

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Sledování změn obsahu cytokininů v průběhu dne  
v semenáčcích *Arabidopsis thaliana***

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Kateřina Cermanová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.</b>
Rok:	2020

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Kateřina Cermanová
Název práce:	Sledování změn obsahu cytokininů v průběhu dne v semenáčcích <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	<p>Tato bakalářská práce se zabývá stanovením endogenních hladin cytokininů v <i>Arabidopsis thaliana</i> v průběhu dne. Tyto rostlinné hormony jsou díky procesům, které ovlivňují, pro růst a vývoj rostliny zásadní a jejich koncentrační hladiny se cyklicky mění v závislosti na denní době. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu v kontrolovaných podmínkách s pevně stanovenou denní a noční fází a desetidenní semenáčky byly sklizeny v předem stanovených intervalech během jednoho dne. Vzorky byly následně purifikovány pomocí StageTip metody a cytokininy a jejich metabolity v nich byly stanoveny pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie v zapojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.</p>
Klíčová slova:	Cytokininy, cirkadiánní rytmus, <i>Arabidopsis thaliana</i> , StageTip purifikace, UHPLC-MS/MS
Počet stran:	59
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Kateřina Cermanová

Title: Monitoring of changes in cytokinin content during the day in *Arabidopsis thaliana* seedlings

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of growth regulators

Supervisor: Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: This bachelor thesis deals with the determination of endogenous levels of cytokinins in *Arabidopsis thaliana* during the day. Due to the processes they affect, these plant hormones are necessary for growth and development of plants and their concentrations change cyclically depending on the time of the day. Plants for the experimental part were grown in phytotron with controlled conditions with a set day and night phase and the ten-day-old seedlings were reaped in set intervals during one day. Samples were purified using the StageTip method and cytokinins and their metabolites were quantified using ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

Keywords: Cytokinins, circadian rhythm, *Arabidopsis thaliana*, StageTip purification, UHPLC-MS/MS

Number of pages: 59

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Lenky Plačkové, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

Kateřina Cermanová

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady, které mi poskytla při vypracování jak teoretické, tak praktické části.

Tato bakalářská práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA\_PrF\_2020\_010)

## OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE .....	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	12
2.1 Objev a historie cytokininů.....	12
2.2 Struktura cytokininů .....	12
2.3 Biosyntéza cytokininů.....	14
2.4 Metabolické přeměny cytokininů .....	17
2.4.1 Glykosylace .....	17
2.4.2 Modifikace postranního řetězce .....	18
2.4.3 Degradace cytokininů .....	19
2.4.4 Deriváty s aminokyselinami .....	20
2.5 Fyziologické funkce cytokininů.....	20
2.5.1 Regulace buněčného cyklu .....	21
2.5.2 Regenerace rostlinných orgánů.....	21
2.5.3 Regulace růstu rostliny .....	21
2.5.4 Apikální dominance a větvení nadzemních částí.....	22
2.5.5 Oddálení senescence listů .....	23
2.6 Transport cytokininů.....	23
2.7 Signální transdukce a receptory cytokininů.....	24
2.8 Interakce cytokininů se světlem.....	26
2.8.1 Interakce s fytochromy .....	26
2.8.2 Interakce s kryptochromy .....	26
2.8.3 Reakce na stín .....	27
2.8.4 Světlo a senescence listů.....	28
2.9 Cytokininy a cirkadiánní rytmus.....	28
2.10 Analýza cytokininů .....	30
3 MATERIÁL A METODY .....	32
3.1 Biologický materiál.....	32
3.2 Použité chemikálie .....	32
3.3 Přístrojové vybavení .....	33
3.4 Příprava biologického materiálu .....	34
3.4.1 Příprava kultivačního média dle Murashige & Skooga.....	34
3.4.2 Výsev, kultivace a sklizení <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
3.4.3 Příprava vzorků.....	35
3.5. Extrakce .....	35

3.6 Purifikace pomocí StageTip metody.....	35
3.6.1 Příprava a aktivace StageTip kolon .....	35
3.6.2 Purifikace a eluce vzorků.....	36
3.7 Identifikace a kvantifikace cytokininů.....	36
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5 ZÁVĚR .....	49
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	50

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7G	<i>N7</i> -glukosidy cytokininů
9G	<i>N9</i> -glukosidy cytokininů
ADP	adenosindifosfát
AHK	<i>Arabidopsis</i> His kinázy
AHP	histidin-transferové proteiny
AMP	adenosinmonofosfát
ARR	regulátory buněčné odpovědi
ATP	adenosintrifosfát
B	cytokininové báze
BA	benzyladenin
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin,
<i>cZ7G</i>	<i>cis</i> -zeatin-7-glukosid
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZR5'MP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>cZROG</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DF	denní fáze
DHZ	dihydrozeatin
DHZ7G	dihydrozeatin-7-glukosid
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid
DHZOG	dihydrozeatin- <i>O</i> -glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DHZR5'MP	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát
DHZROG	dihydrozeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
EC	evening complex
ELF	EARLY FLOWERING
FW	čerstvá hmota



GI	GIGANTEA
HMBPP	4-hydroxy-3-methyl-2-E-butenyl difosfát
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
iP	isopentenyladenin
iP7G	isopentenyladenin-7-glukosid
iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid
iPR	isopentenyladenin ribosid
iPR5'MP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát
IPT	adenylát:isopentenyltransferáza
LHY	ELONGATED HYPOCOTYL
LOG	LONELY GUY
LUX	LUX ARRHYTHMO
MEP	methylerythritol fosfátová dráha
MRM	selektivní záznam více iontových reakcí
MS médium	kultivační médium dle Murashige a Skooga
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MVA	mevalonátová dráha
NT	cytokininové nukleotidy
OG	<i>O</i> -glukosidy cytokininů
phyB	fytochrom B
PRR	pseudoregulátory buněčné odpovědi
QqQ	trojitý kvadrupól
R	cytokininové ribosidy
SDB-RSD	kopolymer poly(styren-divinylbenzen)
SPE	extrakce na pevné fázi
TCS	dvousložkové signální dráhy
TF	temnostní fáze
TOC1	TIMING OF CAB EXPRESSION1
tRNA-IPT	tRNA:isopentenyltransferáza
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid

<i>t</i> ZOG	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
<i>t</i> ZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>t</i> ZR5'MP	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>t</i> ZROG	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
UGT	uridin difosfát glykosyltransferáza
UHPLC-MS/MS	ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotností spektrometrií
ZTL	ZEITLUPE

## 1 ÚVOD A CÍLE

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou definovány jako přirozeně se vyskytující organické látky, které v nízkých koncentracích ovlivňují fyziologické procesy rostlin (Davies, 2010). Na rozdíl od živočišných hormonů jsou méně specifické, ačkoliv mechanismus jejich účinku je obdobný. Nemají přesná místa syntézy a účinku a působí jak endokrinně, tak parakrinně (Procházka *et al.*, 1998).

Cytokininy jsou společně s auxiny považovány za nejdůležitější hormony, protože jsou pro životaschopnost rostlin zásadní. Aktivují dělení buněk v meristémech, snižují apikální dominanci, oddalují senescenci listů, odbourávání chlorofylu a stimulují tvorbu chloroplastů a syntézu fotosyntetických barviv. Dnes je známo více než 70 endogenních látek s cytokininovou aktivitou (Procházka *et al.*, 1998).

Cílem bakalářské práce je vypracovat literární rešerši zabývající se těmito hormony, stanovit množství cytokininů v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* a analyzovat, jak se jejich endogenní hladiny mění v průběhu 24 hodin (den/noc). Získané výsledky mohou podávat informace o syntéze a metabolismu těchto hormonů v souvislosti s cirkadiánním rytmem rostliny.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Objev a historie cytokininů

Důkaz o existenci prvního objeveného cytokininu, kinetinu, byl publikován v roce 1955 po pokusech s autoklávovaným spermatem sledě (Miller *et al.*, 1955). Kinetin se řadí do skupiny aromatických cytokininů, a přestože byla jeho přirozená existence dokázána několika pokusy, a to i v rostlinách, převážně se vyskytuje vázaný na degradaci nukleových kyselin (Barciszewski, 2000). Po testování jeho biologické aktivity byly cytokininy definovány jako látky stimulující buněčné dělení za přítomnosti auxinu (Procházka *et al.*, 1998). Prvním přirozeně se vyskytujícím cytokininem v rostlinách pak byl *trans*-zeatin objevený v nezralém endospermu kukuřice. Z listů topolu byl v roce 1973 izolován 6-(2-hydroxybenzyl amino)-9- $\beta$ -D ribofuranosylpurin, první přirozeně se vyskytující aromatický cytokinin (Horgan *et al.* 1973, 1975). Podle českého názvu byl pro hydroxybenzyladeniny odvozen název topoliny. Tyto látky byly izolovány pomocí ELISA testů založených na interakci specifických protilátek, které umožnily detekovat látky na femtomolární úrovni (Strnad, 1996). I když se aromatické cytokininy v přírodě vyskytují jen omezeně (Strnad *et al.*, 1997), nejhojnějším zástupcem je *meta*-topolin, jehož aktivita je srovnatelná se zeatinem (Holub *et al.*, 1998).

### 2.2 Struktura cytokininů

Cytokininy patří do skupiny organických látek, jejichž struktura je tvořena *N6*-deriváty adeninu. Substitute na aminoskupině je podmínkou jejich biologické aktivity (Procházka *et al.*, 1998). Podle vedlejšího řetězce se cytokininy mohou dělit na dvě skupiny: isoprenoidní a aromatické. Isoprenoidní postranní řetězec může být nasycený nebo převažující nenasycený. Mezi nenasycené isoprenoidní cytokininy patří zeatin, který se vyskytuje zejména v *trans* izomerii jako *trans*-zeatin (*tZ*) a jeho deriváty, dále jeho *cis* izomer *cis*-zeatin (*cZ*) a do skupiny nenasycených cytokininů patří také isopentenyladenin (*iP*; Obr. 1). Kromě výjimek se *cZ* a *iP* v rostlinách vyskytují v menších množstvích. Nasycený vedlejší řetězec se vyskytuje u dihydrozeatinu (*DHZ*; Taiz a Ziegler, 2006).

Mezi aromatické cytokininy mající *N6*-substituent v podobě benzenového jádra patří benzyladenin (*BA*), topoliny a kinetin. Topoliny mohou být substituované v poloze *meta*-, ve které se v přírodě vyskytují nejčastěji a zároveň vykazují nejvyšší aktivitu v biotestech, nebo v poloze *ortho*- a *para*-. Jak *BA*, tak kinetin se řadí i mezi syntetická analoga, protože

se pro laboratorní účely, kde jsou využity především při práci s tkáňovými kulturami, připravují synteticky. Dále sem patří i aromatické deriváty močoviny nebo thiomčoviny, jako jsou thidiazuron, 1,3-difenylmočovina či fenylmočovina (Procházka *et al.*, 1998; Taiz a Zegler, 2006).

General structure of CKs	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Compound	Abbreviation
	H	-	H	<i>N</i> -isopentenyladenine	iP
	N <sub>9</sub> -R	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -isopentenyladenosine	iPR
	N <sub>7</sub> -G	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -isopentenyladenine-7-glucoside	iP7G
	N <sub>9</sub> -G	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -isopentenyladenine-9-glucoside	iP9G
	N <sub>9</sub> -RP	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -isopentenyladenosine-5'-monophosphate	iPMP
	H	H	H	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	N <sub>9</sub> -R	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside	tZR
	N <sub>7</sub> -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-7-glucoside	tZ7G
	N <sub>9</sub> -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glucoside	tZ9G
	H	G	H	<i>trans</i> -zeatin O-glucoside	tZOG
	N <sub>9</sub> -R	G	H	<i>trans</i> -zeatin riboside O-glucoside	tZROG
	N <sub>9</sub> -RP	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	tZMP
	H	H	H	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	R	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside	cZR
	N <sub>9</sub> -G	H	H	<i>cis</i> -zeatin-9-glucoside	cZ9G
	H	G	H	<i>cis</i> -zeatin O-glucoside	cZOG
	N <sub>9</sub> -R	G	H	<i>cis</i> -zeatin riboside O-glucoside	cZROG
	N <sub>9</sub> -RP	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	cZMP
		H	H	H	dihydrozeatin
N <sub>9</sub> -R		H	H	dihydrozeatin riboside	DHZR
N <sub>9</sub> -G		H	H	dihydrozeatin-9-glucoside	DHZ9G
H		G	H	dihydrozeatin O-glucoside	DHZOG
N <sub>9</sub> -R		G	H	dihydrozeatin riboside O-glucoside	DHZROG
N <sub>9</sub> -RP		H	H	dihydrozeatin riboside-5'-monophosphate	DHZMP
		H	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -benzyladenine
	N <sub>9</sub> -R	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -benzyladenosine	BAR
	N <sub>3</sub> -G	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -benzyladenine-3-glucoside	BA3G
	N <sub>7</sub> -G	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -benzyladenine-7-glucoside	BA7G
	N <sub>9</sub> -G	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -benzyladenine-9-glucoside	BA9G
	N <sub>9</sub> -RP	-	H	<i>N</i> <sup>β</sup> -benzyladenosine-5'-monophosphate	BAMP
		H	-	H	<i>ortho</i> -topolin
N <sub>9</sub> -R		-	H	<i>ortho</i> -topolin riboside	oTR
N <sub>9</sub> -G		-	H	<i>ortho</i> -topolin-9-glucoside	oT9G
	H	-	H	<i>meta</i> -topolin	mT
	N <sub>9</sub> -R	-	H	<i>meta</i> -topolin riboside	mTR
	N <sub>9</sub> -G	-	H	<i>meta</i> -topolin-9-glucoside	mT9G
	H	-	H	<i>para</i> -topolin	pT
	N <sub>9</sub> -R	-	H	<i>para</i> -topolin riboside	pTR
	H	-	H	kinetin	K
	N <sub>9</sub> -R	-	H	kinetin riboside	KR
	N <sub>9</sub> -G	-	H	kinetin-9-glucoside	K9G

Obr. 1 Seznam a struktury isoprenoidních a aromatických cytokininů (Svačinová *et al.*, 2012).  
H = vodík; R = β-ribofuranosyl; G = β-D-glukopyranosyl; RP = β-D-ribofuranosyl-5'-monofosfát

Nejaktivnějšími cytokininy jsou volné báze, zvláště nenasycené isoprenoidní formy, navázáním ribózy v poloze *N9*- vznikají ribosidy, jejichž biologická aktivita je oproti volným bazím nižší. V případě navázání fosfátu na *C5*- ribózy vzniká ribotid a dochází k dalšímu snížení aktivity (Procházka *et al.*, 1998). Obě tyto formy vykazují biologickou aktivitu v biotestech, ale v rostlinách mají hlavní význam v regulaci hladiny aktivních forem a pro transport cytokininů (Srivastava, 2002).

Konjugací vedlejšího řetězce cytokininu se sacharidy vznikají *O*-glukosidy. Vznikem *O*-glukosidu cytokininu reversibilně ztrácí aktivitu, čímž je za katalýzy enzymy *O*-glykosyltransferázou a  $\beta$ -glukosidázou regulována hladina aktivních cytokininů. Substráty pro *O*-glykosylaci jsou zeatin, topoliny a hydroxylované deriváty fenylnmočoviny (Brzobohatý *et al.*, 1993; Mok a Mok, 2001).

Glykosylací *N3*-, *N7*- a *N9*- purinového kruhu vznikají *N*-glukosidy. V pozici *N7*- a *N9*- glukosidy nemají žádnou nebo pouze minimální aktivitu, jedná se tedy o ireverzibilně inaktivované formy cytokininů (Letham *et al.*, 1983; Mok a Mok, 2001), zatímco *N3*-glukosid může být za katalýzy  $\beta$ -glukosidázy přeměněn na volnou bázi (Brzobohatý *et al.*, 1993).

### 2.3 Biosyntéza cytokininů

Klíčovým místem biosyntézy cytokininů jsou kořenové vrcholy, odkud jsou do zbylé části rostliny cytokininy transportovány xylémem a dále floémem. Kromě kořenů jsou cytokininy syntetizovány i ve vyvíjejících se embryích, listech a dalších tkáních (Taiz a Ziegler, 2006). Syntéza probíhá dvěma mechanismy – nepřímo z tRNA a přímo přenosem isopentylové skupiny z dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) na adenosindifosfát (ADP) nebo adenosintrifosfát (ATP). Přímá syntéza probíhá dráhou mevalonátovou (MVA) odehrávající se v cytosolu eukaryot nebo dráhou methylerythritol fosfátovou (MEP) odehrávající se v bakteriích a plastidech, jako je tomu například u vyšších rostlin (Sakakibara *et al.*, 2006). V rostoucích, intenzivně se dělících pletivech se cytokininy vyskytují v nejvyšších hladinách, v řádech  $\text{fmol}\cdot\text{g}^{-1}$  až  $\text{pmol}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmoty (fresh weight, FW). Jejich koncentraci ovlivňují i auxiny a ethylen, které potlačují jejich akumulaci (Procházka *et al.*, 1998).

Při biosyntéze cytokininů *de novo* je prvním krokem přenos isoprenoidního zbytku na nukleotid adeninu (AMP, ADP, ATP) v pozici *N6*- za vzniku isopentenyladenosin-5'-

fosfátu. Tento krok zároveň omezuje rychlost biosyntézy. Reakce je katalyzována  $\Delta^2$ -isopentenyl transferázou. V živých organizmech existují dva typy isopentenyltransferázy, které jsou strukturně příbuzné a které se účastní produkce cytokininů (Takei *et al.*, 2001).

Prvním typem je adenylát:isopentenyltransferáza (IPT; EC 2.5.1.27), která zajišťuje syntézu většiny nových cytokininů. Barry *et al.* (1984) a Akiyoshi *et al.* (1984) poprvé identifikovali gen podílející se na syntéze cytokininů *de novo* během tvorby nádorů typu crown gall půdní bakterií *Agrobacterium tumefaciens* jako *Tmr* (tumour morphology root) nacházející se na v T-DNA Ti-plazmidu. Tento gen kóduje IPT, za jejíž katalýzy dochází z adenosinmonofosfátu (AMP) s využitím substrátů DMAPP nebo (2E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl difosfátu (HMBPP) k syntéze isopentenyladenosin-5'-monofosfátu (iPR5'MP) a *trans*-zeatin ribosid-5'-monofosfátu (tZR5'MP; Sakakibara *et al.*, 2005).

Jak MEP dráha, tak i MVA dráha produkuje DMAPP, zatímco HMBPP je meziproduktem pouze MEP dráhy (Sakakibara *et al.*, 2006). Přesto IPT produkovaná *Tmr* majoritně využívá HMBPP, neboť poměr isopentenyl pyrofosfátu a DMAPP vzniklých reakcí katalyzovanou HMBPP reduktázou je 5:1 (Rohdich *et al.*, 2002). Z toho vyplývá, že HMBPP v plastidech je více než množství dostupných DMAPP a Sakakibara *et al.* (2005) tímto odůvodňují převládající obsah cytokininů *tZ*-typu v buňkách napadených *Agrobacterium*.

Druhý typ isopentenyltransferázy je tRNA:isopentenyltransferáza (tRNA-IPT; EC 2.5.1.8), která rozeznává zbytek adeninu obsažený u 3'-konce v pozici 37 antikodonu rozpoznávajícího kodony začínající uracilem. Tento adenin je za její katalýzy modifikován a v pozici N6- může obsahovat isopentenylový nebo *cis*-hydroxy isopentenylový vedlejší řetězec (Mok a Mok, 2001). Po degradaci isoprenylovaných tRNA dochází k uvolnění těchto aktivních forem cytokininů (Miyawaki *et al.*, 2006).

Geny pro rostlinné IPT poprvé identifikovali Takei *et al.* (2001) a Kakimoto *et al.* (2001) v *Arabidopsis thaliana*. Celkem 9 rozdílných genů bylo pojmenováno *AtIPT1-AtIPT9*. Zatímco surové extrakty genů exprimovaných v *Escherichia coli* v experimentech vykazovaly isopentenyltransferázovou aktivitu zužitkující DMAPP a AMP (Takei *et al.*, 2001), po jejich purifikaci došlo ke ztrátě DMAPP:AMP isopentenyltransferázové aktivity (Kakimoto *et al.*, 2001). To bylo vysvětleno možnou přítomností ATP a faktorů *E. coli* s adenylát kinázovou aktivitou katalyzující vznik ADP. Rostlinné IPT spíše než AMP využívají ADP nebo ATP za vzniku isopentenyladenosin-5'-trifosfátu a isopentenyladenosin-5'-difosfátu (Kakimoto *et al.*, 2001).

Miyawaki *et al.* (2006) izolovali mutantní alely všech ATP/ADP IPT i tRNA IPT a provedli experimenty s mutanty vyšších řádů, které objasnily funkce enzymů v biosyntéze cytokininů. Výrazně snížené hladiny iP- a tZ-typů cytokininů, a to včetně ribosidů, ribotidů i glukosidů, u mutantů *atipt3 5 7* a *atipt1 3 5 7* naznačovaly důležitost ATP/ADP IPT pro produkci těchto typů hormonů. Existenci biosyntetické dráhy pro cytokininy cZ-typu, odlišné od dráhy pro iP- a tZ-typ, indikovaly zvýšené hladiny cZ, *cis*-zeatin ribosidu (cZR) a *cis*-zeatin ribosid-5'-monofosfátu (cZR5'MP) u těchto mutantů. Zároveň je tímto podpořena hypotéza negativní regulace degradace cZ signálními drahami cytokininů. Přítomnost tZ-typů cytokininů mohla být způsobena i aktivitou *cis-trans* izomerázy, která ale zatím byla detekována u *Phaseolus vulgaris* (Bassil *et al.*, 1993).

Geny *AtIPT3*, *AtIPT 5* a *AtIPT 7* jsou nejvíce exprimovanými geny pro ATP/ADP IPT ve vegetativní fázi, v menší míře je exprimován i gen *AtIPT1*. Geny *AtIPT4*, *AtIP6* a *AtIP8* za normálních podmínek ve vegetativní fázi exprimovány nejsou. V případě mutací v genu *AtIPT2* a *AtIPT9* byly hladiny iP- a tZ-typů nezměněny, ale cZ-typ nebyl v mutantech detekován vůbec nebo v nižším množství (Miyawaki *et al.*, 2004). Modifikovaná tRNA jako možný zdroj cZ ve formě defosforylovaného hydrolyzátu u mutantu *atipt1 3 5 7* obsahovala nezměněné hladiny jak isopentenyladenin ribosidu (iPR), tak i cZR, ale u *atipt2* bylo množství cZR sníženo. Tím bylo dokázáno, že ATP/ADP IPT se isopentylace tRNA neúčastní, ale jsou klíčové při syntéze cytokininů iP- a tZ-typu (Miyawaki *et al.*, 2006).

Aktivní volné báze vznikají dvěma způsoby. Prvním způsobem je katalýza ribotidů enzymy 5'-ribonukleotid fosfhydroláza (EC 3.1.3.5) a adenosin nukleosidáza (EC 3.2.2.7; Chen *et al.*, 1981a; Chen *et al.*, 1981b). Druhým způsobem je katalýza ribotidů enzymem LONELY GUY (LOG), který poprvé detekovali Kurakawa *et al.* (2007) v meristémeh rostlin rýže (*Oryza sativa*). Enzym má specifitu pro nukleosid 5'-monofosfáty cytokininů, ze kterých uvolní ribosu 5'-monofosfát za vzniku volné báze. Jedná se o klíčový enzym s fosforibohydrolázovou aktivitou regulující místní a časovou distribuci aktivních cytokininů působící v cytosolu. V *Arabidopsis thaliana* se nachází 9 homologů genu *LOG* z rýže, *At LOG1-LOG9*, 7 z nich se nachází v cytosolu a jádře a vykazují stejný enzymatický účinek. Enzymy LOG1, LOG2, LOG3, LOG4 a LOG7 vykazují obdobnou substrátovou specifitu a katalytickou účinnost jako LOG z rýže, zatímco LOG5 a LOG8 mají účinnost nižší. Existuje tedy hypotéza, že tyto dva geny figurují i v jiných metabolických drahách (Kuroha *et al.*, 2009). Expres LOG a IPT se v mnoha místech překrývá, což umožňuje přeměnu na aktivní formy bez translokace do ostatních buněk nebo transportu na delší vzdálenosti, jak se děje



v oblastech, kde exprese těchto genů současně neprobíhá. Například v bočních kořenových primordiích, kořenových a listových vaskulárních pletivech, vajíčkách a ovocných abscisních zónách jsou za katalýzy IPT syntetizovány nukleotidy cytokininů, které jsou dále aktivovány přítomnými LOG (Miyawaki *et al.*, 2004; Kurakawa *et al.*, 2007). Přímá přeměna pomocí LOG je hlavní aktivační dráhou, jež je zároveň klíčovým krokem regulace aktivity cytokininů.

Samotné *tZ* ribotidy mohou být syntetizovány kromě reakce HMBPP s AMP, ADP nebo ATP i hydroxylací isoprenoidního postranního řetězce *iP* ribotidů. Dráha *iPR5*'MP-dependentní zahrnuje enzymy cytochrom P450 monooxygenázy, které byly v *Arabidopsis* identifikovány jako CYP735A1 a CYP735A2. Substrátem těchto enzymů jsou pouze *iP* nukleotidy, primárně *iPR5*'MP a isopentenyladenosin-5'-difosfát, ale ne nukleosidy či volné báze cytokininů. Transkripty obou hormonů jsou negativně regulovány auxiny (Takei *et al.*, 2004).

## 2.4 Metabolické přeměny cytokininů

Metabolismus cytokininů vede k reverzibilní nebo ireverzibilní změně až k ztrátě biologické aktivity a spočívá v modifikaci purinového skeletu, modifikaci *N6*- vedlejšího řetězce anebo jeho štěpení. Různé metabolity mají v organismu různé funkce předurčené jejich strukturou vyskytují se v různých koncentracích, čímž ovlivňují hormonální homeostázi (Spíchal, 2012).

### 2.4.1 Glykosylace

Konjugace molekuly cytokininu se sacharidem vede ke změně jeho aktivity. Glykosylací *N3*-, *N7*- a *N9*- adeninového skeletu vznikají *N*-glukosidy. Jak isoprenoidní, tak aromatické cytokininy jsou v pozici *N7*- a *N9*- ireverzibilně inaktivovány (Letham *et al.*, 1983; Mok a Mok, 2001), zatímco *N3*-glukosid může být za katalýzy  $\beta$ -glukosidázy přeměněn na volnou bázi (Brzobohatý *et al.*, 1993). Enzym podílející se na tomto navázání sacharidu je uridindifosfátglykosyltransferáza (UGT; EC 2.4.1) a poprvé byla ve dvou formách objevena v děložním lístku ředkve seté (*Raphanus sativus*). Zdrojem glukózového zbytku pro tento enzym je UDP-glukóza a TDP-glukóza, substrátem mohou být různé deriváty adeninu, ale míra přeměny je nejvyšší pro sloučeniny s vedlejším řetězcem o délce alespoň 3 uhlíků v pozici *N6*-, což odpovídá struktuře isoprenoidních cytokininů (Entsch a Letham, 1979; Entsch *et al.*, 1979). V *Arabidopsis* byly objeveny dvě UGT (UGT76C1 a UGT76C2) se

specifitou pro cytokininy *in planta* schopné *N*-glykosylace *tZ*, *cZ*, DHZ, iP, BA a kinetinu (Hou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). Glykosylace v *N7*- má oproti pozici *N9*- vyšší enzymatickou specifitu, což vysvětluje majoritní výskyt *N7*- glukosidů. *N*-glukosidy jsou konečnými metabolity cytokininů, což způsobuje jejich akumulaci, především v senescenčních listech (Šmehilová *et al.*, 2016). *N3*-glukosidy v *Arabidopsis* detekovány nebyly (Hou *et al.*, 2004).

Navázáním glukózy nebo xylózy na hydroxylovou skupinu vedlejšího řetězce cytokininu vznikají *O*-glukosidy. *O*-glykosylace je reversibilní konjugace, která inaktivací a ukládáním nadbytečných aktivních cytokininů v rostlinných organismech přispívá k udržení normálního růstu a vývoje (Mok a Mok, 2001). V zásobních tkáních či vyvíjejících se semenech se *O*-glukosidy vyskytují v poměrně vysokých hladinách a jejich zvýšená polarita umožňuje transport konjugátů do vakuol ke skladování (Srivastava, 2002). Konjugáty jsou rezistentní k odštěpení *N6*- vedlejšího řetězce cytokinin oxidázou (McGaw a Horgan, 1983) a mohou být přeměněny zpět na volné báze za katalýzy  $\beta$ -glukosidázy. Enzym s touto aktivitou, ZM-p60, byl poprvé identifikován z kukuřice seté (*Zea mays*; Brzobohatý *et al.*, 1993). V *Arabidopsis* byla nalezena UGT85A1, *O*-glukosyltransferáza s preferencí pro *tZ* (Hou *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2013). Tento cytosolický enzym katalyzuje vznik většiny *trans*-zeatin-*O*-glukosidů (*tZOG*) a je exprimován v raných fázích v semenáčcích, ve vyvíjejících se semenech a v senescenčních listech, kde se tato sloučenina hromadí. Enzym byl dále lokalizován i v jádře, jeho funkce zde ale není objasněna (Jin *et al.*, 2013; Šmehilová *et al.*, 2016).

#### 2.4.2 Modifikace postranního řetězce

Kromě glykosylace může být *tZ* metabolizován na DHZ. Specifická zeatinreduktáza (EC 1.3.1.69) katalyzující redukci postranního řetězce *tZ* v přítomnosti kofaktoru nikotinadeninukleotidfosfát (NADPH) byla ve dvou isoformách identifikována v *Phaseolus vulgaris*. Vzniklý DHZ není substrátem pro cytokininoxidázu/dehydrogenázu, a v organismu tak mohou být zachovány aktivní cytokininy (Martin *et al.*, 1989).

Dalším enzymem metabolizujícím zeatin je *cis-trans* zeatin izomeráza. Byla izolována z fazole (*Phaseolus*) a přeměňuje *cis* izomer v *trans* a umožňuje tak vznik aktivnější formy z *cZ* a *cZR* vzniklých degradací tRNA. Enzym ke své funkci vyžaduje flavin, světlo a dithiothreitol (Bassil *et al.*, 1993).

### 2.4.3 Degradace cytokininů

Degradace cytokininů probíhá oxidativním štěpením postranního řetězce v pozici N6- za vzniku adeninu a aldehydu (Frébortová *et al.*, 2004). Pačes *et al.* (1971) poprvé detekovali enzym katalyzující oxidativní štěpení iPR za vzniku adenosinu u tabáku (*Nicotiana tabacum*), Whitty a Hall (1974) popsali obdobnou enzymovou aktivitu u kukuřice seté (*Zea mays*) a nazvali enzym cytokininoxidáza. Při reakci elektronový akceptor odebírá dva elektrony z flavinového kofaktoru a cytokinin je dehydrogenován na iminový meziprodukt. Hydrolyzou z meziproductu vzniká adenin, v případě cytokininu s N9- substitucí odpovídající derivát, a aldehyd z postranního řetězce (Brownlee *et al.*, 1975; Frébort *et al.*, 2011). Kromě molekulárního kyslíku, jež byl po objevu enzymu považován za esenciální, elektrony mohou přijímat i jiné akceptory elektronů, některé i za anaerobních podmínek. Například analog ubiquinonu 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon zvyšuje aktivitu enzymu i v mikromolárních koncentracích (Galuszka *et al.*, 2001). Enzym byl přejmenován na cytokinindehydrogenázu, někdy označovanou jako cytokininoxidáza/dehydrogenáza, (CKX, EC 1.5.99.12) a studiem sekvence klonovaného proteinu ZmCKX1 z kukuřice bylo objeveno vazebné místo pro flavinadenindinukleotid (FAD). Jelikož je toto vazebné místo přítomno u FAD-dependentních oxidoreduktáz využívajících různé akceptory elektronů, byla CKX zařazena mezi oxidoreduktázy (Frébortová *et al.*, 2004). Buněčné rozmístění flavoproteinu ZmCKX1 v aleuronové vrstvě zrn, embryích a tkáních pediklu je shodné s výskytem enzymu lakáza (EC 1.10.3.2). Lakáza je oxidáza, která produkuje chinonový elektronový akceptor z fenolových sloučenin v místech syntézy buněčné stěny, jež je použit k reoxidaci ZmCKX1. V tomto modelu katabolismu cytokininů mohou kromě lakázy vystupovat i jiné enzymy produkující chinony v apoplastu, jako jsou například peroxidázy (Galuszka *et al.*, 2005).

Enzym CKX je jediný známý enzym schopný katalýzy ireverzibilní inaktivace cytokininů. Všechny rostlinné CKX obsahují kovalentně vázaný FAD kofaktor navázaný přes 8-methyl isoallaxasinového skeletu na zbytek His u N-konce (Malito *et al.*, 2004). Asi třetina pozic aminokyselin je vysoce konzervována, značná část konzervovaných oblastí je lokalizovaná ve FAD vazebné doméně, kratší motivy se nacházejí i u N- a C-konce. Určením hodnot  $K_m$  různých substrátů experimenty s ZmCKX1 bylo zjištěno, že volné báze a jejich ribosidy jsou preferovanými substráty, jejichž afinita závisí na pH (Schmülling *et al.*, 2003). Alifatické i aromatické postranní řetězce vstupují do úzkého póru vedoucího do aktivního místa ZmCKX, kde dochází k oxidativnímu štěpení, zatímco adeninová část cytokininu

vyčnívá na povrchu proteinu (Popelková et al., 2006). *O*-glukosidy substráty CKX nejsou (McGaw a Horgan, 1983).

V *Arabidopsis thaliana* bylo detekováno sedm genů kódujících CKX, *AtCKX1-AtCKX7*. Enzymy *AtCKX1-AtCKX6* obsahují *N*-terminální signální peptidy a jsou cíleně vylučovány do místa jejich působení: *AtCKX2*, *AtCKX4*, *AtCKX5* a *AtCKX6* do apoplastu a *AtCKX1* a *AtCKX3* do vakuoly. Isoforma *AtCKX7* signalizační sekvenci neobsahuje a jedná se o enzym působící v cytosolu (Werner *et al.*, 2003). Nejvíce aktivními enzymy jsou *AtCKX2* a *AtCKX4*, které jsou fylogeneticky nejbližší *ZmCKX1* a jako substráty preferují volné báze v neutrálním a mírně zásaditém pH. Pro ribosidy a *N*-glukosidy má nejvyšší preferenci *AtCKX1*, jehož aktivita je nejvyšší při slabě kyselém pH, což odpovídá lokalizaci enzymu ve vakuole. V cytoplasmě má pro *N*-glykosidy preferenci *AtCKX7*. Isoforma *AtCKX3* s největší pravděpodobností degraduje cytokininové nukleotidy (Schmülling *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2007). Zatímco žádný z enzymů nevykazuje vysokou aktivitu pro aromatické cytokininy, přirozeně se vyskytující hydroxyderiváty BA degradovány jsou, ale mnohem pomaleji oproti isoprenoidním cytokininům, jak bylo ukázáno u pšenice (Laloue a Fox, 1989).

#### **2.4.4 Deriváty s aminokyselinami**

Ze semen lupiny žluté (*Lupinus luteus*) byla izolována transferáza (EC 4.2.99.13) schopná přeměny zeatinu na jeho 9-alanyl derivát zvaný kyselina lupinová. Zbytek aminokyseliny je přenesen z *O*-acetyl-L-serinu na sloučeniny s vysokou cytokininovou aktivitou (Entsch *et al.*, 1983; Mok a Mok, 2001).

### **2.5 Fyziologické funkce cytokininů**

Jako rostlinné hormony cytokininy pozitivně i negativně regulují řadu vývojových a fyziologických procesů. Ovlivňují buněčné dělení, vznik a regeneraci orgánů, oddalují senescenci listů, hrají roli při klíčení semen a při reakcích na stres, stimulují tvorbu a aktivitu stonkového meristému, inhibují růst a větvení kořenů a napomáhají zvyšovat kapacitu sinku pletiv (Skoog a Miller, 1957; Gan a Amasino, 1995; Kerstetter a Hake, 1997; Tanaka *et al.*, 2006; Schaller *et al.*, 2014).

### 2.5.1 Regulace buněčného cyklu

V závislosti na jejich koncentraci mohou mít cytokininy jak pozitivní, tak negativní regulační účinky. Mnohé procesy ovlivněné cytokininy probíhají v optimální koncentraci a po jejím překročení dochází ke změnám účinků. V nižších endogenních koncentracích cytokininy aktivují mitózu a buněčné dělení, ale ve zvýšených koncentracích dochází k jejich inhibici a k endoreduplikaci. Vysoké hladiny aktivních cytokininů jsou obsaženy v intenzivně se dělících meristematických pletivech (Schaller *et al.*, 2014).

V kultuře synchronizovaných BY-2 buněk tabáku byla pozorována oscilace hladin endogenních cytokininů s vrcholy v bodech přechodu fází buněčného cyklu. V každém bodu byl akumulován *tZ*, ale ostatní cytokininy se na tvorbě vrcholů nepodílely ve stejné míře. Během samotných G1, S, G2 a M fází se veškeré cytokininy vyskytovaly v nízkých hladinách, k jejich kontrole přispívala degradace CKX. Po přidání exogenních cytokininů či inhibici biosyntézy v případě zesílení kolísání byl postup buněčného cyklu podporován, ale v případě snížení amplitud kolísání byl zpomalen (Hartig a Beck, 2005).

Přechod mezi fázemi v buněčném cyklu je koordinován aktivitou cyklin-dependentních kináz a jejich regulačními podjednotkami – cykliny. Tyto komplexy řídí postup do další fáze fosforylací příslušných proteinů. Negativní regulaci buněčného cyklu řídí inhibitory cyklin-dependentních kináz (Francis, 2007; Kumar a Larkin, 2017). Geny kódující cyklin-dependentní kinázy, které jsou aktivní za přítomnosti cytokininů, regulují i auxiny (Zhang *et al.*, 1996).

### 2.5.2 Regenerace rostlinných orgánů

Společně s auxiny jsou cytokininy nezbytné pro buněčné dělení v tkáňových kulturách. Výsledný vývoj závisí na poměru těchto spolupůsobících hormonů. Při vyrovnané koncentraci obou hormonů dochází k růstu kalusu, tedy nediferencovaného pletiva. V případě vyšší koncentrace cytokininů dochází k růstu nadzemní části rostliny, v opačném případě z tkáňové kultury porostou kořeny (Skoog a Miller, 1957).

### 2.5.3 Regulace růstu rostliny

Ve vývoji stonkového a kořenového meristému, vysoce specializovaných skupinách buněk, ze kterých dochází k růstu rostliny, hrají cytokininy významnou roli (Kerstetter a Hake, 1997).

Nadexpresí CKX genu, narušením IPT genů či cytokininových receptorů dochází k menšímu stonkovému meristému, což naznačuje, že zde jsou cytokininy pozitivními regulátory proliferace buněk (Werner *et al.*, 2003; Higuchi *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Miyawaki *et al.*, 2006). Pro zřízení a udržení stonkového meristému jsou nezbytné KNOTTED-LIKE transkripční faktory, které jsou v meristému exprimovány. Funkci stonkového meristému regulují relativní hladinou cytokininů a giberelinů. Snižují hladiny giberelinů represí exprese genů účastnících se jejich biosyntézy a indukci exprese genů jejich katabolismu. Zároveň zvyšují hladinu cytokininů indukci exprese *IPT7* (Kieber a Schaller, 2014). V *Arabidopsis* byl lokalizován příbuzný gen *SHOOT MERISTEMLESS* (Long *et al.*, 1996). Ke zvýšeným cytokininovým koncentracím přispívá i v meristému lokalizována exprese *LOG* genů. Pro strukturní a funkční celistvost stonkového meristému jsou dále nezbytné transkripční faktory *WUSCHEL* (Laux *et al.*, 1996).

Zatímco snížená aktivita cytokininů v *Arabidopsis* vede k nižšímu vzrůstu nadzemní části, kořenový meristém je zvětšený, s vyšším počtem laterálních kořenů (Werner *et al.*, 2003; Miyawaki *et al.*, 2006). Vlastnost cytokininů inhibovat růst a vývoj objevili Skoog a Miller (1957). V *Arabidopsis* délku kořene cytokininy regulují lokalizací diferenciací dělicích se buněk vzniklých z buněk meristému (Dello Ioio *et al.*, 2007). Ustálená rovnováha mezi dělicími a diferencujícími se buňkami závisí na protichůdných účincích cytokininů a auxinů, které podporují dělení meristému (Blilou *et al.*, 2005). Zvýšená hladina cytokininů vede k distálnímu posunu zón meristému, čímž dochází ke zkrácení meristému a délky kořene, snížené množství cytokininů naopak vede k posunu zón proximálně, zvětšení meristému a tím pádem zdelšení kořene. Transkripční faktor *PHABULOSA* z rodiny HD-ZIPIII se váže na regulační oblasti *IPT7* DNA a funguje jako její aktivátor. Zpětnou represí cytokininy inhibují gen *PHABULOSA* a zároveň i jeho represor microRNA165. Tato regulační smyčka určuje výslednou rovnováhu mezi diferenciací a dělení buněk (Dello Ioio *et al.*, 2012). Dále se regulace účastní transkripční faktor *SCARECROW* jako aktivátor microRNA165 (Carlsbecker *et al.*, 2010).

#### **2.5.4 Apikální dominance a větvení nadzemních částí**

V intaktních rostlinách vykazuje vzrostný vrchol stonku apikální dominanci a potlačuje tak růst postranních větví. Auxiny negativně regulují lokální biosyntézu cytokininů v úžlabních pupenech kontrolou exprese *IPT*, jak bylo popsáno u hrachu (*Pisum sativum*). Po dekapitaci stonku dochází k uvolnění inhibice, syntéze cytokininů ve stonku a růstu axilárních pupenů

(Tanaka *et al.*, 2006). U *Arabidopsis* Miyawaki *et al.* (2004) naopak prokázali „up regulaci“ *AtIPT5* a *AtIPT7* exogenními auxiny.

### 2.5.5 Oddálení senescence listů

Senescence je děj programované degradace, který vede ke smrti. Je iniciována jak vnitřními, tak vnějšími faktory a dochází při ní k zastavení fotosyntézy, rozpadu chloroplastů a hydrolýze mnohých buněčných proteinů, sacharidů a nukleových kyselin. Vzniklé aminokyseliny, sacharidy a nukleosidy jsou ze senescenčních orgánů transportovány floémem a znovu využity při syntéze (Taiz a Ziegler, 2006). Richmond a Lang (1957) prokázali pozitivní vliv exogenního kinetinu na obsah chlorofylu v listech a tím jeho schopnost oddalovat senescenci.

Důkaz, že zpožděná senescence je následkem zvýšené hladiny cytokininů, a ne následkem sekundárních vlivů provedli Gan a Amasino (1995) při experimentech s nesmrtelnými rostlinami. Systém inhibice byl založen na negativně autoregulované specifické produkci cytokininů v senescenčních listech. Promotor genu asociovaného se senescencí byl připojen k *IPT* za tvorby chimerického genu. Na počátku senescence promotor aktivoval expresi *IPT* a hladina cytokininů se zvýšila na množství schopné proces oddálit, čímž došlo k atenuaci transkripce z promotoru zabraňující jejich nadprodukcí. Při omezeném množství cytokininů opět došlo k senescenci a celý proces fungoval ve zpětnovazebné smyčce, jež dokazuje funkci cytokininů při oddalování senescence (Gan a Amasino, 1995).

## 2.6 Transport cytokininů

Primárně jako *tZ* ribosidy jsou cytokininy transportovány xylémem z kořenů do stonku, zde ovšem ale nejsou nezbytné pro normální růst (Kiba *et al.*, 2013). V přítomnosti nitrátu hladina cytokininů v kořeni narůstá a transport těchto cytokininů může představovat signál na dlouhé vzdálenosti s cílem koordinace vývoje kořene a stonku (Takei *et al.*, 2004). Především cytokininy iP-typu jsou transportovány ze stonku do kořenů floémem (Corbesier *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2007). V *Arabidopsis* probíhá symplastickou cestou a reguluje výskyt cévního řečiště a transport auxinů (Bishopp *et al.*, 2011).

Kromě transportu na dlouhou vzdálenost jsou cytokininy také transportovány přes plasmatickou membránu. Z *Arabidopsis* byly izolovány purinové transportéry AtPUP1 a

AtPUP2 patří do rodiny purinových permeáz. Tyto protonové vysokoafinitní transportní systémy přes membránu přenáší jak volné cytokininy, tak adenin. Transportér AtPUP1 je exprimován v epithemu hydatod, kde pravděpodobně zachycuje nukleové báze a jejich deriváty a zabraňuje jejich sekreci během gutace. Exprese AtPUP2 byla lokalizována ve floému listů, kde transportér může být zapojen do transportu na delší vzdálenosti (Bürkle *et al.*, 2003; Kieber a Schaller, 2018).

Dalšími pro cytokininy nescifickými transportéry jsou ENT (equilibrative nucleoside transporter) transportéry pro nukleosidy. Genom *Arabidopsis* zahrnuje 8 isoform ENT, z nichž AtENT3, AtENT6 a AtENT7 transportují purinové i pyrimidinové nukleosidy (Wormit *et al.*, 2004). Transportéry AtENT3 a AtENT6, stejně jako AtENT8, se navíc účastní transportu cytokininových ribosidů. Větší afinitu tyto proteiny vykazují pro iPR než tZR (Sun *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2007).

## 2.7 Signální transdukcce a receptory cytokininů

K přenosu cytokininového signálu v rostlinách slouží dvousložkové signální dráhy (two-component system, TCS) a percepce s následnou transdukcí je tak velmi podobná signálním drahám bakterií (Stock *et al.*, 2000). Geny kódující proteiny TCS se v *Arabidopsis* nacházejí jako genové rodiny a obsahují His kinázy (*Arabidopsis* histidine kinase, AHK), histidin-transferové proteiny (*Arabidopsis* His-containing phosphotransfer proteins, AHP) a regulátory buněčné odpovědi (*Arabidopsis* response regulators, ARR). Receptory AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4 (Cytokinin response 1, také nazývaný WOL – Wooden leg) mají transmembránové domény s extracytosolickou a cytosolickou oblastí a tvoří dimery. Princip vícestupňového přenosu signálu je založen na postupném přenosu fosfátu cestou His-Asp-His-Asp (West a Stock, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Kieber a Schaller, 2018). Většina receptorů se nachází v endoplasmatickém retikulu a hlavní roli při percepci signálu hrají zejména intracelulární cytokininy. Menší množství receptorů se nachází na cytoplasmatické membráně, kde dochází k transdukcí signálu extracelulárních cytokininů (Lomin *et al.*, 2012).

Rozeznání cytokininů probíhá na CHASE (Cyclase/His Kinase Associated Sensor Extracellular) doméně lokalizované u N-konce AHK, čímž dojde ke změně konformace AHK a k autofosforylaci His. Následně je fosfát intramolekulárně přenesen na Asp druhé z intracelulárních domén a dále přenesen na His AHP, který migruje mezi cytoplasmou a buněčným jádrem. Distribuce AHP zůstává nezměněna po ošetření cytokininu nebo při



genetickém nebo molekulárním narušení signální dráhy cytokininů, což naznačuje, že AHP jsou aktivně transportovány do a z jádra nezávisle na jejich fosforylaci. Jejich lokalizace dynamicky cykluje (Punwani *et al.*, 2010). Z AHP je po vstupu do jádra, kde se nachází většina ARR, fosfát přenesen na Asp přijímací domény ARR (Stock *et al.*, 2000; Lomin *et al.*, 2012).

Transdukce signálu cytokininů v *Arabidopsis* se účastní dva typy ARR. Transkripčními faktory jsou ARR typu B obsahující doménu u N-konce, která přijímá fosfát, a doménu u C-konce s B motivem zodpovědným za vazbu na DNA a za jadernou lokalizaci ARR (Sakai *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 2001; Hosoda *et al.*, 2002). Transkripční faktor je aktivován fosforylací a reguluje, typicky aktivuje, transkripci genů primární odpovědi, tedy ARR typu A (Brandstatter a Kieber, 1998; Lohrmann *et al.*, 2001). Regulace ARR typu A nastává ve fázi iniciace transkripce (Romanov, 2009) a jejich exprese je rychle a přechodně aktivována přítomností cytokinů (Brandstatter a Kieber, 1998), zatímco exprese ARR typu B cytokininy stimulována není (Rashotte *et al.*, 2003). Geny ARR typu A obsahují doménu u N-konce, která může přijmout fosfát z AHP, ale transkripci nespouštějí, a tak dochází k její negativní regulaci. Inhibice spočívá v kompetici o fosfát mezi oběma typy ARR (To *et al.*, 2004; Lomin *et al.*, 2012).

Receptory *in vivo* mají částečně redundantní funkci a mutace v jednom z nich nemá na výsledný fenotyp znatelný účinek. Mutace ve dvou už je znatelná a v případě inaktivace všech tří receptorů dochází ke ztrátě citlivosti k cytokininům a rostlina je trpasličího vzrůstu, sterilní a má omezenou životaschopnost (Higuchi *et al.*, 2004). Receptor CRE1/AHK4 je exprimován převážně v kořenech a má vysokou afinitu pro iP i tZ. Na rozdíl od CRE1/AHK4 má AHK3 exprimovaný především v listech nízkou afinitu k iP, a tak reaguje především na tZ z xylému a DHZ. Oba receptory jsou schopné vázat cZ, avšak s nižší afinitou (Romanov *et al.*, 2006; Romanov, 2009). Glykosylace cytokininů blokuje jejich navázání na receptory (Spíchal *et al.*, 2004).

Redundantní funkci při transdukci mají i AHP. Působí aditivně, mutant všech pěti genů kódujících AHP v *Arabidopsis* vykazuje omezenou citlivost k cytokininům. Klíčovou roli při přenosu signálu hrají AHP1, AHP2, AHP3 a AHP5 (Hutchinson *et al.*, 2006), AHP6 patří mezi pseudo AHP, který strukturou připomíná ostatní AHP, ale neobsahuje His nezbytný pro přenos fosfátu. Protein se váže na ARR, tím znemožňuje jejich interakci s AHP nesoucími fosfát a funguje jako negativní regulátor transdukce cytokininů (Mähönen *et al.*, 2006).

## 2.8 Interakce cytokininů se světlem

Světlo se společně s cytokininy v rostlinách podílí na několika procesech. Jelikož jsou rostliny přisedlé organismy, jsou pro své přežití závislé na fotosyntéze, a proto se na světelné změny svého okolí různě adaptují. K absorpci světla o různých vlnových délkách mají několik druhů fotoreceptorů. Fytochromy určují odpovědi na červené a dlouhovlnné červené světlo, kryptochromy na světlo modré (Chen *et al.*, 2004). Společný vliv světla a fytohormonů může být synergický, aditivní či antagonický (Nováková *et al.*, 2005)

### 2.8.1 Interakce s fytochromy

Fotomorfogeneze, regulace vývoje rostlin světlem, může být částečně napodobena aplikací exogenních cytokininů (Chory *et al.*, 1994) nebo zvýšením endogenní hladiny aktivních cytokininů u transgenních rostlin. Biologicky aktivní cytokininy indukují biogenezi chloroplastů a výsledný fenotyp rostlin je podobný jako při deetiolaci indukované světlem (Lochmanová *et al.*, 2008). K aktivaci tohoto procesu jsou nezbytné TCS (Argyros *et al.*, 2008). Fotoreceptor červeného světla, fytochrom B (phyB), interaguje s ARR4, který patří mezi ARR typu A. Akumulace ARR4 vede ke vzniku komplexu phyB:ARR4 v jádře nebo v cytoplasmě a ARR4 navázaný na N-konci stabilizuje aktivní Pfr formu phyB inhibicí jeho reverze zpět na neaktivní Pr formu (Kircher *et al.*, 1999; Sweere *et al.*, 2001). Pfr forma fytochromu stimuluje klíčení semen a růst listů, a naopak inhibuje etiolaci a kvetení rostlin (Nobel, 2009). Ke konverzi phyB je potřeba, aby byl ARR4 fosforylovaný, k čemuž dochází transdukci signálu cytokininu přes ARR typu B (Sweere *et al.*, 2001).

### 2.8.2 Interakce s kryptochromy

Po přidání cytokininů ke klíčícím semenům dochází k podobným odezvám jako při fotomorfogenezi způsobené kryptochromy v modrém světle – k inhibici růstu hypokotylu, expanzi listů a dělohy a expresi světlem regulovaných genů. Předpokládá se, že funkce kryptochromů spočívá v přenosu elektronů závislém na modrém světle (Zeugner *et al.*, 2005), což vede ke konformačním změnám, které umožňují interakci s dalšími signálními molekulami, jako je E3 ubiquitinligáza COP1 (constitutive photomorphogenic 1; Yang *et al.*, 2001). Tento centrální gen fotomorfogeneze rostlin funguje jako negativní regulátor interagující s pozitivními regulátory fotomorfogeneze, jako je HY5, které degraduje. Regulace hladiny HY5 je považována za primární signální mechanismus kryptochromů (Ang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001). Kryptochromy, stejně jako fytochrom A v dlouhovlnné

červené oblasti, také indukují akumulaci anthokyanů (Ahmad *et al.*, 1995; Hoecker *et al.*, 1998; Vandenbussche *et al.*, 2007), fialově zbarvených pigmentů syntetizovaných jako odezva na světlo a stres (Chalker-Scott, 1999).

K inhibici růstu hypokotylu účinkem cytokininů dochází ve tmě a proces je do značné míry nezávislý k účinkům způsobeným kryptochromy v modrém světle (Vandenbussche *et al.*, 2007). Cytokininy obvykle způsobují vzrůst produkce ethylenu stabilizací enzymu katalyzujícího první krok biosyntézy ethylenu, a tudíž indukují tzv. trojí efekt (Chae *et al.*, 2003). Kromě této cesty, která probíhá především ve tmě, cytokininy zprostředkovávají inhibici růstu hypokotylu i cestou probíhající zejména za světla a nezahrnující ethylen. Obě tyto odlišné cesty působí aditivně k účinkům způsobeným kryptochromy (Vandenbussche *et al.*, 2007).

I cytokininy stimulují biosyntézu anthokyanů (Deikman a Hammer, 1995). Tato stimulace vyžaduje světlo a modré světlo působí v tomto případě neefektivněji. Regulace akumulace spočívá v působení cytokininů v signální dráze kryptochromů, částečně regulací HY5. Transkripční faktor HY5 je zodpovědný za přenos světelných signálů k promotorům genů účastnících se biosyntézy anthokyanů a dochází tak k pozitivní regulaci stejných transkriptů jako u indukce světlem (Deikman a Hammer, 1995; Vandenbussche *et al.*, 2007).

### **2.8.3 Reakce na stín**

Rostliny *Arabidopsis* zastíněné vyššími rostlinnými patry vnímají redukci v poměru červeného a dlouhovlnného červeného světla jako varovný signál indukující vývojové reakce na stín. Dochází ke zvýšené elongaci stonků na úkor vývoje listů (Ballaré, 1999; Carabelli *et al.*, 2007), díky čemuž mohou přerůst okolní stínící rostliny (Casal a Smith, 1989). Zmenšené listy jsou důsledkem redukovaného počtu buněk, neboť nižší podíl červeného světla redukuje frekvenci jejich dělení. Signálem pro tuto odpověď odehrávající se především v počátečních žilních buňkách vyvíjejících se primordií jsou auxiny. Auxiny indukují expresi AtCKX6, která degraduje cytokininy a proliferace buněk je snížena (Carabelli *et al.*, 2007).

Do zastíněných listů rostlin je navíc xylémem transportováno méně cytokininů než do listů rostlin vystavených světlu, díky jejich omezené rychlosti transpirace. Stín i snížená transpirace redukuje fotosyntetickou kapacitu rostlin (Boonman *et al.*, 2007).

#### 2.8.4 Světlo a senescence listů

Jak světlo, tak cytokininy se účastní regulace procesu senescence, dochází k jejich interferenci (Chory *et al.*, 1994, Zdarska *et al.*, 2015) a jejich signální dráhy sdílejí několik společných intermediátů (Sweere *et al.*, 2001; Vandebussche *et al.*, 2007). Senescence regulována cytokininy je zprostředkována především receptorem AHK3 a ARR typu B (Kim *et al.*, 2006), regulace světlem ovlivňuje fotosyntézu (Brouwer *et al.*, 2014).

Za světla je stimulována biosyntéza iP, zatímco biosyntéza tZ je snížena. Pro udržování funkce fotosyntetického aparátu za tmy jsou pravděpodobně nejdůležitější cytokininy ve formě iP, tZ a jejich ribosidů. Světlo tedy může ovlivňovat obsah chlorofylu a funkci fotosyntetického aparátu údržbou biosyntézy iP (Janečková *et al.*, 2018).

Při dysfunkci receptoru AHK3 dochází u rostlin k nižšímu obsahu chlorofylu (Riefler *et al.*, 2006; Danilova *et al.*, 2014). Po vystavení mutantů světlu ale k poklesu nedochází, a světlo tak nahrazuje nedostatečnou signalizaci cytokininů, případně může negativní efekt dysfunkčního AHK3 zvrátit (Janečková *et al.*, 2018).

Bazální aktivitu cytokininů pro udržení esenciálních fyziologických procesů za podmínek nedostatku energetických zdrojů vedoucích k „down regulaci“ aktivních forem představují cytokininy cZ-typu (Gajdošová *et al.*, 2011). Senescence je jedním z faktorů indukujících tyto podmínky a dochází při ní k vzrůstu obsahu cZ, zejména za tmy. Obsah cZ tedy roste, když fotosyntetický výkon klesá (Šmečilová *et al.*, 2016; Janečková *et al.*, 2018). Receptor AHK3 má k cZ afinitu a je jím aktivován, což potvrzuje roli receptoru ve zprostředkovávání jeho signálu (Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006).

## 2.9 Cytokininy a cirkadiánní rytmus

U většiny organismů se vyvinul vnitřní mechanismus schopný rozpoznat 24hodinové periodické výkyvy environmentálních podmínek. U rostlin jsou tyto cirkadiánní hodiny, které synchronizují fyziologii organismu s okolním prostředím, nezbytné pro růst a vývoj (Más, 2005). K regulaci cirkadiánního rytmu v *Arabidopsis* přispívají prvky z TCS, které synchronizují buněčné a fyziologické procesy s denní dobou přenosem informací o množství a kvalitě dostupného světla. Intervaly světla a tmy seřizují cirkadiánní oscilace a modulují fáze cirkadiánních hodin organismu tak, aby ladily s časem okolí. Na udržování správného průběhu oscilací se v *Arabidopsis* podílí ARR3 a ARR4, ARR typu A, ovlivňováním exprese, aktivity a stability dalších proteinů (Salomé *et al.*, 2006). Regulátory aktivují phyB, který dále interaguje s PIF4 a PIF5 z rodiny basic helix-loop-helix proteinů. Ty fungují jako

transkripční faktory pro geny asociované s hormony. Jedním z nich je CKX5, který může ovlivňovat denní a fotoperiodický růst (Nomoto *et al.*, 2012). Mechanismus může probíhat i nezávisle na phyB (Salomé *et al.*, 2006) a po ošetření cytokininu dochází k většímu posunu fáze než periodicity (Hanano *et al.*, 2006).

Komponenty centrálního oscilátoru se dělí do tří skupin. Jsou to transkripční faktory, pseudoregulátory buněčné odpovědi (pseudoresponse regulators, PRR) a komplex proteinů evening complex (EC), které se navzájem regulují svou expresí a funkcí a tvoří propojenou smyčku zpětné vazby (Salomé *et al.*, 2006). Transkripční faktory *Arabidopsis* ELONGATED HYPOCOTYL (LHY; Schaffer *et al.*, 1998) a CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1; Wang a Tobin, 1998) jsou exprimované v ranních hodinách. Tyto faktory negativně regulují expresi PRR TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1), jehož exprese probíhá večer, vazbou na oblast promotoru *TOC1* (Alabadí *et al.*, 2001). Protein TOC1 naopak funguje jako jejich represor, aby nedocházelo k jejich expresi v noci (Huang *et al.*, 2012; Pokhilko *et al.*, 2012). Faktory LHY a CCA1 dále aktivují expresi *PRR7*, *PRR9* a *PRR5/NI*, které mají redundantní funkci, ale jsou exprimovány v různé denní dobu. Jako transkripční represory zpětně inhibují expresi LHY a CCA1 (Nakamichi *et al.*, 2005; Nakamichi *et al.*, 2010). Represivní funkce PRR je tlumena komplexem EC, jež se skládá z EARLY FLOWERING (ELF) 3, ELF4 a LUX ARRHYTHMO (LUX; Helfer *et al.*, 2011; Nusinow *et al.*, 2011). Pouze LUX se váže přímo na promotory cílových genů, jako jsou PRR, *PIF4* a *PIF5*, ale ELF3 je nezbytný pro tvorbu komplexu z LUX a ELF4 a celkovou funkci EC. Represí PRR je za svítání umožněn nástup LHY a CCA1 a celý cyklus je tak zahájen znovu (Nusinow *et al.*, 2011). Protein LUX se navíc váže i na svůj vlastní promotor a tvoří tak negativní autoregulační smyčku (Helfer *et al.*, 2011).

Dodatečnou negativní smyčku s TOC1 tvoří ZEITLUPE (ZTL) a GIGANTEA (GI). F-box protein ZTL jako součást E3 ubiquitinligázy kontroluje degradaci TOC1 proteosomem a k udržení jeho správné oscilace je nezbytný GI. Pomocí protein-protein interakce, která je zvýšena modrým světlem, dochází ke stabilizaci ZTL ve specifických časech cirkadiálního cyklu (Kim *et al.*, 2007).

Několik genů cirkadiálních hodin je regulováno cytokininu v závislosti na světle s využitím phyB a ARR4. Expese LHY a CCA1 je cytokininu specificky indukována, zatímco při expresi TOC1 cytokininu působí jako represory. Regulační smyčka cytokininu ovlivněna není, dochází pouze k posunu fáze a pozměnění amplitudy oscilace. Naopak phyB, LHY i CCA1 mohou působit jako pozitivní regulátory při signalizaci cytokininů (Zheng *et al.*, 2006). Dalším propojením mezi cytokininu a cirkadiálním systémem je

represe exprese *ARR6*, *ARR7*, *CKX5*, *CRF4* a *CFRF5*, genů souvisejících s cytokininy, komplexem EC (Ezer *et al.*, 2017).

V listech tabáku (*Nicotiana tabacum*) pěstovaných 16 h na světle a 8 h ve tmě byly sledovány hladiny cytokininů během dne. Suma aktivních forem cytokininů měla hlavní vrchol po 9 h na světle, tedy hodinu po středu světelné periody. Druhé nejvyšší maximum bylo detekováno po přechodu do temnostní fáze a další zvýšení nastalo na začátku denní fáze. Suma všech cytokininů v průběhu dne za světla vzrůstala až do 9. hodiny a poté docházelo k ostrému poklesu. Po přechodu do tmy nastal další pík a v průběhu temnostní periody hladina cytokininů postupně klesala. Degradační enzym CKX vykazoval nejvyšší aktivitu 3 hodiny po přechodu ze tmy na světlo a po poledním maximu. Vždy tak následovala maxima aktivních cytokininů (Nováková *et al.*, 2005).

Maxima *N*-glukosidů se shodovala s dvěma nejvyššími koncentracemi aktivních cytokininů. Hladina zásobních *O*-glukosidů vrcholila při přechodu mezi temnostní a denní fází a poté opět klesala, což korelovalo s aktivitou  $\beta$ -glukosidázy. Ta byla nejvyšší hodinu po přechodu fází (Nováková *et al.*, 2005).

Hlavní maximum auxinů také nastalo po 9 hodinách. Protože pro buněčné dělení jsou nezbytné jak cytokininy, tak auxiny, je možné, že je zahájeno právě v tento čas (Nováková *et al.*, 2005).

## 2.10 Analýza cytokininů

K vysvětlení role cytokininů v růstu a vývoji rostlin je nutné je stanovit a kvantifikovat jejich množství v rostlinných materiálech. Tyto fytohormony jsou v rostlinách přítomny ve velmi nízkých koncentracích, pohybující se v rozmezí pmol – fmol na 1 g FW. Analýzu navíc může ovlivnit velké množství interferujících sloučenin, které se v komplexních extraktech také vyskytují. Je tedy nutné zvolit vhodnou kombinaci extrakčního a purifikačního protokolu a analytické koncovky s dostatečnou selektivitou a citlivostí (Ljung *et al.*, 2010).

Výběr analytického stanovení je závislý na chemických a fyzikálních vlastnostech cytokininů. Jedná se o slabé báze a změnou pH prostředí, ve kterém se nachází, je možné je ionizovat. V rozmezí pH 6 – 8 se cytokininy chovají jako neutrální sloučeniny. Při pH nižším než 3 mají díky aminoskupině v poloze *N6*- adeninu náboj kladný, zatímco aminoskupina v poloze *N9*- při pH větším než 11 zajišťuje náboj záporný (Barták *et al.*, 2000; Dobrev a Kamínek, 2002). Ne všechny metabolity se chovají za shodných podmínek stejně, což je důležité zohledit při optimalizaci metody (Tarkovská *et al.*, 2014).

Před samotnou extrakcí fytohormonů je nutné rostlinné vzorky zhomogenizovat. Homogenizace se provádí za nízké teploty použitím tekutého dusíku (-196 °C), aby se zabránilo enzymatickým reakcím a chemické degradaci analytu. Ke vhodnému extrakčnímu činidlu, které musí analyt extrahovat s dostatečnou účinností bez velkého množství interferujících látek, jsou přidávány interní standardy. Tyto izotopicky značené standardy sloučenin slouží ke kontrole ztrát a kompenzaci analytu během procesu (Ljung *et al.*, 2010). V případě cytokininů je často volena extrakce do modifikovaného Bielekého pufru (75 % methanol, 20 % redestilovaná voda a 5 % kyselina mravenčí), kde cytokininy vlivem pH získávají kladný náboj (Bielecki, 1964; Tarkowski *et al.*, 2009).

Dalším krokem je purifikace, která je specifická pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Extrakty jsou přečištěny od interferujících látek za použití metody extrakce na pevné fázi (SPE), kde jsou sorbenty voleny podle různého náboje a polaritativit analytů. Při použití kombinace reverzní fáze (C18) s kationtově výměnným nosičem lze vícestupňové čištění zredukovat a zároveň zvýšit retenci cytokininů použitím StageTip (Stop And Go Extraction Tip) metody. Tato metoda je založena na aplikaci malých extrakčních disků vhodných sorbentů ve 200 µl pipetových špičkách, a poskytuje rychlou, efektivní a levnou purifikaci. Tento postup umožňuje kvantifikaci fytohormonů z malého množství rostlinného materiálu pohybující se kolem 1 – 1,5 mg FW (Rappsilber *et al.*, 2007; Svačinová *et al.*, 2012).

Nejpoužívanějšími analytickými metodami fytohormonů jsou plynová a kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, LC-MS). Přirozeně se vyskytující cytokininy nejsou dostatečně těkavé a při jejich derivatizaci pro analýzu GC mohou nastat komplikace. Proto se přednostně využívá spojení vysoko-účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). Molekuly při analýze na MS jsou ionizovány a jejich hmotnost je detekována za vzniku spektra odpovídajícího složení vzorku. Pro stanovení velice nízkých koncentračních hladin fytohormonů se ovšem používá tandemové zapojení hmotnostních spektrometrů (MS/MS) využívající trojitý kvadrupól (QqQ), který zvyšuje selektivitu odstraněním interferujících sloučenin prvním analyzátozem a umožňuje tak analýzu na femtomolárních hladinách (Novák *et al.*, 2003; Ljung *et al.*, 2010). Jako alternativní techniky se dále využívají imunoanalytické metody RIA (RadioImmunoAssay) a ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; Strnad *et al.*, 1992).

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Biologický materiál

Pro experiment byly použity desetidenní semenáčky *Arabidopsis thaliana*, (ekotyp Columbia), které byly pěstovány na Petriho miskách na médiu dle Murashigeho a Skooga (MS médium; Murashige a Skoog, 1962) ve fytotronu za regulovaných podmínek.

### 3.2 Použité chemikálie

- Aceton p.a., Lachner (Neratovice, Česká republika)
- Ethylalkohol pro UV spektroskopii (99,8%), Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Hydroxid amonný 25% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina dusičná (68%), VWR Chemicals S. A. S. (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Kyselina mravenčí 98% - 100% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí p.a., Honeywell (Seetze, Německo)
- Methanol ( $\geq 99,9\%$ ) gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Murashige & Skoog médium, Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemí)
- Plant agar, Duchefa Biochemie (Haarlem, Nizozemí)
- Redestilovaná voda z Millipore Simplicity<sup>TM</sup>
- Sacharóza p.a., Penta (Praha, Česká republika)
- Tween® 20, Sigma Aldrich (Darmstadt, Německo)
- Izotopicky značené cytokininové standardy, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého (Olomouc, Česká republika)

báze (B): [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]cZ, [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]tZ, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZR, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZ9G, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZ, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZR, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZ9G, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iP, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iPR, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iP9G, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]BAP, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]BAPR, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]BAP9G, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]mT, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]oT, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]pT, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]mTR, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]oTR, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]pTR, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]mT9G, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]oT9G, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]pT9G, [<sup>15</sup>N<sub>4</sub>]K  
O-glukosidy (OG): [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZOG, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZROG, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]DHZOG  
nukleotidy (NT): [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]tZRMP, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]DHZRMP, [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]iPRMP, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]BAPRMP



### **Roztoky:**

- Sterilizační roztok (70% ethanol + 0,1% Tween20 – 9,99 ml/10 ml 70% ethanolu + 0,01 ml/10 ml Tween20)
- Modifikovaný Bielecki pufr (75 % methanolu + 5 % kyseliny mravenčí + 20 % redestilované vody – 750 ml/l methanolu + 50 ml/l kyseliny mravenčí + 200 ml/l redestilované vody)
- 50% kyselina dusičná (735 ml/l kyseliny dusičné + 265 ml/l redestilované vody)
- 0,5M roztok hydroxidu amonného v 60% methanolu – eluční roztok CKs (0,775 ml/10 ml hydroxidu amonného + 6 ml/10 ml methanolu + 3,225 ml/l redestilované vody)
- 15mM mravenčan amonný (pH 3,95) (0,566 ml/l kyseliny mravenčí, upravení 25% roztokem hydroxidu amonného na pH 3,95)
- 10% methanol (1ml/10 ml methanolu + 9 ml/10 ml redestilované vody)

### **Stacionární fáze pro SPE purifikaci a kolona pro kapalinovou chromatografií:**

- Empore™ Styren divinyl benzen (SDB-RPS), 47mm Extrakční disky, Supelco, Bellefonte, PA, USA
- Empore™ Cation, 47mm Extrakční disky, Supelco, Bellefonte, PA, USA
- Pro UHPLC separaci použita kolona s reverzní fází Waters UPLC® BEH C18 (1,7 µm: 2,1 × 150 mm), Waters (Milford, MA, USA)

### **3.3 Přístrojové vybavení**

- Acquity UPLC® I-class systém (Waters, Milford, MA, USA) v zapojení s Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) vybavený ionizací elektrosprejem ESI. Data zpracována MassLynx™ software s TargetLynx™ programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA)
- Analytické váhy, Sartorius Weighing Technology GmbH (Goettingen, Německo)
- Autokláv Sanyo MLS-378 1L, Sanyo (Japonsko)
- Centrifuga Avanti™ 30, Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
- Centrifuga Hettlich Micro 220R, Hettlich GmbH (Tuttingen, Německo)
- Flowbox-laminární Heraguard ECO 1.2, Thermo Electron LED GmbH, Thermo Scientific (Langenselbold, Německo)
- Fytokomora Percival AR-100L3, Percival Scientific (Perry, IA, USA)

- Kulový mlýnek MM301, Retsch® & Co. KG (Hann, Německo)
- Millipore Simplicity™ water purification system, Milipore Corp (Billerica, MA, USA)
- pH metr CyberScan 500, Oakton® (Vernon Hills, IL, USA)
- Stolní laboratorní rotátor Stuart SB3-BB Scientific, Keison Products (Chelmsford, Velká Británie)
- Ultrazvuková lázeň Transsonic T310, ELMA® Schmidbauer GmbH (Singen, Německo)
- Vakuová rotační odparka Trigon-plus® RCT1010, Thermo Electron Corporation – k 2006 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Vortex typ Wizard, Velp Scientifica (Usmate, Itálie)

### **3.4 Příprava biologického materiálu**

#### **3.4.1 Příprava kultivačního média dle Murashige & Skooga**

Rostliny byly pěstovány v MS médiu. Na vahách bylo naváženo 10 g sacharózy a 2,2 g MS média, které byly v míchačce rozpuštěny v 1 l destilované vody. Na pH metru bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 5,6 pomocí 0,1M roztoku hydroxidu sodného. Do každé ze čtyř zásobních lahví bylo naváženo 1,75 g agaru a bylo přilito 250 ml připraveného roztoku. Poté bylo médium vysterilizováno v autoklávu společně s ostatními pomůckami pro výsev: párátka, 200 $\mu$ l pipetovacími špičkami a Petriho miskou s filtračním papírem.

#### **3.4.2 Výsev, kultivace a sklizení *Arabidopsis thaliana***

Tekuté kultivační médium bylo ve flowboxu vylito do čtvercových Petriho misek a necháno ztuhnout. Semena *Arabidopsis thaliana* byla vysterilizována sterilizačním roztokem (70% ethanol + 0,1% Tween20) a pomocí pipety přenesena na přichystaný filtrační papír v Petriho misce. Pomocí párátka byla semena vyseta na MS médium ve třech řadách přibližně po 35 semenech. Misky byly důkladně oblepeny fixační páskou k zamezení případné kontaminace, zabaleny do alobalu a ponechány 2 dny v lednici při teplotě 4 °C.

Petriho misky byly poté přeneseny do fytotronu, kde byly vertikálně postaveny do stojanů. Zde byly nastaveny podmínky na 21 °C a 50% relativní vlhkost. Denní cyklus byl nastaven na 16 h světla a 8 h tmy.

Rostliny byly sklizeny po 10 dnech, v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. hodině denní fáze a v 1., 2., 4., 6. a 8. hodině temnotní fáze. Rostliny byly pomocí pinzety sesbírány z MS média, omyty destilovanou vodou a po osušení byl veškerý rostlinný materiál vložen do jedné 2ml mikrozkuhavky a ihned zmražen tekutým dusíkem. Všechny mikrozkuhavky s rostlinným materiálem byly po rychlém zamrazení uskladněny a uchovávány při teplotě -80 °C.

### **3.4.3 Příprava vzorků**

Zmražený rostlinný materiál byl v třecí misce pomocí tekutého dusíku zhomogenizován a na analytických vahách bylo rozváženo přibližně 1,5 mg FW do nové 2ml mikrozkuhavky. Z každého biologického materiálu byly připraveny technické triplikáty.

## **3.5. Extrakce**

Do mikrozkuhovek s biologickým materiálem byl přidán 1 ml modifikovaného Bieleškiho pufru, 20 µl směsi interních standardů (0,25 pmol B, R, 7G, 9G a 0,5 pmol OG a NT) a 3 homogenizační kuličky. Jako blanky vzorků byly použity prázdné mikrozkuhavky bez rostlinného materiálu, pouze se 3 homogenizačními kuličkami. Do prvního blanku nebyly přidány žádné interní standardy, do dalších už přidány byly. Po promíchání vzorků na vortexu byly vzorky homogenizovány po dobu 3 minut na kulovém mlýnku při frekvenci 27 Hz a následně umístěny na 3 minuty do sonifikační lázně o teplotě 4 °C. Poté byly vzorky extrahovány na laboratorním rotátoru po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Po následné centrifugaci (20 000 rpm; 10 minut; 4 °C) byly supernatanty přepipetovány do nových 1,5ml mikrozkuhovek.

## **3.6 Purifikace pomocí StageTip metody**

### **3.6.1 Příprava a aktivace StageTip kolon**

Pro purifikaci extrahovaného materiálu byly StageTipy připraveny naskládáním 4 vrstev SDB-RPS a 4 vrstev Cation-SR extrakčních disků do 200µl pipetové špičky umístěné ve víčku mikrozkuhavky. Protože pH modifikovaného Bieleškiho pufru je v kyselé oblasti, dostávají cytokininy v tomto prostředí kladný náboj a jsou zachyceny na kationtovém sorbentu obsahujícím silnou sulfonovou skupinu.

Aktivace StageTipů byla provedena 50 µl acetonu (2 200 rpm; 10 minut; 8 °C) a 50 µl methanolu za stejných centrifugačních podmínek. Dále byly StageTipy promyty

redestilovanou vodou (2 200 rpm; 15 minut; 8 °C) a kondicionace byla provedena 50 µl 50% kyselinou dusičnou (2 600 rpm; 20 minut; 8 °C) s následným promytím redestilovanou vodou (2 600 rpm; 20 minut; 8 °C). Před vlastním nanesením vzorků byly StageTipy ještě nakonec promyty modifikovaným Bieleškiho pufrem (2 600 rpm; 20 minut; 8 °C) pro získání stejných podmínek StageTipů a vzorků.

### 3.6.2 Purifikace a eluce vzorků

Extrakty jednotlivých vzorků byly opakovaně naneseny na StageTipy za centrifugačních podmínek: 4 200 rpm, teplotě 8 °C po dobu 30 minut. Následně byly StageTipy promyty methanolem (3 500 rpm; 15 minut; 8 °C). Eluce byla provedena pomocí 50 µl roztoku 0,5M hydroxidu amonného v 60% methanolu při 4 000 rpm, teplotě 8 °C po dobu 20 minut do nových spodních částí 1,5ml mikrozkušavek. Roztoky s vypurifikovanými extrakty byly přepipetovány do vialek se 100µl inzerty, odpařeny do sucha a rozpuštěny ve 30 µl 10% methanolu.

## 3.7 Identifikace a kvantifikace cytokininů

Stanovení cytokininů bylo provedeno ultra-vysoce účinnou kapalinovou chromatografií v zapojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) s trojitým kvadrupólem (QqQ). Separace byla provedena podle Svačinová *et al.* (2012), postup byl ale modifikován a díky zvýšení rychlosti průtoku na 0,400 ml/min a teploty na koloně na 55 °C došlo ke zkrácení doby analýzy na 17 minut. Na chromatografické koloně s reverzní fází Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (1,7 µm; 2,1 x 150 mm) bylo po nástřiku 10 µl vzorku odseparováno na základě gradientové eluce 27 isoprenoidních a 20 aromatických cytokininů. Gradient byl vytvořen methanolem (A) a 15mM mravenčanem amonným o pH 3,95 (B) následovně: 0 min, 5:95 (A:B) – 4 min isokratická eluce, 5:95 (A:B) – 10 min lineární gradient, 20:80 (A:B) – 15 min lineární gradient, 50:50 (A:B) – 15.50 min, 99:1 (A:B) – 16.00 min 99:1 (A:B) – 16.50 min, 5:95 (A:B) – 17.00 min, 5:95 (A:B). Ionizace molekul byla provedena elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+).

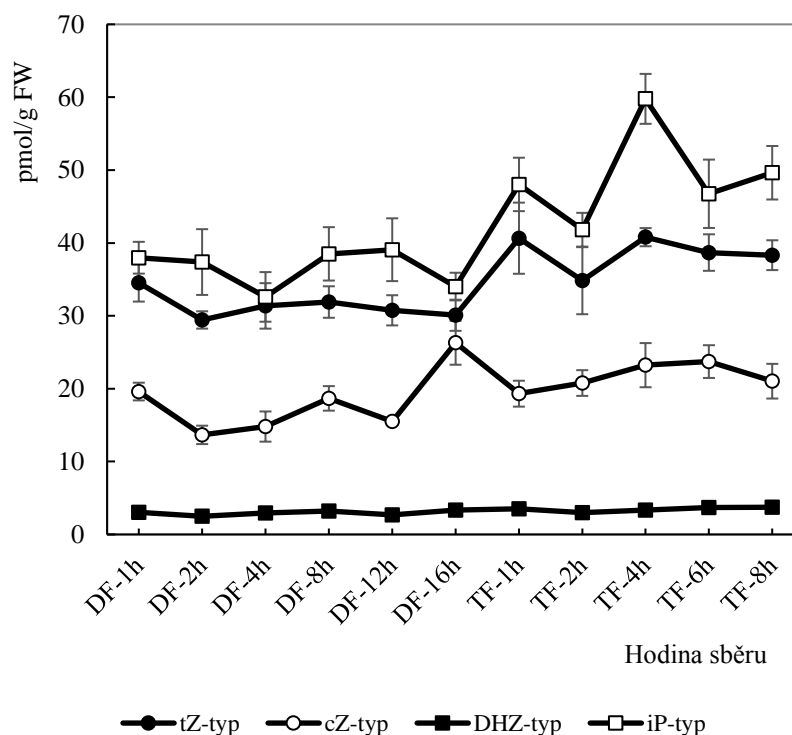
Ionty byly stanoveny pomocí záznamu více iontových reakcí (multiple reaction monitoring, MRM), kde byly sledovány retenční časy cytokininů ve čtyřech MRM oknech: 6.00 – 10.30 minut, 10.30 – 12.60 minut, 12.60 – 13.80 minut, 13.80 – 15.20 minut. Parametry pro analýzu byly nastaveny následovně: teplota zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 600 °C; průtok desolvatačního plynu 600 l/h; napětí v kapiláře 0,75 kV

(Novák *et al.*, 2008). Výsledky byly vyhodnocovány pomocí MassLynx softwaru a kvantifikovány pomocí programu TargetLynx. Endogenní hladiny byly stanoveny metodou standartního izotopového ředění (Plačková *et al.*, 2015).

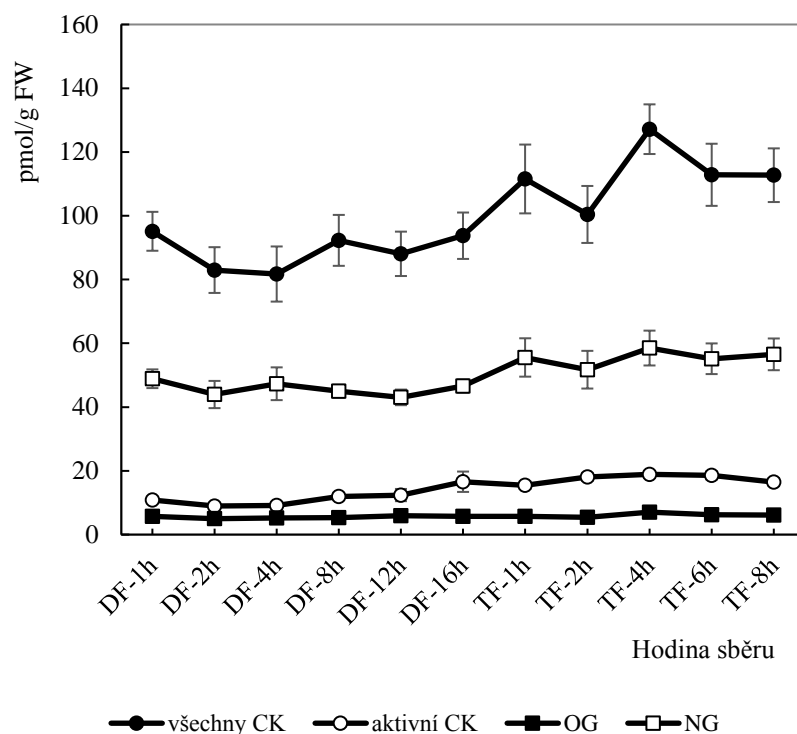
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V desetidenních semenáčcích *Arabidopsis thaliana* byly ve stanovených intervalech detekovány isoprenoidní cytokinininy *tZ*-typu, *cZ*-typu, *iP*-typu a *DHZ*-typu (Obr. 2). Nejvyšší hladiny jak v denní (DF), tak v temnostní fázi (TF) vykazovaly metabolity *iP*-typu, nejnižších hodnot dosahovaly cytokinininy *DHZ*-typu. Aromatické cytokinininy nebyly detekovány v žádné fázi.

Celková hladina cytokininů měla první maximum ve 4. hodině TF a druhé maximum v 1. hodině TF (Obr. 3). Tato maxima byla převážně způsobena hladinou *N*-glukosidů (*tZ7G*, *tZ9G*, *cZ7G*, *cZ9G*, *DHZ7G*, *iP7G* a *iP9G*), které se ze všech metabolitů vyskytovaly v průběhu celého dne v nejvyšších koncentracích (43,03 – 58,51 pmol/g FW) a zejména v TF kopírovaly křivku sumy všech cytokininů. Naopak *O*-glukosidy (*tZOG*, *tZROG*, *cZOG*, *cZROG* a *DHZOG*) měly téměř konstantní hladinu, která se pohybovala mezi 4,99 – 7,04 pmol/g FW, a k žádnému významnému kolísání v průběhu dne nedocházelo. Nejvyšší koncentrace 7,04 pmol/g FW nastala rovněž ve 4. hodinu TF.



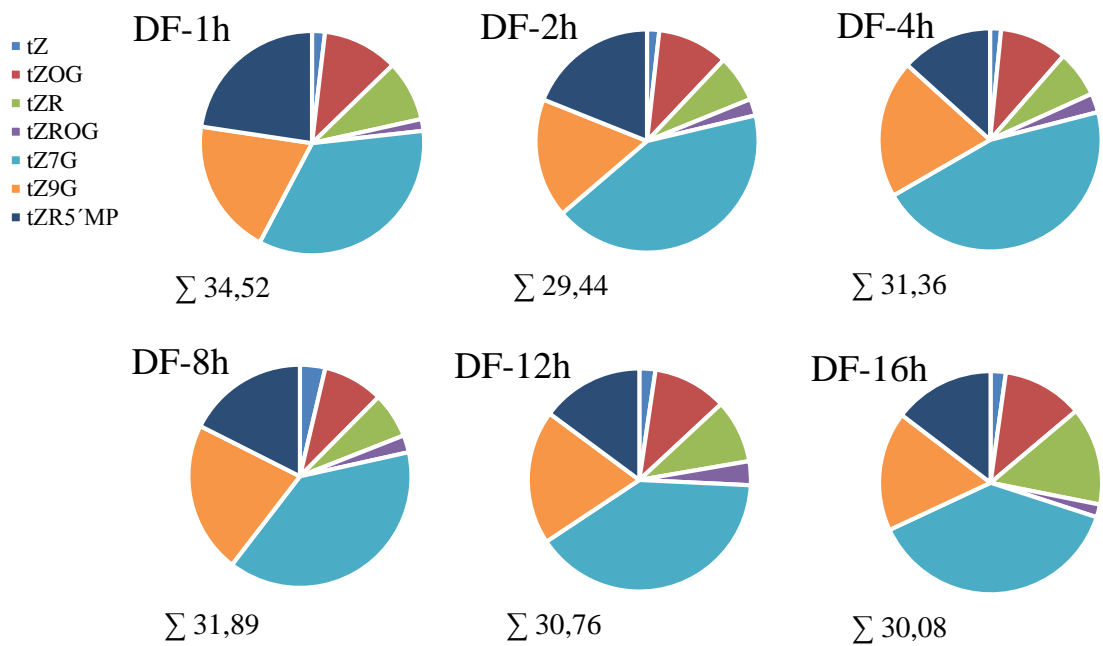
Obr. 2 Celkové hladiny cytokininů *tZ*-, *iP*-, *cZ*- a *DHZ*-typu desetidenního semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. hodině denní fáze a v 1., 2., 4., 6. a 8. hodině temnostní fáze.



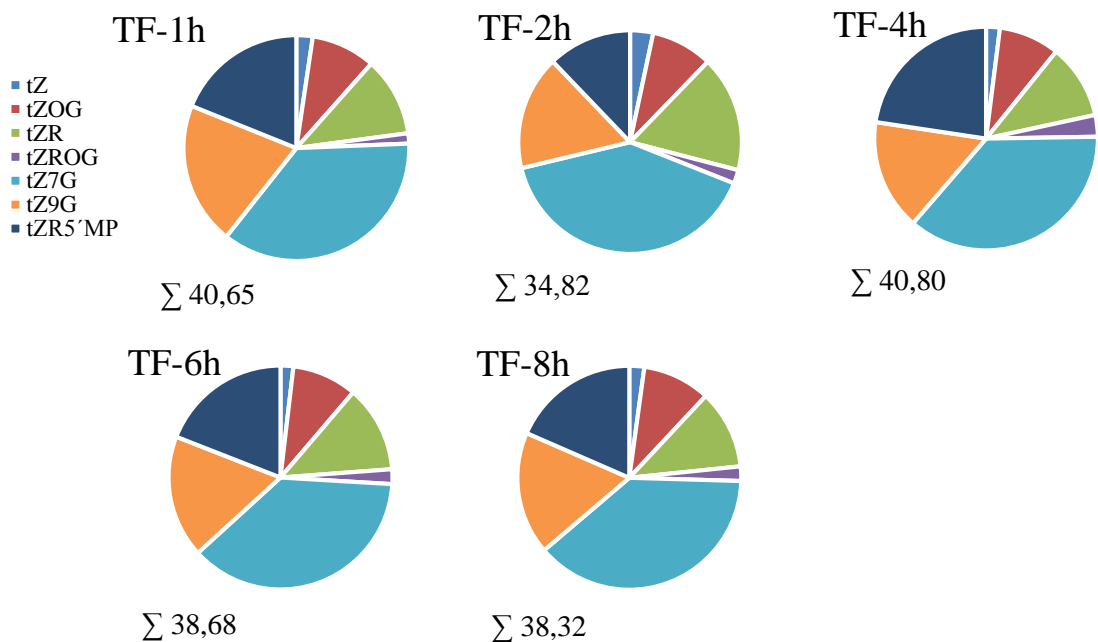
Obr. 3 Porovnání hladiny sumy všech cytokininů a hladiny aktivních cytokininů *tZ*, *tZR*, *cZ*, *cZR*, *iP* a *iPR* s hladinou *N*-glukosidů *tZ7G*, *tZ9G*, *cZ7G*, *cZ9G*, *DHZ7G*, *iP7G* a *iP9G* a s hladinou *O*-glukosidů *tZOG*, *tZROG*, *cZOG*, *cZROG* a *DHZOG* v denní a temnostní fázi.

Celková koncentrace aktivních forem cytokininů, tedy volných bazí (*tZ*, *cZ* a *iP*) a ribosidů (*tZR*, *cZR* a *iPR*), byla navýšena v TF, kde v 2. – 6. hodině tvořila stabilní hladinu o průměrné koncentraci 18,53 pmol/g FW a v 8. hodině mírně klesla. Druhá nejvyšší koncentrace byla detekována v 16. hodině DF, tedy v poslední hodině před TF. Přítomnost a četnost jednotlivých cytokininových metabolitů dle typu je ukázána na koláčových grafech (Obr. 4, 5, 7, 8, 10 a 11).

Cytokininu *tZ*-typu byly zastoupeny všemi typy metabolitů. Nejvíce zastoupeným metabolitem v každé denní hodině byl *tZ7G* (Obr. 4 a 5), což odpovídá výsledkům v Janečková *et al.* (2018), a dále *tZ9G* a *tZR5'MP*. V nejmenší míře se vyskytovaly *tZ* a *tZROG*. Během DF byly koncentrace nižší než v TF, téměř srovnatelná koncentrační maxima nastala v 1. a 4. hodině TF (Obr. 2). Navýšení v TF bylo způsobeno zvýšenými hladinami *tZR* a zejména *tZR5'MP*, který je pro biosyntézu cytokininů *tZ*-typu klíčový. Zvýšení byla patrná ještě v 1. hodině DF, než nastal pokles. Koncentrace zásobní formy *tZOG* se po celý den pohybovala okolo průměrné hodnoty 3,39 pmol/g FW, mírné snížení nastalo pouze v 8. hodině DF, což korespondovalo s nárůstem koncentrace *tZ*.



Obr. 4 Celkové hladiny cytokininů *tZ*-typu v desetidenním semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. hodině denní fáze (Σ; pmol/g FW).



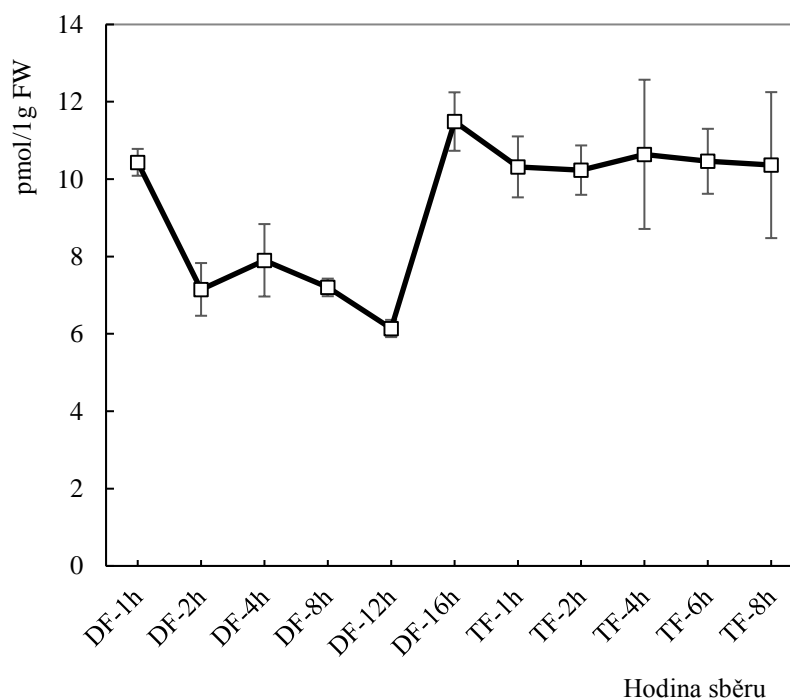
Obr. 5 Celkové hladiny cytokininů *tZ*-typu v desetidenním semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 6. a 8. hodině temnostní fáze (Σ; pmol/g FW).



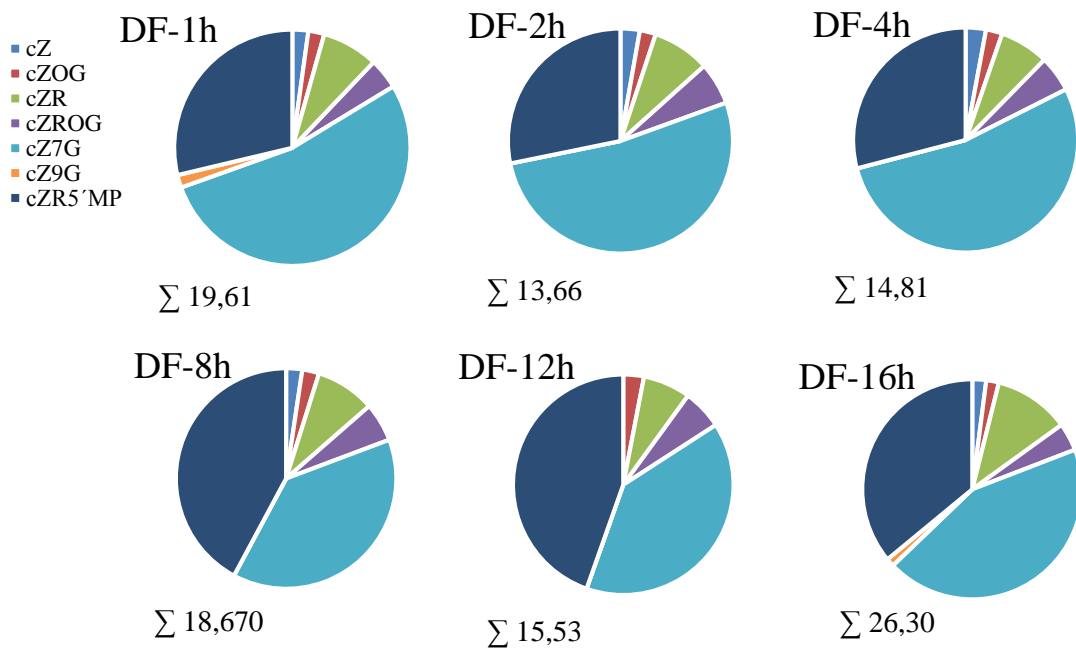
Celková hladina cytokininů DHZ-typu se pohybovala mezi hodnotami 2,49 – 3,73 pmol/g FW, u kterých k žádným výrazným výkyvům během dne nedocházelo. V obou fázích byly detekovány pouze zásobní formy – převažující *N*-glukosidy v podobě DHZ7G a *O*-glukosidy DHZOG, které se vyskytovaly v rozmezí 0,10 – 0,17 pmol/g FW. Ostatní metabolity – DHZ, DHZR, DHZROG, DHZ9G a DHZR5'MP detekovány nebyly.

*cZ*-typ cytokininů měl jako jediný maximum v DF, a to v 16. hodině. Po tomto nárůstu následoval rychlý pokles v 1. hodině TF a poté opět pomalejší nárůst (Obr. 2). Hladiny v TF byly vyšší než v DF, což bylo způsobeno zejména nárůstem koncentrace *cZ*7G, který způsobil pík v 16. hodině DF (Obr. 6). Od 2. hodiny do 12. hodiny DF se jeho koncentrace pohybovala v rozmezí 6,14 – 7,90 pmol/g FW, v 16. hodině stoupla na 11,49 pmol/g FW a po celou TF se pohybovala na neměnné hladině o průměrné hodnotě 10,40 pmol/g FW. Stejný trend vykazovala i hladina *cZ*9G – hodnoty v TF se blížily průměrné hodnotě 0,30 pmol/g FW a podobné hodnoty byly detekovány i v 1. a 16. hodině DF. Ve zbytku DF byly koncentrace pod limitem detekce.

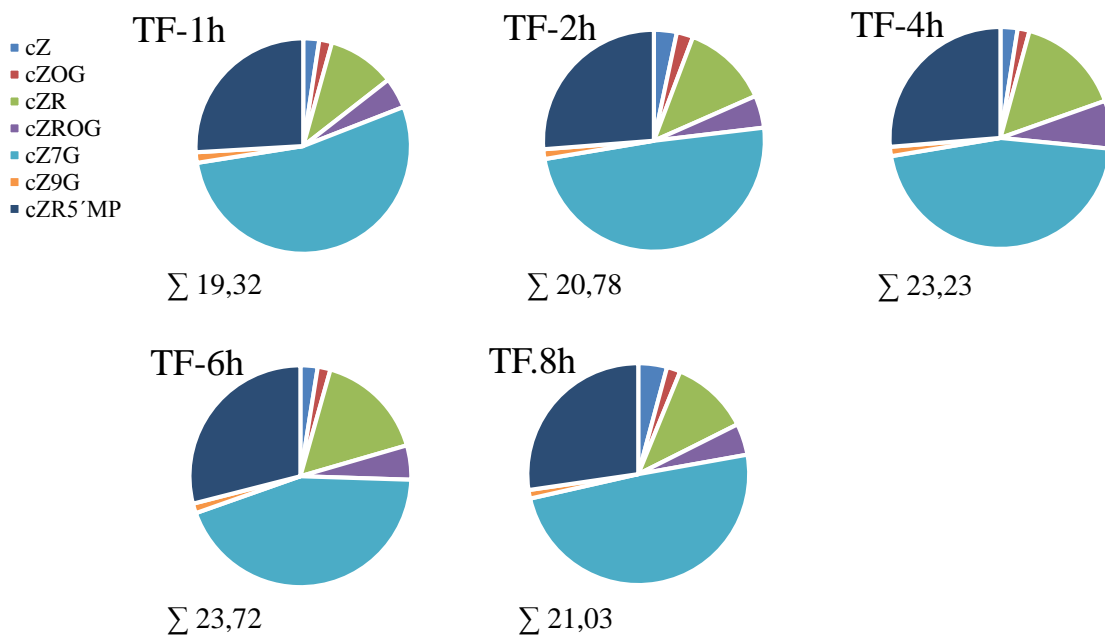
Nejvíce zastoupenou formou byl *cZ*7G následovaný *cZ*R5'MP (Obr. 7 a 8). Ostatní metabolity byly detekovány ve výrazně nižších koncentračních hladinách.



Obr. 6 Hladina *cZ*7G desetidenního semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. hodině denní fáze a v 1., 2., 4., 6. a 8. hodině temnostní fáze.



Obr. 7 Celkové hladiny cytokininů cZ-typu v desetidenním semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. hodině denní fáze (Σ; pmol/g FW).



Obr. 8 Celkové hladiny cytokininů cZ-typu v desetidenním semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 6. a 8. hodině temnotní fáze (Σ; pmol/g FW).

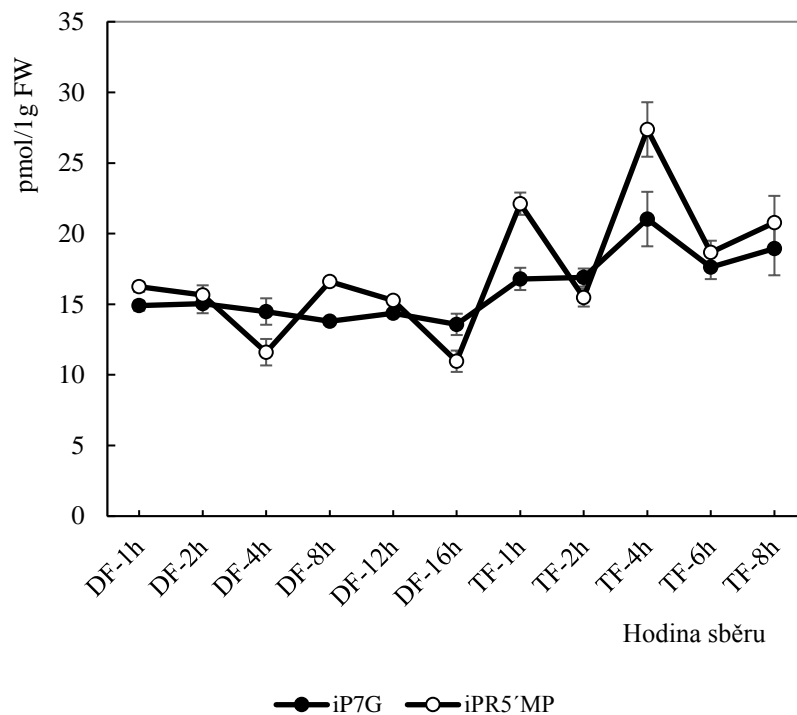
Stabilní hladina aktivního *cZ* se v DF vyskytovala okolo průměrné hodnoty 0,44 pmol/g FW, pouze ve 12. hodině byla pod limitem detekce a v TF opět vzrostla na hodnoty 0,46 – 0,88 pmol/g FW. Podobně vzestupná tendence byla detekována i u *cZR*, kde byla průměrná hodnota v DF 1,56 pmol/g FW a v TF 2,88 pmol/g FW. Zásobní cukerný konjugát *cZOG* tvořil po celý den téměř stabilní hladinu okolo průměrné hodnoty 0,42 pmol/g FW.

Maximum biosynteticky aktivního *cZR5'MP* bylo detekováno v 16. hodině DF, což se shodovalo s nárůstem všech metabolitů *cZ*-typu. Minimum pak nastalo v 2. hodině DF, což opět odpovídalo poklesu ostatních metabolitů, a tudíž naznačuje pokles biosyntézy cytokininů *cZ*-typu během DF.

Hypotézu, že cytokininy *cZ*-typu hrají roli v zajišťování bazální aktivity pro udržení esenciálních fyziologických procesů v podmínkách s nedostatkem energie, které vedou k „down regulaci“ hlavních aktivních cytokininů, poprvé navrhli Gajdošová *et al.* (2011). Janečková *et al.* (2018) hypotézu doplnili o zjištění, že k navýšení obsahu cytokininů *cZ*-typu dochází při snížení aktivity fotosyntetického aparátu. Navrhují hypotézu, že při nedostatku energie v podobě ATP, ADP nebo AMP, ke kterému dochází například při uchovávání listů ve tmě po dobu šesti dní, dochází k preferenci MVA biosyntetické dráhy oproti MEP dráze syntetizující převážně ostatní typy cytokininů. V takovýchto podmínkách mohou být prekurzory MVA dráhy dostupné, na rozdíl od prekurzorů MEP dráhy, jimiž jsou právě ATP, ADP nebo AMP.

Stanovené koncentrace cytokininů *cZ*-typu potvrzují tuto hypotézu. V TF, tedy při nepřítomnosti světla a při snížené fotosyntéze, docházelo ke zvýšení jejich celkové hladiny, která v průběhu fáze narůstala a na konci fáze, v 8. hodině TF, klesla na koncentraci srovnatelnou s koncentrací v 1. hodině DF. Hypotéze odpovídá i chování *cZ7G* (Obr. 6) a *cZ9G*, tedy nárůst jejich koncentrací na téměř stabilní hladinu v TF. Hladiny na začátku DF byly, stejně jako na jejím konci, ovlivněny TF – koncentrace v těchto hodinách byly srovnatelné s těmi v TF.

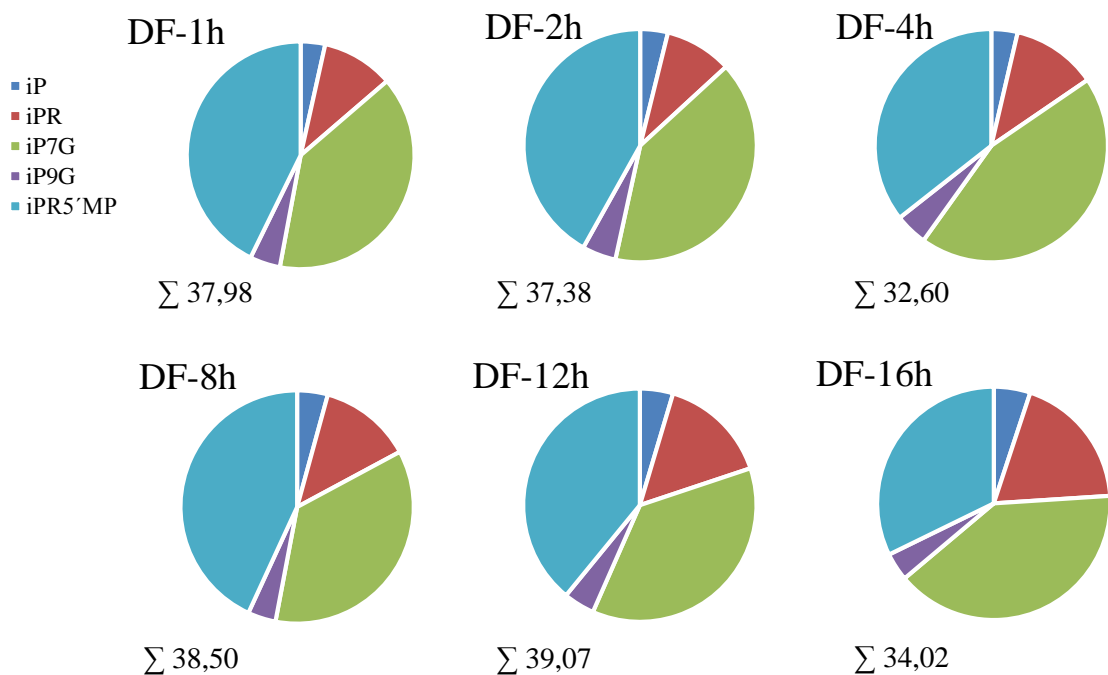
Cytokininy *iP*-typu byly v obou fázích nejzastoupenější. Jejich maximum ve 4. hodině TF, stejně jako další maxima v 1. a 8. hodině TF, způsobilo i maximum celkového obsahu cytokininů. Převládajícími formami byly *iPR5'MP* a *iP7G* (Obr. 10 a 11). Hladina *iP7G* v průběhu celé DF zůstávala téměř neměnná, s průměrnou hodnotou 14,36 pmol/g FW (Obr. 9). Ovšem na začátku TF došlo k jejímu navýšení a uprostřed noci, tj. ve 4. hodině TF, nastalo maximum (21,03 pmol/g FW), které poté začalo opět klesat.



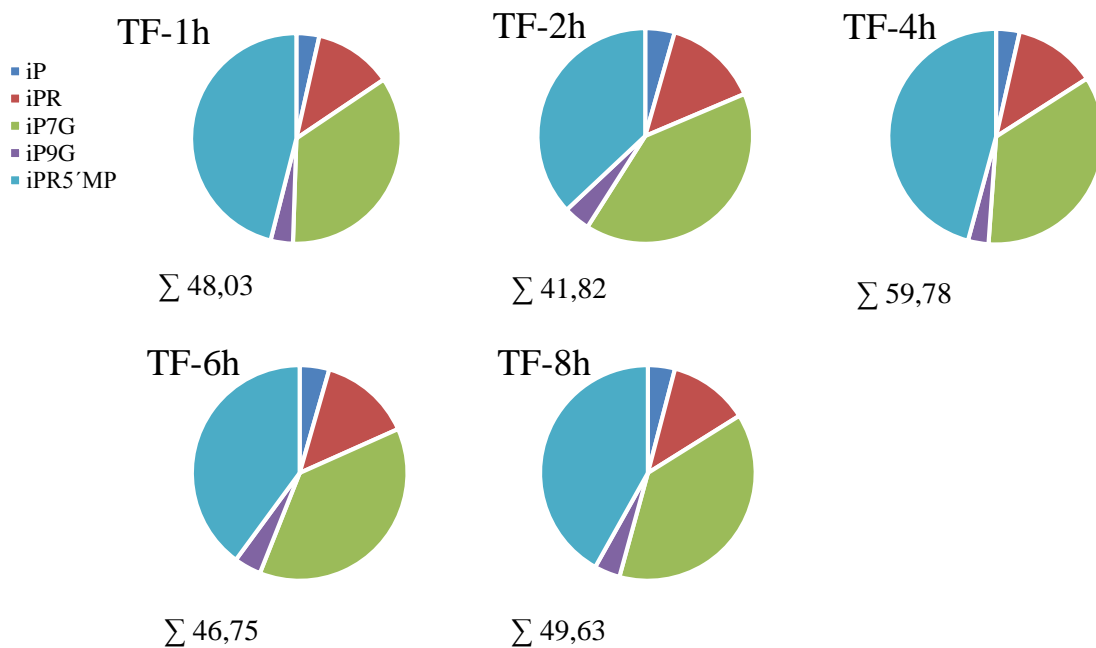
Obr. 9 Hladina iP7G a iPR5'MP desetidenního semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. hodině denní fáze a v 1., 2., 4., 6. a 8. hodině temnostní fáze.

Hladina iPR5'MP, z hlediska biosyntézy cytokininů nejdůležitějšího metabolitu, v průběhu dne vykazovala několik koncentračních výkyvů (Obr. 9). V DF došlo ve 4. a 16. hodině k odchylkám od průměrné hodnoty 15,94 pmol/g FW, ke které se blížily ostatní hodnoty. Koncentrace byly sníženy na 11,61 a 10,96 pmol/g FW, čímž vznikla zřetelná minima. S minimem v 16. hodině DF se shodovalo maximum *cZR5'MP*, což v danou hodinu naznačuje změnu v biosyntéze – navýšení koncentrace cytokininů *cZ*-typu oproti *tZ*- a *iP*-typu (Obr. 2). Po minimu v 16. hodině DF nastal prudký nárůst koncentrace v 1. hodině TF na 22,12 pmol/g FW, hlavní maximum však bylo detekováno až ve 4. hodině TF, kdy byla jeho koncentrace 27,37 pmol/g FW. Toto maximum se shodovalo s maximem iP7G a zapříčinilo tak hlavní maximum sumy všech cytokininů (Obr. 3). Jelikož je iPR5'MP jedním z prvních produktů při biosyntéze cytokininů, zvýšením jeho koncentrace byla podpořena i syntéza všech metabolitů *iP*-typu, jejichž koncentrace v této hodině stoupla.

Zároveň se maximum ve 4. hodině TF shodovalo s maximem *tZR5'MP*, což poukazuje nejen na syntézu cytokininů *iP*-typu, ale i *tZ*-typu. Podobným způsobem jako u *iP*-typu se se zvýšenou koncentrací nukleotidu zvýšila i hladina *tZOG*, *tZROG*, *tZ7G* a *tZ9G*. Energie pro tyto biosyntetické pochody mohla pocházet ze zvýšené hladiny cytokininů *cZ*-typu, především ze zásobního *cZ7G*, který v TF udržoval stabilní hladinu (Obr. 6).



Obr. 10 Celkové hladiny cytokininů iP-typu v desetidenním semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. hodině denní fáze (Σ; pmol/g FW).



Obr. 11 Celkové hladiny cytokininů iP-typu v desetidenním semenáčku *A. thaliana* v 1., 2., 4., 6. a 8. hodině temnostní fáze (Σ; pmol/g FW).

Z výsledků vyplývá, že značná část biosyntézy cytokininů probíhá v TF, což je v rozporu s výsledky v Janečková *et al.* (2018), kde byla biosyntéza iP-typu stimulována světlem. Avšak pro experiment podporující tuto hypotézu byly použity pouze listy *A. thaliana*, a jelikož hlavním místem biosyntézy jsou kořenové meristémy (Taiz a Ziegler, 2006), byla biosyntéza v tomto případě omezena. Pro stanovení hladin cytokininů v *A. thaliana* během dne byl použit zhomogenizovaný rostlinný materiál z celých rostlin, což zajišťuje, že stanovené hladiny zahrnují všechna místa biosyntézy.

Kompletní koncentrační hladiny všech detekovaných cytokininů v jednotlivých hodinách DF a TF jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 1 a Tab. 2).

Tab. 1 Detekované hladiny cytokininů v 1., 2., 4., 8., 12. a 16. h denní fáze v desetidenním semenáčku *A. thaliana* ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, < LOD = pod limitem detekce

Typ cytokininu	Hodina sběru					
	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	16 h
	Koncentrace (pmol/1 g FW)					
<i>tZ</i>	0,64 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,50 ± 0,01	1,17 ± 0,21	0,72 ± 0,13	0,66 ± 0,11
<i>tZOG</i>	3,76 ± 0,55	3,02 ± 0,03	3,08 ± 0,42	2,79 ± 0,46	3,31 ± 0,41	3,51 ± 0,05
<i>tZR</i>	3,03 ± 0,25	2,01 ± 0,19	2,13 ± 0,03	2,11 ± 0,16	2,83 ± 0,22	4,29 ± 0,62
<i>tZROG</i>	0,59 ± 0,03	0,72 ± 0,08	0,86 ± 0,13	0,79 ± 0,00	1,07 ± 0,21	0,56 ± 0,06
<i>tZ7G</i>	11,90 ± 0,44	12,49 ± 0,14	14,33 ± 1,14	12,41 ± 0,97	12,28 ± 0,18	11,44 ± 0,58
<i>tZ9G</i>	6,78 ± 0,75	5,10 ± 0,38	6,28 ± 0,37	7,02 ± 0,08	5,99 ± 0,54	5,21 ± 0,21
<i>tZR5'MP</i>	7,81 ± 0,52	5,57 ± 0,35	4,17 ± 1,03	5,60 ± 0,27	4,57 ± 0,38	4,40 ± 0,51
<i>cZ</i>	0,43 ± 0,01	0,38 ± 0,12	0,43 ± 0,15	0,44 ± 0,09	< LOD	0,54 ± 0,06
<i>cZOG</i>	0,43 ± 0,00	0,32 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,46 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,49 ± 0,07
<i>cZR</i>	1,52 ± 0,08	1,13 ± 0,05	1,05 ± 0,03	1,63 ± 0,56	1,08 ± 0,03	2,93 ± 0,85
<i>cZROG</i>	0,83 ± 0,08	0,83 ± 0,15	0,77 ± 0,11	1,06 ± 0,14	0,91 ± 0,04	1,08 ± 0,27
<i>cZ7G</i>	10,44 ± 0,35	7,15 ± 0,68	7,90 ± 0,94	7,20 ± 0,23	6,14 ± 0,22	11,49 ± 0,76
<i>cZ9G</i>	0,34 ± 0,02	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,31 ± 0,03
<i>cZR5'MP</i>	5,63 ± 0,67	3,85 ± 0,23	4,30 ± 0,82	7,87 ± 0,61	6,93 ± 0,03	9,46 ± 0,99
DHZOG	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,00
DHZ7G	2,89 ± 0,13	2,39 ± 0,20	2,84 ± 0,05	3,05 ± 0,47	2,59 ± 0,21	3,23 ± 0,23
iP	1,32 ± 0,08	1,44 ± 0,16	1,19 ± 0,06	1,64 ± 0,13	1,80 ± 0,25	1,73 ± 0,07
iPR	3,88 ± 0,30	3,49 ± 0,30	3,85 ± 0,10	4,97 ± 0,04	5,96 ± 1,28	6,43 ± 1,48
iP7G	14,90 ± 1,06	15,05 ± 2,82	14,48 ± 2,46	13,80 ± 0,20	14,35 ± 1,21	13,57 ± 0,14
iP9G	1,64 ± 0,19	1,75 ± 0,04	1,47 ± 0,19	1,50 ± 0,07	1,69 ± 0,09	1,32 ± 0,12
iPR5'MP	16,23 ± 0,56	15,66 ± 1,19	11,61 ± 0,59	16,61 ± 3,22	15,27 ± 1,47	10,96 ± 0,08

Tab. 2 Detekované hladiny cytokininů v 1., 2., 4., 6. a 8. h temnostní fáze v desetidenním semenačku *A. thaliana* ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka

Typ cytokininu	Hodina sběru			
	1 h	2 h	4 h	8 h
	Konzentrace (pmol/1 g FW)			
<i>tZ</i>	0,95 ± 0,05	1,16 ± 0,15	0,81 ± 0,03	0,72 ± 0,04
<i>tZOG</i>	3,75 ± 0,38	3,10 ± 0,18	3,59 ± 0,18	3,63 ± 0,09
<i>tZR</i>	4,61 ± 0,78	5,85 ± 0,53	4,41 ± 0,04	4,86 ± 0,48
<i>tZROG</i>	0,60 ± 0,08	0,69 ± 0,09	1,28 ± 0,07	0,82 ± 0,00
<i>tZ7G</i>	14,75 ± 2,41	14,02 ± 2,79	14,93 ± 0,60	14,42 ± 1,11
<i>tZ9G</i>	8,31 ± 0,22	5,77 ± 0,52	6,54 ± 0,32	6,85 ± 0,35
<i>tZR5'MP</i>	7,69 ± 0,96	4,24 ± 0,35	9,23 ± 0,02	7,37 ± 0,43
<i>cZ</i>	0,46 ± 0,04	0,69 ± 0,05	0,58 ± 0,06	0,60 ± 0,05
<i>cZOG</i>	0,37 ± 0,03	0,50 ± 0,00	0,40 ± 0,03	0,44 ± 0,01
<i>cZR</i>	1,96 ± 0,08	2,63 ± 0,36	3,56 ± 0,02	3,83 ± 0,09
<i>cZROG</i>	0,89 ± 0,07	0,98 ± 0,17	1,62 ± 0,54	1,19 ± 0,19
<i>cZ7G</i>	10,32 ± 0,79	10,23 ± 0,64	10,64 ± 1,93	10,46 ± 0,84
<i>cZ9G</i>	0,31 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,31 ± 0,04	0,34 ± 0,03
<i>cZR5'MP</i>	5,01 ± 0,74	5,45 ± 0,51	6,11 ± 0,42	6,87 ± 1,03
DHZOG	0,11 ± 0,00	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02
DHZ7G	3,43 ± 0,46	2,85 ± 0,24	3,21 ± 0,07	3,56 ± 0,28
iP	1,69 ± 0,04	1,85 ± 0,05	2,12 ± 0,24	2,08 ± 0,14
iPR	5,78 ± 0,17	5,94 ± 0,13	7,42 ± 0,30	6,49 ± 0,55
iP7G	16,79 ± 2,09	16,89 ± 1,57	21,03 ± 2,42	17,62 ± 2,01
iP9G	1,65 ± 0,02	1,67 ± 0,13	1,84 ± 0,10	1,90 ± 0,18
iPR5'MP	22,12 ± 1,34	15,48 ± 0,45	27,37 ± 0,37	18,66 ± 1,81
				20,78 ± 1,27



## 5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovit koncentrační hladiny cytokininů v desetidenních semenáčcích *Arabidopsis thaliana* během 24 hodin. Nejdříve byly rostliny pěstovány na Petriho miskách na MS médiu ve fytotronu za regulovaných podmínek s denním cyklem 16 hodin světla a 8 hodin tmy, poté byl rostlinný materiál extrahován a purifikován pomocí StageTip metody a cytokininy byly nakonec identifikovány a kvantifikovány pomocí UHPLC-MS/MS.

Nejvyšší hladina cytokininů byla detekována v polovině TF, tedy ve 4. hodině TF, a to zejména díky cytokininům iP-typu, které byly v rostlinách nejzastoupenější, a dále také přítomností *N*-glukosidů všech cytokininových typů. Bylo zjištěno, že v této denní době dochází ke značné části biosyntézy cytokininů. Energie na tyto procesy nejspíše pochází ze zásobní formy *cZ7G*, jehož koncentrace byla v TF udržována na zvýšené stabilní hladině. Zvýšené hladiny cytokininů *cZ*-typu po celou dobu TF jsou v souladu s výsledky v Janečková *et al.* (2018).

Z experimentu rovněž vychází poznatky pro pěstování rostlin ve změněných podmínkách jako je například změna světelného režimu. Lze předpokládat, že při změně růstových podmínek po deseti dnech je nezbytné nechat rostliny několik dní zadaptovat na nové prostředí, aby nedošlo k jejich ovlivňování předchozími růstovými podmínkami, jak to bylo pozorováno u *cZ7G*, kde byl začátek DF ovlivňován podmínkami TF. Zde byla pozorována zvýšená hladina ještě v 1. hodině DF a k nárůstu koncentrace docházelo už v 16. hodině DF. Dá se tedy předpokládat, že si rostliny „pamatují“ vlastní celodenní cyklus, jak tomu naznačuje jejich chování.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmad M., Lin C., Cashmore A. R. (1995) Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *The Plant Journal* **8**, 653-658.
- Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **81**, 5994-5998.
- Alabadí D., Oyama T., Yanovsky M. J., Harmon F. G., Más P., Kay, S. A. (2001) Reciprocal Regulation Between *TOC1* and *LHY/CCA1* Within the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Science* **293**, 880-883.
- Ang L. -H., Chattopadhyay S., Wei N., Oyama T., Okada K., Batschauer A., Deng X. -W. (1998) Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of *Arabidopsis* Development. *Molecular Cell* **1**, 213-222.
- Argyros R. D., Mathews D. E., Chiang Y. -H., Palmer C. M., Thibault D. M., Etheridge N., et al. (2008) Type B Response Regulators of *Arabidopsis* Play Key Roles in Cytokinin Signaling and Plant Development. *The Plant Cell* **20**, 2102-2116.
- Ballaré C. L. (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends In Plant Science* **4**, 97-102.
- Barciszewski J., Siboska G., Rattan S. I. S., Clark B. F. C. (2000) Occurrence, biosynthesis and properties of kinetin (N<sup>6</sup>-furfuryladenine). *Plant Growth Regulation* **32**, 257-265.
- Barry G. F., Rogers S. G., Fraley R. T., Brand L. (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **81**, 4776-4780.
- Barták P., Bednář P., Stránský Z., Boček P., Vespalec R. (2000) Determination of dissociation constants of cytokinins by capillary zone electrophoresis. *Journal Of Chromatography A* **878**, 249-259.
- Bassil N. V., Mok D. W. S., Mok M. C. (1993) Partial Purification of a cis-trans-Isomerase of Zeatin from Immature Seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* **102**, 867-872.
- Bielecki R. L. (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**, 431-442.
- Bishopp A., Lehesranta S., Vatén A., Help H., El-Showk S., Scheres B., et al. (2011) Phloem-Transported Cytokinin Regulates Polar Auxin Transport and Maintains Vascular Pattern in the Root Meristem. *Current Biology* **21**, 927-932.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., et al. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**, 39-44.
- Boonman A., Prinsen E., Gilmer F., Schurr U., Peeters A. J. M., Voeselek L. A. C. J., Pons T. L. (2007) Cytokinin Import Rate as a Signal for Photosynthetic Acclimation to Canopy Light Gradients. *Plant Physiology* **143**, 1841-1852.
- Brandstatter I., Kieber J. J. (1998) Two Genes with Similarity to Bacterial Response Regulators Are Rapidly and Specifically Induced by Cytokinin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1009-1019.
- Brouwer B., Gardeström P., Keech O. (2014) In response to partial plant shading, the lack of phytochrome A does not directly induce leaf senescence but alters the fine-tuning of chlorophyll biosynthesis. *Journal Of Experimental Botany* **65**, 4037-4049.

- Brownlee B. G., Hall R. H., Whitty C. D. (1975) 3-Methyl-2-butenal: An Enzymatic Degradation Product of the Cytokinin, N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenine. *Canadian Journal Of Biochemistry* **53**, 37-41.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.
- Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., et al. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**, 13-26.
- Carabelli M., Possenti M., Sessa G., Ciolfi A., Sassi M., Morelli G., Ruberti I. (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes & Development* **21**, 1863-1868.
- Carlsbecker A., Lee J. -Y., Roberts C. J., Dettmer J., Lehesranta S., Zhou J., et al. (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **465**, 316-321.
- Casal J. J., Smith H. (1989) The 'end-of-day' phytochrome control of internode elongation in mustard: kinetics, interaction with the previous fluence rate, and ecological implications. *Plant, Cell And Environment* **12**, 511-520.
- Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P., Van Onckelen H., Périlleux C., Bernier G. (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal Of Experimental Botany* **54**, 2511-2517.
- Danilova M. N., Kudryakova N. V., Voronin P. Y., Oelmüller R., Kusnetsov V. V., Kulaeva O. N. (2014) Membrane receptors of cytokinin and their regulatory role in *Arabidopsis thaliana* plant response to photooxidative stress under conditions of water deficit. *Russian Journal Of Plant Physiology* **61**, 434-442.
- Davies P. J. (2010) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In *Plant Hormones* (pp. 1-15). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Deikman J., Hammer P. E. (1995) Induction of Anthocyanin Accumulation by Cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **108**, 47-57.
- Dello Ioio R., Linhares F. S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Sabatini S. (2007) Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology* **17**, 678-682.
- Dello Ioio R., Galinha C., Fletcher A. G., Grigg S. P., Molnar A., Willemsen V., et al. (2012) A PHABULOSA/Cytokinin Feedback Loop Controls Root Growth in *Arabidopsis*. *Current Biology* **22**, 1699-1704.
- Dobrev P. I., Kamínek M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal Of Chromatography A* **950**, 21-29.
- Entsch B., Letham D. S. (1979) Enzymic glucosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Science Letters* **14**, 205-212.
- Entsch B., Parker C. W., Letham D. S. (1983) An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375-381.
- Entsch B., Parker C. W., Letham D. S., Summons R. E. (1979) Preparation and characterization, using high-performance liquid chromatography, of an enzyme forming glucosides of cytokinins. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Enzymology* **570**, 124-139.

- Ezer D., Jung J. -H., Lan H., Biswas S., Gregoire L., Box M. S., et al. (2017) The evening complex coordinates environmental and endogenous signals in *Arabidopsis*. *Nature Plants* **3**.
- Francis D. (2007) The plant cell cycle – 15 years on. *New Phytologist* **174**, 261-278.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal Of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.
- Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., et al. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121-130.
- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P. I., et al. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal Of Experimental Botany* **62**, 2827-2840.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., & Peč, P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase?. *European Journal Of Biochemistry* **268**, 450-461.
- Galuszka P., Frébortová J., Luhová L., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2005). Tissue Localization of Cytokinin Dehydrogenase in Maize: Possible Involvement of Quinone Species Generated from Plant Phenolics by Other Enzymatic Systems in the Catalytic Reaction. *Plant And Cell Physiology* **46**, 716-728.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., et al. (2007) Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal Of Plant Growth Regulation* **26**, 255-267.
- Gan S., Amasino R. M. (1995) Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Hanano S., Domagalska M. A., Nagy F., Davis S. J. (2006) Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes To Cells* **11**, 1381-1392.
- Hartig K., Beck E. (2005) Endogenous Cytokinin Oscillations Control Cell Cycle Progression of Tobacco BY-2 Cells. *Plant Biology* **7**, 33-40.
- Helfer A., Nusinow D. A., Chow B. Y., Gehrke A. R., Bulyk M. L., Kay S. A. (2011) *LUX ARRHYTHMO* Encodes a Nighttime Repressor of Circadian Gene Expression in the *Arabidopsis* Core Clock. *Current Biology* **21**, 126-133.
- Higuchi M., Pischke M. S., Mahonen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., et al. (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **101**, 8821-8826.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2007) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal Of Experimental Botany* **59**, 75-83.
- Hoecker U., Xu Y., Quail P. H. (1998) *SPA1*: A New Genetic Locus Involved in Phytochrome A-Specific Signal Transduction. *The Plant Cell* **10**, 19-33.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998) Biological activity of cytokinins derived from Ortho-and Meta-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109-115.
- Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J., Wareing P. F. (1975) A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008.
- Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G., Wareing P. F. (1973). A new cytokinin from populus robusta. *Tetrahedron Letters* **14**, 2827-2828.

- Hosoda K., Imamura A., Katoh E., Hatta T., Tachiki M., Yamada H., et al. (2002) Molecular Structure of the GARP Family of Plant Myb-Related DNA Binding Motifs of the *Arabidopsis* Response Regulators. *The Plant Cell* **14**, 2015-2029.
- Hou B., Lim E. -K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004) N -Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal Of Biological Chemistry* **279**, 47822-47832.
- Huang W., Pérez-García P., Pokhilko A., Millar A. J., Antoshechkin I., Riechmann J. L., Más, P. (2012) Mapping the Core of the *Arabidopsis* Circadian Clock Defines the Network Structure of the Oscillator. *Science* **336**, 75-79.
- Hutchison C. E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M. W., et al. (2006) The *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell* **18**, 3073-3087.
- Chae H. S., Faure F., Kieber J. J. (2003) The *eto1* , *eto2* , and *eto3* Mutations and Cytokinin Treatment Increase Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis* by Increasing the Stability of ACS Protein. *The Plant Cell* **15**, 545-559.
- Chalker-Scott L. (1999) Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry And Photobiology* **70**, 1-9.
- Chen C. -M., Kristopeit S. M. (1981a) Metabolism of Cytokinin: Deribosylation of Cytokinin Ribonucleoside by Adenosine Nucleosidase from Wheat Germ Cells. *Plant Physiology* **68**, 1020-1023.
- Chen C. -M., Kristopeit S. M. (1981b) Metabolism of Cytokinin. *Plant Physiology* **67**, 494-498.
- Chen M., Chory J., Fankhauser C. (2004) Light Signal Transduction in Higher Plants . *Annual Review Of Genetics* **38**, 87-117.
- Chory J., Reinecke D., Sim S., Washburn T., Brenner M. (1994) A Role for Cytokinins in De-Etiolation in *Arabidopsis* (*det* Mutants Have an Altered Response to Cytokinins. *Plant Physiology* **104**, 339-347.
- Imamura A., Yoshino Y., Mizuno T. (2001) Cellular Localization of the Signaling Components of *Arabidopsis* His-to-Asp Phosphorelay. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry* **65**, 2113-2117.
- Janečková H., Husičková A., Ferretti U., Prčina M., Pilařová E., Plačková L., et al. (2018) The interplay between cytokinins and light during senescence in detached *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment* **41**, 1870-1885.
- Jin S. -H., Ma X. -M., Kojima M., Sakakibara H., Wang Y. -W., Hou B. -K. (2013) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences trans-zeatin homeostasis and trans-zeatin responses likely through O-glucosylation . *Planta* **237**, 991-999.
- Kakimoto T. (2001) Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate: ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant And Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Kerstetter R. A., Hake S. (1997) Shoot Meristem Formation in Vegetative Development. *The Plant Cell* **9**, 1001-1010.
- Kiba T., Takei K., Kojima M., Sakakibara, H. (2013) Side-Chain Modification of Cytokinins Controls Shoot Growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* **27**, 452-461.
- Kieber J. J., Schaller G. E. (2014) Cytokinins. *The Arabidopsis Book* **12**.
- Kieber J. J., Schaller G. E. (2018) Cytokinin signaling in plant development. *Development* **145**.

- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., et al. (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **103**, 814-819.
- Kim W. -Y., Fujiwara S., Suh S. -S., Kim J., Kim Y., Han L., et al. (2007) ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**, 356-360.
- Kircher S., Kozma-Bognar L., Kim L., Adam E., Harter K., Schäfer E., Nagy F. (1999) Light Quality–Dependent Nuclear Import of the Plant Photoreceptors Phytochrome A and B. *The Plant Cell* **11**, 1445-1456.
- Kumar N., Larkin J. C. (2017) Why do plants need so many cyclin-dependent kinase inhibitors?. *Plant Signaling & Behavior* **12**.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., et al. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**, 652-655.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., et al. (2009) Functional Analyses of *LONELY GUY* Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 3152-3169.
- Laloue M., Fox J. E. (1989) Cytokinin Oxidase from Wheat. *Plant Physiology* **90**, 899-906.
- Laux T., Mayer K. F. X., Berger J., Jürgens G. (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 87-96.
- Letham D. S., Palni L. M. S., Tao G. -Q., Gollnow B. I., Bates C. M. (1983) Regulators of cell division in plant tissues XXIX. The activities of cytokinin glucosides and alanine conjugates in cytokinin bioassays. *Journal Of Plant Growth Regulation* **2**, 103-115.
- Ljung K., Sandberg G., Moritz T. (2010) Methods of Plant Hormone Analysis . In *Plant Hormones* (pp. 717-740). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Lohrmann J., Sweere U., Zabaleta E., Bäurle I., Keitel C., Kozma-Bognar L., et al. (2001) The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial Complex I in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics And Genomics* **265**, 2-13.
- Lochmanová G., Zdráhal Z., Konečná H., Koukalová Š., Malbeck J., Souček P., et al. (2008) Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown *Arabidopsis*: a proteomic analysis. *Journal Of Experimental Botany* **59**, 3705-3719.
- Lomin S. N., Krivosheev D. M., Steklov M. Y., Osolodkin D. I., Romanov G. A. (2012) Receptor Properties and Features of Cytokinin Signaling. *Acta Naturae* **4**, 31-45.
- Long J. A., Moan E. I., Medford J. I., Barton M. K. (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Mähönen A. P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K. M., Kinoshita K., Törmäkangas K., et al. (2006) Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate During Vascular Development. *Science* **311**, 94-98.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K. D., Fraaije M. W., Mattevi A. (2004) Structures of Michaelis and Product Complexes of Plant Cytokinin Dehydrogenase: Implications for Flavoenzyme Catalysis. *Journal Of Molecular Biology* **341**, 1237-1249.
- Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D. W. S. (1989) An Enzyme Mediating the Conversion of Zeatin to Dihydrozeatin in *Phaseolus Embryos*. *Plant Physiology* **90**, 1630-1635.
- Más P. (2005). Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *The International Journal Of Developmental Biology* **49**, 491-500.

- McGaw B. A., Horgan R. (1983). Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase. *Phytochemistry* **22**, 1103-1105.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1955) KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *Journal Of The American Chemical Society* **77**, 1392-1392.
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* **37**, 128-138.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., et al. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **103**, 16598-16603.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001) CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nakamichi N., Kiba T., Henriques R., Mizuno T., Chua N. -H., Sakakibara H. (2010) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *The Plant Cell* **22**, 594-605.
- Nakamichi N., Kita M., Ito S., Yamashino T., Mizuno T. (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, Together Play Essential Roles Close to the Circadian Clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant And Cell Physiology* **46**, 686-698.
- Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004) Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 1365-1377.
- Nobel P. S. (2009) Physicochemical and Environmental Plant Physiology. 4th ed., Amsterdam: Elsevier, 177-226.
- Nomoto Y., Kubozono S., Yamashino T., Nakamichi N., Mizuno T. (2012) Circadian Clock- and PIF4-Controlled Plant Growth: A Coincidence Mechanism Directly Integrates a Hormone Signaling Network into the Photoperiodic Control of Plant Architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant And Cell Physiology* **53**, 1950-1964.
- Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.
- Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **480**, 207-218.
- Nováková M., Motyka V., Dobrev P. I., Malbeck J., Gaudinová A., Vanková R. (2005) Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal Of Experimental Botany* **56**, 2877-2883.
- Nusinow D. A., Helfer A., Hamilton E. E., King J. J., Imaizumi T., Schultz T. F., et al. (2011) The ELF4–ELF3–LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* **475**, 398-402.
- Pačes V., Werstiuik E., Hall R. H. (1971) Conversion of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiology* **48**, 775-778.

- Plačková L., Hrdlička J., Smýkalová I., Cvečková M., Novák O., Griga M., Doležal K. (2015) Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures. *Plant Growth Regulation* **77**, 125-132.
- Pokhilko A., Fernández A. P., Edwards K. D., Southern M. M., Halliday K. J., Millar A. J. (2012) The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular Systems Biology* **8**.
- Popelková H., Fraaije M. W., Novák O., Frébortová J., Bilyeu K. D., Frébort I. (2006) Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *Biochemical Journal* **398**, 113-124.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. et al. (1998) Fyziologie rostlin. 1. vydání, Praha: Academia, 253-259.
- Punwani J. A., Hutchison C. E., Schaller G. E., Kieber J. J. (2010) The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The Plant Journal* **62**, 473-482.
- Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* **2**, 1896-1906.
- Rashotte A. M., Carson S. D. B., To J. P. C., Kieber, J. J. (2003) Expression Profiling of Cytokinin Action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 1998-2011.
- Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmülling T. (2006) *Arabidopsis* Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism. *The Plant Cell* **18**, 40-54.
- Richmond A. E., Lang A. (1957) Effect of Kinetin on Protein Content and Survival of Detached *Xanthium* Leaves. *Science* **125**, 650-651.
- Rohdich F., Hecht S., Gartner K., Adam P., Krieger C., Amslinger S., et al. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **99**, 1158-1163.
- Romanov G. A. (2009) How do cytokinins affect the cell?. *Russian Journal Of Plant Physiology* **56**, 268-290.
- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmülling T. (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal Of Experimental Botany* **57**, 4051-4058.
- Sakai H., Aoyama T., Oka, A. (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal* **24**, 703-711.
- Sakakibara H. (2006) CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review Of Plant Biology* **57**, 431-449.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., et al. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* **102**, 9972-9977.
- Salomé P. A., To J. P. C., Kieber J. J., McClung C. R. (2006) *Arabidopsis* Response Regulators ARR3 and ARR4 Play Cytokinin-Independent Roles in the Control of Circadian Period. *The Plant Cell* **18**, 55-69.



- Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carré I. A., Coupland G. (1998) The late elongated hypocotyl Mutation of *Arabidopsis* Disrupts Circadian Rhythms and the Photoperiodic Control of Flowering. *Cell* **93**, 1219-1229.
- Schaller G. E., Street I. H., Kieber J. J. (2014) Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion In Plant Biology* **21**, 7-15.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal Of Plant Research* **116**, 241-252.
- Skoog F., Miller C. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**, 118-131.
- Spíchal L. (2012). Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**.
- Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmülling, T. (2004) Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. *Plant And Cell Physiology* **45**, 1299-1305.
- Srivastava L. M. (2002). Plant growth and development: hormones and environment. 1st ed., Boston: Academic Press, 191-204.
- Stock A. M., Robinson V. L., Goudreau P. N. (2000) Two-Component Signal Transduction. *Annual Review Of Biochemistry* **69**, 183-215.
- Strnad M. (1996) Enzyme immunoassays of N 6-benzyladenine and N 6-(meta-hydroxybenzyl)adenine cytokinins. *Journal Of Plant Growth Regulation*, **15**, 179-188.
- Strnad M., Hanuš J., Vaněk T., Kamínek M., Ballantine J. A., Fussell B., Hanke D. E. (1997) Meta-Topolin, a Highly Active Aromatic Cytokinin from Poplar Leaves ( *Populus x canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry* **45**, 213-218.
- Strnad M., Peters W., Beck E., Kamínek M. (1992) Immunodetection and Identification of N6-(o-Hydroxybenzylamino)Purine as a Naturally Occurring Cytokinin in *Populus x canadensis* Moench cv *Robusta* Leaves. *Plant Physiology* **99**, 74-80.
- Sun J., Hirose N., Wang X., Wen P., Xue L., Sakakibara H., Zuo J. (2005) *Arabidopsis* *SOI33/AtENT8* Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport *In Planta*. *Journal Of Integrative Plant Biology* **47**, 588-603.
- Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012) A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**.
- Sweere U., Eichenberg K., Lohrmann J., Mira-Rodado V., Bäumle I., Kudla J., et al. (2001) Interaction of the Response Regulator ARR4 with Phytochrome B in Modulating Red Light Signaling. *Science* **294**, 1108-1111.
- Šmehilová M., Dobrušková J., Novák O., Takáč T., Galuszka P. (2016) Cytokinin-Specific Glycosyltransferases Possess Different Roles in Cytokinin Homeostasis Maintenance. *Frontiers In Plant Science* **7**.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006) Plant physiology. 4th ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 340-374.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.

- Takei K., Yamaya T., Sakakibara, H. (2004) *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of *trans*-Zeatin. *Journal Of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872.
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal* **45**, 1028-1036.
- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., et al. (2014) Quo vadis plant hormone analysis?. *Planta* **240**, 55-76.
- Tarkowski P., Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N. (2009) Analytical methods for cytokinins. *Trac Trends In Analytical Chemistry* **28**, 323-335.
- To J. P. C., Haberer G., Ferreira F. J., Deruère J., Mason M. G., Schaller G. E., et al. (2004) Type-A *Arabidopsis* Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell* **16**, 658-671.
- Vandenbussche F., Habricot Y., Condiff A. S., Maldiney R., Straeten D. V. D., Ahmad M. (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **49**, 428-441.
- Wang J., Ma X. -M., Kojima M., Sakakibara H., & Hou B. -K. (2011) N-Glucosyltransferase UGT76C2 is Involved in Cytokinin Homeostasis and Cytokinin Response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant And Cell Physiology* **52**, 2200-2213.
- Wang Z. -Y., Tobin E. M. (1998) Constitutive Expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* Gene Disrupts Circadian Rhythms and Suppresses Its Own Expression. *Cell* **93**, 1207-1217.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schumlling T. (2003) Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity . *The Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- West A. H., Stock A. M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends In Biochemical Sciences* **26**, 369-376.
- Whitty C. D., Hall R. H. (1974) A Cytokinin Oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal Of Biochemistry* **52**, 789-799.
- Wormit A., Traub M., Flörchinger M., Neuhaus H. E., Möhlmann T. (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal* **383**, 19-26.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., et al. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane. *Plant And Cell Physiology* **42**, 1017-1023.
- Yang H. -Q., Tang R. -H., Cashmore A. R. (2001) The Signaling Mechanism of *Arabidopsis* CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *The Plant Cell* **13**, 2573-2587.
- Zdarska M., Dobisová T., Gelová Z., Pernisová M., Dabravolski S., Hejátko J. (2015) Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. *Journal Of Experimental Botany* **66**, 4913-4931.
- Zeugner A., Byrdin M., Bouly J. -P., Bakrim N., Giovani B., Brettel K., Ahmad M. (2005) Light-induced Electron Transfer in *Arabidopsis* Cryptochrome-1 Correlates with *in Vivo* Function. *Journal Of Biological Chemistry* **280**, 19437-19440.

- Zhang K., Letham D. S., John P. C. L. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34<sup>cdc2</sup>-like H1 histone kinase. *Planta* **200**, 2-12.
- Zheng B., Deng Y., Mu J., Ji Z., Xiang T., Niu Q. -W., et al. (2006) Cytokinin affects circadian-clock oscillation in a phytochrome B- and *Arabidopsis* response regulator 4-dependent manner. *Physiologia Plantarum* **127**, 277-292.