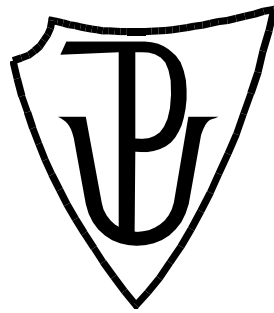


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Vliv ročního období na obsah cytokininů v *Arabidopsis thaliana*

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Eliška Gebauerová**  
Studijní program: N1406 Biochemie  
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.**  
Rok: 2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. nejenom za vedení, připomínky a čas, ale také i za obrovskou podporu a pochopení. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Alexandře Husičkové, Ph.D. za rady a možnost konzultace mé práce. Touto cestou bych chtěla poděkovat taktéž i svému zesnulému otci, který celý svůj život věnoval tvrdé práci a své rodině.

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

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Gebauerová
Název práce	Vliv ročního období na obsah cytokininů v <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Cílem diplomové práce je experimentálně prokázat schopnost rostlin korigovat svůj životní cyklus za konstantních podmínek růstu, tedy bez základních přirozených vnějších faktorů indukujících aktivitu cytokininů a senescenci rostlin, a to prostřednictvím sledování endogenních hladin cytokininů, chlorofylu a monitorování fotosyntetické aktivity v průběhu celého roku. Při řešení dané problematiky bylo využito moderních analytických metod, a metod využívajících fluorescenci pro měření fotosyntézy.

Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokininy, chlorofyl, fotosyntéza, rostlinné hormony, senescence, StageTip
Počet stran	87
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Eliška Gebauerová
Title	The effects of the season on cytokinin content in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Lenka Plačková, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	

The aim of this diploma thesis is to demonstrate the potential ability of plants to manage their cell cycle even under constant growth conditions, i.e. without naturally occurring external factors inducing the activity of cytokinins and plant senescence. This was achieved by monitoring endogenous levels of cytokinins, chlorophyll and monitoring photosynthetic activity throughout the year. Modern analytical methods including also fluorescence method were used for measurements of photosynthesis, chlorophyll and cytokinin levels.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinins, chlorophyll, photosynthesis, plant hormones, senescence, StageTip
Number of pages	87
Number of appendices	3
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	<b>3</b>
2.1	Charakterizace přirozených a syntetických cytokininů	3
2.1.1	Přirozené cytokininy	3
2.1.2	Isoprenoidní cytokininy	4
2.1.3	Aromatické cytokininy	5
2.1.4	Syntetické deriváty cytokininů	6
2.2	Strukturální diverzita a biologická aktivita přirozených cytokininů	8
2.2.1	Strukturální diverzita	8
2.2.2	Biologická aktivita	9
2.3	Metabolismus cytokininů	10
2.3.1	Biosyntéza isoprenoidních cytokininů	10
2.3.1.1	Rostlinné geny pro adenosinfosfát-isopentenyltransferázu	11
2.3.1.2	Substrátová specifita adenosinfosfát-isopentenyltransferázy	12
2.3.1.3	Biosyntéza <i>trans</i> -zeatinového typu cytokininů	12
2.3.1.4	Dráha tRNA degradace	13
2.3.1.5	Aktivace cytokininů	13
2.3.1.6	Lokalizace cytokininové biosyntézy	14
2.3.1.7	Regulace cytokininové biosyntézy	15
2.3.2	Degradace cytokininů	16
2.3.3	Další metabolické modifikace	16
2.4	Hlavní fyziologické funkce cytokininů	20
2.4.1	Cytokininy a buněčný cyklus	20
2.4.2	Cytokininy a stonkový apikální meristém	21
2.4.3	Cytokininy a kořenový apikální meristém	21
2.4.4	Cytokininy a regenerace orgánů – regulace morfogeneze	22
2.4.5	Cytokininy a listová senescence	22
2.5	Popis vlivu ročních období na obsah cytokininů u rostlin	24
2.6	Metody pro stanovení cytokininů, fotosyntézy a chlorofylu	25
2.6.1	Analytické postupy pro stanovení cytokininů	25
2.6.1.1	Extrakce a purifikace vzorku	26
2.6.1.2	Stanovení cytokininů	27

2.6.2	Metody stanovení fotosyntézy	30
2.6.3	Metody pro stanovení chlorofylu	36
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>38</b>
3.1	Rostlinný materiál	38
3.2	Chemikálie a roztoky	38
3.3	Přístroje	39
3.4	Programové vybavení	40
3.5	Metody	40
3.5.1	Příprava rostlinného materiálu	40
3.5.2	Stanovení endogenní hladiny cytokininů	41
3.5.2.1	Purifikace cytokininů	41
3.5.2.2	Separace cytokininových metabolitů	42
3.5.3	Stanovení fotosyntetické aktivity	43
3.5.4	Stanovení obsahu chlorofylu	43
3.5.5	Evaluační dat	44
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>45</b>
4.1	Endogenní hladina cytokininů	45
4.2	Endogenní obsah chlorofylu	52
4.3	Fotosyntetická aktivita	53
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy</b>	<b>70</b>

## **CÍLE PRÁCE**

Cílem teoretické části diplomové práce je zpracování literární rešerše, jejíž obsahem je obecná charakterizace rostlinných hormonů se zaměřením na cytokininy a jejich strukturu, systematické členění, biologickou aktivitu, biosyntézu a její lokalizaci, metabolismus cytokininů a popis vlivu ročních období na obsah cytokininů, chlorofylu a fotosyntetické aktivity. Část literární rešerše je taktéž zaměřena na metody stanovení cytokininů, chlorofylu a fotosyntézy.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na monitorování fyziologického vývoje a změn rostlin *Arabidopsis thaliana* v jednotlivých ročních obdobích (leden 2019- leden 2020) a jejich vlivu na endogenní hladiny cytokininů, chlorofylu a fotosyntézy.



# 1 ÚVOD

Růst je základní projev živých organismů spojený s nevratným přibýváním hmoty či velikosti. Pro růst a vývoj každého organismu je nutný specifický soubor určitých podmínek - faktorů. Mezi tzv. vnější faktory se nejčastěji řadí teplota, záření, zemská tíže a elektřina. Na molekulární úrovni řídí růstové a vývojové procesy látky obecně nazývané fytohormony neboli růstové regulátory (Procházka *et al.*, 1998).

Růst a vývoj rostlin však byly dlouho spojovány jen s vlivy výživnými (trofickými). Hypotézu o existenci specifických organotvorných látek v rostlinách vyjádřil až roku 1880 německý botanik a žák Jana Evangelisty Purkyně, Julius Sachs. Tato hypotéza byla postavena na tvrzení, že určité specifické látky způsobují růst stonků a jiné růst kořenů, květů nebo listů. Po objevu lidských hormonů na počátku desátých let 20. století (Bayliss a Starling, 1902) zbyval pak už jen krok k definování odnože přirozených rostlinných růstových regulátorů, tzv. fytohormonů, na čemž se podíleli zejména: holandský biolog F. W. Went (1928) a také Američané F. Skoog a K. V. Thimann (1934), R. Snow (1932), chemik F. Kögl (1932), botanici H. Söding (1932), F. Laibach (1934), H. Fitting (1936) a další (Procházka *et al.*, 1997).

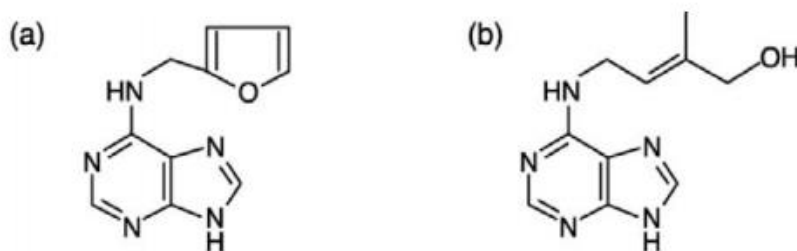
Název hormon je odvozen z řeckého výrazu „hormao“ což znamená „stimulovat, dávat do pohybu“. Jako rostlinné hormony (fytohormony) se označují skupiny přirozeně se vyskytujících organických látek, které již při svých velmi nízkých koncentracích disponují schopností ovlivňovat fyziologické procesy růstu, diferenciaci a vývoje v rostlinných buňkách (Davies, 2004). Dle analogií působení s hormony živočišnými bylo ustanoveno rozdělení základních endogenních růstových regulátorů do pěti různých skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a etylen (Procházka *et al.*, 1998). V posledních desítkách let se navíc objevily další látky fytohormonálního charakteru jako kyselina jasmonová a salicylová, brassinosteroidy či polypeptidy a oligopeptidy (Lindsey, 2002; Vanstraelen a Benková, 2012).

Jako cytokininy (CK) se označují rostlinné hormony (Miller *et al.*, 1955) přirozeně se vyskytující jako N6-substituované deriváty adeninu (Mok a Mok, 2001). Tato samostatná skupina fytohormonů byla odvozena zejména díky poznatkům rakouského botanika G. Haberlandta (1913), jenž objevil, že z floému difundují jisté sloučeniny indukující růst parenchymatického pletiva bramborových hlíz (*Solanum tuberosum* L., Spíchal, 2012). Prostřednictvím rozvoje technik rostlinných tkáňových kultur se poté v padesátých letech minulého století identifikoval první cytokinin z autoklávované DNA spermií sledě, která

byla silným aktivátorem proliferace kultivovaných buněk tabáku. Identifikovaný adeninový derivát, 6-furfurylaminopurin dostal název kinetin (Miller *et al.*, 1955) (Obr. 1). Prvním přirozeným identifikovaným cytokininem byl poté roku 1963 zeatin nacházející se v nezralém endospermu kukuřice (Letham, 1963) (Obr. 1). Dnes je již známo, že se přirozené cytokininy nevyskytují pouze v rostlinných buňkách, ale i v řasách (Brain *et al.*, 1973), mechu (Hahn a Bopp, 1968), cyanobakteriích (Selyakh a Semenova, 2000 v Tsakelova *et al.*, 2006), bakteriích a kvasinkách (Mishke, 1988 v Tsavkelova *et al.*, 2006; Hussain a Hasnain, 2009) či dokonce v lidské moči (Barciszewski *et al.*, 2000). Další kapitoly této diplomové práce se budou věnovat výhradně problematice rostlinných hormonů – cytokininů.

Výskyt, rozložení a variace jednotlivých cytokininů závisí na druhu, tkáni a vývojové fázi rostliny (Mok a Mok, 2001; Sakakibara, 2006). Mimo jejich hlavní funkce, kterými jsou stimulace buněčného dělení, klíčení semen, tvorba laterálních pupenů a regulace apikální dominance (Mok a Mok, 1994), fungují také jako inhibitory senescence rostlin (Gan a Amasino, 1995), při které dochází ke snížení obsahu chlorofylu a fotosyntetické aktivity (Šesták, 1977). Také bylo již prokázáno, že právě cytokininy jsou hlavními komponenty mající vliv na přechod mezi oběma kontrolními body buněčného cyklu G1/S (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2011) a G2/M (Lipavská *et al.*, 2011). Obsah cytokininů, společně s obsahem chlorofylu a související fotosyntetickou aktivitou se tak stávají výhodným ukazatelem senescence rostlin.

Tato diplomová práce se zaměřuje na potvrzení či vyvrácení hypotézy o existenci rostlinného mechanismu, umožňujícího samostatně řídit senescenci rostlin nezávisle na vnějších podmínkách růstu. Simulovaného prostředí bez změn **základních** vnějších faktorů ovlivňující růst je docíleno kultivací semenáčků *Arabidopsis thaliana* pouze za konstantních podmínek. Vykonané studie tak mohou doplnit informace důležité pro úspěšnou regeneraci a mikropropagaci rostlin z buněk či protoplastů *in vitro*. Takto vytvořené rostlinné pletivové kultury mohou sloužit k praktické aplikaci či k získávání teoretických poznatků.



Obr. 1 Struktura kinetinu (a) a *trans*-zeatinu (b) (Davies, 2004).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Charakterizace přirozených a syntetických cytokininů

Cytokininy (CKs) byly na základě dosud získaných poznatků a poznatků vycházejících ze synteticky připraveného kinetinu a jeho analogů definovány jako látky, které mají v přítomnosti auxinů stejné fyziologické účinky jako kinetin (Skoog a Armstrong, 1970). V současné době známe více než 200 přirozených a syntetických cytokininů (Krishnamurthy, 2015), přičemž za nejrozšířenější se považují zeatinový, isopentenyladeninový a dihydrozeatinový typ cytokininů zahrnující i jejich metabolity. V rostlinách se dále vyskytují transportní formy CKs s navázanou ribózou v N9 poloze – ribosidy (Davies, 2004).

Obecně rozlišujeme **přirozené** a **syntetické** CKs, i když tato klasifikace však dosud nebyla dostatečně ucelena. Kupříkladu přirozeně se vyskytující purinové CKs, jako 6-furfurylaminopurin (kinetin) a 6-benzylaminopurin (BAP), jsou vzhledem k velice nízkým koncentracím, v jakých se v rostlinných tkáních nachází, drtivou většinou literárních zdrojů považovány za syntetické a v rámci komerčních využití bývají připravovány chemickou syntézou (van Staden *et al.*, 2008). V rámci skutečnosti, že tyto sloučeniny již byly v rostlinách objeveny, je budeme v následující kapitole řadit do třídy přirozených aromatických CKs.

#### 2.1.1 Přirozené cytokininy

Přirozeně se vyskytující cytokininy strukturně charakterizujeme jako N6–substituované deriváty adeninu. Podle povahy substituentu je možné je dále rozdělit na **isoprenoidní** a **aromatické** (Zažímalová *et al.*, 1999) (Obr. 3). Zatímco isoprenoidní CKs jsou v rostlinách velice rozšířené, aromatické CKs se naopak řadí spíše k synteticky vytvořeným artefaktům zajišťující vhodnou ekonomickou alternativu přirozených CKs.

Přítomnost jednotlivých druhů cytokininů se může velmi lišit mezi rostlinnými druhy, tkáněmi (Hirose *et al.*, 2008), vývojovým stádiem (Emery *et al.*, 1998) a podmínkami prostředí (Takei *et al.*, 2001). Jak již bylo uvedeno v úvodu, tyto molekuly se navíc nevyskytují pouze v rostlinných buňkách, ale i v řasách (Brain *et al.*, 1973), mechu (Hahn a Bopp, 1968), cyanobakteriích (Selyakh a Semenova, 2000 v Tsakelova *et al.*, 2006), bakteriích (Hussain a Hasnain, 2009) a kvasinkách (Mishke, 1988 v Tsakelova *et al.*, 2006) či dokonce v lidské moči (Barciszewski *et al.*, 2000). Již v pracích Lethama a

Palniho z roku 1983 je uvedeno, že samotná produkce volných cytokininů mikroorganismy byla demonstrována už před mnoha lety, čímž se indikoval určitý vztah mezi rostlinami a mikroorganismy (Letham a Palni, 1983). Pro biologické aktivity isoprenoidních a aromatických tříd platí, že jsou kvalitativně podobné, ale mohou se kvantitativně lišit v různých procesech (Davies, 2004; Schmölling, 2004).

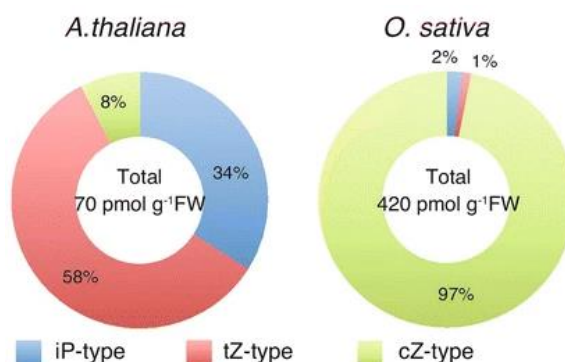
## 2.1.2 Isoprenoidní cytokininy

Isoprenoidní cytokininy jsou nejabundantnější třídou CKs, pro kterou jsou typické 3 základní substituce adeninu v poloze N6-. Tyto substituce odpovídají třem základním typům isoprenoidních CKs (Procházka *et al.*, 1997) (Obr. 3):

1. **N6-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adeninové (iP)** – obsahují isopentenylový N6- vedlejší řetězec
2. **cis – a trans-zeatinové (tZ, cZ)** – obsahují hydroxylovaný isopentenylový N6- vedlejší řetězec, který se vyskytuje buď v *cis*- nebo *trans*- konfiguraci v závislosti na tom, která ze dvou metylových skupin je hydroxylována
3. **dihydrozeatinové (DHZ)** – k jejich vzniku vede redukce dvojnásobné vazby na vedlejším řetězci molekuly zeatinu (Procházka *et al.*, 1997)

### Výskyt isoprenoidních cytokininů

Zdaleka nejrozšířenějšími jsou cytokininy s nenasyceným postranním řetězcem, zejména **trans-zeatiny** a **isopentenyladeniny**, které jsou hlavními formami např. v *A. thaliana* (Letham, 1963; Li *et al.*, 2000; Sakakibara, 2006) (Obr. 2). Naproti tomu **cis-zeatin** se až na určité výjimky, kterými jsou např. rýže (Takagi *et al.*, 1985) či kukuřice (Veitch *et al.*, 2003; Vyroubalová *et al.*, 2009), tedy zejména jednoděložné rostliny, vyskytuje minoritně (Durand a Durand, 1994 v Veitch *et al.*, 2003; Emery *et al.*, 1998) (Obr. 2).



Obr. 2 Výšečové grafy zobrazující relativní zastoupení druhů cytokininů ve výhoncích rostlin *Arabidopsis thaliana* (vlevo) a *Oryza sativa* (vpravo) (Osugi a Sakakibara, 2015 dle Kiba *et al.*, 2013 a Kamada-Nobusada *et al.*, 2013).

**Dihydrozeatin**, protějšek zeatinu s nasyceným postranním řetězcem, byl identifikován převážně v semenech, apikálních pupenech a pravděpodobně je přítomný taktéž i v endospermu fazole (*Phaseolus vulgaris*), ve které byla detekována příslušná reduktáza, katalyzující přeměnu zeatinu na dihydrozeatin (Martin *et al.*, 1989).

### 2.1.3 Aromatické cytokininy

Odlišnou skupinou jsou aromatické cytokininy, tedy CKs obsahující **aromatický substituent** (Obr. 3). Mezi nejznámější aromatické CKs patří:

- 6-furfurylaminopurin (kinetin)
- 6-benzylaminopurin (BAP)
- *o*-, *m*- a *p*-hydroxylované nebo methoxylované deriváty BAP, tzv. topoliny

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>1</sub> -R	H	-	<i>N</i> <sup>1</sup> -isopentenyladenosine	iPR
	N <sub>1</sub> -G	H	-	<i>N</i> <sup>1</sup> -isopentenyladenine-7-glucoside	iP7G
	N <sub>1</sub> -G	H	-	<i>N</i> <sup>1</sup> -isopentenyladenine-9-glucoside	iP9G
	N <sub>1</sub> -RP	H	-	<i>N</i> <sup>1</sup> -isopentenyladenosine-5'-monophosphate	iPMP
	H	H	H	<i>trans</i> -zeatin	zZ
	N <sub>1</sub> -R	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside	zZR
	N <sub>1</sub> -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-7-glucoside	zZ7G
	N <sub>1</sub> -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glucoside	zZ9G
	H	G	G	<i>trans</i> -zeatin O-glucoside	zZOG
	N <sub>1</sub> -R	G	G	<i>trans</i> -zeatin riboside O-glucoside	zZROG
	N <sub>1</sub> -RP	H	H	<i>trans</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	zZMP
	H	H	H	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	R	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside	cZR
	N <sub>1</sub> -G	H	H	<i>cis</i> -zeatin-9-glucoside	cZ9G
	H	G	G	<i>cis</i> -zeatin O-glucoside	cZOG
	N <sub>1</sub> -R	G	G	<i>cis</i> -zeatin riboside O-glucoside	cZROG
	N <sub>1</sub> -RP	H	H	<i>cis</i> -zeatin riboside-5'-monophosphate	cZMP
	H	H	H	dihydrozeatin	DHZ
	N <sub>1</sub> -R	H	H	dihydrozeatin riboside	DHZR
	N <sub>1</sub> -G	H	H	dihydrozeatin-9-glucoside	DHZ9G
	H	G	G	dihydrozeatin O-glucoside	DHZOG
	N <sub>1</sub> -R	G	G	dihydrozeatin riboside O-glucoside	DHZROG
	N <sub>1</sub> -RP	H	H	dihydrozeatin riboside-5'-monophosphate	DHZMP
	H	-	-	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenine	BA
	N <sub>1</sub> -R	-	-	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenosine	BAR
	N <sub>1</sub> -G	-	-	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenine-3-glucoside	BA3G
	N <sub>1</sub> -G	-	-	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenine-7-glucoside	BA7G
	N <sub>1</sub> -RP	-	-	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenosine-5'-monophosphate	BAMP
	H	-	-	<i>ortho</i> -topolin	oT
	N <sub>1</sub> -R	-	-	<i>ortho</i> -topolin riboside	oTR
	N <sub>1</sub> -G	-	-	<i>ortho</i> -topolin-9-glucoside	oT9G
	H	-	-	<i>meta</i> -topolin	mT
	N <sub>1</sub> -R	-	-	<i>meta</i> -topolin riboside	mTR
	N <sub>1</sub> -G	-	-	<i>meta</i> -topolin-9-glucoside	mT9G
	H	-	-	<i>para</i> -topolin	pT
	N <sub>1</sub> -R	-	-	<i>para</i> -topolin riboside	pTR
	H	-	-	kinetin	K
	N <sub>1</sub> -R	-	-	kinetin riboside	KR
	N <sub>1</sub> -G	-	-	kinetin-9-glucoside	K9G

Obr. 3 Struktury, názvy a zkratky nejznámějších isoprenoidních a aromatických cytokininů. (Svačinová *et al.*, 2012).

## Výskyt aromatických cytokininů

**Kinetin** (6-furfurylaminopurin) (Obr. 1), byl izolován roku 1955 (Miller *et al.*, 1995) jako syntetický vedlejší produkt autoklávované DNA spermií sledě, ovšem roku 1996 byl objeven taktéž i v rostlinných a lidských buňkách či lidské moči (Raman, *et al.*, 1996; Barciszewski *et al.*, 1996; Barciszewski *et al.*, 2000). V nedávné době byl také identifikován v endospermu čerstvých mladých kokosových plodů (Ge *et al.*, 2005).

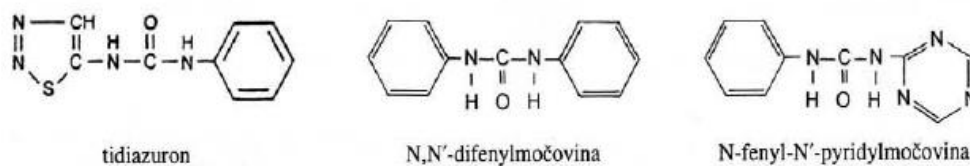
**N6-benzyladenin** a jeho deriváty s hydroxylovou skupinou v poloze *orto*-, *meta*- a *para*- na benzenovém jádře postranního řetězce byly dlouhou dobu pokládány za syntetické, avšak roku 1972 popsali Horgan *et al.* výskyt *o*-hydroxybenzyladeninu v listech topolu (Horgan *et al.*, 1972 v Procházka *et al.*, 1998). Dle místa výskytu hydroxylové skupiny na vedlejším aromatickém řetězci se tyto aromatické cytokininy začaly nazývat *o*-, *m*- a *p*-topoliny (Procházka *et al.*, 1998).

Aromatické cytokininy byly doposud dále identifikovány například u rostlin *Arabidopsis thaliana*, *Populus canadensis* (Tarkowská *et al.*, 2003) a *Solanum tuberosum* L. (Baroja-Fernández *et al.*, 2001), ovšem jejich výskyt není až tak častý a není o nich známo mnoho informací. Vzhledem ke své vysoké stabilitě, ale nízké koncentraci v rostlinách jsou často připravovány synteticky a následně využívány v tkáňových kulturách.

### 2.1.4 Syntetické deriváty cytokininů

Biologickou aktivitu cytokininů vykazují i syntetické cytokininy a některé syntetické sloučeniny. Bylo navíc prokázáno, že některé syntetické CKs disponují podobnou molekulární geometrií jako přirozené CKs (Yonova, 2010), proto se předpokládá jejich rozpoznávání stejnými vazebnými místy a rovněž i podobný mechanismus působení (Procházka *et al.*, 1997). Nejčastěji se jedná o N6-substituované adeninové deriváty, ale známé jsou také i sloučeniny méně chemicky příbuzné, jako např. 4-alkylaminopteridin nebo 6-benzylloxypurin (van Staden *et al.*, 2008).

Nepurinové CKs jsou největší skupinou syntetických CKs, do které se řadí: benzimidazoly, pyrimidiny, O6-substituované deriváty hypoxanthinu, guaninu a nejvýznamnější skupina – aromatické deriváty močoviny a tiomočoviny (Kunikowska *et al.*, 2013). Mezi nejaktivnější z nich se řadí N, N'-difenyльмоčovina, N-fenyl-N'-pyridylmočovina a tidiazuron (Procházka *et al.*, 1998) (Obr. 4).



Obr. 4 Struktura neaktivnějších aromatických derivátů močoviny a tiomočoviny (Procházka *et al.*, 1998).

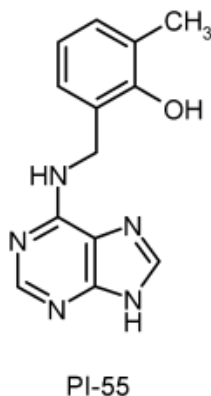
V kulturách *in vitro* se pro mikropropagaci nejvíce využívá 6-furfurylaminopurin (kinetin) a 6-benzyladenin (BA) neboli 6-benzylaminopurin (BAP). Tyto sloučeniny, jak již bylo zmíněno výše (viz. kapitola Aromatické cytokininy), byly dříve považovány za látky pouze syntetické, toto tvrzení se však vyvrátilo s jejich postupným objevem v rostlinách (Procházka *et al.*, 1998).

### Anticytokininy

Při postupném upřesnění struktury a aktivit CKs došlo zároveň k objevení látek s antagonistickou funkcí vůči cytokininům, tzv. anticytokininů. Jedná se zejména o pyrolové a pyrazolové deriváty či cytokininy močovinného typu, kdy modifikací jejich postranních řetězců, zejména navázáním metylové skupiny, zrušením dvojnás vazby či náhradou fenylu benzylem (v případě N,N'-difenylničoviny) se může docílit již zmíněných antagonistických funkcí těchto sloučenin (Procházka *et al.*, 1998). Tyto látky pak mohou sloužit jako nástroj pro studium cytokininů.

První známou molekulou antagonistující aktivitu rostlinného cytokininu na úrovni receptoru byla sloučenina 6-(2-hydroxy-3-metylbenzylamino)purinnebo-li PI-55 (Obr. 5). Strukturálně je tato sloučenina úzce spjata s cytokininem 6-benzylaminopurinem (BAP). Substituce ve specifických polohách aromatického postranního řetězce způsobují, že PI-55 kompetitivně inhibuje vazbu *trans*-zeatinového ligandu do cytokininového receptoru (CRE1) (Spíchal *et al.*, 2008).

V případě souvislostí anticytokininů s lidskými buňkami, se dle biochemických studií zaměřených na vybrané anticytokininy potvrdila jejich schopnost inhibovat lidské cyklin-dependentní kinázy (CDKs). Rentgenové stanovení krystalové struktury lidského komplexu CDK2-anticytokinin prokázalo, že antagonistista zabírá ATP-vazebné místo CDK2 (Spíchal *et al.*, 2007).



Obr. 5 Struktura nově identifikovaného anticytokininu PI-55 (Spíchal *et al.*, 2008).

## 2.2 Strukturální diverzita a biologická aktivita přirozených cytokininů

### 2.2.1 Strukturální diverzita

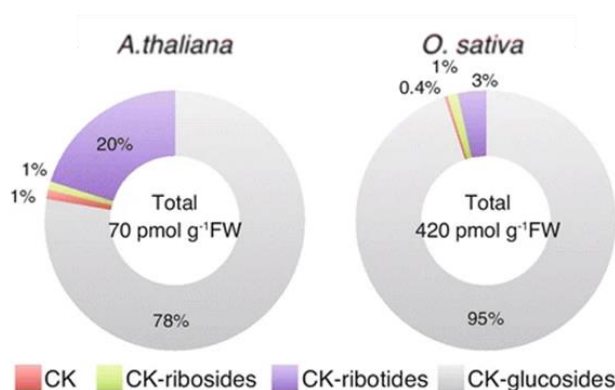
Cytokininy se dále mohou vyskytovat ve formě volných bází nebo modifikované konjugací s cukerným zbytkem či aminokyselinami (Letham a Palni, 1983). Obvykle všechny přirozené cytokininové metabolity mají své odpovídající nukleosidy, nukleotidy a glukosidy (Sakakibara, 2006) (Obr. 6). Mezi nejčastější modifikace přirozených cytokininů patří (Procházka *et al.*, 1997):

1. **Navázání cukerného zbytku na purinový dusík** (nejčastěji v polohách *N9-*, *N7-* za vzniku *N*-glukosidů).
2. **Navázání cukerného zbytku na postranní řetězec molekuly cytokininu přes terminální hydroxyl** (*O*-glukosidy).
3. **Navázání acetylu na postranní řetězec molekuly cytokininu přes terminální hydroxyl** (*O*-acetylestery).
4. **Navázání alaninového zbytku na purinový dusík** (poloha *N9-*).
5. **Esterifikace ribosidů kyselinou fosforečnou za vzniku ribotidů** (poloha *N9-*).

Strukturální variabilita ovlivňuje **biologickou aktivitu** a **stabilitu** těchto látek. Vzhledem ke své stabilitě jsou glukosidy nejhojnějšími složkami derivátů CKs, tvořících 80 % i více z celkových sloučenin souvisejících s CKs v rostlinách (Osugi a Sakakibara, 2015) (Obr. 6). Modifikace adeninového kruhu ve smyslu záměny atomů dusíku za uhlík, připojení funkčních skupin a nasycení dvojných vazeb jakožto i modifikace optimální



pětiuhlíkaté délky postranního řetězce pak může ústít ke snížení až k zániku cytokininové aktivity (Procházka *et al.*, 1997).



Obr. 6 Výšečové grafy zobrazující relativní zastoupení aktivní formy (CK), ribosidů (CK-ribosides), ribotidů (CK-ribotides) a glukosidů (CK-glucosides) ve výhoncích rostlin *Arabidopsis thaliana* (vlevo) a *Oryza sativa* (vpravo) (Osugi a Sakakibara, 2015 dle Kiba *et al.*, 2013 a Kamada-Nobusada *et al.*, 2013).

## 2.2.2 Biologická aktivita

Variace a distribuce jednotlivých cytokininových typů se liší v závislosti na rostlinném druhu, tkáni a stádiu vývoje. Provedené studie však předpokládají, že CKs mohou být z hlediska aktivity rozčleněny do tří hlavních skupin: **aktivní formy**, **translokační formy** a **zásobní – inaktivované formy** (Davies, 2004).

Biotesty provedené na mechu *Funaria hydrometrica* prokázaly, že volné báze jako **tZ** a **iP** jsou aktivní, zatímco **tZR** vykazovaly pouze nízkou aktivitu (Spiess, 1975). Konkrétnější náhled byl poskytnut identifikací CKs receptorových genů a podrobnou analýzou jejich ligandů (Sakakibara, 2006), kdy např. *in vitro* testování <sup>3</sup>H-vázaných cytokininů s AHK4 (CRE1) cytokininovým receptorem potvrdilo, že cytokininové **volné nukleobáze** jsou primárními ligandy pro daný receptor a mohou být považovány za aktivní formyna rozdíl od **nukleosidů** (Yamada *et al.*, 2001; Sakakibara, 2006), které se vzhledem ke své odlišné četnosti v xylému a floému u různých druhů pokládají za formy translokační (Davies, 2004).

Změny v akumulacích cukerných konjugátů – **O-glukosidů** – jakožto reakce na enviromentální faktory (nízká teplota), naznačují, že v porovnáních s volnými bázemi se tyto konjugáty považují za zásobní, tedy inaktivní formu (Brandon *et al.*, 1992). Nízkou či žádnou fyziologickou aktivitu potvrdily i cytokininové biotesty *N7-*, *N9*-glukosidů a *N9*-alanylů. *O*-glukosidy, stejně tak jako i konjugáty *N*-glukosidy a *N*-alanylové deriváty

se v porovnání s volnými bázemi při působení oxidázy/dehydrogenázy (CKX) navíc vyznačují také i větší metabolickou stabilitou (McGaw a Horgan, 1983).

Fyziologický význam různých cytokininových variací nebyl dosud plně objasněn, ovšem na základě aktivity, četnosti a stability iP, tZ, cZ a DHZ v rostlinách byly již objeveny určité specifické odlišnosti.

**iP**, **tZ** a jejich deriváty jsou nejčastějšími typy CKs v rostlinách, jsou však citlivé na cytokininoxidázu/dehydrogenázu (CKX). Naproti tomu **DHZ** se až na jisté výjimky vyskytuje v rostlinách minoritně, avšak disponuje větší rezistencí vůči CKX a tedy vyšší stabilitou. Ve vyšších rostlinách se zeatin vyskytuje jak v *cis*-, tak v *trans*- konfiguraci, přičemž *cis*-isomery (**cZ**) vykazují nižší cytokininovou aktivitu, ale vyšší stabilitu způsobenou nízkou afinitou k CKX (Bilyeu *et al.*, 2001).

V obecné rovině můžeme tvrdit, že nejvyšší biologická aktivita se zaznamenává u látek s pětiuhlíkatým isoprenoidním substituentem v poloze N6- a dvojnou vazbu v poloze C2- (Kamínek, 1992). Aktivita se dále zvyšuje hydroxylací terminální metylové skupiny v poloze *trans*-. Příkladem takovéto konfigurace jsou **trans-zeatiny**, cytokininy, jejichž aktivita je obzvláště vysoká (Schmitz *et al.*, 1972). Vyšší aktivita u hydroxylovaných forem byla prokázána i v řadě biotestů pro aromatické CKs, např. pro vysoce aktivní **m-topolin** (Procházka *et al.*, 1998). Na druhou stranu, hydroxylovaný postranní řetězec tZ, cZ a DHZ může být modifikován *O*-glykosylací, což má za následek převedení těchto aktivních forem na formy zásobní, tedy neaktivní (Davies, 2004).

## 2.3 Metabolismus cytokininů

### 2.3.1 Biosyntéza isoprenoidních cytokininů

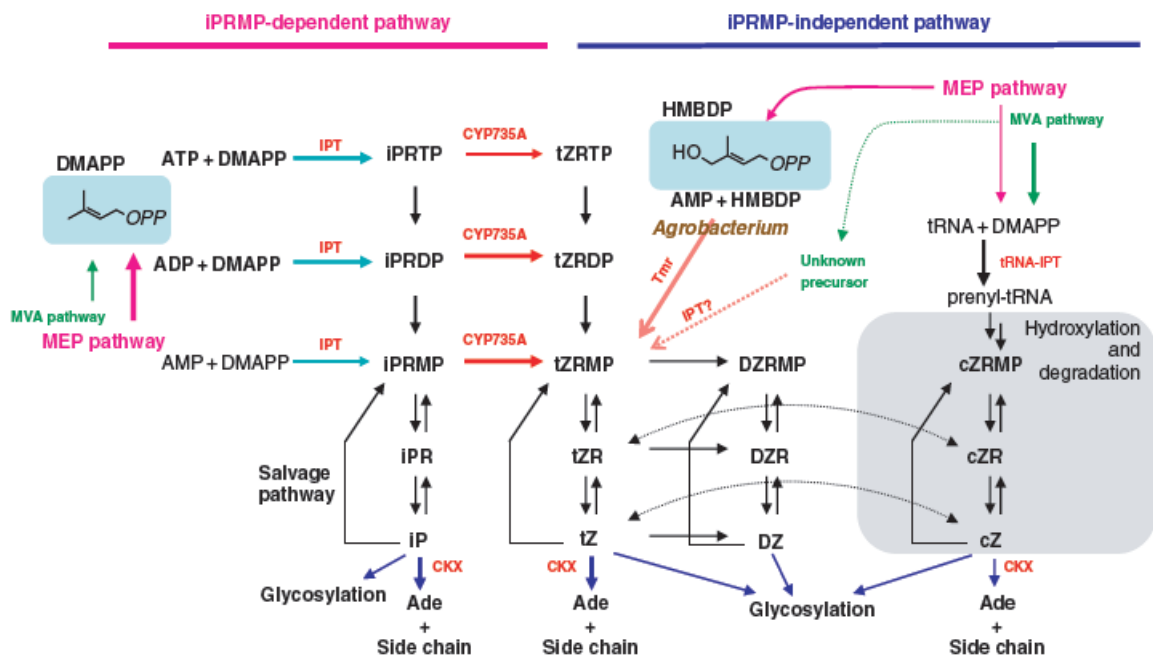
Biosyntéza isoprenoidních cytokininů může probíhat dvěma základními cestami. První nepřímá biosyntetická dráha je odvozená od degradace tRNA, druhou, přímou cestou je *de novo* biosyntéza isopentenylací volných adeninových nukleotidů (Obr. 7) (Davies, 2004).

První krok biosyntézy isoprenoidních CKs je katalyzován enzymem **isopentenyltransferázou** (IPT), který byl původně identifikován v organismu *Dictyostelium discoideum*. Prostřednictvím tohoto enzymu dochází k přenosu prenylového zbytku na N6- pozici ATP (adenosintrifosfátu), ADP (adenosindifosfátu) nebo AMP (adenosinmonofosfátu) (Taya *et al.*, 1978), kdy tyto molekuly jsou využívány

jako isoprenoidní akceptory a jako substrátové donory jsou využity molekuly **dimetyllallylpyrofosfátu (DMAPP)** nebo **hydroxymetylbutenyl difosfátu (HMBDP)** (Krall *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2005) (Obr. 7). Vznikají tak cytokininové prekurzory: isopentenyladenosin-5'-tri-, di-, nebo monofosfáty (iPRTP, iPRDP nebo iPRMP).

**Hydroxymetylbutenyl difosfát (HMBDP)** je metabolickým meziproduktem dráhy metylerytritol fosfátu (MEP), ke které dochází v bakteriích a plastidech (Hecht *et al.*, 2001) (Obr. 7). Pokud IPT využívá HMBDP je primárním produktem tZ nukleotid.

**Dimetyllallyl difosfát (DMAPP)** je syntetizovaný prostřednictvím metabolické MEP dráhy a dráhy pro mevalonáty (MVA), které se běžně nachází v cytosolu eukaryot (Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999). V případě, že je využit jako primární substrát pro IPT, produktem je iP nukleotid (Krall *et al.*, 2002; Sakakibara v Davies, 2004) (Obr. 7).



Obr. 7 Schéma IPRMP-dependenčních a IPRMP-independenčních drah cytokininové biosyntézy v rostlinách (Hwang a Sakakibara, 2005).

### 2.3.1.1 Rostlinné geny pro adenosinfosfát-isopentenyltransferázu

Prvním charakterizovaným IPT genem byl gen *Tmr* nacházející se na Ti (tumor-inducing) plasmidu bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tento gen je přítomen na transferované DNA (T-DNA), která se integruje do hostitelského genomu po napadení touto bakterií a indukuje formaci tumoru (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984).

Genom *A. thaliana* obsahuje devět genů IPT (*AtIPT1* až *AtIPT9*) (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003), které jsou dle fylogenetické analýzy rozčleňovány do dvou skupin. První skupina obsahuje geny *AtIPT2* a *AtIPT9*, které jsou podobné genům kódující tRNAmodifikující enzym, tedy tRNA-isopentenyltransferázu. Druhá skupina obsahuje *AtIPT1*, *AtIPT3* až *AtIPT8* geny, které kódují IPT tvořící iPRMP. Tyto dvě skupiny jsou si strukturně podobné, což svědčí o jejich původu ze společného prekursoru (Davies, 2004).

### 2.3.1.2 Substrátová specifita adenosinfosfát-isopentenyltransferázy

Vznik jednotlivých typů CKs je závislý na typu substrátů pro specifickou IPT. Nedávné studie prokázaly, že substrátová specifita IPT se odlišuje v závislosti na druhu organismu (Kakimoto, 2001; Sakakibara, 2004 v Davies, 2004).

**IPT geny vyšších rostlin** preferuje využití ADP nebo ATP jako prenylový akceptor a téměř výhradně DMAPP jako prenylový donor. Většina přírodních isopentenyladeninových ribotidů jsou proto isopentenyladenosin-5'-difosfáty (iPRDP) a isopentenyladenosin-5'-trifosfáty (iPRTP) (Kakimoto, 2001), ze kterých pak vzniká isopentenyladenosin-5'-monofosfát (iPRMP). Z iPRMP se poté prostřednictvím dalších hydrolytických reakcí uvolňují iPR a základní báze iP (Obr. 7).

Naopak v případě IPT u *A. tumefaciens* (geny *tmr*, popř. *tzs*) je využíváno AMP jako akceptoru a HMBDP nebo DMAPP jako donorového substrátu *in vitro*, přičemž *in vivo* je převážně využíván HMBDP (Sakakibara *et al.*, 2005) (Obr. 7). Pokud IPT využívá HMBDP, jsou primárním produktem tZ-typy CKs.

### 2.3.1.3 Biosyntéza *trans*-zeatinového typu cytokininů

Biochemické studie odhalily existenci dvou základních cest pro biosyntézu *trans*-zeatinového typu CKs. Jedná se o dráhy iPRMP-dependentní a iPRMP-independentní.

#### **iPRMP-dependentní dráha**

První dominantnější dráhou je biosyntéza přes tzv. *trans*-hydroxylaci iP cytokininů, kdy první krok této dráhy je katalyzován enzymem **cytochromová P450 monooxygenáza CYP735A** (Chen a Leisner, 1984; Takei *et al.*, 2004). V *A. thaliana*, existují dva geny kódující cytokinin transhydroxylázu: *CYP735A1* a *CYP735A2*, jenž přednostně využívají iP nukleotidy, nikoli formy nukleosidů či volné báze k produkci tZ nukleotidů (Takei *et al.*, 2004) (Obr. 7).

### **iPRMP-independentní dráha**

V současné době je známá také i alternativní cesta pro biosyntézu tZ, běžně nazývaná jako cesta nezávislá na iPRMP, ovšem biochemická povaha a fyziologický přínos této dráhy stále nebyly zcela pochopeny. Některé teorie vypovídají o ekvivalentnosti mezi tZ a tRNA-odvozenými cZ, a isomerací tRNA-cZ na tZ prostřednictvím zeatin *cis-trans* izomerázy (Bassil *et al.* 1993) (Obr. 7).

#### **2.3.1.4 Dráha tRNA degradace**

Některé z druhů tRNA obsahují modifikované nukleotidy, mající iPR nebo jeho rezidua na místě přilehlém k antikodonu a cytokininy tak mohou být produkovány recyklací těchto typů tRNAs. První krok této dráhy je v rostlinách *A. thaliana* katalyzován enzymem **tRNA-isopentenyltransferázou** (tRNA-IPT), kódovanou genem *AtIPT2* a *AtIPT9* (Golovko *et al.*, 2002; Miyawaki *et al.*, 2004) Tento enzym přenáší isopentenylovou jednotku dimetylallyl difosfátu (DMAPP) do pozice N6- nukleotidu sousedícího s 3'-koncem antikodonu v tRNA. Na základě studií, provedenými na mutantech se ztrátou funkce jak *AtIPT2*, tak i *AtIPT9*, kde došlo k signifikantní redukci cZR a cZRMP, bylo potvrzeno, že právě tato dráha je hlavním zdrojem cZ-typů CKs. (Miyawaki *et al.*, 2006).

#### **2.3.1.5 Aktivace cytokininů**

K aktivaci CKs z neaktivních ribosidových forem dochází prostřednictvím dvou základních cest (Chen, 1997; Kurakawa *et al.*, 2007):

- jednokroková reakční cesta
- dvoukroková reakční cesta

##### **Jednokroková reakční cesta (cesta přímé aktivace)**

Touto cestou dochází k přímému převodu cytokininového nukleotidu (iPRMP a tZRMP) na aktivní formu volné báze (iP a tZ) uvolněním ribózy-5'-monofosfátu. Tato reakce je katalyzována proteinem **LONELY GUY** (LOG), který funguje jako ribosid-5'-monofosfát-fosforibohydroláza. V rostlinách *A. thaliana* bylo identifikováno 9 LOG proteinů LOG1 až LOG9 (Kuroha *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2015).

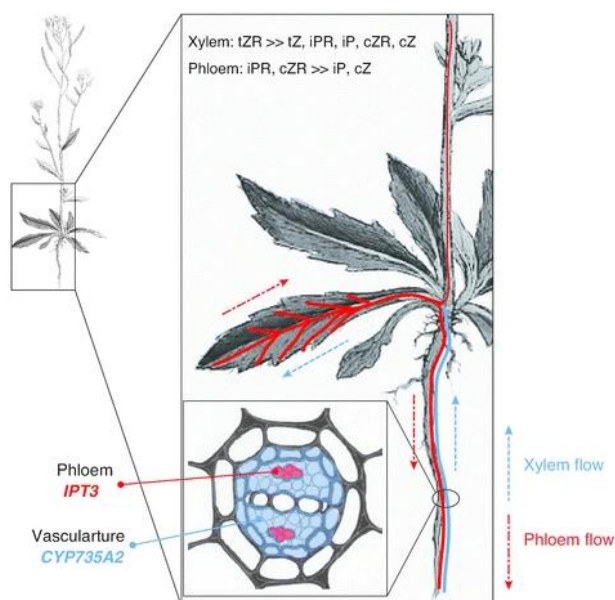
##### **Dvoukroková reakční cesta**

Tato cesta se považuje za hlavní a je charakterizována hydrolýzou nukleotidů na volné báze (iP a tZ), kdy dochází nejdříve ke štěpení fosfátového zbytku a poté zbytku

cukerného. Následně dochází k druhému kroku reakce – hydrolýze iPR na iP. Tato hydrolýza je katalyzována enzymem **nukleosid-N-ribohydrolázou** (NRH), jenž byla identifikována např. u kukuřice nebo mechu *Physcomitrella patens* (Kopečná *et al.*, 2013).

### 2.3.1.6 Lokalizace cytokininové biosyntézy

Zpočátku se předpokládalo, že vyšší syntéza a četnost cytokininů je omezena pouze na místa vyvíjejících se tkání, tedy zejména v kořenových špičkách, kambium apod. Geny cytokininové biosyntézy však vykazují odlišné expresní vzorce, jenž potvrzují lokalizaci cytokininové biosyntézy po celé rostlině (Osugi a Sakakibara, 2015).



Obr. 8 Prostorová exprese IPT3 (červeně) a *CYP735A2* (modře) v rostlinách *A. thaliana* (Osugi a Sakakibara, 2015 dle Sowerby *et al.*, 1864).

V rostlinách *A. thaliana* je gen *AtIPT1* exprimován zejména ve vaskulární stélé kořenů, listových primordiích, vajíčkách a nezralých semenech. *AtIPT3* a *AtIPT5* jsou exprimovány zejména ve floému a laterálních kořenových primordiích. *AtIPT4* a *AtIPT8* jsou exprimovány v chalazální části endospermu nezralých semen (Miyawaki *et al.* 2004; Takei *et al.*, 2004). *AtIPT7* je exprimován v endodermis kořenové elongační zóny, trichomech mladých listů a pylových trubicích (Miyawaki *et al.*, 2004). Rozličná je taktéž i subcelulární lokalizace IPT genů. *AtIPT1*, *AtIPT3* a *AtIPT8* jsou exprimovány v plastidech, kde k produkci CKs dochází prostřednictvím DMAPP odvozeného z MEP dráhy. *AtIPT4* a *AtIPT7* jsou lokalizovány v cytosolu a mitochondriích, což potvrzuje, že DMAPP pro CKs biosyntézu je poskytováno také i MVA dráhou (Kasahara *et al.*, 2004).

Stejně jako v případě IPT genů i LOG geny vykazují rozmanitou expresi. Například gen *CYP735A2* (Takei *et al.*, 2004) jenž je zodpovědný za hydroxylaci isopentenylového vedlejšího řetězce je exprimován zejména v kořenové vaskulatuře. To odpovídá výskytu zejména *trans*-zeatinového typu CKs v xylému rostlin. Isopentenyladenin ribosid (iPR) společně s *cis*-zeatin ribosidem (cZR) jsou pak hlavní formou nacházející se ve floému (Hirose *et al.*, 2008) (Obr. 8). Odlišnost v expresi jednotlivých genů vypovídá o translokační schopnosti iP a tZ.

### **2.3.1.7 Regulace cytokininové biosyntézy**

Biosyntéza CKs je regulována mnoha interními i externími environmentálními podněty, zejména přítomností různých makronutrientů či jiných fytohormonů (Miyawaki *et al.*, 2004).

#### **Vliv makronutrientů na cytokininovou biosyntézu**

Rostliny neustále vnímají své okolí a své metabolické aktivity či vývojové programy, které efektivně upravují dle svých aktuálních potřeb. Dostupnost anorganického dusíku je jedním z faktorů regulující expresi biosyntetických genů v *A. thaliana*. Klíčovým faktorem, jenž byl popsán u této rostliny je gen *AtIPT3*, jenž reaguje na rychlé změny v dostupnosti dusíku. Ztráta funkce v mutantech *AtIPT3* vede ke snížení na dusičnanech závislé akumulace cytokininů. K akumulaci cytokininů v přítomnosti dusičnanů tedy pravděpodobně dochází vlivem indukce exprese genu *AtIPT3* (Takei *et al.*, 2004). Mezi další makronutrienty ovlivňující biosyntézu cytokininů patří také sírany (Kutz *et al.*, 2002) či fosforečnany (López-Bucio *et al.*, 2002), u kterých byl prokázán silný vliv zejména na vývoj laterálních kořenů u rostlin *A. thaliana*.

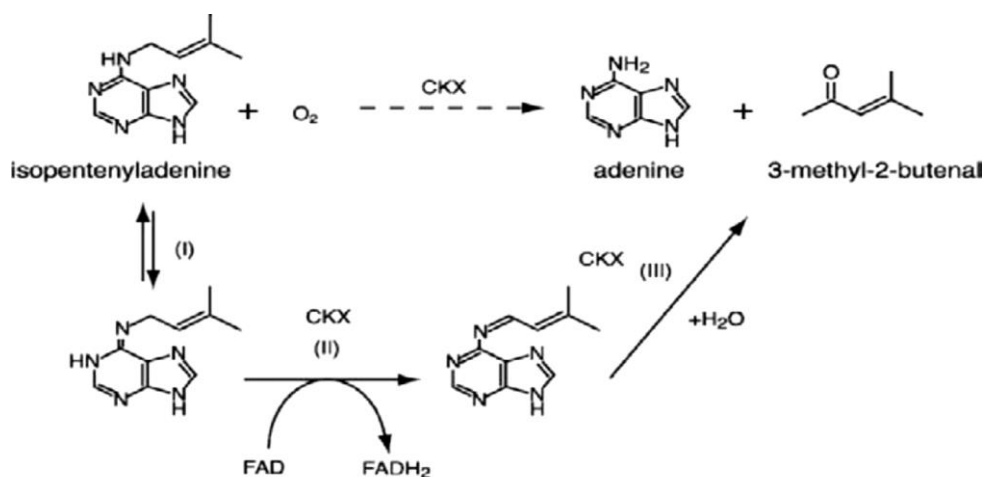
#### **Vliv hormonů na cytokininovou biosyntézu**

Cytokininová biosyntéza může být regulována také dalšími fytohormony – auxiny a kyselinou abscisovou (ABA). K ovlivnění dochází skrz změnu exprese klíčových genů pro CKs biosyntézu jako je IPT, CKX a *CYP735A*. Cytokininů obecně působí jako antagonisté auxinů. Bylo prokázáno, že zatímco auxiny indukují expresi genů *AtIPT5* a *AtIPT7* ve stonkovém meristému, cytokininů tyto geny společně s dalšími geny (*AtIPT1* a *AtIPT3*) reprimují (Cheng *et al.*, 2013). Na druhou stranu geny *CYP735A1* a *CYP735A2* jsou prostřednictvím CKs v kořenech nadexprimovány, ale prostřednictvím auxinů nebo ABA je jejich exprese snížena (Takei *et al.*, 2004). Negativní regulace cytokininové

biosyntézy auxiny byla objevena i ve stonkových nodech rostliny *Pisum sativum* L. represí exprese genu *PsIPT* auxiny (Tanaka *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Degradace cytokininů

Celková rovnováha cytokininů je řízena jejich syntézou a katabolismem. Degradace cytokininů je katalyzována enzymem **cytokinin oxidázou/dehydrogenázou** (CKX, EC 1.5.99.12), který ireverzibilně inaktivuje cytokininy štěpením jejich postranního řetězce, což vede k tvorbě adeninu a odpovídajícího aldehydu (Brownlee *et al.*, 1975). V případě isoprenoidních CKs degraduje pouze volné báze a nukleosidové formy s nenasyceným postranním řetězcem jako iP, tZ, iPR a tZR. Nukleotidové deriváty nejsou pro CKX náchylné. Je-li substrátem CKX iP, je produktem adenin a 3-metyl-2-butenal (Davies, 2004) (Obr. 9).



Obr. 9 Reakční mechanismus cytokinin oxidázy/dehydrogenázy (Davies, 2004).

Rezistence k CKX je spjatá zejména s přítomností dvojně vazby  $\Delta^2$ - na isoprenoidních řetězcích tZ a iP, proto jsou nasycené DHZ-typy CKs charakteristické rezistencí vůči CKX. Rezistenci uděluje i *O*-glykosylace vedlejších řetězců CKs (Armstrong, 1994).

### 2.3.3 Další metabolické modifikace

Metabolické přeměny CKs můžeme rozdělit na modifikace adeninového kruhu a modifikace postranního řetězce (Davies, 2004). Důležité metabolické kroky CKs jsou spjaty s tzv. purinovou metabolickou cestou, známou také jako cesta záchrany (Chen, 1997; Mok a Mok, 2001; Sakakibara v Davies, 2004), což naznačuje, že konverze CKs nukleotidů na aktivní volné báze neprobíhá pouze jednosměrně, ale je cyklická (Obr. 10).



## **Modifikace adeninu**

### *5'-ribonukleotid fosfohydroláza (5'-nukleosidáza, EC 3.1.3.5)*

Tento enzym, jenž byl poprvé částečně purifikován a charakterizován v pšeničných klíčcích, katalyzuje defosforylaci cytokininového nukleotidu na nukleosid (Chen, 1997). Dle své aktivity byl pomocí kolonové chromatografie rozčleněn na dvě formy: F-I (110 kDa) a F-II (57 kDa). U obou forem se potvrdila nutnost přítomnosti bivalentních iontů, např.  $Mg^{2+}$  pro katalýzu AMP, iPRMP, GMP a IMP (Davies, 2004).

### *Adenosin-nukleosidáza (EC 3.2.2.7)*

Přechod z cytokininových nukleotidů na formy volných bází je katalyzován enzymem adenosin-nukleosidázou, jenž byl objeven a charakterizován v mnoha různých rostlinných druzích a parciálně purifikován z pšeničných klíčků (Chen *et al.*, 1981). Studie prokázaly, že daný enzym nevyžaduje přítomnost *orto*-fosfátu a katalyzovaná reakce tedy není modifikována purinovou-nukleosid fosforylázou (Davies, 2004).

### *Purin-nukleosid fosforyláza (EC 2.4.2.1)*

Přeměna volných cytokininových bází na nukleosidy může být zprostředkována enzymem nukleosid fosforylázou. Ač se jedná o reakci reverzibilní, bylo popsáno její posunutí ve prospěch tvorby nukleosidů (Chen a Petschow, 1978). Tento mechanismus byl popsán na parciálně purifikovaném enzymu ze pšeničných klíčků (Davies, 2004).

### *Adenosin kináza (EC 2.7.1.20)*

Enzym adenosin kináza může katalyzovat přechod z nukleosidové formy na formu nukleotidu. Tento enzym byl rovněž parciálně purifikován a charakterizován ze pšeničných klíčků (Davies, 2004).

### *Adenin fosforibosyltransferáza (EC 2.4.2.7)*

Přechod z volných cytokininových bází na nukleotidové formy cytokininů může být katalyzován také cestou katalyzovanou enzymem adenin fosforibosyltransferázou. Fyziologický podíl mezi cestou katalyzovanou enzymem adenin fosforibosyltransferázou a cestou katalyzovanou enzymem purin-nukleosid fosforylázou stále nebyl plně objasněn (Davies, 2004).

### *N-glykosylace*

Tato modifikace vzniká na *N3*-, *N7*-, *N9*- pozici purinového zbytku, přičemž modifikace v polohách *N7*- a *N9*- způsobuje inaktivaci cytokininů. Enzym glukosyltransferáza

(EC 2.4.1.118) využívá UDP - nebo TDP-glukózu a katalyzuje glykosylaci v pozicích *N7-* a *N9-*. Ke katalýze dochází přednostně v poloze *N7-* za vzniku *N7-*glukosidů. Tato preference je desetkrát větší pro *N7-*glukosidy v případě tZ a až jedenadvacetkrát větší v případě cZ. Tato přeměna se obecně považuje za ireverzibilní, jelikož vzniklé glukosidy nemohou být podrobeny hydrolýze  $\beta$ -glukosidázou (EC 3.2.1.21, Davies, 2004).

#### *N-alanylase*

Přeměna tZ, cZ, iP a DHZ na deriváty 9-alanylu je katalyzována enzymem  $\beta$ -(9-cytokinin)-alanin syntázou (Entsch *et al.*, 1983). Tento enzym byl parciálně purifikován ze semen vlčího bobu. Fyziologický podíl a význam tohoto typu modifikace v případě CKs biosyntézy stále nebyly plně objasněny (Davies, 2004).

### **Modifikace cytokininového postranního řetězce**

#### *Zeatin isomeráza*

Tento enzym katalyzuje přeměnu cZ na tZ a pro jeho funkci je nezbytný flavinový kofaktor (FAD, FMN), světlo a ditiotritol. Enzym byl purifikován a charakterizován jako 68 kDa glykoprotein z endospermu *Phaseolus vulgaris* roku 1993, avšak fyziologický význam této izomerace v celkovém metabolismu CKs ještě není známý. Pravděpodobně je však spojníkem mezi metabolismem tRNA a tZ biosyntézou (Davies, 2004).

#### *Zeatin reduktáza* (EC 1.3.1.69)

Katalyzuje nevratnou konverzi tZ na DHZ, jež pro svoji funkci potřebuje nezbytný kofaktor NADPH. Jelikož DHZ a jeho deriváty nepodléhají katalytické reakci CKX, tato redukční konverze stabilizuje fyziologickou aktivitu cytokininů. Tento enzym byl purifikován z nezralých embryí *Phaseolus vulgaris*, přičemž eluce na chromatografické koloně odhalila, že se enzym vyskytuje ve dvou formách lišící se svým nábojem: izoenzym s vysokou molekulovou hmotností (HMW, 55kD) a izoenzym s nízkou molekulovou hmotností (LMW, 25kD) (Davies, 2004).

#### *Hydroxyláza* (EC 1.14.13)

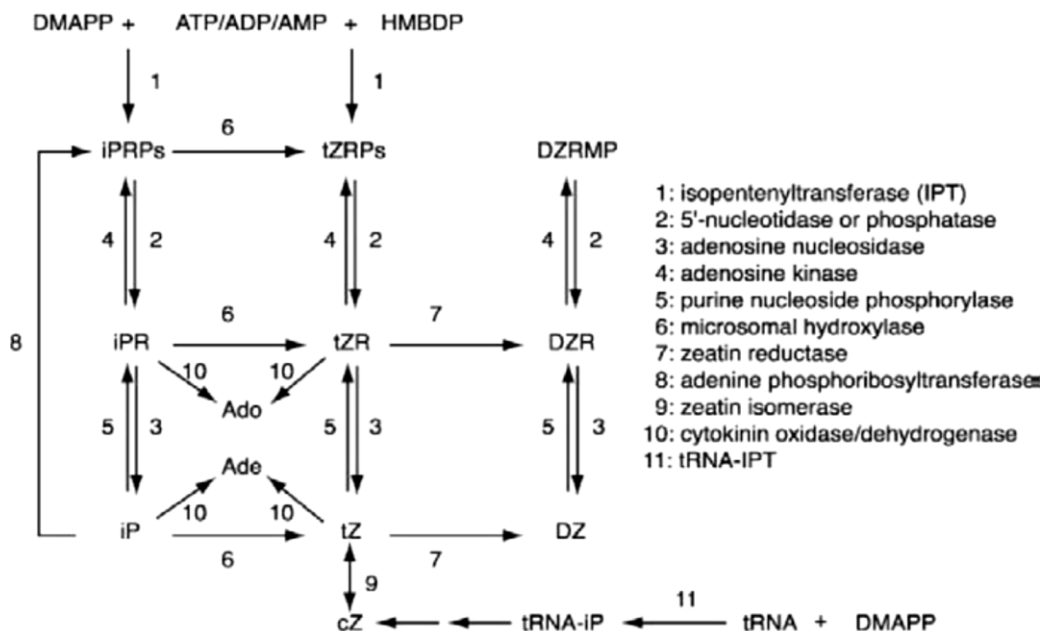
Enzym hydroxyláza parciálně charakterizován v mikrosomálních frakcích kvěťáku, kdy byla potvrzena jeho schopnost hydroxylovat jak iP, tak iPR na tZ a tZR (Chen a Leisner, 1984).

### *O-glykosylace*

Enzymy katalyzující *O*-glykosylaci se nazývají *O*-glukosyltransferázy (EC 2.4.1) a jsou charakteristické tvorbou *O*- $\beta$ -D-glukopyranosylových derivátů tZ anebo cZ. Tyto enzymy byly objeveny v řadě různých druhů rostlin. Prvním identifikovaným genem byl gen *ZOG1* z *Phaseolus lunatus*, který využívá tZ a UDP-glukózu a je exprimován zejména v nezralých semenech, což potvrzuje hlavní úlohu tohoto enzymu v raných stádiích vývoje semen (Martin *et al.*, 1999). Dalším identifikovaným genem byl gen *cisZOG1* z kukuřice. Tato cZ-specifická glukosyltransferáza preferuje *cis* izomer, který využívá společně s UDP-glukózou. *cisZOG1* gen je převážně exprimován v kořenech, slabě pak v listech a stonku. Takto vytvořené *O*-glukosidy jsou hydrolyzovány enzymem  $\beta$ -glukosidázou (EC 3.2.1.21) za uvolnění aktivních bází (Davies, 2004).

### *O-Xylosylace*

Jako donor pro konjugaci může být v některých rostlinách využita také UDP-xyulóza. Tato reakce je katalyzována *O*-xylosyltransferázou (EC 2.4.2.26), jenž konjuguje tZ a DHZ (Turner *et al.*, 1987). Gen *ZOX1* z *P. vulgaris* se exprimuje převážně v nezralých semenech, ale ne v listech a kořenech starších rostlin (Davies, 2004).



Obr. 10 Model cytokininové metabolické dráhy a katalytických enzymů (Davies, 2004). Interkonverze mezi nukleotidy, nukleosidy a volnými bázemi (iPRMP, iPR a iP) je katalyzována enzymy purinové záchranné dráhy (Mok a Mok 2001; Sakakibara, 2005). Cytokininové nukleobáze a nukleosidy s výjimkou DHZ lze katabolizovat CKX na adenin (Ade) nebo adenosin (Ado). cZ, tZ a ribosidy mohou být vzájemně převedeny zeatin isomérázou (Bassil *et al.*, 1993).

## 2.4 Hlavní fyziologické funkce cytokininů

Původně byly cytokinininy definované jako látky, které při souběžné aplikaci s auxiny indukují buněčné dělení a kalusovou diferenciaci. Dnes je však již známo, že cytokinininy hrají důležitou roli v mnoha aspektech rostlinného růstu a vývoje (Nordstrom *et al.*, 2004). Nové poznatky vycházejí ze studií mutantů s narušenou funkcí pro cytokininovou signalizaci či metabolismus. Tyto rozsáhlé studie podporují a dále rozšiřují dřívější znalosti o rolích cytokininů v rostlinách. Následující kapitoly obsahují shrnutí **nejzákladnějších** cytokininových funkcí, mezi které se řadí: stimulace buněčného dělení, regulace apikální stonkové a kořenové dominance (regulace organogeneze), regenerace orgánů, zpomalování senescence a vývoj chloroplastů, indukce mobilizace zásobních látek, regulace síly sinku na rostlině.

### 2.4.1 Cytokinininy a buněčný cyklus

Cytokinininy za současné přítomnosti auxinů jsou nezbytné pro buněčné dělení nejenom v *in vitro* kulturách rostlinných buněk, ale také při *in vivo* buněčném dělení. Přímé měření CKs a imunocytochemie odhalily vysokou koncentraci CKs v mitoticky aktivních pletivech, zejména v kořenových a stonkových meristémech a velmi nízkou koncentraci v tkáních, kde byl buněčný cyklus zastaven (Mok a Mok, 1994; Dewitte *et al.* 1999).

Bylo objeveno, že exogenní aplikací cytokininů dochází k indukci specifických typů regulačních proteinů-cyklinů, které společně s cyklin-dependentními kinázami (CDK) hrají klíčovou roli v regulaci dělení rostlinných buněk *in vitro* i *in vivo* (Soni *et al.*, 1995; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). Studie Kiebera a Schallera z roku 2014 prokázaly, že cytokinininy jsou indukovány *CYCD3*. Na základě konstitutivní nadexprese genu *CYCD3* působícího po proudu směrem od CKs, která vedla k eliminaci nutnosti přítomnosti CKs pro proliferaci buněk v kultuře a k indukci přechodu do S-fáze buněčného cyklu bylo potvrzeno, že CKs regulují přechod z G1- do S-fáze buněčného cyklu přinejmenším na úrovni indukce *CYCD3* transkripce (Kieber a Schaller, 2014).

Některé studie (Francis a Sorrell, 2011; Lipavská *et al.*, 2011) poukazují na schopnost CKs regulovat také i přechod mezi G2- a M-fází buněčného cyklu, například indukci exprese *cdc2* genu (proteinové fosfatázy regulující přechod G2/M) v kořenech *A. thaliana* (Hemerly *et al.*, 1993).

Buněčný cyklus může být regulován prostřednictvím CKs i alternativními mechanismy vyskytujícími se v odlišných typech buněk. Např. zvýšením citlivosti buněk

k cytokininům způsobené mutací genu *ARR* typu A (A-type response regulator) dochází k dělení v klidových buňkách kořene, u kterých se obecně dělicí funkce nevyskytuje (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Cytokininy a stonkový apikální meristém**

Nadexprese CKs v transgenních rostlinách vede k iniciaci růstu vrcholu stonků a ektopického meristému z nediferencovaných kalusových kultur. Naopak, snížení hladin CKs nadexpresí CKX či narušením genů *IPT* nebo genů pro receptory vede k negativní regulaci vývoje stonkového apikálního meristému (SAM) (Kerstetter a Hake, 1997). K samotnému udržování SAM jsou nezbytné transkripční faktory obsahující homeodoménu tzv. KNOTTED-LIKE (KNOX) homeobox transkripční faktory (Kerstetter *et al.*, 1994; Kerstetter *et al.*, 1997). Tyto transkripční faktory kontrolují funkci SAM pomocí regulace hladiny cytokininů, mimo jiné například indukcí exprese genu *IPT7*.

Obsah cytokininů v oblasti SAM je taktéž i výsledkem lokalizované exprese *LOG* genů, které kódují enzymy konvertující inaktivní cytokininové ribotidy na aktivní volné báze (Kurakawa *et al.*, 2007; Chickarmane *et al.*, 2012). Konkrétně v rostlinách *Arabidopsis* je gen *LOG4* lokalizován v L1 vrstvě SAM.

Prostřednictvím cytokininové indukce genu *CYCD3* může docházet i k ovlivnění *SHOOT-MERISTEMLESS* genu, jenž působí jako inhibitor buněčné diference a endoreduplikace, ovšem tato regulace není závislá pouze na hladinách CKs. Množství aktivních cytokininů v SAM moduluje taktéž i aktivitu cytokininové signalizace a související interakce s auxiny (Scofield *et al.*, 2013).

#### **2.4.3 Cytokininy a kořenový apikální meristém**

Již Skoog a Miller roku 1957 objevili, že CKs působí jako inhibitory kořenového růstu a vývoje (Skoog a Miller, 1957). V rostlinách *A. thaliana* vede redukovaná funkce CKs k redukci růstu prýtu, naopak v kořenech vede tato redukce k prodloužení kořenové délky, ke vzniku většího počtu bočních kořenů a zvětšeného kořenového apikálního meristému (RAM) (Werner *et al.*, 2003; Mason *et al.*, 2005; Miyawaki *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006). Na regulaci velikosti RAM se vzájemným antagonistickým způsobem podílejí jak CKs, tak auxiny. Auxiny podporují proliferaci buněk v RAM a CKs podporují rychlost buněčné diference. Jejich vzájemná vyváženost tak určuje

velikost RAM, a tedy i růst kořenů. Jedním z fungujících mechanismů v RAM, jenž spojuje auxinové a CKs funkce, je cytokininová indukce auxinového signálního represoru SHY2 (At1g04240). K této indukci dochází prostřednictvím *AHK3* cytokininového receptoru a *ARR* typu B (Dello Iorio *et al.*, 2007; Moubayidin *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2013). V případě vyšší koncentrace auxinu dochází k degradaci *SHY2*, který zpětně reguluje auxiny a expresi několika auxinových efluxních nosičů v RAM. Pro regulaci RAM tedy platí, že vyšší hladina CKs a zároveň nízká hladina auxinů podporuje buněčné dělení v přechodné a elongační zóně. Naopak vysoká hladina auxinů a nízká hladina CKs podporuje buněčnou proliferaci a inhibuje buněčnou diferenciaci.

Antagonistická funkce CKs a auxinů byla potvrzena také v rámci formace laterálních kořenových primordií. Exogenní aplikace CKs vede ke zmenšení počtu laterálních kořenů (Li *et al.*, 2006), zatímco snížená cytokininová signalizace u mutantů vede ke zvýšení počtu laterálních kořenů (Riefler *et al.*, 2006).

Role CKs byla potvrzena i při regulaci, respektive inhibici buněčného dělení v klidovém centru (QC), kdy pro zachování mitoticky neaktivních buněk QC je nezbytná nízká hladina cytokininů. V případě aplikace exogenního cytokininu nebo narušení více genů *ARR* typu A pak naopak dochází k reaktivaci buněčného dělení v QC (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

#### **2.4.4 Cytokininy a regenerace orgánů – regulace morfogeneze**

Průběh regenerace, stejně tak jako regulace morfogeneze v tkáňových kulturách, je závislý na poměru koncentrace auxinů a cytokininů.

V případě, že je tento poměr vyrovnaný, dochází většinou ke tvorbě nediferencovaného pletiva, tzv. kalusu. Nadbytek CKs pak indukuje regeneraci prýtlů a nadbytek auxinů naopak regeneraci kořenů (Procházka *et al.*, 1998).

#### **2.4.5 Cytokininy a listová senescence**

##### **Senescence u rostlin**

Stárnutí (senescence) je endogenní degradační proces, jehož nejznámějšími projevy je degradace fotosyntetického pigmentu, recyklace nutričně významných látek v listech a nakonec rozpad buněk tkání či celé rostliny (Noodén, 1988; Buchanan-Wollaston, 1997).

Příčiny senescence zahrnují řadu vnějších i vnitřních faktorů (He *et al.*, 2001). Mezi vnější faktory ovlivňující senescenci patří například: vysoká teplota, nevhodné osvětlení

či zatemnění, nutriční nedostatek, sucho nebo patogenní infekce (He a Gan, 2003). Mezi vnitřní faktory se mohou řadit: stáří rostliny, vývojové procesy, hladiny jednotlivých rostlinných hormonů (Gan, 2003 v Davies, 2004), zejména hladiny cytokininů, gibberelinů, kyseliny salicylové, kyseliny jasmonové a etylenu. Konkrétní schopnost zpomalovat listovou senescenci byla objevena u CKs, auxinů a gibberelinů. Naopak v případě kyseliny salicylové, jasmonové, abscisové a etylenu byla objevena schopnost listovou senescenci urychlovat (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Balazadeh *et al.*, 2014).

V rámci procesu senescence se však nepředpokládá pouze hormonální působení, ale jde o mnohem komplexnější mechanismus, jenž zatím nebyl plně prostudován (Edlund *et al.*, 2017).

Důsledkem senescence je intenzivní katabolismus látek v rostlině, která musí hospodárně využívat zdroje živin a minerálních látek pro svůj další vývoj. Mezi zdroje těchto složek patří zejména degradované plastidy – amyloplasty a chloroplasty. Degradací chloroplastů získává rostlina až 50 % proteinů a 70 % lipidů pro svůj další vývoj. Dochází také k makroskopicky pozorovatelným barevným změnám, dezintegraci vnitřní struktury chloroplastů a redukcii jejich počtu i obsahu (Hensel *et al.*, 1993), což souvisí s poklesem fotosyntetické aktivity v listech podléhající senescenci.

Vliv CKs na listovou senescenci byl poprvé objeven po exogenní aplikaci kinetinu na oddělené listy *Xanthium* roku 1957 (Richmond a Lang, 1957). Tato studie byla dále potvrzena i geneticky a to prací Gana a Amasina z roku 1995, kdy nadexprese enzymu biosyntézy CKs IPT vedla k oddálení senescence a vzniku tzv. „nesmrtelné rostliny“ (Gan a Amasino, 1995). Naopak snížení hladin CKs v důsledku např. snížením transportu CKs z kořenů, představuje signál ke zrychlení senescence (Singh *et al.*, 1992; Hirose *et al.*, 2008; Kudo *et al.*, 2010).

Vliv CKs na senescenci rostlin zajišťuje také jejich role v biosyntéze chlorofylu, stimulaci tetrapyrolové biosyntézy a oddálení chlorofylové degradace (Kao, 1980; Jordi *et al.*, 2000). Bylo prokázáno, že některé z těchto procesů se dají po využití určitého typu osvětlení a koncentrace cytokininů vrátit zpět. Regenerace ošetřených rostlin *Nicotiana rustica* vedla ke znovuobnovení zelené barvy, tedy syntéze chlorofylu, a to až na původní hodnoty. To však neplatilo pro počet plastidů, který zůstal redukováný i po vystavení CKs a osvětlení (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999).

### Zvýšení síly sinku

CKs zvyšují tzv. kapacitu sinku a metabolickou aktivitu pletiv stimulováním asimilátové akumulace v chloroplastech starších listů (Criado *et al.*, 2009). Důsledkem zvýšené síly sinku je větší orgánová biomasa s vyšším obsahem CKs (Procházka *et al.*, 1998).

## 2.5 Popis vlivu ročních období na obsah cytokininů u rostlin

Mezi hlavní vnější faktory měnící se vlivem střídání ročního období patří teplota, vlhkost a intenzita světla. Relativní důležitost v případě vztahu mezi ročním obdobím a obsahem CKs je pokládána dále i několika dalším faktorům, jako například transpiraci a mobilizaci zásobních cytokininů brzy na jaře. Vliv těchto faktorů na CKs biosyntézu a akumulaci byl prokázán např. ve studiích Trompa a Ovaa z roku 1990 (Tromp a Ovaa, 1990), ovšem celkový roční náhled na obsah cytokininových derivátů v případě rostlin *A. thaliana* pěstovaných za vybraných konstantních podmínek prozatím nebyl uskutečněn.

Vliv **teploty** na obsah CKs ve výhoncích a kořenech byl studován například u pšenice, kdy po snížení teploty byl pomocí imunoenzymatických biotestů zjištěn menší obsah zeatinů a ribosidů ve výhoncích, přičemž toto snížení obsahu daných metabolitů bylo v korelaci s redukcí v transpiraci v daných výhoncích (Mitrichenko *et al.*, 1997).

Přímý vliv **vlhkosti** na obsah CKs nebyl prozatím plně prostudován, ovšem byl prokázán vliv vlhkosti jako takové například na procesy transpirace a regulace stomat, které ovlivňují fotosyntézu, jež společně s obsahem chlorofylu závisí na obsahu CKs. Skrz transpiraci ovlivněnou vlhkostí je taktéž regulována nutriční translokace (Tibbitts, 1979).

Vliv **intenzity světla** na obsah CKs byl prokázán například ve studiích rostliny baldachýnu, kde zastínění listů vedlo ke snížení rychlosti akumulace cytokininů a tím ke snížení fotosyntetické kapacity a nakonec i ke stárnutí rostliny (Boonman a Pons, 2007).

Příkladem celkové roční studie může být práce Trompa a Ovaa, z roku 1990, kteří studovali sezónní změny ve složení cytokininů v xylému jabloní. Celková CKs koncentrace byla nízká od poloviny léta až do konce zimy. Počínaje únorem byl poté zjištěn větší počet koncentračních vrcholů. Poté došlo k rychlému poklesu až do dosažení původní nízké úrovně v červenci (Tromp a Ovaa, 1990).

Další experimentální studie byla provedena na listech rostliny *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, kultivar 'Valencia', kdy byla sledována aktivita CKs v jednotlivých ročních obdobích. V rámci jarního období bylo v dospělých listech citrusu objeveno větší množství polárních a menší množství nepolárních CKs. Naopak, na začátku léta byly



polární CKs téměř nedetekovatelné, avšak byl detekován nárůst nepolárních CKs. Nízké hodnoty CKs byly detekované v období od poloviny léta do konce podzimu (Hendry *et al.*, 1982).

## **2.6 Metody pro stanovení cytokininů, fotosyntézy a chlorofylu**

### **2.6.1 Analytické postupy pro stanovení cytokininů**

Analýza fytohormonů je nedílnou součástí experimentů v oblasti vývojové biologie, biochemie a fyziologie rostlin, kde jejich kvalitativní i kvantitativní stanovení napomáhá objasnit význam těchto nízkomolekulárních látek při regulaci vývojových procesů a tím doplňuje informace o expresi genů či proteinovém profilu.

Rostlinné extrakty představují velmi komplexní, mnohasložkové směsi, ve kterých se fytohormony vyskytují ve velice nízkých koncentracích. Konkrétně cytokinininy se vyskytují v koncentraci menší než 50 pmol v gramu čerstvé hmoty (FW). Mimo fytohormony se v těchto extraktech vyskytuje i velké množství jiných organických molekul s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které mohou narušovat analýzu (Ljung *et al.*, 2010 v Davies, 2004).

V minulosti se analýza cytokininů prováděla prostřednictvím tzv. biotestů, na základě využití růstových a metabolických reakcí citlivých na specifický hormon, např. test senescence založený na sledování schopnosti CKs inhibovat degradaci chlorofylu (Holub *et al.*, 1998). Tento postup se vyznačoval vysokou citlivostí, ale nízkou specificitou. Proto se dnes pro analýzu fytohormonů využívá převážně fyzikálně-chemických metod plynové či kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, LC-MS), dále vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) a taktéž enzymatické (ELISA) či radioimunoanalytické (RIA) metody (Procházka *et al.*, 1997). Moderní analytické postupy pro stanovení jednotlivých cytokininových metabolitů ze vzorků se tak skládají z vhodného purifikačního protokolu a následného instrumentálního měření citlivými analytickými technikami (Novák *et al.*, 2008).

V současné době se pro identifikaci a stanovení endogenních hladin cytokininů klade důraz zejména na vývoj a aplikaci nových izolačních metod, využívajících minimální množství rostlinného materiálu (1 – 5 mg FW), které tak vedou ke snížení matričního efektu a zvýšení citlivosti MS detekce (Svačinová *et al.*, 2012).

### 2.6.1.1 Extrakce a purifikace vzorku

Příprava vzorku je zásadní pro jednoznačnou identifikaci a bezchybnou kvantifikaci analytu, neboť ovlivňuje všechny následné analytické kroky (Du *et al.*, 2012 v Doležal, 2013). Převedení látek do extrakčního činidla tak, aby přitom nedošlo k jejich degradaci a zároveň aby byl získán dostatečný extrakční výtěžek pro vygenerování následného spektra metabolitů, je hlavní úlohou extrakčních procesů (Tarkowski *et al.*, 2004).

CKs jsou organické látky rozpustné v polárních rozpouštědlech. Pro analýzu je nutno tyto nízkomolekulární látky nejdříve zakonzentrovat a odstranit interferující složky (barviva, fenolické látky apod.) z extraktu. Zásadní je výběr reprezentativního vzorku a čas jeho odběru, jelikož koncentrace cytokininů se v rostlinách pohybují na nízkých hladinách (fmol – pmol na 1g FW) a během dne průběžně kolísají (Procházka *et al.*, 1997). Samotné extrakci vzorků předchází homogenizace pletiv, která se provádí rozetřením rostlinného materiálu v třecí misce za přítomnosti kapalného dusíku (-196 °C) zabraňujícího enzymatické či chemické degradaci analytu (Procházka *et al.*, 1997).

Extrakce vzorků se může provádět ihned po odběru nebo se rostlinný materiál uchovává v mrazicích boxech při teplotě -70 °C. Jak už bylo zmíněno výše, CKs jsou organické látky rozpustné v polárních rozpouštědlech, a proto se pro jejich extrakci používá 70 - 80% metanol, etanol nebo aceton či vícesložková extrakční směs, tzv. Bieleškiho pufr - metanol:chloroform:voda:kyselina mravenčí (12:5:2:1) (Bieleški, 1964). Nevýhodou této extrakční směsi je přítomnost chloroformu, který bohužel zvyšuje i extrakci nežádoucích lipofilních molekul komplikující čistění analytu. Z tohoto důvodu se v posledních letech přešlo na používání tzv. modifikovaného Bielskiho extrakčního pufru obsahujícího pouze: metanol:vodu:kyselinu mravenčí (15:4:1) (Hoyerová *et al.*, 2006). Spolu s extrakčním činidlem se ke vzorku přidávají také interní standardy (IS). Tyto izotopicky značené cytokininové standardy slouží nejenom ke konečnému kvantitativnímu stanovení koncentračních hladin, ale zároveň umožňují kontrolu celého purifikačního procesu, včetně sledování možného cytokininového rozkladu, popřípadě kompenzace ztrát analytu (Ljung *et al.*, 2004).

Na základě fyzikálně-chemických vlastností cytokininových metabolitů se pro maximální účinnost volí správná varianta čistění vzorku pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Cytokinininy jsou bazické molekuly, které získávají kladný náboj při  $\text{pH} < 3$  na exocyklickém atomu dusíku v pozici N6- a záporný náboj v případě  $\text{pH} > 11$  na dusíkovém atomu v pozici N9- (Dobrev a Kamínek, 2002). Tedy, v případě použití Bieleškiho pufru

(pH=2,5), mají CKs v tomto prostředí kladný náboj a pro jejich purifikaci se používá kationtově-výměnná stacionární fáze SPE. Pro získání analytu vysoké čistoty se mohou používat i vhodné kombinace různých stacionárních fází, např. kombinace nepolárního sorbentu C18 (oktadecylsilika) s kationtově-výměnným nosičem (SCX) (Prinsen *et al.*, 1995; Ástot *et al.*, 1998). S vývojem dalších sorbentů SPE s tzv. směsnými fázemi obsahující ve vodě smáčitelny polymer s reverzní fází a příslušný iontoměníč, v případě CKs silný kationtově-výměnný sorbent (MCX) (Dobrev a Kamínek, 2002), došlo k jejich popularitě a hojně aplikaci, čímž došlo ke snížení počtu potřebných purifikačních kroků. Purifikace může být ještě doplněna o imunoafinitní chromatografii (IAC) s navázanými polyklonálními nebo monoklonálními protilátkami (Hage, 1999). Tímto dalším krokem purifikace se sice získává analyt nejvyšší čistoty, ale zároveň se jedná o poměrně časově, ekologicky i ekonomicky náročnou metodu (Faiss *et al.*, 1997; Novák *et al.*, 2003; Hauserová *et al.*, 2005). S možností využití stále citlivějších analytických technik (HPLC-MS/MS; UHPLC-MS/MS) došlo k miniaturizaci SPE purifikačního kroku na jednokrokovou metodu označovanou jako StageTip (**STop And Go Extraction Tip**). Tato metoda je založena na manuální přípravě StageTipů, kde se mohou kombinovat různé typy stacionárních fází, jejich pořadí a počet příslušných vrstev sorbentů. Výhodou metody je nejenom ekonomické a ekologické hledisko, ale zároveň i snížení množství potřebného rostlinného materiálu (1 – 5 mg FW) vedoucího ke snížení matričního efektu a zvýšení tak MS citlivosti (Svačinová *et al.*, 2012).

### **2.6.1.2 Stanovení cytokininů**

V dnešní době nepostradatelnou součástí stanovení a kvantifikace cytokininů a dalších rostlinných hormonů se staly plynová a kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (GC-MS; LC-MS) a kapilární elektroforéza (CE) (Ge *et al.*, 2006). Tyto vysoce citlivé analytické techniky a jejich další vývoj umožňují stanovení nízkých koncentračních hladin fytohormonů i ve stále menším množství rostlinného materiálu bez ztráty těchto informací.

### **Chromatografie**

**Chromatografie** je separační metoda, ve které je separovaný analyt distribuován mezi dvě fáze: mobilní a stacionární. V případě plynové chromatografie je mobilní fází nosný plyn a stacionární fází kapalina nebo polymer. V případě kapalinové chromatografie se jako mobilní fáze používá kapalina, jež unáší vzorek přes stacionární fází nesoucí vhodný

sorbent pro separaci. Interakce mezi analytem a dvěma fázemi způsobuje vznik odlišného retenčního času jednotlivých složek vzorků, který je tak charakteristický pro každou směs za definovaných podmínek (Ardrey, 2003).

### **Plynová chromatografie pro analýzu cytokininů**

Pro analýzu CKs se plynová chromatografie (GC) využívá zhruba od 70. let 20. století (Tarkowski *et al.*, 2009) a struktury téměř všech přirozeně se vyskytujících CKs jsou díky GC-MS známé již od 90. let 20. století. Jelikož CKs nepatří mezi těkavé látky, pro analýzu plynovou chromatografií musí být proto nejdříve derivatizovány, čímž dojde k jejich převedení na sloučeniny těkavé, které mohou být separovány na základě jejich chromatografických vlastností (i jejich optické isomery) (Knapp, 1979). Jako vhodná metoda pro derivatizaci CKs se osvědčila trimetylsilylace (TMS). Další možností derivatizace je tert-butyldimetylsilylace (TBDMS), permetylace, trifluoracetylace (TFA) a acetylace cytokininů (Ástot *et al.*, 1998), která umožňuje větší stabilitu, ale zároveň menší těkavost. Z důvodu nutnosti derivatizace vzorků při využití plynové chromatografie došlo k nahrazení této separační techniky kapalinovou chromatografií i navzdory její robustnosti, citlivosti a reprodukovatelnosti.

### **Kapalinová chromatografie pro analýzu cytokininů**

Nejrozšířenější a nejpreferovanější separační technikou pro analýzu CKs se stala kapalinová chromatografie (LC), konkrétně vysokoúčinná kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) (Ljung *et al.*, 2004). Na základě rozmanité polaritativy všech CKs metabolitů se pro separaci kapalinovou chromatografií osvědčila gradientová eluce s použitím chromatografické kolony s reverzní stacionární fází (C18) (Svačinová *et al.*, 2012). K separaci dochází na základě hydrofobních interakcí mezi stacionární fází a analytem, kde dochází poté k postupnému vymývání jednotlivých CKs metabolitů z kolony změnou poměru složení organické a vodné složky mobilní fáze (Novák *et al.*, 2003). Pro dosažení větší míry rozlišení a rychlejší separace byl vyvinut další typ kapalinové chromatografie – ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) využívající chromatografické kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Předpokladem pro vyšší rychlost separace této techniky je i odpovídající skenovací rychlost a citlivost detektoru (Svačinová *et al.*, 2012), a proto došlo ke spojení UHPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS), která umožňuje vysoké rozlišení, nižší

mez detekce, menší objemy dávkovaných vzorků a v neposlední řadě i sníženou spotřebu mobilní fáze během analýzy (Novák *et al.*, 2008).

Pro MS analýzu CKs se využívají různé ionizační techniky. První ionizační technika použitá pro LC-MS analýzu CKs byla chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) (Yang *et al.*, 1993). Roku 1998 byla dále aplikována ionizace bombardováním urychlenými atomy (FAB) (Åstot *et al.*, 1998), kdy ještě téhož roku byla ovšem zavedena ionizace elektrosprejem (ESI), která se stala nejuniverzálnější a nejpoužívanější ionizační technikou nejenom pro analýzu CKs, ale všech netěkavých fytohormonů (Prinsen *et al.*, 1998).

Na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) dochází pomocí analyzátorů hmotnostní spektrometrie ke stanovení CKs v rostlinném materiálu. Mezi nejpoužívanějšími typy hmotnostních analyzátorů pro identifikaci a kvantifikaci CKs se používají kvadrupól (Q), analyzátor doby letu (TOF), iontová past (IT), orbitrap (OT) (Åstot *et al.*, 1998; Novák *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010; Fletcher *et al.*, 2007). Kromě použití „pouze“ jednoho MS analyzátoru se mohou využívat i tzv. hybridní analyzátory, které vznikají kombinací jednotlivých typů MS analyzátorů, jako je např. Q-TOF (Doležal *et al.*, 2007).

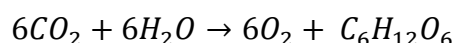
V dnešní době nejpoužívanějším analytickým systémem pro analýzu CKs je spojení ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) využívající trojitý kvadrupól (QqQ) jako analyzátor, pracujícího v módu selektivního záznamu více iontových reakcí („multiple reaction monitoring“; MRM) (Novák *et al.*, 2008; Prinsen *et al.*, 1998). Na základě tohoto uspořádání jsme schopni detekovat a stanovovat CKs a všechny jejich metabolity na velmi nízkých koncentračních hladinách, pohybujících se na femtomolárních hladinách v jednom nástřiku vzorku (Antoniadi *et al.*, 2015; Plačková *et al.*, 2017).

### **Kapilární elektroforéza (CE) pro analýzu cytokininů**

Tato technika se vyznačuje svojí rychlostí a vysokou rozlišovací schopností. Na druhou stranu vlivem miniaturizace potřebného množství vzorku se snižuje maximální objem nástřiku (což je důležitý parametr zejména při analýze biologických vzorků) a i dynamický rozsah a robustnost celé metody (Ge *et al.*, 2006; Tarkowski *et al.*, 2009 a další). Důsledkem nižšího maximálního objemu nástřiku a kratší optické dráhy je limit detekce (LOD) většinou vyšší než u technik HPLC a GC. Proto většina CE analýz potřebuje zvýšit citlivost pomocí konkrétnějších detekčních systémů a zařadit mezi kroky analýzy také zakoncentrování vzorku (Tarkowski *et al.*, 2009). Separaci prostřednictvím CE lze provádět v několika možných režimech: kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Metoda CZE analyzuje nabitý CKs na základě rozdílů mezi vlastní elektroforetickou mobilitou analytů a separuje zpravidla pouze iontové látky. Metoda MEKC, pro kterou je charakteristické přidání surfaktantů do roztoku pufrů za účelem vytvoření micelů, může být využita pro separaci jak iontových, tak i neutrálních látek. Tato metoda dělí látky na základě odlišné separace analytů mezi micely a vodu (Hancu *et al.*, 2013). Pro detekci CKs CE jsou obecně využívány UV a MS detektory. Nedávno byla také vyvinuta nová metoda založená na kombinaci technik MEKC-ESI-MS, která umožňuje determinaci až 13 podobných cytokininů (Ge *et al.*, 2008).

### **2.6.2 Metody stanovení fotosyntetické aktivity**

Fotosyntéza zahrnuje řadu propojených reakcí, při nichž dochází k převodu světelné energie na energii chemickou, která se poté využívá k redukci oxidu uhličitého a vzniku cukru, dle rovnice (Walker *et al.*, 2018):



Při nastavení jednotlivých měřících instrumentů je základní charakteristikou to, jaká část rovnice je měřena. Fotosyntetická reakce se však vyskytuje v kapalně fázi a glukóza jakožto produkt fotosyntézy je rychle převedena na jiné formy. Technologie pro měření fotosyntézy se tak opírají zejména o zkoumání výměny plynů. Mezi hlavní metody měření fotosyntézy patří: **měření asimilace CO<sub>2</sub>** nebo **produkce O<sub>2</sub> *in vivo*** (Walker *et al.*, 2018). Mimo tyto metody se využívá také sledování biofyzikálních procesů, např. **chlorofylové fluorescence** a **listové spektroskopie** (Genty *et al.*, 1989; Harbinson *et al.*,

1989; Walker *et al.*, 2018), které umožňují monitorování specifických komponent světelné reakce fotosyntézy nedestruktivně a za nativních podmínek. Vzhledem k využití měření pomocí chlorofylové fluorescence v experimentální části diplomové části práce, je tato kapitola zaměřena zejména na popis této metodiky měření.

### **Měření asimilace CO<sub>2</sub>**

Důvod, proč došlo ke konstrukci prvního systému na měření výměny CO<sub>2</sub> bylo zjištění, že větší fixace CO<sub>2</sub> rostlinami by alternativně mohla poskytnout větší rostlinnou produkci (Gaastra, 1959 v Walker *et al.*, 2018). Zpočátku bylo možné tato měření uskutečnit vývojem různých fyzikálních a chemických metod, od konduktometrických po optoakustické (Šesták *et al.*, 1971 v Long *et al.*, 1996). V současnosti se do popředí dostává metoda infračerveného plynového analyzátoru (IRGA), jenž měří koncentraci CO<sub>2</sub> prostřednictvím měření absorbance charakteristických vlnových délek v infračervené oblasti elektromagnetického záření (Long *et al.*, 1996).

Principem měření pomocí IRGA je absorpce záření o specifických sub-milimetrových infračervených vlnových délkách heteroatomovou plynovou molekulou. Vychází se z poznatku, že plynové molekuly skládající se ze dvou identických atomů (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) nejsou schopny absorbovat toto infračervené záření, a proto ani neinterferují s heteroatomovými molekulami, jako např. s CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, CO, N<sub>2</sub>O, NO, (Hill a Powell, 1968 v Long *et al.*, 1996). Heteroatomová molekula plynu absorbuje infračervené záření o specifické vlnové délce, čímž získá specifické absorpční spektrum, které se řídí Beer-Lambertovým zákonem (Pandey *et al.*, 2017), proto:

$$\alpha_{\lambda} = l - e^{(-klM)}$$

kde:

$k$  = extinkční koeficient při vlnové délce  $\lambda$  [dm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]

$l$  = délka optické dráhy [cm]

$M$  = molární koncentrace CO<sub>2</sub> ve vzduchu [mol.dm<sup>-3</sup>]

(Pandey *et al.*, 2017).

Měření může být provedeno v uzavřených nebo otevřených systémech (Walker *et al.*, 2018). V uzavřených systémech je proud vzduchu udržován ve smyčce a vzduch je tak recirkulován listovou kyvetou a měřen jako funkce času. Důsledkem tohoto systému je, že jednotlivé podmínky v komorách se kontinuálně mění a výsledem měření nikdy nejsou

hodnoty za skutečně stabilního stavu (Pandey *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2018). V uzavřených systémech fotosyntéza může být vypočítána dle rovnice:

$$\text{fotosyntéza} = \frac{(CO_2 \text{ počáteční} - CO_2 \text{ konečné})}{(\text{listová plocha} * \text{čas})} * \text{objem}$$

V otevřených systémech prochází vzduch pouze jednou. Tok  $CO_2$  se v těchto systémech měří z odlišností v koncentraci plynu v proudu vzduchu před a po vystavení rostlinného materiálu známému průtoku (Walker *et al.*, 2018). V otevřených systémech může být fotosyntéza vypočítána dle rovnice (Pandey *et al.*, 2017):

$$\text{fotosyntéza} = \frac{(CO_2 \text{ referenční} - CO_2 \text{ vzorek})}{(\text{listová plocha})} * \text{tok}$$

### **Měření produkce $O_2$**

Aktivita světelné reakce může být změřena z produkce  $O_2$  po štěpení  $H_2O$  ve fotosystému II (Walker *et al.*, 2018). Pro měření byly dříve využívány manometrické techniky, ovšem dnes se využívá tzv. Clarkova kyslíková elektroda. Tato elektroda měří koncentraci  $O_2$  skrz redukci kyslíku, ke které dochází prostřednictvím difúze kyslíku ze vzorku přes membránu ke katodě, kde je redukován (Clark a Lyons, 1962).

### **Měření chlorofylové fluorescence**

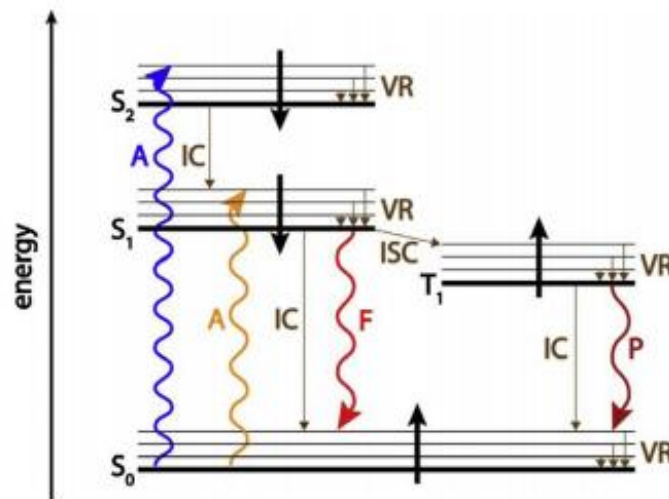
Fluorescence chlorofylu poskytuje výkonný systém pro snímání obrazu fotochemie na úrovni fotosystému II (PSII), což je enzymový komplex zodpovědný za rozdělení vody a elektronů v průběhu fotosyntézy (Baker, 2008). Vztah mezi chlorofylovou fluorescencí a fotochemií spočívá v různém rozdělení světelné energie, která je absorbovaná chlorofylovou molekulou (Butler, 1978).

V případě, že po absorpci světelné energie dojde k excitaci molekuly, energie této excitované molekuly, jejíž snahou je dostat se zpět do svého základního stavu, je deaktivována procesy, jež jsou znázorněny Jablonského diagramem (Obr. 11). Tyto procesy můžeme rozdělit na zářivé a nezářivé přechody (Jablonski, 1933).

### **Nezářivé přechody:**

- **VR** - vibrační relaxace
- **IC** - vnitřní konverze
- **ISC** – mezisystémová konverze





Obr. 11 Jablonski diagram znázorňující jednotlivé energetické hladiny a deexcitační cesty excitované molekuly (Lazár, 2015).

V rámci energetického dělení PSII reprezentují všechny tyto procesy ve stavu adaptovaném na tmu (všechny reakční centra jsou otevřená) procesy **bazální neregulovatelné tepelné disipace**, která je charakterizována rychlostní konstantou **k<sub>D</sub>** (Obr. 12). V případě na světlo adaptovaném stavu se objevuje zvýšení hodnot rychlostních konstant nezářivých přechodů, které je způsobené světelnou indukci. Toto zvýšení hodnot způsobuje **světlem indukovanou regulovanou tepelnou disipaci** charakterizovanou rychlostní konstantou **k<sub>NPQ</sub>** (Obr. 12). Také platí, že v případě přítomnosti regulačního nefotochemického zhášení jsou zároveň zvyšovány hodnoty nezářivých přechodů pro na tmu adaptovaného stavu (Lazár, 2015).

### Zářivé přechody

- **F** - Fluorescence - přechod do nižšího elektronového stavu se stejnou multiplicitou, přechod z hladiny S<sub>1</sub> na hladinu S<sub>0</sub> (spinově povolený přechod charakterizovaný kratší dobou dosvitu).
- **P** - Fosforescence - přechod mezi stavy s různou multiplicitou, přechod z hladiny T<sub>1</sub> na hladinu S<sub>0</sub> (spinově zakázaný přechod charakterizovaný delší dobou dosvitu; Jablonski, 1933).

S ohledem na PSII dochází po absorpci světla i k dalším deaktivacím procesům, jež nejsou znázorněny v Jablonského diagramu. Společně s již zmíněnými procesy tepelné disipace a fluorescence je můžeme obecně rozdělit na **fotochemické** a **nefotochemické** zhášení (Lazár, 2015):

### Fotochemické zhášení

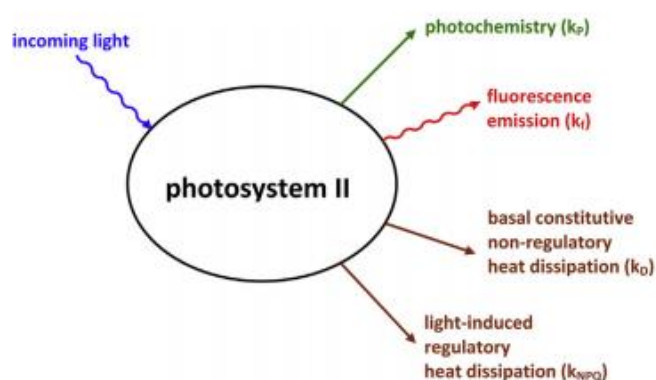
Jedná se o proces, kdy je excitační energie molekuly využita PSII pro transfer elektronů z vody na mobilní elektronový nosič – plastochinon.

### Nefotochemické zhášení

Proces, kdy je excitační energie disipována jako:

- Tepelná disipace – bazální konstitutivní neregulovatelná tepelná disipace a světlem indukovaná regulovatelná tepelná disipace
- Chlorofylová fluorescence – proces, kdy je energie reemitována jako foton s posunutou vlnovou délkou.

Chlorofylová fluorescence, která je pro nás snadno měřitelná, tak doplňuje energetickou rovnováhu těchto tří procesů – fotochemického zhášení, bazální konstitutivní neregulovatelné tepelné disipace a světlem indukované regulovatelné tepelné disipace – a její monitorování může být použito ke sledování jednotlivých poměrů fotochemického a nefotochemického zhášení, což je nezbytné pro určení dané fotochemie PSII (Lazár, 2015).



Obr. 12 Schematické znázornění základního rozdělení absorbované energie PSII (Lazár, 2015).

### Pulzní amplitudová modulace (PAM) fluorescenčního signálu

Jednou z nejvyužívanějších metod pro stanovení chlorofylové fluorescence je tzv. pulzní amplitudová modulační technika. Pokud listy vystavíme tmě po dostatečně dlouhou dobu, primární chinonový akceptor PSII ( $Q_A$ ) se stává maximálně oxidovaným a všechna reakční centra se stávají otevřenými, tzn. že jsou připravena přijmout excitační energii a uskutečnit fotochemickou redukci  $Q_A$ . Listy se tak stávají na tmu adaptované. V tuto chvíli se dané listy zároveň vystavují slabému modulujícímu měřicímu paprsku o

intenzitě cca  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  jehož důsledkem je vznik minimální hladiny fluorescence, která se označuje jako  $F_0$  (Obr. 13) (Baker, 2008). V dalším kroku dochází k vystavení listů krátkému saturačnímu pulzu o vysoké intenzitě  $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , díky kterému dochází k maximální redukci  $Q_A$  a uzavření reakčních center. Dochází tak zároveň i k maximální fluorescenci, která je označována jako  $F_m$ . Pomocí rozdílu hodnot  $F_m$  a  $F_0$  lze vypočítat tzv. variabilní fluorescenci ( $F_v$ ). Pokud se hodnota variabilní fluorescence vydělí hodnotou maximální fluorescence, získá se tzv. základní fluorescenční poměr PSII  $F_v/F_m$ , odpovídající maximálnímu kvantovému výtěžku fotochemie PSII, jenž slouží zejména jako indikátor snížené funkce nebo poškození reakčních center a udává počet reakčních center, které se v průběhu pulzu zavřely. Ve zdravých, nepoškozených rostlinách tento parametr dosahuje obvykle hodnoty 0,83. V případě vystavení rostlin biotickému nebo abiotickému stresu dochází ke snížení této hodnoty. Dále se využívá aktinické světlo, jenž disponuje podobnými podmínkami jako sluneční záření a vede k rozvíjení fotosyntetické aktivity. Fluorescence při daném pulzu koresponduje s počtem reakčních center, které jsou schopny transferovat excitaci na fotochemii (Lazár, 2015).

Experimentální část diplomové práce se zabývala hodnocením 4 základních parametrů:

- **$F_v/F_m$**  – maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosytému II
- **$\Phi_P$**  - aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII v průběhu adaptace na světlo (Lazár, 2015):

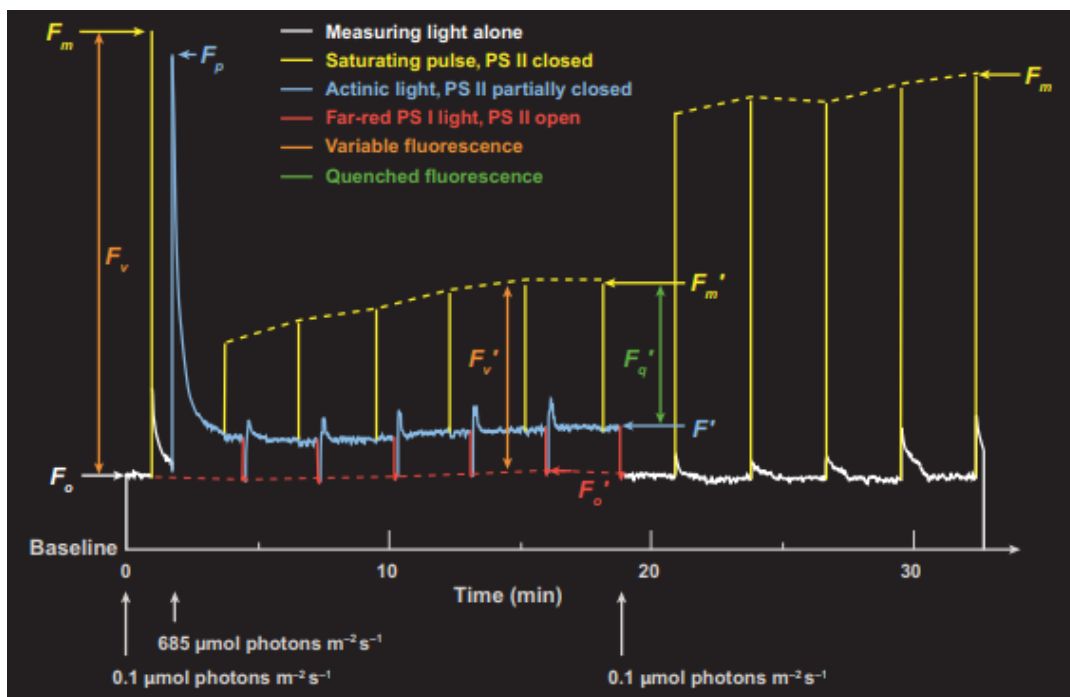
$$\Phi_P = \frac{F_{v'}}{F_{m'}}$$

- **$\Phi_{NPQ}$**  - kvantový výtěžek nefotochemického zhášení chlorofylu v průběhu adaptace na světlo (Lazár, 2015):

$$\Phi_{NPQ} = \frac{F_t}{F'_m} - \frac{F_t}{F_m}$$

- **$\Phi_{f,D}$**  - kvantový výtěžek bazálního nefotochemického zhášení chlorofylu v průběhu adaptace na světlo (Lazár, 2015):

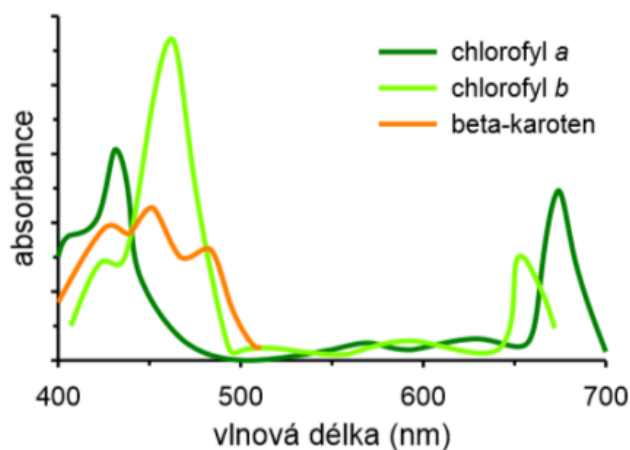
$$\Phi_{f,D} = \frac{F_t}{F_m}$$



Obr. 13 Výstupní schéma pulzní amplitudové modulační techniky pro měření jednotlivých parametrů fotosyntézy dle Bakera (Baker, 2008).

### 2.6.3 Metody pro stanovení chlorofylu

Obsah i složení rostlinných pigmentů jsou důležitým ukazatelem stavu fotosyntetického aparátu. U vyšších rostlin a zelených řas se vyskytují nejvíce chlorofyl *a*, chlorofyl *b* (Chl *a* a Chl *b*) a karotenoidy (Car) (Obr. 14).



Obr. 14 Absorpční spektrum nejdůležitějších listových barviv (Drda, 2018).

Nejjednodušší metodou pro kvalitativní a kvantitativní stanovení chlorofylu patří vzhledem k absorpčním vlastnostem těchto pigmentů zejména UV-VIS spektrofotometrie. Pigmenty se nejdříve extrahují z fotosyntetických tkání organickými

rozpuštědly (aceton, metanol, etanol, éter) a poté dochází k spektrofotometrickému měření, kdy se na základě získané absorbance určuje dle specifických rovnic obsah jednotlivých pigmentů. Tento obsah se následně vztahuje na sušinu, čerstvou hmotu nebo plochu listu.

Spektrofotometrie vychází z tzv. Lambert-Beerova zákona. Koncentrace analytu v roztoku může tak být stanovena měřením absorbance při určité vlnové délce dle rovnice:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde:

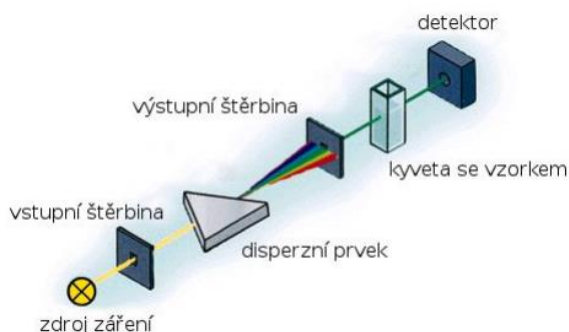
$\varepsilon$  = molární absorpční koeficient [ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

$c$  = koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]

$l$  = délka optické dráhy [cm]

Přístroje, ve kterých dochází k měření absorbance, se nazývají spektrofotometry. V případě stanovení chlorofylu se používá UV-VIS spektrofotometr, který je schopen měřit absorbanci ve dvou oblastech elektromagnetického záření: v UV oblasti (190 - 400 nm) anebo ve VIS oblasti (400 - 800 nm). Spektrofotometr se skládá ze zdroje světla, vstupní a výstupní štěrbin, monochromátoru, kyvety se vzorkem a fotoelektrického detektoru (Novotná *et al.*, 2011) (Obr. 15).

UV-VIS spektrometry obsahují dva typy světelných zdrojů – wolframovou žárovku pro měření ve viditelné oblasti elektromagnetického záření a vodíkovou nebo deuteriovou lampu pro UV oblast. V závislosti na konfiguraci (uspořádání) spektrofotometru se rozlišují jednopaprskové a dvoupaprskové spektrofotometry. V případě jednopaprskových spektrofotometrů dochází nejdříve k proměření tzv. reference nebo-li blanku, a až poté vzorku. U dvoupaprskových spektrofotometrů dochází zároveň k proměřování jak reference, tak i vzorku zároveň (Novotná *et al.*, 2011).



Obr. 15 Základní schéma spektrofotometru (Novotná *et al.*, 2011).

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Rostlinný materiál

*Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) – 10-denní semenáčky, rostoucí *in vitro* v Petriho miskách obsahující Murashige & Skoog médium. Růstové podmínky fytotronu:

- 16 h světlo ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) /8 h tma
- 50% vlhkost
- 21 °C

### 3.2 Chemikálie a roztoky

- 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)
- Metanol ( $\geq 99,9\%$ ) 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

**Sterilizace semen:** sterilizační roztok (70% etanol+ 0,1% Tween20 – 9,99 ml/10 ml 70% etanolu + 0,01 ml/10 ml Tween20)

**Murashige & Skoog médium s vitamíny:** 10 g/l 1 sacharóza, 2,2 g/l 1 MS médium, 7 g/l 1 agar, 1 l/1 l destilované vody, pH=5,6

#### **Stanovení CKs:**

- modifikovaný Bielski pufr (75 % MeOH, 5 % HCOOH, 20 % H<sub>2</sub>O): 750 ml/l metanolu + 200 ml/l redestilované vody + 50 ml/l kyseliny mravenčí
- 50% kyselina dusičná (735 ml/l kyseliny dusičné + 265 ml/l redestilované vody)
- 0,5M roztok hydroxidu amonného v 60% metanolu – eluční roztok CKs (0,775 ml/10 ml hydroxidu amonného + 6 ml/10 ml metanolu + 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% metanol (1ml/10 ml metanolu + 9 ml/10 ml redestilované vody)

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

- 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)

**Stanovení obsahu chlorofylu:** 80% aceton (32 ml/40 ml acetonu + 8 ml/40 ml redestilované vody)

### **3.3 Přístroje**

- 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)
- Spektrofotometr UV/VIS Shimadzu UV-2600/2700 (Kyoto, Japan)
- FluorCam 700 MF (Photon Systems Instruments, Drásov, ČR)

### **3.4 Programové vybavení**

- Microsoft Excel 16
- MassLynx™ software s TargetLynx™ programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA)
- FluorCam 7 (Photon Systems Instruments, Drásov, ČR)
- OriginPro 8.5 OriginLab Corporation (USA)
- UV-Probe 2.62

### **3.5 Metody**

#### **3.5.1 Příprava rostlinného materiálu**

Semena na výsev byla v laminárním boxu promyta sterilizačním roztokem (1 ml) a poté byla pomocí automatické pipety přenesena na filtrační papír a vysušena. Do kultivačních misek bylo nalito přibližně 50 ml horkého média, jenž se nechalo vychladnout a ztuhnout. Pomocí vysterilizovaného párátko se na každou misku, připravenou za účelem měření cytokininů, vysely tři řádky, obsahující zhruba 35 semínek v jednom řádku. Pro měření



fotosyntézy a chlorofylu byly vysety tři řádky se zhruba 10 semínky v jednom řádku. Toto vysazování probíhalo kontinuálně v týdenních intervalech v období od 23. 1. 2019 (4. týden roku) do 15. 1. 2020 (3. týden roku). Misky byly po každém vysetí oblepeny fixační páskou, obaleny alobalem a umístěny do chladničky (4 °C). Po 2 dnech byly desky přeneseny do fytotronu, kde byly pěstovány ve vertikální poloze. Podmínky ve fytotronu byly nastaveny na fotoperiodu 16 h světlo ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) /8 h tma, teplotu 21 °C a 50% vlhkost vzduchu.

Sklízení semenáčků probíhalo vždy po deseti dnech od přesunutí desek do fytotronu, a to vždy ve stejnou denní dobu. Všechn materiál byl poté skladován v hlubokomrazícím boxu, při teplotě -70 °C.

### **3.5.2 Stanovení endogenní hladiny cytokininů**

#### **3.5.2.1 Purifikace cytokininů**

Pro stanovení endogenních hladin CKs bylo nutné nejdříve ručně připravit StageTipy, pro něž byla nejdříve provedena optimalizace formou srovnání návratnosti CKs při použití různých kombinací sorbentů (viz kapitola Přílohy). Protože CKs v prostředí Bieleskiho pufru ( $\text{pH} \pm 2,5$ ) získávají kladný náboj, pro jejich purifikaci se využívá kationtově-výměnný sorbent se silnou sulfonovou skupinou a dochází tak k jejich zachycení. První variantou přípravy bylo použití 4 vrstev SDB-RPS (kopolymer styren-divinylbenzenu) a 4 vrstev kationtově-výměnné fáze (Cation-SR) pro jejich zachycení. Druhá varianta obsahovala 3 vrstvy reverzní fáze C18 pro vychytávání nepolárních složek (lipidy, proteiny, pigmenty), 3 vrstvy SDB-RPS a 3 vrstvy kationtově-výměnné fáze (Cation-SR). Na základě porovnání návratností všech CKs metabolitů purifikovaných přes tyto dva různě připravené typy StageTipů, byly pro konečnou purifikaci vybrány StageTipy s kombinací 4 vrstev kationtově-výměnné fáze a 4 vrstev kopolymeru SDB-RPS.

Aktivace a kondicionace Stage Tipů byla provedena podle Svačinová et al. (2012) následujícím protokolem:

1. 50  $\mu\text{l}$  aceton – 2 200 rpm; 10 min.; 4°C
2. 50  $\mu\text{l}$  MeOH – 2 200 rpm; 10 min.; 4°C
3. 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O – 2 300 rpm; 15 min.; 4°C
4. 50  $\mu\text{l}$  50% HNO<sub>3</sub> – 2 500 rpm; 20 min.; 4°C
5. 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O – 2 500 rpm; 20 min.; 4°C
6. 50  $\mu\text{l}$  Bieleski pufr – 2 500 rpm; 20 min.; 4°C

Jednotlivé vzorky byly zhomogenizovány v třecí misce a rozváženy pod tekutým dusíkem na tři technické replikáty s navážkami cca 2,5 mg. Extrakce byla provedena 1 ml vychlazeného (-20 °C) modifikovaného Bieleskiho pufru. Ke každému vzorku bylo zároveň přidáno 20 µl směsi interních standardů (0,25 pmol B, R, 7G, 9G a 0,5 pmol OG a NT) a 3 homogenizační kuličky z oxidu zirkoničitého. Vzorky byly zvortexovány, zhomogenizovány na kulovém mlýnku (27 Hz; 3 min; 4 °C), podrobeny sonikaci (3 min.; 4 °C) a následovala extrakce na laboratorním rotátoru po dobu 30 minut (17 rpm.; 4 °C). Následně byly vzorky centrifugovány (20 000 rpm; 15 min.; 4 °C), supernatanty sesbírány do 1,5ml eppendorfek a následně opakovaně nanášeny na předem zaktivované a z kondicionované StageTipy. Nanášení vzorků probíhalo za centrifugačních podmínek: 4 500 rpm; 30 min.; 4 °C. Po nanesení kompletních vzorků došlo k jejich promytí pomocí 50 µl H<sub>2</sub>O (3 500 rpm; 20 min; 4 °C) a 50 µl MeOH (3 500 rpm; 20 min.; 4 °C). Eluce CKs byla provedena 50 µl 0,5M NH<sub>4</sub>OH v 60% MeOH (4 000 rpm; 20 min.; 4°C). Eluce byly sbírány do nových eppendorfek, převedeny do vialek se 100µl inzerty, odpařeny do sucha na vakuové odparce a rozpuštěny v 10% MeOH pro analytické měření.

### 3.5.2.2 Separace cytokininových metabolitů

Stanovení CKs metabolitů bylo provedeno ultra-vysoce účinnou kapalinovou chromatografií v zapojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) za použití protokolu vycházejícího z metodiky dle Svačinové *et al.* (2012). Separace cytokininových metabolitů byla provedena na chromatografické koloně s reverzní fází Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH Shield RP18 (1,7 µm; 2,1 x 150 mm) v 17 minutách za využití tzv. gradientové eluce, kdy došlo k rozdělení isoprenoidních (27) a aromatických (20) CKs bází, ribosidů, *N*-glukosidů, *O*-glukosidů a nukleotidů. Gradient byl tvořen metanolem (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). Zkrácení celkové doby analýzy z 30 minut (Svačinová *et al.*, 2012) na 17 minut bylo získáno zvýšením průtokové rychlosti na 0,400 ml.min<sup>-1</sup> a zvýšením teploty na koloně na 55 °C. Detekce CKs byla provedena ionizací molekul elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+). Ionty poté byly stanoveny pomocí záznamu více iontových reakcí (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. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí MassLynx softwaru a kvantifikovány pomocí programu TargetLynx. Endogenní hladiny byly stanoveny metodou standartního izotopového ředění (Novák *et al.*, 2008).

### 3.5.3 Stanovení fotosyntetické aktivity

Pro stanovení aktivity fotosyntetického aparátu byla použita pulzní amplitudová modulační technika. Měření probíhalo za laboratorní teploty, přičemž nejdříve bylo nutno zaostřit systémovou kameru, vycentrovat Petriho misky s rostlinami do středu zorného pole této kamery a po dobu 25 minut tyto misky zatemnit. Následně byly měřeny fotosyntetické parametry dle specifického protokolu, kterým byl dán průběh a délka měření (25 minut). Protokol započal spuštěním záblesků červeného měřicího světla, které bylo dostatečně slabé, aby nezpůsobovalo uzavírání reakčních center PS II. Tak došlo k naměření hodnoty  $F_0$  (minimální fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu). Délka těchto záblesků byla 10  $\mu$ s a tyto pulzy byly aplikovány v třísekundových intervalech. Celkově se jednalo o 10 pulzních záblesků po kterých následoval saturační puls o intenzitě 2500  $\mu$ mol fotonů  $m^{-2}\cdot s^{-1}$  (bílé světlo) a trvání 800 ms. Prostřednictvím saturačního pulzu byla určena hodnota  $F_m$  (maximální fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu). Následoval časový úsek 90 s, jehož cílem byla opětovná relaxace reakčních center do stavu adaptovaného na tmu. V čase 93,8 po spuštění měřicího protokolu byly rostliny vystaveny červenému aktinickému světlu o intenzitě 120  $\mu$ mol fotonů  $m^{-2}\cdot s^{-1}$  po dobu přibližně 23 minut. Tento časový úsek sloužil k měření zhášecích parametrů. Pro určení hodnoty  $F_m'$  (maximální fluorescenci v průběhu adaptace na světlo), se během spuštění aktinického světla aplikovaly taktéž i saturační pulzy, kterých bylo celkem 32. První saturační pulz byl aplikován 9 s po spuštění aktinického světla a další pulzy byly poté spuštěny v dvacetisekundových intervalech. Od 22. pulzu byly zbývající pulzy aplikovány vždy 59 s od počátku posledního pulzu.

### 3.5.4 Stanovení obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu byl stanoven spektrofotometricky, prostřednictvím UV-VIS spektrofotometrie, kdy jednotlivé vzorky byly naváženy pod tekutým dusíkem do hmotnosti cca 10 mg. Poté byl přidán 1 ml 80% acetonu společně s homogenizačními kuličkami z oxidu zirkoničitého a vzorky byly rozemlety na kulovém mlýnku (27 Hz; 10 min) a následně zcentrifugovány (20 000 rpm; 5 min; 4 °C). Poté byl odebrán supernatant

do nových eppenforfek a vzorky byly dále zfiltrvány přes 0.2µm nylonové filtry (8 000 rpm; 5 min.). Po filtraci byly vzorky napipetovány do skleněné kyvety a proměřeno jejich absorpční spektrum pro vlnové délky: 470 nm, 663,2 nm, 646,8 nm a 750 nm. Pro získání dat bylo využito programu UV-Probe. Z naměřených hodnot absorbancí (A) byla vypočtena hodnota obsahu chlorofylu *a* a *b* a karotenoidů ve vzorku dle rovnic:

$$\text{Chl } (a+b) = 7,15 (A_{663,2}-A_{750}) + 18,71 (A_{646,8} - A_{750})$$

$$\text{Car} = [1000(A_{470}-A_{750})-1,82(\text{Chl } a)-85,02(\text{Ch } b)]/198$$

Výsledná koncentrace byla převedena na mg.ml<sup>-1</sup>.

### 3.5.5 Evaluace dat

Vyhodnocení naměřených dat pro obsah endogenních hladin CKs bylo provedeno prostřednictvím softwarů MassLynx a programu TargetLynx. Hodnoty byly poté zpracovány v programu Microsoft Excel, kde byly vytvořeny i konečné grafy

Pro získání parametrů fotosyntetické aktivity bylo využito programu FluorCam 7. Následně byly získané hodnoty převedeny do programu Microsoft Excel, ze kterého byly po získání vypočtených hodnot dle rovnic uvedených v kapitole 2.1.6. převedeny do programu OriginPro 8.5, ve kterém byly vytvořeny příslušné grafy.

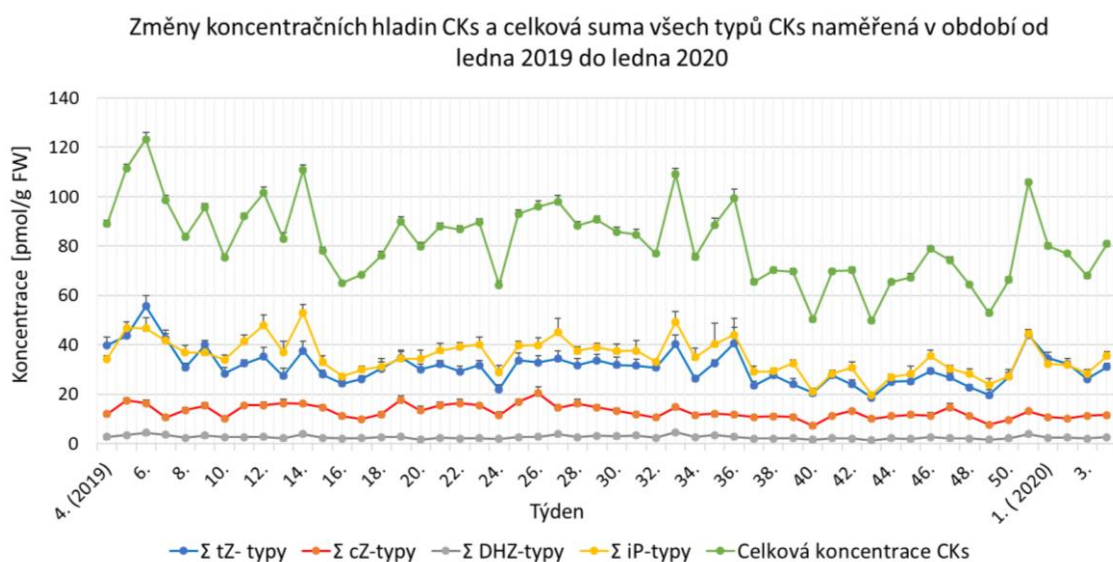
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Endogenní hladina cytokininů

Pomocí UHPLC-MS/MS analýzy byly identifikovány a stanoveny CKs v 10-ti denních rostlinách *Arabidopsis thaliana* pěstovaných a sklizených v týdenních intervalech v průběhu celého roku, u kterých došlo k detekci isoprenoidních CKs tZ-, cZ-, iP- a DHZ-typu. Aromatické CKs detekovány nebyly. Měření bylo prováděno na rostlinném materiálu získaném z období od ledna 2019 do ledna 2020.

#### Změny koncentračních hladin CKs od ledna 2019 do ledna 2020

Na Obr. 16 je zelenou křivkou znázorněna celková koncentrační suma metabolitů všech detekovaných typů CKs. Ostatní křivky zobrazují průběžné sumy koncentrací metabolitů příslušící konkrétnímu typu měřeného CK (tZ-, cZ-, iP-, DHZ-typ).



Obr. 16 Změny koncentrací měřených CKs a celková koncentrační hladina CKs v období od ledna 2019 do ledna 2020.

Během měřeného období lze pozorovat kolísavý trend celkové sumy koncentračních hladin všech detekovaných CKs metabolitů (zelená křivka) v průběhu celého roku. Vyšších koncentračních hladin se dosáhlo zejména v první polovině roku. Nejvyšší koncentrační sumy CKs dosahující hodnot až 123 pmol/g FW byly pozorovatelné přibližně od února do března, což odpovídá výsledkům Trompa a Oova z roku 1990, kteří sledovali změnu v koncentračních hladinách CKs u jabloní v průběhu střídání ročních období – tedy za normálních podmínek. V rámci jejich výzkumu byl potvrzen nárůst

koncentrace CKs již v únoru před viditelným růstem pupenů u studovaných rostlin. Vyšší hladina CKs v našich rostlinách by tak mohla být reakcí na ukončování zimní dormance probíhající obvykle v těchto měsících. Tento časový interval byl v našem experimentu spojen taktéž i s větším počtem píků na křivce, přičemž časový úsek mezi jednotlivými vrcholy trval střídavě čtyři nebo dva týdny.

V období jarních a letních měsíců (od 16. týdne do 39. týdne) byly průměrně naměřeny nižší hodnoty CKs hladin než v předchozích měsících, avšak v měsících květen až červenec (25. – 32. týden) se na rozdíl od předchozích měsíců objevilo o dost menší kolísání hodnot a koncentrace CKs se po tento časový úsek viditelně ustálily. Výsledné hodnoty by mohly poukazovat na skutečnost, že v tomto období dochází obvykle k odlišným procesům v rostlinách, vyžadující jiné rostlinné hormony. Kupříkladu u jabloní dochází v červenci obvykle k zastavení růstu (Luckwill a Whyte, 1968) a indukci kvetení (Luckwill, 1970).

Do 39. týdne neklesla celková koncentrační hladina CKs pod hodnotu 64 pmol/g FW. To se ovšem změnilo s příchodem 40. týdne (říjen), kterým započalo období podzimu. Právě v tomto období byly detekovány nejnižší CKs hladiny. Nejmenší koncentrace CKs byla zaznamenána na přelomu podzimu a zimy, tedy ve 43. týdnu, a to 49,9 pmol/g FW. V tomto období se při růstu za normálních podmínek obvykle objevuje nižší úroveň transpirace (Tromp a Ova, 1990), přičemž při růstu za konstantních podmínek byla v našem experimentu prokázána právě nižší fotosyntetická aktivita semenáčků. Rostliny v tomto období obvykle místo aktivního růstu využívají své energetické zásoby pro přežití v nižších teplotách a dochází u nich k počátečním projevům senescence. Nízká hladina cytokininů tak v našem případě může být spojena s jejich akumulací v zásobních tkáních a s návazností na senescenční projevy, ke kterým by docházelo v případě růstu za normálních podmínek. Mezi tyto projevy patří kromě snížené fotosyntetické aktivity a snížené koncentrační hladiny CKs taktéž i zvýšená degradace chlorofylu, která byla v dlouhodobějším intervalu taktéž prokázána zejména na konci léta a na podzim, viz níže.

Křivky jednotlivých typů CKs se navzájem přibližně kopírují, avšak platí, že čím větší koncentrační hladina CK, tím větší kolísavý charakter křivka má a naopak.

Za cytokininový typ vyskytující se v největších koncentračních hladinách v průběhu téměř celého sledovaného období se jeví iP-typ. Pouze v období zimních týdnů se jeho koncentrační hladiny překrývají s koncentračními hladinami CKs tZ-typu, který je zároveň druhým hlavním typem detekovaných CKs. Tato predominance iP a tZ v rostlinách, kterou nastínil ve své práci již Letham roku 1963 (Letham, 1963), souvisí

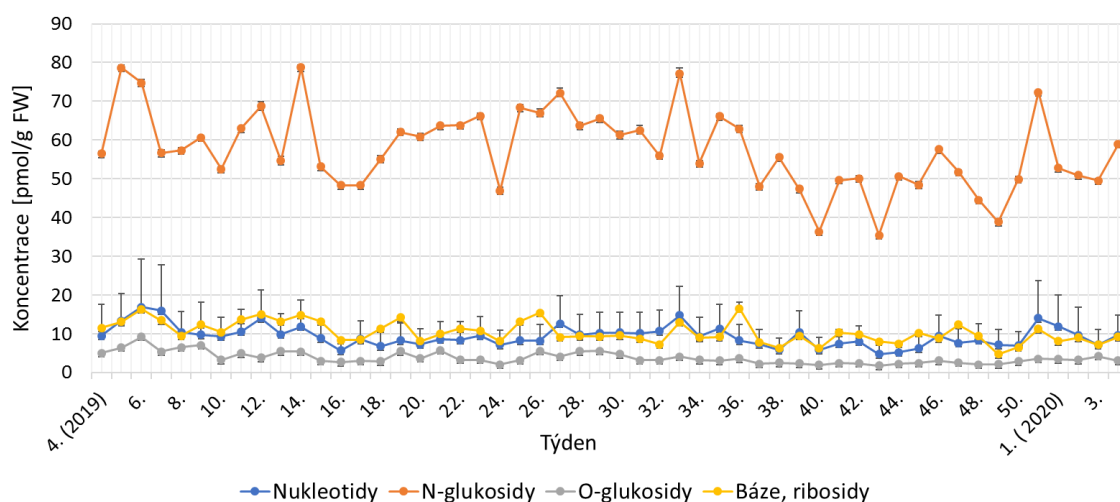
s jejich biologickou aktivitou, a proto jsou tZ a iP uváděny jako neaktivnější složky CKs. Vyšší hodnoty koncentrací tZ-typu CKs v zimních měsících by s přihlédnutím k biosyntetické dráze CKs mohly souviset s vyšší potřebou tZ pro syntézu DHZ-typu CKs a glykosylovaných, čili zásobních metabolitů v tomto období (viz Obr. 17), kdy v rostlinách rostoucích za normálních podmínek obvykle dochází k zastavení růstu a směřování toku energie do fáze kvetení či vytváření gamet. cZ- a DHZ-typ se jeví jako třetí a čtvrtý nejrozšířenější druh CKs v daném pořadí. Výskyt cZ jako minoritní složky CKs v rostlinách diskutovali např. Durand a Durand ve své studii z roku 1994 (Durand a Durand, 1994 v Veitch *et al.*, 2003). Tento typ CKs se vyskytoval ve vyšších koncentracích zejména v jarních a letních měsících, nicméně křivka tohoto typu s přihlédnutím na biosyntetickou dráhu CKs neodpovídá v průběhu celého roku nárůstům křivky tZ-typu, ze kterého by cZ-typ mohl vzniknout konverzí. To znamená, že jeho biosyntetická dráha je méně ovlivněna dráhou ostatních typů CKs a více ovlivněna jiným nespecifickým mechanismem. Koncentrační hladiny DHZ-typu byly v průběhu celého roku téměř konstantní, což zaprvé odpovídá jeho celkové roli při biosyntéze a metabolismu CKs, jelikož tento typ CKs nebývá dále reverzibilně využíván pro syntézu jiných typů CKs a za druhé to odpovídá i jeho větší stabilitě získané díky vyšší rezistenci vůči CKX oproti jiným typům CKs.

### **Změny koncentračních hladiny aktivních, translokačních a zásobních forem CKs v období od ledna 2019 do ledna 2020**

Jednoznačně převažující formou CKs byla v průběhu celého roku forma zásobní, do které se řadí *O*- a *N*-glykosylované metabolity CKs (červená a šedá křivka, Obr. 17). Glukokonjugáty jsou neaktivní formy CKs a pravděpodobně hrají roli v udržování homeostázy hormonů a zajišťování energetických rezerv pro rostliny. Jejich dominance, která je způsobena zejména metabolickou irreverzibilitou této formy CKs, byla již obecně prokázána u rostlin *A. thaliana* rostoucích za normálních podmínek (Osugi a Sakakibara, 2015 dle Kiba *et al.*, 2013 a Kamada-Nobusada *et al.*, 2013).

Naše rostliny vykazovaly vyšší koncentrace zejména *N*-glukosidů, což v rámci studií bývá obecně spojováno zejména s rezistencí těchto metabolitů vůči glukosidázám a taktéž s možnými detoxifikačními funkcemi souvisejících s *N*-glykosilacemi v rostlinách (Latham a Palni, 1983). Translokační a aktivní formy vykazovaly nespecifický kolísavý charakter po celý rok.

Koncentrační hladiny aktivních, translokačních a zásobních (inaktivovaných) forem CKs naměřené v období od ledna 2019 do ledna 2020



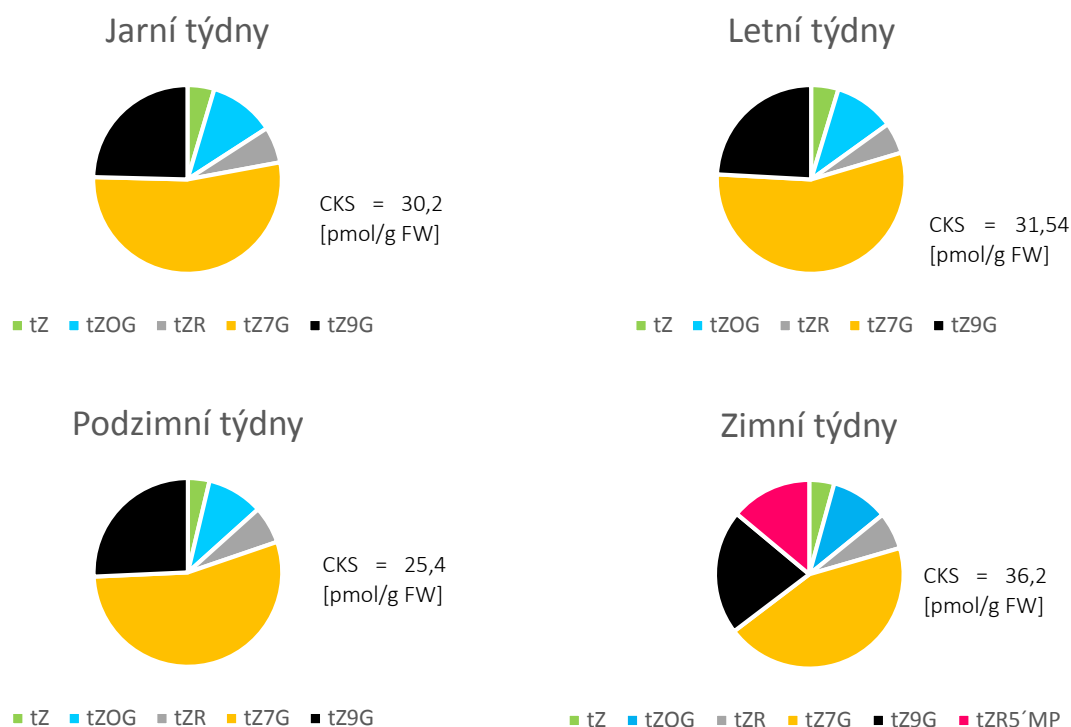
Obr. 17 Změny v koncentračních hladinách aktivních, translokačních a zásobních forem CKs v období od ledna 2019 do ledna 2020.

### Zastoupení CKs metabolitů v období od ledna 2019 do ledna 2020

Pro ucelení výskytu jednotlivých CKs metabolitů a znázornění jejich zastoupení v rámci jednotlivých ročních období byla četnost v následujících grafech vztažena na celkovou sumu daného typu CKs.

**tZ**-typ CKs byl zastoupen všemi metabolity, kromě tZROG, který nebyl detekován v žádném ročním období (Obr. 18). Výjimku tvořil také tZR5'MP, který byl detekován pouze v podzimních a zimních měsících, přičemž v podzimním období byl detekován pouze v 51. týdnu, tedy na přelomu ročních období (podzim/zima), a to o koncentraci 4,68 pmol/g FW. V průběhu celého roku nedocházelo k významným výkyvům zásobních forem CKs, tj. tZOG, tZ7G, tZ9G. Nejhojněji zastoupeným metabolitem byl tZ7G, který se pohyboval v průměrných koncentracích 16,2 pmol/g FW a který v jarních a letních týdnech dosahoval více než 50% podílu z celkových koncentrací všech detekovaných metabolitů tohoto typu. V podzimních týdnech ovšem došlo k významné redukci celkové sumy tZ-typu CKs na hodnotu zhruba 25,8 pmol/g FW.

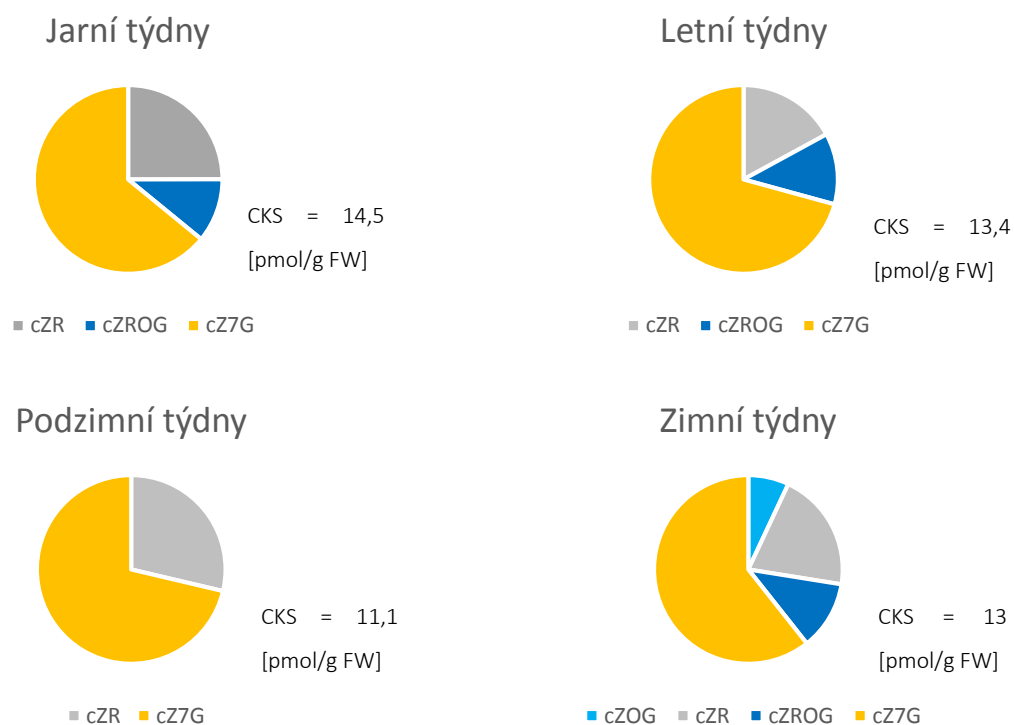




Obr. 18 Výšečové grafy podílů CKs metabolitů tZ-typu v jednotlivých ročních obdobích a celková koncentrační suma všech metabolitů v daném ročním období (CKS).

Nejhojněji se vyskytujícím CK **cZ**-typu byl po celou dobu **cZ7G** (Obr. 19). Jeho hladiny se pohybovaly od 7,885 pmol/g FW do 10,312 pmol/g FW. Druhým metabolitem vyskytujícím se ve všech týdnech roku byl **cZR**, jehož hladiny se pohybovaly kolem 3 pmol/g FW. Naproti tomu **cZOG** byl detekován pouze v zimním období, konkrétně v 6. - 9. týdnu roku 2019. Podobně byl na tom i další glykosidický konjugát **cZROG**. V jarních a letních týdnech se **cZROG** vyskytoval pouze nahodile. Jeho vyšší výskyt byl detekován až v zimních týdnech. Stejně jako v případě tZ-typu CKs došlo i u cZ-typu k redukcii v celkové sumě metabolitů v podzimních týdnech, kdy tato hodnota činila přibližně 11,1 pmol/g FW.

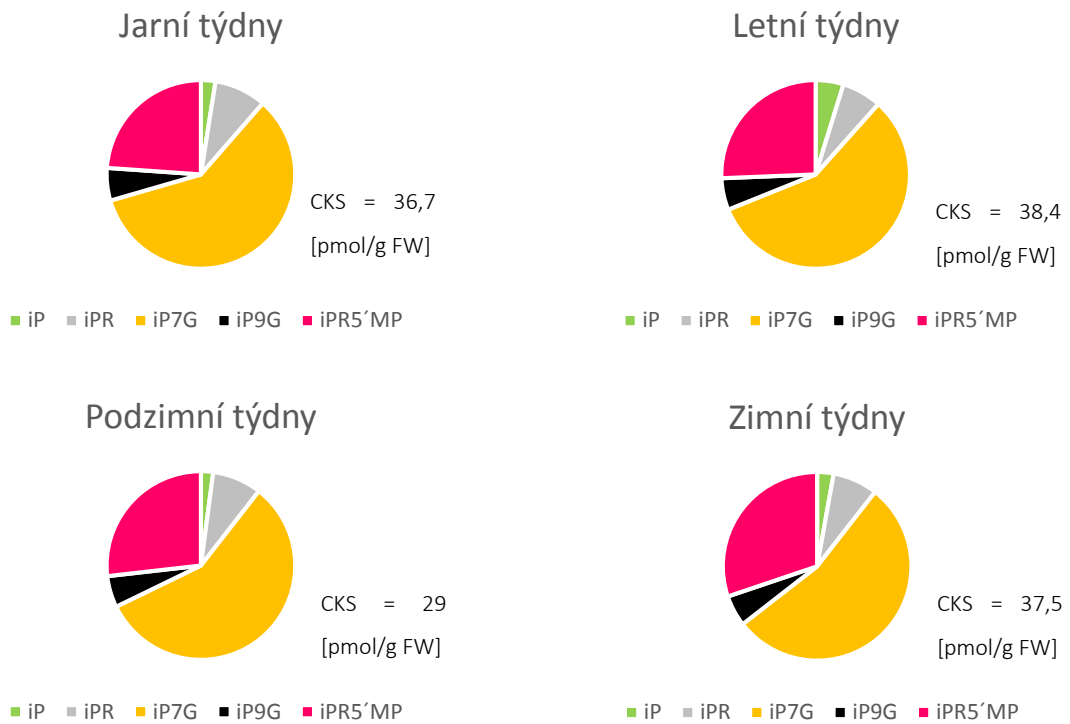
**iP**- typ CKs byl celkově nejdominantnějším typem CKs v námi pěstovaných rostlinách *A. thaliana*. Nejhojněji zastoupeným metabolitem iP-typu CKs byl **iP7G** (Obr. 20), tedy opět jeho zásobní forma. Na základě podílů jednotlivých metabolitů můžeme pozorovat určitou podobnost s metabolity tZ-typu, čemuž odpovídají i křivky těchto typů CKs na Obr. 16. Přítomnost **iPR5'MP** ve všech ročních obdobích souvisí s jeho centrální rolí v rámci biosyntézy CKs. Největší procentuální podíl tohoto metabolitu – 30 %, tj. přibližně 11,3 pmol/g FW se vyskytoval v zimních týdnech, což korespondovalo i s výskytem **tZR5'MP** v tomto období. Tato souvislost je s největší pravděpodobností



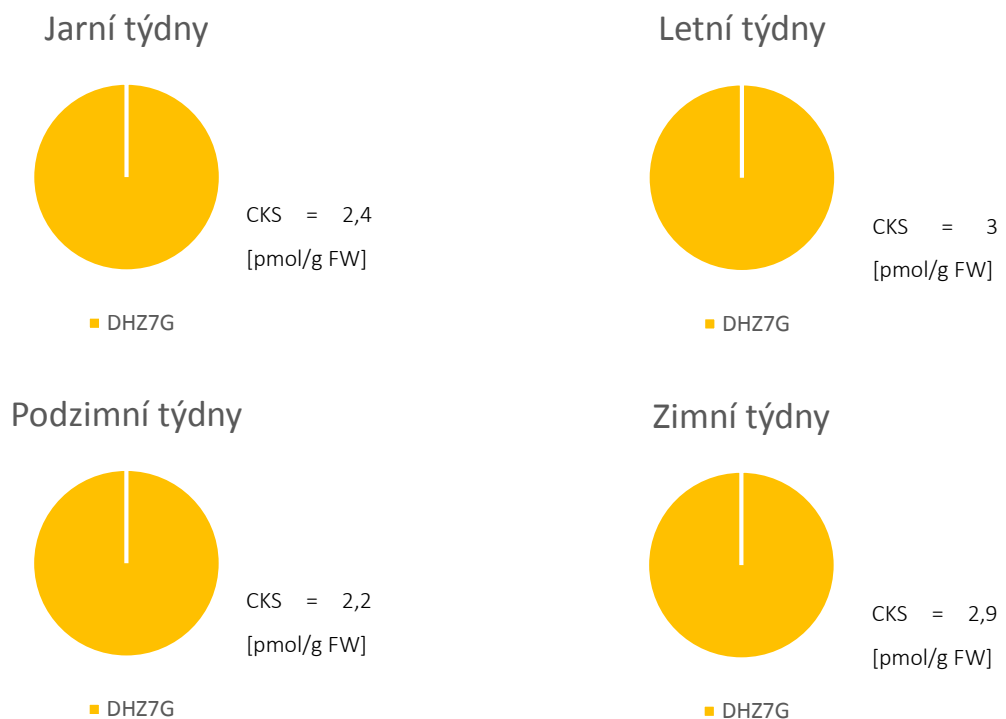
Obr. 19 Výšečové grafy podílů CKs metabolitů cZ-typu v jednotlivých ročních obdobích a celková koncentrační suma všech metabolitů v daném ročním období (CKS).

důsledkem navazujících kroků biosyntézy CKs, kdy z iPR5'MP vzniká prostřednictvím enzymu CYP735A metabolit tZR5'MP. V letních týdnech bylo naopak zaznamenáno zvýšení hladiny aktivní formy iP a to na koncentraci přibližně 1,8 pmol/g FW (5 %). To by mohlo být důsledkem např. indukce biogeneze chloroplastů v tomto ročním období (Lochmanová *et al.*, 2008).

**DHZ**-typ CKs nevykazoval žádné výrazné výkyvy v průběhu střídání ročních období a jeho průměrná koncentrační hladina činila 2,6 pmol/g FW (Obr. 21). Konstantní hladina tohoto typu byla zapříčiněna přítomností pouze jednoho metabolitu, konkrétně DHZ7G, který je zásobní formou CKs. Stejně jako u předešlých jednotlivých typů i zde můžeme pozorovat snížení celkové sumy koncentrační hladiny v průběhu podzimního období, avšak její pokles nebyl až tak významný a zřetelný jako u předešlých CKs typů.



Obr. 20 Výšečové grafy podílů CKs metabolitů iP-typu v jednotlivých ročních obdobích a celková koncentrační suma všech metabolitů v daném ročním období (CKS).



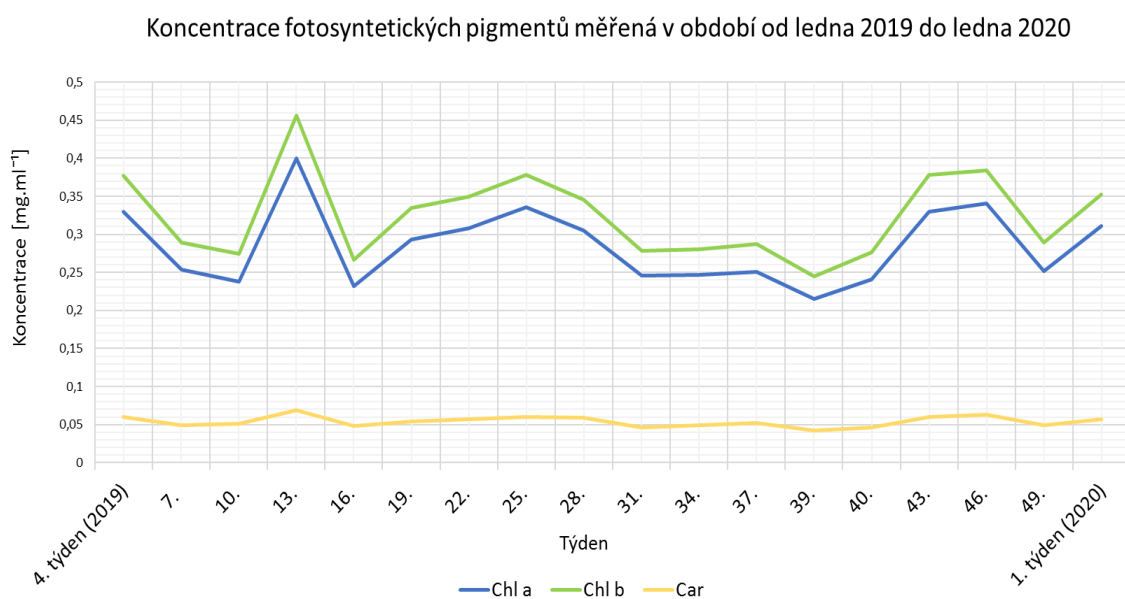
Obr. 21 Výšečové grafy podílů CKs metabolitů DHZ-typu v jednotlivých ročních obdobích a celková koncentrační suma všech metabolitů v daném ročním období (CKS).

## 4.2 Endogenní obsah chlorofylu

Námi získaný celkový obraz koncentrací **chl a**, **chl b** a **car** (Obr. 22) poukazuje na kolísavý charakter obsahu těchto pigmentů v rostlinách *A. thaliana* v průběhu celého roku. Jednotlivé křivky tří sledovaných pigmentů se ve svém vývoji (vzrůst a pokles hodnot) během roku kopírují. **Chlorofyl b** se v průběhu celého roku jevil jako pigment vyskytující se v nejvyšší koncentraci. Průměrná koncentrace chl b za celé měřené období byla 0,325 mg.ml<sup>-1</sup>. Nejméně a zároveň s nejmenšími výkyvy se v průběhu roku vyskytovaly **karotenoidy**. Jejich průměrná koncentrace za celé měřené období byla 0,054 mg.ml<sup>-1</sup>. Průměrná koncentrace **chl a** za celé měřené období činila 0,285 mg.ml<sup>-1</sup>.

Stabilní hladiny koncentrací měřených pigmentů se vyskytovaly v období jarních a letních měsíců, ovšem na podzim a v zimních měsících došlo k jejich kolísání. Trend vyskytující se v podzimních měsících odpovídá výsledkům práce Keskitala *et al.* z roku 2006, kteří studovali změny v koncentračních hladinách pigmentů a jejich degradaci v rámci podzimní senescence u volně rostoucí osiky (*Populus tremula*) (Keskitalo *et al.*, 2005).

Z těchto studií vyplývá, že v rámci podzimních měsíců dochází nejdříve k nárůstu koncentrací (září) a poté k postupnému snížení (konec září a říjen), které doprovází výraznější senescenční projevy, a zvýšená degradace pigmentů, což mohl být důsledek prvotního nárůstu a následného snížení koncentrací i v našem experimentu.



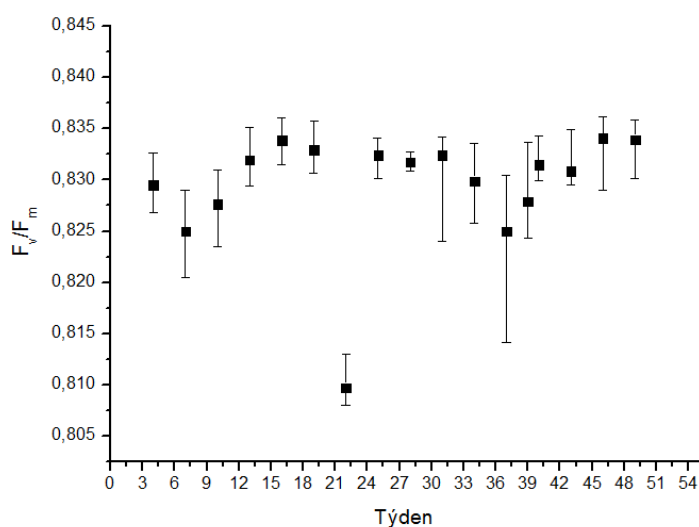
Obr. 22 Graf koncentrací měřených fotosyntetických pigmentů v období od ledna 2019 do ledna 2020.

Data získaná z našeho experimentu korelují jak s hodnotami CKs, tak i s daty popisující fotosyntetickou aktivitu v rostlinách (Obr. 22, 24). V období, kdy se vyskytoval větší obsah CKs a vyšší fotosyntetická aktivita byl zároveň detekován i vyšší obsah chl *a*, *b* a car a naopak. Tyto hodnoty byly potvrzeny na základě použití rozdílných metod měření fotosyntézy a obsahu pigmentů s využitím odlišné sady vzorků pěstovaných v odlišných Petriho miskách.

### 4.3 Fotosyntetická aktivita

V rámci našeho experimentu byly měřeny 4 parametry popisující fotosyntetickou aktivitu.

Parametr  $F_v/F_m$  - maximální kvantový výtěžek fotochemie PS II - dosahoval v průměru celého roku hodnot v rozmezí od 0,810 do 0,835, což vypovídá o dobrém stavu měřených rostlin. Nejnižší hodnota 0,810, která byla naměřena ve 22. týdnu se neobvykle lišila od celkového trendu naměřených hodnot, a to i přes použití zdravých rostlin. Ostatní parametry měření tohoto týdne navíc nevykazovaly žádné neobvyklé odchylky, a proto vysvětlení této redukce může být chybné nastavení programu měření tohoto parametru. Pokud bychom tuto hodnotu z celkového měření vyřadili, parametr  $F_v/F_m$  by dosahoval hodnot od 0,825 do 0,835, což svědčí o zdravé vitalitě rostlin pěstovaných ve fytotronu. Naopak v 37. týdnu je viditelná redukce a vyšší odchylka parametru  $F_v/F_m$ , která se objevila v důsledku výskytu plísně u vysazených rostlin. Potvrdilo se tak, že tento parametr je indikátor snížené funkce nebo poškození reakčních center rostlin. V den tohoto měření se proto vysadily nová semena a další měření bylo provedeno v 39. týdnu,

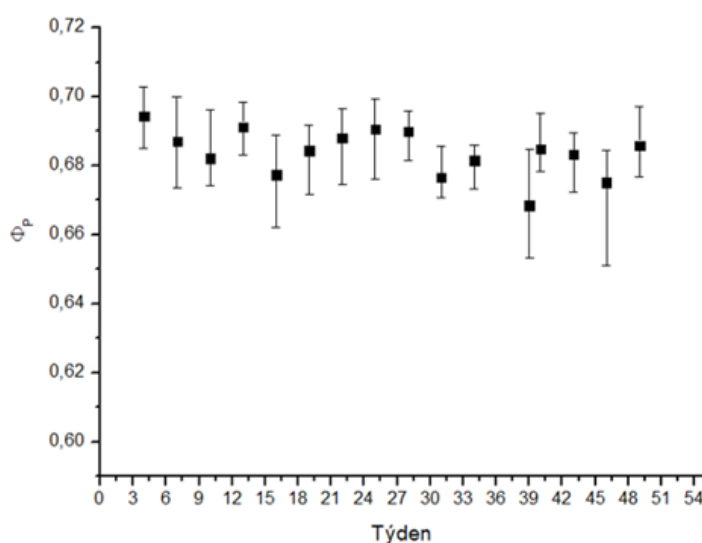


Obr. 23 Souhrn hodnot celoročního měření parametru  $F_v/F_m$ .

kde se již vyskytla vyšší hodnota s nižší odchylkou. Výsledky dalších parametrů a související grafy proto nebudou dále zohledňovat měření provedené v 37. týdnu roku.

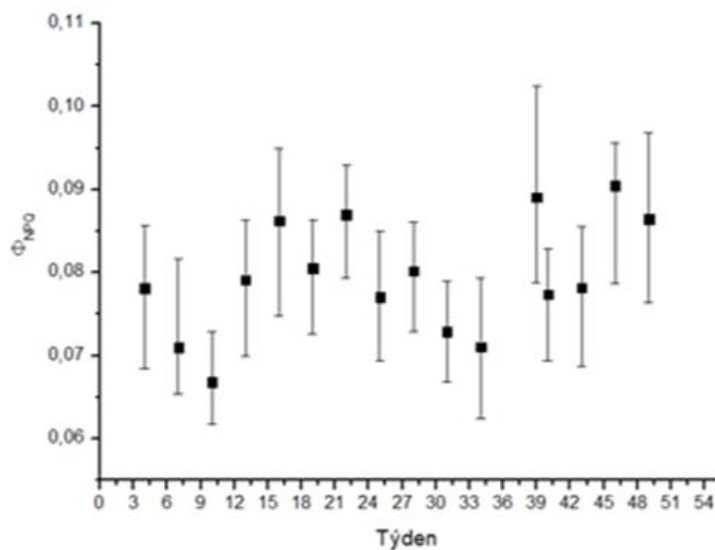
Dlouhodobý interval vyšších hodnot pro parametr  $F_v/F_m$  byl pozorován při měřeních od 16. do 31. týdne roku, což odpovídá jarním a letním měsícům, dále pak od 40. do 49. týdne, což odpovídá konci listopadu a počátku zimy. Nižší hodnoty byly naměřeny v 7. a 10. týdnu roku, poslední zimní týdny, a v 37. a 39. týdnu, což odpovídá konci léta a začátku podzimu.

Dalším měřeným parametrem byl  $\Phi_P$  – aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na světlo. Vyšší hodnoty tohoto parametru jsou viditelné zejména při měření provedených v zimním 4. a 7. týdnu roku a také v měřeních od 16. do 31. týdne roku, které odpovídají jarním měsícům a prvnímu letnímu měsíci. Tyto vyšší hodnoty parametru poukazují na větší aktivitu fotochemie reakčních center v rostlinných buňkách, naproti tomu nižší hodnoty se vyskytují zejména v měřeních, která byla provedena v druhé polovině roku, tedy od 31. do 39. týdne roku (září–prosinec), kdy byla pozorována menší fotochemie reakčních center, a tudíž menší fotosyntetická aktivita.



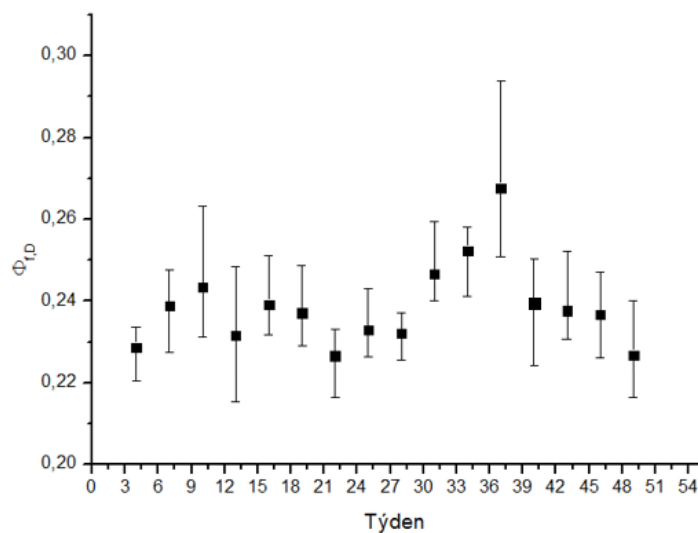
Obr. 24 Souhrn hodnot celoročního měření parametru  $\Phi_P$ .

Pro kvantový výtěžek světlem indukovaného nefotochemického zhášení chlorofylu ve stavu adaptovaném na světlo -  $\Phi_{NPQ}$  bylo objeveno snížení od 4. do 10. týdne a od 31. týdne do 34. týdne roku. Snížení v první i v druhé polovině roku korespondovalo se zvýšením bazálního nefotochemického zhášení -  $\Phi_{f,D}$ . V těchto týdnech také docházelo ke snížení parametru  $F_v/F_m$ . Vyšší hodnoty NPQ jsou vidět zejména ke konci roku, kdy došlo ke snížení fotosyntetické aktivity.



Obr. 25 Souhrn hodnot celoročního měření parametru  $\Phi_{NPQ}$ .

Parametr  $\Phi_{f,D}$  - kvantový výtěžek bazálního nefotochemického zhášení chlorofylu, fluorescence během aktinické iluminace – svými hodnotami doplňuje rozdělení absorbované energie PSII tak, že konečný součet hodnot parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{NPQ}$ , a  $\Phi_{f,D}$  činí 1.



Obr. 26 Souhrn hodnot celoročního měření parametru  $\Phi_{f,D}$ .

## 5 ZÁVĚR

*A. thaliana* se řadí mezi ozimé rostliny, které při klasickém pěstování zpravidla na podzim vyklíčí, přezimují ve vegetativním stavu a na jaře pokračují v růstu, vykvetou, vytvoří semena a uhynou.

Za předpokladu, že optimální načasování růstových mechanismů rostlinných buněk je svázáno mimo jiné s tzv. epigenetickou pamětí (Chouard, 1960), jejíž příkladem může být vernalizace - proces, kdy působení chladu na plně napučené semeno rostliny anebo rostoucí rostlinu synchronizuje dobu kvetení (Iwasaki a Paszkowski, 2014) – by se mělo rychlejší a větší nabytí rostlinné hmoty spojené s větším obsahem CKs, inhibicí redukce chlorofylu a tedy i větší fotosyntetickou kapacitou (Kao, 1980; Jordi et al., 2000) projevit zejména v jarních a letních měsících (Mitrichenko et al., 1997; Gratani et al., 1998). V podzimních a zimních měsících by tak mělo docházet spíše k regresi těchto elementů.

Pokud však byly rostliny pěstovány za konstantní teploty, intenzity světla a vlhkosti jako v našem experimentu, na naměřených parametrech by se sezónnost těchto rostlin neměla projevit vůbec nebo by se měla projevit pouze ve velmi redukované míře. V opačném případě by se mohlo jednat o důsledek evolučně vyvinutého mechanismu, který by byl v rostlině velmi konzervativní a který by zachovával jisté vzorce chování ignorující tyto vnější podmínky. Tento mechanismus by se mohl opírat nejenom o epigenetickou paměť, ale také i o reakci rostliny na přítomnost etylenu ve vzduchu nebo efekt magnetického a gravitačního pole a vliv sklonu osy během ekliptického pohybu kolem Slunce.

Výsledky z naší studie prokázaly, že v průběhu odlišných ročních období rostliny pěstované i za takto specifických podmínek opravdu neobsahují stále stejné hladiny koncentrací CKs a pigmentů a stejně tak se i liší jejich průběžná fotosyntetická aktivita a vitalita. V jarních a letních měsících byly detekovány vyšší hladiny CKs, menší výkyvy v obsahu pigmentů, vyšší fotosyntetická aktivita a vitalita rostlin, zatímco zejména na podzim docházelo ke snížení obsahu CKs, pigmentů, fotosyntetické aktivity a vitality. Vzhledem k tomu, že tyto data odpovídají klasické reakci rostlin na obvyklé změny podmínek v roce, může se jednat o důsledek výše zmíněného mechanismu. Nesmíme však opomenout i možnost, že rostliny mohly pouze reagovat na změny tlaku ve fytokomoře, či na jiné nepatrné změny vnějších podmínek. Optimální doba pro vysazování semen do fytokomor dle získaných dat je tedy zejména v první polovině roku.



## 6 LITERATURA

- 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**(19), 5994–5998.
- Antoniadi I., Plačková L., Simonovik B., Doležal K., Turnbull C., Ljung K., Novák O. (2015): Cell-type specific cytokinin distribution within the *Arabidopsis* primary root apex. *Plant Cell* **27**(7), 1955–67.
- Ardrey B. (2003): *Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction*. 1st ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 300.
- Armstrong D.J. (1994): Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. (Mok D.W.S, Mok M.C., eds.), CRC Press, Florida, 139–54.
- Åstot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G. (1998): Precolumn derivatisation and capillary liquid chromatographic/frit-fast atom bombardment mass spectrometry analysis of cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Mass Spectrometry* **33**, 892–902.
- Baker N.R. (2008): Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* **59**(1), 89–113.
- Balazadeh S., Schildhauer J., Araujo W.L., Munne-Bosch S., Fernie A.R., Proost S., Humbeck K., Mueller-Roeber B. (2014): Reversal of senescence by N resupply to N-starved *Arabidopsis thaliana*: transcriptomic and metabolomic consequences. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3975–3992
- Barciszewski J., Mielcarek M., Stobiecki M., Siboska G.E., Clark B.F.C. (2000): Identification of 6-Furfuryladenine (Kinetin) in Human Urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 69–73.
- Barciszewski J., Siboska G.E., Pedersen B.O., Clark B.F., Rattan S.I. (1996): Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Letters* **393**, 197–200.
- Baroja-Fernández E., Aguirreolea J., Martínková H., Hanuš J., Strnad M. (2002): Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 217–224.
- 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**(15), 4776–4780.
- Bassil N.V., Mok D., 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.
- Bayliss W, Starling E. (1902): The mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of Physiology* **28**, 325–52.
- Bielecki R.L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**(4), 431–442.
- Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O. (2001): Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* **125**, 378–386.
- Boonman A., Pons T.L. (2007): Canopy Light Gradient Perception by Cytokinin. *Plant Signaling & Behavior* **2**(6), 489–491.
- Brain K.R., Chalopin M.C., Turner T.D., Blunden G., Wiwgoose P.B. (1973): Cytokinin activity of commercial aqueous seaweed extract. *Plant Science Letters* **1**, 241–245.
- Brandon D.L., Corse J., Higaki P.C., Zavala M.E. (1992): Monoclonal antibodies for analysis of cytokinin-O-glucosides in response to cold stress. In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. (Kamínek M., Mok D.W.S., Zažimalová E, eds), SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 447–453.
- Brownlee B.G., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N6-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37–41.
- Buchanan-Wollaston V. (1997): The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**, 181–99.

- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. (2003): The molecular analysis of leaf senescence—a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 3–22.
- Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J. (2005): Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **42**, 567–585.
- Butler W.L. (1978): Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **29**(1), 345–378.
- Clark L.C., Lyons C. (1962): Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**(1), 29–45.
- Criado M.V., Caputo C., Roberts I.N., Castro M.A., Barneix A.J. (2009): Cytokinin-induced changes of nitrogen remobilization and chloroplast ultrastructure in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* **166**, 1775–178.
- Davies P.J. (2010): The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: *Plant Hormones*. (Davies P.J. ed), Springer, Dordrecht, 1-15.
- Dello iolo 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.
- Dewitte W., Chiapetta A., Azmi A., Witters E., Strnad M., Rembur J., Noin M., Chriqui D., Van Onckelen H. (1999): Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology* **119**, 111-121.
- Dobrev P., 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**(1-2), 21–29.
- Doležal K., Popa I., Hauserová E., Spíchal L., Chakrabaty K., Novák O., Kryštof V., Voller J., Holub J., Strnad M. (2007): Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 3737-3747.
- Doležal K. (2013): *Cytokininy a jejich deriváty – identifikace, kvantifikace a vztahy mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou*. Disertační práce, ÚEB AVČR, Olomouc, Česká republika.
- Doležal K., Ástot C., Hanuš J., Holub J., Peters W., Beck E., Sandberg G., Strnad M. (2002): Identification of aromatic cytokinins in suspension cultured photoautotrophic cells of *Chenopodium rubrum* by capillary liquid chromatography/frit - fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Growth Regulation* **36**, 181.
- Drda T. (2018): *Návrh osvětlovací soustavy umělého osvětlení pro pěstování rostlin ve skleníku*. Diplomová práce, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Ostrava, Česká republika.
- Du F., Ruan G., Liu H.: Analytical and Bioanalytical Chemistry **403**, 55, 2012a. In: Doležal K. (2013): *Cytokininy a jejich deriváty – identifikace, kvantifikace a vztahy mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou*. Disertační práce, ÚEB AVČR, Olomouc, Česká republika.
- Durand R., Durand B. (1994): Cytokinins and reproductive organogenesis in *Mercurialis*. In: Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M.C (2003): O-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374-1380.
- Eldlund E., Novák O., Karady M., Ljung K., Jansson S. (2017): Contrasting patterns of cytokinins between years in senescing aspen leaves. *Plant, Cell & Environment* **40**(5), 622–634.
- Emery R.J.N., Lepoint L., Barton J.E., Turner N.C., Atkins C.A. (1998): *cis*-Isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiology* **117**, 1515–23.
- Emery R.J.N., Lepoint L., Barton J.E., Turner N.C., Atkins C.A. (1998): *Cis*-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiology* **117**, 1515–1523.
- Entsch B., Parker C.W., Letham D.S. (1983): An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375–381.
- Faiss M., Zalubilová J., Strnad M., Schmülling T. (1997): Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *The Plant Journal* **12**(2), 401–415.

- Francis D., Sorrell D.A. (2001): The interface between the cell cycle and plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* **33**, 1–12.
- Gaastra P. (1959): *Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature, and stomatal diffusion resistance*. Ph.D. thesis, Wageningen University, Veenman, Netherlands.
- Gan S. (2003): Mitotic and post-mitotic senescence in plants. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. (Davies P.J. ed.), Kluwer Academic, Dordrecht, 95–114.
- Gan S., Amasino R.M. (1995): Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science* **270**, 1986–1988.
- Ge L., Tan S., Yong J.W.H., Tan S.N. (2006): CE for cytokinin analyses: A review. *Electrophoresis* **27**(23), 4779–4791.
- Ge L., Tan S.N., Yong J.W.H., Hua L., Ong E.S. (2008): Separation of cytokinin isomers with a partial filling-micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry approach. *ELECTROPHORESIS* **29**(10), 2024–2032.
- Ge L., Yong J.W.H., Goh N.K., Chia L.S., Tan, S.N., Ong E.S. (2005): Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **829**(1-2), 26–34.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. (1989): The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **990**(1), 87–92.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002): Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**, 161–169.
- Gratani L., Pesoli P., Crescente M.F. (1998): Relationship between Photosynthetic Activity and Chlorophyll Content in an Isolated *Quercus Ilex* L. Tree during the Year. *Photosynthetica* **35**(3), 445–451.
- Hage D.S. (1999): Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical Chemistry* **45**, 593–615.
- Hahn H., Bopp M. (1968): A cytokinin test with high specificity. *Planta* **83**, 115–118.
- Hancu G., Simon B., Rusu A., Mircia E., Gyéresi Á. (2013): Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (3)1, 1-8.
- Harbinson J., Genty B., Baker N.R. (1989): Relationship between the quantum efficiencies of photosystems I and II in pea leaves. *Plant Physiology* **90**, 1029-34.
- Hauserová E., Swaczynová J., Doležal K., Lenobel R., Popa I., Hajdúch M., Vydra D., Fuksová K., Strnad, M. (2005): Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *Journal of Chromatography A* **1100**, 116–125.
- He Y., Gan S. (2003): Molecular characteristics of leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **1**, 1-17.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S. (2001): Networking senescence regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology* **126**, 707-716.
- Hecht S., Eisenreich W., Adam P., Amslinger S., Kis K., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F. (2001): Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14837–14842.
- Hemerly A.S., Ferreira P.C.G., Engier de A.J., Montagu V.M., Engier G., Inzd D. (1993): Cdc2a
- Hendry N.S., Van Staden, J., Allan P. (1982): Cytokinins in citrus. I. Fluctuations in the leaves during seasonal and developmental changes. *Scientia Horticulturae* **16**(1), 9–16.
- Hensel L.L., Grbić V., Baumgarten D. A., Bleecker A. B. (1993): Developmental and Age-Related Processes That Influence the Longevity and Senescence of Photosynthetic Tissues in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* **5**(5), 553–564.
- Hill D.W., Powell T. (1968): Non-dispersive infrared gas analysis in science, medicine and industry. London: Adam Hilger Ltd.
- Hill K., Mathews D.E., Kim H.J., Street I.H., Wildes S.L., Chiang Y.H., Mason M.G., Alonso J.M., Ecker J.R., Kieber J.J., Schaller G.E. (2013): Functional characterization of type-B response regulators in the *Arabidopsis* cytokinin response. *Plant Physiology* **162**, 212–224.

- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008): Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**, 75–83.
- 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.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006): Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**(11), 1151–1159.
- Hussain A., Hasnain S. (2009): Cytokinin production by some bacteria: Its impact on cell division in cucumber cotyledons. *African Journal of Microbiology Research* **3**(11), 704–712.
- Hwang I., Sakakibara H. (2006): Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiologia Plantarum* **126**(4), 528–538.
- Chang L., Ramireddy E., Schmülling T. (2015): Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **66**(15), 4759–4768.
- Chen C.M. (1997): Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiologia Plantarum* **101**, 665–673.
- Chen C.M., Petschow B. (1978): Metabolism of cytokinin: Ribosylation of cytokinin bases by adenosin phosphorylase from wheat germ. *Plant Physiology* **62**, 871–874.
- Chen, C.M., Kristopeit, S.M. (1981): Metabolism of Cytokinin: Deribosylation of Cytokinin Ribonucleoside by Adenosine Nucleosidase from Wheat Germ Cells. *PLANT PHYSIOLOGY* **68**(5), 1020–1023.
- Chen C.M., Leisner S.M. (1984): Modification of Cytokinins by Cauliflower Microsomal Enzymes. *Plant physiology* **75**, 442–446.
- Cheng Z.J., Wang L., Sun W., Zhang Y., Zhou C., Su Y.H., Li W., Sun T.T, Zhao X.Y., Li X.G., Cheng Y., Zhao Y., Xie Q., Zhang X.S. (2012): Pattern of Auxin and Cytokinin Responses for Shoot Meristem Induction Results from the Regulation of Cytokinin Biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *PLANT PHYSIOLOGY* **161**(1), 240–251.
- Chickarmane V.S., Gordon S.P., Tarr P.T., Heisler M.G., Meyerowitz E.M. (2012): Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(10), 4002–4007.
- Iwasaki M., Paszkowski J. (2014): Epigenetic memory in plants. *The EMBO Journal* **33**(18), 1987–1998.
- Jablonski A. (1933): Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* **131**(3319), 839–840.
- Jordi W., Schapendonk A., Davelaar E., Stoopen G.M., de Visser C.S.P.R., van Rhijn J.A., Gan S., Amasino R.M. (2000): Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12–IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environment* **23**, 279–289.
- Journal* **30**, 95–106.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677–685.
- Kamínek M. (1992): Progress in cytokinin research. *Trends in Biotechnology* **10**, 159–164.
- Kao C.H. (1980): Senescence of rice leaves IV. Influence of benzyladenine on chlorophyll degradation. *Plant and Cell Physiology* **21**, 1255–1262.
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004): Distinct Isoprenoid Origins of *cis*- and *trans*-Zeatin Biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(14), 14049–14054.
- Kamada-Nobusada T., Makita N., Kojima M., Sakakibara H. (2013): Nitrogen-dependent regulation of de novo cytokinin biosynthesis in rice: the role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant Cell Physiology* **127**, 1881–93.
- Kerstetter R.A., Hake S. (1997): Shoot meristem formation in vegetative development. *The Plant Cell* **9**, 1001–1010.
- Kerstetter R.A., Vollbrecht E., Lowe B., Veit B., Yamaguchi J., Hake S. (1994): Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1 like homeobox genes into two classes. *The Plant Cell* **6**, 1877–1887.

- Keskitalo J., Bergquist G., Gardeström P., Jansson S. (2005): A Cellular Timetable of Autumn Senescence. *PLANT PHYSIOLOGY* **139**(4), 1635–1648.
- Kiba T., Takei K., Kojima M., Sakakibara H. (2013): Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in Arabidopsis. *Developmental Cell* **27**, 452–61.
- Kieber J.J., Schaller G.E. (2014): Cytokinins. In *The Arabidopsis book. American Society of Plant Biologists*, 12.
- Knapp D.R. (1979): *Handbook of analytical derivatization reactions*. Wiley, One Wiley Drive, Somerset, 741 stran. In *Journal of Pharmaceutical Sciences* **69**(5), 619.
- Kopečná M., Blaschke H., Kopečný D., Vigouroux A., Končítiková R., Novák O., Kotland O., Strnad M., Moréra S., von Schwartzberg K. (2013): Structure and Function of Nucleoside Hydrolases from *Physcomitrella patens* and Maize Catalyzing the Hydrolysis of Purine, Pyrimidine, and Cytokinin Ribosides. *PLANT PHYSIOLOGY* **163**(4), 1568–1583.
- Krall L., Raschke M., Zenk M.H., Baron C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters* **527**, 315–318.
- Krishnamurthy K.V. (2015): The Cytokinins. In: *Growth and development in plants*. (Anantanarayanan R. ed.), Scientific Publishers, India, 44-45.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010): Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 53–60.
- Kunikowska A., Byczkowska A., Doniak M., Kaźmierczak A. (2013): Cytokinins résumé: their signaling and role in programmed cell death in plants. *Plant Cell Reports* **32**(6), 771–780.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445** (7128), 652–655.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009): Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**(10), 3152–3169.
- Kutz A., Muller A., Hennig P., Kaiser W.M., Piotrowski M., Weiler E.W. (2002): A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **14**, 131–147.
- Lazar D. (2015): Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* **175**, 131–147.
- Letham D.S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569–73.
- Letham D.S., Palni L.M. S. (1983): The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **34**(1), 163–197.
- Li R., Sosa J.L., Zavala M.E. (2000): Accumulation of zeatin O-glycosyltransferase in *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays* following cold treatment. *The Journal of Plant Growth Regulation* **2**(2), 295-305.
- Li X., Mo X., Shou H., Wu P. (2006): Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiology* **47**, 1112–1123.
- Lichtenthaler H.K. (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **50**, 47– 65.
- Lindsey K. (2002): Peptides: new signalling molecules in plants. *Trends in Plant Science* **7**(2), 78–83.
- Lipavská H., Mašková P., Vojvodová P. (2011): Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase cdc25 induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis. *Annals of Botany* **107**, 1071-1086.
- Ljung K., Sandberg G., Moritz T.: Methods of plant hormone analysis. In: Davies P.J., editor. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, NL. pp. 671 – 694, 2004.
- Lochmanová G., Zdráhal Z., Konečná H., Koukalová S., Malbeck J., Souček P., Valková M., Kiran N.S., Brzobohatý B. (2008): Cytokinin-induced photomorphogenesis in dark-grown *Arabidopsis*: a proteomic analysis, *Journal of Experimental Botany* **59**, 3705–3719.

- Long S.P., Farage P.K., Garcia R.L. (1996): Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in the field. *Journal of Experimental Botany* **47**(11), 1629–1642.
- López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M.F., Simpson J., Herrera-Estrella L. (2002): Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* **129**, 244–256.
- Lorenzi R., Horgan R., Wareing P.F. (1975): Cytokinins in *Picea sitchensis* Carriere Identification and relation to growth. *Biochem. Physiol. Pflanz* **168**, 333–339.
- 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.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W.S. (1999): Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(1), 284–289.
- Mason M.G., Mathews D.E., Argyros D.A., Maxwell B.B., Kieber J.J., Alonso J.M., Ecker J.R., Schaller G.E. (2005): Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 3007–3018.
- McGaw B.A., Horgan R. (1983): Cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels and *Vinca rosea* crown-gall tissue. *Planta* **159**, 30–37.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1329–34.
- Mishke I.V. (1988): Mikrobnye fitogormony v rastenievodstve (Microbial Phytohormones in Plant Cultivation), Riga: Zinatne, 1988. In: Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. (2006): Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42**(2), 117–126.
- Mitrichenko A.N., Farkhutdinov R.G., Teplova I.P., Veselov S.Y., Kudoyarova G.R. (1997): The Effects of Temperature on Cytokinin Levels in Shoots and Roots of Wheat Seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, **45**(3), 402–404.
- 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**, 128–38.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16598–16603.
- Mok D.W., Mok M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**, 89–118.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (1994): Cytokinin and plant development-An overview. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity and function*. (D.W.S. Mok, M.C. Mok eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 155–166.
- Moubayidin L., Perilli S., Dello Iorio R., Di Mambro R., Costantino P., Sabatini S. (2010): The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current Biology* **20**, 1138–1143.
- Noodén L.D. (1988): Whole plant senescence. In: *Senescence and aging in plants*. (Noodén L.D., Leopold A.C. eds.), Academic Press Inc, 391–439.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowská D., Norbaek R., Åstot C., Doležal K., Sandberg G. (2004): Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**(21), 8039–8044.
- 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.
- Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003): Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–singlequadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **480**, 207–218.
- Novotná R., Šilha T., Trávníček Z., Spektrální metody studia chemických látek, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2011, [online], dostupné z: [http://agch.upol.cz/userfiles/file/Spektralni\\_metody.pdf](http://agch.upol.cz/userfiles/file/Spektralni_metody.pdf)

- Ogawa D., Abe K., Miyao A., Kojima M., Sakakibara H., Mizutani M., Morita H., Toda Y., Hobo T., Sato Y., Hattori T., Hirochika H., Takeda S. (2011): RSS1 regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice. *Nature Communications* **2**, 278.
- Osugi A., Sakakibara H. (2015): How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biology*, **13**, 1-10.
- Pandey R., Paul V., Singh M.P. (2017): Measurement of Photosynthesis using Infrared Gas Analyzer. *Academia*, 19-22
- Plačková L., Okleštková J., Pospíšková K., Poláková K., Buček J., Stýskala J., Zatloukal M., Šafařík I., Zbořil R., Strnad M., Doležal K., Novák O. (2017): Microscale magnetic microparticle-based immunopurification of cytokinins from *Arabidopsis* root apex. *Plant Journal* **89**, 1065-1075, 2017.
- Prinsen E., Redig P., Van Dongen W., Esmans E.L., Van Onckelen H.A. (1995): Quantitative-analysis of cytokinins by electrospray tandem mass-spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **9**, 948–953.
- Prinsen E., Van Dongen W., Esmans E.L., Van Onckelen H.A. (1998): Micro and capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. *Journal of Chromatography A* **826**(1), 25-37.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998): *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, Česká republika, 484 stran.
- Procházka S., Šebánek J. a kol. (1997): *Regulátory rostlinného růstu*. Academia, Praha, Česká republika, 395 stran.
- Raman N., Elumalai S. (1996): Presence of cytokinin in the root nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Indian Journal of Experimental Biology* **34**, 577–580.
- Riefler M., Novák 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.
- Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqmar A., Murray J.A.H. (1999): Cytokinin Activation of *Arabidopsis* Cell Division Through a D-Type Cyclin. *Science* **283**(5407), 1541–1544.
- Rohmer M. (1999): The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* **16**, 565–574.
- Sakakibara H. (2004): Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. (Davies P.J. ed.), Kluwer Academic, Dordrecht, 95–114.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 9972–9977.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431–449.
- Scofield S., Dewitte W., Nieuwland J., Murray J.A.H. (2013): The *Arabidopsis* homeobox gene SHOOT MERISTEMLESS has cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. *The Plant Journal* **75**(1), 53–66.
- Selyakh I.O., Semenov L.R. (2000): Problems of Ecology and Physiology of Microorganisms. To the Centenary of Prof. E.E. Uspenskii. In: Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., A.I. Netrusov (2006): Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42**, 117–126.
- Schmitz R.Y., Skoog F., Playtis A.J., Leonard N.J. (1972): Cytokinins: Synthesis and Biological Activity of Geometric and Position Isomers of Zeatin. *PLANT PHYSIOLOGY* **50**(6), 702–705.
- Schmülling T. (2004): Cytokinin. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. (Lennarz W., Lane M.D., eds.), Academic Press/Elsevier Science.
- Singh S., Letham D.S., Palni L.M.S. (1992): Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiologia Plantarum* **86**, 388–397.

- Skoog F., Miller C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118–131.
- Skoog, F., Armstrong D.J. (1970): Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* **21**(1), 359–384.
- Soni R., Carmichael J.P., Shah Z.H., Murray J.A.H. (1995): A Family of Cyclin D Homologs from Plants Differentially Controlled by Growth Regulators and Containing the Conserved Retinoblastoma Protein Interaction Motif. *The Plant Cell* **7**(1), 85–103.
- Sowerby J., Boswell J.T., Lankester P., Salter J.W., de C Sowerby J., Sowerby J.E. (1864): English botany, or coloured figures of British plants. 3 rd ed., R. Hardwicke, London.
- Spieß L.D. (1975): Comparative activity of isomers of zeatin and ribosyl zeatin on *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiology* **55**, 583-585.
- Spíchal L. (2012): Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**(4), 267.
- Spíchal L., Kryštof V., Paprskářová M., Lenobel R., Stýskala J., Binarová P., Cenklová V., De Veylder L., Inzé D., Kontopidis G., Fischer P.M., Schmülling T., Strnad M. (2007): Classical Anticytokinins Do Not Interact with Cytokinin Receptors but Inhibit Cyclin-dependent Kinases. *Journal of Biological Chemistry* **282**(19), 14356–14363.
- Spíchal L., Werner T., Popa I., Riefler M., Schmülling T., Strnad M. (2008): The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. *FEBS Journal* **276**(1), 244–253.
- Sun J., Niu Q.-W., Tarkowski P., Zheng B., Tarkowská D., Sandberg G., Chua N.-H., Zuo J. (2003): The Arabidopsis AtIPT8/PGA22 Gene Encodes an Isopentenyl Transferase That Is Involved in De Novo Cytokinin Biosynthesis. *Plant Physiology* **131**(1), 167–176.
- 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**(1), 17.
- Šesták Z. (1977): Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. I. Chlorophylls. *Photosynthetica* **11**, 367-448.
- Šesták Z., Čatský J., Jarvis P.G. (1971): Plant photosynthetic production. In: *Manual of methods*. (Šesták Z., Čatský J., Jarvis P.G., eds.), The Hague, Dr.W. Junk. 818.
- Takagi M., Yokota T., Murofushi N., Ota Y., Takahashi N. (1985): Fluctuation of endogenous cytokinin contents in rice during its life cycle—quantification of cytokinins by selected ion monitoring using deuterium-labelled internal standards. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 3271-3277.
- 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**(6), 1028–1036.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Åstot C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in Arabidopsis thaliana and Populus x canadensis leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* **117**(4), 579–590.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004): Analytické metody studia cytokininů. *Chemické Listy* **98**: 834–841.
- Tarkowski P., Ge L., Yong J.W.H., Tan S.N. (2009): Analytical methods for cytokinins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**(3), 323–335.
- Tarkowski P., Ge L., Yong, J.W.H., Tan, S.N. (2009): Analytical methods for cytokinins. *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 323-335.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545–547.
- Tibbitts T.W. (1979): Humidity and Plants. *BioScience* **29**(6), 358-363.
- Tromp J., Ovaas, J.C. (1990): Seasonal changes in the cytokinin composition of xylem Sap of apple. *Journal of Plant Physiology* **136**, 606–610.



- Tsavkelova E.A., Klimova S.Y., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. (2006): Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42**(2), 117–126.
- Turner J.E., Mok D.W.S., Mok M.C., Shaw G. (1987): Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of Zeatin-O-xyloside in *Phaseolus vulgaris* embryos. - Proceedings of the National Academy of Sciences USA **84**, 3714–3717.
- van Staden J., Zažímalová E., George E.F. (2008): Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: *Plant propagation by tissue culture 3*. (George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J., eds), Springer, The Netherlands, 205–226.
- Vanstraelen M., Benková E. (2012): Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**(1), 463–487.
- Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M.C (2003): O-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374–1380.
- Vyroubalová S., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009): Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiology* **151**, 433–447.
- Walker B.J., Busch F.A., Driever S.M., Kromdijk J., Lawson T. (2018): Survey of Tools for Measuring In Vivo Photosynthesis. *Photosynthesis* 3–24.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling 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.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (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 Y.Y., Yamaguchi I., Kato Y., Weiler E.W., Murofushi N., Takahashi N. (1993): Qualitative and Semiquantitative Analyses of Cytokinins Using Lc Apci-Ms in Combination with Elisa. *Journal of Plant Growth Regulation* **12**(1), 21–25.
- Yonova P. (2010): Design, synthesis and properties of synthetic cytokinins. *General and Applied Plant Physiology* **36**, 124–147.
- Zavaleta-Mancera H.A., Thomas B.J., Thomas H., Scott I.M. (1999): Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1683–1689.
- Zažímalová E., Kamínek M., Březinová A., Motyka V. (1999): Control of cytokinin biosynthesis and metabolism. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* **33**. (Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R., eds.), Elsevier, Amsterdam, 141.
- Zhang W., Swarup R., Bennett M., Schaller G.E., Kieber J.J. (2013): Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the Arabidopsis root apical meristem. *Current Biology* **23**, 1979–1989.
- Zhang W., To J.P., Cheng C.Y., Eric Schaller G., Kieber J.J. (2011): Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through the post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *The Plant Journal* **68**, 1–10.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosindifosfát
AHK	histidinkinázový receptor ( <i>Arabidopsis</i> histidine kinase receptor)
AMP	adenosinmonofosfát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
<i>AtIPT</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> isopentenyltransferázový gen
BAP	6-benzylaminopurin
BHT	butylhydroxytoluen
C18	oktadecylová fáze vázaná na nosiči
Car	karotenoid
CDK(s)	cyklin-dependentní kináza(y)
CE	kapilární elektroforéza
CK(s)	cytokinin(y)
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
CRE1	receptor cytokininové odpovědi 1 (cytokinin response 1 receptor)
CPPU	<i>N</i> -(2-Chloro-4-pyridyl)- <i>N'</i> -phenylurea
CYP735A	cytochromová P450 monooxygenáza
<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
CZE	kapilární zónová elektroforéza
<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
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

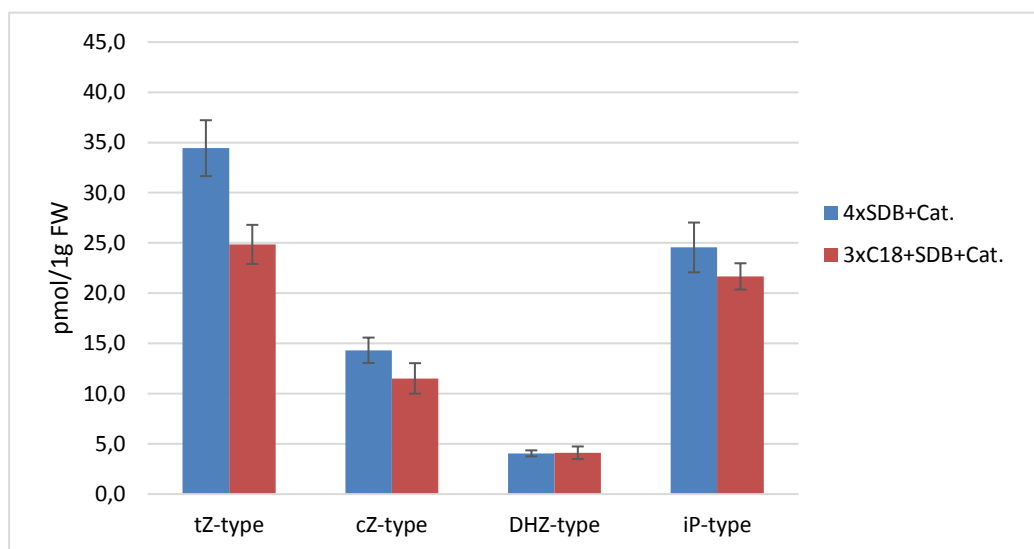
DHZROG	dihydrozeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMAPP	dimetylallylpyrofosfát
DTT	ditiotritol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem
F <sub>0</sub>	minimální hladina fluorescence
F	fluorescence
FAD	flavinadenindinukleotid
F <sub>m</sub>	maximální fluorescence
FMN	flavinmononukleotid
F <sub>v</sub>	variabilní fluorescence
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	základní fluorescenční poměr
FW	čerstvá hmotnost
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
HCOOH	kyselina mravenčí
HMBDP	hydroxymetylbutenyl difosfát
HMW	vysoká molekulová hmotnost
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
Chl ( <i>a,b</i> )	chlorofyl ( <i>a,b</i> )
IAC	imunoafinitní chromatografie
IC	vnitřní konverze
iP	isopentenyladenin
iP7G	isopentenyladenin-7-glukosid
iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid
iPR	isopentenyladenin ribosid
iPR5'DP	isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPR5'MP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát-
iPR5'TP	isopentenyladenosin-5'-trifosfát
IPT	adenosinfosfát-isopentenyltransferáza

IRGA	infračervený plynový analyzátor
ISC	mezisystémová konverze
k <sub>D</sub>	bazální neregulovatelná tepelná disipace
k <sub>NPQ</sub>	světlem indukovaná regulovaná tepelná disipace
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
LMW	nízká molekulová hmotnost
LOD	limit detekce
LOG	LONELY GUY
MCX	směsná fáze kombinující kationtově-výměnné a reverzní fáze sorbentu
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	metanol
MEP	metabolická dráha metylerytritol fosfátu
MES	Murashige & Skoog médium
MRM	selektivní záznam více iontových reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MVA	metabolická dráha kyseliny mevalonové
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NRH	nukleosid-N-ribohydroláza
P	fosforescence
PAM	pulzní amplitudová modulace fluorescenčního signálu
PI-55	6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin
PSII	fotosystém II
<i>PsIPT</i>	adenosinofosfát-isopentenyltransferáza ( <i>Pisum sativum</i> )
Q	kvadrupól
Q <sub>A</sub>	primární chinonový akceptor PSII
QC	klidové centrum
QqQ	trojitý kvadrupól
RAM	kořenový apikální meristém
RIA	radioimunoanalýza
SAM	stonkový apikální meristém
SCX	silný kationtově výměnný nosič
SDB-RPS	kopolymer poly(styren-divinylbenzenu)
SPE	extrakce na pevné fázi

StageTip	STop And Go Extraction Tip
TBDMS	tertbutyldimethylsilylace
T-DNA	transferová DNA
TDP-glukóza	timidin difosfát glukóza
TFA	trifluoracetylace
Ti plasmid	tumor-inducing plasmid
<i>tmr</i>	tumor morphology gene
TMS	trimetylsilylace
tRNA	transferová RNA
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyltransferáza
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZ7G	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
tZ9G	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
tZOG	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZR5'MP	<i>trans</i> -zeatin ribosid -5'-monofosfát
tZROG	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
<i>tzs</i>	<i>trans</i> -zeatin secretion locus
UDP-glukóza	uridin difosfát glukóza
UHPLC	ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie
UHPLC-MS/MS	ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
UV-VIS spektrofotometrie	ultrafialovo-viditelná spektrofotometrie
VR	vibrační relaxace
ZOG	zeatin <i>O</i> -glukosyltransferáza
ZOX	zeatin <i>O</i> -xylosyltransferáza
$\Phi_P$	aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII pro na světlo adaptovaný stav
$\Phi_{NPR}$	kvantový výtěžek nefotochemického zhášení chlorofylu během aktinické iluminace
$\Phi_{f,D}$	kvantový výtěžek bazálního nefotochemického zhášení chlorofylu, fluorescence během aktinické iluminace

## 8 PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Testování purifikačních kapacit odlišných kombinací a vrstev sorbentů na multi-StageTips mikrokolonách s využitím rostlinného materiálu z 10-denních semenáčků *A. thaliana*. Z rostlinného materiálu byly vytvořeny tetraplikáty o navázkách do 1,5 mg FW. Byly testovány dvě kombinace sorbentů. První varianta obsahovala 4 vrstvy SDB-RPS (kopolymer styren-divinylbenzenu) a 4 vrstvy kationtově-výměnné fáze (Cation-SR) pro zachycení kationů. Druhá varianta obsahovala 3 vrstvy reverzní fáze C18 pro vychytávání nepolárních balastních složek (lipidy, proteiny, pigmenty), 3 vrstvy SDB-RPS a 3 vrstvy kationtově-výměnné fáze (Cation-SR). Na základě porovnání návratností všech CKs metabolitů purifikovaných přes tyto dva různě připravené typy StageTipů, byly pro purifikaci v rámci experimentu vybrány StageTipy s kombinací 4 vrstev kationtově-výměnné fáze a 4 vrstev kopolymeru SDB-RPS.



Obrázek 1 Návratnost multi-StageTips mikrokolon po využití odlišné kompozice sorbentů pro purifikaci.

**Příloha 2:** Hodnoty koncentrací chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů získané ze vzorků 10-denních semenáčků *A. thaliana* pěstovaných za konstantní teploty, intenzity světla a vlhkosti. Pro měření bylo využito navážky cca 10 mg. Koncentrace byla stanovena prostřednictvím rovnic využívající hodnoty absorbancí stanovených spektrofotometricky pomocí programu UV-Probe.

Tab. 1 Přehled koncentrací měřených typů fotosyntetických pigmentů v jednotlivých ročních obdobích.

Týden	Koncentrace [mg.ml <sup>-1</sup> ]		
	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Car
<b>4. (2019)</b>	0,329	0,377	0,060
<b>7.</b>	0,253	0,289	0,049
<b>10.</b>	0,238	0,274	0,052
<b>13.</b>	0,400	0,456	0,069
<b>16.</b>	0,232	0,267	0,048
<b>19.</b>	0,294	0,335	0,055
<b>22.</b>	0,308	0,350	0,057
<b>25.</b>	0,336	0,378	0,060
<b>28.</b>	0,306	0,346	0,059
<b>31.</b>	0,245	0,279	0,046
<b>34.</b>	0,247	0,280	0,050
<b>37.</b>	0,251	0,287	0,053
<b>39.</b>	0,215	0,245	0,042
<b>40.</b>	0,241	0,276	0,046
<b>43.</b>	0,330	0,378	0,060
<b>46.</b>	0,340	0,384	0,063
<b>49.</b>	0,252	0,289	0,050
<b>1. (2020)</b>	0,311	0,352	0,057
<b>Průměr</b>	0,285	0,325	0,054

### Příloha 3:

Tab. 2 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklizených v jarních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru						
	12. týden	13. týden	14. týden	15. týden	16. týden	17. týden	18. týden
	Koncentrace (pmol/1 g FW)						
tZ	2,089 ± 0,116	1,293 ± 0,109	1,570 ± 0,203	1,421 ± 0,206	1,040 ± 0,129	1,391 ± 0,086	1,540 ± 0,125
tZR	2,833 ± 0,269	2,279 ± 0,042	2,218 ± 0,197	2,008 ± 0,057	1,483 ± 0,215	1,472 ± 0,153	2,122 ± 0,110
tZ7G	17,926 ± 1,876	13,299 ± 1,710	19,876 ± 2,730	14,529 ± 1,145	12,831 ± 0,445	13,909 ± 0,235	16,827 ± 0,979
tZ9G	8,534 ± 1,170	6,667 ± 0,969	8,535 ± 0,341	7,018 ± 0,201	6,358 ± 0,535	6,457 ± 0,653	7,031 ± 0,934
tZOG	3,814 ± 0,431	3,874 ± 0,376	5,439 ± 0,271	2,950 ± 0,313	2,683 ± 0,225	2,937 ± 0,237	2,913 ± 0,395
tZR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZR	4,691 ± 0,316	5,229 ± 0,300	5,587 ± 0,449	5,189 ± 0,358	3,107 ± 0,245	2,530 ± 0,132	3,233 ± 0,380
cZ7G	10,876 ± 0,907	9,544 ± 1,044	10,642 ± 0,196	9,516 ± 0,716	8,122 ± 0,552	7,388 ± 0,484	8,615 ± 0,613
cZOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZROG	<LOD	1,580 ± 0,277	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
iP	1,580 ± 0,142	0,960 ± 0,136	0,922 ± 0,084	0,574 ± 0,142	0,501 ± 0,078	0,849 ± 0,107	1,018 ± 0,137
iPR	3,824 ± 0,200	3,428 ± 0,416	4,550 ± 0,608	3,974 ± 0,257	2,212 ± 0,113	2,217 ± 0,170	3,450 ± 0,411
iP7G	25,775 ± 2,898	21,157 ± 2,984	33,124 ± 0,377	17,792 ± 1,381	17,271 ± 0,500	16,563 ± 0,519	18,334 ± 2,354
iP9G	2,799 ± 0,260	1,726 ± 0,156	2,592 ± 0,360	1,862 ± 0,160	1,599 ± 0,074	1,721 ± 0,134	1,584 ± 0,087
iPR5'MP	14,028 ± 0,527	9,805 ± 0,800	11,819 ± 1,774	8,787 ± 0,568	5,650 ± 0,121	8,658 ± 0,526	6,778 ± 0,249
DHZ7G	2,811 ± 0,333	2,195 ± 0,329	3,946 ± 0,104	2,391 ± 0,115	2,164 ± 0,232	2,282 ± 0,137	2,673 ± 0,017

<LOD= pod limitem detekce



Tab. 3 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklizených v jarních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru						
	19. týden	20. týden	21. týden	22. týden	23. týden	24. týden	25. týden
tZ	1,208 ± 0,070	1,275 ± 0,125	1,284 ± 0,125	1,527 ± 0,209	1,207 ± 0,069	1,146 ± 0,068	1,493 ± 0,149
tZR	2,387 ± 0,309	1,152 ± 0,121	1,441 ± 0,031	2,008 ± 0,130	1,788 ± 0,108	1,119 ± 0,004	2,012 ± 0,151
tZ7G	18,326 ± 2,021	16,673 ± 0,900	17,745 ± 0,911	15,326 ± 0,757	17,747 ± 0,789	12,522 ± 1,354	18,002 ± 1,512
tZ9G	9,222 ± 0,422	7,379 ± 0,602	7,955 ± 0,170	7,048 ± 0,891	7,690 ± 0,475	5,133 ± 0,280	9,071 ± 0,737
tZOG	3,762 ± 0,092	3,664 ± 0,280	3,771 ± 0,217	3,299 ± 0,282	3,290 ± 0,357	2,073 ± 0,087	3,198 ± 0,303
tZR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZR	6,115 ± 0,731	2,221 ± 0,199	3,112 ± 0,391	3,455 ± 0,497	3,688 ± 0,099	3,017 ± 0,349	4,277 ± 0,274
cZ7G	10,037 ± 0,753	11,234 ± 1,425	10,530 ± 0,695	12,901 ± 1,060	11,830 ± 0,612	8,446 ± 1,160	12,624 ± 0,888
cZOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZROG	1,687 ± 0,095	<LOD	1,939 ± 0,126	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
iP	0,892 ± 0,008	0,709 ± 0,071	0,902 ± 0,031	0,833 ± 0,116	0,980916 ± 0,039496	0,710 ± 0,069	1,345 ± 0,110
iPR	3,562 ± 0,603	2,688 ± 0,098	3,217 ± 0,276	3,539 ± 0,120	3,091 ± 0,006	2,072 ± 0,010	4,045 ± 0,367
iP7G	20,061 ± 1,403	21,691 ± 2,173	22,499 ± 2,007	23,920 ± 0,135	24,128 ± 2,099	17,556 ± 2,412	24,011 ± 0,634
iP9G	1,681 ± 0,199	2,098 ± 0,303	2,646 ± 0,126	2,507 ± 0,230	2,546 ± 0,322	1,363 ± 0,026	2,016 ± 0,067
iPR5'MP	8,236 ± 0,666	7,213 ± 0,856	8,585 ± 0,337	8,345 ± 1,075	9,468 ± 0,354	7,173 ± 0,187	8,254 ± 0,611
DHZ7G	2,764 ± 0,208	1,725 ± 0,181	2,342 ± 0,209	2,082 ± 0,107	2,261 ± 0,094	1,905 ± 0,255	2,641 ± 0,366

<LOD= pod limitem detekce

Tab. 4 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklízených v letních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru						
	26. týden	27. týden	28. týden	29. týden	30. týden	31. týden	32. týden
	<b>Koncentrace (pmol/1 g FW)</b>						
tZ	1,513 ± 0,213	1,614 ± 0,199	1,224 ± 0,050	1,452 ± 0,153	1,496 ± 0,117	1,633 ± 0,018	1,461 ± 0,052
tZR	2,046 ± 0,121	1,656 ± 0,291	1,625 ± 0,144	1,797 ± 0,217	1,907 ± 0,019	1,799 ± 0,120	1,356 ± 0,028
tZ7G	17,783 ± 1,533	18,900 ± 1,711	16,952 ± 1,480	18,199 ± 1,546	17,566 ± 1,772	17,304 ± 1,749	17,976 ± 1,604
tZ9G	8,065 ± 0,628	8,769 ± 0,799	8,259 ± 0,834	8,487 ± 0,476	7,646 ± 0,898	7,756 ± 0,434	6,785 ± 0,530
tZOG	3,460 ± 0,273	3,487 ± 0,168	3,713 ± 0,267	3,744 ± 0,241	3,287 ± 0,336	3,132 ± 0,385	3,148 ± 0,403
tZR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZR	6,130 ± 0,646	2,055 ± 0,088	3,206 ± 0,340	2,306 ± 0,294	2,058 ± 0,189	2,140 ± 0,169	1,581 ± 0,019
cZ7G	12,294 ± 1,555	11,869 ± 1,058	11,333 ± 1,074	10,533 ± 0,602	9,814 ± 0,892	9,804 ± 0,959	9,049 ± 0,335
cZOG	<LOD	0,635 ± 0,038	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZR0G	2,065 ± 0,265	<LOD	1,753 ± 0,162	1,870 ± 0,055	1,418 ± 0,043	<LOD	<LOD
iP	1,857 ± 0,116	0,754 ± 0,073	0,826 ± 0,082	1,250 ± 0,179	1,362 ± 0,049	0,910 ± 0,055	0,848 ± 0,018
iPR	3,856 ± 0,364	3,029 ± 0,185	2,520 ± 0,202	2,484 ± 0,227	2,737 ± 0,132	2,264 ± 0,163	1,958 ± 0,063
iP7G	23,713 ± 2,096	26,533 ± 3,663	22,485 ± 0,653	23,036 ± 0,690	21,239 ± 2,287	22,290 ± 3,237	18,192 ± 0,163
iP9G	2,286 ± 0,141	2,110 ± 0,186	2,048 ± 0,127	2,084 ± 0,175	1,957 ± 0,029	1,987 ± 0,145	1,545 ± 0,152
iPR5'MP	8,129 ± 0,356	12,650 ± 1,500	9,706 ± 0,702	10,170 ± 0,453	10,275 ± 0,352	10,162 ± 0,673	10,667 ± 0,258
DHZ7G	2,817 ± 0,306	3,962 ± 0,428	2,666 ± 0,352	3,209 ± 0,257	3,057 ± 0,245	3,410 ± 0,285	2,427 ± 0,310

<LOD= pod limitem detekce

Tab. 5 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklízených v letních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru					
	33. týden	34. týden	35. týden	36. týden	37. týden	38. týden
	Koncentrace (pmol/1 g FW)					
tZ	1,964 ± 0,138	1,056 ± 0,060	1,584 ± 0,109	1,477 ± 0,105	1,317 ± 0,015	1,414 ± 0,133
tZR	2,617 ± 0,310	1,321 ± 0,143	1,907 ± 0,123	1,410 ± 0,122	1,478 ± 0,082	1,017 ± 0,106
tZ7G	22,596 ± 3,010	14,433 ± 0,698	18,841 ± 0,660	18,070 ± 1,063	13,839 ± 1,260	14,888 ± 1,562
tZ9G	9,136 ± 0,152	6,184 ± 0,164	7,303 ± 0,066	8,096 ± 0,695	4,645 ± 0,173	7,845 ± 0,063
tZOG	3,938 ± 0,144	3,276 ± 0,187	3,033 ± 0,295	3,604 ± 0,327	2,264 ± 0,187	2,475 ± 0,197
tZR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZR	3,010 ± 0,167	2,512 ± 0,107	1,493 ± 0,048	1,743 ± 0,195	2,248 ± 0,079	1,852 ± 0,283
cZ7G	11,827 ± 0,769	9,041 ± 0,773	10,623 ± 0,800	10,075 ± 0,749	8,566 ± 0,724	9,227 ± 0,793
cZOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
iP	1,377 ± 0,174	1,331 ± 0,295	1,059 ± 5,934	1,059 ± 0,540	0,486 ± 0,038	0,650 ± 0,078
iPR	4,043 ± 0,207	2,794 ± 0,087	3,096 ± 0,058	1,809 ± 0,005	2,314 ± 0,252	1,364 ± 0,085
iP7G	26,282 ± 3,197	20,026 ± 2,275	23,322 ± 1,144	21,772 ± 2,160	17,103 ± 1,804	19,119 ± 0,810
iP9G	2,957 ± 0,220	1,585 ± 0,167	2,561 ± 0,280	2,024 ± 0,119	1,861 ± 0,096	2,440 ± 0,171
iPR5'MP	14,737 ± 0,383	9,254 ± 0,860	11,321 ± 1,105	8,270 ± 0,146	7,300 ± 0,197	5,831 ± 0,067
DHZ7G	4,397 ± 0,562	2,724 ± 0,341	3,459 ± 0,270	2,851 ± 0,208	2,038 ± 0,196	2,063 ± 0,207

<LOD= pod limitem detekce

Tab. 6 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklizených v podzimních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru						
	39. týden	40. týden	41. týden	42. týden	43. týden	44. týden	45. týden
	Koncentrace (pmol/1 g FW)						
tZ	1,318 ± 0,108	0,864 ± 0,135	1,027 ± 0,010	0,906 ± 0,027	0,880 ± 0,117	0,607 ± 0,057	1,026 ± 0,143
tZR	1,490 ± 0,167	1,500 ± 0,070	2,899 ± 0,178	1,390 ± 0,122	1,064 ± 0,053	1,644 ± 0,192	1,817 ± 0,069
tZ7G	13,324 ± 1,170	10,734 ± 0,244	13,844 ± 0,663	13,307 ± 1,077	9,932 ± 0,764	14,013 ± 0,425	13,656 ± 1,887
tZ9G	5,658 ± 0,449	5,447 ± 0,530	7,459 ± 0,652	6,152 ± 0,374	4,970 ± 0,265	6,537 ± 0,510	6,337 ± 0,700
tZOG	2,348 ± 0,237	1,961 ± 0,163	2,451 ± 0,156	2,362 ± 0,214	1,754 ± 0,029	2,230 ± 0,278	2,424 ± 0,243
tZR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZR	3,286 ± 0,282	1,769 ± 0,165	3,261 ± 0,430	4,638 ± 0,421	3,332 ± 0,467	2,345 ± 0,244	3,623 ± 0,413
cZ7G	7,471 ± 0,713	5,445 ± 0,142	8,127 ± 0,298	8,661 ± 0,284	6,803 ± 0,374	8,890 ± 0,132	8,200 ± 0,547
cZOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZR0G	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
iP	0,543 ± 0,120	0,350 ± 0,035	0,411 ± 0,031	0,489 ± 0,023	0,689 ± 0,053	0,432 ± 0,025	0,718 ± 0,126
iPR	2,830 ± 0,219	1,705 ± 0,163	2,666 ± 0,428	2,436 ± 0,101	1,981 ± 0,036	2,427 ± 0,009	3,038 ± 0,229
iP7G	17,063 ± 0,434	12,281 ± 0,803	16,437 ± 0,596	18,160 ± 2,128	11,284 ± 0,330	17,352 ± 0,732	16,641 ± 1,915
iP9G	1,699 ± 0,047	0,752 ± 0,046	1,511 ± 0,172	1,657 ± 0,138	1,036 ± 0,016	1,576 ± 0,186	1,640 ± 0,148
iPR5'MP	10,405 ± 0,607	5,839 ± 0,411	7,415 ± 0,120	7,976 ± 0,060	4,701 ± 0,393	5,178 ± 0,266	6,198 ± 0,683
DHZ7G	2,180 ± 0,136	1,735 ± 0,078	2,287 ± 0,164	2,131 ± 0,129	1,430 ± 0,146	2,229 ± 0,058	1,918 ± 0,138

<LOD= pod limitem detekce

Tab. 7 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklizených v podzimních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru					
	46. týden	47. týden	48. týden	49. týden	50. týden	51. týden
	Koncentrace (pmol/1 g FW)					
tZ	0,857 ± 0,103	0,921 ± 0,035	0,857 ± 0,032	0,697 ± 0,051	0,977 ± 0,124	1,320 ± 0,150
tZR	1,789 ± 0,103	1,296 ± 0,019	1,311 ± 0,157	1,030 ± 0,077	1,360 ± 0,128	2,599 ± 0,227
tZ7G	16,560 ± 0,146	15,031 ± 0,827	12,418 ± 0,707	11,023 ± 1,535	14,942 ± 1,888	21,442 ± 0,611
tZ9G	7,100 ± 0,746	7,049 ± 0,837	6,077 ± 0,210	4,771 ± 0,519	6,932 ± 0,344	10,486 ± 0,819
tZOG	3,038 ± 0,159	2,548 ± 0,112	2,100 ± 0,071	2,157 ± 0,144	2,902 ± 0,370	3,566 ± 0,064
tZR5'MP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,680 ± 0,200
cZR	2,635 ± 0,336	6,925 ± 1,159	3,833 ± 0,251	1,302 ± 0,136	1,631 ± 0,062	2,646 ± 0,108
cZ7G	8,696 ± 0,893	7,776 ± 0,539	7,397 ± 0,326	6,381 ± 0,524	8,094 ± 0,304	10,557 ± 0,586
cZOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
cZROG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
iP	0,745 ± 0,057	0,397 ± 0,052	0,409 ± 0,056	0,489 ± 0,024	0,666 ± 0,075	1,568 ± 0,225
iPR	2,799 ± 0,278	2,799 ± 0,097	2,953 ± 0,196	1,213 ± 0,086	1,917 ± 0,130	3,120 ± 0,021
iP7G	20,700 ± 0,825	17,654 ± 0,025	15,115 ± 1,313	13,697 ± 1,656	16,180 ± 1,128	23,633 ± 0,357
iP9G	1,824 ± 0,131	1,976 ± 0,276	1,462 ± 0,113	1,395 ± 0,123	1,573 ± 0,076	2,270 ± 0,023
iPR5'MP	9,501 ± 0,934	7,606 ± 0,819	8,313 ± 0,360	7,175 ± 0,636	6,931 ± 0,336	13,972 ± 0,802
DHZ7G	2,702 ± 0,230	2,279 ± 0,299	2,060 ± 0,185	1,615 ± 0,148	2,220 ± 0,311	3,920 ± 0,117

<LOD= pod limitem detekce

Tab. 8 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklizených v zimních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru						
	1. týden (2020)	2. týden (2020)	3. týden (2020)	4. týden (2020)	5. týden (2020)	6. týden (2020)	7. týden (2020)
	Koncentrace (pmol/1 g FW)						
tZ	1,277 ± 0,119	1,382 ± 0,049	1,257 ± 0,067	1,614 ± 0,210	1,802 ± 0,154	2,295 ± 0,352	2,141 ± 0,055
tZR	1,653 ± 0,005	1,849 ± 0,315	1,277 ± 0,112	1,528 ± 0,211	2,924 ± 0,351	4,672 ± 0,045	3,622 ± 0,320
tZ7G	14,760 ± 0,032	14,828 ± 1,076	14,045 ± 1,214	16,973 ± 0,883	23,822 ± 0,988	24,855 ± 2,226	17,203 ± 1,482
tZ9G	9,556 ± 1,168	6,910 ± 0,239	6,710 ± 0,430	7,875 ± 0,105	10,986 ± 0,836	11,598 ± 0,329	8,181 ± 0,371
tZOG	3,436 ± 0,203	3,286 ± 0,363	2,856 ± 0,114	3,074 ± 0,142	4,166 ± 0,387	6,116 ± 0,424	4,341 ± 0,268
tZR5'MP	3,927 ± 0,873	4,084 ± 0,057	<LOD	<LOD	<LOD	6,162 ± 0,811	7,183 ± 0,727
cZR	1,821 ± 0,125	2,300 ± 0,159	2,131 ± 0,165	2,025 ± 0,058	4,210 ± 0,164	4,408 ± 0,473	2,649 ± 0,133
cZ7G	8,967 ± 0,617	7,913 ± 0,166	7,875 ± 0,242	9,532 ± 0,901	11,036 ± 0,889	8,890 ± 0,662	7,062 ± 0,722
cZOG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,215 ± 0,053	0,917 ± 0,114
cZROG	<LOD	<LOD	1,377 ± 0,030	<LOD	2,286 ± 0,075	1,901 ± 0,059	<LOD
iP	0,500 ± 0,033	0,890 ± 0,007	0,779 ± 0,003	1,529 ± 0,059	1,559 ± 0,431	1,222 ± 0,184	1,213 ± 0,162
iPR	2,819 ± 0,149	2,552 ± 0,209	1,677 ± 0,128	2,497 ± 0,082	2,574 ± 0,199	3,740 ± 0,187	3,831 ± 0,278
iP7G	14,962 ± 0,116	17,163 ± 0,233	17,197 ± 1,052	19,841 ± 0,842	27,049 ± 1,150	22,839 ± 1,995	19,364 ± 1,606
iP9G	2,103 ± 0,275	1,644 ± 0,136	1,551 ± 0,026	2,058 ± 0,132	2,275 ± 0,199	2,078 ± 0,266	1,394 ± 0,214
iPR5'MP	11,914 ± 0,278	9,666 ± 0,761	7,201 ± 0,429	9,634 ± 0,565	13,392 ± 0,593	16,900 ± 1,624	15,957 ± 0,536
DHZ7G	2,406 ± 0,171	2,481 ± 0,185	2,109 ± 0,237	2,644 ± 0,291	3,471 ± 0,120	4,445 ± 0,463	3,440 ± 0,238

<LOD= pod limitem detekce

Tab. 9 Detekované hladiny cytokininů v 10-denních semenáčcích *A. thaliana* sklizených v zimních týdnech ve tvaru průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, n=3.

Typ cytokininu	Týden sběru			
	8. týden (2020)	9. týden (2020)	10. týden (2020)	11. týden (2020)
	<b>Koncentrace (pmol/1 g FW)</b>			
tZ	1,771 ± 0,120	1,643 ± 0,047	1,514 ± 0,139	1,786 ± 0,183
tZR	2,202 ± 0,014	2,733 ± 0,198	2,409 ± 0,220	2,543 ± 0,088
tZ7G	15,172 ± 1,190	18,006 ± 0,634	14,048 ± 1,311	16,489 ± 0,753
tZ9G	7,505 ± 0,327	7,428 ± 0,578	7,228 ± 0,276	8,119 ± 0,406
tZOG	4,172 ± 0,046	4,217 ± 0,229	3,273 ± 0,492	3,500 ± 0,132
tZR5'MP	<LOD	5,944 ± 0,233	<LOD	<LOD
cZR	2,370 ± 0,433	3,656 ± 0,325	2,907 ± 0,122	4,182 ± 0,348
cZ7G	8,904 ± 0,445	8,979 ± 0,649	7,313 ± 0,674	9,904 ± 0,349
cZOG	0,908 ± 0,222	0,986 ± 0,128	<LOD	<LOD
cZROG	1,415 ± 0,061	1,842 ± 0,084	<LOD	1,433 ± 0,170
iP	0,804 ± 0,129	1,096 ± 0,038	0,959 ± 0,143	1,109 ± 0,070
iPR	2,303 ± 0,462	3,265 ± 0,121	2,601 ± 0,060	4,013 ± 0,656
iP7G	20,999 ± 2,024	20,763 ± 0,850	19,185 ± 0,696	23,296 ± 0,507
iP9G	2,308 ± 0,238	2,109 ± 0,147	2,050 ± 0,180	2,457 ± 0,152
iPR5'MP	10,395 ± 0,127	9,747 ± 0,928	9,272 ± 0,628	10,523 ± 1,151
DHZ7G	2,409 ± 0,163	3,347 ± 0,318	2,699 ± 0,294	2,727 ± 0,079

<LOD= pod limitem detekce