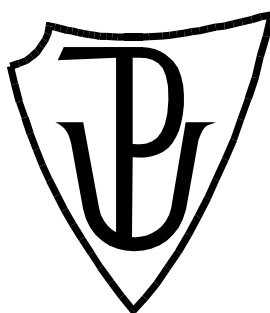


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Optimalizace metody pro studium vlivu cytokininů na vývoj kořene *Vicia faba*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Barbora Opletalová
Studijní program:	1406R012 Biotechnologie a genové inženýrství
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Martin Hönig
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena 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

Mé velké poděkování patří Mgr. Martinu Hönigovi za cenné rady, odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jaromíru Mikulíkovi, Ph.D. za asistenci při experimentech s detekcí etylenu, Mgr. Janu Humplíkovi, Ph.D. za cenné rady při zpracování obrazové analýzy a prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za poskytnutí semen rostliny *Vicia faba*.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Barbora Opletalová
Název práce	Optimalizace metody pro studium vlivu cytokininů na vývoj kořene <i>Vicia faba</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Martin Hönig
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>V této práci byla zkoumána optimalizace růstových podmínek modelové rostliny <i>Vicia faba</i> ssp. <i>minor</i>. Tato metoda umožňuje následné experimenty zkoumající vliv různých cytokininů na kořenový systém dané rostliny. Po nalezení optimálních podmínek pěstování byl otestován vliv třech cytokininů, konkrétně BAP, kinetinu a <i>meta</i>-topolinu na růst kořene této rostliny. Byla také optimalizována metoda měření délky a projektované plochy kořene. V posledním kroku byl pomocí FID plynové chromatografie studován vztah produkce etylenu v přítomnosti vybraného cytokininu.</p>
Klíčová slova	<i>Vicia faba</i> , kinetin, BAP, <i>meta</i> -topolin, optimalizace růstových podmínek, FID GC, PCD
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Barbora Opletalová
Title of thesis	Optimization of the method for studying the effect of cytokinins on root development of <i>Vicia faba</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Martin Hönig
The year of presentation	2019
Abstract	In this thesis a growing conditions of the plant <i>Vicia faba</i> ssp. <i>minor</i> were optimized which allows experiments with different cytokinins, including programmed cell death study. After condition optimization, effect of three selected cytokinins (BAP, kinetin, <i>meta</i> -topolin) was tested. Moreover, measuring methods of root length and projected area were created. In the last step the ethylene production induced by cytokinin treatment was measured by FID gas chromatography.
Keywords	<i>Vicia faba</i> , kinetin, BAP, <i>meta</i> -topolin, optimization of growing condition, FID GC, PCD
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

2.	Úvod	9
3.	Současný stav řešené problematiky	10
3.1.	Rostlinné hormony	10
3.2.	Cytokininy	11
3.2.1.	Typy a struktura.....	11
3.2.2.	Biosyntéza	12
3.3.	Vliv rostlinných hormonů na růst a vývoj kořene	14
3.3.1.	Vliv cytokininů na růst a vývoj kořene	14
3.3.2.	Interakce auxinů s cytokininy.....	16
3.3.3.	Etylen.....	17
3.4.	Programovaná buněčná smrt	18
3.5.	<i>Vicia faba</i> – modelová rostlina.....	20
3.6.	FID plynová chromatografie	20
4.	Experimentální část.....	22
4.1.	Materiál a metody.....	22
4.1.1.	Rostlinný materiál a použité chemikálie	22
4.1.2.	Optimalizace pěstování semen	22
4.1.2.1.	Příprava semen před namáčením.....	22
4.1.2.2.	Délka namáčení a klíčení semen	23
4.1.2.3.	Růst semen a ošetření hormony.....	24
4.1.3.	Obrazová analýza	26
4.1.4.	Měření obsahu etylenu	26
5.	Výsledky	27
5.1.	Optimalizovaný postup pro pěstování rostlinného materiálu.....	27
5.2.	Porovnání délky a projektované plochy	27
5.2.1.	Kořeny ošetřené kinetinem.....	27

5.2.2.	Kořeny ošetřené <i>meta</i> -topolinem	29
5.2.3.	Kořeny ošetřené BAP	30
5.2.4.	Porovnání ovlivnění kořene různými cytokininy	31
5.3.	Produkce etylenu	31
5.3.1.	Porovnání účinnosti použitých metod	34
6.	Diskuze.....	35
7.	Závěr	37
8.	Literatura	38
9.	Seznam použitých zkratk.....	43

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma vlivu cytokininů na vývoj kořenového systému
2. Optimalizace postupu klíčení a kultivace semen modelové rostliny *Vicia faba*
3. Optimalizace metody pro možnost využití obrazové analýzy
4. Zavedení metody pro studium vlivu vybraných cytokininů
5. Použití FID plynové chromatografie k měření produkce etylenu rostlinou *Vicia faba*

2. ÚVOD

Cytokininy (CK) jsou skupinou rostlinných hormonů se strukturou N⁶ substituovaných derivátů adeninu. Tyto sloučeniny hrají důležitou roli ve fyziologii a vývojových procesech rostlin. CK jsou mimo jiné zásadní pro správný růst a vývoj kořene, jeho architekturu a sekundární růst.

V práci Kunikowska *et al.*, 2012 bylo zjištěno, že pokud je kinetin (6-furfurylaminopurin) aplikován ve vysokých koncentracích, spouští u buněk kořene *Vicia faba* programovanou buněčnou smrt. Hlavním cílem této práce tedy byla optimalizace růstových podmínek rostliny *Vicia faba* ssp. *minor*, která by umožnila další studium tohoto procesu.

Po optimalizaci podmínek růstu byl otestován vliv i jiných CK než kinetinu, a to konkrétně 6-benzylaminopurinu (BAP) a 6-(3-hydroxybenzylamino)purinu (*meta*-topolin). V experimentech byla upravena metoda pro hodnocení morfologie kořenů. Ve studii Kunikowska *et al.*, 2012 byly kořeny před měřením délky a vážením uříznuty a nebylo tedy možné pozorovat průběžný vliv CK na konkrétní kořen rostliny. V této práci bylo průběžné měření zajištěno díky fotografické dokumentaci a následnému vyhodnocení.

Účinek CK je úzce spjat s produkcí a aktivitou etylenu. V poslední části práce tak byla testována metoda vhodná pro studium vztahu etylenu produkovaného rostlinou ovlivněnou aplikovanými CK. Pro měření hladiny etylenu byla použita plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID).

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Rostlinné hormony

Rostlinné hormony, též fytohormony, jsou přirozeně se vyskytující skupiny organických látek, které ovlivňují fyziologické procesy rostlin už při nízkých koncentracích (obvykle 10^{-6} až 10^{-9} M). Mnohé molekulárně genetické studie dokazují, že rostlinné hormony mají zásadní vliv na růst a vývoj rostlin. Hormony řídí vývojový cyklus rostlin, od klíčení přes vývoj semen až po dozrávání plodů (Davies, 2010; Garg *et al.*, 2012). Struktura rostlinných hormonů se od sebe značně odlišuje. Mezi sloučeniny obsahující aromatický kruh patří např. kyselina salicylová, auxiny a cytokininy. Karboxylová kyselina se vyskytuje ve struktuře kyseliny abscisové, jasmonové či giberelinů, steroidní strukturu najdeme u brassinosteroidů. Polyaminy jsou skupinou alifatických aminů (Davies, 2010).

Prvním objeveným rostlinným hormonem byl auxin (indol-3-ylactová kyselina, IAA). Následoval objev dalších skupin hormonů — giberelinů (kyselina giberelová, GA), cytokininů (CK), kyseliny abscisové (ABA) či etylenu (ET). Brassinosteroidy (BR), jasmonáty (JA), kyselina salicylová (SA), polyaminy, peptidy a strigolaktony byly mezi rostlinné hormony zařazeny později (Davies, 2010).

Biosyntéza rostlinných hormonů zahrnuje sérii kroků, které mění meziproduct se sníženou či žádnou biologickou aktivitou na aktivní formu. Obvykle je každý krok katalyzován enzymem, který je kódován určitým genem. Syntéza rostlinných hormonů může být lokalizována v jednom místě nebo může probíhat ve větším množství pletiv (Van Staden *et al.*, 2008; Davies, 2010).

Velmi důležitý mechanismus ke kontrole buněčné hladiny fytohormonů je takzvaná konjugace. Reverzibilní konjugace umožňuje rostlinám za měnících se environmentálních, vývojových a fyziologických podmínek získat aktivních hormonů z jejich konjugovaných forem. Ireverzibilní konjugace slouží k nevratné inaktivaci, transportu, kompartmentaci a ochraně proti degradaci. Aktivní fytohormony jsou měněny na různé formy, například pomocí acylace, esterifikace nebo glykosylace. Metabolickou přeměnou může dojít ke ztrátě jejich aktivity. Všechny metabolické kroky jsou zpravidla ireverzibilní, vyjma některých procesů jako formace esterů, glukosidů a amidových konjugátů, kde volné složky nepodléhají enzymatické hydrolyze (Bajguz a Piotrowska, 2009; Piotrowska *et al.*, 2011).

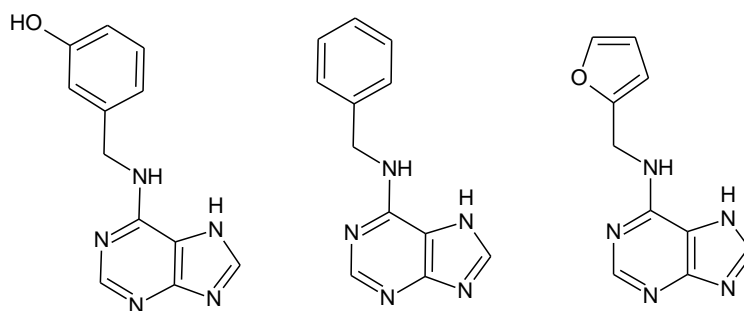
3.2. Cytokininy

CK jsou rostlinné hormony, které jsou zapojeny do regulace buněčné proliferace, buněčného cyklu a vývoje buněk a plastidů. Nejdříve byla u CK předpokládána jen funkce povzbuzení růstu stonku, inhibice kořenového růstu, stimulace buněčného dělení a indukce zelenání v kalusech. Později bylo zjištěno, že hrají důležitou roli v mnohých vývojových procesech rostlin, zahrnující organogenezi, senescenci listů, formaci a udržování stonkových meristemických oblastí, apikální dominanci a klíčení semen. Další studie dokázaly, že CK hrají důležitou roli v interakci na biotické a abiotické faktory (Miller *et al.*, 1956; Mok, 1994; Argueso *et al.*, 2012).

3.2.1. Typy a struktura

CK se v rostlinách nacházejí jako volné báze, ve formě nukleosidů (ribosidů), glykosidů (O – nebo N-glykosidy) nebo nukleotidů. Aktivní formu vykazují jako volné báze, zatímco ve formě konjugátů mají zpravidla jen nízkou aktivitu (Yamada *et al.*, 2001; Lomin *et al.*, 2015). Výskyt, rozmístění a změny jednotlivých CK se liší v závislosti na typu rostliny, pletivu a vývojovém stádiu (Sakakibara, 2006). CK se nejčastěji vyskytují v inaktivní formě, z čehož se usuzuje, že koncentrace aktivních CK je dobře kontrolována, aby nedocházelo k nekontrolovanému přenosu signálu. Správného přenosu signálu je dosaženo díky koordinaci enzymů zahrnutých do biosyntézy, modifikace a degradace CK (Zürcher a Müller, 2016).

Přirozeně se vyskytující CK jsou deriváty adeninu, které se liší postranním řetězcem navázaným na N⁶ dusík adeninu. Rozlišují se dva typy postranních řetězců; isoprenoidní a aromatické (Mok, 2001). Nejvíce prostudované jsou isoprenoidní CK, N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenin (iP), 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin (zeatin) a 6-(4-hydroxy-3-methylbutylamino)purin (dihydrozeatin). Zeatinový postranní řetězec obsahuje dvojnou vazbu, a tudíž jeho hydroxylová skupina může mít *cis*, nebo *trans* konfiguraci, vzniká tak *trans*-zeatin (*tZ*) nebo *cis*-zeatin (*cZ*) (Sakakibara, 2006).



Obr. 1 Struktura 6-(3-hydroxybenzylamino)purinu (*meta*-topolinu, vlevo), 6-benzylaminopurinu (BAP, uprostřed) a 6-furfurylamino purinu (kinetinu, vpravo).

Aromatické CK mají přes N⁶ uhlík navázané substituenty, např. benzyl. Nejvýznamnějšími zástupci jsou uměle připravené CK 6-benzylaminopurin (BAP) a kinetin. Mezi přírodní aromatické CK řadíme topoliny (Strnad *et al.*, 1992; Obr.1). Modifikací navázaného řetězce lze získat odlišné vlastnosti CK, například hydroxylace benzylového kruhu BAP v *ortho* pozici vede k deaktivacím krokům, zatímco hydroxylace v *meta* pozici může mít za následek opačný efekt (Kamínek *et al.*, 1987). Vodíky navázaného benzylového jádra mohou být nahrazeny – methoxy, – halogen, – merkpto nebo – alkylovými skupinami (Plíhalová *et al.*, 2015).

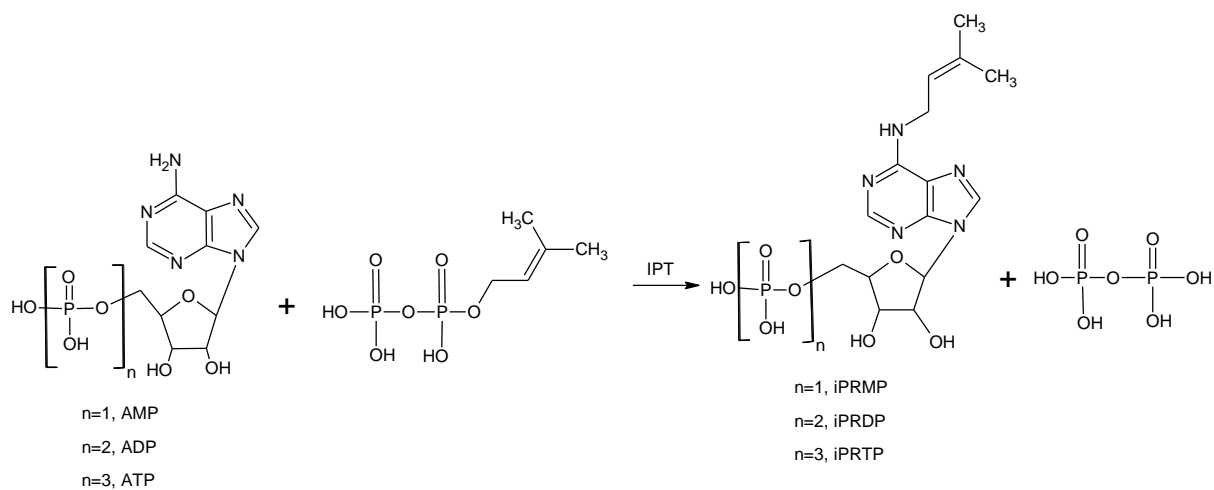
3.2.2. Biosyntéza

Biosyntéza isoprenoidních CK probíhá dvěma cestami: vznik degradací tRNA, nebo isopentenylovací volných nukleotidů adeninu.

V prvním kroku biosyntézy (Obr. 2) isoprenoidních CK dochází k přenosu isopentenylové skupiny, která je součástí dimethylallyl difosfát (DMAPP), na adenosin 5'fosfátu (ATP, ADP), která se váže do N⁶ pozice. Při tomto přenosu dochází ke katalýze pomocí isopentenylyltransferázy (IPT) a vzniku isopentenylový adenosin 5' fosfátu (převážně ADP, nebo ATP), který je prekurzorem biologicky aktivních CK (Lichtenthaler, 1999; Hecht *et al.*, 2001; Krall *et al.*, 2002; Sakakibara, 2004).

Volné báze neboli aktivní formy CK, vznikají v dalším kroku enzymatickou katalýzou CK ribotidu za pomoci LONELY GUY (LOG) genu (Kuroha *et al.*, 2009).

Biosyntéza aromatických CK doposud není značně prostudována, ale usuzuje se, že metabolická cesta bude alespoň z části podobná isoprenoidním CK. Syntéza CK je regulována mnohými podmínkami zahrnujícími biotické, abiotické a endogenní vývojové faktory (Sakakibara, 2005; Davies, 2010).



Obr. 2.: Primární reakce syntézy cytokininů za použití IPT. Adenosin 5'fosfát ve formě AMP, ATP, ADP reaguje s dimethylallyl difosfát (DMAPP) za přítomnosti isopentenyltransferázy (IPT). V reakci dochází k vazbě dimethylallylu do N⁶ pozice za vzniku isopentenyl adenosin 5'fosfátu ve formě monofosfátu (iPRMP), difosfátu (iPRDP), nebo trifosfátu (iPRTP) a difosfátu

3.3. Vliv rostlinných hormonů na růst a vývoj kořene

3.3.1. Vliv cytokininů na růst a vývoj kořene

Efekt CK na kořeny rostlin je velmi komplexní. Určitá koncentrace těchto fytohormonů je nezbytná k růstu kořene, což bylo prokázáno u trojitých mutantů v přenosu CK signálu. Některé mutantní linie nerostly vůbec, jiné jen mírně (Higuchi *et al.*, 2004). CK mají opačný efekt na buněčné dělení v kořenovém a stonkovém meristému. V kořenovém meristému buněčné dělení inhibují, kdežto v meristému stonku jej naopak indukují (Schaller *et al.*, 2014).

Hlavní charakteristikou CK je kontrola buněčného dělení a buněčného cyklu. Negativní vliv na apikální kořenový meristém (RAM; *root apical meristem*) je způsoben podporou buněčné diferenciace. Hladina CK, zvláště zeatinu, osciluje v průběhu buněčného cyklu, přičemž ostré píky se objevují na konci S fáze a během vstupu do mitózy (Hartig a Beck, 2005). CK ovlivňují kontrolní body u přechodů G₁ do S a G₂ do M fáze. Tento fakt potvrzuje studie zkoumající efekt lovastatinu (inhibitor CK biosyntézy), kdy byla patrná blokáce G₂/M přechodu v tabákové buněčné kultuře (Redig *et al.*, 1996), nebo narušení třech CK receptorů (AHK2, AHK3, AHK4-histidin kináz), což vedlo ke zpomalení G₂/M přechodu (Higuchi *et al.*, 2004). Díky těmto poznatkům je patrné, že hlavním bodem kontroly buněčného cyklu ovlivněného CK je přechod G₂ do M fáze (Schaller *et al.*, 2014).

Další rolí CK je regulace buněčného dělení v klidovém centru (QC; *quiescent center*) a regulace rovnováhy v zóně přechodu mezi buněčným dělením a buněčnou diferenciací (mitóza a endoreduplikace) (Schaller *et al.*, 2014). Tento děj je postaven na zjištění inhibice auxinové aktivity pomocí CK. Při této inhibici dochází ke zvýšení buněčné diferenciace na úkor buněčného dělení (Ioio *et al.*, 2008). Zároveň zvýšená hladina CK vede k opětovné aktivaci buněčného dělení QC, díky čemuž lze soudit, že snížený CK přenos signálu je nezbytný k inhibici buněčného dělení v klidovém centru (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

V RAM je CK aktivita v QC nižší, než je optimální hladina pro mitózu. Pokud dojde ke zvýšení hladin cytokininů, a to zvýšením CK aktivity nebo snížením auxinové aktivity, dojde k podpoře mitózy a buněčného dělení (Zhang *et al.*, 2013). Naopak pokud je CK aktivita zvýšená v zóně přechodu ve srovnání s optimální hladinou

pro mitózu, dochází k endoreduplikaci. CK tedy aktivují mitózu a buněčné dělení při nízkých koncentracích, při vyšších koncentracích dochází k inhibici a tím i k endoreduplikaci (Schaller *et al.*, 2014).

Je nutné dodat, že závislost CK na délce kořene nemusí být jediným faktorem; vliv na délku může mít i transport IAA v kořenovém meristému (Benková a Hejátko, 2009) a další IAA závislé procesy (Blilou *et al.*, 2015).

Snížení endogenní hladiny CK způsobuje změny v pleiotropním vývoji, jako je opoždění vzniku a expanze listů, opoždění kvetení, zvýšení sterility a zlepšení růstu kořene (Werner *et al.*, 2001). U rostlin s deficiencí v produkci CK došlo ke zvýšení tvorby primárních kořenů téměř o 50 % ve srovnání s kontrolní rostlinou. Zároveň u rostlin došlo k silnému růstu postranních kořenů a jejich primordia se nacházela v menší vzdálenosti od sebe. Primární RAM dosahoval větší délky i šířky než u kontrolní rostliny. Naopak zvýšení endogenního množství CK (pomocí zvýšení biosyntézy IPT) redukuje apikální dominanci a vývoj kořene, dochází ke změně tvaru listů a potlačení vývoje nadzemní části (Li, 1992; Werner *et al.*, 2003).

CK regulují architekturu kořenového systému. Fungují jako negativní regulátory formování a růstu postranních kořenů díky zabránění vytvoření auxinového gradientu potřebného pro vytvoření postranních kořenů (Laplaze *et al.*, 2007; Marhavý *et al.*, 2011). V kořenech s nízkou hladinou CK dochází k formování primordií laterálních kořenů v neobvykle blízké vzdálenosti od sebe, z čehož byla vyvozena role CK jako regulátorů pozice laterálních kořenů podél osy hlavního kořene. U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní) bylo zjištěno, že během brzkého stádia formování primordií laterálních kořenů dochází k syntéze genu IPT5 a LOG4. Díky těmto genům dochází ke snížení tvorby primordií laterálních kořenů v sousedních pericyklových buňkách. Sousední buňky přeměňují isopentenyl adenin na *trans*-zeatin a dochází k syntéze nových vlastních CK, které inhibují formování primordií postranních kořenů (Chang *et al.*, 2015).

CK fungují jako klíčový modulátor sekundárního růstu kořene, a to díky regulaci proliferace v kořenovém kambiu. V inbredních liniích s aktivním sekundárním růstem byla v kořenovém kambiu CK odpověď silnější než v sousedních pletivech. Naopak v inbredních liniích s potlačeným sekundárním růstem byla v kořenovém kambiu naměřena velmi slabá CK aktivita. Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že u této linie není možné aktivovat buněčné dělení v zóně kambia a s ním spojený sekundární růst pomocí

exogenní aplikaci CK. Z těchto výsledků vyplývá, že potlačení radiálního růstu kořene v inbredních liniích je způsobena defektem v CK přenosu signálu (Jang, 2015).

CK dále hrají důležitou roli v odpovědi na environmentální podmínky, jako jsou nutriční a osmotické podmínky (Malamy *et al.*, 2005, Ramireddy *et al.*, 2014), díky nimž dochází k rozvoji plasticity kořenové architektury, která se neustále adaptuje na vnější podmínky (Chang *et al.*, 2015).

3.3.2. Interakce auxinů s cytokininy

Auxin je důležitý regulátor buněčné morfologie, formování a přímého růstu orgánů v různých vývojových souvislostech (Vanneste a Friml, 2009). K zajištění optimálního růstu a vývoje si rostliny vytvořily mechanismus kontroly lokální auxinové homeostáze. Ten zahrnuje kontrolu auxinového metabolismu (Cheng *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2008), subcelulární kompartmentace (Mravec *et al.*, 2009; Barbez *et al.*, 2012) a přímého auxinového transportu, který je zprostředkován pomocí ATP-binding cassette skupiny B (ABCB), PIN-FORMED (PIN) a AUXIN-RESISTANT 1 (AUX1) transportérů (Geisler *et al.*, 2005; Baster P. *et al.*, 2013).

Polární auxinový transport je speciální transportní systém, který rostlina používá k přenosu kyseliny indol-3-ylactové z místa vzniku k potřebným pletivům. Podle směru transportu rozlišujeme akropetální (ze stonku do kořene) a basipetální (z kořene do stonku) transport (Casimiro *et al.*, 2001). Akropetální transport hraje zásadní roli v zahájení a pozdějším vývoji postranních kořenů (Reed *et al.*, 1998). Zatímco basipetální transport má důležitou funkci na zprostředkování růstové odpovědi v kořenové apikální části jako gravitropismus (Rashotte *et al.*, 2000).

Při gravitropismu dochází k sedimentaci statolitů v kořenové špičce, což způsobuje změny orientace vzhledem ke gravitačnímu vektoru (Harrison a Masson, 2008; Morita, 2010). Díky nerovnoměrnému rozložení auxinu dochází k odlišnému růstu nižší a vyšší části kořene, což vede k ohybu a změně směru v závislosti na gravitačním vektoru (Firn *et al.*, 2000; Swarup *et al.*, 2005).

Vztah mezi auxiny a CK je často nazýván antagonistickým, přičemž daleko lepším slovem by bylo doplňujícím. Auxiny pracují společně, dynamicky; někdy dochází k antagonismu a občas naopak k podpoře druhého hormonu za účelem plně kvalitního

vývoje kořene. Jedním z příkladů je kontrola velikosti meristému, kdy po ovlivnění CK dochází ke zmenšení meristému a zvýšení diferenciaci buněk v zóně přechodu (Ioio *et al.*, 2007), zatímco při působení auxinu dochází ke zvětšení velikosti meristému a indukci buněčného dělení ve středu meristému (Blilou *et al.*, 2005). Mnohočetné interakce auxinů a CK při kontrole velikosti meristému jsou řízeny Aux/IAA SHY2 (*short hypocotyl*) proteiny, které působí jako centrální spínače v mechanismu rovnováhy přenosu signálu (Schaller *et al.*, 2015).

Auxiny a CK byly identifikovány jako důležité komponenty lokálního přenosu signálu, čímž se ve významné míře podílí na rostlinném vývoji, především na indukci a udržování meristémů a rostlinné polarity (Uggla *et al.*, 1996). Tyto dvě skupiny hormonů vytváří rovnováhu mezi dělením a diferenciací a stálým neměnným stavem. Auxinové maximum se nachází v kořenové špičce a podporuje funkci nediferencovaných totipotentních buněk, zatímco auxinový gradient můžeme nalézt v zóně dělení, která podporuje buněčnou proliferaci (Ioio *et al.*, 2007). CK potlačují auxinový signál a díky tomu dochází k diferenciaci a určení pozice přechodné zóny. Zvýšením hladiny CK dochází k posunu přechodné zóny, zkrácení meristému a kořenové délky. Opačně při snížení hladiny CK v přechodné zóně dochází k produkci delšího meristému a kořene (Ioio *et al.*, 2012).

3.3.3. Etylen

Etylen způsobuje v rostlinách charakteristickou, tzv. „trojí odpověď“. Ta je založena na třech odlišných morfologických změnách tvaru semenáčku: inhibice prodlužování meristému, radiální ztloustnutí meristému a absenci standardní gravitopické odpovědi. Etylen též způsobuje nadměrné zakřivení apikálního háčku a inhibici primárního kořenového prodlužování (Guzmán a Ecker, 1990). Efekty CK a etylenu na kořen rostlin jsou úzce svázány. Při zkoumání vztahu těchto dvou rostlinných hormonů na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že etylen ve značné míře zprostředkovává odpověď na exogenní CK, jako například inhibici kořenu a prodlužování hypokotylu (Cary *et al.*, 1995). Etylen také hraje důležitou roli v regulaci odpovědi rostliny na programovanou buněčnou smrt (PCD, *programmed cell death*) způsobenou jak biotickými, tak i abiotickými stresovými faktory (De Jong *et al.*,

2002). CK stimulují produkci etylenu, která zase inhibuje kořen a hypokotylové prodlužování. Díky tomu efekt CK na kořenové a hypokotylové prodloužení může být částečně blokován etylenovými inhibitory nebo etylenovými mutanty (neboli rostlinami neschopnými produkovat etylen) (Cary *et al.*, 1995). Zároveň jsou CK efektivnější ve stimulaci produkce etylenu ve spojení s auxiny, zejména v mladých pletivech (Fuchs a Lieberman, 1968; Aharoni *et al.*, 1979).

Etylen hraje důležitou roli jako regulátor biosyntézy auxinu a má značný vliv na lokální rozmístění auxinu v kořeni. Etylen stimuluje biosyntézu auxinu a bazipetální auxinový transport směrem k zóně prodlužování, kde dále aktivuje lokální auxinovou odpověď, která vede k inhibici prodlužování buněk. U mutantních rostlin s defektem v přijímání auxinu nebo v bazipetálním auxinovém transportu nemůže etylen aktivovat auxinovou odpověď a regulovat růst kořene (Růžička *et al.*, 2007).

3.4. Programovaná buněčná smrt

Vývoj mnohobuněčných, stejně jako jednobuněčných organismů závisí na mnoha fyziologických faktorech, mezi které patří i programovaná buněčná smrt (PCD) (Kunikowska *et al.*, 2012). Buněčná smrt může být indukována vnitřními nebo vnějšími signály, které mohou být enviromentální (van Doorn a Woltering, 2005), stejně jako chemické (Rao *et al.*, 2008). Rostliny produkují mnoho chemických látek způsobující PCD u lidských, živočišných i rostlinných buněk. Tyto sloučeniny mohou být fenoly, flavonoidy, glykoproteiny (Carimi *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2008). Bylo dokázáno, že i některé CK, např. BAP, kinetin nebo zeatin mají podobné účinky (Kunikowska *et al.*, 2012).

Buněčná smrt může v rostlinách probíhat autolytickou, nebo neautolytickou cestou, avšak nejsou žádné důkazy o PCD cestou apoptózy. Autolytická smrt probíhá především během normálního rostlinného vývoje, nebo je způsobená abiotickým stresem. Hlavní příčinou neautolytické PCD je interakce s rostlinným patogenem. Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami spočívá v prasknutí tonoplastu. Při autolytické smrti tonoplast praskne již při PCD a obsah vakuoly přispívá k smrti buňky, zatímco u neautolytické tonoplast praskne až ve chvíli, kdy je buňka mrtvá (van Doorn, 2011). PCD se projevuje snižováním cytoplasmy a počtu buněk, kondenzací jader

(Carimi *et al.*, 2003) a také jejich fragmentací. Někdy dochází k rozbití chromatinu na DNA fragmenty, uvolňování cytochromu c, formaci DNA obsahujících apoptických tělísek, přítomnosti apopticky specifických kaspázových nebo metakaspázových enzymů, aktivaci 28 kDa endonukleázy (Kunikowska *et al.*, 2012) a inhibici buněčného dělení (Carimi *et al.*, 2003).

Při aplikaci kinetinu na kořeny rostliny *Vicia faba* ssp. *minor* docházelo k PCD ve střední vrstvě kortexu parenchymatických buněk, nikoliv v buňkách meristematických. Kinetin ovlivňuje morfologii jader, nukleární chromatin a DNA degradaci během buněčné smrti. Po aplikaci kinetinu dochází ke zvýšení kondenzace nukleárního chromatinu, formaci mikrojadern, invaginaci, degradaci chromatinu a fragmentaci jader. Po delší aplikaci kinetinu (96 hodin) dochází ke zvýšení degradace a fragmentace jader. Kinetin ovlivňuje množství buněk v jednotlivých fázích cyklu buněčného dělení, a to nadpolovičním zvýšením buněk v G1 fázi a snížením buněk v ostatních fázích v zóně meristematických buněk. U zóny obsahující rostoucí a diferenciační buňky dochází jen k mírnému zvýšení v G1 fázi, S fáze je nezměněna a počet buněk v G2 fázi je snížen. Kinetin také snižuje aktivitu dehydrogenázy v zóně obsahující rostoucí a diferenciační buňky, která je doprovázena snížením počtu mitochondrií. Aplikací kinetinu se zvyšuje vodivost buněčných elektrolytů a formování vakuol, které často fúzí za vzniku velkých vakuol s kyselým pH. Dalším velmi podstatným efektem je ovlivnění růstu, při kterém dochází ke zvýšení hmotnosti a tloušťky kořene (Kunikowska *et al.*, 2012).

Prvotní děj, který předchází hypersenzitivní odpovědi rostliny na PCD je influx vápenatých iontů do cytoplazmy, aktivace MAP-kinázové kaskády a produkcí salicylové kyseliny, oxidu dusíku a aktivních forem kyslíku (Hayward *et al.*, 2009). Influx vápenatých iontů do cytoplazmy zadrží buňku v G1 a G2 fázi přímou, nebo nepřímou cestou. U některých buněk dochází též k procesu PCD díky DNA kondenzaci, segmentaci jader a DNA degradaci pomocí nukleáz (Jan *et al.*, 2008; van Doorn, 2011). Vápenaté ionty zároveň prochází do mitochondrií, kde způsobují produkci reaktivních forem kyslíku (Jan *et al.*, 2008; Cacas, 2010; van Doorn, 2011), které ničí jadernou DNA a/ nebo indukují procesy buněčné smrti (Roy *et al.*, 2008). V poslední řadě dochází k postupnému zvyšování fúze kyselých lytických vakuol, které pohlcují a ničí protoplasty umírajících buněk (Scott a Logan, 2008; Jan *et al.*, 2008; McCall, 2010; van Doorn *et al.*, 2011).

3.5. *Vicia faba* – modelová rostlina

V bakalářské práci vycházím ze studie A. Kunikowske *et al.* 2012, ve které byla zkoumána kinetinem indukovaná buněčná smrt kořenových buněk. V této studii byla použita jako modelová rostlina *Vicia faba*, konkrétně ssp. *minor*, jelikož rostlina nevyžaduje práci ve sterilních podmínkách laminárního boxu (není tolik náchylná na plísně), její kořen roste velmi rychle a je dostatečně široký pro pozdější studie. Tato rostlina patří do čeledi bobovitých (*Fabaceae*) a do češtiny je její název překládán jako Bob obecný, ve starší literatuře Bob koňský (Adsule a Akpapunam, 1996). Bob obecný je jednou z nejstarších hospodářských plodin. Bylo zjištěno, že semena se nacházela v severozápadní Sýrii již před deseti tisíci lety, a proto byl podán návrh k zařazení této rostliny mezi zakladatelské plodiny (Tanno a Willcox, 2006). Tato čeleď je velmi rozmanitá, proto došlo k botanické klasifikaci semen do 3 skupin: „*major*” (velké semena), „*equine*” (středně velké semena) a „*minor*” (malá a kulatá semena) (Tanno a Willcox, 2006). Díky malému počtu (šesti) mimořádně velkých a lehce pozorovatelných chromozomů se bob obecný stal modelovou rostlinou pro cytogenetické výzkumy v 70-tých a 80-tých letech. V pozdějších letech však byl nahrazen rostlinami *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní) a *Medicago sativa* (Tolice vojtěška) (O'Sullivan a Angra, 2016).

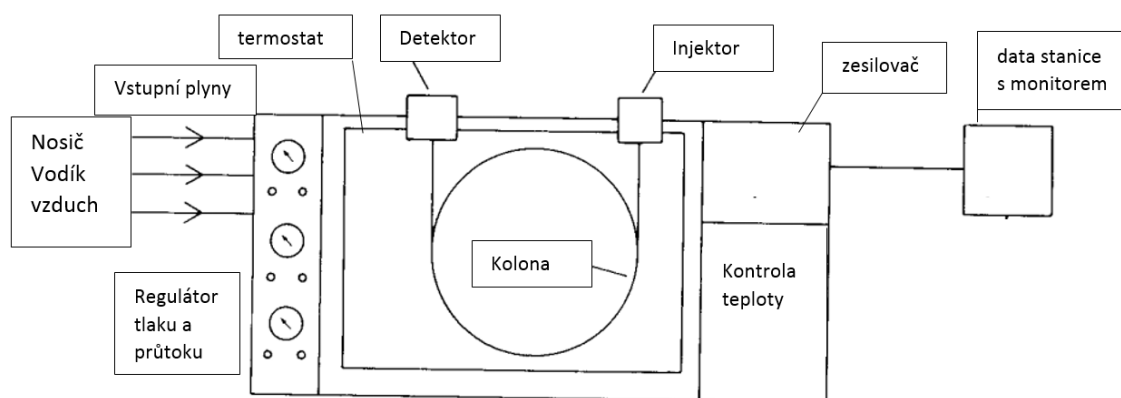
3.6. FID plynová chromatografie

Detektor používající ionizaci plamenem (FID; *flame ionization detector*) je velmi výhodný pro studium organických sloučenin pomocí plynové chromatografie. Díky uživatelské jednoduchosti, přesnému měření a sensitivitě se tato metoda stala základním prostředkem měření etylenu produkovaného rostlinami (Ward *et al.*, 1978).

Při plynové chromatografii dochází k separaci plynného analytu mezi mobilní a stacionární fází (Obr. 3). Mobilní fáze je chemicky inertní plyn, který slouží jako nosič molekul analytu skrze vyhřátou kolonu. Stacionární fáze je buďto pevný adsorbant, nebo tekutina na inertním nosiči. Sloučenina přeměněná odpařením na plyn je injektována do chromatografické kolony, poté je nesena inertním plynem, často heliem nebo dusíkem, a následně dochází k rozdělení složek. Složky jsou rozděleny

na základě odlišné schopnosti poutat se na stacionární fázi (Skoog *et al.*, 2007; Hubschmann, 2008).

Sloučenina přichází do detektoru pumpováním a následně prochází přes plamen. Plamen je běžně produkován za přítomnosti vodíku a vzduchu. Po průchodu vzorku plamenem dojde k produkci iontů a elektronů. Tyto elektrony prochází mezi dvěma elektrodami s odlišným potenciálem v řádu stovek voltů. Intenzita proudu je přímo úměrná množství analytu (iontů) přítomných v detektoru (Stauffer *et al.*, 2008).



Obr. 3: Schematická reprezentace základní plynové chromatografie (upraveno dle *Gass Chromatography*, 1995)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a metody

4.1.1. Rostlinný materiál a použité chemikálie

Jelikož tato práce vychází z experimentů publikovaných v práci Kunikowská *et al.*, 2012, byla v této práci použita totožná modelová rostlina *Vicia faba ssp. minor*.

Rostlinné hormony kinetin, BAP a *meta*-topolin byly zakoupeny u firmy Olchemim (Olomouc, ČR). Rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Německo).

4.1.2. Optimalizace pěstování semen

4.1.2.1. Příprava semen před namáčením

V první části mé práce byly zkoumány ideální podmínky k přípravě semen před klíčením. Semena byla vždy uchována v lednici z důvodu sjednocení klíčivosti. V mých předcházejících experimentech nebyla semena nijak sterilizována, proto bylo nejdříve zkoumáno, jestli sterilizace ovlivní růst a v jaké formě. Semena byla namočena do roztoku 4% Sava (chlornan sodný) s destilovanou vodou po dobu 10 minut před namáčením. Z pozdějších pozorování jsem došla k závěru, že sterilizace není nezbytná, jelikož semena nejsou náchylná ke kontaminaci a naopak vystavení semen sterilizačním prostředkům může způsobit poškození semen a zpomalení růstu.

4.1.2.2. Délka namáčení a klíčení semen

V dalším kroku byla nalezena ideální doba namáčení. Semena byla namočena do deionizované vody a kádinka byla přikryta alobalem, aby nedošlo ke kontaminaci, a umístěna do temné komory. Namáčení probíhalo za pokojové teploty. Do exikátoru byla vložena deska a na ní přeneseno 6 vrstev buničiny. Do buničiny byly následně udělány díry odpovídajícím otvorům v desce a nakonec nalito 1,5 litru vody (Obr. 4). Následně byla semena přenesena na buničinu umístěnou na desce v exikátoru v intervalech 1,5; 2; 2,5 a 3 hodiny. Růst probíhal v uzavřeném exikátoru, který byl provzdušňován vzduchovacím motorkem po dobu 72 hodin a poté byly výsledky fotograficky zaznamenány a vyhodnoceny. Experiment byl 2x zopakován.

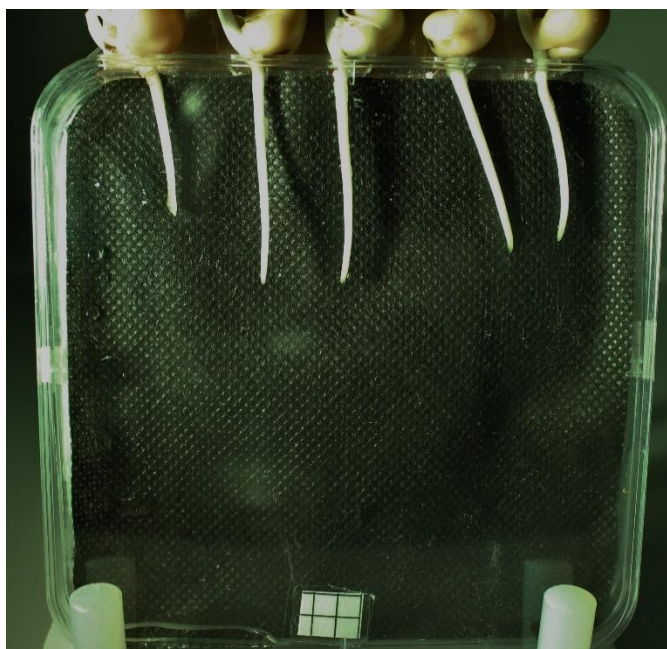


Obr. 4: Aparatura ke klíčení semen sestavená z exikátoru a vzduchovacího motorku

4.1.2.3. Růst semen a ošetření hormony

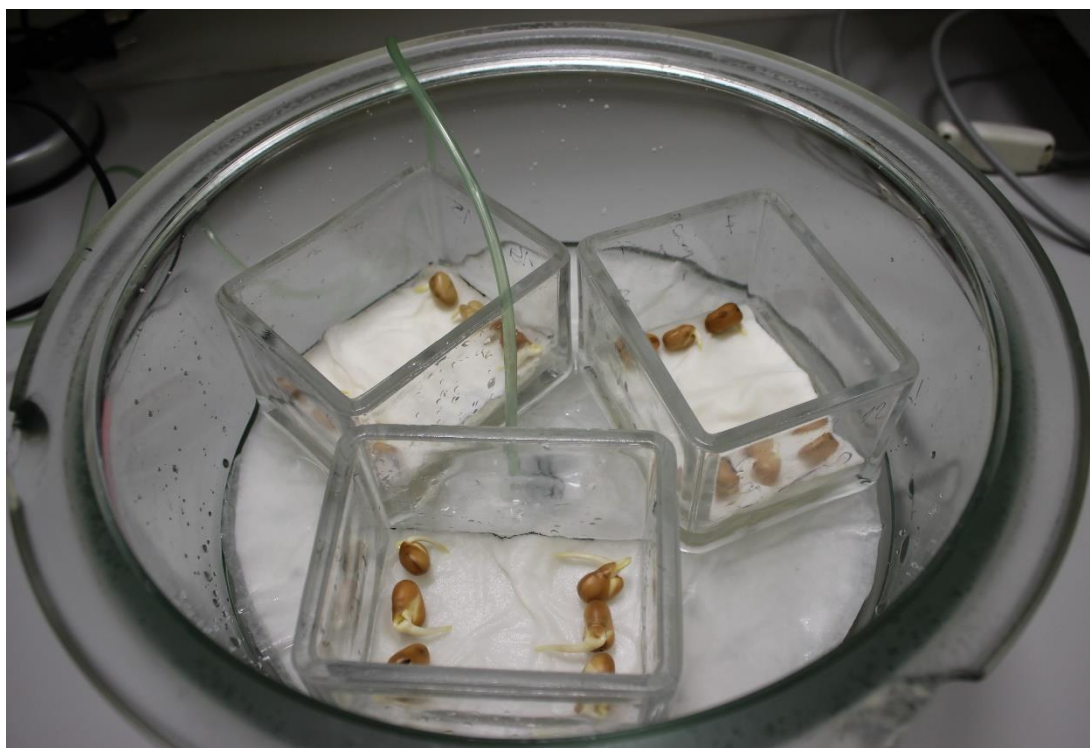
Optimalizace růstu musela korespondovat s vhodnou obrazovou analýzou. V prvních pokusech byly použity čtvercové Petriho misky, které byly upraveny pro růst semenáčků, a to vyvrtáním 5-ti děr do horní strany misky (Obr. 5). Po optimalizaci bylo do misek vloženo 6 vrstev buničiny a na ně tvrdý papír, prvotně bílé a v následujících experimentech modré. Na tyto vrstvy byl nanesen roztok deionizované vody (20 ml) a miska byla utěsněna parafilmem, aby se zabránilo úbytku vlhkosti. Následně byly misky umístěné do stojanu, v první fázi kolmo a v pozdějších experimentech pod úhlem 45°, čímž se dosáhlo lepšího růstu díky vyšší přiléhavosti ke zvlhčenému materiálu. Růst v těchto podmínkách probíhal dobře a kořínky bylo možné fotografovat přímo v Petriho miskách. Bohužel nebylo možné kvůli špatnému kontrastu provést obrazovou analýzu.

Došlo ke změně podkladového materiálu za netkanou mulčovací textilií, která při fotografování poskytla dobrý kontrast. Problémem tohoto materiálu ale byly sorpční vlastnosti, kořínky během kultivace usychaly, a proto byla z pokusů vyřazena.



Obr. 5: Čtvercová Petriho miska uzpůsobená pro vertikální růst rostlin

Od vertikálního pěstování tedy bylo upuštěno a byly využity horizontálně umístěné skleněné misky. Semenáčky byly po naklíčení přeneseny z exikátoru do připravených skleněných misek. V miskách se nacházelo 20 vrstev buničiny, které byly poté zality 20 ml destilované vody s 0,5% DMSO (negativní kontrola) nebo roztokem CK (*meta*-topolin, kinetin, BAP) o molární koncentraci 46 μ M, tedy koncentrací korespondující s podmínkami v Kunikowská *et al.*, 2012. Takto připravené misky se semenáčky byly přemístěny do exikátoru. Ten obsahoval 6 vrstev buničiny ve tvaru kruhu s dírou uprostřed a bylo v něm nalito 2200 mL vody tak, aby během experimentu nedocházelo k nadměrnému srážení na stěnách exikátoru. Exikátor byl poté uzavřen, do spodní části s vodou byl pomocí otvoru vložen vzduchovací motorek, který sloužil k provzdušnění nádoby, aniž by došlo ke kontaminaci rostlin nebo úbytku vlhkosti (Obr. 6).



Obrázek 6: Horizontální aparatura pro růst rostlin využívající exikátor

4.1.3. Obrazová analýza

K pořizování fotografií byl použit fotoaparát Canon EOS 600D. Fotografie kořenů byly pořizeny na černém tvrdém papíru, na který byly semenáčky přeneseny z kultivačních misek, vyfoceny a poté nazpět vloženy do misek a umístěny do exikátoru. Následně byly fotografie vyhodnoceny pomocí programu ImageJ. V tomto programu byla změřena délka vyfotografovaných kořínků a také jejich projektovaná plocha.

4.1.4. Měření obsahu etylenu

Pro měření produkce etylenu rostlinou *Vicia faba* byla semena naklíčena stejným způsobem jako v předchozích experimentech. Po 72 hodinách klíčení byla semena přemístěna do deseti Erlenmeyerových baněk (6 vzorků s BAP, 4 vzorky s DMSO) a čtyř láhvi se septem (2 vzorky s BAP a 2 vzorky s DMSO), do kterých bylo předem umístěno 20 vrstev buničiny a přidána deonizovaná voda s BAP (o koncentraci 43 μM), nebo 0,5 % DMSO (kontrola). Do každé Erlenmeyerovy baňky bylo vloženo 5 semenáčků, do láhve kvůli menší velikosti byly vloženy jen 3. Z laboratorních rukavic byly odstříženy prstové části, které byly poté použity na uzavření Erlenmeyerových baněk. Následně byly baňky i láhve utěsněny parafilmem.

Následující den došlo k odebrání etylenu. Odběr vzorku byl prováděn injekční stříkačkou 2,5 ml. Bylo odebráno 1,5 ml vzduchu, jehož objem byl před nástřikem snížen na 1 ml. Po odběru byla polovina vzorků na několik sekund odvětrána, poté byl u baněk byl vyměněn uzávěr a byly opětovně uzavřeny. Odvětrávání bylo provedeno každý den u stejných lahví a baněk.

Pro měření vyprodukovaného etylenu byla použita plynová chromatografie s plamenoionizačním detektorem (GC-FID). Odebraný vzduch o objemu 1 ml byl analyzován pomocí plynového chromatografu Agilent GC6890 za pomoci FID detektoru a 50m kapilární kolony (HP-AL/S stacionární fáze, 15 μm , i.d. = 0,535). Teplota nástřikového prostoru byla nastavena na 200 °C, teplota kolony na 150 °C a teplota detektoru na 220 °C. Měření bylo provedeno v jednom opakování pro každý odebraný vzorek.

5. VÝSLEDKY

5.1. Optimalizovaný postup pro pěstování rostlinného materiálu

V této práci došlo k optimalizaci růstu kořene rostliny *Vicia faba* ssp. *minor*. Semena uchovaná v lednici není nutno nijak sterilizovat, jelikož sterilizace vedla ke zhoršení klíčivosti, navíc u nesterilizovaných semen nebyla pozorována žádná kontaminace. Ideální doba namáčení byla určena jako 2,5 hodiny. U semen s kratší dobou namáčení, bylo započato klíčení později, nebo vůbec. Zároveň u semen namočených po delší dobu se občas ukazovalo pozdější plesnivění.

Ke klíčení semen byl vybrán exikátor, který byl provzdušňován motorkem. Po 72 hodinách klíčení byly semenáčky po 6 kusech vloženy do připravených misek, které obsahovaly 20 ml roztoku hormonů (o molární koncentraci 46 μM), nebo DMSO (0,5%).

Focení rostlin probíhalo na černém papíře v temné komoře pouze za použití zeleného světla, a to po dobu pěti dní od přenesení rostlin do misek (první focení 72 hodin po započatí klíčení).

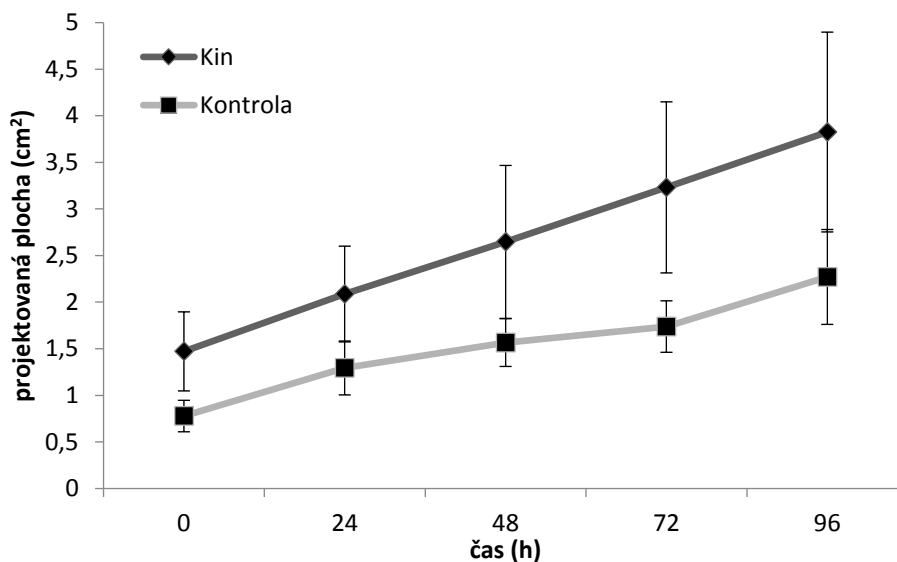
5.2. Porovnání délky a projektované plochy

Z fotografií byla získána data o délce a projektované ploše kořenů po jejich ošetření různými CK. Získaná data byla dále zpracována do grafů, výsledky byly vyhodnoceny a porovnány s kontrolními rostlinami (Obr. 7-12). Každý CK byl otestován minimálně ve třech opakováních.

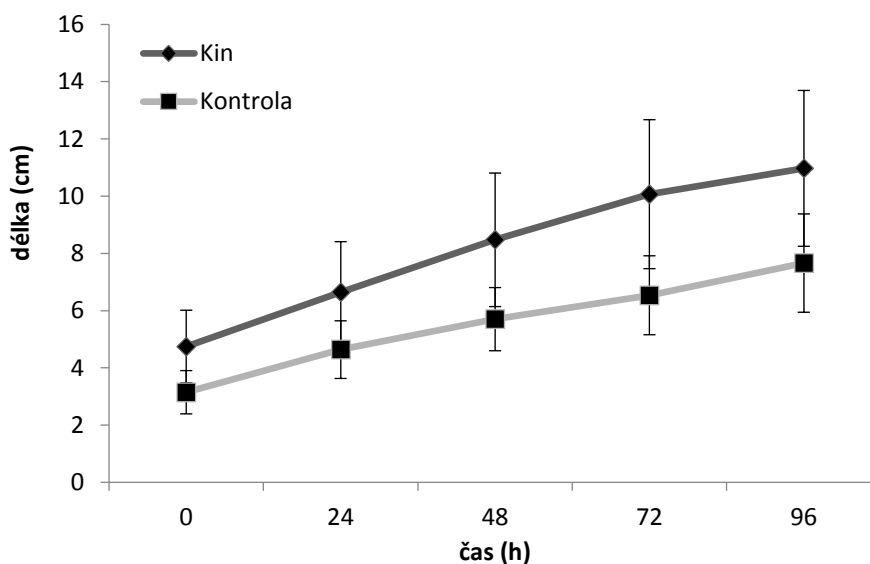
5.2.1. Kořeny ošetřené kinetinem

Data získaná z růstu kořene ovlivněného kinetinem byla srovnána s kořeny kontroly. Z grafu zobrazujícího projektovanou plochu kořene (Obr. 7) je patrné, že jak u kontroly, tak i u kořenů ovlivněných kinetinem docházelo k lineárnímu zvětšování plochy. V následujícím grafu, na němž je zobrazeno srovnání kontroly a efekt kinetinu na délku

kořene, je vidět jen mírný inhibiční efekt v posledním dnu pozorování (Obr. 8). Kinetin tedy nevykazoval inhibiční efekt na plochu kořene a jeho vliv na délku kořene se projevil jen nepatrně ve čtvrtém dnu testování.



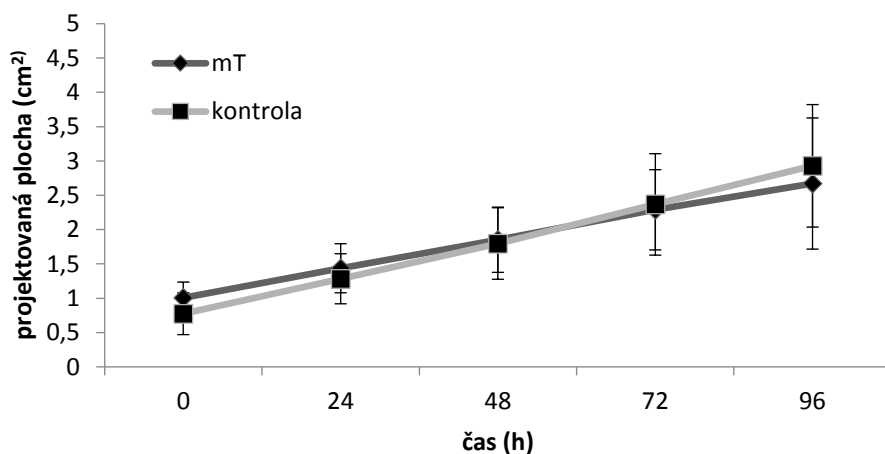
Obr. 7: Zobrazení projektované plochy kořenů vystavených kinetinu ($46 \mu\text{M}$) ve srovnání s kontrolou v čase



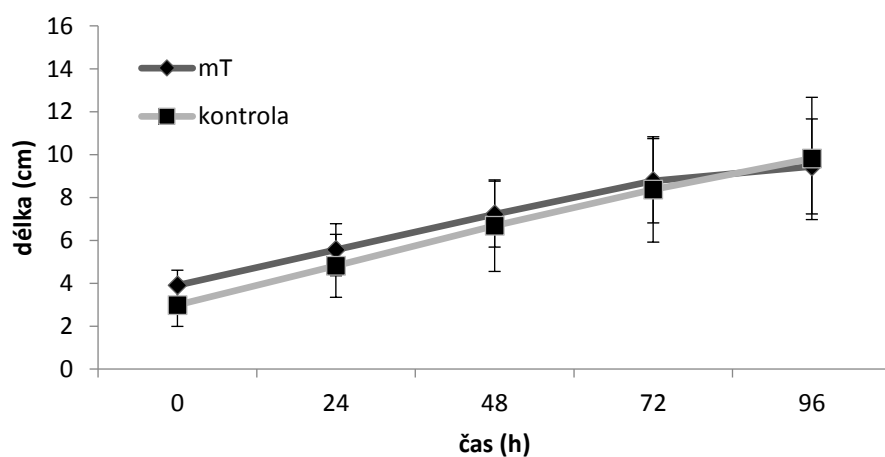
Obr. 8: Zobrazení délky kořenů vystavených kinetinu ($46 \mu\text{M}$) ve srovnání s kontrolou v čase

5.2.2. Kořeny ošetřené *meta*-topolinem

Při dalším testování byly kořeny rostlin vystaveny *meta*-topolinu. Projektovaná plocha kořene (Obr. 9) lineárně rostla stejně jako u předchozích experimentů s kinetinem. Co se týče délky (Obr. 10), docházelo ke zvětšování velikosti kořene, které se ale postupem času zpomalovalo. V posledním dnu je patrný nejmenší přírůstek délky díky inhibici CK. *meta*-Topolin vykazoval silnější efekt na kořeny než kinetin.



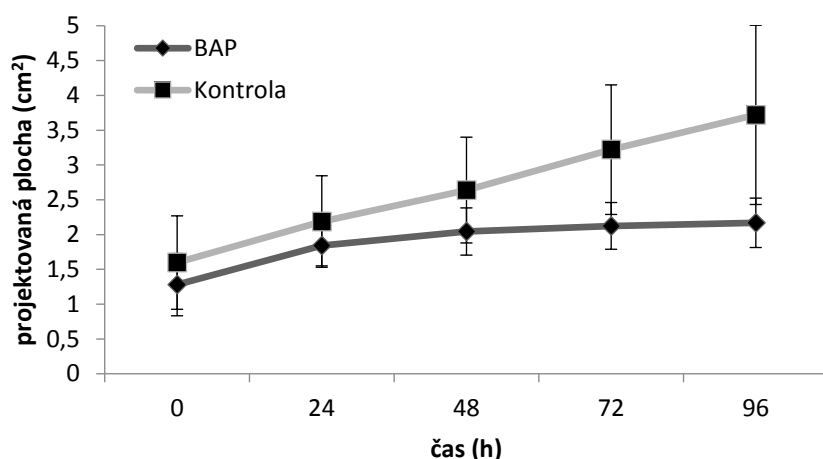
Obr. 9: Zobrazení projektované plochy kořenů vystavených *meta*-topolinu (46 μ M) ve srovnání s kontrolou v čase



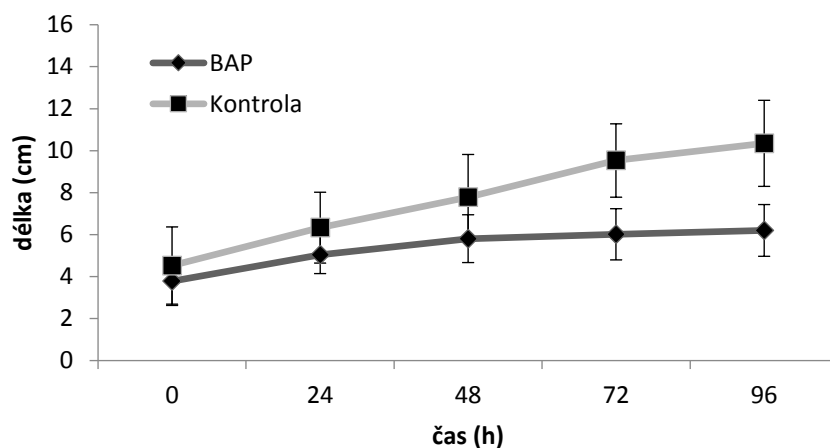
Obr. 10: Zobrazení délky kořenů vystavených *meta*-topolinu (46 μ M) ve srovnání s kontrolou v čase

5.2.3. Kořeny ošetřené BAP

Posledním zkoumaným hormonem byl BAP. Po vystavení rostliny tomuto hormonu došlo ke změně plochy již po 24 hodinách, kdy příbytek projektované plochy byl značně menší než ve srovnání s kontrolou (Obr. 11). V dalších dnech docházelo jen k malým změnám plochy. Každým dnem se přírůstek plochy zmenšoval a v posledním dnu byl téměř nepatrný. Stejně tak i u délky kořenů (Obr. 12) byla pozorována obdobná inhibice jako u projektované plochy. Příbytek délky se zmenšoval už po 24 hodinách a postupně docházelo k téměř úplnému zastavení růstu. U kontrolních rostlin se růst i plocha kořene po celou dobu pozorování zvětšovala. Ve srovnání s kinetinem a *meta*-topolinem projevoval BAP nejsilnější inhibiční efekt, a to jak na délku, tak i na plochu kořene.



Obr. 11: Zobrazení plochy kořenů vystavených BAP (46 μ M) ve srovnání s kontrolou v čase



Obr.12: Zobrazení délky kořenů vystavených BAP (46 μ M) ve srovnání s kontrolou v čase

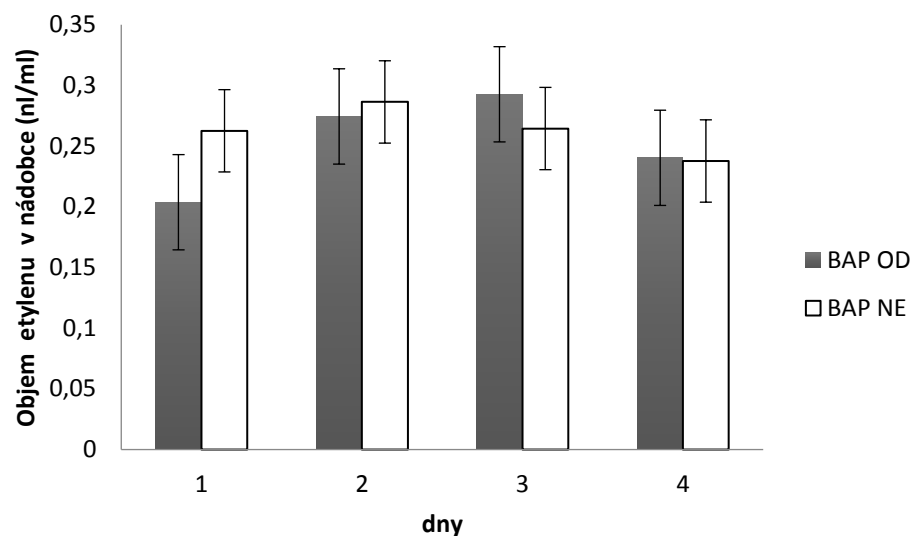
5.2.4. Porovnání ovlivnění kořene různými cytokininy

Největší inhibiční efekt na kořen měl hormon BAP. Po vystavení kořene tomuto CK docházelo ke snižování projektované plochy a délky kořene a postupnému zastavení růstu. Naopak nejmenší efekt měl kinetin, který ovlivnil kořenový růst jen ve velmi slabé formě. Růst kořenů vystavených *meta*-topolinu byl též slabě zpomalen v posledním dnu pozorování. Inhibice tímto hormonem byla více patrná než u kinetinu.

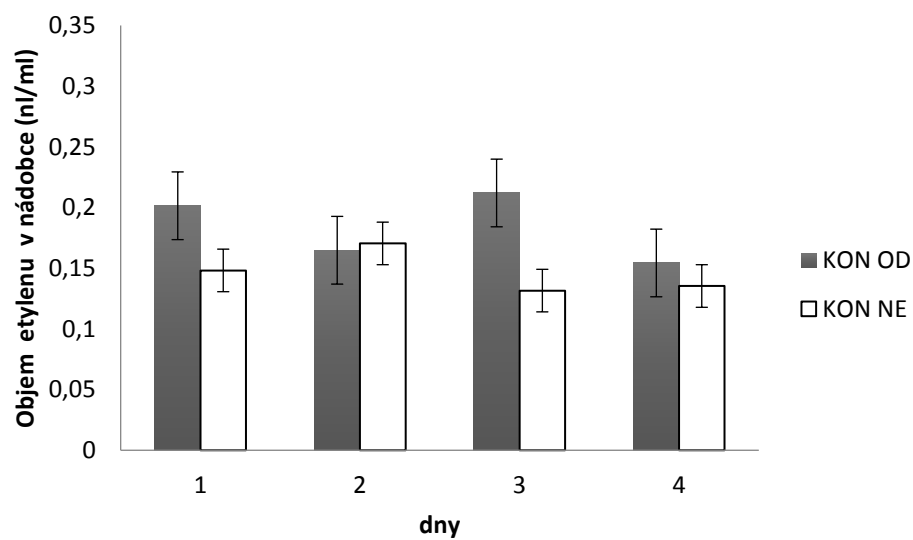
5.3. Produkce etylenu

V této části práce byly vyzkoušeny dvě metody měření etylenu produkovaného rostlinou. V prvním uspořádání byly rostliny umístěny do Erlenmeyerovy baňky, kde byly následně uzavřeny pomocí latexových prstů odstřižených z laboratorních rukavic. Ve druhém uspořádání byly použity láhve se septem.

Data obdržená z FID plynové chromatografie o produkci etylenu rostlinou ošetřenou BAP (Obr. 13) anebo kontrolních rostlin (Obr. 14) v Erlenmeyerových baňkách byla vložena do grafů. Mezi ošetřenými i neošetřenými rostlinami byl pozorován pouze slabý rozdíl, stejně tak mezi odvětrávanými a neodvětrávanými variantami, což jak ukázal následující experiment, bylo způsobeno pravděpodobně netěsností použitého systému.

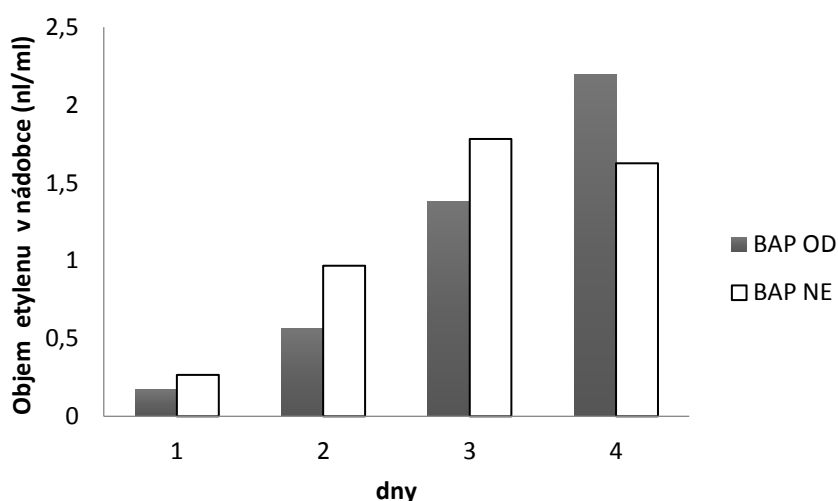


Obr. 13: Srovnání objemu etylenu vyprodukovaného rostlinkami *Vicia faba* vystavené BAP ($46 \mu\text{M}$) v Erlenmeyerově baňce (OD= odvětrávaná, NE= neodvětrávaná)

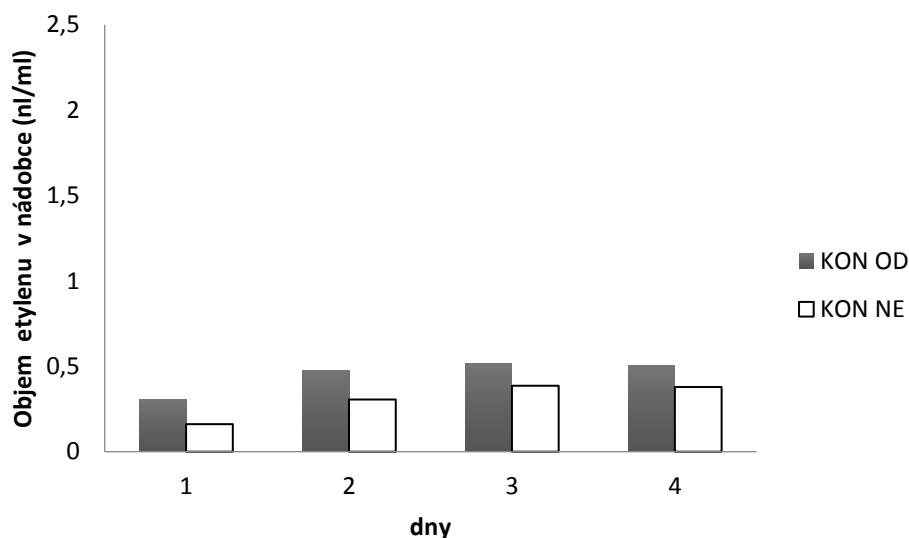


Obr. 14: Srovnání objemu etylenu vyprodukovaného rostlinkami *Vicia faba* v Erlenmeyerové baňce (OD= odvětrávaná, NE= neodvětrávaná)

Při použití lahví se septem byl na první pohled patrný rozdíl v hladině etylenu u kontrolních a BAP ošetřených kořenů, stejně tak mezi odvětrávanou i neodvětrávanou variantou. Zatímco u kontrolní skupiny zůstává hladina etylenu po celou dobu srovnatelná, u ošetřených kořenů je patrný růst koncentrace sledovaného plynu. U odvětrávané varianty je po celou dobu trvání experimentu patrný pozvolný nárůst hladiny etylenu, která čtvrtý den dosahovala 13ti násobku původní hladiny. Koncentrace etylenu u neodvětrávané varianty byla první, druhý i třetí den vyšší než u odvětrávané varianty, avšak maximum bylo dosaženo již třetí den a činilo 10,5 násobek původní hladiny. Čtvrtý den již hladina etylenu nerostla. Důvodem mohlo být nasycení neodvětrávané lahve etylenem, což vedlo k inhibici jeho produkce.



Obr.15: Srovnání objemu etylenu vyprodukovaného rostlinkami *Vicia faba* vystavené BAP (46 μ M) v láhvi se septem (OD= odvětrávaná, NE= neodvětrávaná)



Obr. 16: Srovnání objemu etylenu vyprodukovaného rostlinkami *Vicia faba* vystavené v baňce se septem (OD= odvětrávaná, NE= neodvětrávaná)

5.3.1. Porovnání účinnosti použitých metod

Jak je patrné z předchozích grafů (Obr. 13-16), metoda měření etylenu v Erlenmeyerových baňkách utěsněných latexovými prsty rukavice není v tomto uspořádání použitelná, jelikož dochází k úniku sledovaného plynu.

Oproti tomu při použití láhve se septem je patrný vliv BAP na kořeny ovlivněných rostlin. Hladina BAP skokově roste do třetího dne, kdy dochází k inhibici produkce etylenu, pravděpodobně díky nasycení atmosféry nádoby tímto plynem. Inhibici produkce etylenu je možné určit díky srovnání s odvětrávanou variantou, ve které se hladina etylenu nadále zvyšuje. U kontrolního skupiny je produkce etylenu výrazně nižší a během celého experimentu se téměř nemění.

6. DISKUZE

Správné pěstování rostlin je základní podmínkou úspěšného experimentu. K dosažení této podmínky je nezbytná optimalizace růstových podmínek. Metoda optimalizovaná v této práci umožňuje pozorování růstu kořenů v čase, díky čemuž můžeme získat komplexnější pohled na vliv CK než metodou, kdy dochází k odříznutí kořenů po jednotlivých časových úsecích uvedené ve studii Kunikowská *et al.*, 2012. Nutno dodat, že úhel zeleného světla, pod kterým světlo dopadá na rostlinu, výrazně ovlivňuje obrazovou analýzu, jelikož program ImageJ vyhodnocuje jinak kořeny s odlišným osvětlením, a proto je nutné vždy dodržovat stejný úhel.

Efekt CK a etylenu je úzce svázán. Etylen má nemalý podíl na inhibici kořene a zároveň i na PCD (Cary *et al.*, 1995; De Jong *et al.*, 2002). Ve mnou optimalizované metodě byl růst semenáček podpořen během celého růstu provzdušňováním. Díky tomu byl růst prokazatelně rychlejší a kvalitnější, avšak zároveň i díky otevírání exikátoru docházelo k velkému úniku tohoto plynu, což mohlo ovlivnit experimenty. Je nutné ale zmínit studii Bertell a Eliasson, 1992, ve které byl zkoumán efekt mimo jiné i BAP a interakce etylenu s CK na *Pisum sativum* (Hrách setý). Při tomto experimentu bylo taktéž použito provzdušnění a semenáčky nebyly uzavřeny v žádné laboratorní pomůcce.

V druhé části práce byly zkoumány efekty CK na kořen. Po porovnání architektury kořene kontrolní rostliny a CK ošetřeného kořene byla pozorovatelná kratší délka kořene. Inhibice kořenového růstu způsobena CK byla dokázána mnohými studiemi, například Aloni *et al.*, 2006. Hormon BAP vykazuje inhibici i u dalších druhů rostlin, jako *Pisum sativum* (Bertell a Eliasson, 1992), *Daucus carota* (Mrkev obecná) a *Arabidopsis thaliana* (Carimi *et al.*, 2002).

Inhibice růstu kořenů nebyla patrná u kinetinu a jen mírně byla pozorovatelná u *meta*-topolinu. U CK BAP byla jako u jediného zkoumaného fytohormonu prokázána silná inhibice růstu, a to snížením příbytku velikosti, ke které docházelo od druhého dne po vystavení kořenů rostlin tomuto hormonu. Stejně výsledky při experimentech s BAP byly získány ve studii Bertell a Eliasson, 1992 u rostliny *Pisum sativum*. Inhibice kořenového růstu je dokázána i u mnohých dalších rostlinných druhů. Velké množství studií se zabývalo vlivem různých CK na různé kultivary banánů, zejména „Williams“ (Bairu *et al.*, 2008; Aremu *et al.*, 2012; Aragón *et al.*, 2013). Ve studii Valero-Aracama

et al., 2009 byly testovány CK na rostlinách *Uniola paniculata* L. (Mořský oves). Testování vlivu CK na *Arabidopsis thaliana* neboli huseníček rolní bylo zkoumáno například studii Žďárská *et al.*, 2012.

Dalším viditelným efektem CK byl patrný úbytek postranních kořenů. Tento poznatek se shoduje se výsledky studií Laplaze *et al.*, 2007 a Marhavý *et al.*, 2011. Stejně jako ve studii Cary *et al.*, 1995 u kořenů vystavených CK, zvláště BAP, docházelo k nadměrnému kroucení kořenů.

Z námi testovaných hormonů vykazoval nejsilnější inhibiční efekt hormon BAP, zatímco nejslaběji působil hormon kinetin. Tyto výsledky jsou ve shodě se studii Stehlik, 1982, kde ale nebyl zkoumán efekt *meta*-topolinu.

Jako důležitý faktor ovlivňující růst kořene v přítomnosti CK byla stanovena počáteční délka naklíčených rostlin. Pokud byl kořen již před vystavením CK dobře vyvinut, respektive délka byla několik centimetrů, potom CK měl nižší efekt než u kořene méně vyvinutého a získaná data se více podobala kontrole. Je tedy důležité, aby kořeny po klíčení v exikátoru nebyly příliš dlouhé, délka by neměla přesáhnout 2-3 cm.

Data získaná z FID-GC potvrzují zvýšenou hladinu etylenu společně s CK. Tento fakt je zvláště patrný u kontroly v láhvi se septem, kde je hladina etylenu u kontroly daleko nižší. Data nám tedy potvrdila, že CK stimuluje etylenovou produkci stejně jako ve studii Cary *et al.*, 1995.

7. ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo nalezení ideálních podmínek pro pěstování rostliny *Vicia faba* a ovlivnění jejího růstu exogenně aplikovanými CK. Rostliny byly namáčeny po dobu 2,5 hodiny v neionizované vodě. Následně byla semena přenesena do exikátoru, kde byla naklíčena po dobu 72 hodin. V posledním kroku byla přenesena do skleněných misek a nadále vystavena efektu jednoho z CK, nebo DMSO.

Dalším bodem této práce bylo zkoumání efektu třech CK na tuto rostlinu s následným srovnáním. U rostlin ovlivněných CK bylo pozorováno postupné zpomalení růstu kořenů, úbytek postranních kořenů a ztloustnutí hlavního kořene. Nejsilnější efekt vykazoval BAP, který způsobil až postupné zastavení růstu. Naopak nejslabší efekt byl pozorován u kinetinu, kdy se kořeny lišily od kontrolních rostlin pouze nepatrně.

V práci byla měřena délka a povrch kořene v průběhu růstu z důvodu změny tvaru kořene vlivem efektu CK. Tyto parametry byly vyhodnoceny pomocí obrazové analýzy, čímž se docílilo pozorování vlivu CK v časovém úseku. Pro tento účel byl vybrán program ImageJ.

Jelikož produkce etylenu je úzce svázána s vlivem CK, byly v poslední části práce zkoumány možné metody studia produkce etylenu rostlinou *Vicia faba*. Byly testovány dvě metody, a to sice měření etylenu v láhvích se septem a Erlenmeyerových baňkách uzavřených odstřiženými latexovými prsty rukavic. Druhá zmíněná metoda se v tomto experimentu ukázala jako neefektivní. Z první metody jsme získaly data implikující postupné zvyšování etylenu u kořenů vystavených BAP, které bylo ale u neodvětrávané varianty zastaveno a hladina etylenu v posledním dni již nerostla, nejpravděpodobněji díky nasycení atmosféry láhve tímto plynem.

Optimalizace růstové metodiky by mohla usnadnit hlubší studium efektů CK na kořen rostlin *Vicia faba* a umožnit následné zkoumání programované buněčné smrti.

8. LITERATURA

Citace článku:

Aharoni N., Anderson J. D., Lieberman M. (1979): Production and action of ethylene in senescing leaf discs. Effect of indoleacetic acid, kinetin, silver ion, and carbon dioxide. *Plant Physiology* **64**, 805-809.

Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich C. I. (2006): Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Annals of Botany* **97**, 883–893.

Aragón C. E., Sánchez C., Gonzalez-Olmedo J., Escalona M., Carvalho L., Amâncio S. (2013): Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. *Biologia Plantarum* **58**, 29–38.

Aremu A. O., Bairu M. W., Szűčová L., Doležal K., Finnie J. F., Van Staden, J. (2012): Shoot and root proliferation in “Williams” banana: are the topolins better cytokinins? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **111**, 209–218.

Bairu M. W., Stirk W. A., Doležal K., Van Staden J (2008): The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (Musa spp. AAA). *Plant Cell Tissue Organ Culture* **95**, 373–379.

Bajguz A., Piotrowska A. (2009): Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**, 957-969.

Barbez E., Kubeš M., Rolčík J., Béziat C., Pěnčík A., Wang B., Rosquete M. R., Zhu J., Dobrev P. I., Lee Y., Zažímalová E., Petrášek J., Geisler M., Friml J., Kleine-Vehn J. (2012): A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* **485**, 119–122.

Baster, P., Robert, S., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., Kania, U., Grunewald, W., De Rybel, B., Beeckman, T., Friml, J. (2012): SCF(TIR1/AFB)-auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism. *The EMBO journal*, **32**, 260-74.

Benková E., Hejátko J. (2009): Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Molecular Biology* **69**, 383–396.

Benková E., Zažímalová E., Geisler M., Friml J. (2009): Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**, 1136–1140.

Bertell G. A Eliasson L. (1992): Cytokinin effect on root growth and possible interaction with ethylene and indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum* **84**, 255-261.

Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005): The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**, 39–44.

Cacas J. L. (2010): Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system? *Plant, Cell and Environment* **33**, 1453–1473.

Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo S.F. (2003): Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**, 413–421.

Cary A. J., Liu W., Howell S. H. (1995): Cytokinin Action Is Coupled to Ethylene in Its Effects on the Inhibition of Root and Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Physiology* **107**, 1075-1082.

Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P. J., Bennett M. (2001): Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant Cell* **13**, 843–852.

Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo S. F. (2003): Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**, 413–421.

Choi B. H., Kim W., Wang Q. C., Kim D. C., Tan S. N., Yong J. W. H., Kim K. T., Yoon H. S. (2008): Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells. *Cancer Letters* **261**, 37–45.

De Jong A., Yakimova E., Kapchina V., Woltering E. (2002): A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta*, **214**(4), 537–545.

Chang L., Ramireddy E., Schmülling T. (2015): Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in *Arabidopsis*. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4759–4768.

Cheng Y., Dai X., Zhao Y. (2006): Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development* **20** 1790–1799.

Firn R. D., Wagstaff C., Digby J. (2000): The use of mutants to probe models of gravitropism. *Journal Experimental Botany* **51**, 1323–1340

Fuchs Y., Lieberman M (1968): Effects of kinetin, IAA and gibberellin on ethylene production, and their interactions in growth of seedlings. *Plant Physiology* **43**, 2029-2036.

Garg R., Tyagi A. K., Jain M. (2012): Microarray analysis reveals overlapping and specific transcriptional responses to different plant hormones in rice. *Plant Signaling & Behavior* **7**. 951-956.

Geisler M., Blakeslee J. J., Bouchard R., Lee O. R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., Titapiwatanakun B., Peer W. A., Bailly A., Richards E. L., Ejendal K. F. K., Smith A. P., Baroux C., Grossniklaus U., Müller A., Hrycyna C. A., Dudler R., Murphy A. S., Martinoia E. (2005): Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant Journal* **44**, 179–194.

Guzmán P, Ecker J. R. (1990). Exploiting the Triple Response of *Arabidopsis* To Identify Ethylene-Related Mutants. *Plant cell* **2**, 513–523.

Harrison B. R., Masson P. H. (2008): ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J* **53**, 380–392.

Hartig K., Beck E. (2005): Endogenous Cytokinin Oscillations Control Cell Cycle Progression of Tobacco BY-2 Cells. *Plant Biology* **7**, 33–40.

Hayward A. P., Tsao J., Dinesh-Kumar S. P. (2009): Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **20**, 1041–1047.

Higuchi M., Pischke M. S., Manonen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8821–8826.

Ioio R. D., 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.

Ioio R. D., Nakamura K., Moubayidin L., Perilli S. Taniguchi M., Morita M. T., Aoyama T., Costantino P., Sabatini S. (2008): A Genetic Framework for the Control of Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* **322**, 1380–1384.

Ioio R. D., Galinha C., Fletcher A. G., Grigg S. P., Molnar A., Willemsen V., Scheres B., Sabatini S., Baulcombe D., Maini P. K., Tsiantis M. (2012): A PHABULOSA/Cytokinin Feedback Loop Controls Root Growth in *Arabidopsis*. *Current Biology* **22**, 1699–1704.

Jan N., Hussain M., Andrabi K. I. (2008): Programmed cell death or apoptosis: do animals and plants share anything in common. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **3**, 111–126.

Jang G., Lee J. H., Rastogi K., Park S., Oh S. H., Lee J. Y. (2015). Cytokinin-dependent secondary growth determines root biomass in radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Experimental Botany* **66**, 4607–4619.

Kamínek M., Vaněk T., Motyka V. (1987): Cytokinin activities of N⁶-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Journal of Plant Growth Regulation* **6**, 113-120.

Kunikowska A., Byczkowska A., Kaźmierczak A. (2012): Kinetin induces cell death in root cortex cells of *Vicia faba* ssp. *minor* seedlings. *Protoplasma* **250**, 851–861.

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**, 3152–3169.

Krall, L., Raschke, M., Zenk, M. H., and Baron, C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 50'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett* **527**, 315–318.

Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M. B., Offringa R., Graham N., Doumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., Bennett M. (2007): Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**, 3889-900.

Li Y., Hagen G., Guilfoyle T. J. (1992): Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Developmental Biology* **153**, 386-395.

Lichtenthaler, H. K. (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47–65.

Lomin S. N., Krivosheev D. M., Steklov M. Y., Arkhipov D. V., Osolodkin D. I., Schmülling T., Romanov G. A. (2015): Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1851–1863.

Malamy, J. E. (2005): Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment* **28**, 67–77.

Marhavý P., Bielach A., Abas L., Abuzeineh A., Duclercq J., Tanaka H., Pařezová M., Petrášek J., Friml J., Kleine-Vehn J., Benková E. (2011): Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell* **21**, 796-804.

McCall K. (2010): Genetic control of necrosis-another type of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 882–888.

Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 1375-1380.

Mok, D. W., & Mok, M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89–118.

Morita M. T. (2010): Directional gravity sensing in gravitropism. *Annual Review Plant Biology* **61**, 705–720.

Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Křeček P., Bielach A., Petrášek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y. D., Dobrev P. I., Schwarzerová K., Rolčik J., Seifertová D., Luschnig C., Piotrowska A., Bajguz A. (2011): Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* **72**, 2097-2112.

Plíhalová L., Vylčililová H., Doležal K., Zahajská L., Zatloukal M., Strnad M. (2015): Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New biotechnology* **33**, 614-624.

Rao G. V., Kumar S., Islam M., Mansour S. E. (2008): Folk medicines for anticancer therapy-a current status. *Cancer Therapy* **6**, 913–922.

Rashotte, A. M., Brady, S. R., Reed, R. C., Ante, S. J., and Muday, G. K. (2000): Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**, 481–490.

Redig P., Shaul O., Inzé D., Van Montagu M., Van Onckelen H. (1996): Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* **391**, 175–180.

Reed, R. C., Brady, S. R., and Muday, G. K. (1998): Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 1369–1378.

Roy A., Ganguly A., Dasgupta S. B., Das B. B., Pal C., Jaisankar P., Majumder H. K. (2008): Mitochondria dependent ROS-mediated programmed cell death (PCD) induced by 3,3'-diindolylmethane (DIM) through Inhibition of FoF1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Molecular Pharmacy* **74**, 1292–1307.

Růžička K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beeckman T., Friml J., Benková E. (2007): Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution. *The Plant Cell* **19**, 2197–2212.

- Sakakibara, H. (2005). Cytokinin Biosynthesis and Regulation. *Vitamins & Hormones* **72**, 271–287.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431–449.
- Schaller G. E., Street I. H., Kieber J. J. (2014): Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 7–15.
- Schaller G. E., Bishopp A., Kieber J. J. (2015): The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant cell* **27**, 44–63.
- Scott I., Logan D. C. (2008): Mitochondria and cell death pathways in plants. *Plant Signal Behaviour* **3**, 475–477.
- Stehlid G. (1982): Cytokinins as inhibitors of root growth. *Physiologia Plantarum* **56**, 500–506.
- Strnad M., Peters W., Beck E., Kamínek M. (1992): Immunodetection and Identification of N⁶-(O-Hydroxybenzylamino) Purine as a Naturally Occurring Cytokinin in *Populus x canadensis Moench cv Robusta* Leaves. *Plant physiology* **99**, 74–80
- Strnad M. (2006): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674 – 688.
- Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M. P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J. D., Taylor C. G., Schachtman D. P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplaze L., Bennett M. J. (2008): The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Natural Cell Biology* **10**, 946–954.
- Tanno K., Willcox G. (2006): How Fast Was Wild Wheat Domesticated? *Science* **311**, 1886–1886.
- Tao Y., Ferrer J. L., Ljung K., Pojer F., Hong F., Long J. A., Li L., Moreno J. E., Bowman M. E., Ivans L. J., Cheng Y., Lim J., Zhao Y., Ballaré C. L., Sandberg G., Noel J. P., Chory J. (2008): Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**, 164–176.
- 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.
- Uggla C., Moritz T., Sandberg G., Sundberg B. (1996): Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 9282–9286.
- Van Doorn W. G., Woltering E. J. (2005): Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* **10**, 117–122.
- Van Doorn W. G. (2011): Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany* **14**, 4749–4761.
- Vanneste S., Friml J. (2009): Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005–1016.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmulling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS* **98**, 10487–10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmulling 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. *Plant Cell* **15**, 2532–2550.
- Zhang W., To J. P. C., Cheng C. Y., Schaller E. G., Kieber J. J. (2011): Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *The Plant Journal* **68**, 1–10.
- 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.
- Zürcher E., Müller B. (2016): Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function—Advances and New Insights. *International Review of Cell and Molecular Biology* **324**, 1–38.

Citace článku v elektronické formě:

Argueso C. T., Ferreira F. J., Epple P., To J. P., Hutchison C. E., Schaller G. E., Dangi J. L., Kieber J. J. (2012): Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLOS Genetics* **8**, <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002448>.

Ramireddy E., Chang L., Schmülling T. (2014): Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. *Plant Signaling & Behavior* **9**:1 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.27771>.

O'Sullivan D. M., Angra, D. (2016): Advances in Faba Bean Genetics and Genomics. *Frontiers in Genetics* **7**:150 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2016.00150/full>.

Citace knihy (nebo její části) s editorem:

Adsule R. N., Akpapunam M. (1996): Faba Bean (*Vicia faba* L.) In: *Food and feed from legumes and oilseeds*. (Nwokolo E., Smartt. J.), Springer, Boston, USA, 197-202.

Davies P. J. (2010). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Functions. 3rd Edition. In: *Plant Hormone*.(Davies P. J.), Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands, 1-15.

Mok M. C. (1994): Cytokinins and plant development: an overview. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*.(Mok D. W. S.; Mok M. C.), CRC Press, Boca Raton, U. S. A., 155-166.

Sakakibara, H. (2004): Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (Davies P. J.), Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands,95–114.

Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R. (2007): Gas Chromatography. In: *Principles of Instrumental Analysis* Vol. 6. (Thomson B., Thomson C.), Thomson Brook/Cole, Belmont, USA. 788-811.

Stauffer E., Dolan J. A., Newman R. (2008): Detection of Ignitable Liquid Residues at Fire Scenes. In: *Fire Debris Analysis*.(Soucy J.), Elsevier, Oxford, U. K., 131–161.

Hubschmann, H. (2008): Fundamentals. In: *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*.(Wiley J.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany,7-292.

Van Staden J., Zazimalova E., George E. F. (2008): Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. 3rd Edition. In: *Plant Propagation by Tissue Culture* (George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J.), Springer, Dordrecht, Netherland,205-226.

Ward T. M., Wright M., Roberts J. A., Self R., Osborne D. J. (1978): Analytical procedures for the assay and identification of ethylene. In: *Isolation of Plant Growth Substances* (Hillman J. R.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 135-151.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ABCB	ATP-binding cassette skupiny B
AHK (2/3/4)	histidin kináza (2/3/4)
AUX1	Auxin-Resistant 1 protein
BAP	6-benzylaminopurin
BR	brassinosteroidy
CK	cytokininy
dihydrozeatin	6-(4-hydroxy-3-methylbutylamino)purin
DMSO	dimethylsulfoxid
DMAPP	dimethylallyl difosfát
ET	etylen
FID	flame ionization detector (detektor používající ionizaci plamenem)
GA	kyselina gibberelová
IAA	indol-3-ylactová kyselina
iP	N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-adenine
IPT	isopentenyl transferáza
IPT5	gen syntetizující isopentenyl transferasu
JA	kyselina jasmonová; jasmonáty
LOG	enzym LONELY GUY
<i>meta</i> -topolin	6-(3-hydroxybenzylamino)purin
PIN	Pin-Formed protein
PCD	programmed cell death (programovaná buněčná smrt)
QC	Quiescent center (klidové centrum)
RAM	Root apical meristem (kořenový apikální meristém)
SA	kyselina salicylová; salicyláty
SHY2	short hypocotyl protein
zeatin	6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin