

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie (B-BI)



Karolína Synková

Cytokininy a jejich transportní mechanismy v rostlinách
Cytokinins and Their Transport Mechanisms in Plants

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Klára Hoyerová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 26.4.2025

Podpis:

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Kláře Hoyerové, Ph.D., za vedení mé práce, pomoc, rady a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi RNDr. Janu Petráškovi Ph.D., za pomoc a připomínky k této práci. Poděkování patří také Mgr. Danielu Nedvědovi Ph.D., a ostatním členům laboratoře, kteří mi vždy rádi pomohli a vytvářeli velmi příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

Abstrakt

Cytokininy jsou fytohormony, jejichž objevování začalo již na začátku dvacátého století. Mají velké množství fyziologických funkcí, jako je iniciace buněčného dělení, oddálení senescence, urychlení vývoje chloroplastů a další. Jedná se o deriváty adeninu substituované v N⁶ pozici a nejvíce fyziologicky aktivním cytokininem je *trans*-zeatin. Cytokininy se mohou v rostlině vyskytovat ve formě glykosidů, ribotidů, ribosidů a volných bází, které jsou jedinou aktivní formou rozpoznávanou receptory u *Arabidopsis*. Aby docházelo ke správné signalizaci a následným účinkům, musí být cytokininy v rámci rostliny transportovány. Transport probíhá mezi orgány, kdy je zajišťován především vodivými pletivy, a také mezi buňkami přes plazmatické membrány. Transport přes membrány zajišťuje velké množství transportérů z rodin proteinů ABCG, PUP, AZG, SWEET a ENT. Cytokininy nejsou syntetizovány pouze rostlinami, ale například také některými bakteriemi, které žijí v rhizosféře. Je to například *Azotobacter chroococcum*, *Paenibacillus polyxyma* nebo *Agrobacterium tumefaciens*. Velmi zajímavým zjištěním je, že tyto cytokininy produkované bakteriemi mohou být rostlinou přijímány a mít pozitivní vliv na její růst.

Klíčová slova: rostlinné hormony, cytokinin, *trans*-zeatin, transport cytokininů, membránové přenašeče, ENT proteiny

Abstract

Cytokinins are phytohormones whose discovery began in the early twentieth century. They have a large number of physiological functions, such as initiating cell division, delaying senescence, accelerating chloroplast development, and others. They are derivatives of adenine substituted at the N⁶ position and the most physiologically active cytokinin is *trans*-zeatin. Cytokinins can occur in the plant in the form of glycosides, ribotides, ribosides and free bases, which are the only active form recognized by receptors of *Arabidopsis*. Cytokinins must be transported within the plant for proper signalling and subsequent effects to occur. Transport takes place between organs, mainly facilitated by vascular tissue, and also between cells through plasma membranes. Transport across membranes is provided by a large number of transporters from the protein families ABCG, PUP, AZG, SWEET and ENT. Cytokinins are not only synthesized by plants but also by certain bacteria that live in the rhizosphere. This is for example *Azotobacter chroococcum*, *Paenibacillus polyxyma* or *Agrobacterium tumefaciens*. A very interesting finding is that these cytokinins produced by bacteria can be taken up by the plant and have a positive effect on its growth.

Keywords: plant hormones, cytokinin, *trans*-zeatin, cytokinin transport, membrane transporters, ENT proteins

Seznam zkratek

ATP/ADP/AMP – adenosintrifosfát/adenosindifosfát/adenosinmonofosfát

DMAPP – dimethylallyldifosfát

MEP – methylerythritolfosfát

MVA – mevalonát

iPRTP/iPRDP – isopentenyladeninribosid-5'-trifosfát/isopentenyladeninribosid-5'-difosfát

IPT – isopentenytransferáza

tZRTP/tZRDP – *trans*-zeatinribosid-5'-trifosfát/*trans*-zeatinribosid-5'-difosfát

LOG – „LONELY GUY“

Z – zeatin

tZ – *trans*-zeatin

iP – *N*⁶-isopentenyladenin

cZ – *cis*-zeatin

tZR – *trans*-zeatinribosid

iPR – *N*⁶-isopentenyladeninribosid

tRNA-IPT – tRNA-isopentenytransferáza

At – *Arabidopsis thaliana*

Os – *Oryza sativa*

Hv – *Hordeum vulgare*

Mt – *Medicago trunculata*

ZRED – zeatinreduktáza

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

CKX – cytokininoxidáza/dehydrogenáza

AHK – „ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE“

CHASE – „Cytokinin Histidine kinase And Sensor Environment“

AHP – „ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER“

ARR – „ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS“

NO – oxid dusnatý

RAM – kořenový apikální meristém

ER – endoplazmatické retikulum

ABC – „ATP-BINDING CASSETTE“

PUP – „PURINE UPTAKE PERMEASE“

ENT – „EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS“

SWEET – „SUGAR WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTERS“

AZG – „AZA-GUANINE RESISTANT“

PIN – „PIN FORMED“

CCCP – karbonylkianid-*m*-chlorofenylhydrazon

DNP – 2,4-dinitrofenol

Ti-plazmid – tumor indukující plazmid

T-DNA – transferová DNA

PGPR – „plant growth promoting rhizobacteria“

GFP – „green fluorescent protein“

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cytokininy a jejich objevení.....	1
3	Struktura	2
4	Biosyntéza	3
5	Metabolismus	5
6	Signalizace.....	6
7	Transport	9
7.1	Transport na dlouhou vzdálenost	9
7.1.1	Signalizace dostupnosti dusíku.....	10
7.2	Transport přes plazmatickou membránu.....	11
7.2.1	ABCG – ATP-BINDING CASSETTE G.....	11
7.2.2	PUP – PURINE UPTAKE PERMEASE.....	13
7.2.3	SWEET – SUGAR WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTERS	14
7.2.4	AZG – AZA-GUANINE RESISTANT.....	14
7.2.5	ENT – EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS	15
8	Bakterie produkující cytokininy	18
8.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
8.2	Bakterie podporující růst rostlin	18
9	Závěr.....	21
10	Citovaná literatura	22

1 Úvod

Cytokininy jsou důležitými signálními molekulami s mnoha funkcemi v rostlinách. Mezi jejich nejdůležitější fyziologické účinky patří iniciace buněčného dělení, oddalování senescence listů, urychlení diferenciac chloroplastů a další (Kieber and Schaller, 2014). Další důležitou funkcí cytokininů je signalizace o dostupnosti živin, která je realizovaná transportem cytokininů z kořene do nadzemní části rostliny pomocí xylému (Takei *et al.*, 2001; Sakakibara, 2021). Transport cytokininů neprobíhá pouze prostřednictvím vodivých pletiv, ale je nutné je transportovat i přes plazmatické membrány. Ačkoliv není zcela vyloučena možnost prosté difúze, jsou k transportu přes membránu potřebné přenašeče různých typů (Nedvěd *et al.*, 2021). Cytokininy jsou produkovány také půdními bakteriemi a tyto cytokininy jsou rostliny schopné přijímat kořeny a dále transportovat do nadzemních částí (Arkhipova *et al.*, 2005). Jakým způsobem jsou bakteriální cytokininy přijímány není ale prozatím zcela objasněno. Poznání mechanismu transportu různých derivátů cytokininů a popsání jejich přenašečů, které často transportují cytokininy selektivně, je zásadní pro pochopení a následné ovlivnění distribuce cytokininů v rostlině. Cíleným ovlivněním cytokininového transportu je možné dosáhnout například vyšších výnosů nadzemních částí rostlin.

Cílem práce je popsat cytokininové přenašeče a strukturu cytokininových metabolitů, která následně ovlivňuje mechanismus jejich transportu, a popsání specifického transportu cytokininových ribosidů, do kterého jsou zapojeny přenašeče z rodiny ENT, a popsání možné funkce těchto přenašečů v transportu cytokininů bakteriálního původu.

2 Cytokininy a jejich objevení

Fytohormony jsou organické nízkomolekulární látky, které v rostlinách zajišťují signalizaci. Vyskytují se ve velmi nízkých koncentracích a rostlina je sama syntetizuje nebo je může přijímat z okolí (Arkhipova *et al.*, 2005). Cytokininy jsou jedny z rostlinných hormonů a mají mnoho fyziologických funkcí, jako je oddálení senescence, urychlení diferenciac chloroplastů, iniciace buněčného dělení, snížení apikální dominance a mnoho dalších (Kieber and Schaller, 2014).

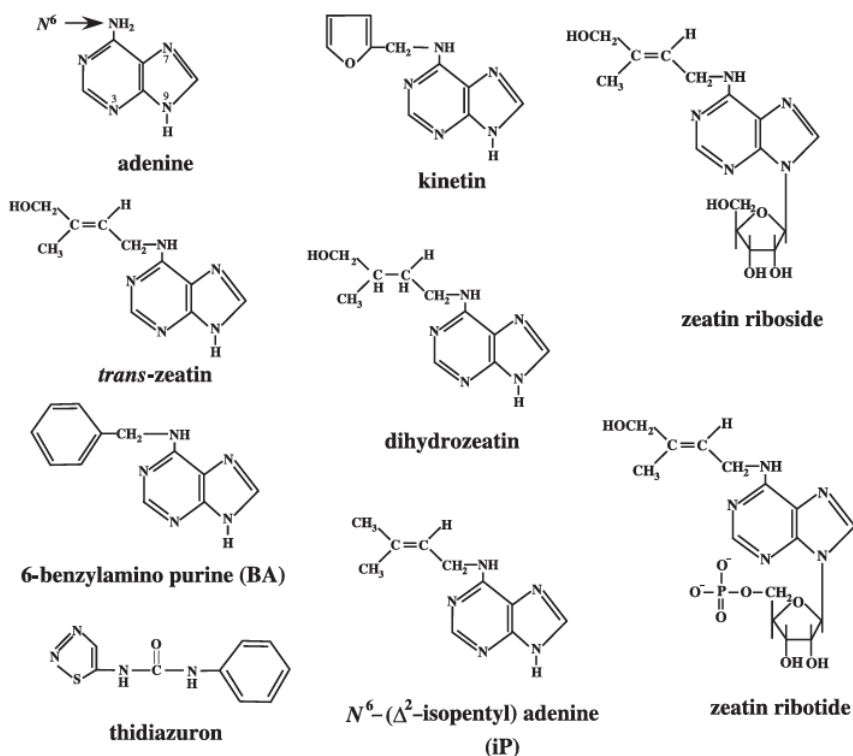
První myšlenka o existenci cytokininů je již ze začátku 20. století. Gottlieb Haberlandt si všiml, že nedělící se parenchymatické buňky je možné přimět k dělení přidáním floémové

šťávy z jiných rostlin. Předpokládal, že se jedná o účinek nějakého hormonu (Haberlandt, 1913). O několik desítek let později se profesor Folke Skoog zabýval aplikací stimulantů podporujících růst kalusu. Pracoval s tabákovými stonky a zjistil, že pokud přidá adenin do kultivačního média, které obsahuje auxin, bude inhibiční účinek auxinu na tvorbu pupenů potlačen. Bylo ale zřejmé, že adenin nestimuluje dělení buněk a nejedná se tedy o hledanou látku. Efektivního dělení buněk bylo dosaženo až přidáním tekutého endospermu z kokosu. Důležitým zjištěním pro identifikaci hledané látky bylo, že je možné ji vysrážet dusičnanem stříbrným. To naznačovalo, že se může jednat o purinový nebo pyrimidinový derivát, ale preferovaný byl purinový. Až v roce 1954 se podařilo izolovat první krystal hledané látky. Vzhledem ke schopnosti stimulovat buněčné dělení dostala jméno kinetin. Jednalo se ale pouze o syntetický cytokinin. Po tomto objevu začalo hledání přírodního cytokininu. Laboratoř profesora Lethama se v šedesátých letech zabývala dlouhodobým uskladněním jablek. Z pokusů se podařilo vyvodit, že stimulace buněčného dělení způsobuje menší velikost buněk jablek, kdy docházelo k méně častému výskytu hniloby, a proto stimulací buněčného dělení lze snížit riziko výskytu hniloby. Snažili se tedy izolovat látku stimulující dělení buněk (Kamínek, 2015). V roce 1963 se podařilo tuto látku izolovat z nezralých kukuřičných jader a byla pojmenována zeatin po kukuřici (*Zea mays*) (Letham, 1963).

3 Struktura

Cytokininy jsou ve většině případů deriváty adeninu substituované v N⁶ pozici. V této pozici mohou mít připojený isoprenoidní řetězec a v tom případě se jedná o isoprenoidní cytokininy, mezi které patří N⁶-isopentenyladenin (iP) s čistě isoprenoidním postranním řetězcem, *trans*-zeatin (tZ) a *cis*-zeatin (cZ) s hydroxylovaným postranním řetězcem a dihydrozeatin (DHZ), který má kromě hydroxylovaného postranního řetězce také redukovanou dvojnou vazbu isoprenoidního postranního řetězce. Další skupinou jsou aromatické cytokininy, které mají v N⁶ pozici navázané aromatické jádro a řadí se mezi ně *ortho*-methoxytopolin, *meta*-methoxytopolin, *ortho*-topolin a *meta*-topolin (Strnad, 1997). Různé strukturální varianty na postranním řetězci isoprenoidních a aromatických cytokininů ovlivňují interakci s cytokininovými receptory, což by mohlo znamenat funkční specifitu (Spíchal *et al.*, 2004; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004). Existuje také množství syntetických cytokininů, například benzyladenin, kinetin a difenylmočovina. Vzorce některých přírodních

a syntetických cytokininů jsou zobrazeny na obrázku 1. Nejvíce fyziologicky aktivním cytokininem je *trans*-zeatin (Argueso and Kieber, 2024).



Obrázek 1: Strukturální vzorce některých přírodních a syntetických cytokininů a adeninu, ze kterého jsou cytokininy odvozeny (Kieber and Schaller, 2014).

4 Biosyntéza

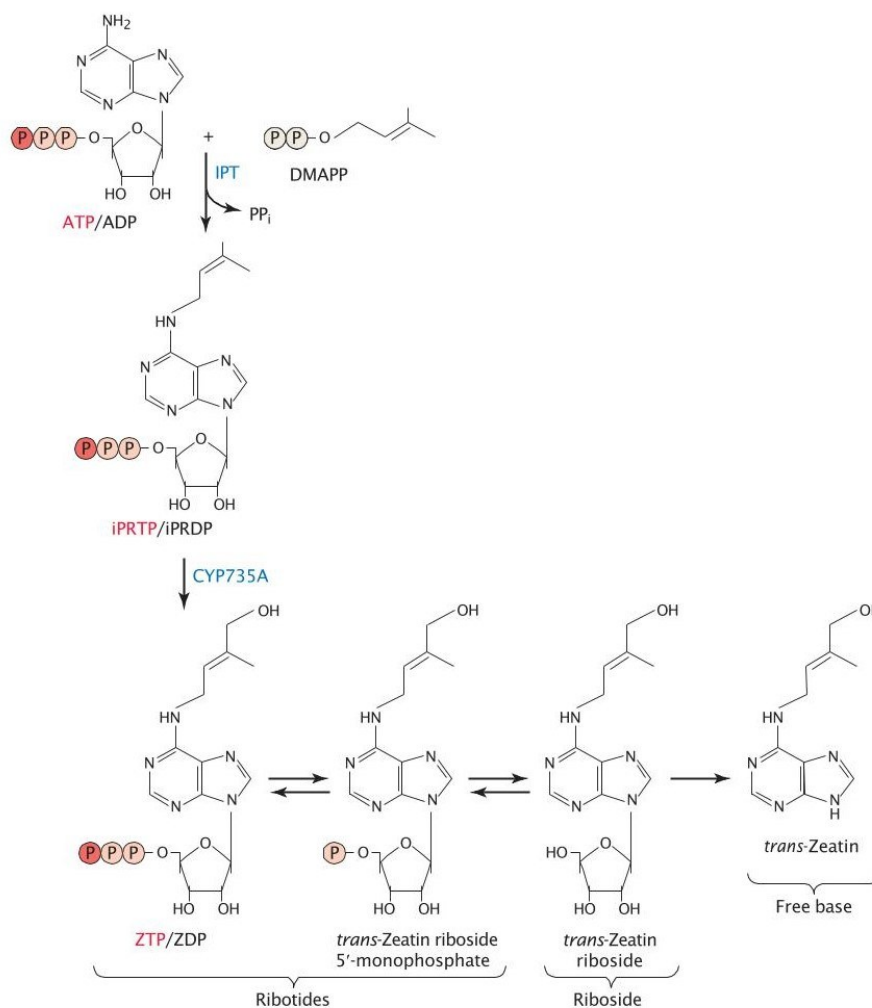
Cytokininy se mohou v rostlinách vyskytovat jako glykosidy, ribotidy, ribosidy nebo volné báze (Kieber and Schaller, 2014). Volné báze jsou jediné aktivní formy, tj. formy rozpoznávané receptory cytokininů (Spíchal *et al.*, 2004). Výchozí látky pro syntézu cytokininu jsou adenosintrifosfát (ATP) nebo adenosindifosfát (ADP) a dimethylallyldifosfát (DMAPP). Poskytovatel isoprenoidního postranního řetězce DMAPP může vznikat dvěma drahami, a to dráhou methylerythritolfosfátovou (MEP), která probíhá v plastidech nebo mevalonátovou (MVA) dráhou, která probíhá v cytosolu (Kasahara *et al.*, 2004).

Prvním krokem v syntéze cytokininu tZ a iP je napojení isopentenylového řetězce z DMAPP, který v tomto případě vzniká převážně dráhou MEP, na ATP/ADP (Kasahara *et al.*, 2004). Tímto krokem vzniká isopentenyladeninribosid-5'-trifosfát/isopentenyladeninribosid-5'-difosfát (iPRTP/iPRDP) a jeho katalyzátorem je isopentenyltransferáza (IPT), která

v *Arabidopsis thaliana* existuje v 9 isoformách (Kakimoto, 2001; Takei, Sakakibara and Sugiyama, 2001). V případě biosyntézy tZ dochází navíc k hydroxylaci postranního řetězce, kterou zajišťuje cytochrom P450 monooxygenáza, v *Arabidopsis* kódovaná geny *AtCYP735A1* a *AtCYP735A2*, a dá tak vznik *trans*-zeatinribosid-5'-trifosfátu/*trans*-zeatinribosid-5'-difosfátu (tZRTP/tZRDP), nukleotidové formě (Takei, Yamaya and Sakakibara, 2004). Nukleotidové formy iPRTP/iPRDP a tZRTP/tZRDP jsou stále neaktivní a je třeba další krok, který katalyzuje enzym LONELY GUY (LOG), v *Arabidopsis* kódovaný geny *AtLOG1-9*. Tento krok zahrnuje odstranění ribosa-5'-monofosfátové skupiny a vzniká tak volná báze (Kurakawa *et al.*, 2007). Schéma biosyntézy je znázorněno na obrázku 2.

Existuje i další dráha, která dává vznik cZ. Adenin v tomto případě pochází z tRNA a napojení isopentenylového řetězce zajišťuje tRNA-isopentenyltransferáza (tRNA-IPT). U *Arabidopsis* tento enzym kódují 2 geny (*AtIPT2* a *AtIPT9*) (Miyawaki *et al.*, 2006). Není dosud popsán původ *cis* hydroxylovaného postranního prenylového řetězce. Kromě cZ byly nalezeny v tRNA vázané také další cytokininy: iP, DHZ a tZ (Stirk *et al.*, 2012).

Dalším cytokininem je DHZ, který je syntetizován z tZ. Zeatinreduktáza (ZRED), původně izolovaná z embryí fazolu, je enzymem specifickým pro tZ, který rozpoznává hydroxylovou skupinu na postranním řetězci a redukuje jeho dvojnou vazbu (Martin *et al.*, 1989). Původně se zdálo, že jediným kofaktorem ZRED je nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH), ale ukázalo se, že jsou nejspíše nutné i některé kovy (Gaudinová *et al.*, 2005).



Obrázek 2: Schéma biosyntézy trans-zeatinu (IPT – isopentenyltransferáza; CYP735A – gen pro cytochrom P450 monooxygenázu; DMAPP – dimethylallyldifosfát; iPRTP/iPRDP – isopentenyladeninribosid-5'-trifosfát/isopentenyladeninribosid-5'-difosfát; ZTP/ZDP – zeatinribosidtrifosfát/zeatinribosiddifosfát; P – fosfátová skupina) (Taiz et al., 2015)

5 Metabolismus

Hladina cytokininů v rostlině je regulována nejen biosyntézou, ale také jejich degradací nebo reverzibilní či ireverzibilní inaktivací. Inaktivaci způsobuje glukosylace, která spočívá v navázání molekuly glukózy na volné báze cytokininů v pozicích N³, N⁷ nebo N⁹ nebo přes kyslík v postranním řetězci obou izomerů Z (zeatin) a DHZ (Argueso and Kieber, 2024).

N-glukosylaci na purinu v pozicích N⁷ a N⁹ zajišťuje N-glukosyltransferáza. N-glukosyltransferázu kódují u *Arabidopsis* dva geny, *AtUGT76C1* a *AtUGT76C2*. Oba tyto proteiny rozpoznávají nejspíše všechny cytokininy a jejich působení bylo považováno za

nevratné (Hou *et al.*, 2004). Metabolická studie na *Arabidopsis* však prokázala konverzi tZ N⁷ a N⁹ glukosidů na tZ (Hošek *et al.*, 2020). Doposud však nebyl objeven enzym katalyzující tvorbu N³-glukosidů.

Dalším typem inaktivace cytokininů je O-glukosylace, kdy je glukóza navázána na postranní řetězec přes hydroxylovou skupinu. Existují celkem čtyři geny kódující O-glukosyltransferázu. *ZOG1* izolovaný z *Phaseolus lunatus*, *ZOX1* z *Phaseolus vulgaris* a *cis-ZOG1*, *cis-ZOG2* ze *Zea mays*. Na rozdíl od N-glukosyltransferáz jsou tyto transferázy specifické pouze pro určité cytokininy. *ZOG1* a *ZOX1* jsou specifické pouze pro tZ a mají vysokou expresi v semenech, *cis-ZOG1* a *cis-ZOG2* pro cZ (Martin, Mok and Mok, 1999b, 1999a; Martin *et al.*, 2001; Veach *et al.*, 2003). Tato modifikace je vratná a je tedy možné konjugáty hydrolyzovat a získat opět aktivní volné báze. To zajišťuje β-glukosidáza, která byla původně izolovaná ze semen kukuřice (Campos *et al.*, 1992; Brzobohatý *et al.*, 1993). O O-glukosidech by se tedy dalo říci, že se jedná o zásobní formu hormonu (Spíchal *et al.*, 2004).

Nevratnou degradaci katalyzuje cytokininoxidáza/dehydrogenáza (CKX). Ta odštěpuje postranní řetězec od adeninu (Pačes, Werstiuk and Hall, 1971), takže například v případě iP vznikne adenin a aldehyd 3-methyl-2-butenal. Substráty pro tento enzym jsou pouze cytokininy, které mají nenasycený postranní řetězec (tZ, cZ, iP a jejich deriváty) (Brownlee, Hall and Whitty, 1975; McGaw and Horgan, 1983). Nelze tedy oxidovat DHZ a jeho deriváty, protože v jeho postranním řetězci není dvojná vazba. Dále jsou před oxidací chráněné O-glukosidy. U *Arabidopsis* tento enzym kóduje 7 CKX genů (*AtCKX1-7*) (Schmülling *et al.*, 2003). Vzniklé isoformy vykazují různé substrátové preference. Obecně jsou ale akceptovány jako substrát preferenčně cytokininové báze a následně ribosidy. *AtCKX1* a *AtCKX7* však preferují jako substrát N⁶-isopentenyladenin-9-glukosid. CKX v rostlinách jsou tedy částečně redundantní, ale vykazují i jistou míru specificity vůči substrátu (Galuszka *et al.*, 2007).

6 Signalizace

Cytokininová signalizace probíhá přes změnu genové exprese v jádře. Signalizace začíná navázáním volné báze cytokininu na receptor, který je lokalizovaný v membráně. Receptory jsou histidinové kinázy a u *Arabidopsis* jsou jimi AHK2, AHK3 a AHK4 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2,3,4) (Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi, Koizumi, *et al.*,

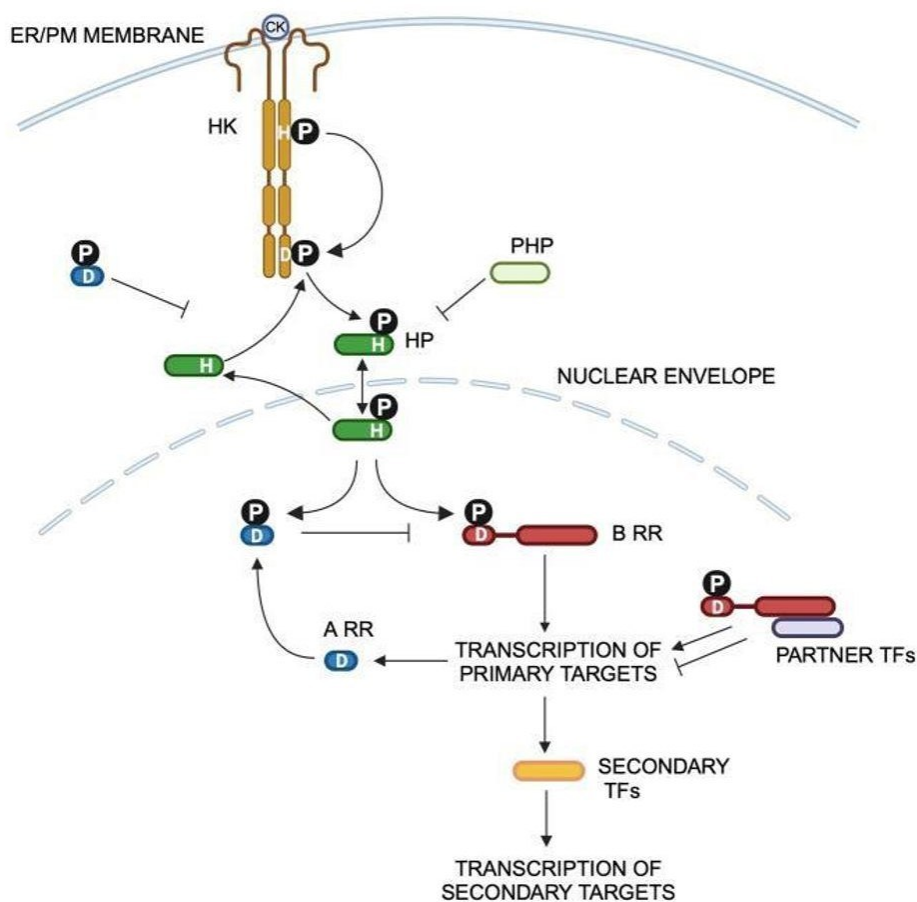
2001). Cytokininy se na vnější straně membrány naváží na CHASE (Cytokinin Histidine kinase And Sensor Environment) doménu receptoru (Anantharaman and Aravind, 2001). Toto navázání ligandu na receptor, způsobí aktivaci histidin-kinázové domény na vnitřní straně membrány a dojde tak k autofosforylaci na histidinu. Tento fosfát je následně přenesen na další část receptoru na aspartát (Ueguchi, Sato, *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001). Původní představa lokalizace receptorů byla na plazmatické membráně (Kim *et al.*, 2006), ale pozdější výzkumy ukázaly, že se vyskytují na membráně endoplazmatického retikula (ER) (Wulfetange *et al.*, 2011). Později byla potvrzená lokalizace cytokininových receptorů na plazmatické membráně (Antoniadi *et al.*, 2020; Kubiasová *et al.*, 2020). Receptory jsou tedy na plazmatické membráně i na membráně ER.

Dalším krokem v přenosu signálu je přenesení fosfátu z aspartátu na fosfotransferové proteiny obsahující histidin (ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS-AHP). AHP se vyskytují ve stabilní koncentraci v cytoplazmě a v jádře a pohybem mezi těmito kompartmenty zajišťují přenos signálu od receptorů k regulátorům odpovědi ARR (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS) (Punwani *et al.*, 2010). Genom *Arabidopsis* kóduje pět těchto proteinů (AHP1-5) (Suzuki *et al.*, 1998, 2000). U AHP1, AHP2, AHP3 a AHP5 bylo prokázáno, že se chovají jako pozitivní regulátory odpovědi, ale AHP4 může v některých případech fungovat jako regulátor negativní (Hutchison *et al.*, 2006). Rostlinný genom kóduje také protein podobný AHP, který ale neobsahuje histidin nutný pro přenos fosfátu. Je to AHP6 a funguje jako negativní regulátor cytokininové signalizace, protože blokuje aktivitu AHP proteinů (Mähönen *et al.*, 2006). Negativním regulátorem přenosu signálu je také oxid dusnatý (NO). NO může AHP1 modifikovat S-nitrosilací na cysteinu, což snižuje jejich schopnost přenášet fosfát na ARR1 (Feng *et al.*, 2013).

Poslední část cytokininové signalizace se odehrává především v jádře pomocí ARR typu B a ARR typu A. ARR typu B jsou transkripční faktory, které spouští genovou expresi jako odpověď na cytokininy (Sakai, Aoyama and Oka, 2000) a v genomu *Arabidopsis* jsou kódovány 11 geny, ale ne u všech je prokázána účast v signalizaci (Mason *et al.*, 2004). V nepřítomnosti cytokininů přijímací doména ARR typu B inhibuje funkci těchto transkripčních faktorů (Sakai *et al.*, 2001) a pouze po navázání fosfátu na přijímací doménu dojde k aktivaci a ARR typu B se mohou navázat na cílové sekvence (Zubo *et al.*, 2017).

ARR typu A jsou negativními regulátory odpovědi (Kiba *et al.*, 2003; To *et al.*, 2004). U *Arabidopsis* jsou kódovány 10 geny. Stejně jako ARR typu B mají ARR typu A

přijímací doménu, ale chybí jim doména umožňující vazbu na DNA. Rychlost, jakou probíhá transkripce genů pro tyto regulátory, se zvyšuje se zvyšující se hladinou cytokininů (D'Agostino, Deruère and Kieber, 2000). Není zcela známo, jakým způsobem negativní regulace probíhá, ale fosforylované ARR typu A zřejmě specificky interagují s cílovými proteiny a také není vyloučeno, že ARR typu B a ARR typu A spolu kompetují o fosfát, a tím pak dochází ke snížení pozitivní odezvy (To *et al.*, 2007). Zjednodušené schéma signalizace je znázorněno na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma signalizace cytokininu (HK – histidinová kináza, D – aspartát, H – histidin, P – fosfát, HP – histidine phosphotransfer protein, RR – response regulator, TF – transkripční faktor) (Argueso and Kieber, 2024)

7 Transport

Rostliny v průběhu života musí reagovat na podmínky prostředí a jejich jednotlivé části spolu musí komunikovat a mít tak koordinovanou reakci. Signalizace probíhá mezi jednotlivými buňkami, pletivy a celými orgány. Komunikace mezi orgány probíhá především pomocí floému a xylému. Důležitou signální molekulou jsou cytokininy, které mají roli v transportu na dlouhou i krátkou vzdálenost a účastní se právě komunikace mezi orgány a ovlivňují růst v odpovědi na množství dostupného dusíku v prostředí (Sakakibara, 2021).

7.1 Transport na dlouhou vzdálenost

Dříve se zdálo, že cytokininy se syntetizují pouze v kořenových špičkách a v apikálních oblastech nadzemní části rostlin a jsou následně transportovány. Později se ovšem ukázalo, že se syntetizují v celé rostlině (Sakakibara, 2006). Existují ovšem oblasti rostlin, ve kterých převažuje určitý typ cytokininu. Hlavním transportní cytokininem je tZ, a hlavně jeho ribosid (tZR), který je převážně syntetizován v kořeni, kde je akumulovaná cytochrom P450 monooxygenáza, zajišťující hydroxylaci postranního řetězce, což vede k přeměně iP typu cytokininu na tZ typ (Takei, Yamaya and Sakakibara, 2004). Jelikož je tZ typ cytokininů syntetizovaný v kořeni, je transportovaný pomocí xylému do nadzemní části, kde má pozitivní vliv na růst (Kiba *et al.*, 2013). Naopak je tomu u iP typu, jehož syntéza převažuje v nadzemní části a je tak do kořene transportovaný díky floému (Hirose *et al.*, 2008). Později bylo zjištěno, že transport iP není pouze jednosměrný, ale že dochází k cirkulaci tohoto cytokininu (Zhao *et al.*, 2023).

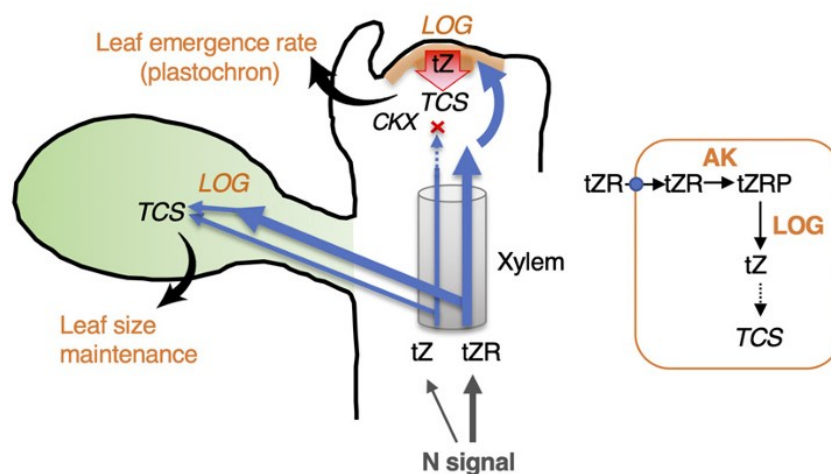
Cytokininy tZ typu (tZ a tZR) transportované xylémem do nadzemní části rostliny tedy regulují její růst (Hirose *et al.*, 2008; Kiba *et al.*, 2013). Bylo ale zjištěno, že tZR, který je následně v místě účinku konvertovaný díky LOG na tZ (Kurakawa *et al.*, 2007), ovlivňuje velikost listů i meristematickou aktivitu vzrostného vrcholu, zatímco z kořenů transportovaný aktivní tZ ovlivňuje pouze velikost listů. V případě zvýšení dostupnosti dusíku, dochází k mnohem vyššímu nárůstu tZR než tZ v xylémové šťávě (Osugi *et al.*, 2017). Situace je schematizovaná na obrázku 4.

Nejen samotná vodivá pletiva jsou potřebná pro transport na dlouhou vzdálenost, ale také přenašeče. Asi nejdůležitějším přenašečem podílejícím se na transportu na dlouhou vzdálenost je ATP-Binding Cassette G14 nalezený u *Arabidopsis* (AtABCG14), který zajišťuje

nakládání kořenového xylému, vykládání floému nadzemní části a vykládání kořenového floému (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2021, 2023). Pokud je gen tohoto přenašeče mutovaný, nedochází k normálnímu růstu nadzemní části rostliny. Dalším fenotypem *atabcg14* je dlouhý primární kořen, což je fenotyp vyskytující se také u rostlin se sníženou hladinou cytokininů (Ko *et al.*, 2014). Role tohoto přenašeče v dálkovém transportu je tedy důležitá a nezastupitelná.

7.1.1 Signalizace dostupnosti dusíku

Dusík je klíčový prvek, který je v přírodě často limitující a rostlina je informována o jeho dostupnosti díky transportu cytokininů vodivými pletivy. Několik dřívějších studií ukázalo, že dusík má vliv na množství cytokininů v rostlině (Singh *et al.*, 1992; Samuelson and Larsson, 1993). Po aplikaci dusíku se v xylému zvýší výrazněji obsah tZR než tZ. tZR je poté transportován do nadzemní části, kde signalizuje o dostupnosti dusíku (Takei *et al.*, 2001; Osugi *et al.*, 2017). Toto zjištění naznačuje, že dusíkový signál se částečně mění na cytokininový signál (Sakakibara, 2021). V *Arabidopsis* existují dva druhy transkripčních faktorů, které zprostředkovávají dusičnanovou odezvu a jsou to NIN-LIKE PROTEIN a NITRATE-INDUCIBLE GARP-TYPE TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR1, které fungují jako antagonisté (Konishi and Yanagisawa, 2013; Maeda *et al.*, 2018). O vzájemném propojení syntézy cytokininů a příjmu dusíku také vypovídá fakt, že *AtIPT3* a *AtCYP735A2* jsou regulovány stejně jako některé geny pro příjem a asimilaci dusičnanů (Maeda *et al.*, 2018).



Obrázek 4: Cytokinin (tZR a tZ) transportované z kořene ovlivňující růst nadzemní části v závislosti na dusíkové signalizaci (AK – adenosinová kináza; LOG – LONELY GUY; TCS – dvoukomponentový signální systém, CKX – cytokininoxidáza/dehydrogenáza) (Sakakibara, 2021).

7.2 Transport přes plazmatickou membránu

Cytokininy i další látky vyskytující se v rostlinách musí při přechodu mezi buňkami, kompartmenty a mezi cytoplazmou a apoplastem překonávat membrány. Membrány jsou tvořené dvojvrstvou amfifilních lipidů a mnoha proteiny s různou funkcí. Membrány vytváří hydrofobní prostředí, které je pro většinu molekul nemožné překonat bez pomoci transportních proteinů umístěných v membráně. Volně přes membránu jsou schopné přejít pouze malé a nepolární látky. Transport přes plazmatickou membránu lze rozdělit na aktivní a pasivní. V případě pasivního transportu se jedná o difúzi, kdy je molekula schopná přejít samovolně přes plazmatickou membránu bez přenašeče, a usnadněnou difúzi, kterou již zprostředkovává membránový přenašeč, ovšem bez spotřeby energie. Oba typy difúze probíhají po koncentračním gradientu transportované látky. Aktivní transport již vyžaduje k transportu molekul energii a přenašeč a je tímto typem možné transportovat molekuly proti jejich koncentračnímu gradientu. Právě podle zdroje energie lze rozdělit aktivní transport na primární aktivní transport a sekundární aktivní transport. V případě primárního pochází energie přímo z hydrolýzy ATP a takový přenašeč musí obsahovat doménu, která hydrolýzu zajistí. Při sekundárním aktivním transportu je energie získávána z jiného, již existujícího gradientu, který je u rostlin nejčastěji protonový a lze ho vyjádřit jako rozdíl pH. Transportovaná molekula je přenesena přenašečem společně s protonem, který se pohybuje po svém koncentračním gradientu, a to buď ve stejném směru (symport), nebo v opačném směru (antiport) (Nedvěd *et al.*, 2021).

Cytokininy využívají mnoho typů přenosu přes membrány a není vyloučeno, že některé volné báze cytokininů mohou prostupovat membránu volnou difúzí, protože jsou malé a hydrofobní a vzhledem k jejich afinitě k hydrofobnímu prostředí. To samé ovšem neplatí o hojně transportovaných cytokininových ribosidech (Nedvěd *et al.*, 2021). Většina cytokininových transportérů je tedy aktivní, a to buď primárně, nebo sekundárně.

7.2.1 ABCG – ATP-BINDING CASSETTE G

ABC přenašeče jsou obecně proteiny skládající se běžně ze dvou transmembránových domén, které utváří pór, a ze dvou cytosolických domén, které vážou nukleotidy. Transport molekul přes membránu je spřažený s hydrolýzou ATP, jedná se tak o primární aktivní transport a je možné takto transportovat molekuly proti jejich koncentračnímu gradientu. U rostlin

můžeme ABC přenašeče rozdělit do 8 podrodin (ABCA-ABCG a ABCI). Právě ABCG je podrodina, u které byla prokázána účast na transportu cytokininů (Nedvěd *et al.*, 2021).

Přenašeč AtABCG14 hraje významnou roli v transportu cytokininů typu tZ z kořenů do nadzemní části. Jedná se o homodimer (Zhao *et al.*, 2023) lokalizovaný v plazmatických membránách stéle, včetně prokambia a floému v kořeni i v nadzemní části. Je zásadní pro nakládání cytokininu tZ typu do xylému v kořeni (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014), ale následně také pro vykládání z floému v nadzemní části (Zhao *et al.*, 2021). Pozdější výzkumy ukázaly, že tento přenašeč má ještě větší úlohu v dálkovém transportu. Neúčastní se totiž pouze transportu tZ typu cytokininů z kořene do nadzemní části, ale také transportu iP typu cytokininů z nadzemní části do kořenů, takže slouží i k vykládání z floému v kořenech. AtABCG14 tedy transportuje poměrně mnoho typů cytokininů, preferuje jak volné báze (tZ, iP), tak ribosidy (N⁶-isopentenyladeninribosid – iPR, tZR), a je tak důležitou složkou dálkového transportu cytokininů (Zhao *et al.*, 2023).

Dalším ABCG přenašečem je MtABCG56, popsáný u *Medicago truncatula*. Největší expresi má v kořenech a v dusík fixujících kořenových hlízkách, s jejichž vývojem zřejmě souvisí. Nachází se na plazmatické membráně a stejně jako ostatní ABC přenašeče je energeticky závislý na ATP. Je schopen transportovat pouze volné báze cytokininů (iP, tZ), na rozdíl od již popsáného AtABCG14, který je schopen transportovat jak volné báze, tak ribosidy (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2023), takže se jedná o přenašeč s vysokou substrátovou specifitou. mRNA *MtABCG56* se v kořeni akumuluje po ošetření rostliny aktivními cytokininy, Nod faktorem nebo po infekci bakterií produkující tento faktor, což nasvědčuje o souvislosti tohoto přenašeče s vývojem kořenových hlízek (Jarzyniak *et al.*, 2021).

MtABCG40 je také přenašečem aktivních cytokininů na plazmatické membráně. Vyskytuje se v buňkách apikálního kořenového meristému (RAM), kde snižuje koncentraci cytokininů v apoplastu a snižuje tak cytokininovou odpověď přes receptory na plazmatické membráně (Antoniadi *et al.*, 2020; Kubiasová *et al.*, 2020), což může snížit inhibiční efekt cytokininů na RAM (Ioio *et al.*, 2007). Dalším místem výskytu MtABCG40 v kořeni je stéle, kde má vliv na iniciaci růstu laterálních kořenů. Mutantní rostliny *mtabcg40* mají totiž zvýšený počet laterálních kořenů oproti kontrolním rostlinám (Jamruszka *et al.*, 2024).

7.2.2 PUP – PURINE UPTAKE PERMEASE

PUP jsou hydrofobní proteiny, procházející plazmatickou membránou, s 9-10 transmembránovými doménami, popsané ve výzkumu s kvasinkami. Jsou schopné přenášet přes membránu volné báze cytokininů a další purinové deriváty a jelikož transport běží proti koncentračnímu gradientu, jsou energeticky závislé. energii pro transport získávají z gradientu H^+ , takže se jedná o sekundární aktivní transport, kotransport (Gillissen *et al.*, 2000). U *Arabidopsis* je kódovaný 21 genů. Různé isoformy tohoto přenašeče mají v rámci rostliny a buňky rozdílnou lokalizaci a mají tak význam jednak v transportu z apoplastu do buňky (Zürcher *et al.*, 2016), z buňky do apoplastu a z cytoplazmy do vakuoly (Hu *et al.*, 2023). Prvním objeveným PUP přenašečem je AtPUP1, který se nachází ve všech orgánech rostliny až na kořen a je specifický pro purinové báze a jejich deriváty včetně cytokininů tZ a kinetinu (Gillissen *et al.*, 2000). Transport cytokininů pomocí AtPUP1 byl potvrzen později ve studii s kvasinkami. Navíc se ukázal jako substrát také iP (Bürkle *et al.*, 2003).

Nejvíce exprimovaným AtPUP je AtPUP14. Převyšuje expresi všech AtPUP ve všech analyzovaných pletivech rostliny, jako je květ, kořen, semenáčky atd. (Cedzich *et al.*, 2008). Transportuje aktivní cytokininy z apoplastu do buněk a dokáže tak lokálně regulovat obsah cytokininů v apoplastu rostlin. Funkce tedy spočívá nejspíše v redukci signálu dostupného pro cytokininové receptory lokalizované v plazmatické membráně (Zürcher *et al.*, 2016).

AtPUP přenašeče se nenachází pouze na plazmatické membráně, ale také na membráně vakuoly, kde umožňuje import, a jsou jimi AtPUP7 a AtPUP21. Tato lokalizace může zpříčiňovat nižší hladinu cytokininů dostupných pro přenos do ER a snižovat tak cytokininovou odezvu. Společně s AtPUP7 a AtPUP21 byl popsán i AtPUP8, lokalizovaný na plazmatické membráně a zajišťující export cytokininů z buňky. AtPUP7, AtPUP8 i AtPUP21 tedy způsobují snížení hladiny cytokininů v cytoplazmě (Hu *et al.*, 2023).

Při výzkumech s *Oryza sativa* byly PUP nalezeny i na membráně ER, a to konkrétně OsPUP7 a OsPUP1 zajišťující import cytokininů do ER. (Xiao *et al.*, 2019, 2020). Jelikož jsou cytokininové receptory lokalizované nejen na plazmatické membráně (Antoniadi *et al.*, 2020; Kubiasová *et al.*, 2020), ale také na membráně ER (Wulfetange *et al.*, 2011), mohou pro ně tyto přenašeče zvyšovat dostupnost aktivních cytokininů a regulovat tak cytokininovou odpověď. OsPUP1 se vyskytuje převážně ve vodivých pletivech, a to hlavně ve floému kořene, takže se předpokládá funkce vykládání cytokininů a regulace růstu kořene (Xiao *et al.*, 2020).

OsPUP4 je lokalizovaný na plazmatické membráně, a to především ve vodivých pletivech. Zajišťuje transport z apoplastu do cytoplazmy buněk. Je možné, že je zapojený do transportu na dlouhou vzdálenost a má ekvivalentní roli k ABCG14, který je zodpovědný za nakládání cytokininů do vodivých pletivech kořene (Ko *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2019).

7.2.3 SWEET – SUGAR WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTERS

SWEET je rodina přenašečů transportujících cukry z maternálních pletiv do rostlinných embryí (Chen *et al.*, 2015). Jedná se o uniportery a fungují nezávisle na pH gradientu (Chen *et al.*, 2010). Nedávná studie ukázala, že HvSWEET11b izolovaný z *Hordeum vulgare* je schopný společně s cukry transportovat i cytokininy. To, že rostlina pro transport cytokininů a cukrů do semene využívá stejný přenašeč, umožňuje koordinovat jeho vývoj a ukazuje, že tyto dva komponenty při něm vysoce interagují (Radchuk *et al.*, 2023).

7.2.4 AZG – AZA-GUANINE RESISTANT

AZG byly původně popsány jako přenašeče purinů a později bylo zjištěno, že dokážou transportovat také cytokininy. *Arabidopsis* má pouze dva geny kódující tento přenašeč, *AtAZG1* a *AtAZG2* (Mansfield, Schultes and Mourad, 2009). Jsou lokalizované v plazmatické membráně a na membráně ER. Prvním popsáním pro transport cytokininů je *AtAZG2*, který je lokalizovaný na plazmatické membráně i na membráně ER. Funguje na principu usnadněné difuze, protože na rozdíl od *AtAZG1* je méně závislý na elektrochemickém protonovém gradientu a pravděpodobně umožňuje transport oběma směry. Největší výskyt přenašeče *AtAZG2* je v okolí zakládajících se postranních kořenů, z čehož vyplývá jeho účast v regulaci tohoto procesu (Tessi *et al.*, 2021).

AtAZG1 je lokalizovaný pouze v plazmatické membráně. Vyskytuje se ve všech částech rostlin, ale nejvíce v kořeni a květech. K transportu cytokininů využívá protonový gradient, jedná se tedy o sekundární aktivní transport. Důležitou funkcí tohoto přenašeče je nejen transport cytokininů, ale také stabilizace přenašeče *AtPIN1* (PIN FORMED 1) (Tessi *et al.*, 2023). *AtPIN1* je přenašeč auxinu (jiný typ fytohormonu) a zprostředkovává jeho transport v kořeni směrem ke klidovému centru v kořenové špičce (Sabatini *et al.*, 1999). Nachází se především na bazálních stranách buněk stéle a endodermis kořene (Friml *et al.*, 2002). U rostlin

mutovaných v *AtAZG1* nebo *AtAZG2* je přenašeče *AtPIN1* výrazně menší množství, což u obou *AtAZG* přenašečích vypovídá o jejich funkci ve stabilizaci tohoto proteinu. Stejně jako *AtAZG2* ovlivňuje vývoj postranních kořenů. Mutantní rostliny měly oproti kontrolním rostlinám větší množství postranních kořenů, což poukazuje na roli těchto dvou přenašečů ve vývoji tohoto orgánu. Další funkcí je odpověď na stres ze zasolení, při němž dochází ke zvýšení transkripce genu *AtAZG1* (Tessi *et al.*, 2023).

7.2.5 ENT – EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTERS

ENT byly u rostlin nejdříve popsány jako přenašeče nukleosidů s velkou afinitou k adenosinu a jako první byl popsán *AtENT1*. Později bylo na kvasinkových buňkách exprimujících *OsENT2* zjištěno, že tato rodina přenašečů je schopna transportovat cytokininy (Hirose *et al.*, 2005).

Genom *Arabidopsis* obsahuje 8 genů pro tento přenašeč (*AtENT1-8*) a u 5 z nich (*AtENT1, 3, 4, 6, 7*) je podrobně popsán transportní mechanismus a další specifika. 7 *AtENT* genů, u kterých se podařilo identifikovat cDNA, jsou si blíže příbuzné mezi sebou než s ENT z jiných organismů. Nepodařilo se identifikovat cDNA pouze u *AtENT5*, což může být způsobeno například tím, že tento gen není transkribován nebo že jsou hladiny transkriptu velmi nízké atd. (Li *et al.*, 2003). ENT byly také popsány u rýže, jejíž genom obsahuje 4 *ENT* geny (*OsENT1-4*) (Hirose *et al.*, 2005).

Způsob transportu přes membránu se u jednotlivých isoformů liší. Z názvu vyplývá, že půjde o ekvilibrativní přenos, ale většina rostlinných ENT je závislá na protonovém gradientu a zprostředkovává tedy sekundární aktivní transport (Girke *et al.*, 2014). Tento typ přenosu byl potvrzen v mnoha studiích. V některých za použití protonoforů, což jsou látky narušující protonový gradient na membránách díky schopnosti přenosu protonů. V takových případech po aplikaci například karbonylkyanid-*m*-chlorofenylhydrazonu (CCCP) nebo 2,4-dinitrofenolu (DNP) byl transport prostřednictvím ENT přenašečů inhibován (Möhlmann *et al.*, 2001; Wormit *et al.*, 2004). V jiných případech byl transport zkoumán v závislosti na změnách pH (Girke *et al.*, 2015). Výjimkou je *AtENT7*, jehož transport není ovlivněn ani změnami pH ani přítomností protonoforů, z čehož vyplývá, že nevyužívá k transportu protonový gradient, ale umožňuje usnadněnou difuzi a chová se tak jako klasický ekvilibrativní přenašeč (Wormit *et al.*, 2004; Girke *et al.*, 2015)

Transport adenosinu je u AtENT1 inhibován purinovými i pyrimidinovými nukleosidy, což svědčí o jeho široké substrátové specifitě. Nebyl ale inhibován uridinem a žádnými volnými bázemi, tudíž je netransportuje (Möhlmann *et al.*, 2001). Má 11 transmembránových domén, stejně jako všechny ENT přenašeče, a vykazuje vysokou podobnost lidskému nukleosidovému transportéru human ENT1 (Li and Wang, 2000). AtENT1 se vyskytuje v plazmatické membráně (Li and Wang, 2000) i na tonoplastu (Jaquinod *et al.*, 2007), kde by mohl zajišťovat export nukleosidů a produktů rozpadu RNA z vakuoly do cytoplazmy (Bernard *et al.*, 2011).

AtENT3 je lokalizovaný v plazmatické membráně a je schopný transportovat také uridin, čehož AtENT1 není schopný. Dalším rozdílem je, že AtENT1 je téměř 100% inhibovaný protonofory (CCCP, DNP) (Möhlmann *et al.*, 2001), ale AtENT3 je jimi inhibovaný podstatně méně, což může naznačovat, že není zcela závislý na protonovém gradientu. V experimentu, kde byl AtENT3 exprimovaný v kvasinkových buňkách importujícími adenosin, po přidání iPR ani tZR nedošlo k výrazné inhibici příjmu adenosinu a podobné výsledky byly také u AtENT7. U AtENT6 se výsledek lišil, a to u buněk ošetřených iPR, kde došlo k výraznější inhibici příjmu adenosinu. Tyto výsledky naznačují, že by AtENT6 mohl transportovat iPR a také mít roli v kompartmentalizaci iP a tZ, jelikož má rozdílnou afinitu k iPR a tZR (Hirose *et al.*, 2008). AtENT6 je také lokalizovaný v plazmatické membráně (Wormit *et al.*, 2004). V rostlině se AtENT6 vyskytuje nejvíce v kořeni, listech, květech a průduších, takže je možné, že je zapojený do transportu na dlouhou vzdálenost (Hirose *et al.*, 2008).

AtENT3 se společně s AtENT1 nachází ve vysokých hladinách v kořeni, kde jsou nejspíše zapojeny do transportu cytokininů (Li *et al.*, 2003). V laboratoři hormonálních regulací u rostlin, ÚEB AV ČR byla prokázána přítomnost ENT1 a ENT3 také přímo ve rhizodermis kořene, pomocí konfokální mikroskopie díky označení přenašečů GFP (green fluorescent protein) (Hoyerová, osobní sdělení). Nedávná studie popsala funkci AtENT3 v řízení množství cytokininů v kořeni. Autoři se zde poprvé zabývali množstvím cytokininů v kořeni a nadzemní části rostlin zvlášť. Rostliny s mutací v AtENT3 obsahovaly v kořenech méně cytokininů než kontrolní rostliny a bylo tomu tak u rostlin ošetřených i neošetřených zeatinribosidem. To nasvědčuje tomu, že tento přenašeč zajišťuje příjem cytokininů do kořene. Opačný výsledek byl u nadzemní části, ve které bylo u mutantních rostlin větší množství cytokininů, a to konkrétně aplikovaného zeatinribosidu, což znamená, že byl více transportován z kořene do nadzemní části. Důvodem jsou chybějící AtENT3 přenašeče, které za běžných podmínek zajišťují příjem cytokininů do buněk kořene, čímž je snižované množství cytokininů, které může být transportováno do xylému přenašečem ABCG14 a dopraveno tak do nadzemní části

(Zhang *et al.*, 2014; Korobova *et al.*, 2021). Kořeny mutantních rostlin byly v obou případech delší, což lze přisuzovat nižší hladině cytokininů, které fungují jako negativní regulátor aktivity kořenového meristému (Werner *et al.*, 2003; Korobova *et al.*, 2021).

U AtENT8 se původně zdálo, že mu chybí transportní funkce. Tento výsledek mohl být způsoben tím, že volné nukleosidy nejsou substrátem pro tento přenašeč anebo proto, že se přenašeč nesprávně integroval do plazmatické membrány kvasinek, na kterých byla studie prováděna (Wormit *et al.*, 2004). Později bylo zjištěno, že rostliny se zvýšenou expresí AtENT8 jsou hypersenzitivní na iPR, na iP ale ne. To potvrzuje, že transportní formou cytokininů u těchto přenašečů jsou nukleosidové formy. Co se týká rozložení přenašeče v rostlinném těle, nejvíce se vyskytuje v hypokotylu, stonkovém apikálním meristému, stonku, řapíku, nezralých plodech a primárních vodivých pletivech v listech. Ve zbylých pletivech listu a v kořeni se téměř nevyskytuje, což znamená, že cytokininy v těchto pletivech musí transportovat analogický přenašeč a tím je již zmíněný AtENT3, u kterého byl v této studii prokázán transport cytokininových nukleosidů (Sun *et al.*, 2005).

ENT přenašeče u rostlin nejsou popsány pouze u *Arabidopsis*, ale také u rýže. Jsou nalezeny celkem čtyři *OsENT* geny (*OsENT1-4*), jejichž exprese je rozdílná v jednotlivých orgánech rostliny. Transkripty *OsENT* se vyskytují ve všech testovaných orgánech (kořen, stonek, listová pochva, listová čepel, semena), *OsENT2-4* se nacházejí hlavně v kořenech. Celkově se v rostlině nachází nejvíce transkriptu *OsENT2*, a je tak dominantní isoformou. Největší aktivitu má *OsENT2* při pH 5, ale částečná aktivita přetrvává i při vyšších hodnotách pH. Inhibice protonoforem CCCP je okolo 30 %, takže se zdá, že *OsENT2* nemá transport zcela závislý na protonovém gradientu. Také u tohoto přenašeče byla potvrzena schopnost transportovat cytokininy, a to s vyšší afinitou k iPR než k tZR. V průběhu vývoje se lokalizace přenašeče v rámci rostliny proměňuje. V malých semenáčcích se vyskytuje nejvíce v kořeni a v dospělých rostlinách ve vodivých pletivech celé rostliny. Rozložení tohoto přenašeče v rostlinném těle naznačuje, že by se mohl účastnit transportu na dlouhou vzdálenost (Hirose *et al.*, 2005).

8 Bakterie produkující cytokininy

8.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Cytokininy nejsou pouze rostlinnou záležitostí, ale také bakteriální. *Agrobacterium tumefaciens* je bakterie způsobující nádory na rostlinách, pomocí tumor indukujícího plazmidu (Ti-plazmid). Tento plazmid obsahuje segment transferové DNA (T-DNA), který se přenesou do rostlinné buňky. V rostlinné buňce je T-DNA transportována do jádra, kde je následně začleněna do genomu. Po napadení touto bakterií dochází v rostlině ke zvýšené syntéze rostlinných hormonů a opinů, což jsou nízkomolekulární látky, sloužící jako zdroj dusíku a uhlíku pro *Agrobacterium*. Mezi těmito hormony jsou právě také cytokininy. Díky této interakci mezi rostlinou a bakterií byl již v osmdesátých letech popsán enzym zajišťující přenos postranního isopentenylového řetězce na AMP, což je důležitý krok v syntéze cytokininů. Gen pro tento enzym se nachází právě na Ti-plazmidu a u bakterií a následně i u rostliny slouží k syntéze cytokininů. Nazývá se DMA transferáza (Akiyoshi *et al.*, 1984) a homologický enzym IPT byl u rostlin nalezen až o mnoho let později (Kakimoto, 2001; Takei, Sakakibara and Sugiyama, 2001).

8.2 Bakterie podporující růst rostlin

Okolo kořenů rostlin, v rhizosféře, se nachází větší koncentrace bakterií než v ostatních částech půdy. Je to proto, že rostliny svými kořeny vylučují velké množství jimi syntetizovaných látek, a mohou tak bakterie přitahovat, a dochází mezi nimi k vytvoření symbiotického vztahu (Lynch and Whipps, 1990). Některé z těchto bakterií patří mezi bakterie podporující růst rostlin (PGPR – plant growth promoting rhizobacteria), které jsou schopné produkovat fytohormony, vitaminy a růstové faktory (Babalola, 2010). Působení PGPR na rostliny může být přímé a nepřímé (Glick, 1995). Mezi přímé mechanismy patří produkce fytohormonů, fixace dusíku, solubilizace fosforu atd. Nepřímý mechanismus může být například inhibice rostlinných patogenních hub a bakterií díky produkci antibiotik nebo enzymů degradujících buněčné stěny (Olanrewaju, Glick and Babalola, 2017). PGPR pomáhají rostlinám svou činností lépe zvládat stresové podmínky, jako je zvýšená salinita nebo sucho (Kurepin *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2016).

Mezi hormony, které mohou bakterie syntetizovat jsou také cytokininy, a to především ve formě ribosidů. Existuje mnoho druhů bakterií, které jsou syntézy schopné, například již

zmíněné *Agrobacterium spp.* Dále *Pseudomonas spp.*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Paenibacillus polyxyma* a další (Akiyoshi, Regier and Gordon, 1987; Nieto and Frankenberger, 1989; Taller and Wong, 1989; Timmusk *et al.*, 1999). Předpokládá se, že fytohormony produkované bakteriemi mají pozitivní vliv na růst rostlin (Arkhipova *et al.*, 2005). Bakterie v okolí rostlin jsou také schopné zvyšovat přístupnost minerálních látek pro příjem kořeny, a to může mít vliv na obsah fytohormonů v rostlině (Takei *et al.*, 2001; Ping and Boland, 2004).

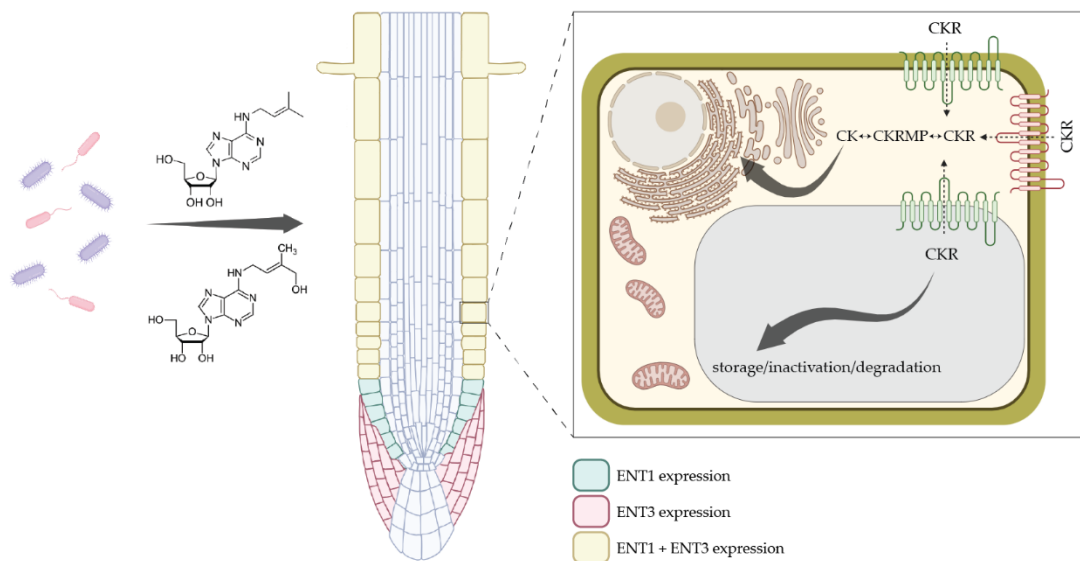
Nicméně na rostlinách salátu bylo prokázáno, že po inokulaci *Bacillus subtilis* byla v rostlině zvýšená hladina cytokininů a bylo zde vyloučeno, že by šlo o cytokininy syntetizované rostlinou. Akumulace cytokininů byla vyšší v kořenech než v nadzemní části, což odpovídá tomu, že byly přijaté do rostliny pomocí kořenů ze substrátu. Obsah zeatinu v rostlině vzrostl stejnou mírou jako jeho ribosilovaná forma. Bakterie ovšem v tomto případě zeatin neprodukovaly, takže zvýšená hladina zeatinu v rostlině může být vysvětlena konverzí ZR na zeatin díky LOG (Arkhipova *et al.*, 2005; Kurakawa *et al.*, 2007). Inokulace také ovlivnila růst kořenů i listů, jejichž čerstvá hmotnost byla zvýšena již po pěti dnech oproti kontrolním rostlinám. U rostlin také došlo ke zvýšené produkci chlorofylu a karotenoidů (Arkhipova *et al.*, 2005).

V další studii bylo prokázáno, že vojtěška po inokulaci transformovanou bakterií *Sinorhizobium meliloti*, která produkuje cytokininy, má podstatně vyšší toleranci ke stresu ze sucha. V listech vojtěšky po inokulaci *Sinorhizobium meliloti* byla hladina zeatinu vyšší oproti neošetřeným rostlinám a po suchém období byly inokulované rostliny schopné přežít a měly znatelně vyšší čerstvou hmotnost (Xu, Li and Luo, 2012).

Při pokusech s bakterií *Bacillus megaterium* bylo prokázáno, že k podpoře růstu u inokulovaných rostlin dojde pouze v případě, pokud jsou v rostlině k dispozici cytokininové receptory AHK2, AHK3 a AHK4. V případě trojitého mutanta ke stimulaci nedošlo (Ortíz-Castro, Valencia-Cantero and López-Bucio, 2008). Dále bylo zjištěno, že při ošetření rostlin *Arabidopsis thaliana* bakterií *Bacillus sp. LZR216* dochází ke snížení exprese *ARR* typu A a *AHP* v nadzemní části, a naopak ke zvýšení exprese těch samých genů v kořeni. Tato bakterie podporuje růst a mění architekturu kořenového systému. Konkrétně z *AHP* proteinů je při odezvě na ošetření touto bakterií nejdůležitější nejspíše *AHP5* a v případě trojitého mutanta *ahp2,3,5* nedochází k podpoře růstu. Z toho vyplývá, že aby došlo k odpovědi na bakterie, jsou potřebné *AHP* a *ARR* (Wang *et al.*, 2018). I v dalším případě, při ošetření rostlin *Arabidopsis*

bakterií *Azospirillum brasilense* Sp245, došlo v kořeni ke zvýšení exprese transkripčního faktoru *ARR5* a u rostlin s trojitou mutací v receptoru pro cytokininy (*ahk2,3,4*) opět nedošlo k podpoře růstu. Aby došlo k cytokininové signalizaci v rostlině, musí dojít k přímé interakci mezi rostlinou a PGPR a kontakt rostliny pouze s těkavými látkami produkovanými bakteriemi není dostačující (Méndez-Gómez *et al.*, 2021).

Tato zjištění naznačují, že se opravdu jedná o cytokininy produkované bakteriemi a že se nejedná pouze o zvýšenou produkci cytokininů samotnou rostlinou. Aby ale mohlo dojít k signalizaci těmito molekulami v rostlině, musí být nejdříve transportovány kořeny dovnitř do buněk. Přenašeče, které tento transport zajišťují ovšem nejsou známy. Vzhledem k tomu, že bakterie syntetizují cytokininy ve formě ribosidů/nukleosidů (Arkhipova *et al.*, 2005), na které jsou citlivé přenašeče z rodiny ENT (Sun *et al.*, 2005), mohly by být tyto přenašeče, konkrétně ENT1 a ENT3, které se vyskytují ve rhizodermis (Hoyerová, osobní sdělení), dobrými kandidáty pro příjem cytokininů produkovaných PGPR. Na obrázku 5 je schéma popisující tuto hypotézu.



Obrázek 5: Bakterie v rhizosféře jsou schopné produkovat cytokininové ribosidy, které rostlina následně může přijmout přenašeči ENT1 a ENT3, lokalizovanými ve rhizodermis. Cytokininové ribosidy mohou být následně metabolizovány na volné báze, které jsou schopné signalizace (CKR – cytokininové ribosidy, CKRMP – cytokininribosidmonofosfát, CK – volná báze cytokininu) (schéma vzniklo ve spolupráci s LHR ÚEB AV ČR a LRR UP).

9 Závěr

V této práci byly souhrnně popsány hlavní poznatky o cytokininech, počínaje jejich strukturou, vlastnostmi, biosyntézou, metabolismem a signalizací, aby bylo možné následně lépe porozumět jejich transportu, který byl poté popsán detailněji. Transport byl zaměřen především na přenos přes plazmatickou membránu a konkrétně na přenašeče z rodiny ENT. Na závěr byly cytokininy popsány i z jiného pohledu, a to na jejich funkci ve spojení mezi bakterií a rostlinou.

ENT přenašeče jsou poměrně dobře popsanou skupinou a jejich úloha v rostlinách je nemalá. Velmi zajímavé je, že bakterie jsou schopné také produkovat cytokininy, a to ve formě ribosidů, které rostlina umí z rhizosféry přijmout a využít. Jelikož ENT přenašeče transportují ribosidy, vyplývá z poznatků o nich, že jsou možnými kandidáty pro import cytokininů produkovaných bakteriemi. Konkrétně to lze předpokládat o ENT1 a ENT3, protože jsou lokalizované v rhizodermis kořene.

Symbióza mezi rostlinou a bakteriemi, a především zmíněný příjem bakteriálních cytokininů, je téma, na kterém bych ráda pracovala v průběhu navazujícího magisterského studia na PřF UK na katedře Experimentální biologie rostlin.

10 Citovaná literatura

Akiyoshi, D.E. *et al.* (1984) 'T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19), pp. 5994–5998. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.5994>.

Akiyoshi, D.E., Regier, D.A. and Gordon, M.P. (1987) 'Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp', *Journal of Bacteriology*, 169(9), pp. 4242–4248. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.169.9.4242-4248.1987>.

Anantharaman, V. and Aravind, L. (2001) 'The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors', *Trends in Biochemical Sciences*, 26(10), pp. 579–582. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01968-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01968-5).

Antoniadi, I. *et al.* (2020) 'Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins', *Nature Communications*, 11, p. 4284. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17700-9>.

Argueso, C.T. and Kieber, J.J. (2024) 'Cytokinin: From autoclaved DNA to two-component signaling', *The Plant Cell*, 36(5), pp. 1429–1450. Available at: <https://doi.org/10.1093/plcell/koad327>.

Arhipova, T.N. *et al.* (2005) 'Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants', *Plant and Soil*, 272, pp. 201–209. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>.

Babalola, O.O. (2010) 'Beneficial bacteria of agricultural importance', *Biotechnology Letters*, 32(11), pp. 1559–1570. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0347-0>.

Bernard, C. *et al.* (2011) 'Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*', *Journal of Experimental Botany*, 62(13), pp. 4627–4637. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/err183>.

Brownlee, B.G., Hall, R.H. and Whitty, C.D. (1975) '3-Methyl-2-butenal: An Enzymatic Degradation Product of the Cytokinin, N^6 -(Δ^2 -Isopentenyl)adenine', *Canadian Journal of Biochemistry*, 53(1), pp. 37–41. Available at: <https://doi.org/10.1139/o75-006>.

Brzobohatý, B. *et al.* (1993) 'Release of Active Cytokinin by a β -Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem', *Science*, 262(5136), pp. 1051–1054.

Bürkle, L. *et al.* (2003) 'Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis', *The Plant Journal*, 34(1), pp. 13–26. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01700.x>.

Campos, N. *et al.* (1992) 'A protein from maize labeled with azido-IAA has novel β -glucosidase activity', *The Plant Journal*, 2(5), pp. 675–684. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.tb00136.x>.

Cedzich, A. *et al.* (2008) 'Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures', *Plant Physiology*, 148(4), pp. 1857–1867. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.108.128454>.

Chen, L.-Q. *et al.* (2010) 'Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens', *Nature*, 468(7323), pp. 527–532. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature09606>.

Chen, L.-Q. *et al.* (2015) 'A Cascade of Sequentially Expressed Sucrose Transporters in the Seed Coat and Endosperm Provides Nutrition for the Arabidopsis Embryo', *The Plant Cell*, 27(3), pp. 607–619. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134585>.

D'Agostino, I.B., Deruère, J. and Kieber, J.J. (2000) 'Characterization of the Response of the Arabidopsis Response Regulator Gene Family to Cytokinin', *Plant Physiology*, 124(4), pp. 1706–1717. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1706>.

Feng, J. *et al.* (2013) 'S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling', *Nature Communications*, 4, p. 1529. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms2541>.

Friml, J. *et al.* (2002) 'AtPIN4 Mediates Sink-Driven Auxin Gradients and Root Patterning in Arabidopsis', *Cell*, 108(5), pp. 661–673. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00656-6).

Galuszka, P. *et al.* (2007) 'Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from Arabidopsis thaliana Expressed in Nicotiana tabacum L.',

Journal of Plant Growth Regulation, 26(3), pp. 255–267. Available at:
<https://doi.org/10.1007/s00344-007-9008-5>.

Gaudinová, A. *et al.* (2005) ‘The Involvement of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase and Zeatin Reductase in Regulation of Cytokinin Levels in Pea (*Pisum sativum* L.) Leaves’, *Journal of Plant Growth Regulation*, 24, pp. 188–200. Available at:
<https://doi.org/10.1007/s00344-005-0043-9>.

Gillissen, B. *et al.* (2000) ‘A New Family of High-Affinity Transporters for Adenine, Cytosine, and Purine Derivatives in Arabidopsis’, *The Plant Cell*, 12(2), pp. 291–300. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.12.2.291>.

Girke, C. *et al.* (2014) ‘Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism’, *Frontiers in Plant Science*, 5, p. 443. Available at:
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00443>.

Girke, C. *et al.* (2015) ‘High yield expression and purification of equilibrative nucleoside transporter 7 (ENT7) from *Arabidopsis thaliana*’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(9), pp. 1921–1929. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.003>.

Glick, B.R. (1995) ‘The enhancement of plant growth by free-living bacteria’, *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), pp. 109–117. Available at: <https://doi.org/10.1139/m95-015>.

Haberlandt, G. (1913) *Zur physiologie der zellteilung*. Kgl. Akademie d. Wissenschaften.

Hirose, N. *et al.* (2005) ‘Functional Characterization and Expression Analysis of a Gene, OsENT2, Encoding an Equilibrative Nucleoside Transporter in Rice Suggest a Function in Cytokinin Transport’, *Plant Physiology*, 138(1), pp. 196–206. Available at:
<https://doi.org/10.1104/pp.105.060137>.

Hirose, N. *et al.* (2008) ‘Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation’, *Journal of Experimental Botany*, 59(1), pp. 75–83. Available at:
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm157>.

Hošek, P. *et al.* (2020) ‘Distinct metabolism of N-glucosides of isopentenyladenine and transzeatin determines cytokinin metabolic spectrum in *Arabidopsis*’, *New Phytologist*, 225(6), pp. 2423–2438. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.16310>.

Hou, B. *et al.* (2004) ‘N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp. 47822–47832. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409569200>.

Hu, Y. *et al.* (2023) ‘Multi-Knock—a multi-targeted genome-scale CRISPR toolbox to overcome functional redundancy in plants’, *Nature Plants*, 9(4), pp. 572–587. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01374-4>.

Hutchison, C.E. *et al.* (2006) ‘The *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling’, *The Plant Cell*, 18(11), pp. 3073–3087. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045674>.

Inoue, T. *et al.* (2001) ‘Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*’, *Nature*, 409, pp. 1060–1063. Available at: <https://doi.org/10.1038/35059117>.

Ioio, R.D. *et al.* (2007) ‘Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation’, *Current Biology*, 17(8), pp. 678–682. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>.

Islam, F. *et al.* (2016) ‘Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility’, *Plant Growth Regulation*, 80(1), pp. 23–36. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0142-y>.

Jamruszka, T. *et al.* (2024) ‘*Medicago truncatula* ABCG40 is a cytokinin importer that negatively regulates lateral root density and nodule number’. bioRxiv, p. 2022.11.10.516000. Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.11.10.516000>.

Jaquinod, M. *et al.* (2007) ‘A Proteomics Dissection of *Arabidopsis thaliana* Vacuoles Isolated from Cell Culture’, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(3), pp. 394–412. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.M600250-MCP200>.

Jarzyniak, K. *et al.* (2021) ‘Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins’, *Nature Plants*, 7, pp. 428–436. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00873-6>.

Kakimoto, T. (2001) ‘Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate:ATP/ADP Isopentenyltransferases’, *Plant and Cell Physiology*, 42(7), pp. 677–685. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pce112>.

Kamínek, M. (2015) ‘Tracking the Story of Cytokinin Research’, *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, pp. 723–739. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9543-4>.

Kasahara, H. *et al.* (2004) ‘Distinct Isoprenoid Origins of cis- and trans-Zeatin Biosyntheses in Arabidopsis’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), pp. 14049–14054. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M314195200>.

Kiba, T. *et al.* (2003) ‘The Type-A Response Regulator, ARR15, Acts as a Negative Regulator in the Cytokinin-Mediated Signal Transduction in Arabidopsis thaliana’, *Plant and Cell Physiology*, 44(8), pp. 868–874. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg108>.

Kiba, T. *et al.* (2013) ‘Side-Chain Modification of Cytokinins Controls Shoot Growth in Arabidopsis’, *Developmental Cell*, 27(4), pp. 452–461. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.004>.

Kieber, J.J. and Schaller, G.E. (2014) ‘Cytokinins’, *The Arabidopsis Book*, 12, p. e0168. Available at: <https://doi.org/10.1199/tab.0168>.

Kim, H.J. *et al.* (2006) ‘Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), pp. 814–819. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0505150103>.

Ko, D. *et al.* (2014) ‘Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19), pp. 7150–7155. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1321519111>.

Konishi, M. and Yanagisawa, S. (2013) ‘Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling’, *Nature Communications*, 4, p. 1617. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms2621>.

- Korobova, A. *et al.* (2021) ‘Limitation of Cytokinin Export to the Shoots by Nucleoside Transporter ENT3 and Its Linkage with Root Elongation in Arabidopsis’, *Cells*, 10(2), p. 350.
- Kubiasová, K. *et al.* (2020) ‘Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum’, *Nature Communications*, 11, p. 4285. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17949-0>.
- Kurakawa, T. *et al.* (2007) ‘Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme’, *Nature*, 445, pp. 652–655. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature05504>.
- Kurepin, L.V. *et al.* (2015) ‘Involvement of plant stress hormones in Burkholderia phytofirmans-induced shoot and root growth promotion’, *Plant Growth Regulation*, 77(2), pp. 179–187. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0049-7>.
- Letham, D.S. (1963) ‘Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*’, *Life Sciences*, 8, pp. 569–573. Available at: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(63\)90108-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(63)90108-5).
- Li, G. *et al.* (2003) ‘Equilibrative Nucleoside Transporters of *Arabidopsis thaliana*’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp. 35732–35742. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M304768200>.
- Li, J. and Wang, D. (2000) ‘Cloning and in vitro expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from *Arabidopsis thaliana*’, *Plant Science*, 157(1), pp. 23–32. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00261-2).
- Lynch, J.M. and Whipps, J.M. (1990) ‘Substrate flow in the rhizosphere’, *Plant and Soil*, 129(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00011685>.
- Maeda, Y. *et al.* (2018) ‘A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*’, *Nature Communications*, 9(1), p. 1376. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03832-6>.
- Mähönen, A.P. *et al.* (2006) ‘Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate During Vascular Development’, *Science*, 311(5757), pp. 94–98. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1118875>.

- Mansfield, T.A., Schultes, N.P. and Mourad, G.S. (2009) 'AtAzg1 and AtAzg2 comprise a novel family of purine transporters in Arabidopsis', *FEBS Letters*, 583(2), pp. 481–486. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.048>.
- Martin, R.C. *et al.* (1989) 'An Enzyme Mediating the Conversion of Zeatin to Dihydrozeatin in Phaseolus Embryos', *Plant Physiology*, 90(4), pp. 1630–1635. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.90.4.1630>.
- Martin, R.C. *et al.* (2001) 'A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), pp. 5922–5926. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.101128798>.
- Martin, R.C., Mok, M.C. and Mok, D.W.S. (1999a) 'A Gene Encoding the Cytokinin Enzyme ZeatinO-Xylosyltransferase of Phaseolus vulgaris', *Plant Physiology*, 120(2), pp. 553–558. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.120.2.553>.
- Martin, R.C., Mok, M.C. and Mok, D.W.S. (1999b) 'Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from Phaseolus lunatus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, pp. 284–289. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.284>.
- Mason, M.G. *et al.* (2004) 'Type-B Response Regulators Display Overlapping Expression Patterns in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 135(2), pp. 927–937. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.103.038109>.
- McGaw, B.A. and Horgan, R. (1983) 'Cytokinin catabolism and cytokinin oxidase', *Phytochemistry*, 22(5), pp. 1103–1105. Available at: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80200-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80200-3).
- Méndez-Gómez, M. *et al.* (2021) 'Azospirillum brasilense Sp245 triggers cytokinin signaling in root tips and improves biomass accumulation in Arabidopsis through canonical cytokinin receptors', *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(8), pp. 1639–1649. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01036-9>.
- Miyawaki, K. *et al.* (2006) 'Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), pp. 16598–16603. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0603522103>.

Möhlmann, T. *et al.* (2001) ‘Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At)’, *FEBS Letters*, 509(3), pp. 370–374. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03195-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03195-7).

Nedvěd, D. *et al.* (2021) ‘Differential Subcellular Distribution of Cytokinins: How Does Membrane Transport Fit into the Big Picture?’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), p. 3428. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22073428>.

Nieto, K.F. and Frankenberger, W.T. (1989) ‘Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*’, *Soil Biology and Biochemistry*, 21(7), pp. 967–972. Available at: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90089-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90089-8).

Olanrewaju, O.S., Glick, B.R. and Babalola, O.O. (2017) ‘Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), p. 197. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>.

Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E. and López-Bucio, J. (2008) ‘Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling’, *Plant Signaling & Behavior*, 3(4), pp. 263–265. Available at: <https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5204>.

Osugi, A. *et al.* (2017) ‘Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots’, *Nature Plants*, 3, p. 17112. Available at: <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.112>.

Pačes, V., Werstiuk, E. and Hall, R.H. (1971) ‘Conversion of N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue’, *Plant Physiology*, 48(6), pp. 775–778. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.48.6.775>.

Ping, L. and Boland, W. (2004) ‘Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*’, *Trends in Plant Science*, 9(6), pp. 263–266. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.04.008>.

Punwani, J.A. *et al.* (2010) ‘The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling: Localization of AHPs is independent of cytokinin signaling’, *The Plant Journal*, 62(3), pp. 473–482. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04165.x>.

Radchuk, V. *et al.* (2023) ‘SWEET11b transports both sugar and cytokinin in developing barley grains’, *The Plant Cell*, 35(6), pp. 2186–2207. Available at: <https://doi.org/10.1093/plcell/koad055>.

Sabatini, S. *et al.* (1999) ‘An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root’, *Cell*, 99(5), pp. 463–472. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81535-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81535-4).

Sakai, H. *et al.* (2001) ‘ARR1, a Transcription Factor for Genes Immediately Responsive to Cytokinins’, *Science*, 294(5546), pp. 1519–1521. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1065201>.

Sakai, H., Aoyama, T. and Oka, A. (2000) ‘Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators’, *The Plant Journal*, 24(6), pp. 703–711. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2000.00909.x>.

Sakakibara, H. (2006) ‘CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation’, *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), pp. 431–449. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>.

Sakakibara, H. (2021) ‘Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling’, *The Plant Journal*, 105(2), pp. 421–430. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.15011>.

Samuelson, M.E. and Larsson, C.-M. (1993) ‘Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium’, *Plant Science*, 93(1), pp. 77–84. Available at: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90036-Y](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90036-Y).

Schmülling, T. *et al.* (2003) ‘Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species’, *Journal of Plant Research*, 116(3), pp. 241–252. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0096-4>.

Singh, S. *et al.* (1992) ‘Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VI. Effect of nitrogenous nutrients on cytokinin levels and senescence of tobacco leaves’, *Physiologia Plantarum*, 84(2), pp. 262–268. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04663.x>.

Spíchal, L. *et al.* (2004) ‘Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay’, *Plant and Cell Physiology*, 45(9), pp. 1299–1305. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pch132>.

Strnad, M. (1997) ‘The aromatic cytokinins’, *Physiologia Plantarum*, 101(4), pp. 674–688. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x>.

Sun, J. *et al.* (2005) ‘*Arabidopsis* SOI33/AtENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport In Planta’, *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(5), pp. 588–603. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00104.x>.

Suzuki, T. *et al.* (1998) ‘Histidine-Containing Phosphotransfer (HPT) Signal Transducers Implicated in His-to-Asp Phosphorelay in *Arabidopsis*’, *Plant and Cell Physiology*, 39(12), pp. 1258–1268. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029329>.

Suzuki, T. *et al.* (2000) ‘Compilation and Characterization of Histidine-Containing Phosphotransmitters Implicated in His-to-Asp Phosphorelay in Plants: AHP Signal Transducers of *Arabidopsis thaliana*’, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(11), pp. 2486–2489. Available at: <https://doi.org/10.1271/bbb.64.2486>.

Taiz, L. *et al.* (2015) *Plant Physiology and Development*. 6th edn. USA: Sinauer Associated Incorporated.

Takei, K. *et al.* (2001) ‘Nitrogen-Dependent Accumulation of Cytokinins in Root and the Translocation to Leaf: Implication of Cytokinin Species that Induces Gene Expression of Maize Response Regulator’, *Plant and Cell Physiology*, 42(1), pp. 85–93. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pce009>.

Takei, K., Sakakibara, H. and Sugiyama, T. (2001) ‘Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana*’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), pp. 26405–26410. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M102130200>.

Takei, K., Yamaya, T. and Sakakibara, H. (2004) ‘*Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of trans-Zeatin’, *Journal of*

Biological Chemistry, 279(40), pp. 41866–41872. Available at:
<https://doi.org/10.1074/jbc.M406337200>.

Taller, B.J. and Wong, T.-Y. (1989) ‘Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* Culture Medium’, *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), pp. 266–267. Available at:
<https://doi.org/10.1128/aem.55.1.266-267.1989>.

Tessi, T.M. *et al.* (2021) ‘*Arabidopsis* AZG2 transports cytokinins in vivo and regulates lateral root emergence’, *New Phytologist*, 229(2), pp. 979–993. Available at:
<https://doi.org/10.1111/nph.16943>.

Tessi, T.M. *et al.* (2023) ‘AZG1 is a cytokinin transporter that interacts with auxin transporter PIN1 and regulates the root stress response’, *New Phytologist*, 238(5), pp. 1924–1941. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.18879>.

Timmusk, S. *et al.* (1999) ‘Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*’, *Soil Biology and Biochemistry*, 31(13), pp. 1847–1852. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00113-3).

To, J.P.C. *et al.* (2004) ‘Type-A *Arabidopsis* Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling’, *The Plant Cell*, 16(3), pp. 658–671. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.018978>.

To, J.P.C. *et al.* (2007) ‘Cytokinin Regulates Type-A *Arabidopsis* Response Regulator Activity and Protein Stability via Two-Component Phosphorelay’, *The Plant Cell*, 19(12), pp. 3901–3914. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052662>.

Ueguchi, C., Koizumi, H., *et al.* (2001) ‘Novel Family of Sensor Histidine Kinase Genes in *Arabidopsis thaliana*’, *Plant and Cell Physiology*, 42(2), pp. 231–235. Available at:
<https://doi.org/10.1093/pcp/pce015>.

Ueguchi, C., Sato, S., *et al.* (2001) ‘The AHK4 Gene Involved in the Cytokinin-Signaling Pathway as a Direct Receptor Molecule in *Arabidopsis thaliana*’, *Plant and Cell Physiology*, 42(7), pp. 751–755. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pce094>.

Veach, Y.K. *et al.* (2003) ‘O-Glucosylation of cis-Zeatin in Maize. Characterization of Genes, Enzymes, and Endogenous Cytokinins’, *Plant Physiology*, 131(3), pp. 1374–1380. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.017210>.

Wang, J. *et al.* (2018) ‘An intact cytokinin-signaling pathway is required for *Bacillus* sp. LZR216-promoted plant growth and root system architecture alteration in *Arabidopsis thaliana* seedlings’, *Plant Growth Regulation*, 84(3), pp. 507–518. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0357-1>.

Werner, T. *et al.* (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(11), pp. 2532–2550. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>.

Wormit, A. *et al.* (2004) ‘Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family’, *Biochemical Journal*, 383(1), pp. 19–26. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20040389>.

Wulfetange, K. *et al.* (2011) ‘The Cytokinin Receptors of *Arabidopsis* Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum’, *Plant Physiology*, 156(4), pp. 1808–1818. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.111.180539>.

Xiao, Y. *et al.* (2019) ‘Big Grain3, encoding a purine permease, regulates grain size via modulating cytokinin transport in rice’, *Journal of Integrative Plant Biology*, 61(5), pp. 581–597. Available at: <https://doi.org/10.1111/jipb.12727>.

Xiao, Y. *et al.* (2020) ‘Endoplasmic Reticulum-Localized PURINE PERMEASE1 Regulates Plant Height and Grain Weight by Modulating Cytokinin Distribution in Rice’, *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 618560. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618560>.

Xu, J., Li, X.-L. and Luo, L. (2012) ‘Effects of Engineered *Sinorhizobium meliloti* on Cytokinin Synthesis and Tolerance of Alfalfa to Extreme Drought Stress’, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), pp. 8056–8061. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.01276-12>.

Yamada, H. *et al.* (2001) ‘The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane’, *Plant and Cell Physiology*, 42(9), pp. 1017–1023. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pce127>.

Yonekura-Sakakibara, K. *et al.* (2004) ‘Molecular Characterization of Cytokinin-Responsive Histidine Kinases in Maize. Differential Ligand Preferences and Response to cis-Zeatin’, *Plant Physiology*, 134(4), pp. 1654–1661. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.103.037176>.

Zhang, K. *et al.* (2014) ‘Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins’, *Nature Communications*, 5, p. 3274. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms4274>.

Zhao, J. *et al.* (2021) ‘Phloem unloading via the apoplastic pathway is essential for shoot distribution of root-synthesized cytokinins’, *Plant Physiology*, 186(4), pp. 2111–2123. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab188>.

Zhao, J. *et al.* (2023) ‘Arabidopsis ABCG14 forms a homodimeric transporter for multiple cytokinins and mediates long-distance transport of isopentenyladenine-type cytokinins’, *Plant Communications*, 4(2), p. 100468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100468>.

Zubo, Y.O. *et al.* (2017) ‘Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in Arabidopsis’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), pp. E5995–E6004. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1620749114>.

Zürcher, E. *et al.* (2016) ‘Plant development regulated by cytokinin sinks’, *Science*, 353(6303), pp. 1027–1030. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaf7254>.