

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědná fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lucie Doležálková

Homeostáze rostlinných hormonů:  
vzájemné působení mezi auxiny a cytokininy

Plant hormones homeostasis: auxin and cytokinin crosstalk

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Eva Zažímalová, CSc.

Konzultanti: Ing. Petre I. Dobrev, CSc.

Ing. Václav Motyka, CSc.

doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha 2016

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Evy Zažímalové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

---

Lucie Doležálková, v. r.

## Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. RNDr. Evě Zažímalové, CSc., Ing. Václavu Motykovi, CSc. a doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za jejich čas, ochotu a trpělivost při vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Marii Korecké, Bc. za její cenné rady a pomoc během práce v laboratoři, Ing. Petru I. Dobrevovi, CSc. za analýzu vzorků a v neposlední řadě také své rodině a přátelům za jejich podporu během celého studia.

## Abstrakt

Vzájemná kooperace fytohormonů je jedním z ústředních témat biologie rostlin už od 19. století. Díky pokrokům v molekulární biologii je v současnosti objasněna řada metabolických drah spojených s jednotlivými skupinami fytohormonů, nicméně jejich kooperace nám z větší části zůstává stále neznámá. Cílem této práce je posouzení účinků exogenní aplikace různých zástupců cytokininů na listové segmenty ovsa setého (*Avena sativa*) – a to jak specificky na hladiny fytohormonů, tak i v širším fyziologickém kontextu (vzhledem k jejich senescenci)

V práci jsme prokázali zvýšení hladin auxinu následkem exogenní aplikace vybraných cytokininů a poukázali na biologickou aktivitu *trans*-zeatin-9-glukosidu (považovaného dosud za ireverzibilní deaktivační formu) ve vybraném rostlinném modelu.

Klíčová slova: fytohormony, auxin, cytokininy, *Avena sativa*, senescenční biotest

## Abstract

It has been since 19<sup>th</sup> century when the phytohormones and their crosstalk became one of the central themes in plant biology. Due to advances in molecular biology there is number of metabolic pathways linked to certain groups of plant hormones revealed by now, nevertheless much remains to be determined about their cooperation. The aim of this thesis is to evaluate the effect of exogenous cytokinin application on oat leaf segments (*Avena sativa*) – both specifically towards other phytohormones levels and generally in physiological context (in relation to their senescence).

Our results confirmed increased auxin levels due to exogenous application of selected cytokinins and identified biological activity of *trans*-zeatin-9-glucoside (previously considered as irreversibly deactivated cytokinin type substance) in respective plant model.

(In Czech)

Key words: phytohormones, auxin, cytokinin, *Avena sativa*, senescence assay

# Obsah

1	Seznam použitých zkratk.....	8
2	Úvod.....	10
2.1	Auxin.....	11
2.1.1	Metabolismus auxinu.....	14
2.1.2	Transport auxinu.....	16
2.1.3	Signální dráha auxinu.....	18
2.2	Cytokininy.....	19
2.2.1	Metabolismus cytokininů.....	21
2.2.2	Transport cytokininů.....	22
2.2.3	Signální působení cytokininů.....	23
2.3	Vzájemná kooperace auxinů a cytokininů.....	23
3	Cíl práce.....	25
4	Materiál a metody.....	26
4.1	Materiál.....	26
4.1.1	Biologický materiál.....	26
4.1.2	Chemikálie.....	26
4.1.3	Přístroje a vybavení.....	26
4.2	Metody.....	27
4.2.1	Příprava rostlinného materiálu.....	27
4.2.2	Testovací roztoky.....	27
4.2.3	Inkubace listových segmentů.....	28
4.2.4	Analýza retence chlorofylu.....	28
4.2.5	Stanovení obsahu fytohormonů.....	28

5	Výsledky .....	33
5.1	Senescenční biotesty .....	33
5.2	Analýza obsahu fytohormonů.....	34
6	Diskuze.....	43
7	Závěr.....	46
8	Seznam použité literatury .....	47

# 1 Seznam použitých zkratek

1-NAA	kyselina 1-naftoová
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová
4-Cl-IAA	kyselina 4-chlorindolyl-3-octová
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
BAPN7G	6-benzylaminopurin-7-glukosid
BAPN9G	6-benzylaminopurin-9-glukosid
<i>cis</i> OPDA	<i>cis</i> -12-oxophytodienová kyselina
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ</i> 9G	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
<i>cZ</i> OG	<i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
<i>cZ</i> R	<i>cis</i> -zeatinribosid
<i>cZ</i> RMP	<i>cis</i> -zeatinribosidmonofosfát
<i>cZ</i> ROG	<i>cis</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid
CK	cytokininy
CPPU	N-(chloro-4-pyridyl)-N'-fenylmočovina
DHZ	dihydrozeatin
DHZ7G	dihydrozeatin-7-glukosid
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid
DHZR	dihydrozeatinribosid
DMAPP	dimethylallyl-pyrofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
ER	endoplasmatické retikulum
FW	hmotnost čerstvého rostlinného materiálu (z angl. fresh weight)
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát
IAA	indolyl-3-octová kyselina
IAA-Asp	indol-acetyl-aspartát
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
iP	isopentenyladenin
iP7G	isopentenyladenin-9-glukosid
iP9G	isopentenyladenin-7-glukosid



iPR	isopentenyladenosin
iPRMP	isopentenyladenosinmonofosfát
Kin	kinetin
MeIAA	methylester kyseliny indol-3-octové
mT	<i>meta</i> -topolin
oT	<i>ortho</i> -topolin
OxIAA	oxindol-3-octová kyselina
p.a.	pro analýzu (označení kvality chemikálií)
PAA	kyselina fenylactová
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
TDZ	thidiazuron
tRNA	transferová RNA
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZ7G	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
tZ9G	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
tZOG	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
tZR	<i>trans</i> -zeatinribosid
tZRMP	<i>trans</i> -zeatinribosid-5'-monofosfát
tZROG	<i>trans</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid

## 2 Úvod

Vznik mnohobuněčných organismů byl jednoznačně podmíněn rozvojem mezibuněčné komunikace. Děje jako růst, rozvoj jednotlivých orgánů regulace metabolismu, a mnohé další, jsou u vyšších organismů koordinovány pomocí signálních sloučenin. [1] Mezi tyto signální sloučeniny u rostlin patří fytohormony (jinak též rostlinné hormony) – obecně se vyskytující, přirozené, organické, většinou nízkomolekulární metabolity působící již v koncentracích  $10^{-9}$  –  $10^{-6}$  M. Na rozdíl od většiny živočišných hormonů se jedná o látky s pleiotropním účinkem, jejichž produkce ve většině případů není orgánově specifická a rozličnost fyziologických projevů je dána především kooperací různých skupin fytohormonů a reakcí na aktuální okolní podmínky. [2]

Za základní skupiny fytohormonů (dle chemické struktury) jsou považovány auxiny, cytokininy, gibbereliny, ethylen, abscisová kyselina, polyaminy, brassinosteroidy, jasmonáty, salicylová kyselina a strigolaktony, nicméně jejich počet v souvislosti s dalším vědeckým výzkumem narůstá. [3] Výsostní postavení mezi nimi pak zauímají auxiny a cytokininy a to nejen historicky (dle roku objevu), ale zejména kvůli skutečnosti, že dosud nejsou známy mutanty bez těchto fytohormonů. [2]

Existenci rostlinných růstových regulátorů postuloval na konci 19. století Julius von Sachs, který předpokládal rozvoj morfologicky odlišných orgánů na základě substancí (např. kořenotvorné nebo květovorné) pohybujících se různými směry rostlinou. [4] Souběžně roku 1880 podali důkaz přítomnosti růstových signálních látek u rostlin Charles a Francis Darwinovi, kteří experimentálně pozorovali prostorové oddělení percepčních orgánů gravitropismu resp. fototropismu od výkonných pletiv příslušné odpovědi (viz Obrázek 1, str. 12, část B). [5] Idea rostlinného hormonu poprvé vstoupila do literatury roku 1919 zásluhou Árpáda Paála, který dále rozvíjel práci Petera Boysen-Jensena (viz kapitola 2.1 Auxin, str. 11). [4] S myšlenkou dvou hormonů zodpovědných za indukci buněčného dělení, děje spojené s hojením ran a různými vývojovými ději

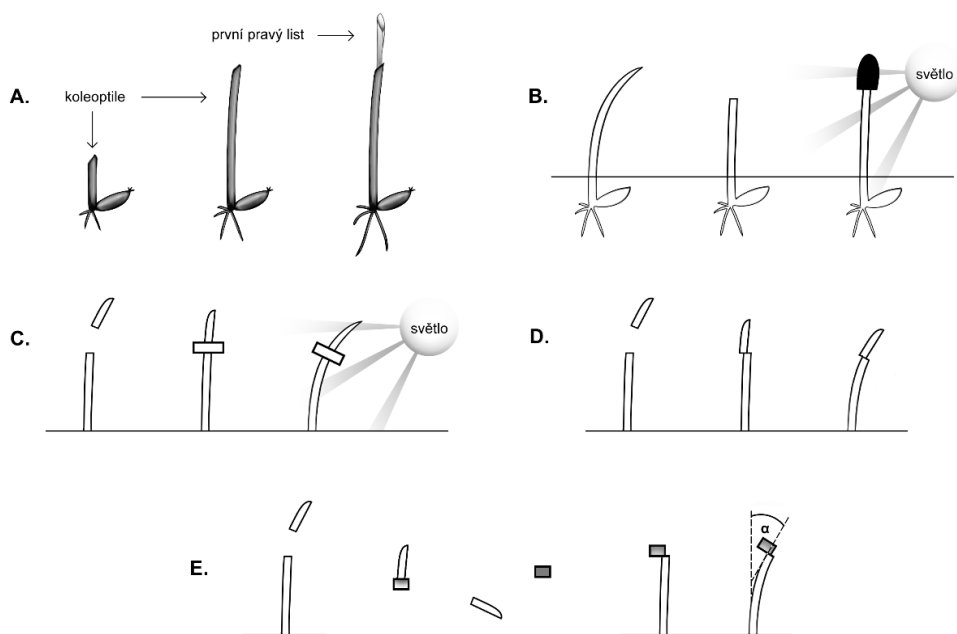
(oplozením, morfogenezí apod.) pak přišel v roce 1922 Gottlieb Haberlandt. [6] Od té doby je otázce fytohormonů a jejich působení věnována velká pozornost, ale komplexita jednotlivých signálních drah spolu s mnohdy nejednoznačným průběhem závislosti účinku na koncentraci fytohormonu situaci značně ztěžuje. [7]

## 2.1 Auxin

Historie prvního objeveného fytohormonu auxinu (z řeckého auxein neboli růst, zvětšovat se) [2] sahá do roku 1913, kdy Peter Boysen-Jensen sledoval fototropickou odpověď koleoptile ovsa i po dekapitaci apexu koleoptile za předpokladu umožnění průchodu signálu do báze přes želatinový bloček (viz Obrázek 1, str. 12, část C). Dokázal tím, že signál objevený Charlesem Darwinem a jeho synem Francisem (viz kapitola 2 Úvod, str. 8) je přenosný (jedná se o chemickou látku). V navazujícím experimentu 1919 Árpád Paál poukázal na ovlivnění růstu koleoptile pozorovanou chemickou látkou (viz Obrázek 1, str. 12, část D). V roce 1925 experimenty s obohacováním agarového bločku ukázala Elisabeth Seubertová, že růst může být zprostředkován rovněž látkami jiného než rostlinného původu (např. slinami *Izolace* endogenně přítomné, účinné chemické látky se zdařila v roce 1928 Fritzi Warmoltu Wentovi, a to difúzí do agarového bločku z odděleného apexu koleoptile. Takto byly ověřeny předchozí hypotézy a výpočtem z rychlosti difúze byla určena přibližná relativní molekulová hmotnost  $M_r = 376$ . Kvůli nízké úrovni analytické chemie v té době se podařilo určit chemickou strukturu až v roce 1934 Fritzi Köglovi, kdy byla jako původce pozorovaných jevů konečně označena kyselina indol-3-octová ( $M_r = 175,18$ ), zkratkou IAA z angl. indole-3-acetic acid. [4] Její přítomnost přímo v rostlině pak prokázal poprvé Arie Jan Haagen-Smit v kukuřici v roce 1946. [8]

Další experimenty vedly především cestou testování dalších látek a kvantifikace jejich účinků (za tímto účelem bylo navrženo několik biotestů – např. *Avena* test – Obrázek 1, str. 12, část E nebo *Pisum* test). Tyto metody, ač mnohdy sofistikované, nemohly postihnout celou šíři metabolismu a fyziologických odpovědí

auxinu (taktéž kvůli studiu redukovaných systémů – rostlinných segmentů a explantátů). Proto lze za další významný milník považovat až nástup molekulárně genetických technik a zavedení modelového organismu huseníčku rolního (lat. *Arabidopsis thaliana*). [9]



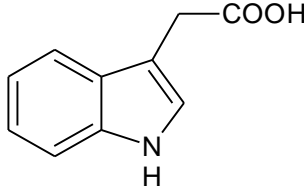
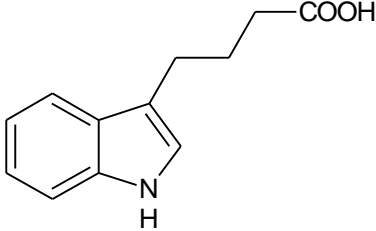
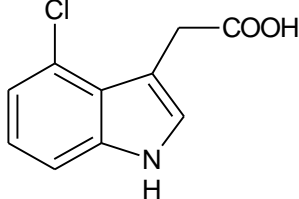
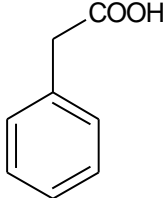
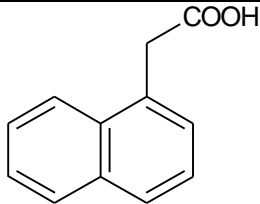
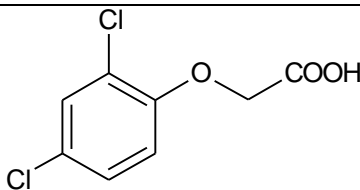
Obrázek 1: Koleoptile ovsa (*Avena sativa*) a jejich experimentální využití pro výzkum auxinu

- A. Růst koleoptile ovsa v čase (směrem zleva doprava).
- B. Experiment Ch. a F. Darwinových – zleva koleoptile rostoucí směrem ke zdroji světla (slepý pokus), koleoptile s dekapitovaným apexem (bez odpovědi na stimul), koleoptile se zastíněným apexem (bez odpovědi na stimul).
- C. Experiment P. Boysen-Jensena – želatinový bloček umožňuje průchod signálu podmiňujícího fyziologickou odpověď na světelný podnět.
- D. Experiment Á. Paála – signál z apexu koleoptile ovlivňuje pozitivně růst báze.
- E. Zjednodušené schéma tzv. Avena testu navrženého F. W. Wentem – agarový bloček obsahující difundovaný signál z apexu koleoptile vyvolá stejnou reakci jako apex samotný, míru účinku lze porovnávat měřením úhlu ohybu vyvolaného růstovou reakcí.

V rostlinách se kromě IAA přirozeně vyskytují látky podobné chemické struktury: kyseliny 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA z angl. 4-chloro-indole-3-acetic acid), indol-3-máselná (IBA z angl. indole-3-butyric acid) a kyselina fenyloctová (PAA z angl. phenylacetic acid), jež v různé míře také vykazují auxinovou aktivitu. Často je však pojem auxin používán jako synonymum pouze pro IAA. Důvodem je v případě IBA případná metabolická přeměna na IAA

(v současnosti je IBA některými pracovníky považována za zásobní formu IAA – např. [9], srovnej s [10]). 4-Cl-IAA a PAA se od IAA liší mírou interakce s některými proteiny signálních drah a přenašeči a vykazují tudíž schopnost regulovat různé procesy různou mírou – někdy jsou proto označovány jako látky podobné auxinu (anglicky auxin-like). [11] Uměle připravené látky s fyziologickými účinky podobnými auxinu označujeme jako syntetické analogy auxinu (přehled chemických struktur látek s „auxinovým“ účinkem viz Tabulka 1). [12]

Tabulka 1: Auxin a látky jemu podobné

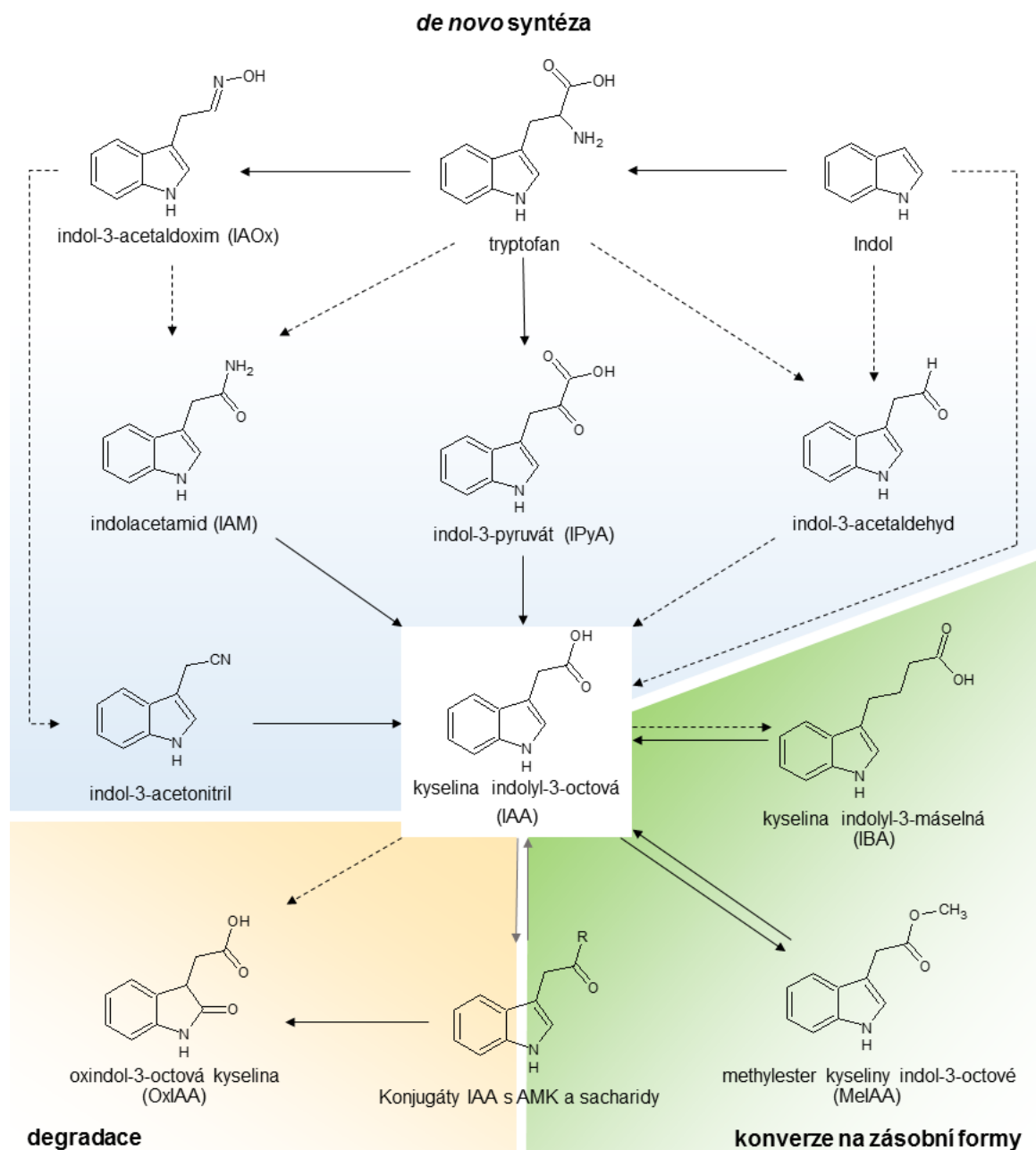
kyselina indol-3-octová (IAA)	auxin	
kyselina indol-3-máselná (IBA)	auxin [10] /prekurzor auxinu [9]	
kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA)	látka podobná auxinu	
kyselina fenylactová (PAA)	látka podobná auxinu	
kyselina naftalen-1-octová (1-NAA)	syntetický analog auxinu	
kyselina 2,4- dichlorofenoxyoctová (2,4-D)	syntetický analog auxinu	

Popsaná historie nám odhaluje některé z funkcí, které auxin zastává – dlouhivý růst (který dal fytohormonu název) a také roli při fototropismu. Tento efekt je zajímavý také z jiného hlediska. Spíše než celková koncentrace látky v pletivu je důležitá její distribuce (nezávisle na sobě popsáno roku 1928 Nicolajem Cholodnym a Fritsem Wentem [4]), což znesnadňuje generalizaci fyziologických efektů auxinu. Jako další fyziologické efekty auxinu můžeme uvést regulaci buněčného dělení, buněčnou diferenciaci, ustavení a udržení polarity buněk a potažmo rostlinného těla, tvorbu orgánů (např. rozvoj kořenového systému, tvorbu plodů), podporu apikální dominance, kontrolu senescence a regulaci odpovědi na přítomnost patogenů. [13]

### 2.1.1 Metabolismus auxinu

Většina dominantního nativního auxinu, tedy IAA, v rostlinách je syntetizována z tryptofanu (viz Obrázek 2, str. 15), u mutantu neschopného syntetizovat tryptofan byla objevena také cesta vycházející s největší pravděpodobností z indol-3-glycerolfostátu. [14] Poměrné zastoupení jednotlivých meziproductů syntézy je druhově, vývojově i pletivově specifické a odráží také aktuální stav rostliny. Např. ačkoli je za základní považována dráha syntézy IAA přes indol-3-pyruvát (IPyA), čeleď Brassicaceae využívá dominantně metabolickou dráhu s meziproductem indol-3-acetaldoximem (IAOx). [9]

Zatím jediná plně objasněná dráha syntézy IAA probíhá ve dvou krocích přes IPyA. V prvním kroku se tryptofan deaminuje rodinou TAA aminotransferas (ty byly nezávisle na sobě objeveny v letech 2008 - 2009 studiem mutantů s pozměněnou reakcí na zastínění, ethylen a inhibitor auxinového transportu – jedná se o jednu z křížovatek metabolických cest auxinu a ethylenu). Ve druhém (rychlost limitujícím kroku) je IPyA oxidována flavinovou monooxygenasou YUCCA (objevenou již 2001 díky mutantu se zvýšenou expresí YUC typickým nadprodukcí IAA) na IAA. [15]



Obrázek 2: Stručný přehled metabolismu auxinu

*Přerušované šipky značí metabolické dráhy bez objasněného průběhu. Sestaveno podle [13]*

Vzhledem k vysoké biologické aktivitě IAA není pro rostlinu žádoucí udržovat konstantně vysoké hladiny této látky (vysoké citlivosti zejména dvouděložných rostlin vůči nadbytku auxinu a jeho analogů je využíváno v zemědělství k přípravě herbicidních přípravků [13]). Nicméně vědci už v počátcích výzkumu auxinu pozorovali, že exogenní aplikace auxinů ovlivňuje intaktní rostliny podstatně méně než rostlinné segmenty nebo explantáty. Homeostáze auxinu v rostlině je daná

citlivou regulací biosyntézy, degradace a převodem IAA na neaktivní „zásobní formy“, a také transportem auxinových molekul mezi buňkami, pletivy a orgány. Zásobní formy auxinu vznikají jak tzv. konjugací IAA s aminokyselinami (amidovou vazbou s alaninem, leucinem, aspartátem, glutamátem nebo dalšími pomocí acylamid synthetas rodiny GRETCHEN HAGEN3 – GH3), sacharidy (esterovou vazbou především na glukosu pomocí UDP glukosyltransferas, např. UGT84B1 u *Arabidopsis*), tak možná i přeměnou na IBA (kterou by bylo možné zpět na IAA převést  $\beta$ -oxidací). Dobře prozkoumaná je rovněž methylace IAA za vzniku MeIAA (methylesteru kyseliny indol-3-octové) IAA karboxymethyltransferasou (IAMT1). Kromě jmenovaných způsobů reverzibilní konjugace je konjugace aspartátu a glutamátu u některých druhů využíváno jako vstupních reakcí vedoucích dále k degradaci oxidativním štěpením. IAA lze oxidovat také přímo na OxIAA, ale příslušný enzym dosud nebyl identifikován; viz Obrázek 2, str. 15. [14]

### 2.1.2 Transport auxinu

V rámci rostliny jako celku pozorujeme rychlý nespecifický transport na dlouhé vzdálenosti z míst syntézy pomocí cévních svazků (floému) a na buněčné úrovni dále pomalý přesně regulovaný transport (tzv. polární transport auxinu), který vede k tvorbě místních auxinových maxim, resp. gradientů klíčových zejména pro nově vytvářená pletiva a orgány a také pro některé reakce rostliny na okolní prostředí (především tzv. tropismy). [16] Polarita přenosu auxinu je zajištěna řadou specifických auxinových transportérů – tok do buňky umožňují rodiny proteinů AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) / AUX 1 LIKE (LAX; z angl. podobný AUX1), ven z buňky auxin transportují přenašeče ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B (ABCB) a PIN-FORMED (PIN). [9] Na transportu auxinu se podílí také transportér/receptor (tzv. transceptor) z rodiny nitrátových transportérů NRT (konkrétně NRT1.1). [17]

Vezmeme-li v úvahu  $pK_A$  kyseliny indol-3-octové (4,75), pH apoplastu (asi 5,5) a pH cytosolu (přibližně 7), nedisociovaná IAA nacházející se v malém množství v apoplastu bude samovolně procházet plasmatickou membránou



do cytosolu (kde zůstane v disociované formě „uvězněna“). [16] Přenašeče z rodiny AUX1/LAX umožňují přenos auxinů do buňky symportem s protony a zrychlují tak celkový tok IAA a dalších auxinu podobných látek do cytosolu. [12]

ABCB přenašeče patří mezi ATPasy a proto nevyžadují ke svému fungování vnější zdroj energie ani gradient auxinu (v některých případech jsou přímo použity k narušení dosavadního gradientu – např. v epidermis zralého kořenu k umožnění vzniku nového kořenového vlásku. Přítomnost ABCB v rozvíjejících se pletivech nicméně není vhodná vzhledem k nízké dostupnosti ATP. I z tohoto důvodu hrají hlavní roli při rané ontogenezi proteiny z rodiny PIN). Dalším rozdílem oproti proteinům PIN je stabilita proteinů ABCB v rámci plasmatické membrány (diskutovaná je možnost asociace ABCB se sekundární buněčnou stěnou), která se u ABCB mutantů projevuje defekty elongace a sníženým transportem auxinu na dlouhé vzdálenosti. [18]

Proteiny PIN umožňují export auxinu z buňky a dělíme je podle délky hydrofilní smyčky ve středu peptidového řetězce na „dlouhé“ (u *Arabidopsis thaliana* PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 a PIN7) sloužící k přenosu auxinu přes plasmatickou membránu a „krátké“ (v případě *Arabidopsis* PIN5, PIN6 a PIN8) jež zprostředkují transport z cytosolu do endoplasmatického retikula (ER). [16] Jelikož PIN přenáší auxin proti koncentračnímu spádu, obdobně jako ABCB potřebují zdroj energie. Na rozdíl od ABCB ale neobsahují ATP-vazebnou doménu a jiný zdroj energie dosud nebyl identifikován. Rozmístění PIN-proteinů v rámci jedné buňky (jejich polaritu) regulují u vyšších rostlin kinasy PINOID, u řas se diskutuje zapojení ABCB. [18]

Jednotlivé PIN-přenašeče se navzájem liší jak výskytem v pletivech a orgánech, tak mírou exprese v průběhu vývoje orgánů, což umožňuje specifickou roli jednotlivých forem při organogenezi. [19]

Dalšími proteiny s možnou funkcí při intracelulárním přenosu auxinů jsou předpokládané přenašeče z rodiny PILS (PIN-LIKES, tedy PINu podobné proteiny. [16]

### 2.1.3 Signální dráha auxinu

V současné době víme o dvou oddělených signálních drahách, které zprostředkují fyziologické odpovědi na auxin. První z nich využívá F-box proteiny TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (TIR1/AFB) zatímco druhá AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1). [9]

Při nízkých koncentracích auxinu je omezena aktivita transkripčních faktorů AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) proteiny Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA). Po zvýšení hladin IAA dojde k interakci TIR1/AFB F-box proteinu s Aux/IAA za vytvoření auxinového koreceptoru, který na sebe auxin přímo váže. TIR1/AFB F-box, který je zároveň podjednotkou komplexu ubiquitin ligasy, pak ubiquitínuje represorový protein Aux/IAA, což vede k jeho degradaci proteosomem, uvolnění ARF a následné změně transkripce auxinem ovlivněných genů. [20]

U modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) rozeznáváme 29 různých Aux/IAA proteinů a 6 TIR1/AFB. Různé kombinace kooperujících proteinů rozšiřují možnosti fyziologické odpovědi a vykazují různou afinitu vůči jednotlivým druhům auxinu. Celý tento systém je ještě komplikovanější možnou multimerizací ARF a Aux/IAA. [9]

Druhá zmíněná (a dosud blíže neobjasněná) možnost percepce auxinového signálu se týká ABP1 proteinů lokalizovaných na membráně ER (do které je ukotven interakcí s C-TERMINAL PEPTIDE-BINDING PROTEIN1 neboli CBP1). ABP1 interaguje s transmembránovou kinasou TMK v závislosti na množství auxinu, čímž je zprostředkována aktivace RHO-LIKE GTPASES OF PLANTS (ROP), které mají dále vliv např. na lokalizaci PIN-proteinů, ale přesné interakce ani mezikroky mezi jednotlivými komponentami dosud nejsou popsány. [13]

## 2.2 Cytokininy

Objev cytokininů (zkratkou CK) je úzce spjat s pokusy o zavedení rostlinných buněčných kultur *in vitro*. Ačkoli buňky v médiích obohacených o auxin vykazovaly dlouhivý růst (některé byly polyploidní), i přes dostupnost živin nedocházelo k jejich dělení (cytokinezi, odtud název skupiny fytohormonů cytokininů). To podnítilo zájem vědců v 50. letech minulého století k testování účinků řady chemických látek a přírodních extraktů. Tým pod vedením Folke Skooga publikoval své výsledky navození buněčného dělení kvasničným extraktem (1951), tekutým endospermem kokosového ořechu (1952) a autoklávovanou DNA spermatu sledě (1953). Účinná látka izolovaná z posledního jmenovaného zdroje byla roku 1955 identifikována Carlosem Millerem a nazvána kinetin (chemická struktura viz Tabulka 2, str. 20) [21]. Ačkoli byl kinetin původně považován za exogenní látku, nedávné důkazy svědčí i o jeho výskytu jako přirozeného cytokininu v rostlinné říši (poprvé jej roku 1996 Jan Barciszewski a jeho kolegové objevili v extraktu z kokosového ořechu [22]). Prvním identifikovaným isoprenoidním cytokininem izolovaným z rostlinného materiálu byl zeatin (roku 1963 D. S. Letham popsal chemickou strukturu CK izolovaného z kukuřice – *Zea mays*, odtud název). [3]

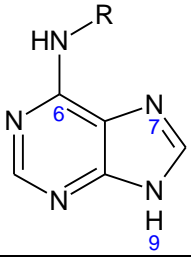
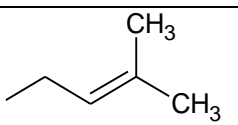
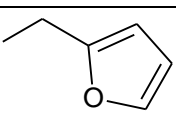
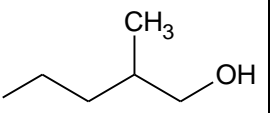
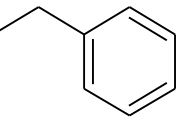
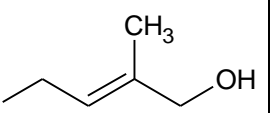
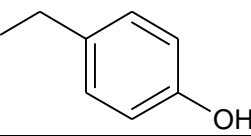
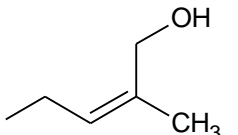
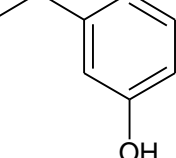
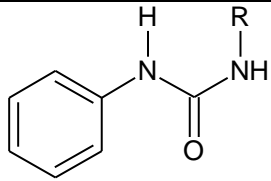
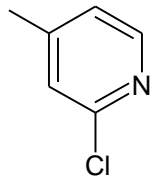
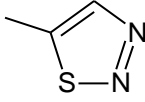
Všechny přirozené CK jsou deriváty adeninu substituované na N6, podle typu substituentu je rozlišujeme na isoprenoidní a aromatické (číslování a příklady chemických struktur viz Tabulka 2, str. 20). Chemická struktura adeninu umožňuje substituce v polohách N7 a N9 (méně často také v poloze N3, příp. C2), které obdobně jako u auxinu rozšiřují škálu fyziologických efektů a metabolického zpracování CK (viz kapitola 2.2.1 Metabolismus cytokininů, str. 21). [23]

Cytokininy jsou evolučně staré molekuly vyskytující se dále např. u bakterií, hub, hlístic, hmyzu nebo člověka, kde svou přítomností v tRNA (vysvětlení objevu kinetinu) ovlivňují přesnost a účinnost transkripce kodonů začínající uracilem (prenylovaný adenin, odpovídající svou chemickou strukturou cytokininu, se může nacházet v tRNA pozici 37, takže následuje adenin antikodonu). U savců jsou

mutace genu kódujícího enzym zprostředkující příslušnou prenylaci spojeny s nádorovými onemocněními. [24]

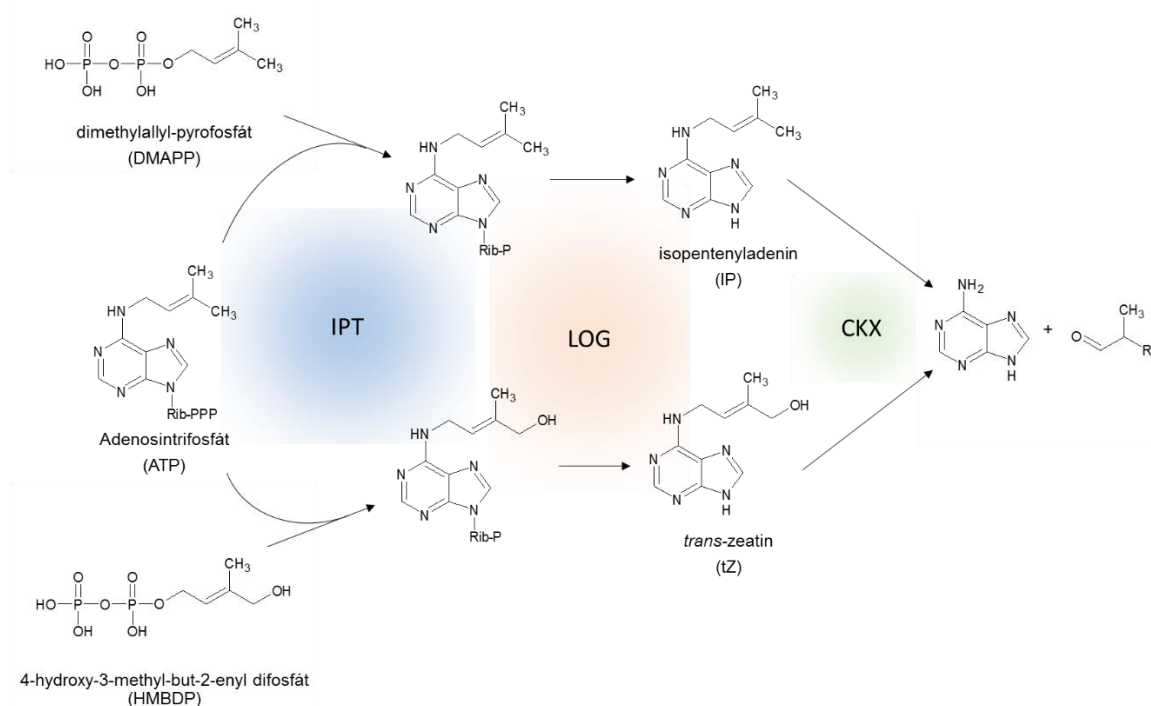
CK u rostlin kromě cytokineze ovlivňují organogenezi, mobilizaci živin a distribuci biomasy, potlačují apikální dominanci (podporují rozvoj laterálních pupenů), zpomalují senescenci a podporují fotosyntézu. [3]

Tabulka 2: Chemická struktura vybraných cytokininů

látky odvozené od adeninu (přírodně se vyskytující cytokinininy)			
isoprenoidní R		aromatické R	
isopentenyladenin (IP)		kinetin (Kin)	
dihydrozeatin (DZ)		6-benzylaminopurin (BAP) – syntetický analog CK	
<i>trans</i> -zeatin (tZ)		<i>meta</i> -topolin (mT)	
<i>cis</i> -zeatin (cZ)		<i>ortho</i> -topolin (oT)	
látky odvozené od fenylnmočoviny (syntetické analogy cytokininů)			
N-(chloro-4- pyridyl)-N'- fenylnmočovina (CPPU)		thidiazouron (TDZ)	

## 2.2.1 Metabolismus cytokininů

Hlavním enzymem biosyntézy CK je ATP/ADP isopentenyltransferasa neboli IPT (kódovaná u *Arabidopsis* geny AtIPT1 a AtIPT2 až AtIPT8). [25] Tento enzym katalyzuje přenos produktu mevalonátové metabolické dráhy dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) nebo (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfátu (HMBDP) na ATP nebo ADP (viz Obrázek 3, str. 21). Ze dvou jmenovaných substrátů pak vznikají dva základní typy CK – v případě DMAPP jsou to cytokininy typu isopentenyladeninu (iP), HMBDP dává vzniknout cytokininům trans-zeatinového (tZ) typu (převod prekurzoru iP na prekurzor tZ umožňuje cytochrom P450 monooxygenasa). K aktivaci prekurzorů (vázaný adenin je ve formě nukleotidu) je využíváno specifické fosforibohydrolasy LOG (z angl. lonely guy). [3]



Obrázek 3: Velmi zjednodušené schéma metabolismu cytokininů

Vyznačeny jsou enzymy IPT (isopentenyltransferasa), LOG (cytokinin specifická fosforibohydrolasa), CKX (cytokinindehydrogenasa). Sestaveno podle [3]

Aktivní formy (včetně dosud nezmíněného dihydrozeatinu, zkratkou DHZ, získaného hydrogenací tZ) mohou dále podléhat izomeraci, případně konjugaci se sacharidy (většinou ribosou, příp. glukosou) za vzniku méně aktivních nebo

zásobních forem. Degradace CK je katalyzována cytokinindehydrogenasou [3] (dříve cytokininoxidasou, z historie pramení zkratka enzymu CKX, potřeba kyslíku jako substrátu byla vyloučena roku 2004 [26]). CKX je u *Arabidopsis* kódována geny *AtCKX1* až *AtCKX7*, jednotlivé izoformy se od sebe navzájem liší aktivitou, pH optimem i preferovaným substrátem (velmi výrazné jsou rozdíly pro štěpení N9 glukosidů, naopak N7 glukosidy mezi substráty nepatří). [27]

CK jsou díky své struktuře modifikovatelné mnoha směry. N-glukosidace (zprostředkovaná N-glukosyltransferasami) v polohách 7 a 9 je velmi častá a možná u všech CK (v poloze 3 byla rovněž u některých rostlin pozorována, ale zodpovědné enzymy nejsou známy). CK tZ typu mohou taktéž podstoupit O-glukosidaci isoprenoidního řetězce zprostředkované O-glukosyltransferasami (jejichž aktivita je většinou ovlivněna stereochemií substrátu, proto je dělíme dle preferencí na *cis*- nebo *trans*-specifické). [28]

Dosud jediný známý enzym schopný převodu glukosidů na aktivní CK je  $\beta$ -glukosidasa, substráty tohoto enzymu identifikovaného v rostlinách jsou ovšem pouze O-glukosidy, což z nich činí majoritní zásobní formy CK (spolu s neschopností CKX oxidativně štěpit zeatin-O-glykosidy a jejich deriváty). [3]

N-glukosidy spolu s cZ jsou historicky dle výsledků biotestů považovány za málo aktivní zásobní formy [29] [30], v současné době se nicméně stále častěji objevují důkazy zpochybňující toto rozdělení. [31] [32]

### 2.2.2 Transport cytokininů

Na rozdíl od auxinu, jehož transportní mechanismy jsou poměrně dobře známy, není role transportu CK ve fyziologii rostlin dosud zřejmá a naše znalosti jsou v této oblasti velmi limitované.

Rozdílná distribuce CK na dlouhé vzdálenosti (CK tZ-typu xylémem, iP-typu floémem) naznačuje zapojení selektivního transportního systému (přímo pozorován byl tok radioaktivně značených CK floémem). [33]

Při transportu na krátké vzdálenosti nabízí chemická struktura CK nukleotidů možnost použití purinových permeas (PUP), ale kinetika těchto

transportérů vzhledem k rozdílným fyziologickým hladinám CK a purinů neumožňuje efektivní transport. [34] Specifické transportéry byly prozatím nalezeny pro nukleosidy CK a pojmenovány ENT (z angl. equilibrative nucleoside transporters). [35]

### 2.2.3 Signální působení cytokininů

Percepci CK zajišťují dvoukomponentní signální systémy – první součástí tohoto systému je histidinová kinasa, druhou pak histidinofotransferasa. Signál CK indukuje autofosforylaci proteinu histidinové kinasy (fosfát je přenesen z histidinu na aspartát téže kinasy), následuje přenos na histidinofotransferasu (její histidinový zbytek). Posledním krokem je fosforylace aspartátu regulátoru odpovědi RR (z angl. response regulator). Regulátory odpovědi byly v minulosti u *Arabidopsis* rozděleny na základě své struktury do dvou skupin – ARR-A (nezbytné pro CK odpověď) a ARR-B (negativní regulátory dráhy), v současnosti však rozeznáváme ještě další dvě skupiny ARR-C a pseudoRR. [36]

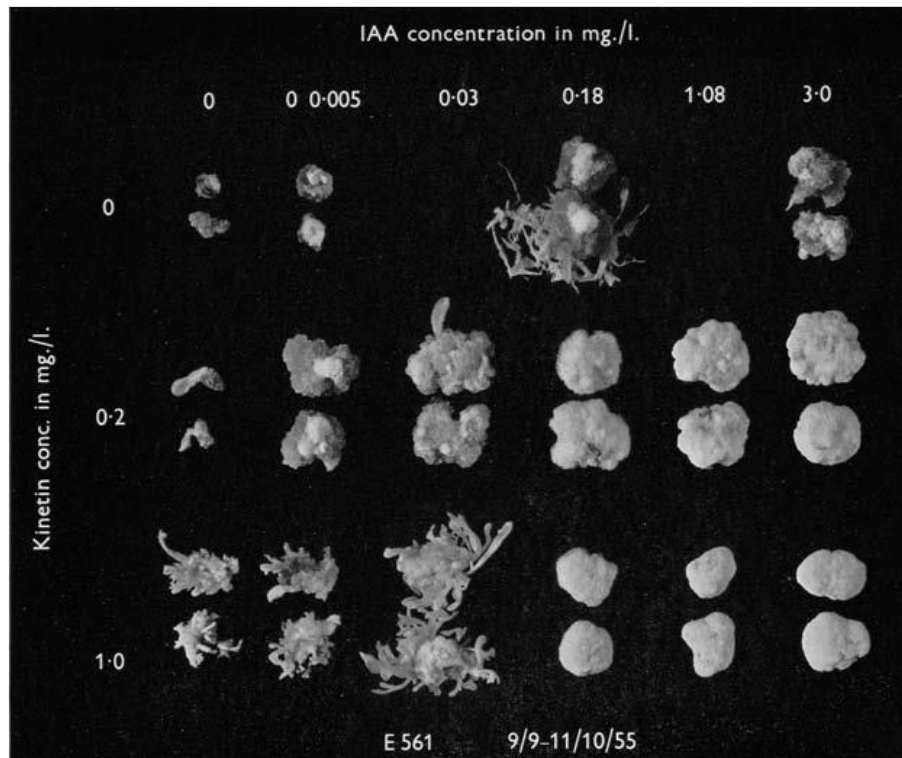
## 2.3 Vzájemná kooperace auxinů a cytokininů

Koncept fytohormonů již od samých počátků zdůrazňuje nutnost spolupráce jejich jednotlivých skupin při vývojových procesech rostlin. [6] První ukázkou může být problematika pěstování rostlinných explantátů (viz str. 19). Růst buněk a jejich diferenciaci (organogeneze) je závislá na exogenním přídávku auxinu a CK, resp. jejich vzájemném poměru (viz Obrázek 4, str. 24). [37]

Ačkoli by se mohlo zdát, že CK a auxin působí antagonisticky, zejména bližší studie apikálních meristémů (jak stonkových, tak kořenových) dokázaly, že je jejich kooperace značně složitější a probíhá na několika úrovních. [19]

Vzájemné ovlivnění metabolismu obou fytohormonů probíhá na několika úrovních. Například auxin ovlivňuje biosyntézu CK regulací exprese IPT genů. Pomocí real-time PCR byla zjištěno zvýšení transkripce IPT5 a IPT7 v kořenech *Arabidopsis* již 4 hodiny po exogenní aplikaci auxinu. [38] Opačně omezení biosyntézy CK (kvůli nízké aktivitě cytochrom P450 monooxygenas podílejících se

na hydroxylaci prekurzoru iP na prekurzor tZ) exogenní aplikací auxinu bylo pozorováno u semenáčků *Arabidopsis*, které byly vystaveny auxinu po dobu jedné hodiny. [39]



Obrázek 4: Vliv obsahu IAA (vodorovná osa) a Kin (svislá osa) v mediu na explantáty tabáku (hybrid *Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii*)

Nízká koncentrace obou fytohormonů neumožňuje růst explantátu, vysoké koncentrace obou fytohormonů indukují vznik kalusu (morfologicky nerozlišeného meristematického pletiva), relativní nadbytek IAA nebo Kin vede k organogenezi kořenů, resp. prýtu. Koncentrace fytohormonů v mediu v mg/l, převzato z [37].

Pozorován byl také vliv CK na regulaci syntézy IAA a to indukcí *IPT8* (opět v rostlině *Arabidopsis*) v mladých, vyvíjejících se pletivech (na rozdíl od starších listů) [40] – což může vysvětlit protichůdné vlivy IAA na CK popsané v předchozím odstavci.

Vzájemnou kooperaci a ovlivňování těchto dvou skupin fytohormonů lze pozorovat i na jejich transportu – na příkladu omezeného zakládání kořenového vlášení vlivem vysokých hladin CK byla identifikována represe transkripce PIN-proteinů vlivem CK. [41]



### 3 Cíl práce

Pro lepší pochopení vzájemné kooperace a metabolismu rostlinných hormonů typu auxinů a cytokininů a jejich spolupráce s dalšími, především stresovými hormony, byly bakalářské práci vytyčeny následující cíle:

- 1) Charakterizovat účinky 7 exogenně aplikovaných látek typu cytokininů (tZ, tZ7G, tZ9G, cZ, BAP, BAP7G, BAP9G) na senescenci listových segmentů ovsu setého (*Avena sativa*).
- 2) Stanovit obsah vybraných fytohormonů a jejich metabolitů (auxinu, CK, abscisové kyseliny, salicylové kyseliny, jasmonátů a prekursoru ethylenu) v inkubovaných listových segmentech z předchozího bodu.
- 3) Porovnat účinek exogenně aplikovaných cytokininů na endogenní hladiny auxinu a cytokininů (spolu s jejich metabolity) v listových segmentech ovsu setého (*Avena sativa*).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

obilky ovsa setého (*Avena sativa* cv. Abel)

#### 4.1.2 Chemikálie

Olchemim, ČR:

tZ, cZ, tZ7G, tZ9G, BAPN7G, BAPN9G,  $^2\text{H}_5$ -tZ,  $^2\text{H}_5$ -tZR,  $^2\text{H}_5$ -tZ7G,  $^2\text{H}_5$ -tZ9G,  $^2\text{H}_5$ -tZOG,  $^2\text{H}_5$ -tZROG,  $^2\text{H}_5$ -tZRMP,  $^2\text{H}_3$ -DHZ,  $^2\text{H}_3$ -DHZR,  $^2\text{H}_3$ -DHZ9G,  $^2\text{H}_6$ -iP,  $^2\text{H}_6$ -iPR,  $^2\text{H}_6$ -iP7G,  $^2\text{H}_6$ -iP9G,  $^2\text{H}_6$ -iPRMP,  $^2\text{H}_3$ -kastasteron,  $^2\text{H}_3$ -epibrassinolid, gibbereliny:  $^2\text{H}_2$ -GA<sub>4</sub>,  $^2\text{H}_2$ -GA<sub>8</sub>,  $^2\text{H}_2$ -GA<sub>19</sub>,  $^2\text{H}_2$ -GA<sub>20</sub>

NRC-PBI, Kanada:

$^2\text{H}_6$ -abscisová kyselina,  $^2\text{H}_3$ -fazeová kyselina

C-D-N Isotopes, Kanada:

$^2\text{H}_5$ -jasmonová kyselina

Cambridge Isotope Laboratories, Spojené Království:

$^{13}\text{C}_6$ -IAA

Sigma-Aldrich, USA:

BAP,  $^2\text{H}_4$ -salicylová kyselina, ostatní použité chemikálie

#### 4.1.3 Přístroje a vybavení

centrifuga 5430 R, rotor FA-45-24-11-HS	Eppendorf, Německo
centrifuga J-26 xPI, rotor JA-18.1	Beckman Coulter, USA
HPLC systém UltiMate 3000	Dionex, USA
HPLC kolona Luna C18 (100 x 2 mm, 3 $\mu\text{m}$ )	Phenomenex, USA
klimatizační box MLR 350 H	Sanyo, Japonsko
kolony Oasis MCX 1cc (30 mg) extraction cartridges (1 ml)	Waters, USA

MS detektor 3200 QTRAP LC/MS/MS	Applied biosystems, USA
rotační olejová vývěva RV3	Edwards, Spojené Království
rotační vakuová odparka Alpha RVC CMC-2	Christ, Německo
spektrofotometr Helios Alpha	Thermo Electron, USA
termostat BT 120	Laboratorní přístroje Praha, ČR
ultrazvuková čistička S10H	Elma, USA
Visiprep SPE Vacuum Manifold	Supelco, USA
vymrazovací past LT 105	Christ, Německo

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Příprava rostlinného materiálu

Pro senescenční biotesty byly využity 7 cm dlouhé apikální segmenty prvních pravých listů z desetidenních rostlin ovesa setého (*Avena sativa* cv. Abel).

Obilky ovesa byly v Petriho misce máčeny za stálého míchání v destilované vodě po dobu 12 h a vysazeny do sponu 1,5 x 1,5 cm do perlitu nasyceného dvakrát koncentrovaným Knopovým roztokem (v 1000 ml: 2 g dusičnanu vápenatého, 0,5 g fosforečnanu draselného, 0,5 g síranu hořečnatého, 0,24 g chloridu draselného, 2 kapky 5% roztoku chloridu železitého, doplněno destilovanou vodou a pH upraveno na hodnotu 5,7 přidavkem 1 N roztoku hydroxidu draselného nebo stejně koncentrovaného roztoku kyseliny chlorovodíkové).

Rostliny byly 10 dní kultivovány v klimatizačním boxu Sanyo při stálé relativní vlhkosti vzduchu (90 %) a kontrolovaném denním (18 h světla, 20° C) a nočním (6 hodin bez osvětlení, 18° C) režimu.

### 4.2.2 Testovací roztoky

Navážka testovaného CK byla nejdříve spláchnuta 0,5 ml 0,1 N roztokem kyseliny chlorovodíkové, naředěna destilovanou vodou a zneutralizována 0,5 ml 0,1 N roztoku hydroxidu sodného tak, aby byla výsledná koncentrace zásobního roztoku  $5 \cdot 10^{-4}$  M a jeho objem asi 6 ml.

Ze zásobního roztoku byly připraveny testovací roztoky R1-R6 ředící řadou 1:4 tak, že koncentrace použitých roztoků byly  $1 \cdot 10^{-4}$  M (R1),  $2 \cdot 10^{-5}$  M (R2),  $4 \cdot 10^{-6}$  M (R3),  $8 \cdot 10^{-7}$  M (R4),  $1,6 \cdot 10^{-7}$  M (R5),  $3,2 \cdot 10^{-8}$  M (R6). Z každého testovacího roztoku byl odpipetován vždy 1 ml do polystyrenové zkumavky o objemu 10 ml a to v pěti opakováních pro inkubaci listových segmentů.

### 4.2.3 Inkubace listových segmentů

Z apikálních konců prvních pravých listů byly odřezány 7 cm dlouhé segmenty a po čtyřech umístěny bazálním koncem do testovaných roztoků v popsáných polystyrenových zkumavkách o objemu 10 ml. Zkumavky byly uzavřeny parafilmem a umístěny na 4 dny do termostatu nastaveného na teplotu 27° C bez přítomnosti světla.

Inkubované listové segmenty byly osušeny, zbaveny nekrotizované bazální části a dále zpracovány buď pro analýzu retence chlorofylu (3 opakování pro každý testovaný roztok), nebo pro analýzu obsažených fytohormonů (2 opakování).

Pro analýzy byly rovněž odebrány segmenty čerstvých listů (dále označovány jako kontrola) a listové segmenty inkubované za výše popsáných podmínek v 1 ml destilované vody (v grafech popsány zkráceně jako voda).

### 4.2.4 Analýza retence chlorofylu

Připravené listové segmenty byly přeneseny do kalibrovaných skleněných zkumavek s 10 ml 80% roztoku ethanolu. Pro urychlení extrakce chlorofylu z listových segmentů byly zkumavky ponořeny na 15 minut do vodní lázně o teplotě 80° C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo spektrofotometricky stanoveno množství chlorofylu (měřením absorbancí při vlnové délce 665,0 nm oproti použitému 80% roztoku ethanolu).

### 4.2.5 Stanovení obsahu fytohormonů

Obsah fytohormonů v listových segmentech byl stanoven metodikou vyvinutou na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. [42], která umožňuje z malého množství rostlinného materiálu (naše navážky se pohybovaly v rozmezí

100 – 200 mg, možné je i použití už od 20 mg [43]) analyzovat až 68 látek (fytohormonů a jejich prekurzorů či metabolitů). Přestože dochází k dlouhodobému postupnému zdokonalování této metody [44] [45], stále ještě není možné pomocí ní stanovit množství aromatických CK. Tento fakt omezuje možnost zpracování výsledků pro BAP a jeho deriváty, ale výhody jinak velkého množství analyzovaných látek převyšují. Pro seznam analyzovaných látek viz Tabulka 3, str. 29.

Tabulka 3: Seznam analyzovaných fytohormonů a jejich metabolitů

stanovované látky ve frakci A („kyselé“ fytohormony)	stanovované látky ve frakci B („bazické“ fytohormony)
ABA (abscisová kyselina)	tZ ( <i>trans</i> -zeatin)
DPA (dihydrofazeová kyselina)	tZR ( <i>trans</i> -zeatinribosid)
PA (fazeová kyselina)	tZ7G ( <i>trans</i> -zeatin-7-glukosid)
ABA-GE (glukosaester abscisové kyseliny)	tZ9G ( <i>trans</i> -zeatin-9-glukosid)
9OH-ABA (9-hydroxyabscisová kyselina)	tZOG ( <i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid)
IAA (indol-3-octová kyselina)	tZROG ( <i>trans</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid)
IAA-Asp (Indol-3-acetyl-aspartát)	tZRMP ( <i>trans</i> -zeatinribosid-5'-monofosfát)
OxIAA (2-oxindol-3-octová kyselina)	DHZ (dihydrozeatin)
PAA (fenyloctová kyselina)	DHZ7G (dihydrozeatin-7-glukosid)
SA (salicylová kyselina)	DHZ9G (dihydrozeatin-9-glukosid)
BzA (benzoová kyselina)	cZ ( <i>cis</i> -zeatin)
JA (jasmonová kyselina)	cZR ( <i>cis</i> -zeatinribosid)
JA-Ileu (jasmonát-izoleucin)	cZ7G ( <i>cis</i> -zeatin-7-glukosid)
cOPDA ( <i>cis</i> -12-oxophytodienová kyselina)	cZOG ( <i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid)
	cZROG ( <i>cis</i> -zeatinribosid- <i>O</i> -glukosid)
	cZRMP ( <i>cis</i> -zeatinribosidmonofosfát)

stanovované látky ve frakci A („kyselé“ fytohormony)	stanovované látky ve frakci B („bazické“ fytohormony)
	iP (isopentenyladenin)
	iPR (isopentenyladenosin)
	iP7G (isopentenyladenin-7-glukosid)
	iP9G (isopentenyladenin-9-glukosid)
	iPRMP (isopentenyladenosinmonofosfát)
	ACC (1-aminocyklopropan-1- karboxylová kyselina)

#### 4.2.5.1 Extrakce fytohormonů z rostlinného materiálu

Vzhledem k chemické a biologické labilitě fytohormonů v rostlinných pletivech (kvůli činnosti přítomných enzymů obzvláště po narušení kompartmentace buněk), byly všechny kroky extrakce prováděny za snížené teploty (použitím chladících bloků, ledových táčů, chlazených roztoků atd.).

Připravené listové segmenty byly homogenizovány rozetřením v třecí misce v kapalném dusíku. K navážce homogenátu (100 – 200 mg) v mikrozkuhavce bylo napipetováno 500 µl Bielekého činidla (v 1000 ml: 750 ml methanolu, 50 ml 99% roztoku mravenčí kyseliny, doplněno destilovanou vodou), 50 µl interních standardů pro stanovení kyselých fytohormonů a 50 µl interních standardů pro stanovení bazických fytohormonů (roztoky radioaktivně značených fytohormonů viz oddíl 4.1.2 Chemikálie, str. 26). Obsah mikrozkuhavky byl rozmíchán pomocí vortexu a uložen do druhého dne v -20° C. Následovala 20 minut trvající centrifugace (Beckman) za teploty 4° C při 15 000 RPM ( $29\,053,2 \times g$ ). Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkuhavky a peleta byla za pomoci vortexu rozmíchána v 500 µl Bielekého činidla. Po 30 minut trvající re-extrakci byla provedena 25 minutová centrifugace (4° C, 15 000 RPM). Supernatant byl připojen k supernatantu z předchozího kroku a umístěn na 30 minut v -80° C.

Rotační vakuovou odparkou (40° C, 1 500 Pa) byl snížen podíl organických rozpouštědel v supernatantu tak, aby byl výsledný objem cca 200  $\mu$ l.

#### 4.2.5.2 Purifikace fytohormonů

Kolony Oasis MCX byly na manifoldu aktivovány proplachem 1 ml methanolu a 1 ml 1 M kyseliny mravenčí. Vzorky byly okyseleny přidavkem 500  $\mu$ l 1 M kyseliny mravenčí, nanесeny na kolony a přepuštěny rychlostí asi 1 kapka za sekundu. Mikrozkuмavky byly dvojnásobně promyty 500  $\mu$ l 1 M kyseliny mravenčí a vzniklé roztoky analogicky nanесeny na kolonu a přepuštěny. Kolony byly následně promyty 500  $\mu$ l 1 M kyseliny mravenčí a 250  $\mu$ l destilované vody. Odpadní nádoby v manifoldu byly nahrazeny popsanými mikrozkuмavkami pro jímání eluovaných frakcí fytohormonů. „Kyselé“ fytohormony (frakce A) byly uvolněny dvojnásobným proplachem 250  $\mu$ l methanolu, „bazické“ (frakce B) dvojnásobným proplachem 250  $\mu$ l 0,35 M roztoku hydroxidu amonného v 60% methanolu.

Eluáty dokonale vysušené rotační vakuovou odparkou (stejné nastavení jako při extrakci) byly rozpuštěny v 30  $\mu$ l 10 % roztoku methanolu a následně přemrazeny (30 minut v -80° C) a centrifugovány (Eppendorf) rychlostí 17 500 RPM

(30 130  $\times$  g) při teplotě 4° C po dobu 25 minut. Supernatant byl přenesen do popsaných vialek a analyzován pomocí HPLC/MS.

#### 4.2.5.3 Analýza obsahu fytohormonů

10  $\mu$ l každého vzorku bylo odděleně analyzováno pomocí HPLC/MS (Ultimate 3000, 3200 Q TRAP). Pro analýzu frakce A byla použita kolona Luna C18(2) (100  $\times$  2 mm, 3  $\mu$ l, Phenomenex) a nastaveným průtokem 0,25 ml min<sup>-1</sup> a lineárním gradientem rozpouštědla A (5 mM vodný roztok mravenčanu amonného o pH = 3) a rozpouštědla B (5 mM roztok mravenčanu amonného v acetonitrilu o pH = 3) od 10 do 50 % rozpouštědla B během 15 minut.

Analýza frakce B byla provedena pomocí kolony Luna C18(2) (150  $\times$  2 mm, 3  $\mu$ l, Phenomenex) a nastaveným průtokem 0,25 ml min<sup>-1</sup> a lineárním gradientem

rozpouštědla A (5 mM vodný roztok octanu amonného o pH = 4) a rozpouštědla B (5 mM roztok octanu amonného v methanolu o pH = 4) od 10 do 40 % rozpouštědla B během 20 minut.

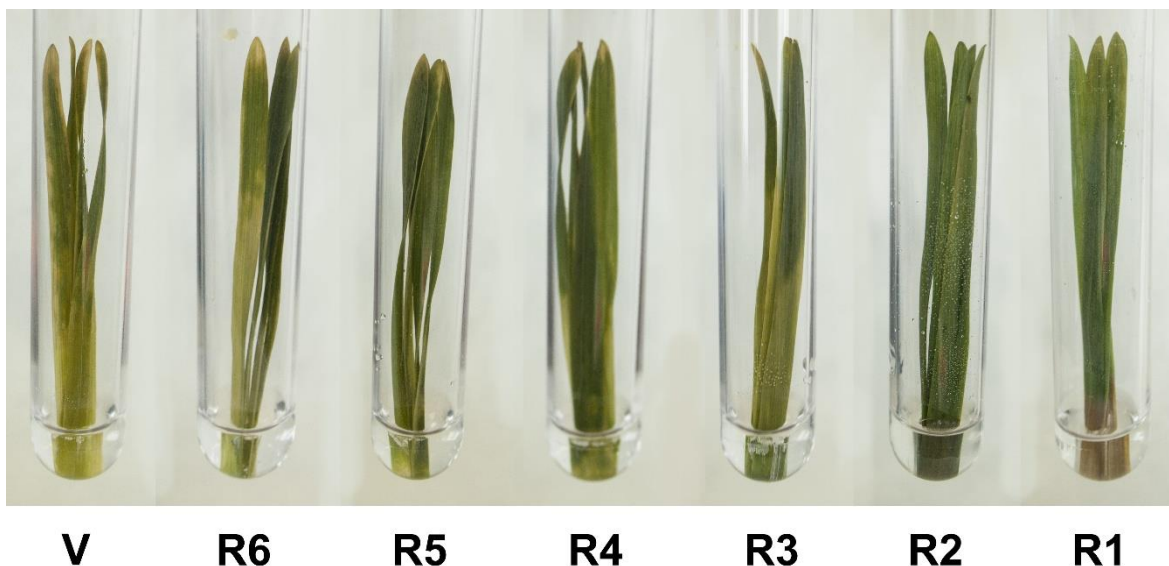
Ionizace elektrosprejem probíhala pomocí napětí -4 000 V pro frakci A a +4 500 V frakci B, tlak nebulizéru byl nastaven na 50 psi, tlak sušícího plynu na 60 psi, jeho teplota 500° C a tlak přídavného sušícího plynu 20 psi. Ke kvantifikaci fytohormonů byla využita metoda izotopového ředění s mnohaúrovňovými kalibračními křivkami ( $r^2 > 0,99$ ). Naměřená data byla zpracována softwarem Analyst 1.5 (výrobce Applied Biosystems).



## 5 Výsledky

### 5.1 Senescenční biotesty

Většina inkubovaných listových segmentů na první pohled vykazovala symptomy senescence (viz Obrázek 1, str. 12), ačkoli se její míra lišila i v rámci jednoho vzorku (listové segmenty v jedné testovací zkumavce měly rozdílné zbarvení). Testovací roztoky nejvyšších koncentrací v některých případech způsobily nekrózu bazálních částí segmentů, které byly z důvodu možného rušení při spektrofotometrickém stanovení obsahu chlorofylu před extrakcí odstraněny.



*Obrázek 5: Listové segmenty po čtyřdenní inkubaci*

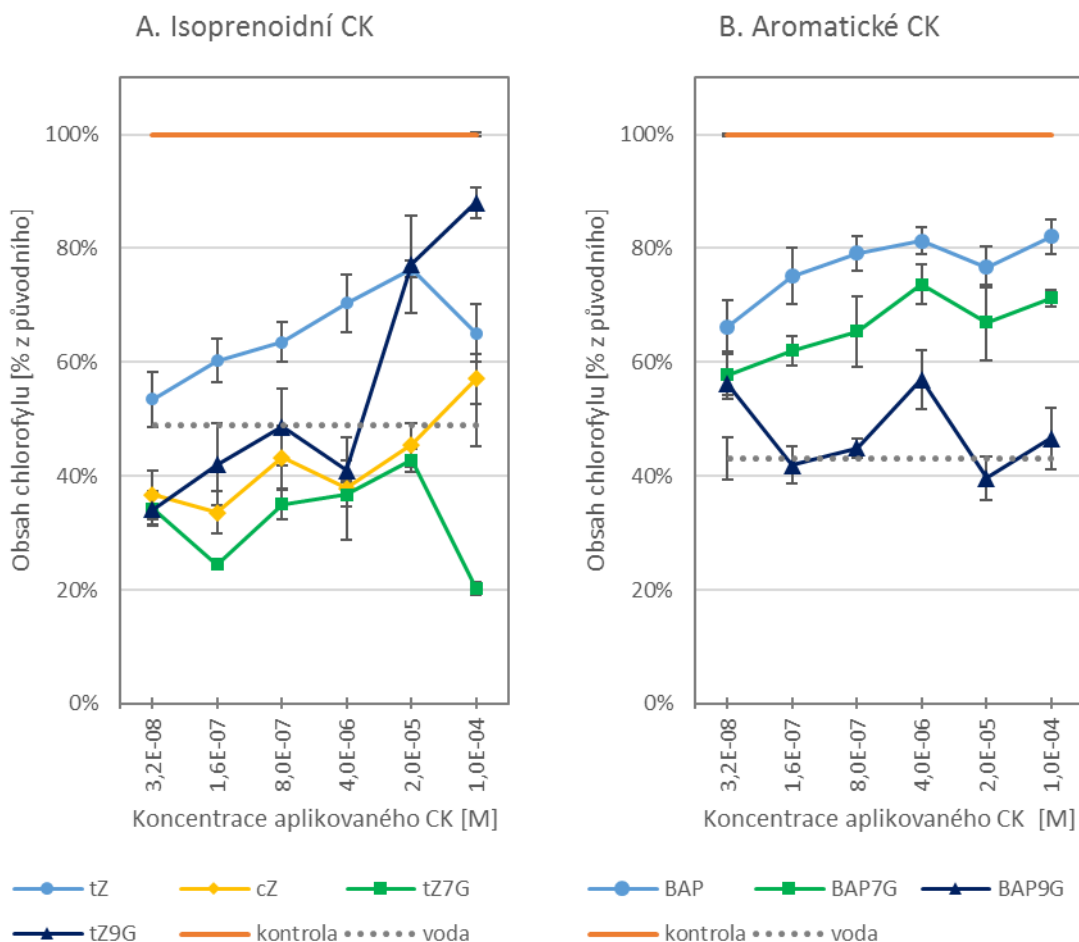
*V: segmenty inkubované v destilované vodě*

*R6 – R1: segmenty inkubované v roztocích tZ příslušné koncentrace (na fotografii seřazeny dle vzrůstající koncentrace zleva doprava)*

*U segmentů R1 si prosím povšimněte hnědě zbarvené nekrotizované bazální části.*

Naměřené hodnoty absorbance ethanolových extraktů chlorofylu při 665 nm byly pro všechny testovací roztoky (a vodu) vyhodnoceny ve vztahu k naměřené hodnotě absorbance extraktu z čerstvých listů (s použitím přepočtu na procenta původního množství chlorofylu v listech) a výsledky byly rozděleny dle chemické

struktury testovaných látek – viz Obrázek 6, str. 34 (statistické zpracování dat zahrnuje vynesení střední chyby průměru do grafu).



Obrázek 6: Pokles množství chlorofylu v inkubovaných listových segmentech v závislosti na koncentraci exogenně aplikovaného CK auxinu

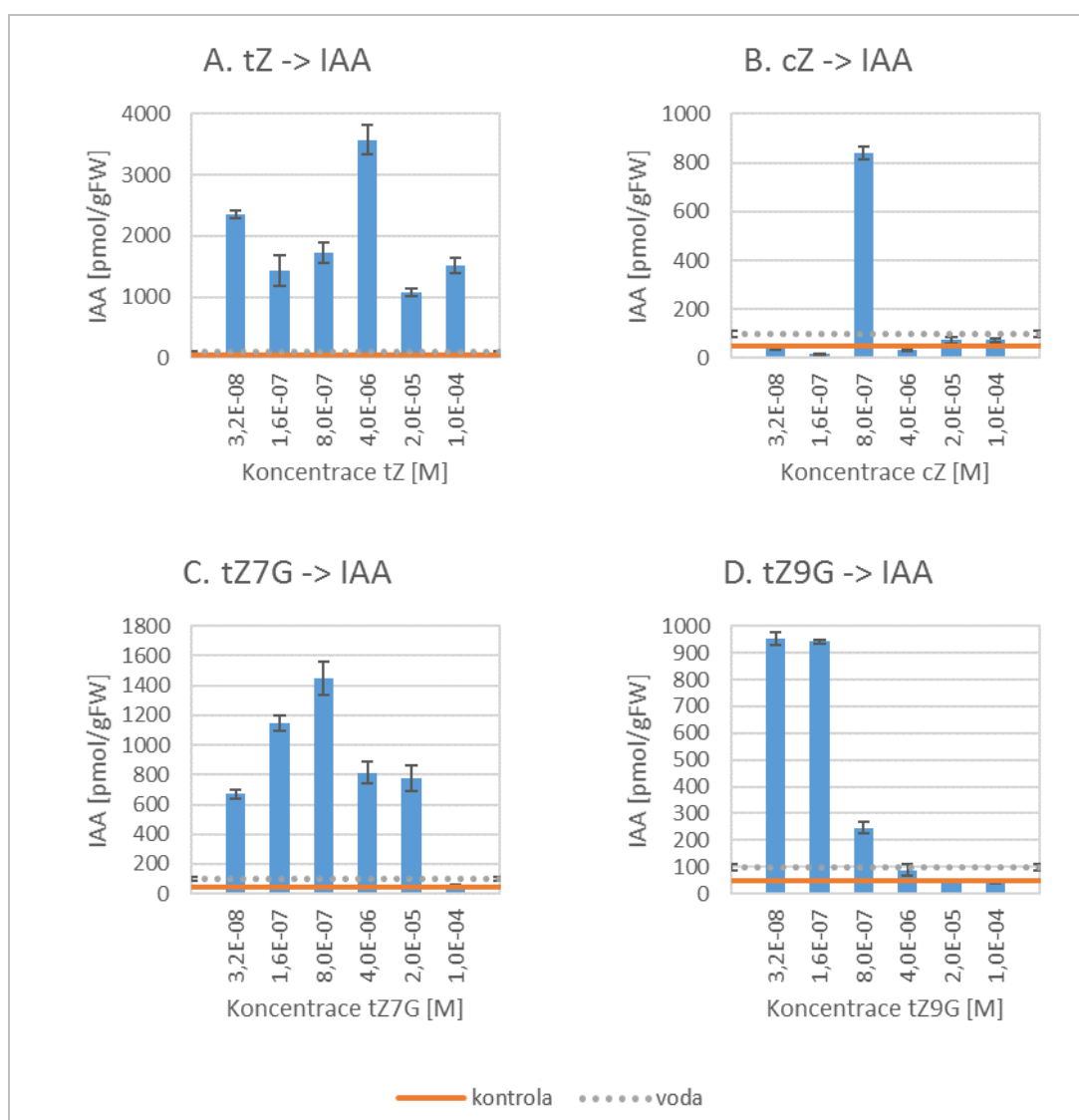
A. Pro aplikované isoprenoidní CK.

B. Pro aplikované aromatické CK.

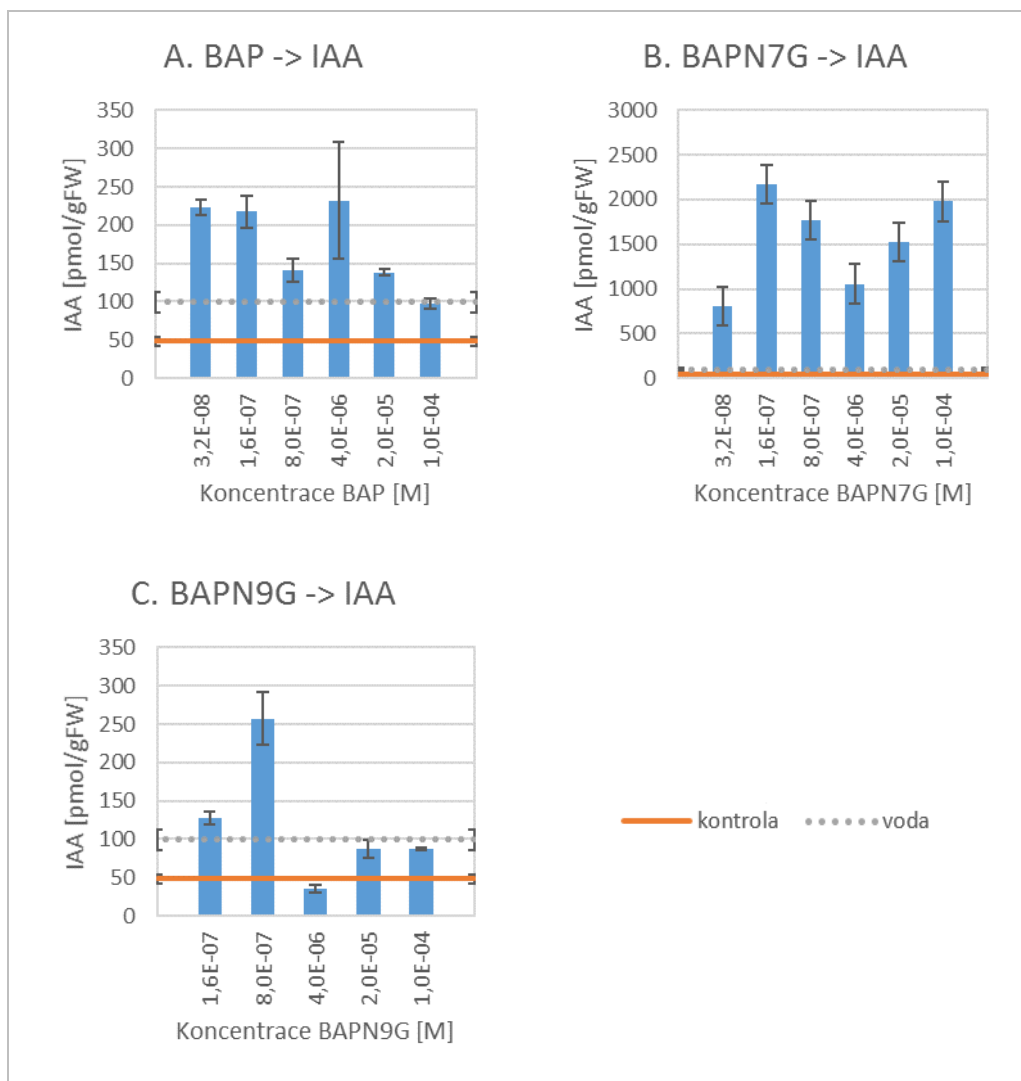
## 5.2 Analýza obsahu fytohormonů

Přestože ve středu našeho zájmu byly auxiny a cytokininy (spolu s jejich metabolity), provedli jsme v jednom kroku také analýzu dalších (především stresových) fytohormonů a jejich metabolitů (pro seznam všech analyzovaných látek viz Tabulka 3, str. 29). Výsledky těchto analýz jsou ke zhlédnutí v příloze práce, nicméně zde nebudou hlouběji diskutovány.

Pro udržení homeostáze po exogenním přidavku CK jsme předpokládali ovlivnění množství IAA v inkubovaných listových segmentech, což se potvrdilo (viz Obrázek 7, str. 35 a Obrázek 8, str. 36). Hladiny IAA byly ve srovnání s kontrolou i listy inkubovanými ve vodě ve většině případů zvýšené, zajímavá je spojitost s koncentrací aplikovaného roztoku CK pozorovaná u isoprenoidních CK – nejvyšší odezvu IAA vyvolaly exogenně aplikované CK o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} - 8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (tedy R2 - R4) v závislosti na použitém isoprenoidním CK.

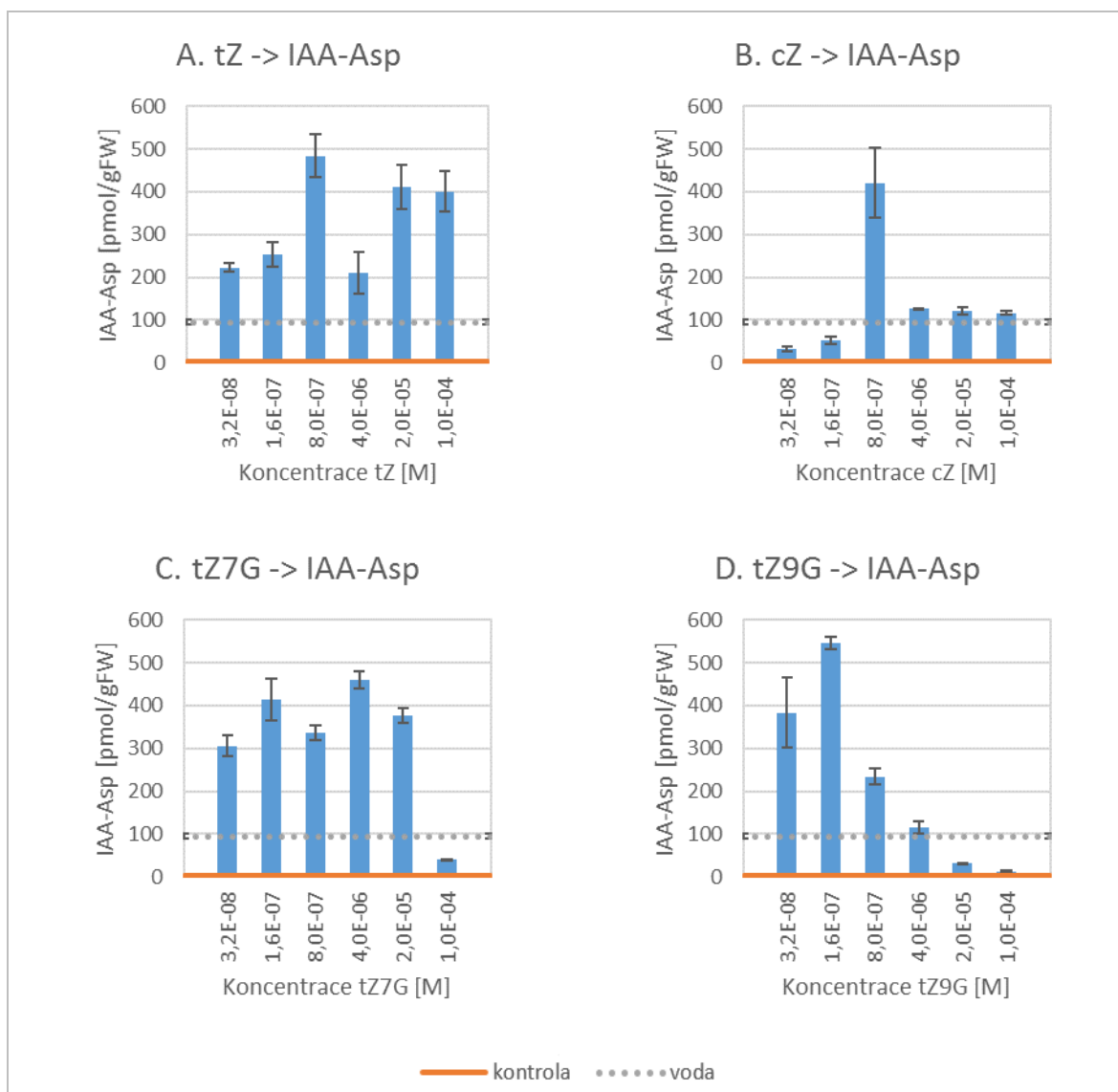


Obrázek 7: Množství IAA (udávané v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci roztoků isoprenoidních CK (A. tZ, B. cZ, C. tZ7G, D. tZ9G)



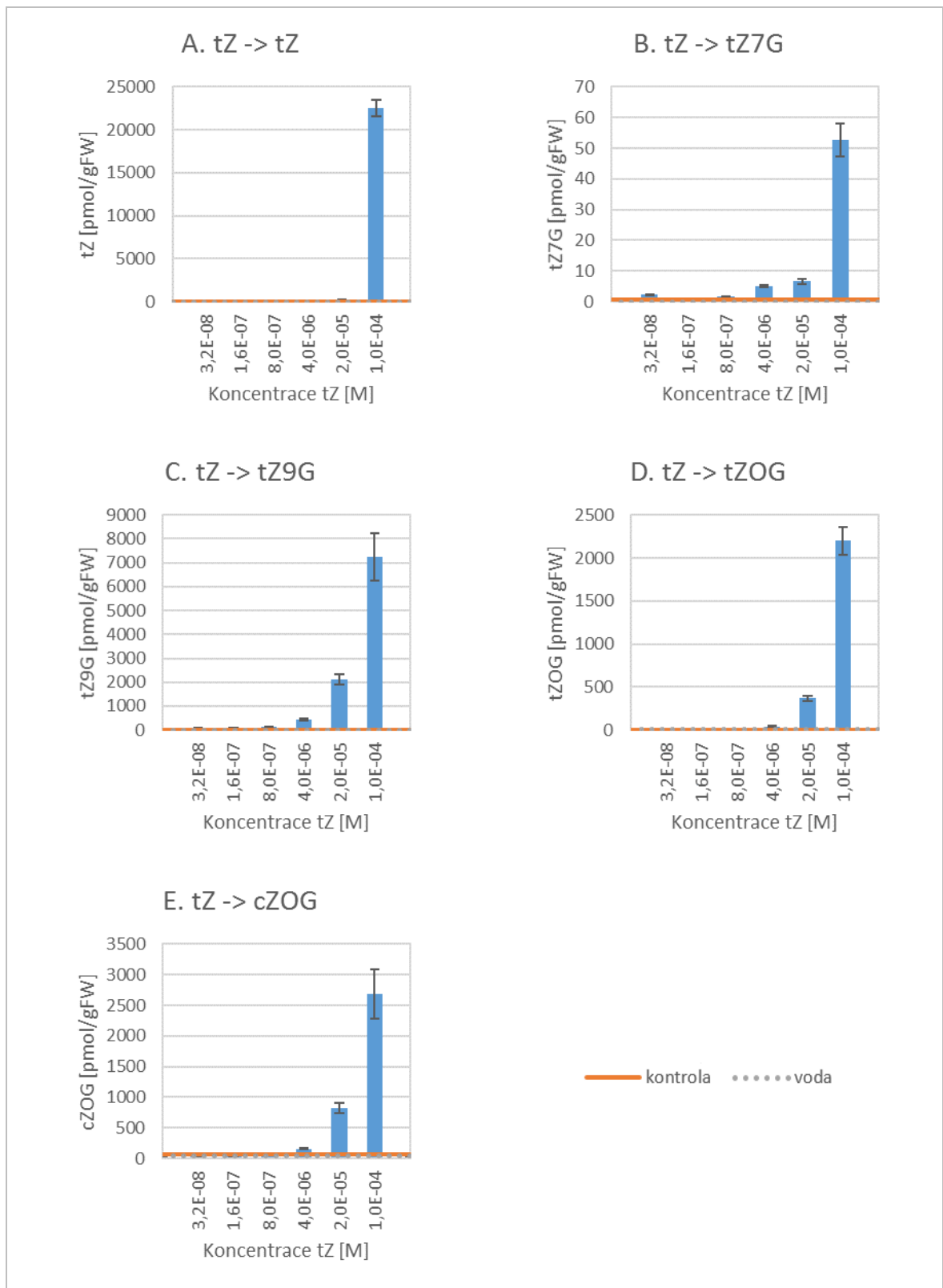
Obrázek 8: Množství IAA (udávané v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci roztoků aromatických CK (A. BAP, B. BAPN7G, C. BAPN9G)

Obdobné trendy byly pozorovány i pro konjugát indol-3-octové kyseliny s aspartátem (IAA-Asp), viz Obrázek 9, str. 37. Na další ze stanovovaných metabolitů auxinu exogenně aplikované cytokininy neměly vliv (naměřené hladiny při použití různých koncentrací testovacích roztoků neměnily a byly podobné naměřeným hodnotám listových segmentů kultivovaných ve vodě), výsledky zde proto nejsou uvedeny.



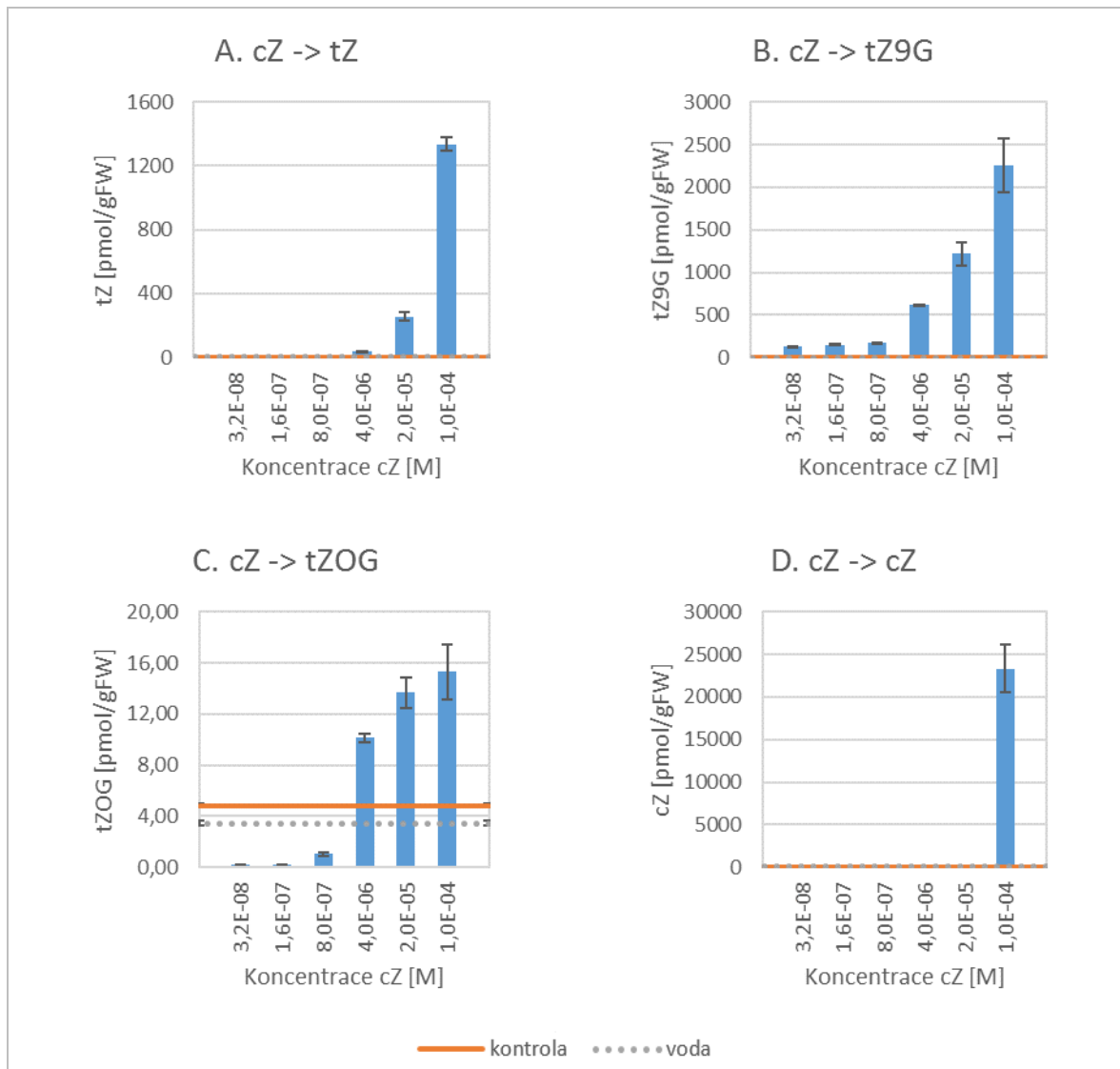
Obrázek 9: Množství IAA-Asp (udávané v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci roztoků isoprenoidních CK (A. tZ, B. cZ, C. tZ7G, D. tZ9G)

Na rozdíl od ne příliš jasných výsledků auxinu a jeho metabolitů jsme pozorovali zajímavé souvislosti v oblasti cytokininů. Prvním testovanou látkou byl tZ, jehož aplikace výrazně zvýšila obsah jeho glukosidů (tZ7G, tZ9G, tZOG), ale také obsah cZOG. Pro úplnost je mezi výsledky (viz Obrázek 10, str. 38) zahrnuta i změna v endogenním obsahu tZ.

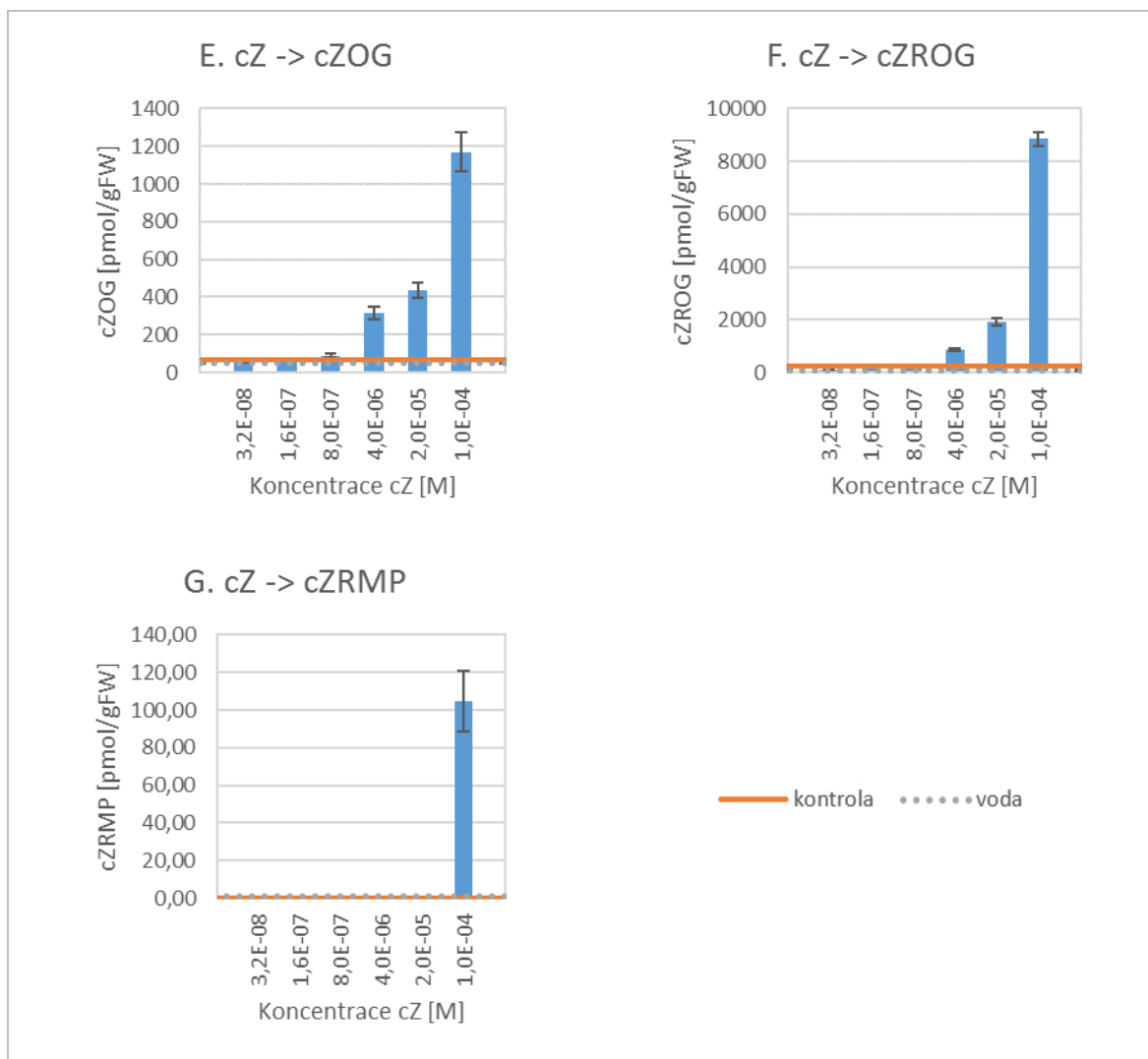


Obrázek 10: Množství vybraných CK (udávané v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci tZ (A. tZ, B. tZ7G, C. tZ9G D. tZOG, E. cZOG)

Exogenně aplikovaný cZ podle získaných výsledků překvapivě podléhá vyššímu počtu přeměn než samotný tZ (viz Obrázek 11, str. 39 a Obrázek 12, str. 40).



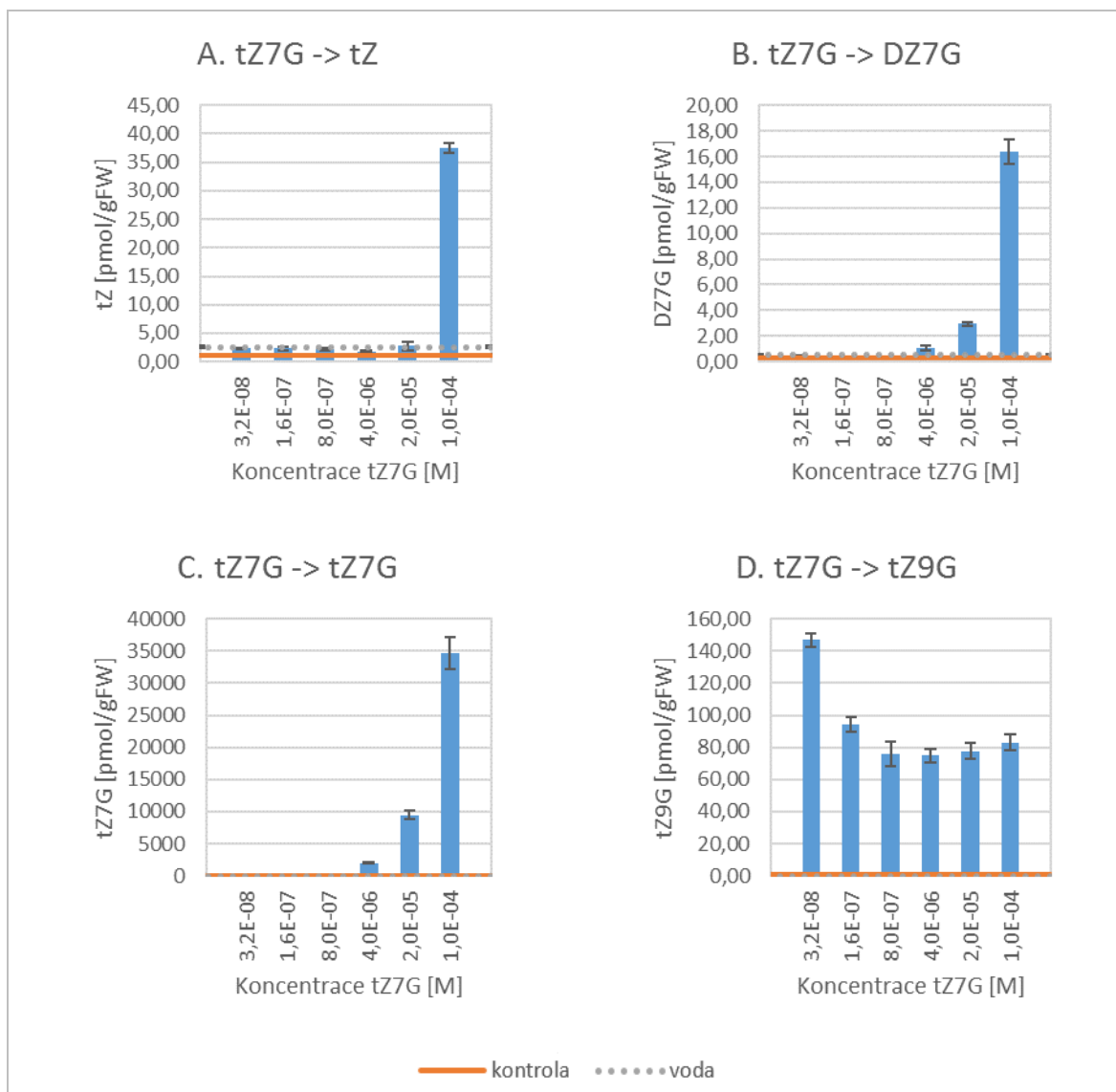
Obrázek 11: Množství vybraných CK (udávané v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci cZ – část první (A. tZ, B. tZ9G, C. tZOG D. cZ)



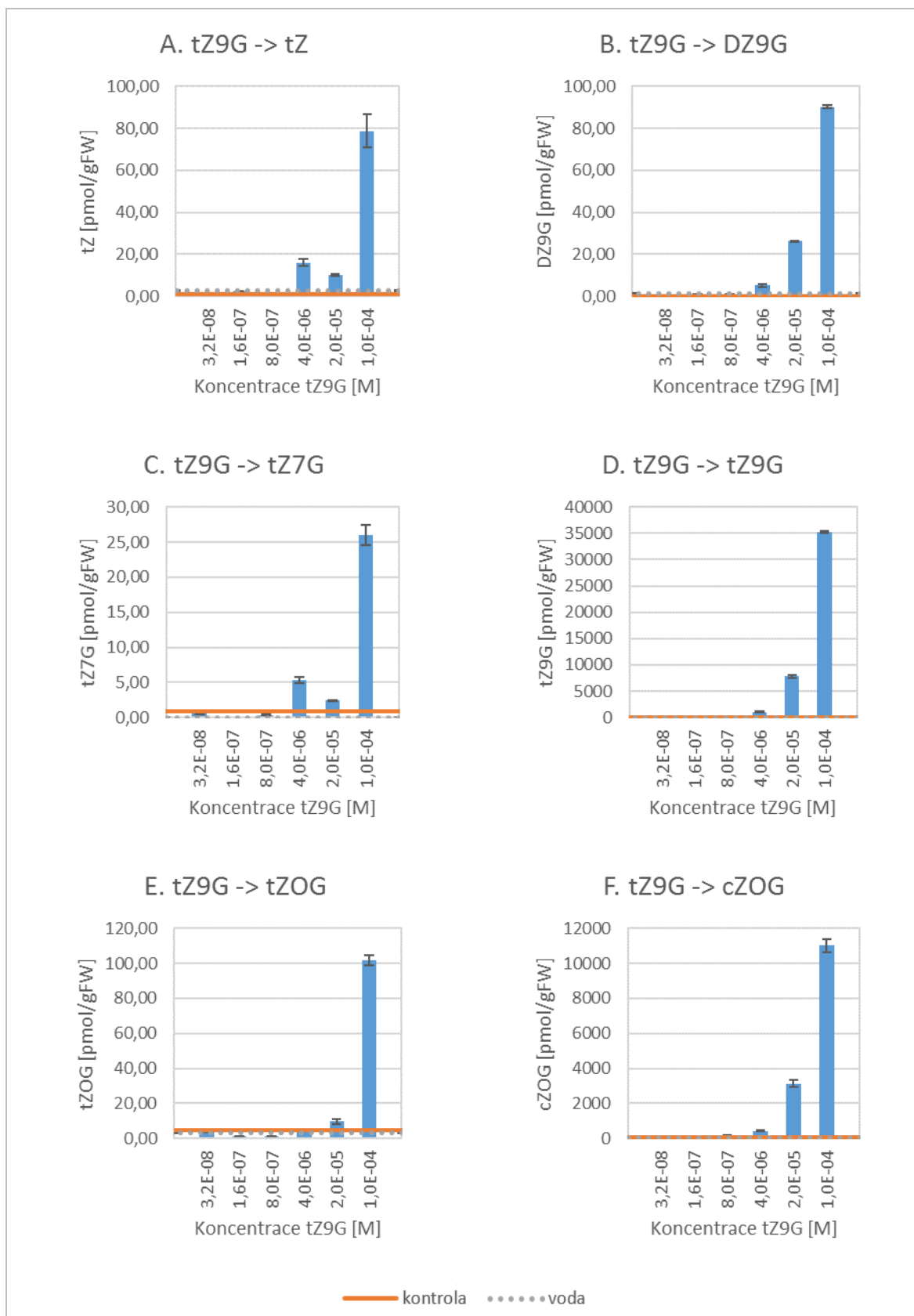
Obrázek 12: Množství vybraných CK (udávané v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci cZ – část druhá (A. cZOG, B. cZROG, C. cZRMP)

Dalšími testovanými látkami byly tZ7G (viz Obrázek 13, str. 41) a tZ9G (viz Obrázek 14, str. 42). Pro BAP a jeho glukosidy nebyly pozorovány změny měřených hladin CK (pravděpodobně kvůli oddělení metabolismu isoprenoidních CK od aromatických CK, které nejsou použitou metodou detekovatelné – viz oddíl 4.2.5 Stanovení obsahu fytohormonů, str. 28).





Obrázek 13: Množství vybraných CK (v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci tZ7G.  
(A. tZ, B. DZ7G, C. tZ7G, D. tZ9G)



Obrázek 14: Množství vybraných CK (A. tZ, B. DZ9G, C. tZ7G, D. tZ9G, E. tZOG, F. cZOG udávané v pmol v 1 g čerstvého rostlinného materiálu) v inkubovaných listových segmentech po exogenní aplikaci tZ9G

## 6 Diskuze

Rozdělení fytohormonů na aktivní a neaktivní resp. zásobní formy v minulosti bylo založeno na výsledcích biotestů (a odpovídalo tedy míře pozorovatelné a měřitelné fyziologické odpovědi na aplikovanou látku). Toto rozdělení je s postupujícím vědeckým výzkumem stále častěji zpochybňováno a to nejen díky vyšší úrovni analytické chemie a většímu množství analyzovaného rostlinného materiálu (např. cZ, v biotestech původně označován jako neaktivní [30], byl prokázán jako dominantní zástupce CK např. v některých vývojových stádiích cizrny beranní – *Cicer arietinum* [46], kukuřice seté – *Zea mays* [47] a mnohých dalších), ale také díky rozvoji molekulární biologie a biochemie, které předkládají objasnění mechanismů předcházejících pozorované fyziologické reakci. Stále důležitější se rovněž jeví kooperace jednotlivých fytohormonů způsobená provázaností metabolických drah.

Tato práce nabízí možnost srovnání historického přístupu biotestů (konkrétně senescenčního biotestu provedeného na listech ovsa setého, lat. *Avena sativa*) s výsledky moderní analýzy obsahu fytohormonů a měla by podnítit další výzkum kooperace jednotlivých skupin fytohormonů v tomto rostlinném materiálu.

Senescence listových segmentů ovsa setého (*Avena sativa*) se k hodnocení účinku cytokininů používá již od sedmdesátých let 20. století. [48] [49] [50] Výsledky biotestů se u jednotlivých autorů drobně liší (srovnej výsledky pro BAP v [48] a [29]), což lze jednak přičíst použití různých odrůd ovsa, jednak jsme sami pozorovali značné interindividuální rozdíly mezi inkubovanými listy v některých zkumavkách. Tyto jevy lze vysvětlit např. možným rozdílným kontaktem s testovacím roztokem a značnou variabilitou rostlinného materiálu.

Z výsledků biotestů (viz Obrázek 6, str. 34) bychom mohli usuzovat, že BAP vykazuje ve srovnání s přirozeně se vyskytujícím tZ mnohem vyšší aktivitu (stejně jako se to v minulosti dělo – např. [29]), analýzy fytohormonů nám umožňují hlubší vhled do problému a zvýrazňují omezený efekt působení BAP na metabolismus modelové rostliny ovsa setého neboli *Avena sativa* (tZ zvýšil množství auxinů

v inkubovaných listových segmentech přibližně desetkrát více – viz Obrázek 7, str. 35, část A a Obrázek 8, str. 36, část A).

Ačkoli exogenní aplikace CK (zejména v případě tZ, jeho glukosidů a BAPN7G) zvyšovala množství IAA v inkubovaných listových segmentech (viz Obrázek 7, str. 35, části A, C, D a Obrázek 8, str. 36, část B), získaná data nevykazují jednoduchou závislost na koncentraci aplikovaných CK (pro ukázkou dalších souvislostí doporučuji [51]). Pro vyvození závěrů je potřeba další šetření (totéž platí pro IAA-Asp – viz Obrázek 9, str. 37).

Zajímavým fenoménem, který jsme pozorovali, je odlišné chování N7 a N9 glukosidů tZ jak v senescenčním biotestu, tak při analýze fytohormonů (viz Obrázek 6, str. 34, část A, Obrázek 13, str. 41 a Obrázek 14, str. 42). Ačkoli jsou tyto cytokininy tradičně považovány za ireverzibilní deaktivální formy s navzájem podobně nízkou aktivitou (stále se objevuje např. v [3] a [23]), naše výsledky poukazují jednak na vysokou aktivitu tZ9G v senescenčním biotestu (viz Obrázek 6, str. 34, část A), jednak na přeměnu tZ9G i na tzv. aktivní formy CK (viz Obrázek 14, str. 42, části A a F). Vzájemným srovnáním výsledků obou glukosidů (viz Obrázek 13, str. 41 a Obrázek 14, str. 42) jsme zjistili, že oba glukosidy podléhají při vyšších koncentracích hydrogenaci na příslušné dihydrozeatinglukosidy. tZ7G je v nižších koncentracích preferenčně převáděn na tZ9G, zatímco při nejvyšší koncentraci pozorujeme v menší míře i vznik tZ. tZ9G je ve vysokých koncentracích primárně konvertován na *cis*-O-glukosidy (které jsou rovněž hlavními zástupci CK zjištěnými u kontrolních listových segmentů – viz příloha práce, dříve v literatuře např. [31]), v menší míře sledujeme též vznik tZ7G a tZ. Získaná data mohou mít spojitost s publikovanými rozdíly v afinitě vůči N-glukosidům tZ některých enzymů cytokininového metabolismu (konkrétně CKX viz [27] a  $\beta$ -glukosidasou viz [52]), pro potvrzení je výsledky současné práce potřeba dále rozvést.

Přestože jsme nepozorovali jednoznačný a jednoduše interpretovatelný účinek exogenně aplikovaných CK a jejich metabolitů na endogenní hladiny auxinů v listových segmentech ovsa setého (*Avena sativa*), v práci jsme odhalili zajímavé trendy v oblasti metabolismu CK, v jejichž zkoumání budeme dále pokračovat.

## 7 Závěr

Cíle bakalářské práce byly splněny:

- 1) Exogenně aplikované cytokininy ovlivnily senescenci listových segmentů ovsa setého (*Avena sativa*) v míře, která obecně souhlasí s dříve publikovanou literaturou.
- 2) V inkubovaných listových segmentech byl stanoven obsah vybraných fytohormonů a jejich metabolitů.
- 3) Výsledky analýzy prokázaly zvýšení hladin auxinů v inkubovaných listových segmentech ovsa setého následkem exogenní aplikace cytokininů. Pozorována byla též metabolická přeměna aplikovaných cytokininů na jiné jejich formy. Za nejzajímavější výsledky v tomto ohledu považujeme zjištění aktivity tZ9G v senescenčním biotestu (vymyká se předchozí literatuře) a prokázané metabolické přeměny na tZ9G na formy CK aktivní ve zvoleném modelovém organismu (tZ a cZOG).

## 8 Seznam použité literatury

- [1] H. W. Heldt a B. Piechulla „Multiple signals regulate the growth and development of plant organs and enable their adaptation to environmental conditions“ v knize „Plant biochemistry, 4th edition“ (H. W. Heldt a B. Piechulla) Elsevier, Amsterdam, str. 451-485 (2011)
- [2] L. Pavlová a L. Fischer „Fytohormony“ v knize „Růst a vývoj rostlin“ (L. Pavlová a L. Fischer) Nakladatelství Karolinum, Praha, str. 87-121 (2011)
- [3] I. Frébort, M. Kowalska, T. Hluska et al. „Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation“ *J Exp Bot* 62 (8), str. 2431-2452 (2011)
- [4] F. W. Went a K. V. Thimann „Phytohormones“ The Macmillan Company, New York (1937)
- [5] C. Darwin a F. Darwin „The power of movement in plants“ D. Appleton and Company, New York (1880)
- [6] E. Höxtermann „Cellular 'elementary organisms' in vitro. The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization“ *Physiol Plantarum* 100 (3), str. 716-728 (1997)
- [7] F. Cvrčková, J. Luštinec a V. Žárský „Complex, non-monotonic dose-response curves with multiple maxima: Do we (ever) sample densely enough?“ *Plant Signal Behav* 10 (9), e1062198 (2015)
- [8] S. Abel a A. Theologis „Odyssey of Auxin“ *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (10), a004572 (2010)
- [9] T. A. Enders a L. C. Strader „Auxin Activity: Past, Present, and Future“ *Am J Bot* 102 (2), str. 180-196 (2015)
- [10] A. W. Woodward a B. Bartel „Auxin: Regulation, Action, and Interaction“ *Ann Bot* 95 (5), str. 707-735 (2005)
- [11] S. Simon, M. Kubeš, P. Baster et al. „Defining the selectivity of processes along the auxin response chain: a study using auxin analogues“ *New Phytol* 200 (4), str. 1034-1048 (2013)
- [12] E. Zažímalová, J. Petrášek a E. Benková „Auxin and Its Role in Plant Development“ Springer-Verlag, Vídeň (2014)
- [13] M. Sauer, S. Robert a J. Kleine-Vehn „Auxin: simply complicated“ *J Exp Bot* 64 (9), str. 2565-2577 (2013)
- [14] D. A. Korasick, T. A. Enders a L. C. Strader „Auxin biosynthesis and storage

- forms“ *J Exp Bot* 64 (9), str. 2541-2555 (2013)
- [15] Y. Zhao „Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants“ *Mol Plant* 5 (2), str. 334-338 (2012)
- [16] M. Adamowski a J. Friml „PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution“ *Plant Cell* 27 (1), str. 20-32 (2015)
- [17] G. Krouk, B. Lacombe, A. Bielach et al. „Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants“ *Dev Cell* 18 (6), str. 927-937 (2010)
- [18] E. Zazimalova, S. A. Murphy, H. Yang et al., „Auxin Transporters - Why So Many?“ *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (3), a001552 (2010)
- [19] E. G. Schaller, A. Bishopp a J. J. Kieber „The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development“ *Plant Cell* 27, str. 44-63 (2015)
- [20] E. J. Chapman a M. Estelle „Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants“ *Annu Rev Genet* 43 (1), str. 265-285 (2009)
- [21] R. Amasino „1955: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone“ *Plant Physiol* 138 (3), str. 1177-1184 (2005)
- [22] J. Barciszewski, E. G. Siboska, O. B. Pedersen et al. „Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts“ *FEBS Letters* 393, str. 197-200 (1996)
- [23] H. Sakakibara „Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation“ *Annu Rev Plant Biol* 57, str. 431-449 (2006)
- [24] L. Spíchal „Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules,“ *Funct Plant Biol* 39, str. 267-284 (2012)
- [25] S. El-Showk, R. Ruonala a Y. Helariutta „Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk“ *Development* 140 (7), str. 1373-1383 (2013)
- [26] J. Frébortová, M. W. Fraaije a P. Galuszka „Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors“ *Biochem J* 380 (1), str. 121-130 (2004)
- [27] P. Galuszka, H. Popelková, T. Werner et al. „Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Nicotiana tabacum* L.“ *J Plant Growth Regul* 26 (3), str. 255-267 (2007)
- [28] B. Brzobohatý, I. Moore, P. Kristoffersen et al. „Release of active cytokinin



- by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem“ *Science* 262 (5136), str. 1051-1054 (1993)
- [29] M. Kamínek, T. Vaněk a V. Motyka „Cytokinin activities of N6-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring“ *J Plant Growth Regul* 6, str. 113-120 (1987)
- [30] R. Y. Schmitz a F. Skoog „Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin“ *Plant Physiol* 50 (6), str. 702-705 (1972)
- [31] S. Gajdošová, L. Spíchal, M. Kamínek et al. „Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants“ *J Exp Bot* 62 (8), str. 2827-2840 (2011)
- [32] T. Hluska, P. I. Dobrev, D. Tarkowská et al. „Cytokinin metabolism in maize: Novel evidence of cytokinin abundance, interconversions and formation of a new trans-zeatin metabolic product with a weak anticytokinin activity“ *Plant Sci* 247, str. 127-137 (2016)
- [33] A. Bishopp, S. Lehesranta a A. Vatén „Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem.“ *Curr Biol* 21 (11), str. 927-932 (2011)
- [34] A. Cedzich, H. Stransky, B. Schulz et al. „Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures,“ *Plant Physiol* 148 (4), str. 1857–1867 (2008)
- [35] T. Kudo, T. Kiba a H. Sakakibara „Metabolism and long-distance translocation of cytokinins,“ *J Integr Plant Biol* 52 (1), str. 53-60 (2010)
- [36] I. Hwang, J. Sheen a B. Müller „Cytokinin Signaling Networks“ *Annu Rev Plant Biol* 63 (1), str. 353-380 (2012)
- [37] F. K. Skoog a C. O. Miller „Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro.“ *Symp Soc Exp Biol* 11, str. 118-131 (1957)
- [38] K. Miyawaki, M. Matsumoto-Kitano a T. Kakimoto „Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate“ *Plant J* 37 (1), str. 128-38 (2004)
- [39] K. Takei, T. Yamaya a H. Sakakibara „Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of *trans*-Zeatin“ *J Biol Chem* 279 (40), str. 41866-41872 (2004)

- [40] B. Jones, S. A. Gunnerås, S. V. Petersson et al. „Cytokinin regulation of auxin synthesis in Arabidopsis involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction“ *Plant Cell* 22 (9), str. 2956-2969 (2010)
- [41] L. Laplaze, E. Benkova, I. Casimiro et al. „Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation“ *Plant Cell* 19 (12), str. 3889-3900 (2007)
- [42] P. I. Dobrev a M. Kamínek „Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction“ *J Chromatogr A* 950, str. 21-29 (2002)
- [43] D. L. Djilianov, P. I. Dobrev, D. P. Moyankova et al. „Dynamics of Endogenous Phytohormones during Desiccation and Recovery of the Resurrection Plant Species *Haberlea rhodopensis*,“ *J Plant Growth Regul* 32 (3), str. 564-574 (2013)
- [44] P. I. Dobrev, L. Havlíček, M. Vágner et al. „Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography“ *J Chromatogr A* 1075, str. 159-166 (2005)
- [45] P. I. Dobrev a R. Vaňková „Quantification of abscisic Acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues“ v knize „Plant Salt Tolerance“ (S. Shabala a T. A. Cuin) Humana Press, Totowa, str. 251-261 (2012)
- [46] R. J. N. Emery, L. Leport, J. E. Barton et al. „*cis*-Isomers of Cytokinins Predominate in Chickpea Seeds throughout Their Development“ *Plant Physiol* 117 (4), str. 1515-1523 (1998)
- [47] Y. K. Veach, R. C. Martin, D. W. Mok et al. „O-glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins.“ *Plant Physiol* 131 (3), str. 1374-1380 (2003)
- [48] A. Varga a J. Bruinsma, „Effects of Different Cytokinins on the Senescence of Detached Oat Leaves“ *Planta* 111 (1), str. 91-93 (1973)
- [49] K. V. Thimann, R. R. Tetley a T. Van Thanh, „The Metabolism of Oat Leaves during Senescence: II. Senescence in Leaves Attached to the Plant“ *Plant Physiol* 54 (6), str. 859-862 (1974)
- [50] E. B. Dumbroff a M. A. Walker, „The Oat-leaf Senescence Test for Cytokinins Reconsidered“ *Ann Bot* 44 (6), str. 767-769 (1979)
- [51] J. Luštinec, F. Cvrčková, J. Čížková et al. „Multiple, concentration-

dependent effects of sucrose, auxins and cytokinins in explant cultures of kale and tobacco“ *Acta Physiol Plant* 36 (8), str. 1981-1991 (2014)

- [52] T. Filipi, P. Mazura, L. Janda et al. „Engineering the cytokinin-glucoside specificity of the maize  $\beta$ -D-glucosidase Zm-p60.1 using site-directed random mutagenesis“ *Phytochemistry* 74, str. 40-48 (2012)

