

**Masarykova univerzita  
Přírodovědecká fakulta  
Ústav biochemie**



Diplomová práce

# **Vliv elicitorů obranné reakce na hladinu fyttohormonů**

Vypracovala: Martina Marečková

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.

Brno 2007

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s využitím pramenů v práci uvedených.

Brno, květen 2007

.....  
podpis

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Ladislavu Havlovi, CSc., vedoucímu mé diplomové práce, a prof. RNDr. Vladimíru Mikešovi, CSc. za odborné vedení.

Ing. Jiřímu Petřekovi, PhD. a laborantce Martině Jůzové za pomoc při práci s tkáňovými kulturami.

RNDr. Petru Doleželovi CSc. a laborantce Elišce Jaškové za pomoc při zpracování a analýze cytokininů.

Všem přátelům, kteří mi zpříjemňovali chvíle ve škole i mimo ni. A v neposlední řadě především rodičům, za jejich podporu, bez které bych pravděpodobně nikdy nemohla studovat.

# **1. Obsah**

1.	Obsah.....	1
2.	Seznam zkratek.....	4
3.	Teoretická část.....	6
3.1.	Reakce rostliny na stres.....	6
3.2.	Elicitory.....	8
3.2.1.	Ergosterol.....	8
3.2.1.1.	Václavka.....	9
3.2.2.	Cryptogein.....	9
3.2.2.1.	Phytophthora.....	10
3.3.	Růst a vývoj rostlin.....	11
3.3.1.	Vliv vnějších faktorů na růst rostlin.....	12
3.3.2.	Vliv vnitřních faktorů na růst rostlin.....	13
3.4.	Cytokininy.....	14
3.4.1.	Objev cytokininů.....	14
3.4.2.	Struktura a aktivita cytokininů.....	15
3.4.3.	Anticytokininy, jejich struktura a využití.....	17
3.4.4.	Metabolismus cytokininů.....	18
3.4.4.1.	Biosyntéza.....	19
3.4.4.2.	Vzájemné přeměny.....	20
3.4.4.3.	Degradace.....	22
3.4.5.	Regulace obsahu cytokininů v buňkách.....	22
3.4.6.	Transport cytokininů.....	22
3.4.7.	Mechanismy účinku cytokininů.....	23
3.4.8.	Úloha cytokininů v rostlinách.....	24
3.4.9.	Praktické využití cytokininů.....	25
3.4.10.	Metody stanovení cytokininů.....	25
3.4.10.1.	Chromatografie.....	26
4.	Cíl práce.....	30
5.	Materiál a metody.....	31
5.1.	Materiál.....	31
5.2.	Příprava média.....	31

5.3. Založení pokusu .....	33
5.4. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku.....	33
5.5. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA .....	33
5.6. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteras .....	34
5.7. Stanovení celkového obsahu cytokininů v buněčné suspenzi tabáku pomocí HPLC s MS detekcí.....	35
6. Výsledky.....	38
6.1. Vliv elicitoru ergosterolu na tabák linie BY-2 .....	38
6.1.1. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku linie BY-2 .....	38
6.1.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku linie BY-2 pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteras.....	39
6.1.3. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku linie BY-2 pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA.....	41
6.2. Vliv elicitoru ergosterolu na tabák var. Xanthi .....	42
6.2.1. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi .....	43
6.2.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteras.....	44
6.2.3. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA.....	46
6.2.4. Stanovení celkového obsahu cytokininů v buněčné suspenzi tabáku var. Xanthi pomocí HPLC s MS detekcí .....	47
6.3. Vliv elicitoru cryptogeinu na tabák var. Xanthi .....	49
6.3.1. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi .....	50
6.3.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteras.....	51
6.3.3. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA.....	53
6.3.4. Stanovení celkového obsahu cytokininů v buněčné suspenzi tabáku var. Xanthi pomocí HPLC s MS detekcí. ....	54

7.	Diskuze .....	56
8.	Závěr.....	60
9.	Seznam grafů .....	61
10.	Seznam obrázků .....	61
11.	Seznam příloh .....	63
12.	Seznam tabulek .....	63
13.	Seznam literatury .....	64

## **2. Seznam zkratek**

AHK	arabidopsis histidine kinase
AHP protein	arabidopsis histidine phosphotransfer protein
ARR protein	arabidopsis response regulator protein
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
BA	N <sup>6</sup> -benzyladenin
BAP	benzylaminopurin
CDPK	proteinkinasa kalmodulínového typu
CHASE	cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular
<i>cis-Z</i>	<i>cis</i> -zeatin
CKX	cytokininoxidasa-dehydrogenasa
CRE	cytokinin response
DEAE-celulóza	diethylaminoethylcelulóza
DEAE-Sephadex	diethylaminoethylsephadex
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylalylldifosfát
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FDA	fluoresceindiacetát
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iP	N <sup>6</sup> - isopentenyladenin
iPDP	isopentenyladenosindifosfát
iPMP	isopentenyladenosinmonofosfát
iPTP	isopentenyladenosintrifosfát
<i>mOHBA</i>	N <sup>6</sup> - <i>meta</i> -hydroxybenzyladenin
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>Kouba</i>	N <sup>6</sup> - <i>ortho</i> -hydroxybenzyladenin
PI	propidium jodid
PKC	proteinkinasa C
RIA	radioimuno assay
Z	<i>trans</i> -zeatin

ZMP	zeatin monofosfát
ZR	zeatin ribosid
7G BA	benzyladenin-7-glukosid
9R BA	benzyladenin-9-ribosid
9R-MP BA	benzyladenosin-5-monofosfát
+SIM	single ion monitoring



### **3. Teoretická část**

#### **3.1. Reakce rostliny na stres**

Rostliny jsou v průběhu svého života vystaveny velmi proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Ty mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést i k jejich uhynutí. Nepříznivé vlivy prostředí označujeme jako stresové faktory. Stresové faktory mohou být fyzikálně-chemické nebo biotické. Mezi fyzikálně-chemické stresové faktory patří například účinky teplot, vodní stres, toxické látky v prostředí a další. Biotické faktory mohou být například patogenní organizmy, jako jsou viry bakterie nebo houby (1).

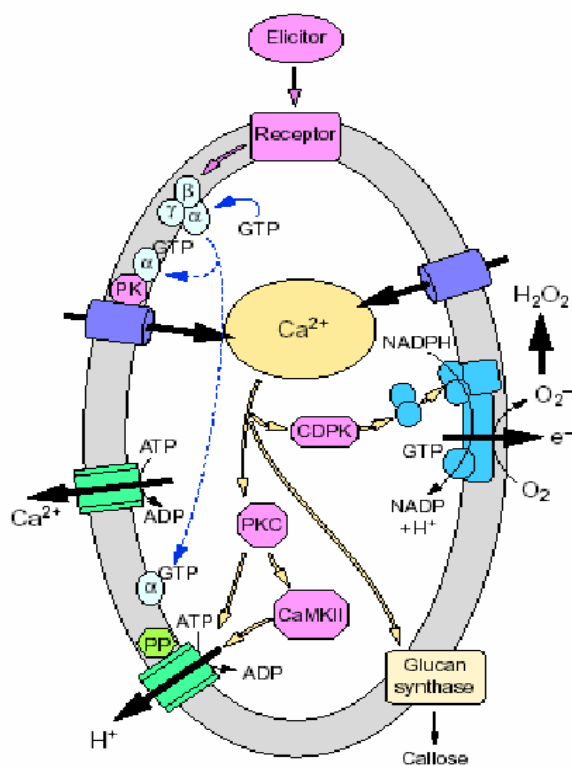
Nejen průnik, ale často i kontakt patogenního organismu s buňkou vyvolává celou řadu koordinovaných vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je omezit nebo zcela eliminovat jeho působení a šíření do dalších buněk. Úspěch obranné reakce, je závislý na včasném rozpoznání patogenu. Na počátku obranných reakcí musí být podnět pro jejich spuštění, kterým obvykle bývá specifický metabolit, elicitor, uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem (1).

Interakce mezi patogenem a rostlinou může být kompatibilní a inkompatibilní. Kompatibilní interakce nastane, když po proniknutí do hostitele se rozvíjí infekce a patogen se reprodukuje. Pokud buňka rozpozná patogen, dochází k spuštění obranné reakce, infekce je potlačena a patogen se nereprodukuje, jedná se o inkompatibilní interakci. Zda je daná rostlina odolná vůči určitému patogenu, závisí na tom, jestli má ve svém genomu geny rezistence. Jejich produkty jsou potom příslušné receptory, které spouští signální kaskádu (2, 3).

Během obranné reakce v buňce dochází k specifickým fyziologickým procesům, jako je například depolarizace cytoplazmatické membrány, která je spojena s tokem iontů přes cytoplazmatickou membránu, výtok  $K^+$  a  $Cl^-$  iontů z buňky a naopak pronikání  $Ca^{2+}$  iontů do buňky. Dochází k zvýšení tvorby polysacharidu kalózy (1,3-D-glukan), který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalóza je velmi odolná vůči hydrolyzám. Dále jsou produkovány aktivní formy kyslíku jako je například superoxidový radikál nebo peroxid vodíku. To způsobí změny ve struktuře buněčné stěny, která se stane pevnější vůči pronikání patogenu do buňky. Peroxid vodíku se může také uplatnit jako signální molekula, dochází k aktivaci genové exprese a

produkcí fytoalexinů a dalších obranných látek a enzymů Obr. 1 (2). Fytoalexiny jsou specifická skupina nízkomolekulárních látek, které se za normálních okolností v okolí buňky nevyskytují, ale začnou se tvořit až po napadení buňky patogenem. Existuje více než 300 fytoalexinů. Většina těchto sloučenin jsou lipofilní povahy, což jim umožňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům toxického působení fytoalexinů (1).

Aktivní obrana rostliny proti patogenu může vyústit v tzv. hypersenzitivní reakci. Při ní dochází k rozpadu membránového systému rostlinné buňky, zejména náhlým zvýšením koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů, peroxidu vodíku a dalších toxických látek. V konečném důsledku pak dochází ke smrti rostlinné buňky. V další fázi dojde k odumření buněk i v blízkém okolí místa infekce. Lokalizovanou nekrózou se rostlina snaží zastavit další šíření infekce po jiných částech rostliny (1).



**Obr. 1:** Hypotetický model transdukční signální kaskády, v prvním kroku reakce rostliny na interakci s patogenem. Interakce elicitoru s receptorem spojeným s G-proteinem (přerušované čáry naznačují aktivaci heterotrimerního G-proteinu) vede ke zvýšení cytosolové koncentrace Ca<sup>2+</sup>. Ca<sup>2+</sup> aktivuje doménu proteinkinasy kalmodulínového typu (CDPK). To nastartuje aktivitu NADPH oxidasy a vznikají aktivní formy kyslíku O<sup>2-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zvýšení cytosolové koncentrace Ca<sup>2+</sup> aktivuje také

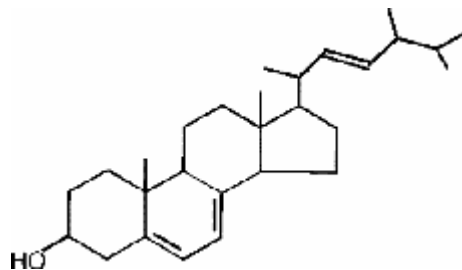
enzym  $\beta$ -1,4–glukansyntasu, která syntetizuje kalózu. Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  dále aktivují také proteinkinasy C (PKC) a  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependentní proteinkinasy, které refosforylují  $\text{H}^+$ -ATPasu a vrací enzymovou aktivitu na kontrolovanou úroveň (2).

## 3.2. Elicitory

Elicitory jsou biologicky aktivní sloučeniny, schopné vyvolat u rostliny obrannou reakci. Jako elicitory mohou sloužit jednak některé metabolity vylučované patogeny, tzv. exogenní elicitory, a sloučeniny, které se uvolňují narušováním buněčné stěny obou organismů, tzv. endogenní elicitory. Mezi exogenní elicitory patří například některé polysacharidy a specifické enzymy a peptidy. Endogenní elicitory jsou například oligomery chitinu nebo glykoproteidy, uvolněné hydrolyzou buněčné stěny patogenu, nebo oligogalaktouronany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky (1). Elicitory mohou být druhově specifické, ty jsou produkovány pouze určitým druhem patogenu, nebo druhově nespecifické, to jsou například fragmenty buněčných stěn (2).

### 3.2.1. Ergosterol

Ergosterol (Obr. 2) je jednou ze složek cytoplazmatické membrány hub. Spolu s chitinovými oligomery byl detekován ve vodném extraktu z houby václavky (*Armillaria ostoyae* a *A. mellea*), který obsahoval aktivní sloučeniny, elicitory, schopné vyvolat obrannou reakci u buněčné suspenze tabáku. Bylo prokázáno, že izolovaná frakce z extraktu z václavky, obsahující ergosterol, vyvolávala syntézu aktivních forem kyslíku a způsobila změny v pH u buněk tabáku. Tento fakt naznačil, že ergosterol je specificky rozpoznáván rostlinnými buňkami a má tedy aktivitu elicitoru (4). Ergosterol také indukuje syntézu fytoalexinu capsidiolu a mobilizuje  $\text{Ca}^{2+}$  ze zásob v buňce a tím zvyšuje jeho hladinu v cytosolu (5).



**Obr. 2:** Struktura ergosterolu.

### 3.2.1.1. Václavka

Václavky jsou saprofytické nebo saproparazitické houby. K parazitizmu přecházejí v důsledku oslabení smrků, např. stářím nebo jeho výsadbou v nevhodných podmínkách (především nedostatek vláhy a výživy). Václavky způsobují každoročně v lesním hospodářství velké škody. Především václavka smrková (*Armillaria ostoyae*) (Obr. 3) je vedle choroše a kořenovníku vrstevnatého největším parazitem smrkových lesů (6). Václavka smrková působí rozklad dřeva spodní části kořenů a plamencovitě proniká do vnitřní pařezovité části kmene (7).

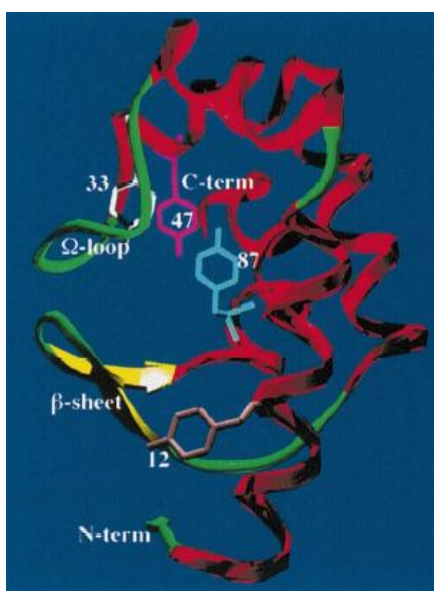


**Obr. 3:** Václavka smrková (*Armillaria ostoyae*) (8).

### 3.2.2. Cryptogein

Cryptogein (Obr. 4) je malý protein, elicitin, sekretovaný houbou *Phytophthora cryptogea*, který indukuje obrannou reakci v buňkách tabáku. Je to holoprotein s molekulovou hmotností 10 kDa (9). Metodou cirkulárního dichroismu bylo zjištěno, že sekundární struktura elicitinů je hodně stálá. Všechny mají přibližně 50% alfa-helix a

málo nebo vůbec beta-struktur. Podle schopnosti způsobovat nekrózu se elicitory dělí na  $\alpha$ -elicitory (málo nekrotizující), mezi ně patří např. caspicein, a na  $\beta$ -elicitory (hodně nekrotizující), sem patří např. cryptogein.  $\alpha$ -elicitory obsahují kyselé zbytky, jako například valin v poloze 13.  $\beta$ -elicitory jsou bazické, v poloze 13 mají lysin. Toto může být předpokládané aktivní místo odpovědné za indukci nekrózy (10). Elicitory indukují v suspenzi tabáku výrazné zvýšení pH a vodivosti v extracelulárním prostředí, produkci aktivních forem kyslíku (11) a zvýšení množství  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu (12). Dále dochází také k výrazným změnám v zastoupení jednotlivých druhů lipidů (např. nárůst sterolových esterů nebo zvýšení syntézy fosfatidyletanolaminu), tvorbě ethylenu a k akumulaci fytoalexinů (11, 13).



**Obr. 4:** Struktura cryptogeinu (14).

### 3.2.2.1. Phytophthora

*Phytophthora* je mikroskopický parazitický organizmus, který patří do třídy Oomycety. Houby a Oomycety jsou dvě nejdůležitější skupiny eukaryotických rostlinných patogenů, ale fylogeneticky jsou to dvě odlišné skupiny. Houby mají více společného se živočichy, zatímco oomycety jsou spíše příbuzné s řasami (15, 16).

*Phytophthora* patří mezi obligátně biotrofní patogeny. Zpočátku má s hostitelskou rostlinnou buňkou biotrofní vztah, roste a rozmnožuje se na hostitelském pletivě. Potom, co hostitelská buňka na infekční proces zemře, čerpá živiny z mrtvé buňky (15).

*Phytophthora* se rozmnožuje jak pohlavně tak nepohlavně. Spóry jsou roznášeny větrem nebo deštěm. Spóry jsou schopné přežít i extrémní přírodní podmínky. Přezimují na zbytcích listů nebo v půdě. Mechanizmy, kterými tyto spóry útočí na hostitelskou rostlinu, nejsou přesně známy, ale předpokládá se, že by při tom mohly hrát důležitou roli chemotaxe, elektrotaxe a autoagregace (15).

*Phytophthora* syntetizuje a vylučuje sloučeniny označované jako patogenní faktory. Ty jsou potřebné pro úspěšnou kolonizaci a vyvolání infekce u hostitelské rostliny a pro ochranu před rostlinnými toxiny a látkami určenými na obranu rostliny před *Phytophthorou*. Mezi patogenní faktory patří enzymy degradující buněčnou stěnu, toxiny a proteiny pro ochranu proti rostlinným obranným sloučeninám. Ty pak mohou sloužit jako elicitory (15).

Bylo identifikováno více než 43 druhů *Phytophthory*. *Phytophthora* má široké spektrum hostitelů např. brambory (*Phytophthora infestans*) (Obr. 5), jahody (*Phytophthora fragariae*), paprika (*Phytophthora capsici*), atd. (16, 17).



**Obr. 5:** Plíseň bramborová *Phytophthora infestans* (18).

### 3.3. Růst a vývoj rostlin

Růst je jedním z nejcharakterističtějších projevů živých organizmů. Růstem se rozumí nevratné přibývání hmoty či velikosti. Růst je úzce spjat s buněčným metabolismem, který dodává látky a energii potřebné k výstavbě těla. S růstem je spojena i diferenciace. Obecně lze říct, že diferenciace je rozlišování původních meristematických buněk v buňky specializované. Buňky diferenciované mají rozdílnou strukturu a funkci. Růst a vývoj rostlin je ovlivňován vnějšími faktory a vnitřními faktory (19).

### 3.3.1. Vliv vnějších faktorů na růst rostlin

Mezi faktory prostředí patří především teplota, záření, zemská tíže a složení ovzduší a půdního roztoku.

Rostliny jsou velmi citlivé ke změnám teploty. Pro růst rostliny jsou důležité tzv. kardinální body: minimum, optimum a maximum teploty. V minimu teploty se růst zastavuje. Při mrznutí buněk se vytváří v mezibuněčných prostorech krystalky ledu. Dochází k dehydrataci buňky, porušuje se normální metabolismus buňky, vznikají jedovaté látky, až nakonec dojde k nevratné koagulaci cytoplazmy a buňky odumírají. V optimu teploty je rychlost růstu nejvyšší. Při zvýšení teploty nad 30 °C již růstová rychlost většinou klesá, až při dosažení maxima teploty ustává. Při teplotách nad 40 °C vznikají v rostlinných pletivech jedovaté látky a při teplotách kolem 50 °C dochází ke koagulaci proteinů. Kardinální body se při adaptaci rostliny k novým podmínkám prostředí mohou posunovat. Odolnost rostlin proti extrémním teplotám je specifická pro jednotlivé druhy. V odolnosti se mohou značně lišit různé orgány, ale i pletiva téhož druhu (20).

Dalším vnějším faktorem, který působí na rostliny, je záření. Důležitou charakteristikou záření je jeho intenzita a vlnová délka. Intenzita denního světla je závislá na výšce Slunce nad obzorem. Ta se mění během dne, s ročním obdobím i zeměpisnou šířkou. Absorpce infračerveného záření závisí především na struktuře pokožky a projevuje se zvýšením teploty pletiv. Viditelná část záření je důležitá pro fotosyntézu. Ultrafialové záření brzdí růst rostlin. Je pohlcováno především nukleovými kyselinami buněčného jádra, kde pak vznikají thyminové dimery, které znemožňují správnou tvorbu nové DNA a mRNA (20).

Na utváření rostliny působí také zemská tíže. Kořeny i prýty umístěné horizontálně se ohýbají a obnovují růst ve směru působení zemské tíže. Tento jev se nazývá gravitropismus (19).

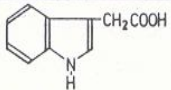
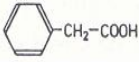
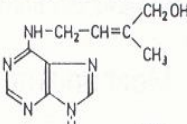
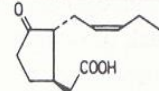
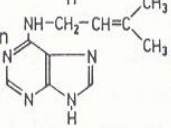
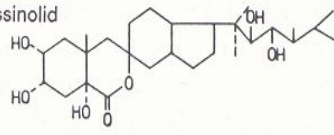
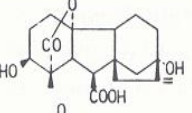
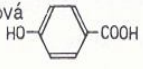
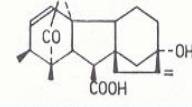
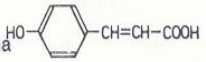
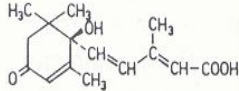
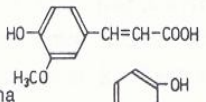
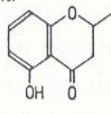
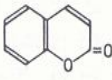
Důležitým faktorem, který ovlivňuje růst rostlin, je také složení vzduchu, půdy a vody. Různé orgány rostlin mají různou potřebu kyslíku. Množství kyslíku ve vzduchu spíše brzdí růst nadzemních částí rostlin. Snížení kyslíku v půdě má vliv na růst kořenů. Nedostatečné provzdušňování půdy snižuje růst kořenů v přijímání roztoku minerálních látek z půdy. Množství oxidu uhličitého má vliv na rychlost fotosyntézy. Nepříznivý vliv na růst rostlin mají některé plyny (oxid siřičitý, ozon) a nečistoty (popílek, různé organické sloučeniny a sloučeniny těžkých kovů, atd.) (20).

### 3.3.2. Vliv vnitřních faktorů na růst rostlin

Roku 1880 vyslovil německý botanik Julius Sachs domněnku o existenci chemických signálů, kterými mohou vzájemně komunikovat jednotlivé orgány rostlin. Koncem dvacátých let dvacátého století se začalo látkám, které regulují růstové a vývojové procesy u rostlin, říkat růstové regulátory. Tento obecný název však nerozlišuje látky přirozené od látek synteticky připravených. Přirozené regulátory růstu lze rozdělit do dvou skupin: rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou. Mezi látky s růstově regulační aktivitou patří zejména polyaminy, kyselina jasmonová, oligosacharidy a různé fenolické látky (Obr. 6). Tyto látky mezi fytohormony řazeny nejsou, protože jsou účinné ve vyšších koncentracích, nebo se dostatečně nezná mechanismus jejich působení. Mezi rostlinné hormony se řadí auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abcisová, ethylen a brassinosteroidy (Obr. 6) (21).

Fytohormony jsou výrazně méně specifické než hormony živočišné. Každý z fytohormonů ovlivňuje několik často odlišných procesů a naopak, týž proces bývá ovlivněn větším počtem různých látek. Většina fytohormonů je syntetizována na více místech v rostlině. Mechanismus působení fytohormonů je velmi blízký mechanismu působení živočišných hormonů. Účinku hormonu musí vždy předcházet vazba na receptor. Hormon se může vázat na receptor umístěný na membráně a signál je pak dále do buňky přenášen systémy druhých posílů, nebo hormon proniká do jádra, kde pak například může vyvolat změnu v expresi některých genů. U rostlin je popsáno mnoho bílkovin schopných vázat fytohormony, ať již membránových nebo cytoplazmatických. Fytohormony jsou schopny ve velmi krátké době vyvolat či zastavit expresi některých genů (19).



SKUPINA	NEJDŮLEŽITĚJŠÍ LÁTKY VZOREC	ZKR.	SKUPINA	NEJDŮLEŽITĚJŠÍ LÁTKY VZOREC	ZKR.
auxiny	indolyl-3-octová kyselina 	IAA	polyaminy	putrescin $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Put
	fenylloctová kyselina 	PAA		spermidin $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Spd
cytokininy	zeatin (4 <sup>1</sup> -hydroxy-6-izopentenyl-aminopurin) 	Z	jasmonová kyselina	jasmonová kyselina 	JA
	izopentenyladenin (6-izopentenyl-aminopurin) 	IPA		brassinolid 	
gibereliny	giberelin A <sub>1</sub> 	GA <sub>1</sub>	fenolické látky	<i>p</i> -hydroxybenzoová kyselina 	pHBA
	giberelin A <sub>3</sub> 	GA <sub>3</sub>		<i>p</i> -kumarová (4-hydroxy-skořicová) kyselina 	pCA (HCA)
abscisová kyselina	abscisová kyselina 	ABA		ferulová (4-hydroxy-3-metoxyskořicová) kyselina 	FA
	etylen	etylen $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$		naringenin 	—
			kumarin 	—	

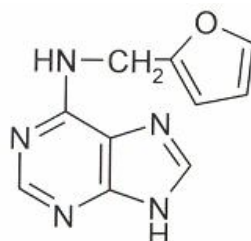
Obr. 6: Nejdůležitější růstové regulátory (19).

## 3.4. Cytokininy

### 3.4.1. Objev cytokininů

Objev cytokininů vycházel ze zjištění, že látky, které difundují z floému, indukují meristemizaci parenchymatického pletiva bramborových hlíz. Díky rozvoji technik explantátových kultur byl vyvinut citlivý biotest. Tento biotest byl založený na stimulaci buněčného dělení v kultuře stonkové dřevě tabáku. Buňky klidového dřevného parenchymu se dělily pouze po přidání látek s cytokininovou aktivitou. Nejbohatším zdrojem těchto látek byla autoklávovaná DNA. V ní byl jako účinná látka izolován a identifikován 6-furfurylaminopurin (6-furfuryladenin, kinetin) (Obr. 7). Pomocí kinetinu a jeho analog byly prozkoumány fyziologické účinky cytokininů. Na základě těchto poznatků byly cytokininy definovány jako látky, které v přítomnosti auxinu stimulují v některých rostlinných tkáňových kulturách buněčné dělení. První

přirozený cytokinin byl identifikován v nezralém endospermu kukuřice (*Zea mays*) a byl nazván Zeatin (6-[4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl]-aminopurin). Zeatin a jeho deriváty byly později zjištěny i v nezralých plodech slunečnice, kořenu čekanky, kokosovém mléku aj. V současné době je známo přes 40 přirozených cytokininů (21, 22).



**Obr. 7:** Struktura kinetinu.

### 3.4.2. Struktura a aktivita cytokininů

Strukturně vycházejí přírodní cytokininy z adeninu substituovaného na aminoskupině v poloze 6 (Obr. 8). Tato konformace je podmínkou jejich biologické aktivity. Ta souvisí se strukturou substituentu na aminoskupině v poloze 6 (Tabulka 1.). Cytokininy, které mají nejvyšší aktivitu, obsahují v poloze N-6 pětiuhlíkatý isoprenoidní substituent s dvojnou vazbou v poloze C-2. Aktivitu také zvyšuje hydroxylace terminální methylové skupiny v poloze *trans*. Příkladem cytokininu s takovou konfigurací je *trans*-zeatin. Další skupina cytokininů obsahuje aromatický substituent. Patří sem především N<sup>6</sup>-benzyladenin a jeho deriváty. Přirozené cytokininy jsou odvozené od čtyř základních substitucí adeninu v poloze N-6:

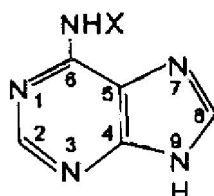
- N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adeninu
- *cis* a *trans*-zeatinu
- dihydrozeatinu
- N<sup>6</sup>-benzyladeninu

Tyto čtyři základní substituenty adeninu mohou být modifikovány:

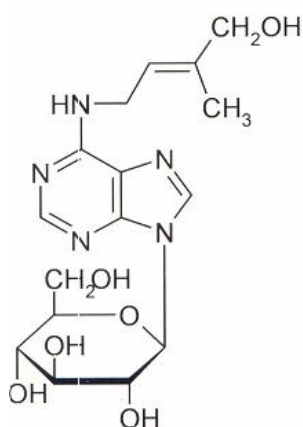
- navázáním cukerného zbytku na N-9
- navázáním cukerného zbytku na postranní řetězec
- esterifikací (N-9)- ribosidů kyselinou fosforečnou
- vazbou zbytku alaninu na N-9

Navázáním cukerného zbytku (glukózy, ribózy) na cyklický purinový dusík, a to nejčastěji v polohách N-9 a N-7, vznikají N-glykosidy (Obr. 9). Připojením cukerného zbytku (glukózy, ribózy, xylózy) nebo acetylu na postranní řetězec prostřednictvím terminálního hydroxyly vznikají O-glykosidy (Obr. 10), respektive O-acetylestery. Glykosidy jsou transportní, zásobní a inaktivní formou cytokininů. Vazba kyseliny fosforečné v poloze 5 na ribózu dává vznik ribotidům. Ribotidy jsou primární produkty biosyntézy cytokininů. Modifikace adeninového skeletu či změna počtu atomů uhlíku v postranním řetězci vede k značnému snížení až ztrátě biologické aktivity (21, 23).

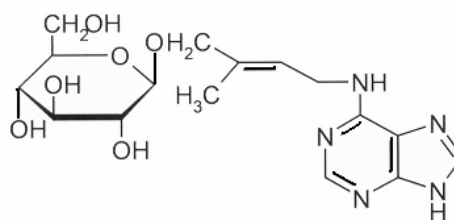
Svou chemickou povahou jsou cytokininy báze. Jejich chování závisí na hodnotě pH. Při pH pod 2 nesou celkově kladný náboj, v rozmezí pH 6 až 8 se chovají jako neutrální sloučeniny, při hodnotách pH nad 12 nesou záporný náboj. Ribosidy vystupují jako slabé báze (blokování N-9 ribózou). Ribotidy mají výraznější amfoterní charakter (přítomnost fosfátové skupiny). Cytokininové báze jsou hydrofobní sloučeniny (21).



**Obr. 8:** Struktura adeninu se substituentem v poloze N-6 (22).

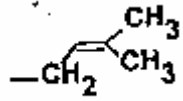
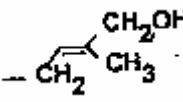
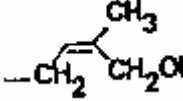
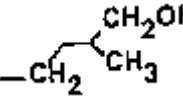
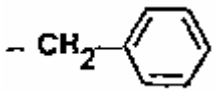
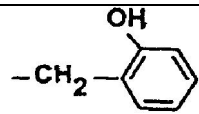
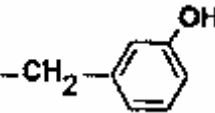


**Obr. 9:** Struktura zeatin-N<sup>9</sup>-glukosidu.



**Obr. 10:** Struktura zeatin-O-glukosidu.

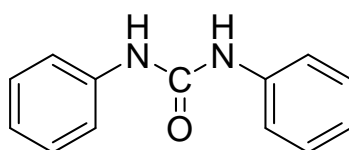
**Tabulka 1:** Struktura nevýznamnějších substituentů na aminoskupině v poloze 6 (22).

Substituent v poloze N-6	Název	Zkratka
<b>isoprenoidní</b>		
	N <sup>6</sup> -isopentenyladenin	iP
	<i>trans</i> -zeatin	Z
	<i>cis</i> -zeatin	<i>cis</i> -Z
	dihydrozeatin	DHZ
<b>aromatické</b>		
	N <sup>6</sup> -benzyladenin	BA
	N <sup>6</sup> - <i>ortho</i> -hydroxybenzyladenin	<i>o</i> OHBA
	N <sup>6</sup> - <i>meta</i> -hydroxybenzyladenin	<i>m</i> OHBA

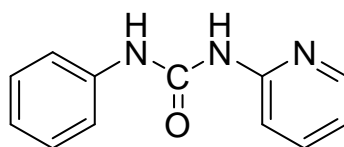
### 3.4.3. Anticytokininy, jejich struktura a využití

Některé aromatické deriváty močoviny a thiomčoviny jsou velmi aktivní v biotestech na cytokininy. Nejaktivnější jsou N,N'-difenylmočovina (Obr. 11), N-fenyl-N'-pyridylmočovina (Obr. 12), tidiazuron (Obr. 13) a jejich deriváty. Tyto sloučeniny vykazují vyšší aktivitu v biotestech než nejaktivnější adeninový cytokinin *trans*-zeatin. Cytokinin-aktivní deriváty močoviny mají podobnou molekulární geometrii jako isoprenoidní cytokininy, proto mohou být rozeznávány stejnými vazebnými místy v rostlinných buňkách a vykazují stejný mechanismus působení. Poznání vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou derivátů adeninu a

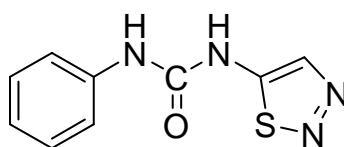
močoviny umožnilo přípravu látek působících jako antagonisté cytokininů. Anticytokininy byly získány modifikací cytokininů močovinnového typu, například nahrazením fenylového zbytku benzylem u N,N'-difenylmočoviny. Modifikací purinového skeletu cytokininů byly získány různé deriváty pyrolové. Pomocí anticytokininů se sleduje mechanismus a působení cytokininů. Prakticky se pak mohou využívat také pro zvýšení účinnosti auxinu, například při indukci tvorby adventivních kořenů (21).



**Obr. 11:** Struktura N,N'-difenylmočoviny.



**Obr. 12:** Struktura N-fenyl-N'-pyridylmočoviny.



**Obr. 13:** Struktura tidiázonu.

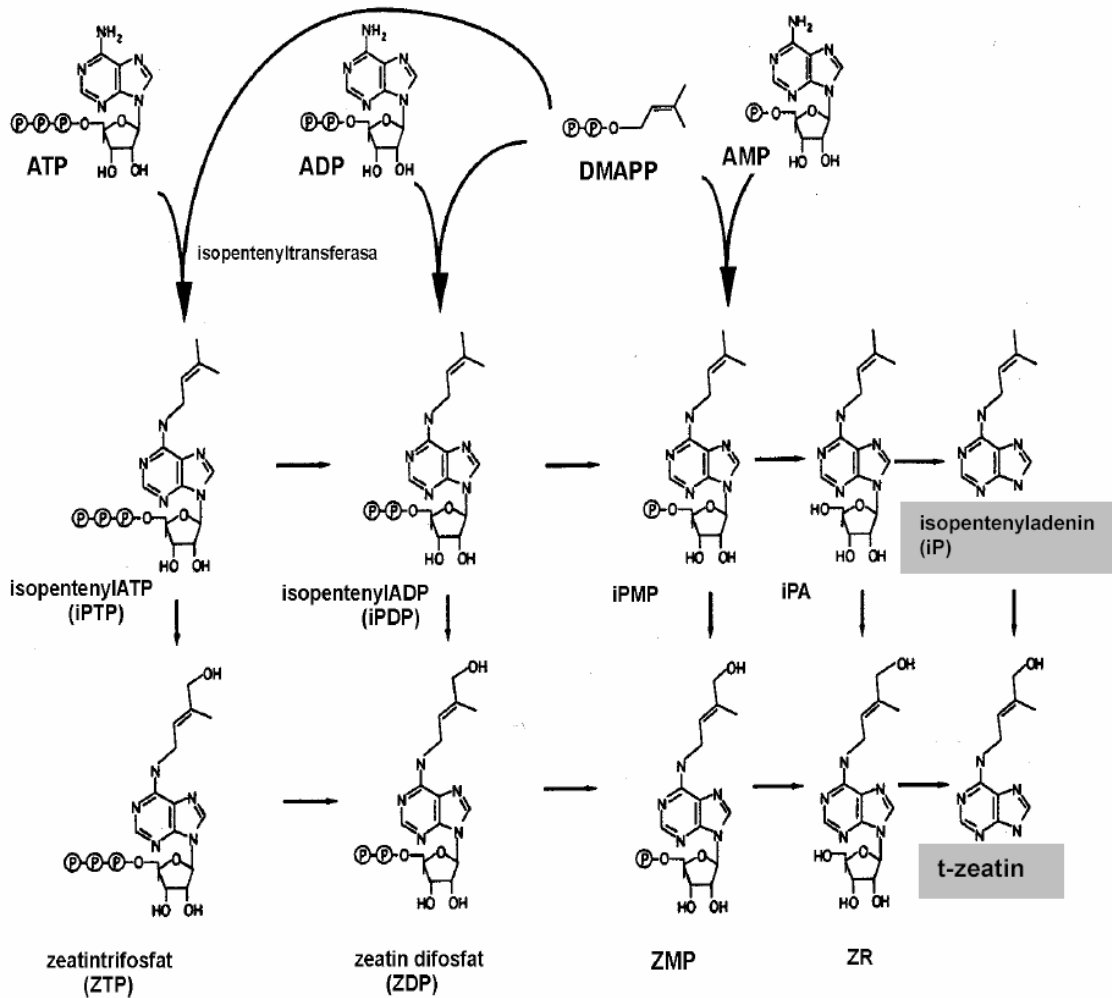
#### 3.4.4. Metabolismus cytokininů

Metabolismus cytokininů zahrnuje biosyntézu, reverzibilní přeměny postranních řetězců a reverzibilní tvorbu ribosidů a ribotidů. Tímto způsobem vzniká několik desítek více či méně aktivních cytokininů. Ireverzibilní inaktivace cytokininů se děje pomocí oxidací cytokininů (s uvolněním adeninu) nebo glykosylací na purinovém jádru (24).

### 3.4.4.1. Biosyntéza

Prvním a klíčovým krokem v biosyntéze cytokininů je reakce mezi adenosin 5'-fosfátem (ATP, ADP nebo AMP) a dimethylalylidifosfátem (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátem (HMBDP). Tato reakce je katalyzována enzymem isopentenyltransferasou. Pokud jsou substráty DMAPP a HMBDP pak isopentenyltransferasa katalyzuje syntézu nukleotid  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adeninu a nukleotid *trans*-zeatinu. Ty jsou pak dále metabolizovány na aktivní cytokininy isopentenyldenin a *trans*-zeatin. Isopentenyltransferasa vyšších rostlin je substrátově specifická, preferuje ADP nebo ATP před AMP. Naopak u mikroorganismů je upřednostňován AMP. *Trans*-zeatin je nejčastěji syntetizován trans-hydroxylací isopentenylových typu cytokininů. Tyto reakce jsou katalyzovány P450 monooxygenasou. Enzym upřednostňuje isopentenyldenosinmonofosfát (iPMP) a isopentenyldenosindifosfát (iPDP) před isopentenyldenosintrifosfátem (iPTP) (Obr. 14) (25). Část *trans*-zeatinu může být také syntetizována izomerací z *cis*-zeatinu, který je získáván z degradace tRNA obsahující *cis*-zeatin (26). Pokud jsou cytokininy jako součásti tRNA, potom se nachází vždy vedle 3'-konce antikodonu. Tato tRNA vzniká již na úrovni polynukleotidu přenesením isopentenylového řetězce na adenylový zbytek za katalytického působení  $\Delta^2$ -isopentenyl:tRNA-transferázy. Vzniklý isopentenyldenin je většinou následně modifikován hydroxylací terminální methylové skupiny za vzniku *cis*-zeatinu. Při metabolické degradaci takového tRNA se může uvolnit cytokinin (21).

Biosyntéza aromatických cytokininů, jako je benzyladenin, je zatím neznámá. Předpokládá se, že biosyntéza těchto cytokininů využívá jiné dráhy, než jaké jsou známy u isoprenoidních cytokininů. Pravděpodobně může souviset s metabolismem fenolů (26, 27).



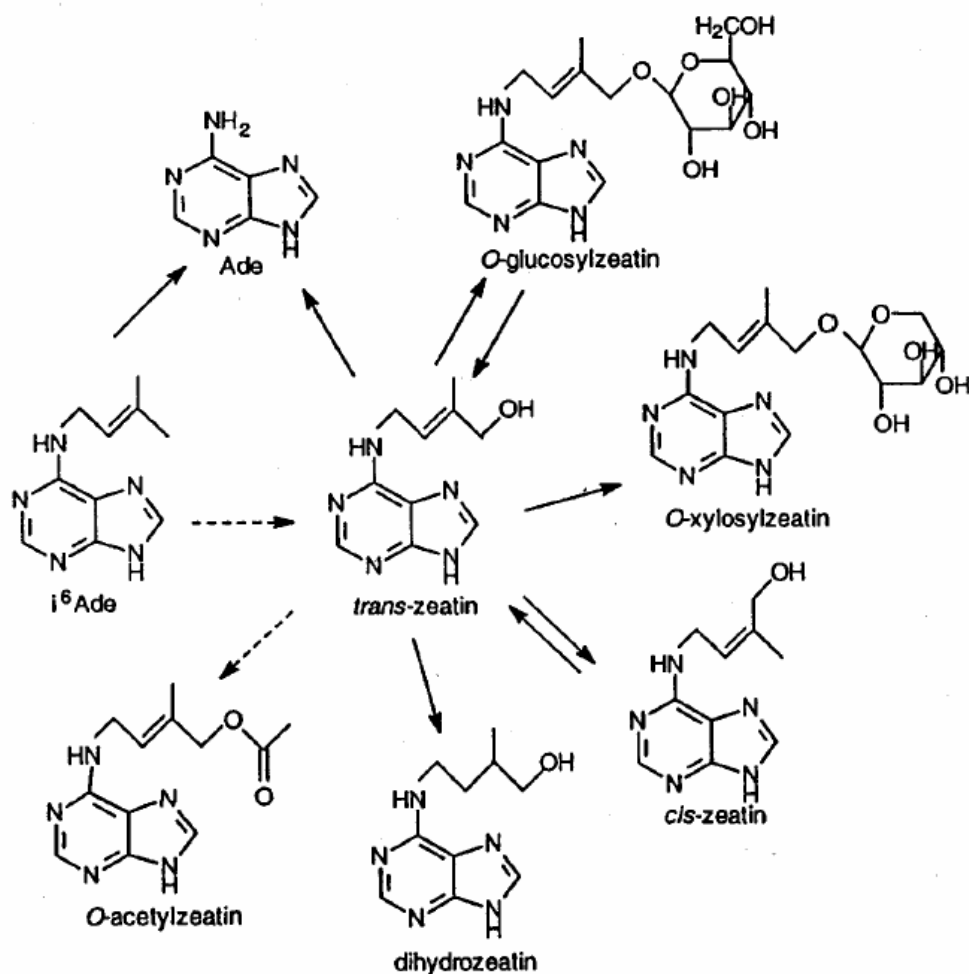
**Obr. 14:** Model biosyntézy cytokininů. Klíčovou reakcí u mikroorganismů je připojení fosforylovaného isopentenylového řetězce z DMAPP na adeninmonofosfát (AMP), kdežto u vyšších rostlin je klíčovou reakcí připojení DMAPP na adenindifosfát (ADP) nebo adenintrifosfát (ATP). Odštěpením fosfátu a ribosy vzniknou aktivní cytokininy isopentenyladenin (iP) a *t*-zeatin (24).

### 3.4.4.2. Vzájemné přeměny

Vzájemná přeměna cytokininů spočívá v pěti typech reakcí (Obr. 15):

- vzájemná přeměna bází, nukleosidů a nukleotidů
- N-glukosylace purinů a konjugace alaninu v poloze N-9
- redukce dvojné vazby postranního řetězce
- odštěpení postranního řetězce

Produkty metabolismu se liší svými vlastnostmi, z nichž je důležitá polarita. Ta rozhoduje o příjmu a translokaci metabolitů v pletivech a v buňkách. Velký význam má také přechod volných bází na nukleosidy, katalyzovaný enzymem adenosinnukleosidasa, a nukleotidy, katalyzovaný enzymem fosforibosyltransferasa. Toto pravděpodobně pomáhá regulaci koncentrace fyziologicky aktivních cytokininů v buňce (21,25). O-glukosidace je důležitým krokem v metabolismu *trans*-zeatinu. Vzniklé O-glukosidy slouží jako zásoba pro syntézu cytokininů. Mohou být snadno převedeny  $\beta$ -glucosidasami na aktivní cytokininy. O-glukosidy jsou také odolné vůči degradaci enzymem cytokininoxegenasa-dehydrogenasa (26, 27). Důležitá je také vazba glukosy na dusíkové atomy purinového skeletu v poloze 7 a 9. Dochází k nevratné fyziologické inaktivaci cytokininů. Takto se inaktivují především ty cytokininy, které nemohou být odbourány oxidativně. Jedná se o deriváty dihydrozeatinu a aromatické cytokininy (21).

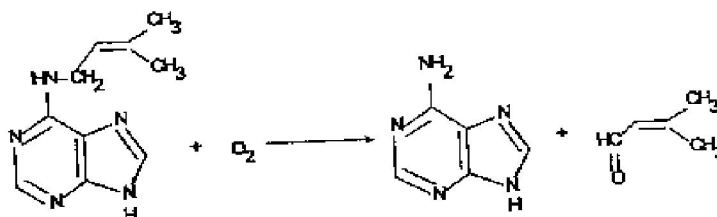


**Obr. 15:** Některé přeměny cytokininů: modifikace postranního řetězce. U většiny těchto přeměn jsou dnes známy enzymy (plné šipky) (24).



### 3.4.4.3. Degradace

Cytokiny se inaktivují nejčastěji oxidací cytokininoxidasou-dehydrogenasou (CKX). Tento enzym katalyzuje odštěpení postranního řetězce za vzniku adeninu (Obr. 16). Substrátem jsou volné cytokiny typu isopentenyladeninu, zeatinu a jejich N-glukosidy. CKX neštěpí O-glukosidy, cytokiny s nenasyceným postranním řetězcem a aromatické cytokiny. Aktivita cytokininoxidasy-dehydrogenasy je závislá na koncentraci cytokinů v buňce (21, 25).



**Obr. 16:** Oxidace N<sup>6</sup>-(Δ<sup>2</sup>-isopentenyl)adeninu. Jako produkt degradace vzniká adenin a 3-methyl-2-butenal (22).

### 3.4.5. Regulace obsahu cytokininů v buňkách

Na hladinu cytokininů v rostlinných buňkách mají vliv ostatní fytohormony, a to především auxiny, kyselina abscisová a ethylen. Akumulaci cytokininů v buňkách potlačuje zvýšená koncentrace auxinu a ethylenu. Ethylen může nepřímo urychlit působení na řadu procesů, jako je například otevírání průduchů. Hladinu cytokininů v buňkách mohou ovlivňovat i samotné cytokiny. Exogenně aplikované syntetické cytokiny zvyšují obsah přirozených cytokininů v rostlinných buňkách. Na biosyntézu cytokininů má také vliv vnější prostředí, například: množství živin, kvalita a délka ozáření, obsah kyslíku, stresové faktory (sucho, nevhodné pH půdy), teplota, napadení chorobami a škůdci aj. (21).

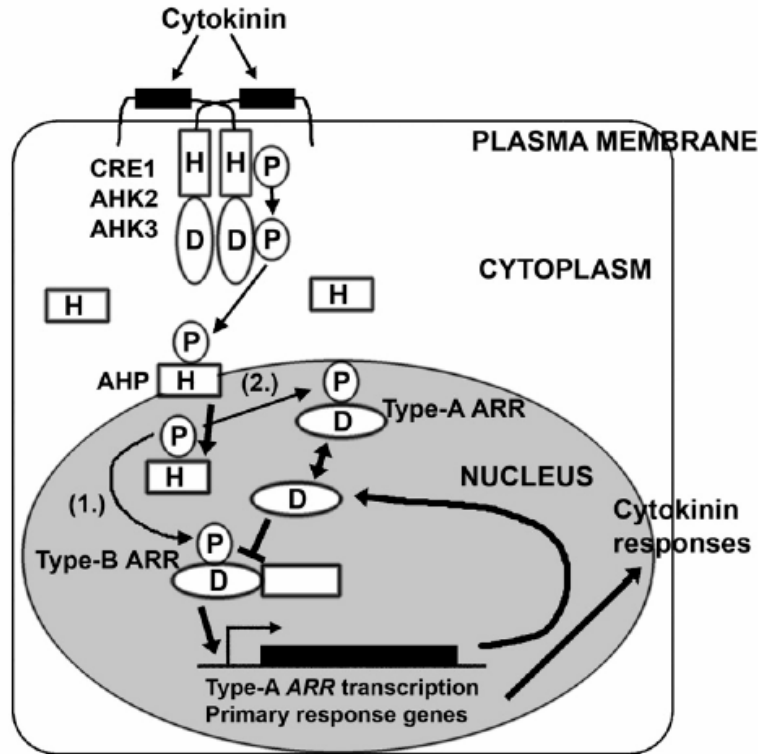
### 3.4.6. Transport cytokininů

Cytokiny se syntetizují převážně ve vzrostných vrcholech kořenů. Odtud jsou vzestupným transpiračním proudem (xylémem) vedeny do nadzemní části rostlin, především do listů a pupenů. Cytokiny se také hromadí v semenech. V nadzemních částech rostliny přecházejí do floému a mohou být transportovány do jiných orgánů.

Transport cytokininů v xylému i floému je fotoperiodicky regulován. Tma zvyšuje transport cytokininů. Pro příjem cytokininů rostlinnými buňkami je důležitá jejich molekulární forma. Lipofilní cytokininové báze jsou přijímány velmi dobře, zatímco pro polární glykosidy a zejména ribotidy nejsou rostlinné membrány permeabilní. Ribotidy a O-glykosidy mohou být metabolicky přeměněny na báze, a proto představují zásobní metabolickou hotovost cytokininů v buňce. Zásobní formou mohou být i cytokininové báze ve vakuole s nízkým pH. Zdrojem přirozených cytokininů mohou být nejen kořeny, ale i vyvíjející se embrya a pupeny. Distribuce a působení je pak spíše lokální (21, 24).

### 3.4.7. Mechanizmy účinku cytokininů

Model signální dráhy byl studován u *Arabidopsis* (Obr. 17). Cytokiny jsou rostlinnou buňkou rozpoznány CHASE doménou (Cyclase/Histidine kinase-Associated Sensing Extracellular domain), která zahrnuje tři cytokininové receptory z CRE-rodiny histidinových kinas. U *Arabidopsis* jsou to receptory AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4. Vazba cytokininu vede k autofosforilaci histidinového konce cytokininového receptoru. Fosfátová skupina je intramolekulárně přenesena na asparaginový konec. Z cytokininového receptoru je fosfátová skupina přenesena na histidinový konec AHP proteinu. Fosforilovaný AHP protein se přesune do jádra a přeneše fosfát na asparaginový konec A-typu nebo B-typu ARR přenašeče. B-typ ARR přenašečů jsou transkripční faktory nacházející se v jádře. Vážou se specificky na sekvenci GATCTT, která se nachází v promotoru genů, kódujících mimo jiné i A-typ ARR přenašečů. A-typ ARR přenašečů pak funguje jako negativní zpětná vazba cytokininové signalizace. Některé ARR receptory fungují jako signální molekuly i pro jiné signalizační dráhy, jako například pro ethylen nebo auxiny (25, 26, 28).



Obr. 17: Model signální dráhy cytokininů v *Arabidopsis* (26).

### 3.4.8. Úloha cytokininů v rostlinách

Cytokiny stimuluji buněčné dělení. Aktivují geny buněčného cyklu při přechodu z fáze G2 do mitózy a regulují také (spolu s auxinem) přechod z G2 do fáze replikace DNA. V některých pletivech cytokiny stimuluji objemový růst buněk.

Cytokiny snižují apikální dominanci. Mohou probudit spící úžlabní pupeny nebo urychlit růst v nepřilíš aktivních pupenech. Cytokinin zvyšuje v buňkách pupenu transport iontů. Zvyšuje také množství auxinu v pupenech. Mobilizace sinků za součinnosti obou těchto fytohormonů umožňuje větší přísun živin a dalších regulačních látek do pupenů a podporuje růst pupenů.

Interakce cytokininu s auxinem v tkáňových kulturách umožňuje regeneraci celých rostlin z izolovaných částí. Zvýšený poměr cytokinin/auxin v živné půdě vyvolává překotnou regeneraci pupenů a brání tvorbě kořenových vrcholů.

Cytokiny zpomalují degradaci bílkovin a destrukci chloroplastů. Prodlužují životnost chloroplastů a oddalují stárnutí listů. Cytokiny v nadměrném množství zpomalují ontogenezi a oddalují stárnutí celých rostlin (24).

Cytokiny spolu s ostatními fytohormony ovlivňují řadu dalších procesů v rostlinách. Například ovlivňují enzym nitrát reduktasu a tím obsah dusíku v rostlinách (29). Ovlivňují také celkovou distribuci živin v rostlině (30), stimulují diferenciaci plastidů, tvorbu chlorofylu a škrobu a zvyšují toleranci vůči extrémním podmínkám prostředí (19).

### **3.4.9. Praktické využití cytokininů**

Z praktických aplikací cytokininů je nejdůležitější jejich využití v rostlinných biotechnologiích jako složek kultivačních médií při udržování explantátových kultur a při regeneraci rostlin *in vitro*. Řízená regenerace rostlin umožňuje získání viruprostého rostlinného materiálu nebo odvození rostlin z transformovaných a haploidních buněk. Exogenní aplikace cytokininů se využívá pro stimulaci větvení okrasných rostlin za účelem zvýšené tvorby květů, semen, nebo produkce řízků matečnými rostlinami. V kombinaci s gibereliny se používají ke tvarování plodů některých odrůd jablek. Aplikace cytokininů u obilovin v raných fázích vývoje zvyšuje odnožování. Cytokininů se využívá také při zvyšování odolnosti rostlin vůči stresovým podmínkám. Působení cytokininů způsobuje zpomalení stárnutí pletiv. Tohoto se využívá při prodlužování skladovatelnosti oddělených rostlinných částí, především řezaných květů a řízků. Cytokiny rovněž prodlužují období fotosyntetické produktivity rostlin a tím zvyšují produkci biomasy (21).

### **3.4.10. Metody stanovení cytokininů**

První používané metody stanovení cytokininů byly založeny na biotestech kalibrovaných pomocí syntetických standardů. Jeden z vysoce citlivých a specifických biotestů je test založený na stimulaci růstu kalusového pletiva tabáku (21).

Cytokiny se v rostlinách vyskytují v nepatrných množstvích, řádově pikomolárních a femtomolárních, a jejich kvalitativní a kvantitativní stanovení tak vyžaduje vysokou citlivost. Při použití analytických metod je také problém v tom, že v buňkách je mnoho strukturně příbuzných látek. Před vlastním stanovením se musí vzorek vyčistit (21).

Jednou z metod čištění je extrakce vzorku v Bieleskiho roztoku, nebo v 80% metanolu. Použití anexového iontoměníče, např. dietylaminoethylcelulózy (DEAE-celulózy) nebo dietylaminoethylsephadexu (DEAE-Sephadex), umožňuje odstranit nečistoty nesoucí záporný náboj a ribotidy od cytokininových bází ribosidů a glukosidů. Ribosidy, glukosidy a báze lze zachytit na koloně katexového měniče (fosfocelulózy) a po vymytí nečistot je vytěsnit roztokem hydroxidu amonného (23).

K analýzám cytokininů se také používají imunoanalytické metody založené na využití specifických protilátek připravených proti stanovovanému cytokininu. Protilátky, připravené jako konvenční antiséra, jsou vysoce citlivé a našly využití především při detekci a kvantifikaci jednotlivých cytokininů metodami ELISA a RIA. Při použití v imunoafinitní chromatografii, pro izolaci všech cytokininů ze vzorku, je nutné použít směs specifických protilátek schopných vázat jednotlivé cytokininy (31).

Jako poslední krok čištění vzorku se často používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která kromě odstranění nečistot umožňuje také separaci jednotlivých cytokininů a jejich následné stanovení. Pokud se jedná o velmi čisté vzorky, mohou se cytokininy stanovit na základě absorpce UV záření. Pro kvalitativní i kvantitativní stanovení se také využívá hmotnostní spektrometrie. Je to vysoce citlivá a účinná identifikační metoda, umožňuje sledovat koncentrační hladiny cytokininů na úrovni femtomolů a nižší. Pro sledování výtěžku celkového purifikačního a separačního kroku se také používají izotopicky značené cytokininy přidávané do vzorku jako interní standardy (21).

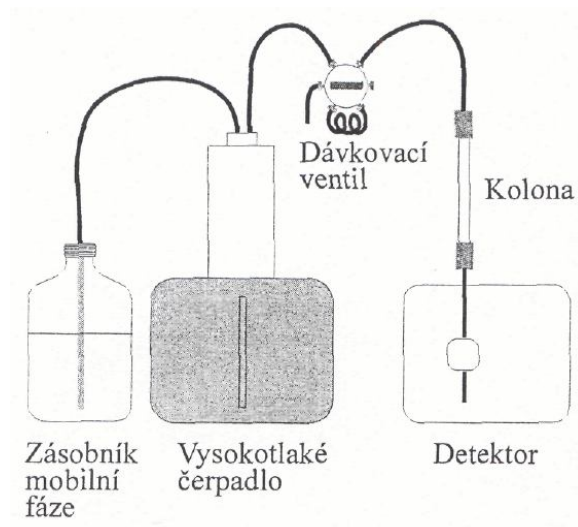
### 3.4.10.1. Chromatografie

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek. Chromatografie se rozděluje podle povahy mobilní fáze na plynovou a kapalinovou. Mobilní fáze je fáze, která unáší separované látky přes fázi stacionární, která je lokalizována v koloně (resp. ve vrstvě). Stacionární fáze je nepohyblivou složkou, má specifické vlastnosti, které zprostředkovávají interakci s dělenými látkami. Na základě typů vzájemných interakcí je možno klasifikovat jednotlivé chromatografické metody:

- **adsorpční** – k dělení součástí analyzované směsi dochází v důsledku jejich rozdílné adsorpce na stacionární fázi.

- **rozdělovací** – její princip spočívá v rozdílném rozdělení plynných nebo kapalných součástí směsi mezi dvě spolu nemísitelné kapalné fáze, případně mezi kapalnou a plynnou fází. Jedna z těchto fází je stacionární a druhá je mobilní.
- **na měničích iontů** – analyzovaný vzorek se vede přes kolonu naplněnou zrnitými anorganickými či organickými polyelektrolyty, které jsou prakticky nerozpustné ve vodě a běžných rozpouštědlech. Obsahují aktivní skupiny schopné zachycovat určité ionty a vyměňovat je za jiné. Takovéto látky se nazývají ionexy.
- **gelová** – složky vzorku se rozdělují podle své velikosti při průchodu pevnou pórovitou fází.
- **afinitní** - je založena na biochemických interakcích, jako jsou interakce antigen-protilátka, enzym-substrát, hormon-receptor.

Pro separaci cytokininů se používá **vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**. Jedná se o pokročilou a instrumentálně náročnou techniku kapalinové chromatografie. Vysoké účinnosti separačního procesu je dosaženo použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze, a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze (řádově ml/min.) je nutno aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa. Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí, kterými postupně prochází mobilní fáze (kapalina) se vzorkem (Obr. 18). Mobilní fáze je vedena ze zásobníků přes odplyňovač do směšovacího ventilu. Zde se jednotlivé proudy mobilní fáze mísí podle daného programu. Vzorek je dávkován do toku mobilní fáze na začátek chromatografické kolony. Ta je většinou zhotovena z nerezové oceli. Kolona je naplněna sorbentem (stacionární fází). Při výstupu z kolony je připojen detektor, který detekuje separované látky vycházející z kolony. Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich specifických vlastností, kterými se tyto látky liší od mobilní fáze. Při analýze cytokininů se jako detektor používá buď spektrofotometrický detektor nebo hmotnostní spektrometr. Data, která jsou získána z detektoru, jsou zpracována na počítači (32, 33).

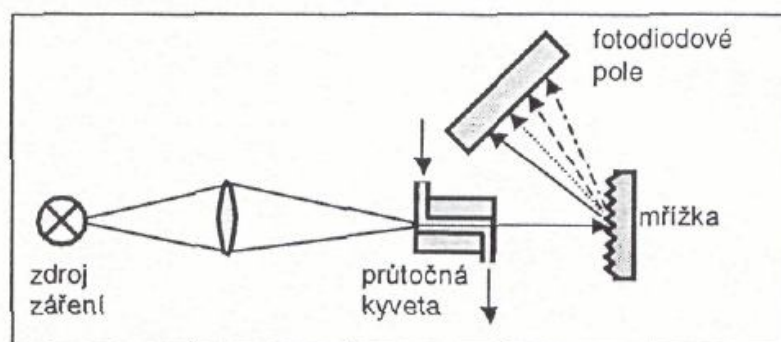


**Obr. 18:** Základní schéma kapalinového chromarografu (32).

V kapalinové chromatografii se nejčastěji používají dva typy detektorů:

o **Spektrofotometrický detektor**

Schéma spektrofotometrického detektoru je znázorněno na obrázku 19. Při měření se sleduje úbytek záření po průchodu absorbující látky (analytu) průtokovou celou. Díky tomuto je možné detekovat určitou látku a stanovit její koncentraci. Většina rozpouštědel, která se používají v kapalinové chromatografii jako mobilní fáze, neabsorbují viditelné a ultrafialové záření. Proto se nejčastěji využívá detekce v této oblasti (33). Pro analýzu cytokininů se používá detekce v ultrafialové oblasti (22).

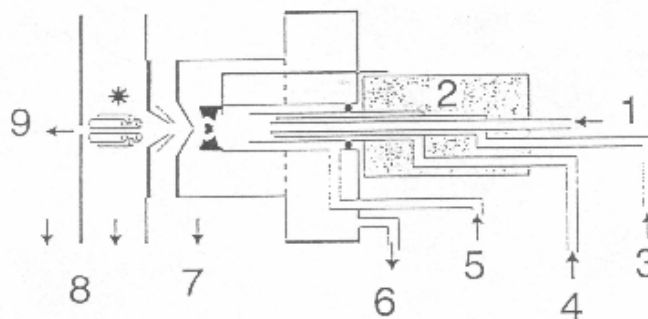


**Obr 19:** Schéma spektrofotometrického detektoru (34).

o **Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie**

Podstatou hmotnostní spektrometrie je separace molekulových fragmentů analyzované látky, které vznikly ionizací molekul nevratným odštěpením valenčních elektronů v magnetickém poli (Obr. 20). Pro separaci je rozhodující veličinou efektivní hmotnost. Ta závisí na hmotnosti iontu, jeho elementárním náboji a nábojovém čísle.

Analyzovaný vzorek je v ionizační komůrce vystaven vlivu iontového zdroje. Vzniknou tak molekulové ionty a fragmenty. Jejich proud se vlivem silného elektrického pole urychlí a je dále veden jako tenký svazek letících částic do homogenního magnetického pole. Jednotlivé částice se v něm rozliší podle svých efektivních hmotností a dochází k zakřivení drah. Částice stejných efektivních hmotností vychází z magnetického pole jako svazky zaostřené na stejné místo detektoru. Intenzita signálu je úměrná počtu dopadlých částic. Záznamem signálu vznikne tzv. hmotnostní spektrum. V současné době je velice časté použití ionizace v elektropray za atmosférického tlaku, kdy vznikají převážně jednoduché molekulární ionty  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$ , které jsou následně detekovány v kvadrupólovém analyzátoru (35).



**Obr. 20:** Schéma hmotnostního spektrometru.

1. Výstup z HPLC
2. Sonda
3. Zmlžující plyn
4. Nosný plyn
5. Sušící plyn (vstup)
6. Sušící plyn (výstup)
7. Rotační pumpy
8. Turbomolekulární pumpy
9. Hmotnostní analyzátor (36)



## **4. Cíl práce**

Cílem diplomové práce bylo sledování efektu elicitorů na syntézu fytohormonů cytokininů u rostlinných kalusů tabáku. Elicitory jsou látky vyvolávající obrannou reakci u rostlin. V práci byly použity elicitory ergosterol a cryptogein. Ergosterol je nízkomolekulární elicitor pocházející z plasmatické membrány hub. Byl přidáván ve formě komplexů s cyklodextrinem a jeho efekt byl srovnáván s cholesterolem, který reakci nevyvolává. Cryptogein je malý protein, který byl izolován z houby *Phytophthora cryptogea* a indukuje obrannou reakci v buňkách tabáku. Práce byla prováděna na Ústavu biologie rostlin MZLU v Brně. Koncentrace cytokininů byla studována zavedenými metodami, které se zde používají. Pracoviště Ústavu biochemie poskytovalo metodiku práce s elicitory.

## 5. Materiál a metody

### 5.1. Materiál

Byly využity kultury buněčné suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* linie BY-2 a var. Xanthi kultivované na médiu Murashige & Skoog. Buněčná suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* linie BY-2 v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce Kühner Shaker, typ: LT-W. při  $27 \pm 1$  °C a  $135 \text{ ot. min}^{-1}$  ve tmě (Obr. 21). Buněčná suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* var. Xanthi v 250 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce Heidolph UNIMAX 1010 při  $27 \pm 1$  °C a  $135 \text{ ot. min}^{-1}$  na světle (Obr. 22). Pasáž byla prováděna po 3 až 4 dnech v poměru 1:10 u tabáku linie BY-2 a 1:6 u tabáku var Xanthi.



Obr. 21: *Nicotiana tabacum* linie BY-2.



Obr. 22: *Nicotiana tabacum* var. Xanthi.

### 5.2. Příprava média

Pro kultivaci tabáku bylo použito tekuté médium Murashige & Skoog. Složení médií viz tabulka 2. a 3.

Nejdříve byly v destilované vodě rozpuštěny všechny makro a mikro prvky a sacharosa, pH bylo upraveno pomocí KOH na pH metru Schott CG 842 na hodnotu 5,7 – 5,9. Následně byla tato část média sterilizována v autoklávu Tuttnauer 3870 EA při teplotě 121°C a přetlaku 100 kPa po dobu 30 minut.

Ostatní složky média byly rozpuštěny v destilované vodě, pH bylo upraveno na hodnotu 5,7 – 5,8. Tato část média byla sterilizována membránovou filtrací (Whatman Puradisc 25 AS 0,2 µm). Po ochlazení autoklávované části média

na 45-50 °C byly obě části média sterilně smíchány. Pro přípravu média a roztoků byla použita destilovaná voda kvality 18,2 MΩ (Watek IWA 20).

**Tabulka 2:** Složení tekutého média Murashige & Skoog na tabák linie BY-2.

<b>Makro prvky:</b>	navážka v mg.l <sup>-1</sup>	<b>Mikro prvky:</b>	navážka v mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	332,02	CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200,00	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025
KNO <sub>3</sub>	1900,00	FeNa EDTA	36,70
MgSO <sub>4</sub>	180,54	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	KI	0,83
		MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16,90
		NaMo <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25
<b>Sacharosa</b>	30 000	ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,60
<b>Vitamíny:</b>			
glycin	2,00		
inositol	100,00		
kys. nikotinová	0,50		
pyridoxin	0,50		
thiamin	0,10		
2,4 D	0,20		

**Tabulka 3:** Složení tekutého média Murashige & Skoog na tabák var.Xanthi.

<b>Makro prvky:</b>	navážka v mg.l <sup>-1</sup>	<b>Mikro prvky:</b>	navážka v mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	332,02	CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,025
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025
KNO <sub>3</sub>	1900,00	FeNa EDTA	36,70
MgSO <sub>4</sub>	180,54	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	KI	0,83
		MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16,90
		NaMo <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25
<b>Sacharosa</b>	30 000	ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,60
<b>Vitamíny:</b>			
glycin	2,00		
inositol	100,00		
kys. nikotinová	0,50		
pyridoxin	0,50		
thiamin	0,50		
pantothenát Ca	3,00		
kys. folová	0,50		
biotin	0,05		
glutamin	200,00		
2,4 D	0,18		
BAP	0,11		

### **5.3. Založení pokusu**

Kultura byla ředěna v poměru 1:10 u tabáku linie BY-2 a 1:6 u tabáku var. Xanthi. Z naředěné kultury bylo pipetováno 20 ml do sterilních 50 ml Erlenmeyerových baněk. Do kultury pak byla přidána určitá koncentrace elicitoru. Veškerá manipulace s kulturou byla prováděna se sterilními pomůckami ve sterilním prostředí v boxu.

### **5.4. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku**

Při založení pokusu bylo z naředěné kultury odebráno 20 ml buněčné suspenze tabáku. Buněčná suspenze tabáku byla zfiltrována dosucha přes fritu. Buňky tabáku, které zůstaly na fritě byly zváženy na vahách KERN 440-33 a tím stanovena jejich hmotnost. Po určité době kultivace, byla kultura tabáku v 50 ml Erlenmeyerových baňkách zfiltrována a zvážena. Tím byla určena hmotnost buněk tabáku na konci pokusu. Pro stanovení přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku byla odčítána hmotnost buněk tabáku, které byly odebrány při založení pokusu od hmotnosti buněk tabáku, které byly odebrány a zfiltrovány na konci pokusu.

### **5.5. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA**

Možnost rozlišit mrtvé a živé buňky je založena na kombinaci ovlivnění membránové integrity a některé z metabolických cest. Mrtvé buňky se barví s využitím změn v membránové integritě, kdy použité barvivo prochází pouze přes porušenou plasmatickou membránu. U živých buněk se používá barvička, která se do buňky dostává aktivním transportem přes neporušenou cytoplazmatickou membránu (37).

Pro stanovení životnosti buněk bylo využito barvení buněčné suspenze fluorescenčními barvivy - propidium jodidem (PI) a fluoresceindiacetátem (FDA). Propidium jodid je propouštěn přes cytoplazmatickou membránu dovnitř buňky a způsobuje ve fluorescenčním mikroskopu v případě mrtvé buňky červené fluorescenční zbarvení. Fluoresceindiacetát je v živých buňkách štěpen na octan a fluorescein, který

vydává zelené fluorescenční zbarvení. Pozorování bylo prováděno pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu. Celková životnost je pak daná počtem živých buněk v preparátu (38).

Pro vlastní stanovení bylo odebráno 50  $\mu$ l suspenze tabáku. K suspenzi bylo přidáno: 10  $\mu$ l propidium jodidu a 3  $\mu$ l fluoresceindiacetátu. Vše se promíchalo a po 1 minutě inkubace bylo možné připravit mikroskopický preparát. Pozorování bylo prováděno pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus AX 70 při zvětšení 10 x 10. Pro pozorování bylo využito filtru WU, excitace při vlnové délce 330 – 385 nm. Při sledování preparátů byla pořízena jejich fotodokumentace digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-4040 ZOOM.

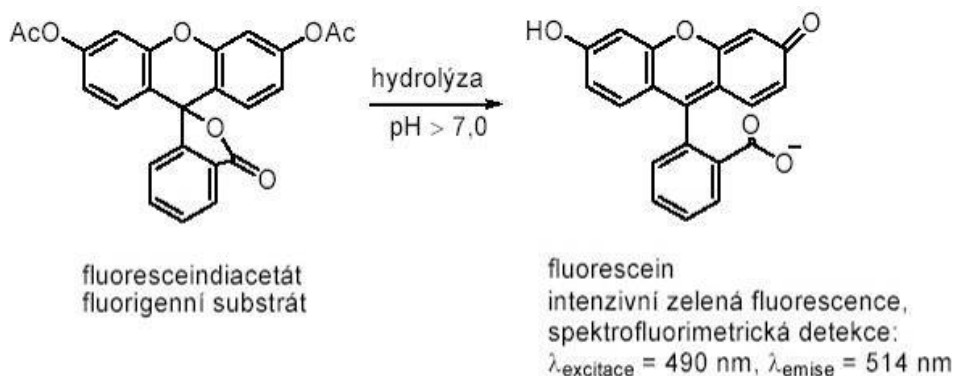
## **5.6. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteraz**

Esterasy jsou enzymy, které se účastní řady biochemických dějů v buňkách např: signální procesy, energetický metabolismus, výstavba buněčné stěny, atd. Jsou markerem buněčné viability. Aktivita intracelulárních esteraz v buněčné suspenzi závisí pouze na počtu živých buněk (39, 40).

Stanovení esteraz je založeno na fluorimetrické detekci produktů hydrolýzy fluoresceindiacetátu (Obr. 23). Fluoresceindiacetát hydrolyzuje jak působením esteraz, tak i samovolně. Aby bylo možno vypočítat „čistou enzymovou hydrolýzu“ odečtením blanku, je nutné provést všechny inkubace ve stejném čase. Protože po porušení celistvosti buněk dochází k postupné degradaci buněčného obsahu působením lytických enzymů, které snižují výtěžek esteraz, musí se celá izolace provádět na ledové lázni a po co nejkratší dobu (39, 40).

Odebrané vzorky, které byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při – 80 °C, byly po rozmrznutí doplněny na 1 ml 1 M fosfátovým pufrem a bylo přidáno 10  $\mu$ l 100 mM DTT. Následně byla suspenze homogenizována 3 minuty v homogenizátoru ULTRA-TURRAX T8. Vše bylo prováděno v ledové lázni, aby docházelo k co nejmenší degradaci esteráz. Po homogenizaci byl vzorek vložen na 1 minutu do ultrazvukové lázně (sonikátor-TRANSSONIC T 310). Následovala centrifugace při 14000 G a teplotě 4 °C na centrifuze Jouan MR 22. Po 15 minutách centrifugace bylo ze vzorku odebráno

500  $\mu$ l supernatantu a vzorek byl opět umístěn do ledu. Takto připravený vzorek bylo možné použít k vlastnímu měření. Na jedno měření bylo možné zpracovat 5 vzorků. Ke každému vzorku byly dělány tři duplikáty. Přesně po jedné minutě bylo pipetováno 10  $\mu$ l 500  $\mu$ M fluoresceindiacetátu a 40  $\mu$ l roztoku do předem připravených mikrozkušavek s 950  $\mu$ l 1 M fosfátového pufru, který byl přehřátý na 45 °C. Vše bylo promícháno. Po uplynutí 15 minut inkubace bylo z mikrozkušavky odebráno 10  $\mu$ l vzorku a bylo napipetováno do kyvety s 2 ml 5 mM fosfátového pufru. Vše bylo promícháno a na spektrofluorimetru Shimadzu RF-551 byla změřena fluorescence při excitaci 490 nm a emisi při 514 nm. Fluorescence byla přepočítána na g rostlinného materiálu a na % živých buněk. Kdy 100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu (40).



**Obr. 23:** Štěpení fluoresceindiacetátu. Fluoresceindiacetát je esterásmi rozštěpen na octan a fluorescein, který vydává zelené fluorescenční zbarvení (40).

## 5.7. Stanovení celkového obsahu cytokininů v buněčné suspenzi tabáku pomocí HPLC s MS detekcí.

Pro izolaci cytokininů byla použita kyselá izolace cytokininů. Jedná se o extrakci 4 % kys. trichloroctovou. Jako poslední krok čištění vzorku byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi, která kromě odstranění nečistot umožňuje také separaci jednotlivých cytokininů a jejich následné stanovení. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr. V HPLC na reverzní fázi se jednotlivé látky elují

postupně v pořadí snižující se polaritu, tzn. že v tomto chromatografickém systému byly látky polární eluovány z kolony dříve než látky méně polární, případně nepolární.

Odebrané vzorky, které byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , byly zlyofilizovány po dobu minimálně 24 hodin. Ke zlyofilizovanému vzorku bylo přidáno 1,5 ml 4 % kys. trichloroctové. Po hodině třepání následovala centrifugace na centrifuze JANETZKI K 23 při 1600 G. Po 15 minutách centrifugace bylo odebráno 400  $\mu\text{l}$  supernatantu a upraveno pH na pH metru inoLab pH Level 2 pomocí 2 M  $\text{NH}_4\text{OOC}$  na hodnotu 2,0. Takto zpracovaný vzorek byl připraven k analýze pomocí HPLC. Do vlastní analýzy byl vzorek po izolaci uchováván při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

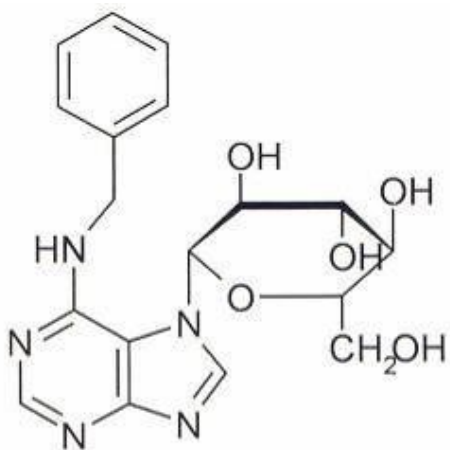
Analýza izolovaných vzorků cytokininů pomocí HPLC-MS byla provedena ve Fyziologické laboratoři Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendlovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Analýzu prováděl pověřený odborný pracovník laboratoře.

Metodou HPLC na reverzní fázi byly separovány jednotlivé cytokininy a jejich deriváty pro dané chromatografické podmínky:

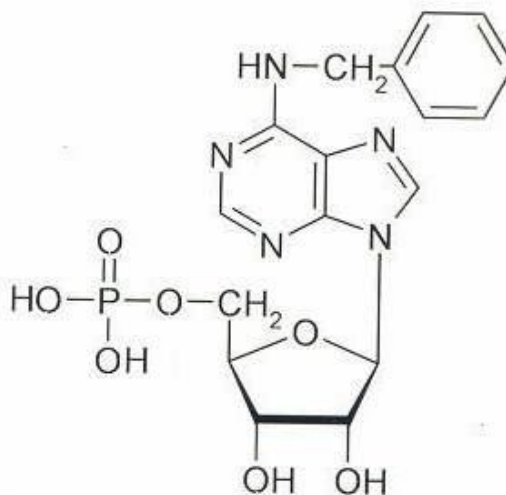
- **kolona:** Aquasil C18, délka 250 mm, průměr 2 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ;
- **mobilní fáze:** A = MeOH, B = HCOOH;
- **gradientová eluce:** postupné zvyšování koncentrace složky A v mobilní fázi a to tak, že do 3 min. obsahuje 28% A, do 11 min. 40% A, do 16 min. 80% A, a do 20 min. 80% A;
- **průtoková rychlost:** 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ ;
- **dávkovaný objem:** 20  $\mu\text{l}$ ;
- **hmotnostní detekce v +SIM módu.**

V HPLC na reverzní fázi se jednotlivé látky eluují postupně v pořadí snižující se polaritu, tzn. že v tomto chromatografickém systému byly látky polární eluovány z kolony dříve než látky méně polární, případně nepolární.

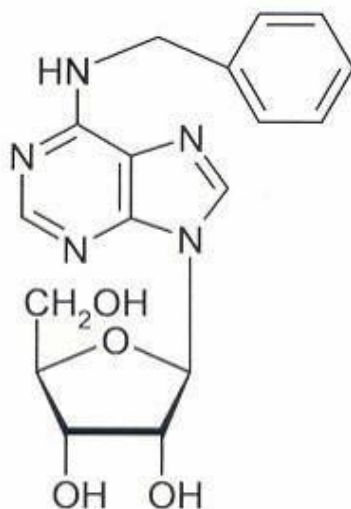
Byly detekovány tyto cytokininy 7G BA (Obr. 24), 9R-MP BA (Obr. 25), 9R BA (Obr. 26).



**Obr. 24:** Benzyladenin-7-glukosid.



**Obr. 25:** Benzyladenosin-5-monofosfát.



**Obr. 26:** Benzyladenin-9-ribosid.



## **6. Výsledky**

### **6.1. Vliv elicitoru ergosterolu na tabák linie BY-2**

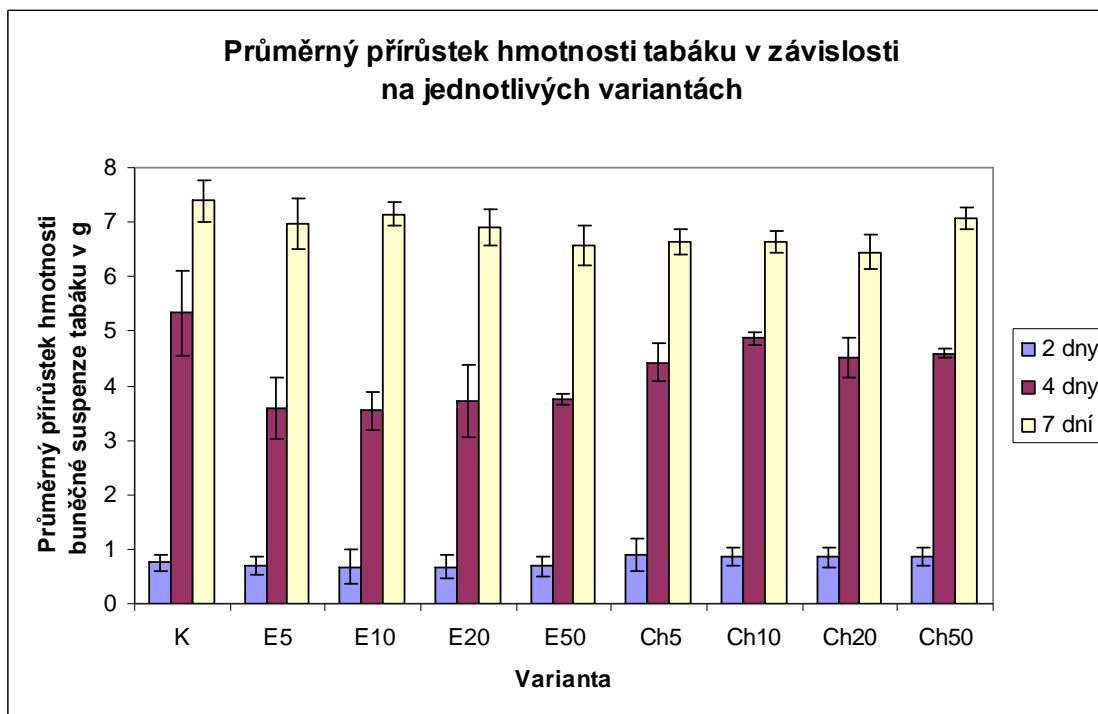
Byl zkoumán vliv elicitoru ergosterolu na kulturu buněčné suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* linie BY-2. Suspenze (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce při  $27 \pm 1$  °C a  $135 \text{ ot.min}^{-1}$  ve tmě. Ke kultuře byl přidán ergosterol v koncentracích 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM. Jako kontrola byl použit cholesterol ve stejných koncentracích jako ergosterol. Ergosterol i cholesterol byly rozpuštěny v roztoku pomocí 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinu. Vzorky byly odebírány po 2, 4 a 7 dnech. Byl stanovován průměrný přírůstek hmotnosti buněčné suspenze tabáku. Dále životnost pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteraz a barvením fluorescenčními barvivy PI a FDA. Stanovení cytokininů nebylo prováděno, protože jejich koncentrace ve vzorcích byla pod detekcí přístroje. Pokus byl opakován třikrát.

#### **6.1.1. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku linie BY-2**

Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách je znázorněn v grafu 1.

Po dvou, čtyřech ani sedmi dnech kultivace nebyly vidět žádné výraznější rozdíly v průměrném přírůstku hmotnosti mezi kontrolními variantami a variantami s ergosterolem.

**Graf 1:** Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách. (K-kontrola bez cholesterolu, E5-5 nM ergosterol, E10-10 nM ergosterol, E20-20 nM ergosterol, E50-50 nM ergosterol, Ch5-5 nM cholesterol, Ch10-10 nM cholesterol, Ch20-20 nM cholesterol, Ch50-50 nM cholesterol). Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



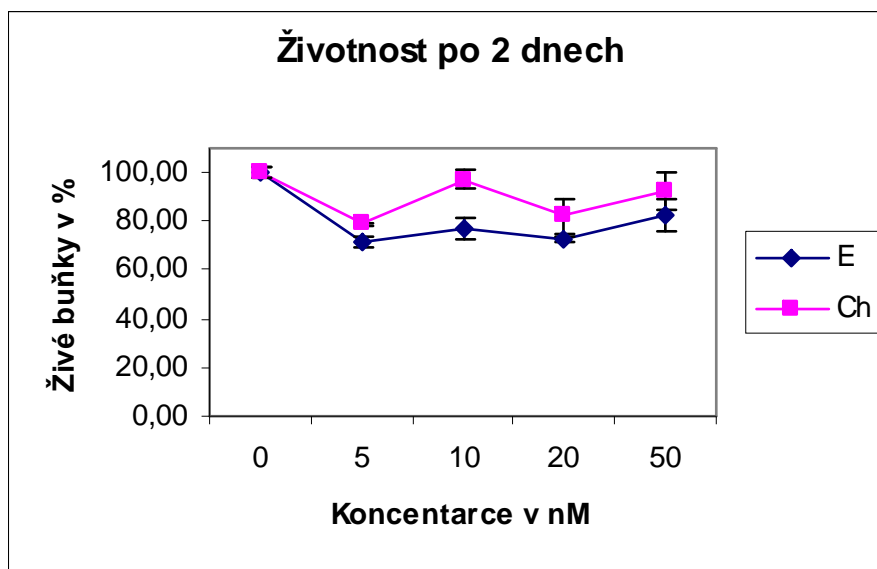
### 6.1.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku linie BY-2 pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteraz

Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou, čtyřech a sedmi dnech kultivace znázorňují grafy 2, 3 a 4.

Po dvou, čtyřech ani sedmi dnech kultivace nebyly vidět žádné výraznější rozdíly v životnosti mezi kontrolními variantami a variantami s ergosterolem.

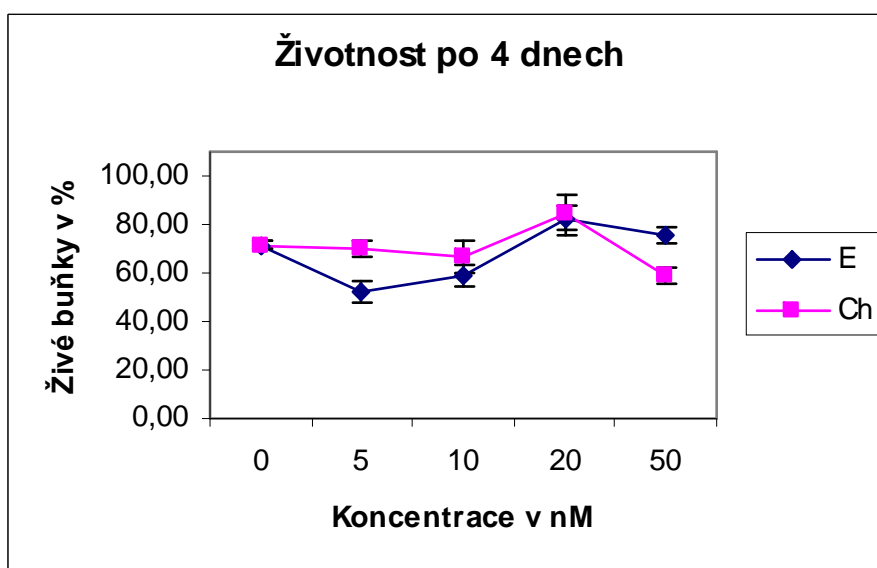
**Graf 2:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou dnech.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



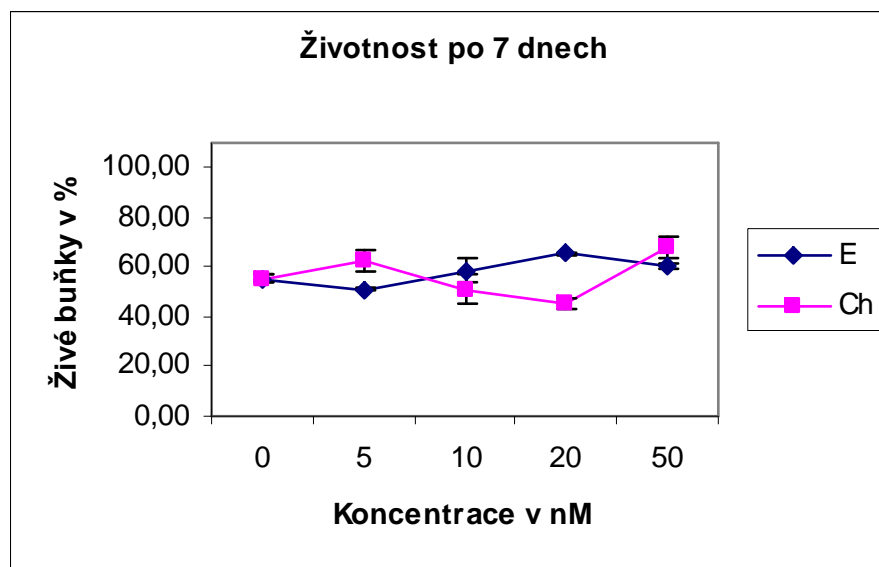
**Graf 3:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po čtyřech dnech.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



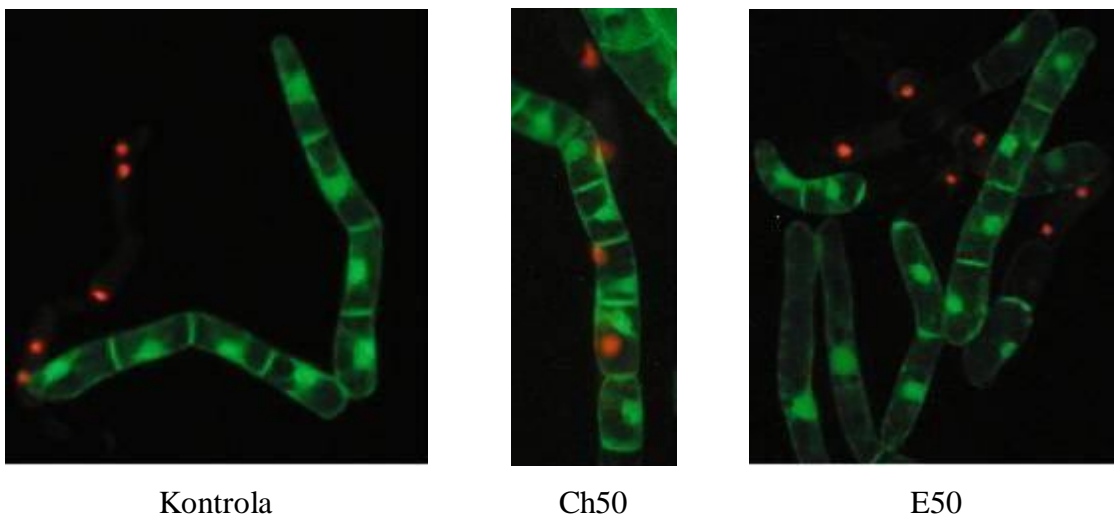
**Graf 4:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po sedmi dnech.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



### 6.1.3. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku linie BY-2 pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA

Životnost byla u jednotlivých variant stanovována také pomocí barvení fluorescenčními barvivy. Na obrázcích 27, 28 a 29 je vyfocena kontrola, kontrolní varianta s cholesterolem o koncentraci 50 nM a varianta s ergosterolem o koncentraci 50 nM po čtyřech dnech kultivace. Rozdíly v poměru mezi živými (zeleně zbarvené) a mrtvými buňkami (červeně zbarvené) u jednotlivých variant nebyly.



**Obr. 27, 28, 29:** Tři varianty tabáku linie BY-2 po čtyřech dnech kultivace. Kontrola, varianta s cholesterolem o koncentraci 50 nM a s ergosterolem o koncentraci 50 nM. Zvětšení 10 x 10.

## 6.2. Vliv elicitoru ergosterolu na tabák var. Xanthi

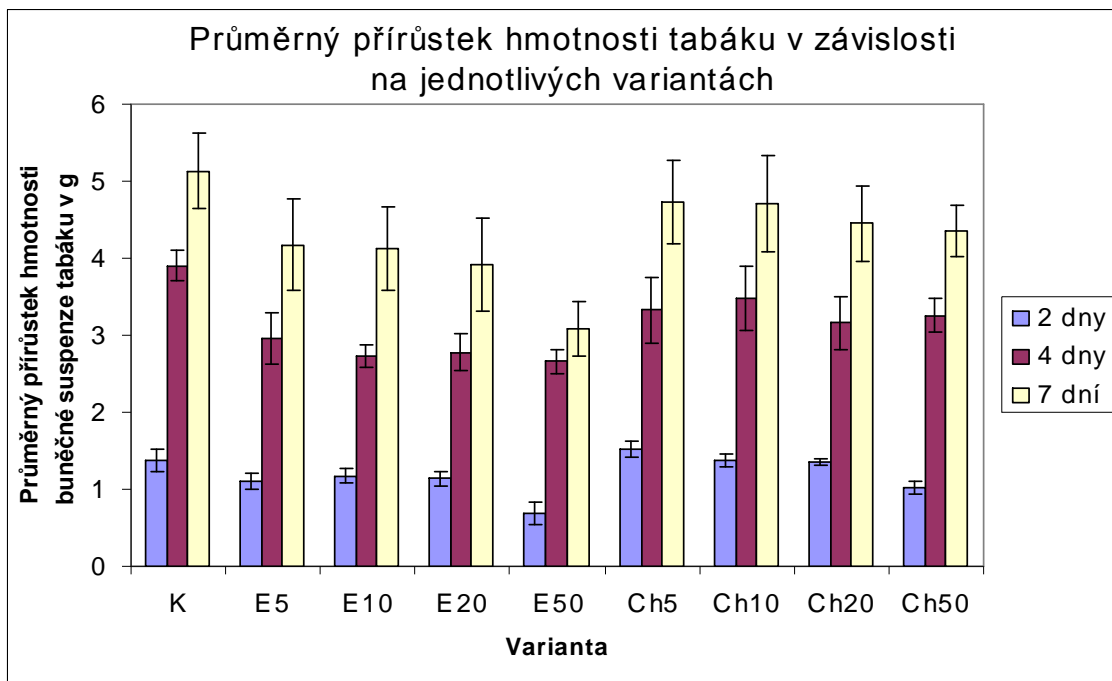
Byl zkoumán vliv elicitoru ergosterolu na kulturu buněčné suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* var. Xanti. Suspenze (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce při  $27 \pm 1$  °C a  $135 \text{ ot. min}^{-1}$  na světle. Ke kultuře byl přidán ergosterol v koncentracích 5nM, 10nM, 20nM, 50nM. Jako kontrola byl použit cholesterol ve stejných koncentracích jako ergosterol. Ergosterol i cholesterol byly rozpuštěny v roztoku pomocí 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinu. Vzorby byly odebírány po 2, 4 a 7 dnech. Byl stanovován průměrný přírůstek hmotnosti buněčné suspenze tabáku. Dále životnost pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteraz a barvením fluorescenčními barvivy PI a FDA. Stanovení cytokininů bylo prováděno pomocí HPLC s MS detekcí. Byly detekovány tyto cytokininů 7G BA, 9R-MP BA, 9R BA. V grafech je uvedena celková koncentrace cytokininů přítomných v kalusu tabáku. Pokus byl opakován třikrát.

## 6.2.1. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi

Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách je znázorněn v grafu 5.

Po dvou, čtyřech a sedmi dnech kultivace byl průměrný přírůstek hmotnosti variant s ergosterolem nižší než u kontrolní varianty bez cholesterolu i s cholesterolem. Jak u variant s ergosterolem, tak u variant s cholesterolem nebyl patrný pokles přírůstku hmotnosti s narůstající koncentrací ergosterolu případně cholesterolu.

**Graf 5:** Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách. (K-kontrola bez cholesterolu, E5-5 nM ergosterol, E10-10 nM ergosterol, E20-20 nM ergosterol, E50-50 nM ergosterol, Ch5-5 nM cholesterol, Ch10-10 nM cholesterol, Ch20-20 nM cholesterol, Ch50-50 nM cholesterol). Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



## 6.2.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteras

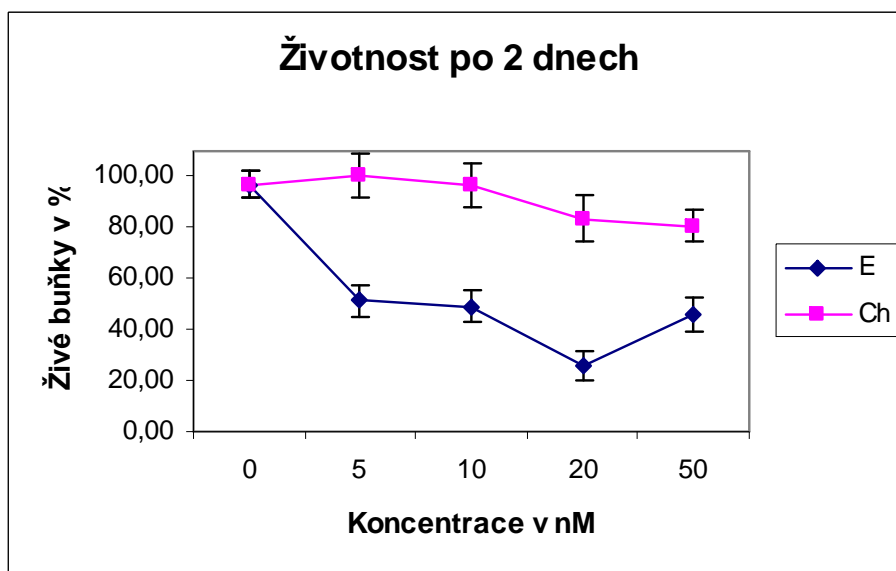
Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou dnech kultivace znázorňuje graf 6. Životnost variant s ergosterolem byla oproti kontrole s cholesterolem i bez něj výrazně nižší. Se zvyšující se koncentrací ergosterolu popřípadě cholesterolu se životnost snižovala. Nejnižší životnost u ergosterolu byla při koncentraci 20 nM, při koncentraci 50 nM se životnost opět zvýšila.

Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po čtyřech dnech kultivace znázorňuje graf 7. I zde byla životnost variant s ergosterolem oproti kontrole s cholesterolem i bez něj výrazně nižší. Se zvyšující se koncentrací ergosterolu popřípadě cholesterolu se životnost snižovala. Nejnižší životnost u cholesterolu byla při koncentraci 20 nM, při koncentraci 50 nM se životnost opět zvýšila.

Obdobný byl průběh životnosti u jednotlivých variant i po sedmi dnech kultivace (graf 8). Nejnižší životnost u ergosterolu byla při koncentraci 20 nM, při koncentraci 50 nM se životnost opět zvýšila.

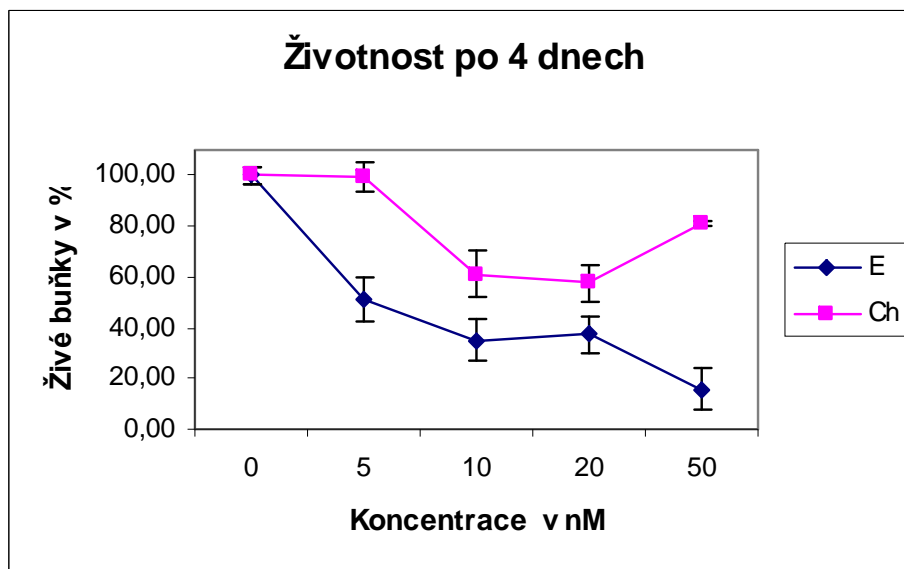
**Graf 6:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou dnech.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



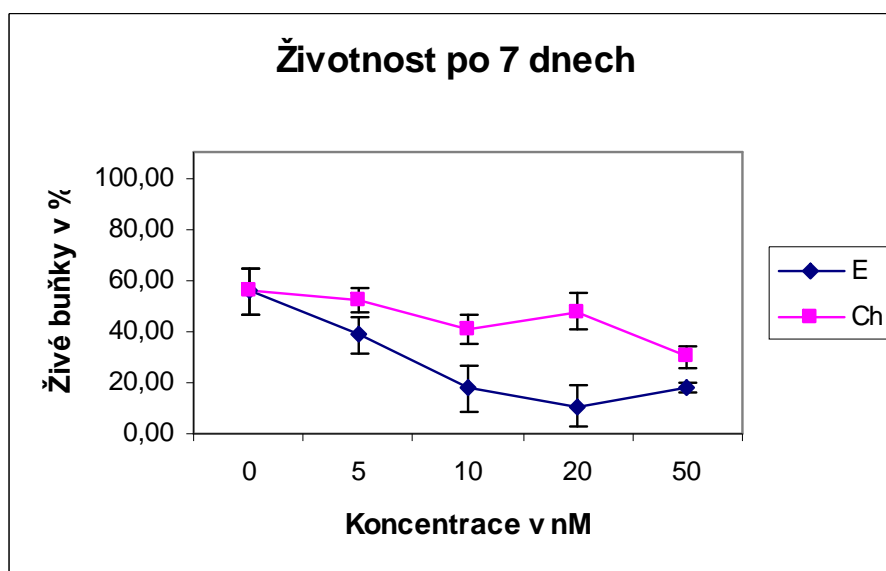
**Graf 7:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po čtyřech dnech.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



**Graf 8:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po sedmi dnech.

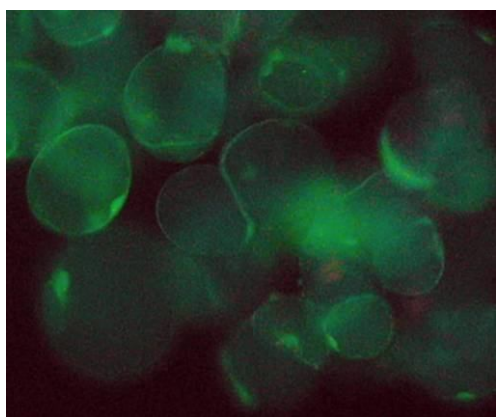
100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



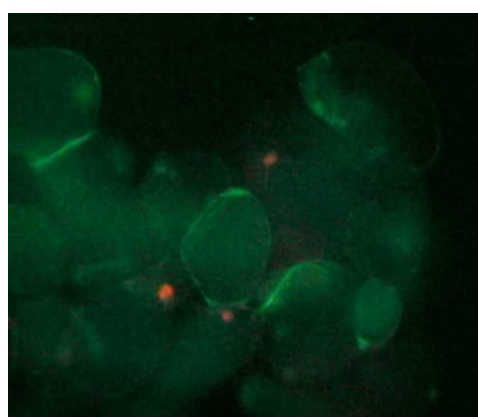


### 6.2.3. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA

Životnost byla u jednotlivých variant stanovována také pomocí barvení fluorescenčními barvivy. Na obrázcích 30, 31 a 32 je vyfocena kontrola, varianta s cholesterolem o koncentraci 50 nM a varianta s ergosterolem o koncentraci 50 nM po čtyřech dnech kultivace. Jsou jasně vidět rozdíly v poměru mezi živými (zeleně zbarvené) a mrtvými buňkami (červeně zbarvené) u jednotlivých variant. Nejvíce mrtvých buněk bylo u varianty s ergosterolem, nejméně pak u kontrolní varianty bez přídavku cholesterolu.

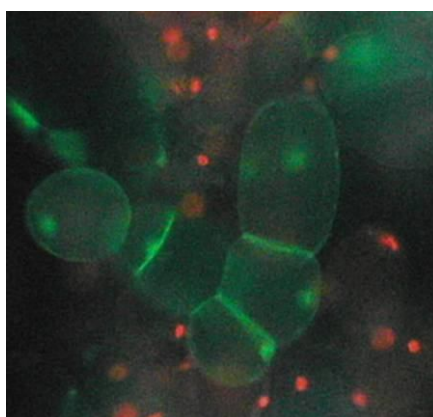


Kontrola



Ch50

**Obr. 30, 31:** Tabák var. Xanthi po čtyřech dnech kultivace, kontrola a varianta s cholesterolem o koncentraci 50 nM. Zvětšení 10 x 10.



E50

**Obr. 33:** Tabák var. Xanthi po čtyřech dnech kultivace, varianta s ergosterolem o koncentraci 50 nM. Zvětšení 10 x 10.

#### **6.2.4. Stanovení celkového obsahu cytokininů v buněčné suspenzi tabáku var. Xanthi pomocí HPLC s MS detekcí**

Detekovány byly tyto cytokininy 7G BA, 9R-MP BA, a 9R BA. U 7G BA byl pík mírně deformován. Celkový obsah cytokininů v závislosti na jednotlivých variantách znázorňuje graf 9. Obsah jednotlivých derivátů BA viz příloha 6, 7, 8.

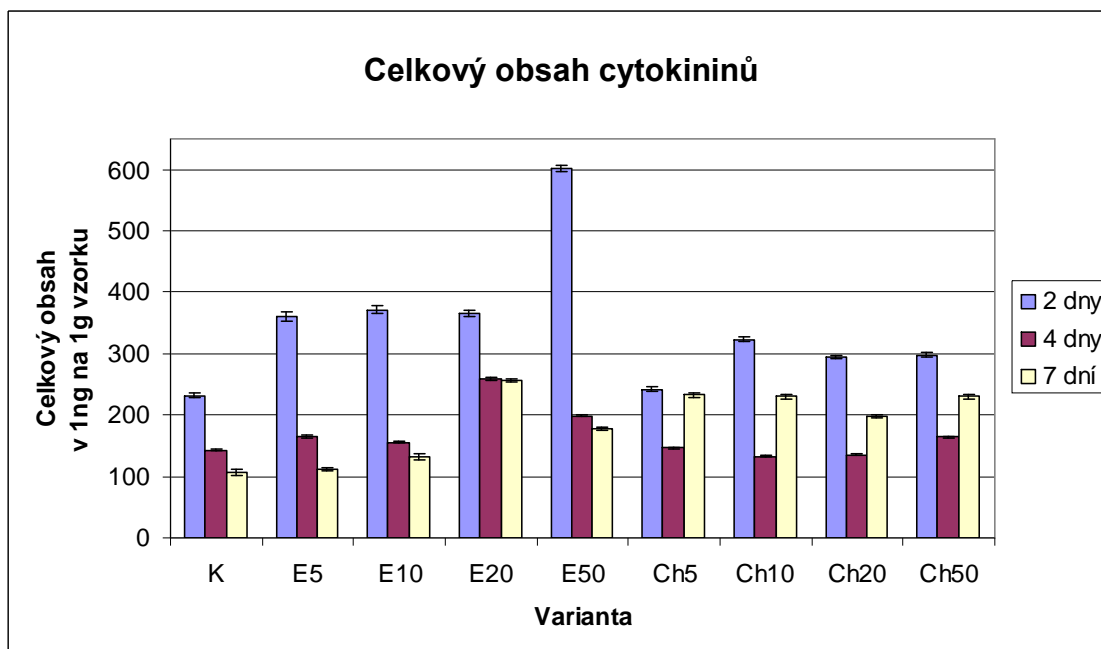
Po dvou dnech kultivace byl celkový obsah cytokininů u variant s ergosterolem vyšší než u kontrolní varianty bez cholesterolu i s cholesterolem. I varianty s cholesterolem měly oproti kontrolní variantě vyšší obsah cytokininů. U variant s ergosterolem byl patrný nárůst obsahu cytokininů v závislosti na zvyšující se koncentraci elicitoru. Pouze u varianty s koncentrací ergosterolu 20 nM byl zaznamenán pokles obsahu cytokininů oproti variantě s koncentrací ergosterolu 10 nM. U kontrolních variant s cholesterolem byl nejnižší obsah cytokininů u varianty s 5 nM koncentrací, nejvyšší pak u varianty s 10 nM koncentrací.

Po čtyřech dnech kultivace byl také celkový obsah cytokininů u variant s ergosterolem vyšší než u kontrolních variant bez cholesterolu i s ním. U variant s ergosterolem byl patrný nárůst obsahu cytokininů v závislosti na zvyšující se koncentraci elicitoru. Pouze u varianty s koncentrací ergosterolu 10 nM a 50 nM byl zaznamenán pokles obsahu cytokininů oproti variantě s koncentrací ergosterolu 5 nM a 20nM.

Po osmi dnech kultivace byla závislost obsahu cytokininů na jednotlivých variantách podobná jako v předešlých dnech. Pouze obsah cytokininů u kontrolní varianty s cholesterolem byl vyšší než u kontrolní varianty bez cholesterolu a mimo varianty E20 i u variant s ergosterolem.

**Graf 9:** Závislost celkového obsahu cytokininů na jednotlivých variantách.

(K-kontrola bez cholesterolu, E5-5 nM ergosterol, E10-10 nM ergosterol, E20-20 nM ergosterol, E50-50 nM ergosterol, Ch5-5 nM cholesterol, Ch10-10 nM cholesterol, Ch20-20 nM cholesterol, Ch50-50 nM cholesterol). Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.

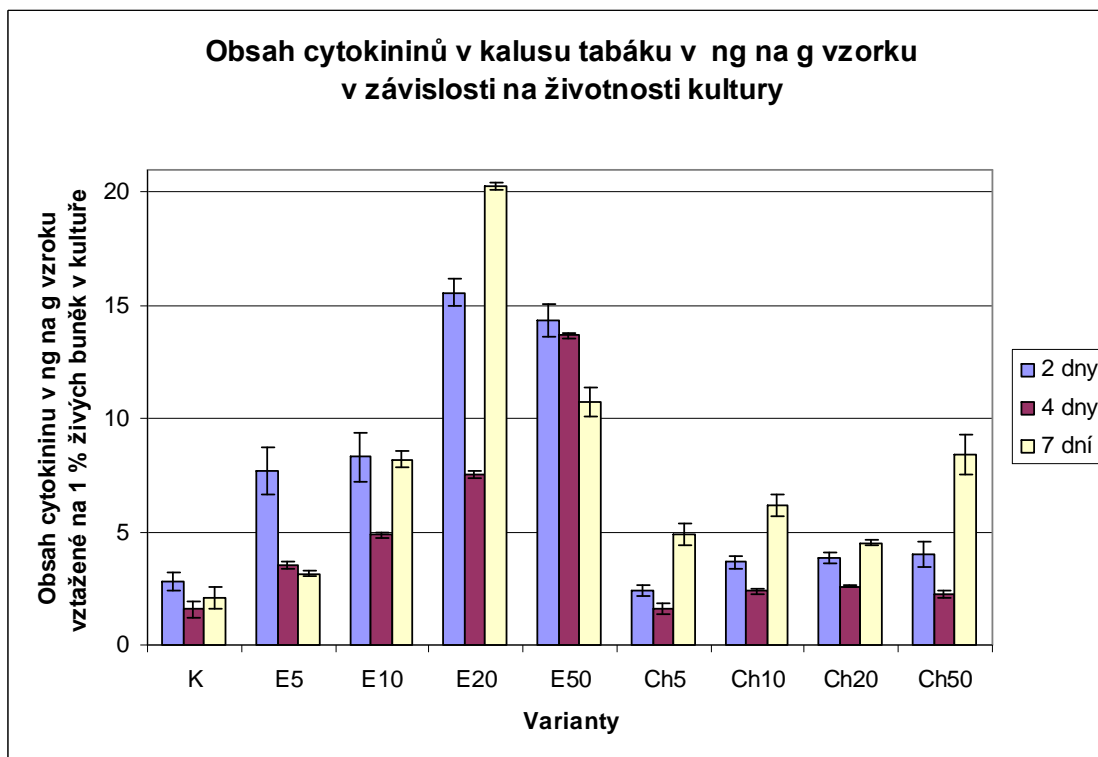


Celkový obsah cytokininů byl vztažen na 1% živých buněk v kultuře u jednotlivých variant. To je znázorněno v grafu 10.

Po dvou dnech kultivace byl celkový obsah cytokininů vztažených na životnost u variant s ergosterolem výrazně vyšší než u kontrolní varianty bez cholesterolu i s cholesterolem. U variant s ergosterolem byl patrný nárůst obsahu cytokininů v závislosti na zvyšující se koncentraci elicitoru. Podobné výsledky byly zaznamenány i po čtyřech a sedmi dnech kultivace. Po čtyřech dnech kultivace, byl nejvyšší obsah cytokininů u varianty s koncentrací ergosterolu 50 nM. Po sedmi dnech kultivace, byl nejvyšší obsah cytokininů u varianty s koncentrací ergosterolu 20 nM.

**Graf 10:** Obsah cytokininů v závislosti na životnosti kultury.

(K-kontrola bez cholesterolu, E5-5 nM ergosterol, E10-10 nM ergosterol, E20-20 nM ergosterol, E50-50 nM ergosterol, Ch5-5 nM cholesterol, Ch10-10 nM cholesterol, Ch20-20 nM cholesterol, Ch50-50 nM cholesterol). Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



### 6.3. Vliv elicitoru cryptogeinu na tabák var. Xanthi

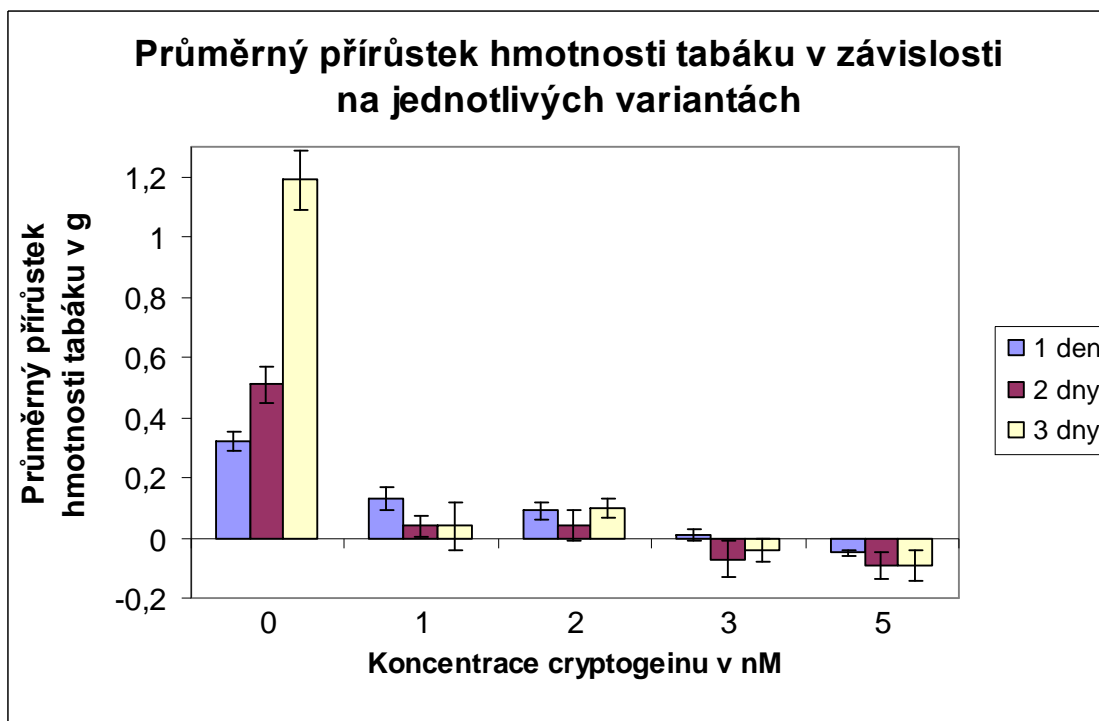
Byl zkoumán vliv elicitoru cryptogeinu na kulturu buněčné suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. Suspenze (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce při  $27 \pm 1$  °C a  $135 \text{ ot. min}^{-1}$  na světle. Ke kultuře byl přidán elicitor cryptogein v koncentracích 1nM, 2nM, 3nM, 5nM. Jako kontrola byla použita kultura bez přídavku cryptogeinu. Vzorky byly odebírány po 1, 2 a 3 dnech. Byl stanovován průměrný přírůstek hmotnosti buněčné suspenze tabáku. Dále životnost pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteráz a barvením fluorescenčními barvivy PI a FDA. Stanovení cytokininů bylo prováděno pomocí HPLC s MS detekcí. Byly detekovány tyto cytokinininy 7G BA, 9R-MP BA, 9R BA. V grafech je uvedena celková koncentrace cytokininů přítomných v kalusu tabáku. Pokus byl opakován třikrát.

### 6.3.1. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi

Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách je znázorněn v grafu 11.

Po jednom dni kultivace byl průměrný přírůstek hmotnosti variant s cryptogeinem výrazně nižší než u kontrolní varianty. Byl patrný pokles přírůstku hmotnosti s narůstající koncentrací cryptogeinu. Podobné výsledky byly zaznamenány i po dvou a třech dnech kultivace. I zde byly přírůstky variant s cryptogeinem oproti přírůstkům kontrolní varianty výrazně nižší. U varianty s koncentrací cryptogeinu 3 a 5 nM byl pozorován úbytek hmotnosti tabáku.

**Graf 11:** Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.

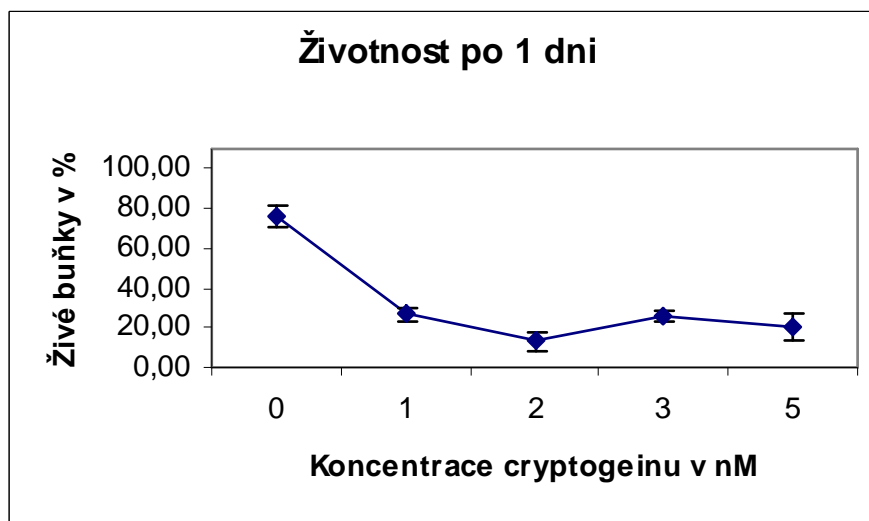


### 6.3.2. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí stanovení aktivity intracelulárních esteras

Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po jednom, dvou a třech dnech kultivace znázorňuje graf 12, 13 a 14. Varianty s cryptogeinem měly výrazně nižší životnost než kontrolní varianta. Výrazné rozdíly mezi jednotlivými variantami s různou koncentrací cryptogeinu nebyly. Po třech dnech kultivace byla životnost u varianty s koncentrací cryptogeinu 3 a 5 nM pod detekcí přístroje.

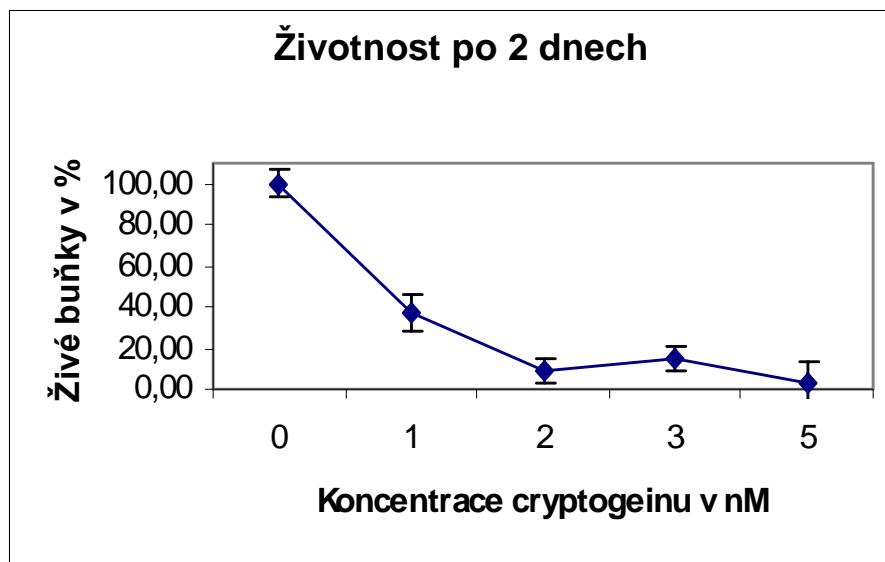
**Graf 12:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po jednom dni.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



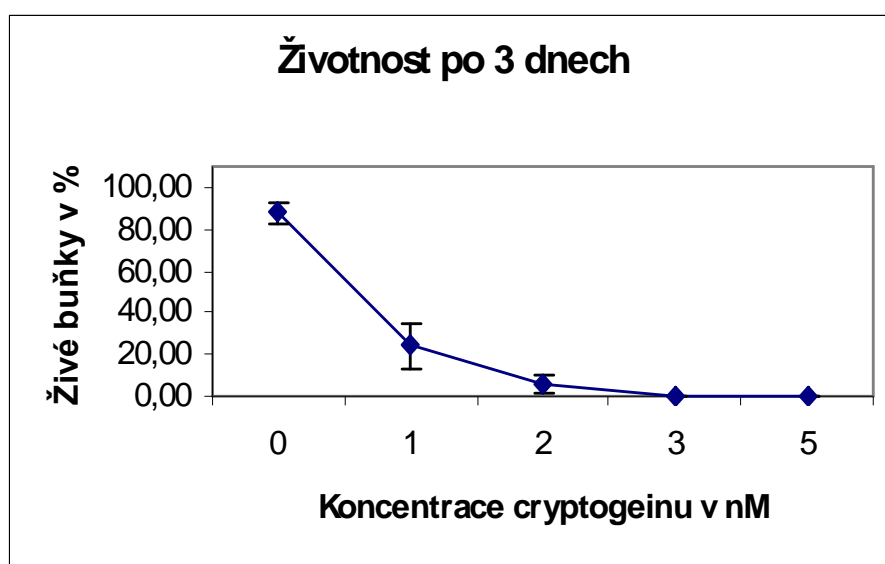
**Graf 13:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou dnech.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



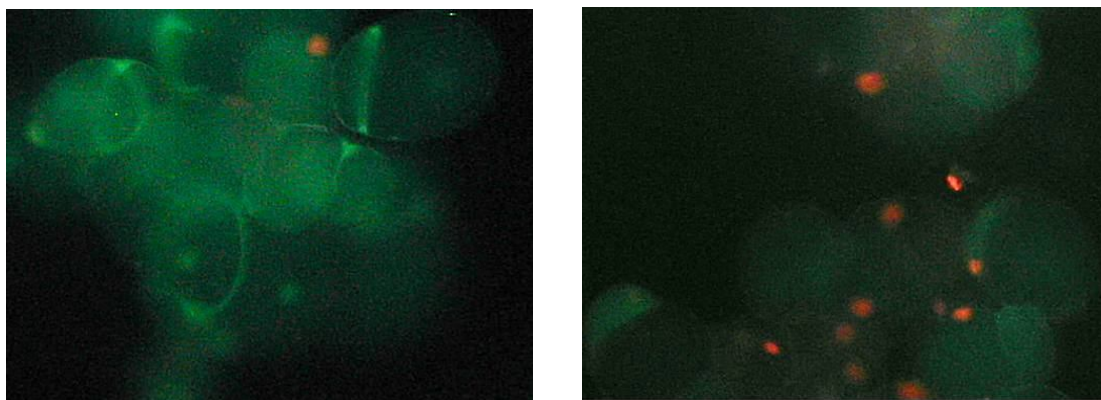
**Graf 14:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po třech dnech.

100% představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.

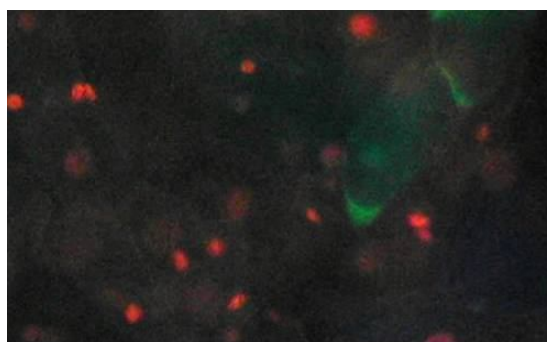


### 6.3.3. Stanovení životnosti buněčné suspenze tabáku var. Xanthi pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA

Životnost byla u jednotlivých variant stanovována také pomocí barvení fluorescenčními barvivy. Na obrázcích 33, 34 a 35 je vyfocena kontrola, varianta s cryptogeinem o koncentraci 2 a 5 nM po dvou dnech kultivace. Jsou jasně vidět rozdíly v poměru mezi živými (zeleně zbarvené) a mrtvými buňkami (červeně zbarvené) u jednotlivých variant. Nejvíce mrtvých buněk bylo u varianty s cryptogeinem o koncentraci 5 nM, nejméně pak u kontrolní varianty.



**Obr. 33, 34:** Tabák var. Xanthi po dvou dnech kultivace, kontrola a varianta s cryptogeinem o koncentraci 2 nM. Zvětšení 10 x 10.



**Obr. 35:** Tabák var. Xanthi po dvou dnech kultivace, varianta s cryptogeinem o koncentraci 5 nM. Zvětšení 10 x 10.



### 6.3.4. Stanovení celkového obsahu cytokininů v buněčné suspenzi tabáku var. Xanthi pomocí HPLC s MS detekcí.

Detekovány byly tyto cytokininy 7G BA, 9R-MP BA, a 9R BA. U 7G BA byl pík mírně deformován. Celkový obsah cytokininů v závislosti na jednotlivých variantách znázorňuje graf 15. Obsah jednotlivých derivátů BA viz příloha 13, 14, 15.

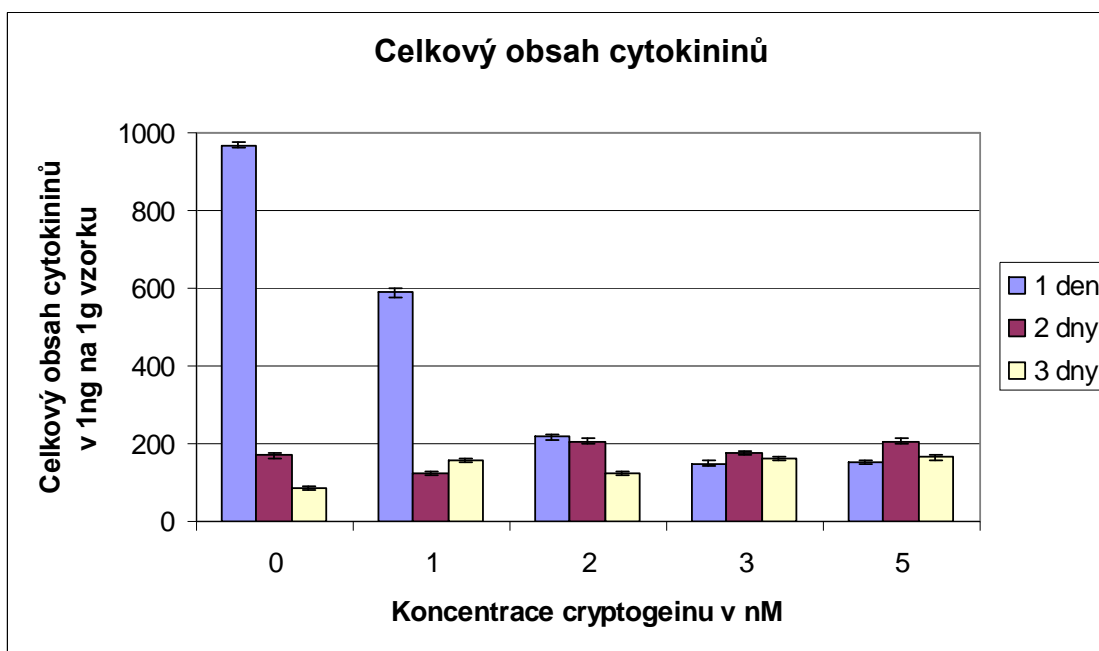
Po jednom dni kultivace byl celkový obsah cytokininů nejvyšší u kontrolní varianty. Se zvyšující se koncentrací cryptogeinu se snižoval obsah cytokininů v tabáku.

Po dvou dnech kultivace byly rozdíly mezi kontrolou a jednotlivými variantami s cryptogeinem pouze nepatrné. Varianta s koncentrací cryptogeinu 1 nM byla nižší než kontrolní varianta, ostatní varianty s cryptogeinem byly oproti kontrole vyšší. Nejvyšší obsah cytokininů měla varianta s koncentrací cryptogeinu 5 nM.

Po třech dnech kultivace byly také rozdíly mezi kontrolou a jednotlivými variantami s cryptogeinem malé. Obsah cytokininů byl u variant s cryptogeinem vyšší než u kontrolní varianty, nejnižší byl u koncentrace 2 nM nejvyšší pak u koncentrace 5 nM.

**Graf 15:** Závislost celkového obsahu cytokininů na jednotlivých variantách.

Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



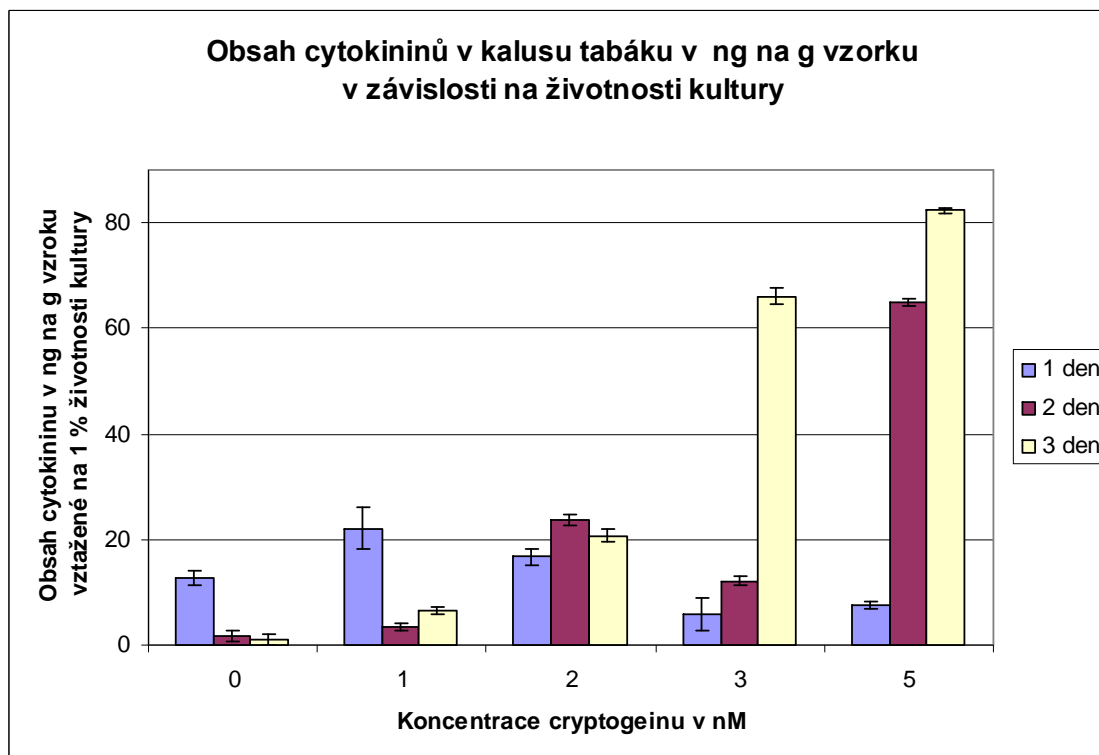
Celkový obsah cytokininů byl vztažen na 1% živých buněk u jednotlivých variant. To je znázorněno v grafu 16. Po třech dnech kultivace u varianty s cryptogeinem o koncentraci 3 a 5 nM byla životnost kultury stanovovaná pomocí aktivity esterasy pod detekcí přístroje. Zde byla životnost určena pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA.

Po jednom dni kultivace byl obsah cytokininů v případě varianty s cryptogeinem o koncentraci 1 a 2 nM vyšší než kontrolní varianta, u varianty s cryptogeinem o koncentraci 3 a 5 nM naopak nižší než kontrola.

Po dvou a třech dnech kultivace bylo naopak pozorováno, že varianty s cryptogeinem měly vyšší koncentraci cytokininů než kontrolní varianta. Se zvyšující se koncentrací cryptogeinu se zvyšovala také koncentrace cytokininů. A to u variant s koncentrací cryptogeinu 3 a 5 nM velice výrazně.

**Graf 16:** Obsah cytokininů v závislosti na životnosti kultury.

Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří měření jednoho vzorku. Chybová úsečka znázorňuje odchylku od měření.



## **7. Diskuze**

Cílem diplomové práce bylo sledování efektu elicitorů na syntézu fytohormonů cytokininů u kultury buněčné suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* linie BY-2 a var. Xanthi. Elicitory jsou látky vyvolávající obrannou reakci u rostlin. V práci byly použity elicitory ergosterol a cryptogein, které byly přidány v různých koncentracích ke kultuře tabáku, a byl sledován jejich efekt v průběhu kultivace. Z rostlinných fytohormonů byl u tabáku var. Xanthi pomocí HPLC s MS detekcí stanovován obsah cytokininů, konkrétně derivátů benzyladeninu, a to benzyladenin-7-glukosidu, benzyladenosin-5-monofosfátu a benzyladenin-9-ribosidu. Benzyladenin byl součástí kultivačního média v koncentraci 0,11 mg.l<sup>-1</sup>. Benzyladenin, na rozdíl od svých metabolitů, nebyl ve vzorcích tabáku detekován. Vedle obsahu cytokininů byl dále sledován také vliv elicitoru na růst a životnost kultury tabáku. Růst byl sledován pomocí stanovení průměrného přírůstku hmotnosti buněčné suspenze tabáku (37), životnost potom pomocí stanovení aktivity intracelulárních esterás (38) a barvením fluorescenčními barvivy PI a FDA (36).

Nejdříve bylo třeba určit vhodnou kulturu, která bude reagovat na přítomnost elicitoru a bude mít detekovatelnou hladinu cytokininů. Jako první byla k pokusům použita kultura buněčné suspenze tabáku linie BY-2 a elicitor ergosterol, jako kontrola byl použit cholesterol. Ergosterol je nízkomolekulární elicitor pocházející z plasmatické membrány hub. Byl izolován z houby václavky, která způsobuje každoročně v lesním hospodářství velké škody (3, 5). Ergosterol byl přidáván do kultury ve formě komplexu s 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinem a jeho efekt byl srovnáván s cholesterolem, který reakci nevyvolává. Byly použity koncentrace 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM. Efekt byl sledován po dobu sedmi dnů, vzorky byly odebrány po 2, 4 a 7 dnech kultivace. Vždy byla ještě současně s variantami s ergosterolem a cholesterolem kultivována kontrolní varianta bez přídavku.

Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti u jednotlivých variant neprokázalo žádné výraznější rozdíly. Dále byla stanovována životnost kultury pomocí aktivity intracelulárních esterás. Také životnost se u jednotlivých variant výrazně nelišila. Podobné závěry poskytlo i stanovení životnosti pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA. Z toho vyplývá, že kultura tabáku linie BY-2 nereaguje na přítomnost použitého elicitoru. Navíc při stanovení cytokininů byla jejich koncentrace pod detekcí přístroje. Proto kultura tabáku linie BY-2 byla nevhodná k dalším pokusům.

Jako druhá kultura byl vybrán tabák var. Xanthi. Jako elicitor byl opět použit ergosterol a jako kontrola cholesterol. Byly použity koncentrace 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM. Efekt byl sledován po dobu sedmi dnů, vzorky byly odebírány po 2, 4 a 7 dnech kultivace. Vždy byla ještě současně s variantami s ergosterolem a cholesterolem kultivována kontrolní varianta bez přídavku. Průměrné přírůstky hmotnosti variant s ergosterolem byly nižší než u kontrolních variant. Rozdíly mezi jednotlivými variantami s různými koncentracemi ergosterolu však nebyly pozorovány. Vliv ergosterolu na tabák var. Xanthi byl také potvrzen stanovením životnosti. Výsledky se shodovaly jak u stanovení životnosti pomocí esterasy, tak i pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA. Varianty, kde byl přidán ergosterol, měly životnost nižší než varianty kontrolní. To znamená, že ergosterol má vliv na růst a životnost u tabáku varianty Xanthi. Naproti tomu v literatuře 41 a 42, kde byla stanovována životnost kultury tabáku v závislosti na koncentraci ergosterolu, nebyl zaznamenán pokles životnosti. Vliv na větší citlivost buněk tabáku vůči elicitoru ergosterolu mohly mít rozdílné podmínky kultivace, a to především rozdíl v době osvětlení. Dále mohla být kultura ovlivněna také látkou pomocí, které byl ergosterol rozpuštěn. V případě práce 41 a 42 byl jako rozpouštědlo použit methanol. Je tedy možné, že 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin, pomocí kterého byl ergosterol a cholesterol rozpuštěn, mohl ovlivňovat životaschopnost buněk, a v případě ergosterolu ještě násobit jeho účinek.

Stanovení cytokininů potvrdilo přítomnost derivátů benzyladeninu. Byl stanoven celkový obsah cytokininů na g vzorku. Bylo potvrzeno, že přítomnost elicitoru zvyšuje koncentraci cytokininů v tabáku var. Xanthi. Největší rozdíly byly pozorovány po dvou dnech kultivace. V následujících dnech už nebyl rozdíl obsahu cytokininů mezi variantami s ergosterolem a kontrolou tak výrazný. To může být způsobeno poklesem životnosti u variant s ergosterolem a tím snížení živých buněk s cytokininy ve vzorku odebraném na stanovení cytokininů. Proto byl celkový obsah cytokininů vztažen na 1 % živých buněk v kultuře. V grafu 10 je jasně vidět, že přítomnost ergosterolu výrazně zvyšovala koncentraci cytokininů v tabáku var. Xanthi, a to během všech sedmi dnů kultivace. Dále bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací ergosterolu se zvyšovala i koncentrace cytokininů. Výrazné zvýšení obsahu cytokininů v buňkách tabáku může být pravděpodobně způsobeno tím, že buňky tabáku reagují na stres vyvolaný ergosterolem zvýšeným příjmem cytokininů z média. Cytokiny totiž mimo jiné zvyšují toleranci vůči extrémním podmínkám prostředí (18).

Jako další elicitor byl použit cryptogein, jako kultura byl opět použit tabák var. Xanthi. Elicitor cryptogein je malý protein, který byl izolován z houby *Phytophthora cryptogea* a indukuje obrannou reakci v buňkách tabáku (8). *Phytophthora* patří mezi obligátně biotrofní patogeny a má široké spektrum hostitelů (14). Protože cryptogein patří mezi  $\beta$ -elicitiny, které jsou hodně nekrotizující (9), byly použity nízké koncentrace 1nM, 2nM, 3nM, 5nM, a jeho efekt byl sledován pouze po dobu tří dnů po 1, 2 a 3 dnech kultivace.

Již stanovení průměrného přírůstku hmotnosti tabáku potvrdilo, že cryptogein patří mezi nekrotizující elicitory (9) a aktivuje programovanou buněčnou smrt u buněk tabáku var. Xanthi (40). Přírůstky hmotnosti jednotlivých variant s cryptogeinem byly v porovnání s kontrolní variantou mnohem menší. U varianty s koncentrací cryptogeinu 3 a 5 nM docházelo dokonce k úbytku hmotnosti. Přírůstek hmotnosti klesal se zvyšující se koncentrací cryptogeinu v médiu. Také životnost potvrdila, že cryptogein je nekrotizující elicitor (9). Vlivem přídavku cryptogeinu docházelo k výraznému snížení životnosti kultury tabáku vůči kontrole. Se zvyšující se koncentrací cryptogeinu se snižovala životnost kultury. Toto potvrdilo jak stanovení životnosti pomocí esteras, tak i pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA. Tyto výsledky se shodují s literaturou (41, 42). I zde bylo pozorováno snížení životnosti po přídavku cryptogeinu ke kultuře tabáku var. Xanthi.

Dále byl stanoven celkový obsah cytokininů na g vzorku. Po prvním dnu kultivace docházelo se zvyšující se koncentrací cryptogeinu k výraznému snižování obsahu cytokininů v tabáku. V dalších dnech už nebyly tak výrazné rozdíly mezi kontrolní variantou a variantami s různou koncentrací cryptogeinu. I zde byl obsah cytokininů vztažen na 1 % živých buněk v kultuře, aby byl eliminován vliv poklesu životnosti buněk tabáku ve vzorku odebraném na stanovení cytokininů. U varianty s koncentrací cryptogeinu 3 a 5 nM po třech dnech kultivace byla aktivita esteras pod mezí detekce přístroje. Pomocí barvení fluorescenčními barvivy však bylo pod mikroskopem ještě vidět malé procento živých buněk. Proto k přepočtu obsahu cytokininů byla u těchto variant použita životnost stanovená pomocí barvení fluorescenčními barvivy PI a FDA. První den byl obsah cytokininů vztažený na životnost kultury u variant s cryptogeinem o koncentraci 1 a 2 nM vyšší než u kontrolní varianty, naopak u variant s cryptogeinem o koncentraci 3 a 5 nM byl obsah cytokininů nižší než u kontrolní varianty. To může být způsobeno rozdílnou dobou adaptace na nové podmínky po přenesení buněk do nového média. U variant s cryptogeinem je pravděpodobně vlivem stresu třeba delší doba

na adaptaci buněk na nové podmínky, tím je možné vysvětlit nižší příjem cytokininů z média. Po dvou a třech dnech kultivace docházelo k výraznému zvyšování obsahu cytokininů u jednotlivých variant s cryptogeinem oproti kontrole. S rostoucí koncentrací cryptogeinu v médiu se zvyšoval i obsah cytokininů, tak jak tomu bylo i v případě použití elicitoru ergosterolu. Z toho vyplývá, že přítomnost elicitoru zvyšuje koncentraci cytokininů. Nejvyšší nárůst cytokininů byl zaznamenán po dvou dnech kultivace u varianty s cryptogeinem o koncentraci 5 nM a po třech dnech kultivace u varianty s cryptogeinem o koncentraci 3 a 5 nM. Tedy u variant, kde byla životnost nenižší. Vlivem velmi nízké životnosti, a tedy velkého počtu mrtvých buněk, by mohl být v těchto případech celkový obsah cytokininů ovlivněn i cytokininy, které by mohly ještě zůstat v mrtvých buňkách v kalusu. Tím by mohlo docházet ke zvyšování jejich celkového obsahu ve vzorcích s velmi nízkou životností. To by mohlo částečně vysvětlit výrazné zvýšení obsahu cytokininů u variant s koncentracemi cryptogeinu 3 a 5 nM. Pro přesné rozlišení jaký obsah cytokininů je pouze v živých buňkách a kolik jich zůstalo v mrtvých buňkách, by se muselo pravděpodobně využít nějaké molekulárně-biologické metody.

## **8. Závěr**

Nejdříve bylo třeba určit vhodnou kulturu, která bude reagovat na přítomnost elicitoru a bude mít detekovatelnou hladinu cytokininů. Jako první byla k pokusům použita kultura buněčné suspenze tabáku linie BY-2 a elicitor ergosterol a jako kontrola cholesterol. Stanovení průměrného přírůstku hmotnosti a stanovení životnosti pomocí aktivity intracelulárních esteraz a barvením fluorescenčními barvivy PI a FDA neprokázalo vliv ergosterolu na kulturu tabáku linie BY-2. Navíc u stanovení cytokininů byla jejich koncentrace pod detekcí přístroje. Proto kultura tabáku linie BY-2 byla nevhodná k dalším pokusům.

Jako druhá kultura byl vybrán tabák var. Xanthi. Jako elicitor byl opět použit ergosterol a jako kontrola cholesterol. Průměrné přírůstky hmotnosti variant s ergosterolem byly nižší než u kontrolních variant. Vliv ergosterolu na tabák var. Xanthi byl také potvrzen stanovením životnosti. Varianty, kde byl přidán ergosterol, měly životnost nižší než varianty kontrolní. To znamená, že ergosterol má vliv na růst a životnost u tabáku varianty Xanthi. Účinek ergosterolu mohlo ještě zvyšovat rozpouštědlo, ve kterém byl elicitor rozpuštěn. Stanovení obsahu cytokininů potvrdilo přítomnost derivátů benzyladeninu. Přítomnost ergosterolu vyvolávala vyšší příjem benzyladeninu z média, a tím zvýšení jeho derivátů ve vzorcích.

Jako další elicitor byl použit cryptogein, jako kultura byl opět použit tabák var. Xanthi. Přírůstky hmotnosti jednotlivých variant s cryptogeinem byly v porovnání s kontrolní variantou mnohem menší. Vlivem přídavku cryptogeinu docházelo k markantnímu snížení životnosti kultury tabáku vůči kontrole. Tímto bylo potvrzeno, že cryptogein je nekrotizující elicitor. S rostoucí koncentrací cryptogeinu v médiu se zvyšoval i obsah cytokininů v tabáku, tak jako tomu bylo i v případě elicitoru ergosterolu.

Výsledky této diplomové práce by mohly být využity k dalšímu studiu vlivu elicitorů na produkci fytohormonů v rostlinách, popřípadě i to, zda by cytokininy nemohly sloužit ke zvýšení odolnosti rostliny vůči patogenům.

## **9. Seznam grafů**

- Graf 1:** Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách.
- Graf 2:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou dnech.
- Graf 3:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po čtyřech dnech.
- Graf 4:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po osmi dnech.
- Graf 5:** Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách.
- Graf 6:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou dnech.
- Graf 7:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po čtyřech dnech.
- Graf 8:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po sedmi dnech.
- Graf 9:** Závislost celkového obsahu cytokininů na jednotlivých variantách.
- Graf 10:** Obsah cytokininů v závislosti na životnosti kultury.
- Graf 11:** Závislost průměrného přírůstku hmotnosti na jednotlivých variantách.
- Graf 12:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po jednom dni.
- Graf 13:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po dvou dnech.
- Graf 14:** Závislost životnosti kultury na jednotlivých variantách po třech dnech.
- Graf 15:** Závislost celkového obsahu cytokininů na jednotlivých variantách.
- Graf 16:** Obsah cytokininů v závislosti na životnosti kultury.

## **10. Seznam obrázků**

- Obr. 1:** Hypotetický model transdukční signální kaskády.
- Obr. 2:** Struktura ergosterolu.
- Obr. 3:** Václavka smrková (*Armillaria ostoyae*).
- Obr. 4:** Struktura cryptogeinu.
- Obr. 5:** Plíseň bramborová *Phytophthora infestans*.
- Obr. 6:** Nejdůležitější růstové regulátory.
- Obr. 7:** Struktura kinetinu.
- Obr. 8:** Struktura adeninu se substituentem v poloze N-6.
- Obr. 9:** Struktura zeatin-N<sup>9</sup>-glukosidu.
- Obr. 10:** Struktura zeatin-O-glukosidu.
- Obr. 11:** Struktura N,N'-difenylmočoviny.
- Obr. 12:** Struktura N-fenyl-N'-pyridylmočoviny.
- Obr. 13:** Struktura tidiazuronu.



- Obr. 14:** Model biosyntézy cytokininů.
- Obr. 15:** Některé přeměny cytokininů: modifikace postranního řetězce.
- Obr. 16:** Oxidace N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adeninu.
- Obr. 17:** Model signální dráhy cytokininů v *Arabidopsis*.
- Obr. 18:** Základní schéma kapalinového chromatografu.
- Obr. 19:** Schéma spektrofotometrického detektoru.
- Obr. 20:** Schéma hmotnostního spektrometru.
- Obr. 21:** *Nicotiana tabacum* linie BY-2.
- Obr. 22:** *Nicotiana tabacum* var. Xanthi.
- Obr. 23:** Štěpení fluoresceindiacetátu.
- Obr. 24:** Benzyladenin-7-glukosid.
- Obr. 25:** Benzyladenin-5-monofosfát sodná sůl.
- Obr. 26:** Benzyladenin-9-ribosid.
- Obr. 27:** Kontrolní varianta tabáku linie BY-2 po čtyřech dnech kultivace.
- Obr. 28:** Varianta tabáku linie BY-2 s cholesterolem o koncentraci 50 nM po čtyřech dnech kultivace.
- Obr. 29:** Varianta tabáku linie BY-2 s ergosterolem o koncentraci 50 nM po čtyřech dnech kultivace.
- Obr. 30:** Kontrolní varianta tabáku var. Xanthi po čtyřech dnech kultivace.
- Obr. 31:** Varianta tabáku s cholesterolem o koncentraci 50 nM po čtyřech dnech kultivace.
- Obr. 32:** Varianta tabáku var. Xanthi s ergosterolem o koncentraci 50 nM po čtyřech dnech kultivace.
- Obr. 33:** Kontrolní varianta tabáku var. Xanthi po dvou dnech kultivace.
- Obr. 34:** Varianta tabáku var. Xanthi s cryptogeinem o koncentraci 2 nM po dvou dnech kultivace.
- Obr. 35:** Varianta tabáku var. Xanthi s cryptogeinem o koncentraci 5 nM po dvou dnech kultivace.

## **11. Seznam příloh**

- Příloha 1:** Zdrojová data ke grafu 1.
- Příloha 2:** Zdrojová data ke grafu 2, 3 a 4.
- Příloha 3:** Zdrojová data ke grafu 5.
- Příloha 4:** Zdrojová data ke grafu 6, 7 a 8.
- Příloha 5:** Zdrojová data ke grafu 9.
- Příloha 6:** Obsah benzyladenin-7-glukosidu v ng na g vzorku v závislosti na jednotlivých variantách.
- Příloha 7:** Obsah benzyladenosin-5-monofosfátu v ng na g vzorku v závislosti na jednotlivých variantách.
- Příloha 8:** Obsah benzyladenin-9-ribosidu v ng na g vzorku v závislosti na jednotlivých variantách.
- Příloha 9:** Zdrojová data ke grafu 10.
- Příloha 10:** Zdrojová data ke grafu 11.
- Příloha 11:** Zdrojová data ke grafu 12, 13, 14.
- Příloha 12:** Zdrojová data ke grafu 15.
- Příloha 13:** Obsah benzyladenin-7-glukosidu v ng na g vzorku v závislosti na jednotlivých variantách.
- Příloha 14:** Obsah benzyladenosin-5-monofosfátu v ng na g vzorku v závislosti na jednotlivých variantách.
- Příloha 15:** Obsah benzyladenin-9-ribosidu v ng na g vzorku v závislosti na jednotlivých variantách.
- Příloha 16:** Zdrojová data ke grafu 16.

## **12. Seznam tabulek**

- Tabulka 1:** Struktura nevýznamnějších substituentů na aminoskupině v poloze 6.
- Tabulka 2:** Složení tekutého média Murashige & Skoog na tabák linie BY-2.
- Tabulka 3:** Složení tekutého média Murashige & Skoog na tabák var.Xanthi.

### **13. Seznam literatury**

1. Gloser, J., Prášil, I. (1998): Fyziologie stresu. In Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.: Fyziologie rostlin. Academia Praha, 412 – 430.
2. Blumwald, E., Aharon, G. S., Lam B. C.-H. (1998): Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 3, 342-346.
3. De Wit, P. J. G. M. (1998): Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition, *Trends Plant Sci.* 12, 452–458
4. Víteček, J., Kašparovský, T., Mikešová, M., Mikeš, V. (2005): Nonspecific elicitation of defense reaction in suspension tobacco cells by elicitors from *Armillaria*. *Folia microbiol.* 50, 128 – 132.
5. Kašparovský, T., Milat, M.-L., Humbert, C., Blein, J.-P., Havel, L., Mikeš, V. (2003): Elicitation of tobacco cells with ergosterol activates a signal pathway including mobilization of internal calcium. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 495-501.
6. Hagara, L., Antonín, V., Baier, J. (2002): Houby. Aventinum.
7. Černý, A. (1989): Parazitické dřevokazné houby. Státní zemědělské nakladatelství v Praze.
8. <http://www.nahuby.sk>
9. Zanetti, A., Beauvais, F., Huet, J. C., Pernollet, J. C. (1992): Movement of elicitors, necrosis-inducing proteins secreted by *phytophthora*-sp, in tobacco. *Planta* 187, 163-170.
10. Nespoulous, C., Huet J. C., Pernollet J. C. (1992): Structure-function-relationships of alpha-elicitor and beta-elicitor, signal proteins involved in the plant-*phytophthora* interaction. *Planta* 186, 551-557.
11. Rustérucci, Ch., Stallaert, V., Milat, M.-L., Pugin, A., Ricci, P., Blein J.-P. (1996): Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology* 111, 885-891.
12. Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.-P., Pugin, A. (1995): Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiology* 109, 1025-1031.

13. Tavernier, E., Stallaert, V., Blein, J.-P., Pugin, A. (1995): Changes in lipid composition in tobacco cells treated with cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Science* 104, 117-125.
14. Ponchet, M., Panabieres, F., Milat, M.-L., Mikeš, V., a kol. (1999): Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications?. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 1020-1047.
15. Latijnhouwers, M., Pierre, J. G. M. de Wit, Govers, F. (2003): Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in microbiology* 11, 462-469.
16. Kamoun, S., Young, M., Forster, H., Coffey, M.D., Tyler, B.M. (1994): Potential role of elicitins in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and environmental mikrobiology* 60, 1593-1598.
17. Čača, Z. (1958): *Zemědělská fytopatologie díl 2*. Praha.
18. [http://www.syngentacropprotection.nl/gew/poot/oplossingen\\_06.shtm](http://www.syngentacropprotection.nl/gew/poot/oplossingen_06.shtm)
19. Macháčková, I., (1998): Růst a vývoj: Růstové regulátory. In Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., a kol., *Fyziologie rostlin*. Academia Praha, 226 – 243, 253 – 259.
20. Kincl, M., Krpeš, V. (2000): *Základy fyziologie rostlin*. Ostravská univerzita Ostrava, 158 - 169.
21. Kamínek, M., (1997): Cytokininy. In Procházka, S., Šebánek, J. a kol., *Regulátory rostlinného růstu*. Academia Praha, 63 – 76.
22. Zažímalová, a kol. (1999): Control of cytokinin biosynthesis and metabolism. In Hooykaas, P., J., J., Hall, M., A., Libbenga, K., R., *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Elsevier Science B.V., 142-150.
23. Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., a kol. (2006): Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* 67, 1151-1159.
24. Šetlík, I., Seidlová, F., Šantůček, J. (1998): *Fyziologie rostlin*. Biologická fakulta Jihočeské univerzity.
25. Hwang, I., Sakakibara, H. (2006): Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiologia Plantarum* 126, 528-538.
26. Mahönen, A. P. (2005): *Disertační práce*. Uversitatis Helsingiensis in Viikki.
27. Mok, DWS., Mok, MC. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52, 89-118.
28. Kakimoto, T. (2003): Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual review of plant biology* 54, 605-627.

29. Gaudinová, A. (1999): Effects of phytohormones on nitrate reductase. In Strnad, M., Peč, P., Beck, E., Advances in regulation of plant growth and development. Peres Praha, 59-67.
30. Beck, E. (1999): Towards on understanding of plant growth regulation: Cytokinins as major signals of biomass distribution. In Strnad, M., Peč, P., Beck, E., Advances in regulation of plant growth and development. Peres Praha, 97-111.
31. Spíchal, L. (2002): Diplomová práce. Olomouc.
32. Opekar, F., a kol. (2002): Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. Karolinum Praha.
33. Churáček, J. (1987): Chromatografie. In Holzbecher, Z., Churáček, J., a kol., Analytická chemie. SNTL Praha, 413 – 480.
34. Klouda, P. (2003): Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda Ostrava.
35. Ksandr, Z., (1987): Hmotnostní spektrometrie. In Holzbecher, Z., Churáček, J., a kol., Analytická chemie. SNTL Praha, 376 - 380.
36. Jandera, P., Holčapek, M. (1998): In Autorský kolektiv, Hmotnostní spektrometrie. Vydavatelství MU Brno, 102.
37. Chumchalová, J., Kovařík, J. (2000): Metodiky testování chemosensitivity/chemorezistence nádorů in vitro. Klinická onkologie 2/13, 18-21.
38. Petřek, J. (2003): Diplomová práce. MZLU Brno.
39. Víteček, J., Adam, V., Petřek, J., Vacek, J., a kol. (2004): Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79, 195-201.
40. Víteček, J., Adam, V., Petřek, J., Babula, P., a kol. (2005): Aplikace spektrofluorimetrického stanovení esteras v rostlinném materiálu. Chem. Listy 99, 496-501.
41. Kašparovský, T. (2004): Disertační práce, MU Brno.
42. Tiefferová, J. (2006): Bakalářská práce, MU Brno.