



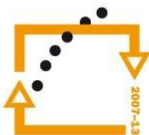
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Petr Tarkowski

Rostlinné hormony *malé molekuly s velkým významem*

**Vzdělávání středoškolských pedagogů a
studentů středních škol jako nástroj ke
zvyšování kvality výuky přírodovědných
předmětů**

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Obsah přednášky



- Představení
- Rostliny a rostlinné hormony
- Rozdělení a popis
- Metody studia
- Využití fytohormonů
- Věda a výzkum
- U nás doma
- Základy chemických výpočtů
- Závěr



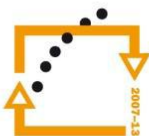
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Curriculum vitae

- **1990-1994 SPŠ-chemická Ostrava**
Voltametrické stanovení Pb, Cd v půdách
- **1994-1999 Analytická chemie, (Mgr.)**
Využití PAGE a IEF vybraných proteinů k analýze rostlinných populací
- **1999-2003 Botanika, (Ph.D.)**
Analytické metody studia cytokininů, biosyntéza cytokininů a jejich interakce s auxiny
- **2006 Botanika, (RNDr.)**
Úloha cytokininů v regulaci růstu a vývoje rostlin
- **2011 Biochemie, (doc.)**
Bioanalytické metody studia cytokininů a jejich aplikace

Curriculum vitae

Zahraniční stáže a krátkodobé pobyty

2000 – Antwerpy, Belgie

2001-2003 – Umea, Švédsko

2004 – Záhřeb, Chorvatsko

2005 – Osaka, Japonsko

2006 – Poznaň, Polsko

2007 – Brémy, Německo

2006-2010 Gent, Belgie

2010 – Stockholm, Švédsko

2011 – Wuhan, Čína





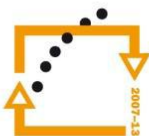
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Mezioborové studie

Biologie (molekulární, buněčná,
fyziologie)

Chemie (biochemie, analytická,
organická)

Fyzika (chemická, optika, biofyzika)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Rostliny

- Buchlovská legenda
- Primární a sekundární metabolity
- Fytohormony – integrátory signálů



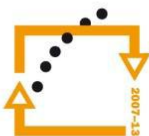
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



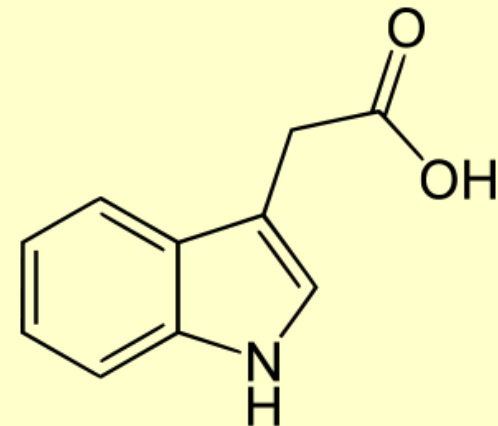
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Fytohormony

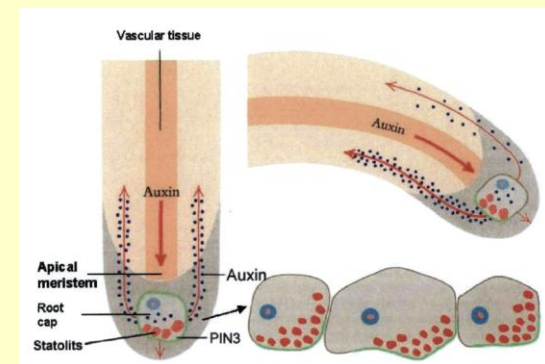
- Auxiny
 - Cytokininy
 - Gibereliny
 - Kyselina abscisová
 - Ethylen
 - (Strigolaktony)
-
- Brassinosteroidy, polyaminy, kys. jasmonová, fenolické látky

Auxiny



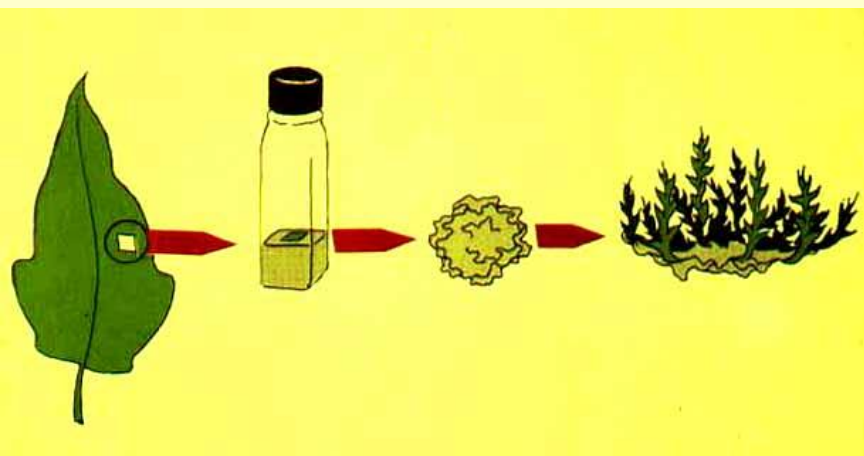
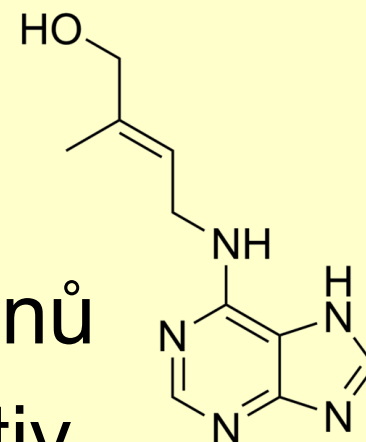
Kyselina indolyl-3-octová

- stimulace buněčného dělení
- dlouhivý růst stonků
- větvení kořenů
- apikální dominance
- tropismy (foto-, geo-)
- zrání plodů (apikální dominance)

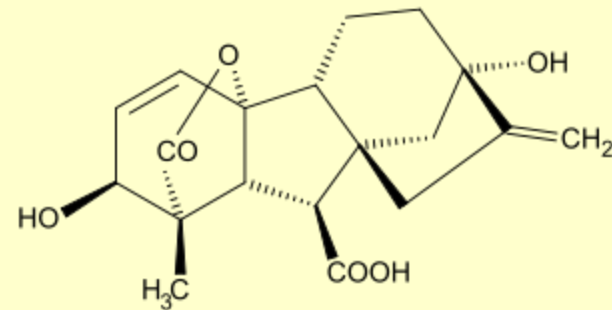


Cytokinininy

- buněčné dělení
- regenerace orgánů
- tvorba laterálních pupenů
- stárnutí rostlinných pletiv
- apikální dominance



Gibereliny



- indukce klíčení semen
- indukce kvetení
- indukce dlouhivého růstu stonku
- dnes známo přes 130 gb
- původci *bakanae* (*etiolizace*)

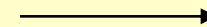
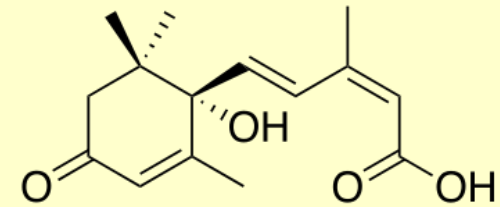


Gibberella fujikuroi

Kyselina abscisová

- brání růstu za stresových podmínek – sucho, chlad, imise
- inhibice prodlužovacího růstu
- stimulace opadu
- urychlení stárnutí (stimulace deg. procesů)
- regulace dormance
- zavírání průduchů

Viviparie (živorodost)





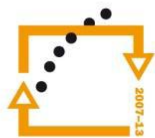
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

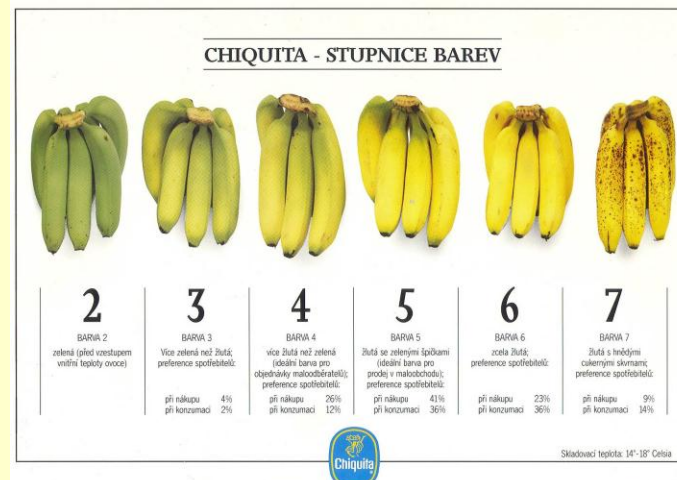


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Ethylen

- plynný hormon
- inhibice dlouhivého růstu
- stimulace radiálního růstu
- urychlení zrání plodů
- stárnutí listů
- opad listů, květů a plodů





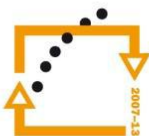
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Metody studia fytohormonů

Klasická fyziologie a biochemie

- Narušení vnějších podmínek
- Narušení celistvosti rostlin
- Inhibice enzymů, exogenní aplikace, chemická analýza

Molekulárně-biologické a genetické studie

- Genetické modifikace (gain, loss)
- Buněčná biologie a biochemie
- Chemická analýza

Modely

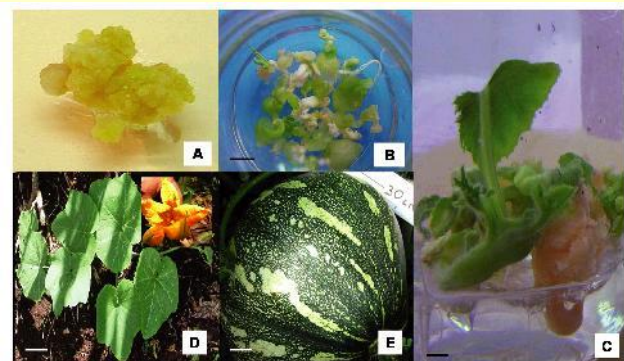
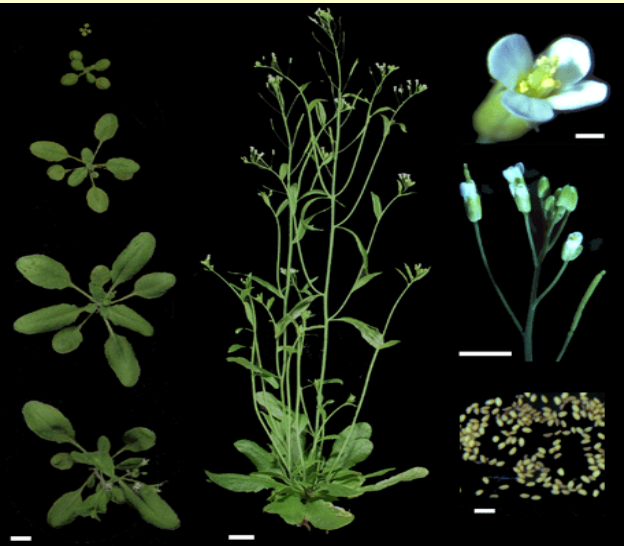
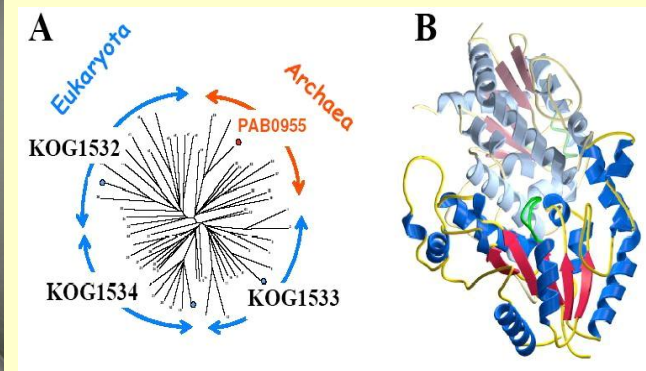


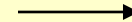
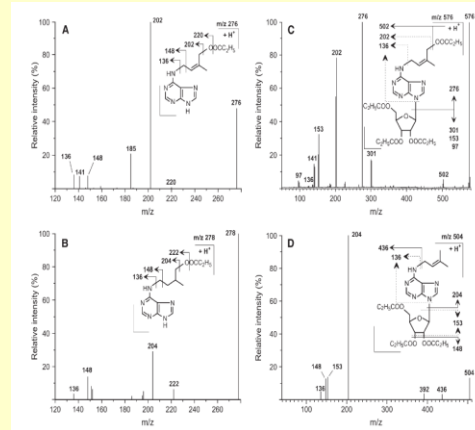
Fig. 1. High frequency somatic embryogenesis from *Cucurbita moschata* cv. Sello de Oro. (A) Embryogenic callus formed after 16 weeks of culture on basal MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D. (B) Regenerated squash plantlets from somatic embryos cultured on regeneration medium. (C) Squash plants cultured on basal MS medium. (D) Plant acclimated in the field with flowers. (E) Squash fruits with normal seeds.



Přístroje a zařízení



Klasická fyziologie a biochemie



Eur. J. Biochem. 276, 3990–4002 (2004) © FEBS 2004

doi:10.1111/j.1472-0033.2004.00345.x

Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat Cloning and heterologous expression

Petr Goluszka¹, Jitka Freibortová², Tomáš Werner³, Mamoru Yamada³, Miroslav Štnas⁴,
Thomas Schumilleg⁵ and Ivo Frišner¹

¹Division of Molecular Biology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic;
²Laboratory of Growth Regulators, Palacký University/Institute of Experimental Botany of the Academy of Sciences, Olomouc;
³Czech Republic, Institute of Biology, Applied Genetics, Free University of Berlin, Germany; ⁴Department of Biological Chemistry,
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan

The cloning of two novel genes that encode cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) in barley is described in this work. Transformation of both genes into *Arabidopsis* and tobacco showed that at least one of the genes codes for a functional enzyme, as its expression caused a cytokinin-deficient phenotype in the heterologous host plants. Additional cloning of two gene fragments, and as an alternative search in the public expressed sequence tag (EST) database, revealed the presence of at least 13 more members of the CKX gene family in barley and wheat. The expression of three selected barley genes was analyzed by RT-PCR and

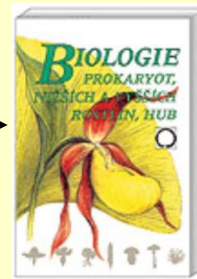
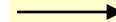
found to be organ-specific with peak expression in mature kernels. One barley CKX (BcCKX2) was characterized in detail after heterologous expression in tobacco. Interestingly, this enzyme shows a pH optimum at 4.5 and a preference for cytokinin riboside as substrate, which may indicate its vacuolar targeting. Different substrate specificities, and the pH profile of cytokinin-degrading enzymes extracted from different barley tissues are also presented.

Keywords: cereals; cloning; cytokinins; oxidase/dehydrogenase; expression; gene family.

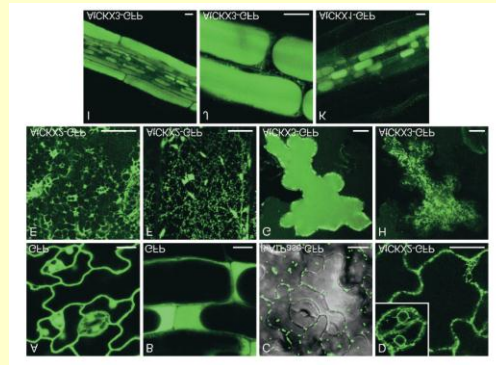
Cytokinin was initially viewed as factor promoting cell division and differentiation in plants. Since then, however, cytokinins have been shown to control other developmental events, such as the growth of lateral buds, the release of buds from apical dominance, leaf expansion, the delay of senescence, the promotion of root germination, and cytokinin formation [1]. Naturally occurring cytokinins are mainly N⁶-substituted adenine derivatives that generally contain an isoprenoid side-chain. Recently, considerable progress has been made in elucidating the regulation of cytokinin biosynthesis during plant growth and development. New molecular biological techniques have allowed for the identification and characterization of genes encoding important enzymes participating in cytokinin metabolic pathways. Genetically engineered plants that overexpress some of these genes were prepared as a tool to study changes in physiological aspects caused by altered cytokinin levels. Seven genes for isopentenyltransferase-cytokinin deaminase (IPT-CKX) have been identified in

the *Arabidopsis* genome [2–4]. In addition, three novel genes, encoding cytokinin-specific glycosyltransferase enzymes with different substrate specificities, have been described [5–7]. The principle of cytokinin catabolism has been studied for many years. Various aspects of cytokinin catabolism with unbranched side-chains have been found in many plant tissues [8], but the details of their function and the mechanism of their action remained unknown for a long time owing to the very low content in plant tissue. The ground-breaking cloning of the cytokinin oxidase maize gene *ZmCKX1* [9,10] opened up the possibility for more detailed study of cytokinin degradation, both at the molecular and at the biochemical levels. The acetoamide moiety of a glycoside containing a covalently bound FAD. The isoprenoid side-chain of the cytokinin molecule is most efficiently cleaved in the presence of an electron acceptor other than oxygen. Hence, the enzyme has been classified as a dehydrogenase with a new EC (1.10.9.12) [11]. The detailed molecular mechanism of cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) has recently been presented for the conversion of different types of cytokinin substrates [12]. Studies of reaction rates have revealed that oxygen is unlikely to be the physiological acceptor oxidizing the FAD molecule of the enzyme *in vivo*. The exact characteristics of a naturally occurring electron acceptor are still unknown, but experiments *in vivo* indicate that it might be pyruvate or a molecule with a similar structure [13]. The completed sequencing project of *Arabidopsis* and rice genomes allowed identification of the small CKX gene family of seven homologues in *Arabidopsis* (*AtCKX1* to *AtCKX7*) [10] and 11 in rice [14]. *AtCKX1* gene was individually overexpressed in tobacco or *Arabidopsis* plants, and a detailed phenotypic characterization was

Correspondence to: P. Goluszka, Division of Molecular Biology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Studentská 1, 782 03 Olomouc, Czech Republic.
E-mail: goluszka@upol.cz
Abbreviations: CKX, cytokinin oxidase/dehydrogenase; EST, expressed sequence tag; M8 medium, Murashige-Skoog medium; BcCKX2, barley cytokinin oxidase/dehydrogenase 2; IPT, isopentenyltransferase; CKX, cytokinin oxidase/dehydrogenase; EC, Enzyme Commission number; ZmCKX1, maize cytokinin oxidase/dehydrogenase 1.
Received 29 April 2004; revised 14 July 2004; accepted 14 August 2004



Molekulárně-biologické a genetické studie



Mutantní rostliny

Eur. J. Biochem. 271, 3999–4002 (2004) © FEBS 2004 [doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04334.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04334.x)

Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat Cloning and heterologous expression

Petr Galuszka¹, Jitka Frébortová², Tomáš Werner³, Mamoru Yamada⁴, Miroslav Strnad², Thomas Schmilling² and Ivo Frébert¹

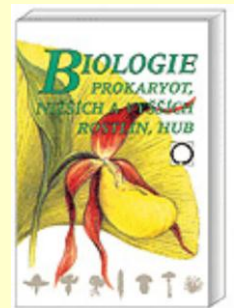
¹Division of Molecular Biology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic; ²Laboratory of Growth Regulation, Palacký University, Institute of Experimental Botany of the Academy of Sciences, Olomouc, Czech Republic; ³Institute of Biology/Applied Genetics, Free University of Berlin, Germany; ⁴Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan

The cloning of two novel genes that encode cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) in barley is described in this work. Transformation of both genes into *Arabidopsis* and tobacco showed that at least one of the genes codes for a functional enzyme, as its expression caused a cytokinin-deficient phenotype in the heterologous host plants. Additional cloning of two gene fragments, and an *in situ* search in the barley genome, revealed that the two genes, located on different chromosomes, are present in at least 13 members of the CKX gene family in barley and wheat. The expression of three selected barley genes was analyzed by RT-PCR and found to be organ-specific with peak expression in mature leaves. The barley CKX (HCKX) was characterized in detail after heterologous expression in tobacco. Interestingly, this enzyme shows a pH optimum at 4.5 and, later on, its activity was found to be inhibited by salicylic acid, an indicator to vascular targeting. Different substrate specificities, and the pH profiles of cytokinin-degrading enzymes extracted from different barley tissues, are also presented.

Keywords: cereals; cloning; cytokinin oxidase/dehydrogenase; expression; gene family.

Cytokines were initially visual in factors promoting cell division and differentiation in plants. Since then, however, they have been found to be involved in a wide range of events, such as the growth of lateral buds, the response of buds after frost damage, removal, the delay of flowering, the induction of flowering, the formation of chlorophyll formation [1]. Naturally occurring cytokinins are purine and pyrimidine derivatives, which can be synthesized or taken up by plants and act as an important or auxiliary hormone. Recently, considerable progress has been made in elucidating the role of cytokinins in plant growth, development and development. New molecular biology techniques have allowed for the identification and characterization of genes that are important in cytokinin metabolism and action. Cytokinin metabolism and action have been studied in a wide range of plant species, and this has led to a better understanding of the role of cytokinins in plant growth and development. This review discusses the role of cytokinins in plant growth and development, with a focus on the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action. The review is organized into three main sections: the role of cytokinins in plant growth and development, the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action, and the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action. The first section discusses the role of cytokinins in plant growth and development, with a focus on the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action. The second section discusses the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action, with a focus on the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action. The third section discusses the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action, with a focus on the role of cytokinins in the regulation of cytokinin metabolism and action.

Correspondence to: G. Glushchenko, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Faculty of Science, Pskov University, Pskov, 180000, Russia.
E-mail: glushchenko@pskovu.ru
Fax: +7 820 5630403; Tel.: +7 820 5630405
© 2006 Blackwell Publishing Ltd
Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd



Metody chemické analýzy

- Stopová analýza (ng/g)
- Složitá matrice
- Velký počet metabolitů
- Extrakce
- Izolace
- analýza



LOD amol-fmol

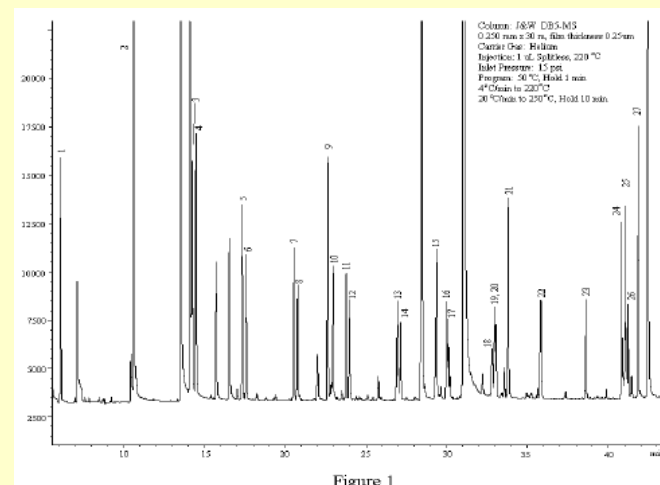
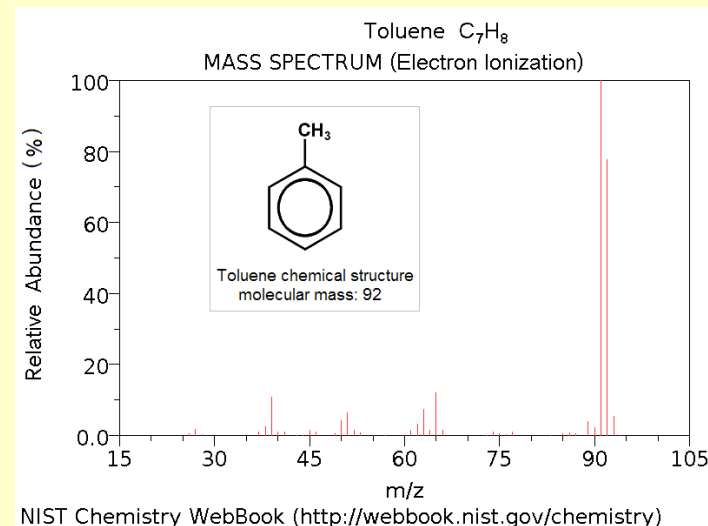
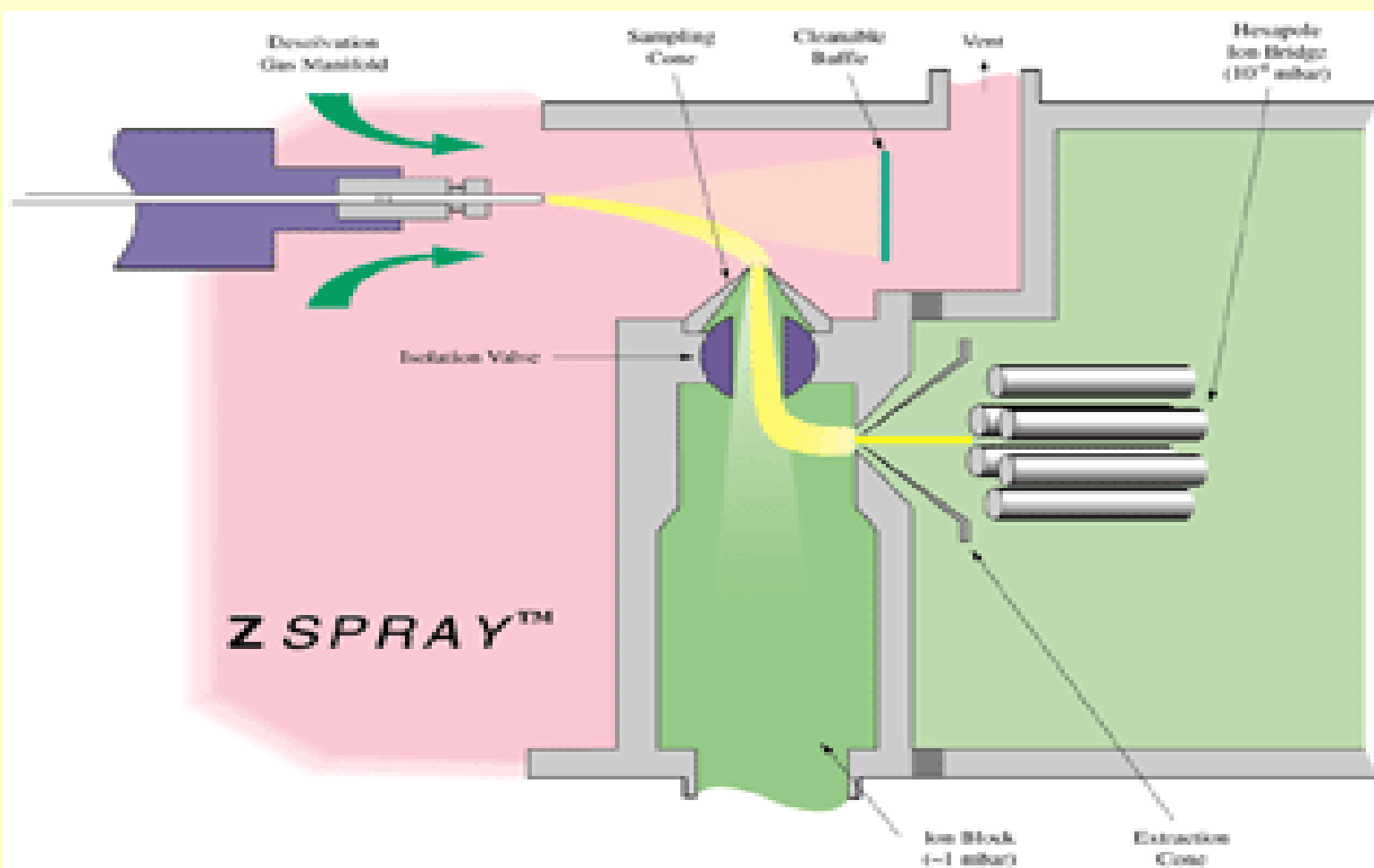


Figure 1



Hmotnostní spektrometrie ionizace elektrosprejem





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

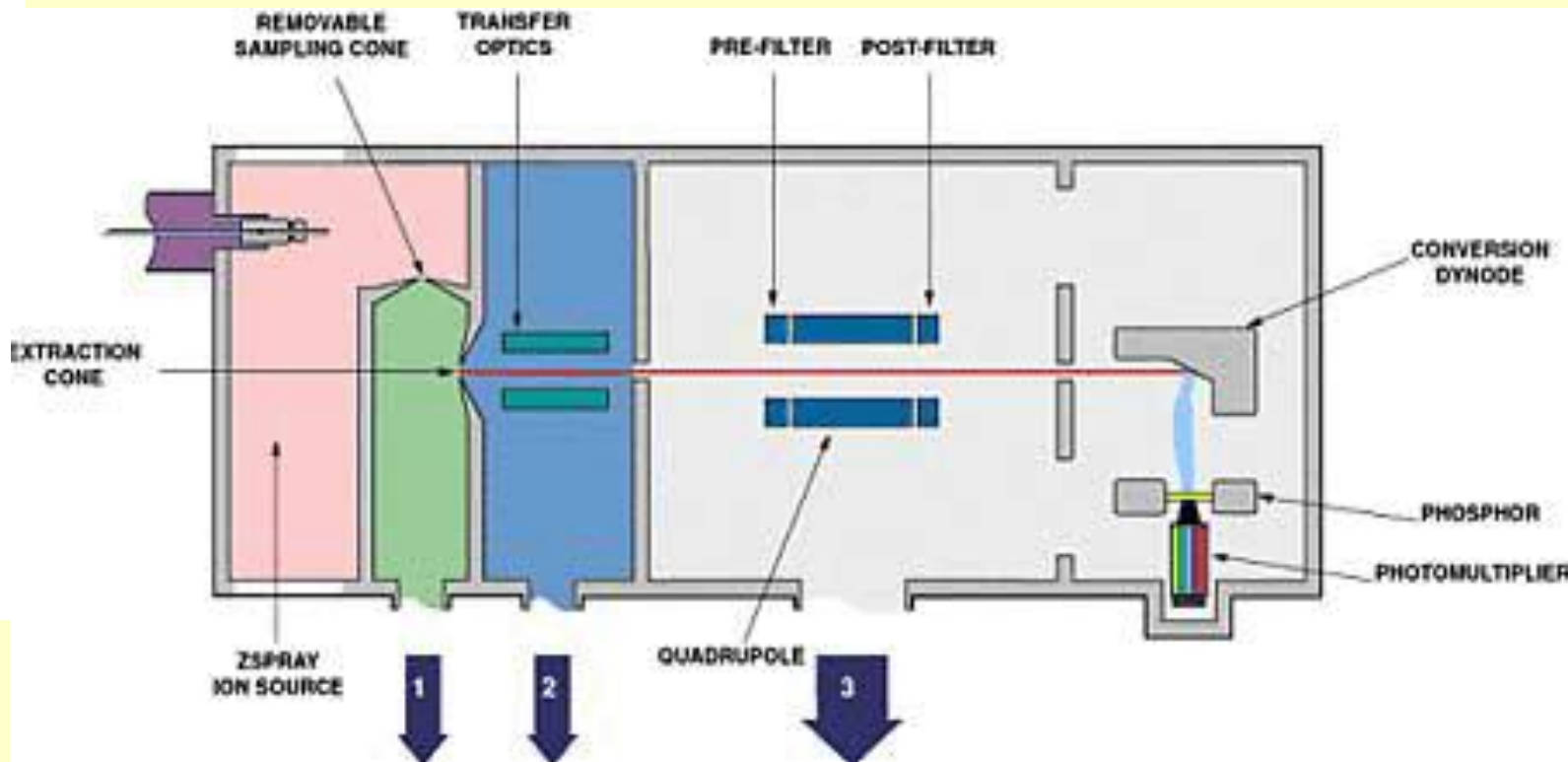


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Hmotnostní spektrometrie

kvadrupolový analyzátor





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

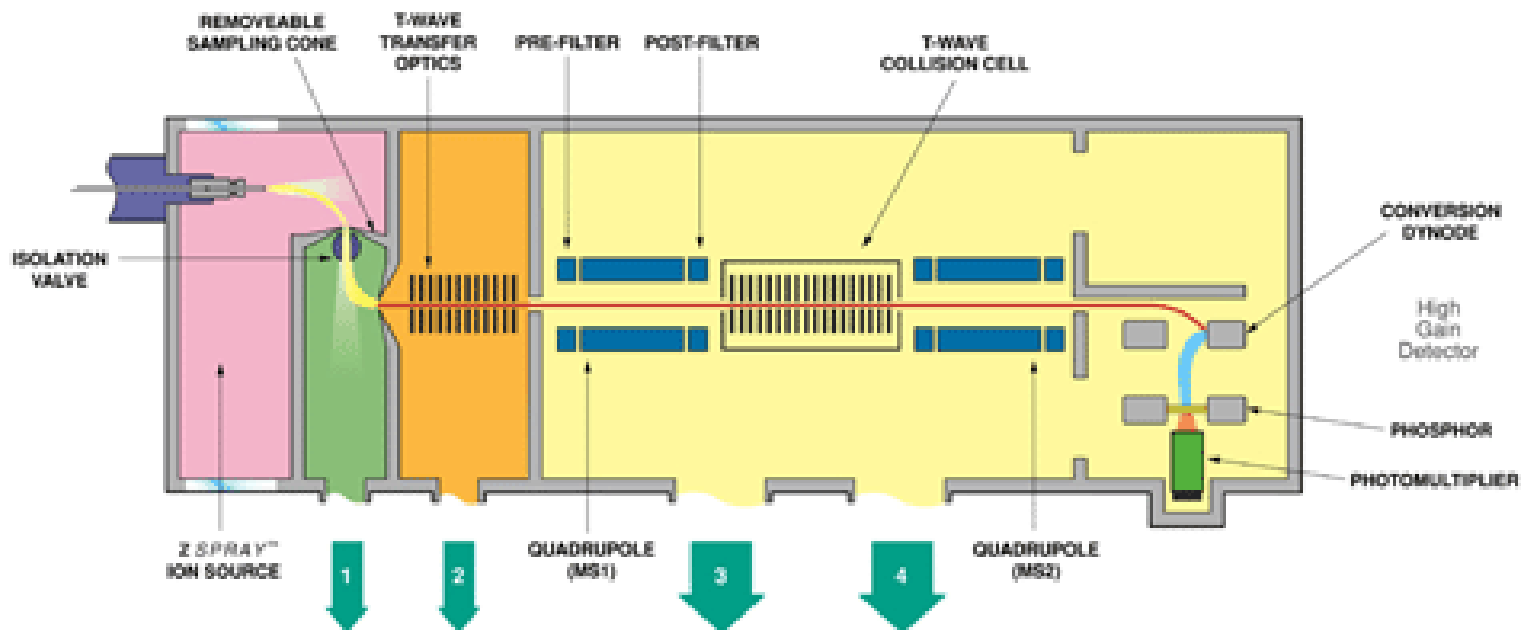


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

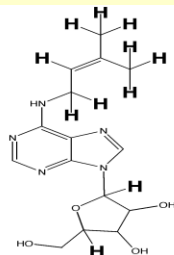
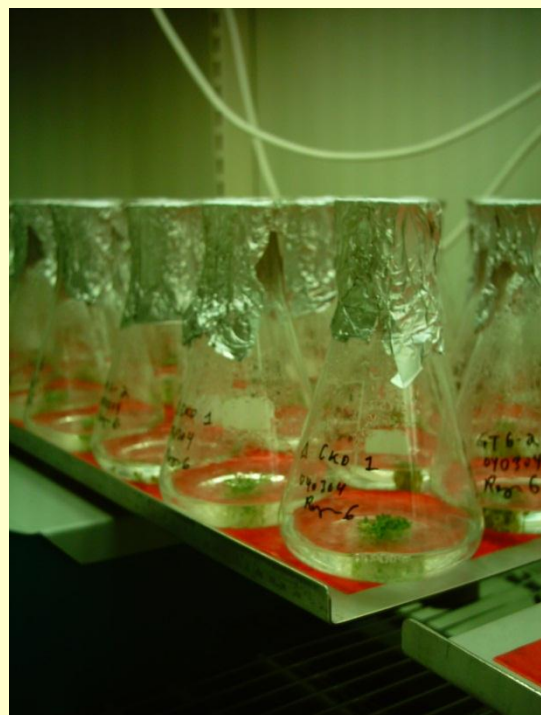
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Hmotnostní spektrometrie

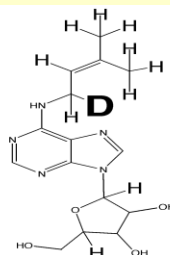
trojitý kvadrupolový analyzátor



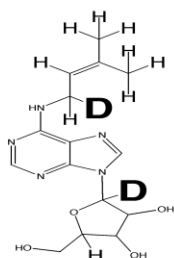
In vivo deuterium labeling



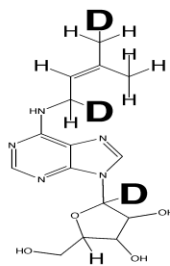
Exact Mass: 335,1594
IPA, No Isotopic Species



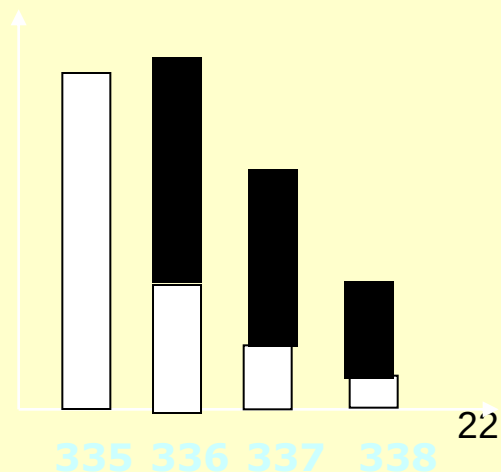
Exact Mass: 336,1655
IPA, 1 st Isotopomer



Exact Mass: 337,1717
IPA, 2 nd Isotopomer



Exact Mass: 338,1779
IPA, 3 d Isotopomer





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

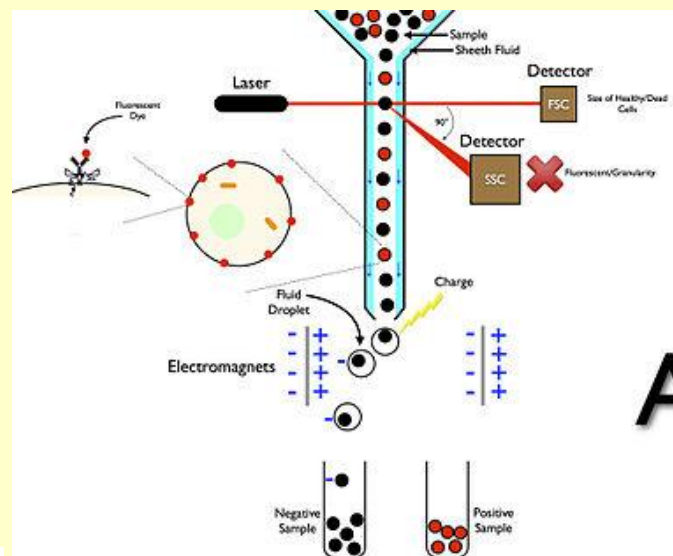
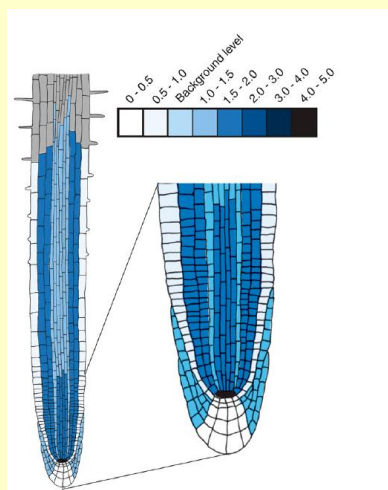


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

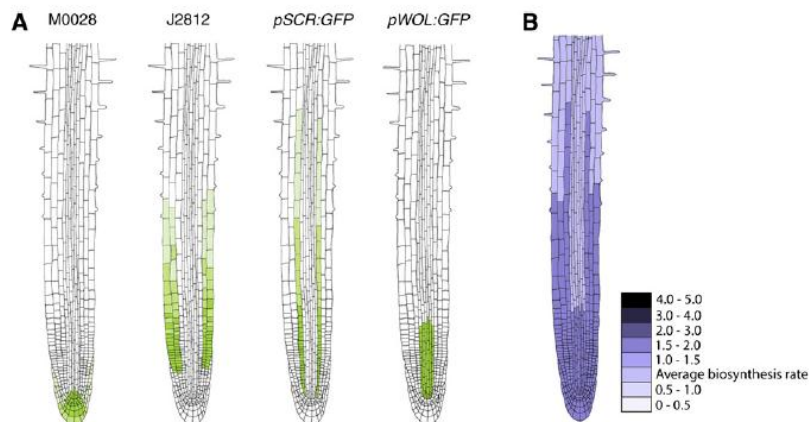
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Syntéza IAA

- Izolace protoplastů, Cell sorting
- GC-MS/MS



A



Radioizotopy

^3H – poločas rozpadu 12 let, slabý beta- zářič, radius ve vodě 0,0006 cm

^{14}C - poločas rozpadu 5700 let, slabý beta- zářič, radius ve vodě 0,028 cm

^{32}P - poločas rozpadu 14 dnů, beta- zářič, radius ve vodě 0,8 cm

Dále ^{35}S , (81d), ^{125}I (60d)

Absolutní aktivita látky se udává jako počet dezintegrací za sekundu (s^{-1}) – Bq (Ci), přičemž platí:

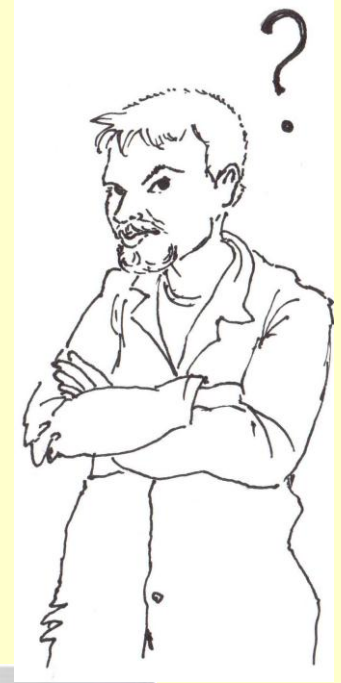
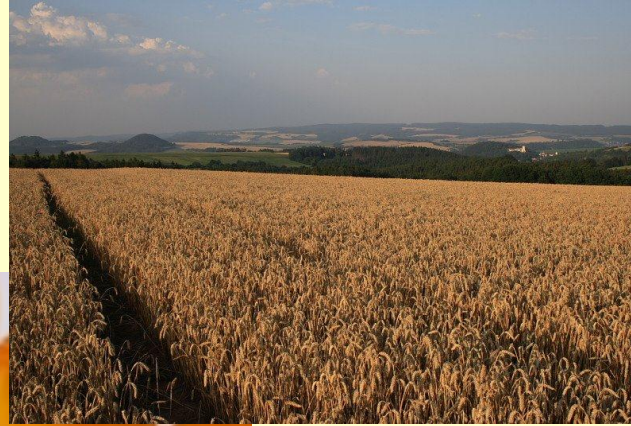
$$1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq (37 GBq)}$$

Scintilační počítač

K měření aktivity málo energetického záření β –scintilační počítače, koktejly (kapalné scintilátory)



K čemu to všechno?





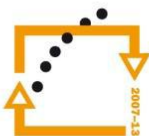
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Věda a výzkum

- Základní výzkum (poznání)
 - Aplikovaný výzkum (praktické použití)
1. Kde, kdo a jak?
 2. Za co?
 3. Výsledky práce (články, knihy, patenty...)
 4. Hodnocení výsledků

Výzkumná centra



BIOMEDREG



C. R. HANÁ



RCPTM

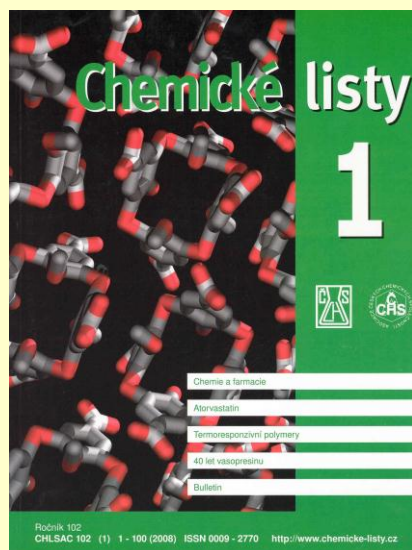
BIOMEDREG – Biomedicína pro regionální
rozvoj a lidské zdroje

C. R. Haná – Centrum regionu Haná pro
biotechnologický a zemědělský výzkum

RCPTM – Regionální centrum pokročilých
technologií a materiálů

Vědecké časopisy

- Rozdělení podle oborů
- Multioborové
- Redakční rada, oponenti
- Impaktové faktory





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Hodnocení vědců

- Počet článků (kvalita časopisů)
- Citační ohlas
- Hirschův index



Patenty, přednášky v zahraničí

Vědecké konference, přednášky –
plenární, zvané, ostatní



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



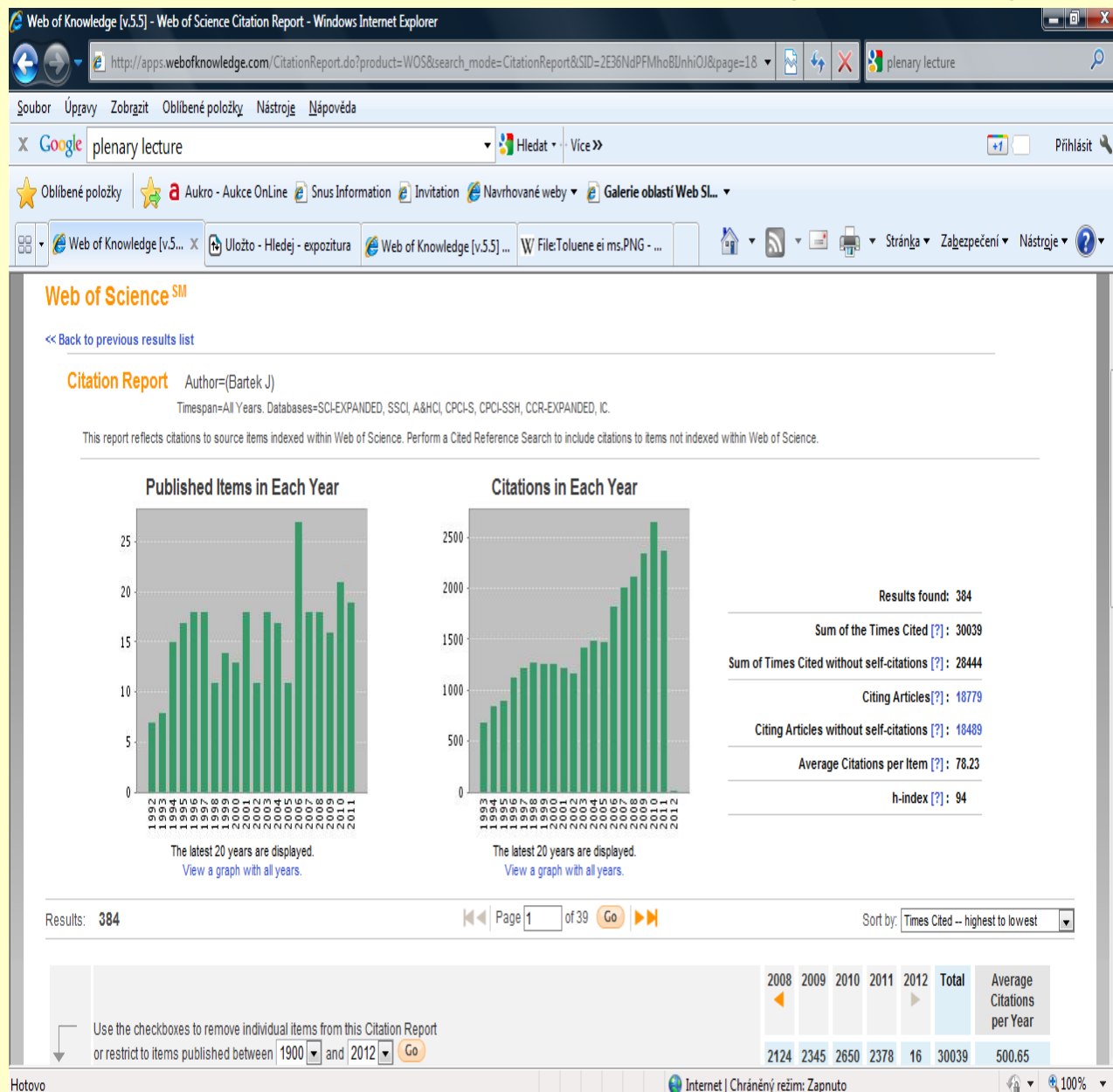
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Databáze vědeckých výsledků



Hvězdy v oboru





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Základy chemických výpočtů

- Požadované minimum znalostí
- Hlavní nedostatky
- Příklady písemných testů



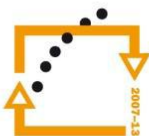
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Požadované minimum znalostí

- Základní orientace v PSP (názvy, symboly)
- Anorganické a organické názvosloví
- Základní jednotky (předpony)
- Oxidační číslo
- Vyčíslování rovnic
- Základní stechiometrické výpočty
- Příprava a ředění roztoků
- Výpočet pH silných kyselin a zásad



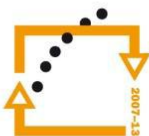
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Hlavní nedostatky

- Obecná chemická terminologie – pochopení zadání (příklady ze skript)
- Jednotky a převody jednotek
- Matematické úpravy složitějších vztahů