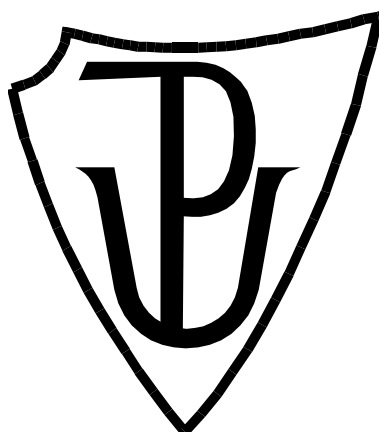


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Biosyntéza giberelinů - studium  $3\beta$ -hydroxyláz (GA3ox)**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vypracovala:	<b>Bc. Michaela Němcová</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	11. 4. 2016

## Biobliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Michaela Němcová
Název práce	Biosyntéza giberelinů - studium $3\beta$ -hydroxyláz (GA3ox)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, PřF UP Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Tato diplomová práce se zabývá studiem jednoho z enzymů zapojených do biosyntézy giberelinů - <math>3\beta</math>-hydroxylázy (GA3ox). Teoretická část práce se věnuje především samotným giberelinům, jejich vlastnostem a metabolismu v rostlinách se zaměřením na biosyntetické enzymy a možnosti jejich inhibice. Dále je uveden přehled analytických metod, které byly do současnosti použity k izolaci a ke stanovení giberelinů. Experimentální část práce je pak členěna na dva oddíly, z nichž první se věnuje izolaci GA3ox z pšenice (<i>Triticum aestivum</i>) a ověření jejího využití pro <i>in vitro</i> testování syntetických inhibitorů. Druhá část experimentální práce se pak zabývá stanovením giberelinů jako prekurzorů a produktů biosyntetických reakcí, jichž se <math>3\beta</math>-hydroxyláza účastní. Jako rostlinný model byla vybrána řeřicha setá <i>Lepidium sativum</i>, v níž byl obsah giberelinů stanoven metodou ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.</p>
Klíčová slova	Gibereliny, biosyntéza, metabolismus, $3\beta$ -hydroxylázy, <i>Lepidium sativum</i> , <i>Triticum aestivum</i>
Počet stran	81
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Biobibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Michaela Němcová
Title of thesis	Gibberellin biosynthesis – the study of 3 $\beta$ -hydroxylases (GA3ox)
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, UP Olomouc
Supervisor	M.Sc. Danuše Tarkowská, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>This thesis deals with the study of one of the enzymes involved in the biosynthesis of gibberellins - 3<math>\beta</math>-hydroxylase (GA3ox). The theoretical part focuses primarily to gibberellins themselves, their properties, metabolism in plants with respect to biosynthetic enzymes and their potential inhibition. Further, the thesis contain an overview of analytical methods that have been used for isolation and determination of gibberellins. The experimental part of the work is divided into two sections, the first of which is devoted to the isolation of GA3ox from wheat (<i>Triticum aestivum</i>) and verification of its use for the testing of synthetic inhibitors <i>in vitro</i>. The second part of the experimental work deals with the determination of gibberellins including precursors and products of biosynthetic reactions, in which 3<math>\beta</math>-hydroxylase is involved. The garden cress <i>Lepidium sativum</i> was chosen as model plant, in which gibberellin content was determined using ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).</p>
Keywords	Gibberellins, biosynthesis, metabolism, 3 $\beta$ -hydroxylases, <i>Lepidium sativum</i> , <i>Triticum aktivum</i>
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Czech

## **PROHLÁŠENÍ**

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Danuše Tarkowské, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 11. 4. 2016

.....

Touto cestou bych chtěla vyjádřit své upřímné poděkování za vědecký přístup ve vedení práce, věnovaný čas, cenné rady, hodnotné a důležité připomínky svoji vedoucí diplomové práce Mgr. Danuši Tarkowské, Ph.D. Dále děkuji Mgr. Martině Kopečné, Ph.D a Mgr. Davidovi Kopečnému, Ph.D z Oddělení biochemie proteinů a proteomiky CR Haná za přípravu enzymu GA3ox. Děkuji také panu prof. Peterovi Heddenovi za objasnění funkce buněčných lyzátů. Nespornou zásluhu na průběhu mé diplomové práce, a to konkrétně na přípravě vnitřních standardů giberelinů a cenné rady, měla Mgr. Andrea Novotná. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při studiu a všem pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za příjemnou atmosféru, ochotu a pomocné rady v nelehkých chvílích bádání.

## Seznam použitých zkratk a symbolů

<b>ABA</b>	kyselina abscisová
<b>ACN</b>	acetonitril
<b>ANS</b>	anthocyanin syntéza
<b>ATP</b>	adenosin trifosfát
<b>CPP</b>	copalyl difosfát
<b>CPS</b>	<i>ent</i> -copalyl difosfát syntáza
<b>DTT</b>	dithiotreitol
<b>EKO</b>	<i>ent</i> -kauren 19-oxidáza
<b>FA</b>	formid acid
<b>FW</b>	fresh weight
<b>GAP</b>	glyceraldehyd-3-fosfát
<b>GAs</b>	gibereliny
<b>GGPP</b>	geranylgerenyl difosfát
<b>GID1</b>	GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IAA</b>	indol 3-yl octová kyselina
<b>IPP</b>	isopentenyl difosfát
<b>KAO</b>	<i>ent</i> -kaurenoic acid oxidáza
<b>KO</b>	<i>ent</i> -kauren oxidáza
<b>KS</b>	<i>ent</i> -kauren syntáza
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie
<b>LLE</b>	extrakce kapalina-kapalina (liquid – liquid extraction)
<b>LOD</b>	limit of detection
<b>MCH</b>	mepiquat-chlorid
<b>MRM</b>	multiple reaction monitoring
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>ODDs</b>	2-oxoglutarát dependentní dioxygenázy
<b>PIF</b>	phytochrome interacting factors
<b>SPE</b>	extrakce na pevné fázi ( <i>angl.</i> solid phase extraction)
<b>TCA</b>	trikarboxylové kyseliny
<b>XET</b>	xyloglukan endotransglykolázy

# OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů.....	6
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>10</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
3.1 Historie giberelinů.....	11
3.2 Současnost giberelinů.....	13
3.3 Metabolismus giberelinů.....	17
3.3.1 Biosyntéza giberelinů.....	17
3.3.2 Konjugace giberelinů.....	21
3.3.3 Degradace giberelinů.....	21
3.3.4 Regulace homeostázy a signalingu giberelinů.....	22
3.4.1 2-oxoglutarát dependentní dioxygenázy v biosyntéze giberelinů.....	25
3.5 Inhibitory biosyntézy giberelinů.....	29
3.5.1 Onium sloučeniny.....	29
3.5.2 Sloučeniny s heterocyklem obsahujícím atom dusíku.....	30
3.5.3 Látky strukturně napodobující 2-oxoglutarát.....	30
3.5.4 16,17-dihydro-deriváty GA <sub>5</sub> .....	31
3.6 Metody chemické analýzy giberelinů.....	33
3.6.1 Příprava vzorků.....	33
3.6.2 Instrumentální metody analýzy giberelinů.....	35
3.6.3 Kapalinová chromatografie (LC).....	36
3.6.4 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	37
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>39</b>
4.1 Biologický materiál.....	39
4.2 Chemikálie.....	39
4.3 Pracovní materiál.....	40
4.4 Přístrojové vybavení.....	40
4.5 Pracovní postupy.....	41
4.5.1 Exprese GA3ox2, jeho extrakce a purifikace.....	41
4.5.2 Sterilizace semen řechy seté.....	41
4.5.3 Příprava kultivačního média dle Murashige & Skooga.....	42
4.5.4 Příprava mobilní fáze pro UHPLC.....	42
4.5.5 Test aktivity GA3ox enzymu <i>in vitro</i> – reakce dle MacMillan a kol., 1997.....	42

4.5.6 Test aktivity GA3ox enzymu <i>in vitro</i> - reakce navržena dle McNeil a kol., 2005 .....	44
4.5.7 Kultivace rostlin řeřichy seté <i>in vitro</i> .....	44
4.5.8 Stanovení průměrné délky kořene a nadzemní části semenáčků řeřichy seté <i>L. sativum</i> pomocí programu ImageJ .....	45
4.5.9 Příprava biologického materiálu pro analýzu giberelinů pomocí UHPLC-MS/MS .....	46
4.5.10 Stanovení giberelinů metodou UHPLC-MS/MS .....	48
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>50</b>
5.1 Detekce giberelinů po reakcích s enzymem GA3ox <i>in vitro</i> .....	50
5.2 Vliv délky reakční doby na obsah giberelinů v reakční směsi .....	53
5.3 Optimalizace postupu povrchové sterilizace semen řeřichy seté <i>Lepidium sativum</i> s ohledem na vliv endogenních hladin sledovaných giberelinů .....	54
5.4 Studium role GA3ox inhibitorů na endogenní hladiny giberelinů .....	56
5.5 Stanovení průměrné délky kořene a nadzemní části semenáčků řeřichy seté <i>L. sativum</i> .....	61
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>69</b>



# 1 ÚVOD

Ačkoli mají rostlinné hormony (fytohormony) charakter nízkomolekulárních látek (disponují molekulovou hmotností do 1000 Da), podílejí se přesto zcela neodmyslitelným způsobem na regulaci růstu a vývoje rostlin. Klíčovou roli hrají v oblasti komunikace mezi buňkami, pletivy a orgány v průběhu životního cyklu rostlin. Do jisté míry mohou být označovány jako integrátory vnějších a vnitřních signálů. Obecně fungují u rostlin jako endogenní signální molekuly, jejichž efekt je buď stimulační, nebo inhibiční v závislosti na koncentraci a místě účinku. V rostlinách se navíc kromě fytohormonů vyskytují i jiné látky, které se rovněž vyznačují regulační aktivitou, ale od fytohormonů se zásadně liší zejména vyššími koncentracemi a méně obecnými účinky.

Gibereliny (GAs) tvoří jednu z devíti v současnosti známých skupin rostlinných hormonů. Jde o látky terpenoidního charakteru mezi jejichž hlavní fyziologické účinky se řadí navození kvetení a klíčení, stimulace prodloužování stonku a zpoždění senescence v listech a citrusových plodech. Část skupiny více než 136 dnes známých giberelinů tvoří gibereliny vykazující biologickou aktivitu, část odpovídá jejich katabolickým produktům a část tvoří prekurzory giberelinů bioaktivních.

Charakteristickým znakem giberelinů, stejně jako dalších signálních molekul hormonální povahy je, že působí při velmi malých koncentracích ( $10^{-9}$  –  $10^{-15}$  mol /g čerstvé hmoty, v závislosti na typu pletiva). Z tohoto důvodu je nutné zvolit takovou metodu izolace a stanovení, která umožní takto nízké koncentrace úspěšně detekovat. Pro izolaci GAs se zejména používají různé druhy extrakce, jejíž účinnost v případě rostlinných pletiv nezávisí pouze na subcelulární lokalizaci GA, ale také na polaritě jeho molekuly a míře v jaké je asociován s ostatními molekulami v matici (fenolické látky, lipidy, pigmenty apod.). Pro analytické instrumentální metody stanovení GAs platí hlavně požadavek na vysokou citlivost a selektivitu umožňující detekci stopových množství GAs (ppq a nižší) v obrovském nadbytku interferujících látek běžně se vyskytujících v rostlinných pletivech (matrice).

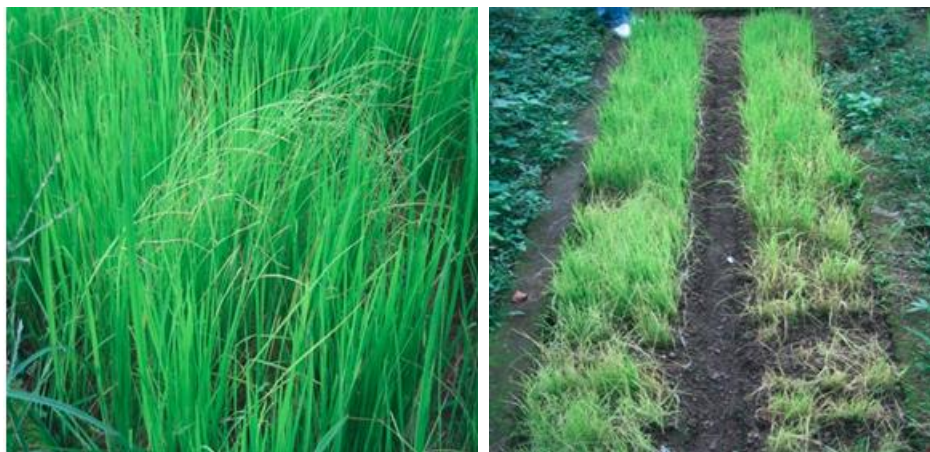
## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce bylo vypracování literární rešerše na téma biosyntéza giberelinů v rostlinách se zaměřením na biosyntetické enzymy typu dioxygenáz, jejich funkce a možnosti inhibice. Dalším cílem pak bylo izolovat jeden GA biosyntetický enzym typu dioxygenázy,  $3\beta$ -hydroxylázu (GA3ox), z jednoho ze známých rostlinných druhů a použít ji pro *in vitro* reakci vedoucí k tvorbě bioaktivních giberelinů. Posledním cílem předložené diplomové práce pak bylo kvantifikovat biosyntetické prekurzory a produkty GA3ox v semenáčcích řechy seté kultivované *in vitro* za přítomnosti vybraných zástupců inhibitorů GA3ox.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Historie giberelinů

Na rozdíl od živočichů se u rostlin vyvinul v jejich vývoji vysoký stupeň proměnlivosti. Každá rostlinná buňka je údajně "kmenovou buňkou" schopnou se vyvinout v širokém spektru vývojových stádií v odpovědi na přítomnost rostlinných hormonů. Rovněž na rozdíl od živočichů, nemají rostliny jasně určený zdroj a cílový orgán působení hormonů. Každá signální dráha fytohormonu se skládá ze dvou nezbytných částí, kontroly nashromáždění hormonu a vnímavosti jeho signálu. Prvními identifikovanými rostlinnými hormony byly gibereliny, jejichž objev byl započat už koncem 19. století. Tehdy bylo v Japonsku a na celém Dálném Východě už od roku 1809 velmi rozšířeno onemocnění rýže (*Oryza sativa*), které bylo známé jako "pošetilá sazenice" nebo *bakanae* (v japonštině). Onemocnění se projevovalo nadměrným prodlužováním stonků rýže vedoucí k nedostatečné tvorbě mechanických pletiv u napadené rostliny vedoucí k lámavosti stonků (Obr. 1), dále k žloutnutí listů, vadnutí a nakonec úhynu rostliny. To způsobovalo zemědělcům obrovské škody (přišli až o 40 % výnosu) a měli tudíž enormní zájem zjistit, co nemoc způsobuje a jak ji zabránit. První vědecký popis této nemoci byl publikován v roce 1898 japonským vědcem Shotaro Horim, který ukázal, že nemoc způsobuje patogenní houba *Gibberella fujikuroi* (dnes *Fusarium moliniforme*) napadající rostliny rýže (Hori, 1898). V roce 1926 Eiichi Kurosawa ukázal, že sekret houby má stejný růstově stimulační účinek i bez infekce rostliny houbou, tj. že houbový patogen napadající tyto rostliny produkuje látku, která by mohla stimulovat extrémní prodlužování výhonků rýže (Kurosawa, 1926). Zároveň konstatoval, že tento účinek není způsoben působením enzymu, ale spíše nějakou „chemikálií“.

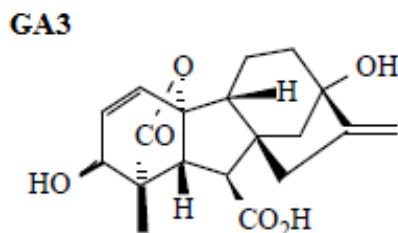


**Obr. 1.** Projevy *bakanae* nemoci u rýže infikované *Gibberella fujikuroi* způsobující prodloužení a zakrnění rostlin (převzato a upraveno z [www.agriskmanagementforum.org](http://www.agriskmanagementforum.org)).

Po Kurosawově vědeckém článku začalo mnoho rostlinných patologů izolovat ze sekretu houby aktivní substanci, o čemž svědčí více než 50 vědeckých prací publikovaných mezi lety 1927 a 1940, a to hlavně v Japonsku. V roce 1934 dostala sloučenina název ‚kyselina fusarová‘ (Yabuta a kol., 1934), ale už o rok později ji byl název změněn na ‚giberelin‘ podle názvu houby, která ji produkovala (Yabuta, 1935). V roce 1938 se pak podařilo získat dvě krystalické substance označené jako ‚giberelin A‘ a ‚giberelin B‘ (Yabuta a Sumiki, 1938). Druhá světová válka experimenty zastavila a po jejím skončení se výzkum v tomto směru znovu rozběhl, tentokrát už i v jiných zemích. Ve Spojených státech byla vyvinuta fermentační technika pro masivní produkci giberelinů a izolovány dvě látky označené jako ‚giberelin A‘ a ‚giberelin X‘ (Stodola a kol., 1955). Nezávisle na výzkumech v USA byla ve Velké Británii získána nová aktivní substance, ‚kyselina giberelová‘, s podobnými biologickými, ale různými chemickými a fyzikálními vlastnostmi (Curtis a Cross, 1954). V Japonsku bylo po válce přezkoumáno složení ‚giberelinu A‘, přičemž bylo zjištěno, že obsahuje tři sloučeniny, které pojmenovali giberelin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> a A<sub>3</sub> (Takahashi a kol., 1955). Postupem času se ukázalo, že GA<sub>3</sub> odpovídá ‚giberelinu X‘ a ‚kyselině giberelové‘, a že giberelin A<sub>1</sub> je tentýž jako ‚giberelin A‘ nalezený v tomtéž roce v USA. Dodnes ale zůstalo záhadou, co je Yabutův ‚giberelin B‘. Takahashiho systém značení GAs se vžil pro všechny ostatní gibereliny, které byly později izolovány (číslují se v pořadí jejich objevu), a používá se dodnes. Poslední z nich má označení GA<sub>136</sub> (Hedden a Thomas, 2012).

První objeveným giberelinem a zároveň jedním ze zástupců giberelinů s biologickou aktivitou vyskytující se přirozeně v rostlinách, je již zmíněná kyselina giberelová GA<sub>3</sub> (Obr. 2). Ta, stejně jako ostatní gibereliny, má vliv na dlouhivý růst buněk, a to jak u stonku, tak i u kořene rostliny (Taiz a Zeiger, 2010). Krom tohoto účinku se GAs dále podílí na přerušení dormance semen, čímž lze docílit klíčení semen rostlin, které jinak vyžadují dormanci za chladu, aby následně klíčily. Z neopomenutelných účinků GAs je ještě dále potřeba se zmínit o podpoře tvorby pylu a růstu pylové láčky a indukci kvetení. Proto mutantní rostliny, které mají ovlivněnu biosyntézu nebo signaling GAs, vykazují změny v klíčení a ve stádiu dospělosti jsou zakrslé, tmavě zelené a mají opožděné kvetení (Davière a Achard, 2013). Přestože jich v různých přírodních zdrojích (cévnaté rostliny, houby, bakterie) bylo k dnešnímu dni identifikováno více než 130, biologickou aktivitou se vyznačuje pouze několik z nich (Yamaguchi, 2008). Jsou to zejména GAs nesoucí v poloze C3 hydroxylovou skupinu (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>7</sub>). Bioaktivní GAs mohou být v rostlině inaktivovány různými mechanismy založenými na strukturální modifikaci bioaktivní molekuly (metylace, hydroxylace). Nejběžnější deaktivující reakcí je pak

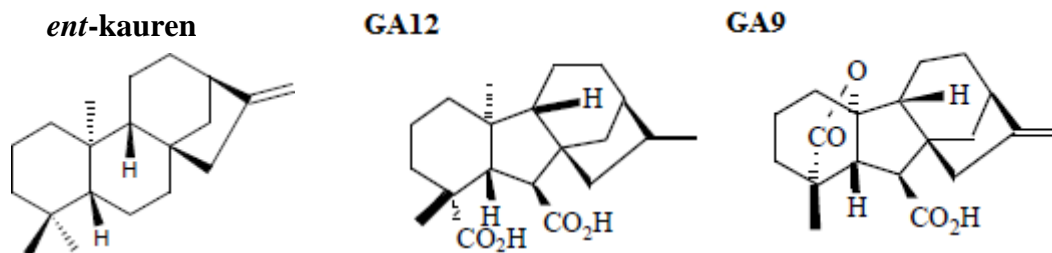
hydroxylace GA v poloze C2 pomocí GA 2-oxidázy probíhající v cytosolu rostlinných buněk (Urbanová a kol., 2011). Biosyntéza biaktivních GAs představuje z hlediska buněčných kompartmentů třístupňový proces zahrnující: a) tvorbu *ent*-kaurenu z geranylgeranyl difosfátu (GGPP) odehrávající se v proplastidu buněk za účasti kauren syntázy (KS), b) následnou tvorbu GA<sub>12/53</sub> z *ent*-kaurenové kyseliny v endoplazmatickém retikulu pomocí kaurenoxidázy (KAO) a nakonec tvorbu aktivních GAs v cytosolu postupnými oxidačními kroky, jichž se účastní hlavně GA 20-oxidáza a GA 3-oxidáza (Urbanová a kol., 2011) – viz kapitola 2.3.1.



**Obr. 2.** Struktura kyseliny gibberelové GA<sub>3</sub>

### 3.2 Současnost giberelinů

Gibereliny představují skupinu hormonů obsahující biologicky aktivní sloučeniny, jejichž distribuce je zaznamenána v širokém spektru rostlin, v plísních ba dokonce i v bakteriálních druzích (Urbanová a kol., 2011). Strukturně představují gibereliny skupinu tetracyklických (kruhy A, B, C, D) diterpenoidních karboxylových kyselin obsahující *ent*-giberelanový (obsahuje 20 atomů uhlíku) nebo 20-nor-*ent*-giberelanový skelet (obsahuje jen 19 uhlíkových atomů), tzn., že ve smyslu počtu uhlíků mohou být GA rozděleny do dvou skupin: C<sub>19</sub>-GA (např. GA<sub>9</sub>) a C<sub>20</sub>-GA (např. GA<sub>12</sub>) - Obr. 3. Předpona *ent* se vztahuje k faktu, že skelet GA je odvozen od *ent*-kaurenu (Obr. 3), tetracyklického uhlovodíku, který je enantiomerem k přirozeně se vyskytující sloučenině kaurenu (Podlešáková a kol., 2012).



**Obr. 3.** Struktura *ent*-kaurenu, C-19 (GA<sub>12</sub>) a C-20 (GA<sub>9</sub>)

Gibereliny jsou slabé organické kyseliny málo rozpustné ve vodě ( $pK_a \approx 4.0$ ). Navzájem se liší přítomností laktonového kruhu a zároveň počtem a polohou hydroxylových a karboxylových skupin. Většina z nich představuje prekurzory aktivních giberelinů nebo produkty jejich inaktivace, některé jsou pouze možnými artefakty získaných při chemických analýzách (Šetlík a kol., 2004).  $C_{19}$ -GAs zahrnují biologicky aktivní formy, které obsahují hydroxylové skupiny na  $C-3\beta$ ,  $\gamma$ -lakton mezi  $C-4$  a  $C-10$  a současně volnou karboxylovou skupinu v pozici  $C-6$  z důvodu optimálního navázání k  $GID1$  receptoru, zatímco hydroxylace na  $C-2\beta$  způsobí ztrátu vazby a zároveň ztrátu jejich biologické aktivity (Murase a kol., 2008, Shimada a kol., 2008). Klíčové mechanismy pro inaktivaci GAs nezbytné pro regulaci velikosti zásob aktivního hormonu, dále zahrnují metylaci a glukosylaci karboxylové skupiny, a epoxidaci na  $C-16$ ,  $C-17$  za vzniku  $16\alpha,17$ -epoxidů (Hedden a Thomas, 2012). Charakteristickým rysem biologicky aktivních GAs jsou hydroxylové skupiny na  $C-3$  a karboxylová skupina na  $C-6$ , jejichž nepřítomnost vede ke ztrátě aktivity (Harberd a kol., 2008). Tyto skupiny jsou schopny zvýšit vazbu na receptor prostřednictvím interakce s polárními zbytky aminokyseliny, zatímco hydroxyskupina na  $C-2$  způsobí, že se GAs do receptoru neváže. Tato reakce tvoří důležitý mechanismus v regulaci koncentrace GAs u krytosemenných rostlin (v květu).

Gibereliny tvořené v nadzemní části rostliny jsou do kořenů transportovány floémem, zatímco xylémem jsou GAs tvořené v kořenech transportovány do nadzemní části rostliny (Pavlová 2005). Fyziologické účinky GAs jsou různé a často druhově specifické. Jak již bylo řečeno výše, mezi základní projevy patří stimulace růstu stonku, klíčení semen, překonávání dormance, nahrazení jarovizace (období nízkých teplot, při kterém se rostliny stávají citlivé k fotoperiodě a začínají kvést), stimulace přechodu z juvenilní fáze rostliny do fáze reprodukce hlavně mají i druhově specifický vliv na pohlaví květu (Pavlová, Fischer 2011).

GAs společně s auxiny (IAA) výrazně stimulují prodlužovací růst rostlin. Na rozdíl od auxinů, které působí elongačně na celou rostlinu a zároveň stimulují růst i u segmentů rostlin, působí gibereliny pouze v nadzemní části rostliny, čímž aktivují prodlužovací růst stonku způsobený rozvolněním buněčné stěny u intaktních rostlin (Procházka, Macháčková a kol., 2003). Stimulace prodlužovacího růstu u rostlin je spojena s aktivitou enzymu xyloglukanendotransglykolázy (XET), který je schopen hydrolyzovat xyloglukan, měnit orientaci molekul v buněčných stěnách a umožňovat penetraci expanzinů (strukturní proteiny buněčné stěny, klíčové pro zvětšování buněk, narušující vodíkové můstky mezi celulózními mikrofibrilami a hemicelulózami) do buněčné stěny. Při této regulaci spolupracují IAA a GAs za předpokladu, že IAA reguluje některé pozdější kroky

v biosyntéze GAs (Šetlík a kol., 2004). Pomocí zakrslých mutantů (hrachu a rýže) můžeme v prodlužovacím růstu rostliny dokázat účast některých GAs v jejich regulaci tím, že se u těchto rostlin vyskytují ve velmi nízkých koncentracích a jejich zakrslý vzrůst lze kompenzovat aplikací exogenních giberelinů (Macháčková, 1998). Bylo dokázáno, že nejaktivnějším GA ve stimulaci dlouhivého růstu je GA<sub>1</sub>, který ovlivňuje buněčné dělení v přechodu z fáze G1 do fáze S, jenž je obvykle zkrácená, takže díky tomuto působení dochází ke zvětšení velikosti a počtu buněk (Procházka, Šebánek 1997).

Gibereliny společně se světlem a dalšími hormony (ABA, etylen) regulují klíčení (Obr. 4) a s tím související dormanci semen (Leubner-Metzger, 2001).



**Obr. 4.** Klíčení semene

(převzato z <http://www.salviaparadise.cz/clanky-rady-navody-kliceni-semen-vysev-c-254255.html>)

Gibereliny se v embryu nacházejí ve vázané formě. Po nabobtnání semene tyto fytohormony uvolní a embryo syntetizuje gibereliny *de novo*. Takto syntetizované gibereliny se poté dostávají do aleuronové vrstvy, kde indukují tvorbu enzymu  $\alpha$ -amylázy. O délce dormance rozhoduje zejména vzájemný poměr koncentrací výše zmíněných hormonů (Macháčková, 1998).

Mezi nejkritičtější období v životním cyklu rostlin patří pravděpodobně přechod z vegetativní do reprodukční fáze. Z tohoto důvodu je přechod ke kvetení regulován na několika úrovních. U většiny rostlin je kvetení ovlivňováno různými environmentálními signály, nejčastěji teplotou a délkou dne. Mezi vnitřní faktory se pak řadí vývojový stav rostliny, její stáří a velikost (Amasino, 2004). S tímto faktem dále souvisí jev zvaný „jarovizace“. Pro řadu rostlin je nezbytné, aby byly po nějakou dobu vystaveny nízkým teplotám. Tím se stanou citlivé k samotné fotoperiodě a začnou kvést (Macháčková, 1998). Procesem jarovizace označujeme vystavování rostliny nízkým teplotám (0 až 4 °C) po dobu nejméně 21 dní. Tento parametr zajišťuje, že rostliny nevykvetou před začátkem zimy, například v přechodně výhodných podmínkách teplého podzimu (Cetková, 2006).

U dlouhodobých rostlin (kvetení urychlováno fotoperiodou delší než hraniční - kritická-  
délka dne, tj. 10 až 14 hodin) indukují GAs kvetení, které ve vegetativním stavu vytváří  
přízemní růžici. Na druhou stranu u některých dlouhodobých, krátkodobých (kvetení  
urychlováno fotoperiodou kratší než hraniční délka dne), ale i neutrálních rostlin (nejsou  
závislé na fotoperiodě) GAs tento účinek nemají. Z tohoto důvodu převládal názor, že  
indukce kvetení vyvolaná GAs je spjata se stimulací dlouhivého růstu (Macháčková,  
1998). Na modelovém organismu huseníčku rolního *Arabidopsis thaliana* (dlouhodobní  
rostlina) bylo ale dokázáno, že pokud dojde k narušení biosyntézy GAs, pak tyto rostliny  
kvetou za podmínek krátkého dne velmi pozdě, z čehož vyplývá, že funkce GAs je  
nezbytná pro indukci kvetení za podmínek krátkého dne a zároveň přímo nesouvisí se  
stimulací dlouhivého růstu (Moon a kol., 2003). K dalším účinkům GAs patří ovlivnění  
pohlaví květů, kdy zvýšená aplikace GAs potlačuje vznik samičích květů (např. u špenátu).  
Zároveň mohou GAs inhibovat opadávání listů.

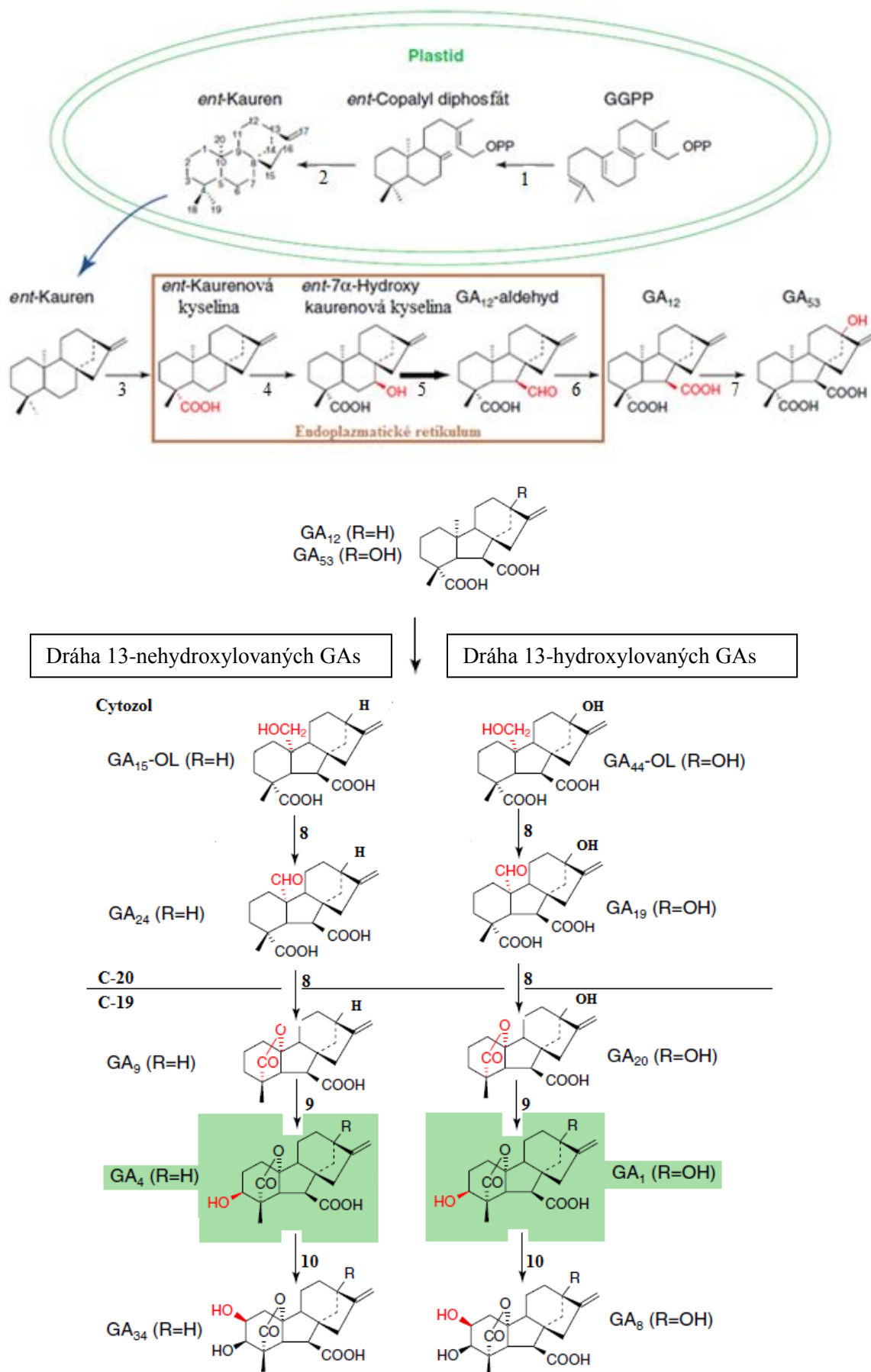


### 3.3 Metabolismus giberelinů

Znalost biosyntetických a metabolických drah a jejich ovlivnění různými faktory je nezbytná pro studium různých fyziologických procesů a vývoje rostliny. Do metabolismu giberelinů, se stejně jako u ostatních skupin fytohormonů, zařazují procesy biosyntézy, degradace a konjugace. Jednotlivé kroky biosyntézy a metabolismu GAs jsou ovlivňovány vnějšími signály (světlo, fotoperioda, teplota - Šetlík a kol., 2004). Gibereliny obsahující odlišnou chemickou strukturu mají různé účinky, z čehož vyplývá, že jejich regulační funkce závisí nejen na jejich biosyntéze, ale i inaktivaci (konjugaci nebo degradaci). Hlavními enzymy v biosyntéze GAs jsou GA 20-oxidázy (GA20ox), 3 $\beta$ -hydroxylázy (GA3ox) přeměňující GAs prekurzory na biologicky aktivní hormony a 2 $\beta$ -hydroxylázy (GA2ox) produkující inaktivní metabolity (Urbanová a kol., 2011).

#### 3.3.1 Biosyntéza giberelinů

Biosyntéza giberelinů probíhá především v oblastech aktivního růstu rostlin (pupeny, mladé listy, semena), odkud jsou transportovány do celé rostliny floémem v aktivní formě, neaktivní formě nebo ve formě konjugované (Salaš, 2003). Syntéza může probíhat nejen v nadzemních částech rostliny, ale i v kořenech, kdy je jimi vlastní růst kořenů minimálně ovlivněn. Tato skupina giberelinů je poté transportována xylémem do nadzemních částí rostliny. Dřívější teorie, že celý proces biosyntézy GAs probíhá tzv. mevalonátovou drahou biosyntézy izoprenoidních látek byla vyvrácena v roce 2002, kdy japonsští vědci pomocí izotopově značených prekurzorů ukázali, že většina izoprenoidních jednotek pro stavbu GAs vzniká methyletrytol fosfátovou drahou v plastidech (Kasahara a kol., 2002). Jak bylo uvedeno výše, podle místa průběhu se biosyntéza giberelinů rozděluje do tří etap (Obr. 5), přičemž první dvě jsou společné pro všechny typy giberelinů (Hedden a Thomas, 2012).



**Obr. 5.** Biosyntéza giberelinů (upraveno a převzato z Hedden a Thomas, 2012)

### **1) Cyklizace až po *ent-kauren* probíhající v chloroplastech a proplastidech**

Biosyntézy GAs se v každém ze tří buněčných kompartmentů účastní enzymy náležející do tří významných skupin: terpen cyklázy (plastidy), cytochrom P450 dependentní monooxygenázy (endoplasmatické retikulum) a 2-oxoglutarát dependentní dioxygenázy (cytosol) - (Yamaguchi a Kamiya, 2000), jenž představují klíčové komponenty pro přeměnu *ent-kaurenu* na bioaktivní formy těchto fytohormonů. Terpen cyklázy (KS a CPS – *ent-copalyl* difosfát syntáza, Obr. 5) se podílejí na cyklizaci tetraterpenu geranylgeranyl difosfátu (GGPP) za vzniku prvního prekurzoru GA, *ent-kaurenu* ve dvou krocích, kdy je nejprve GGPP přeměněn pomocí CPS na *copalyl* difosfát (CDP) a ten je následně přeměněn na *ent-kauren* pomocí KS. GGPP je přímým produktem isopentenyl difosfátu (IPP), který byl původně považován za produkt mevalonátu, nicméně nyní se předpokládá, že vzniká z glycerinaldehyd-3-fosfátu (GAP) a pyruvátu v methyletrytritol fosfátové dráze (Lichtenthaler a kol., 1997).

U *Arabidopsis* jsou CPS a KS kódovány na základě jednotlivých genů nebo ztráty funkce GA, které mají za následek fenotypy projevující se extrémní zakrslostí, sterilitou a ztrátou klíčivosti semen (Koornneef a van der Veen, 1980). Tyto reakce probíhají v proplastidu z meristematické tkáně, z čeho vyplývá, že neprobíhají ve zralých chloroplastech, jak bylo prokázáno u hrachu a pšenice (Lange, 1998).

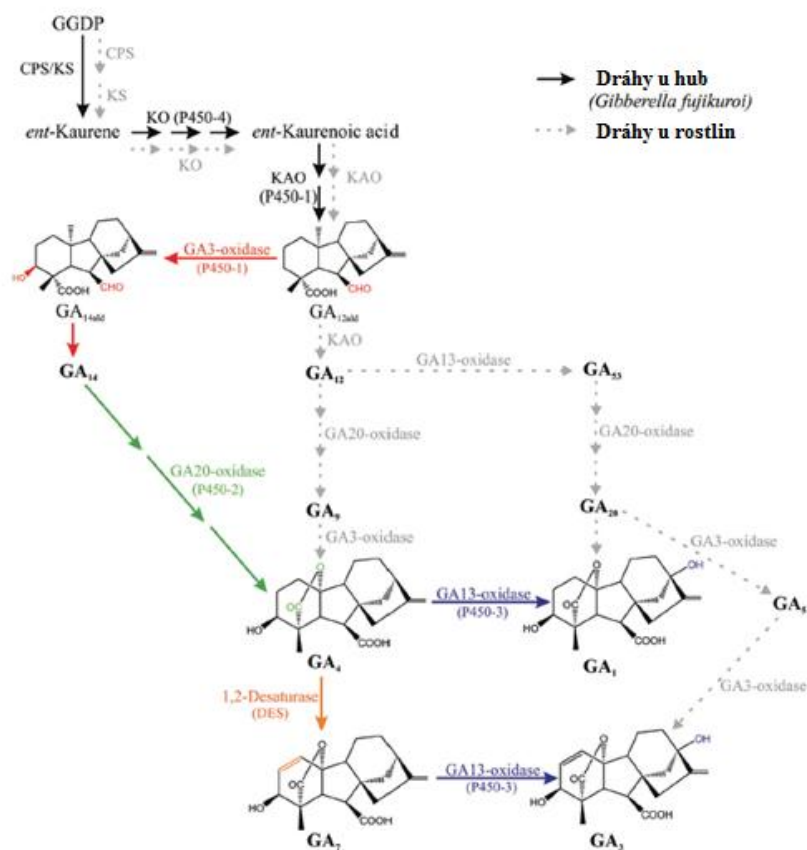
### **2) Biosyntetická dráha od *ent-kaurenové kyseliny* přes $GA_{12}$ aldehyd (prekurzor $GA_{12}$ po působení GA 7-oxidázy) až po $GA_{53}$ probíhá v endoplazmatickém retikulu**

Tvorba  $GA_{12}$ , který je považován za společný prekurzor všech GA v rostlinách (Hedden a Phillips, 2000), vyžaduje čtyři oxidační kroky, které jsou katalyzované dvěma na membráně vázanými monooxygenázami: *ent-kauren* oxidázou (KO) a *ent-kauren*oic acid oxidázou (KAO). KO je lokalizována na membráně plastidů, zatímco KAO se nachází na membráně endoplazmatického retikula (Hedden a Kamiya, 1997). Oxidace vysoce hydrofobního *ent-kaurenu* na kyselinu *ent-kauren*ovou představuje třístupňovou reakci, při níž je *ent-kauren* oxidován nejdříve na *ent-kaurenol*, následně na *ent-kaurenal* a nakonec na příslušnou kyselinu. U *Arabidopsis* je KO kódována jediným genem, zatímco rýže obsahuje shluk pěti KO-genů, např. gen OsKO2, který v kvasinkách způsobuje heterologní expresi. Mutace tohoto genu může vést až k závažnému nedostatku GAs a následně k zakrslosti, což nepochybně potvrzuje jeho účast v biosyntéze GAs (Sakamoto a kol., 2004). K oxidaci kyseliny *ent-kauren*ové na  $GA_{12}$  dochází opět ve třech krocích

prostřednictvím meziproductů *ent-7 $\alpha$ -hydroxykaurenové* kyseliny a GA<sub>12</sub> aldehydu, což vyžaduje po sobě jdoucí oxidace na C-7 $\beta$ , C-6 $\beta$  a C-7 (Hedden a Kamiya, 1997).

### 3) Přeměny giberelinů probíhající v cytozolu

Přeměn GAs v cytosolu se účastní 2-oxoglutarát dependentní dioxygenázy (ODDs) - GA7ox, GA20ox, GA3ox a GA2ox. GA<sub>12</sub> a GA<sub>53</sub> se působením enzymu GA20ox oxidují na C-20, ODD pak tyto substráty přeměňuje paralelně do forem GA<sub>9</sub> a GA<sub>20</sub>. V této řadě reakcí se C-20 methylová skupina oxiduje na alkohol a následně aldehyd, ze kterého methylová skupina zanikne s tvorbou  $\gamma$ -laktonu mezi C-19 a C-10. Zejména při nízkém pH se C-20 skupina alkoholu snadno kooperuje se skupinou C-19 karboxylové kyseliny, aby se zabránilo další oxidaci pomocí GA20ox. O mechanismu, kterým je C-20 ztracen, je známo málo. Oxidační ztráta na C-20 v houbách *G. fujikuroi* a *Sphaceloma manihoticola* je katalyzována pomocí P450 častěji než ODD (Bömke a kol., 2008; Tudzynski a kol., 2002). Substrát GA<sub>14</sub> (tj. 3-hydroxy derivát GA<sub>12</sub> aldehydu, Obr. 6) a současně C<sub>20</sub>-GA meziproducty (GA<sub>37</sub> a GA<sub>36</sub>) se zde podílejí na tvorbě bioaktivní GA<sub>4</sub> (C<sub>19</sub>-giberelin). Na rozdíl od hub vzniká GA<sub>4</sub> u vyšších rostlin z GA<sub>12</sub> ve dvou krocích pomocí GA20ox a GA3ox (Obr. 6), které jsou obě 2-oxoglutarát dependentními dioxygenázami (Yamaguchi, 2008).



**Obr. 6.** Biosyntéza giberelinů v houbách a rostlinách (upraveno a převzato z Urbanová a kol., 2011)

Konečným krokem v tvorbě biologicky aktivních hormonů je  $3\beta$ -hydroxylace produktů předchozí oxidace na C-20, tj. GA<sub>9</sub> a GA<sub>20</sub> na GA<sub>4</sub> a GA<sub>1</sub> katalyzována dependentními dioxygenázami, konkrétně GA3ox. Ve výhoncích dvouděložných rostlin má tato reakce vysokou specifitu, zatímco u několika jednoděložných rostlin vzniká díky působení GA3ox z GA<sub>20</sub> kromě GA<sub>1</sub> také GA<sub>3</sub> a to přes meziprodukt GA<sub>5</sub> (Obr. 6; Appleford a kol., 2006; Itoh a kol., 2001; Spray a kol., 1996). Semena některých dvouděložných rostlin obsahují GA3ox relativně nízké specifity, která má vlastnosti také  $2\beta$ -hydroxylázy (Itoh a kol., 2001, Lange a kol., 1997, Smith a Hilton, 1980).

Na regulaci biosyntézy se podílí několik mechanismů. Prvním z nich je mechanismus zpětné vazby, která spočívá v tom, že při nadměrné koncentraci giberelinů dochází k zastavení jejich syntézy. Druhý mechanismus je regulován působením světla a třetí pak změnou teploty, kdy je klíčení semen a kvetení indukováno nízkými teplotami (Hedden a Kamiya, 1997).

### 3.3.2 Konjugace giberelinů

Esterové a etherové GA konjugáty byly identifikovány u řady rostlinných druhů, přičemž u většiny případů je v konjugátech obsažena glukóza, tj. jedná se o glukozidy či glukózestery různých giberelinů. První nalezenou vázanou formu u giberelinů byl GA<sub>8</sub>-glukozid (Harada a Yokota, 1970). U těchto látek je typické, že se tvoří relativně rychle, proto se uvažuje o jejich vlivu při regulaci metabolismu giberelinů. Díky jeho výskytu ve floému se dá předpokládat jeho role v transportní funkci, naopak u nezralých semen souvisí s jejich funkcí při dozrávání a klíčení semen (Macháčková a kol., 1998). Nedávné studie zjistili, že ektopická exprese  $\beta$ -glukosidázy v tabáku vede ke zvýšení výskytů několika rostlinných hormonů včetně GA<sub>1</sub> (Kaneko a kol., 2003), což naznačuje potenciální roli plastidu jako zásobárny pro hormonální konjugáty.

### 3.3.3 Degradace giberelinů

Aby bylo umožněno rostlině efektivně regulovat koncentraci bioaktivního hormonu, je zapotřebí, aby měla mechanismus jakým to provést. V případě GAs je těchto mechanismů známo několik. Jak už bylo uvedeno výše (kapitola 2.1), nejběžnější drahou je  $2\beta$ -hydroxylace bioaktivních GAs v poloze C-2 za vzniku neaktivních 2-hydroxy GAs pomocí

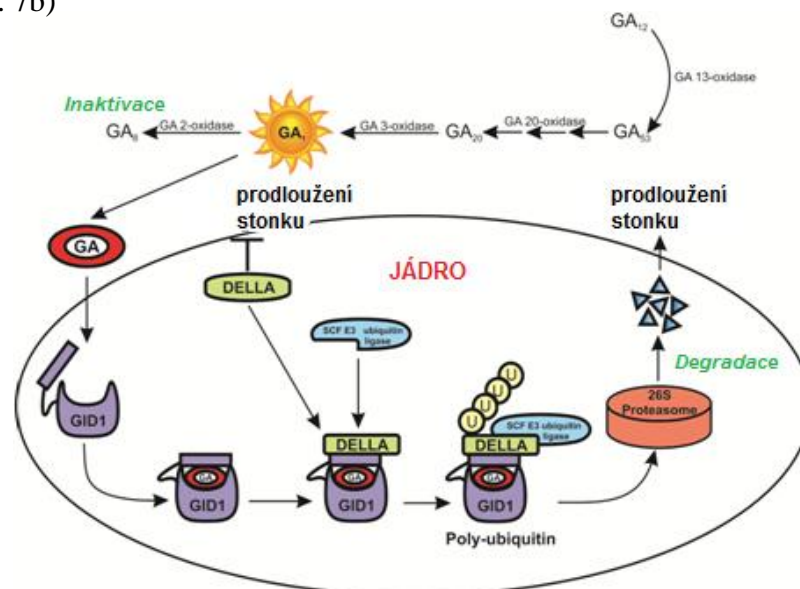
GA2ox (Elliot a kol., 2001; Schomburk a kol., 2003; Lee a Zeevart, 2002). Alternativní mechanismus pro deaktivaci GAs byl nalezen u rostlin rýže, kde dochází k epoxidaci 16, 17- dvojně vazby u 13-nehydroxylovaných GAs (Zhu a kol., 2006). Enzym akceptuje GA<sub>4</sub>, GA<sub>9</sub> a GA<sub>12</sub>, přičemž ostatní 13-desoxy GAs nebyly testovány, a pro 13-hydroxylované GAs byla přeměna méně efektivní. Rostliny s overexprimovaným genem pro tvorbu příslušných 16 $\alpha$ ,17-epoxidů vykazují extrémní zakrslost a výrazně sníženou hladinu GA<sub>4</sub> v nejvyšším internodiu, což potvrzuje, že epoxidace je deaktivací reakcí. Zajímavostí ale je, že přítomnost 16 $\alpha$ ,17-epoxidů nebyla u těchto rostlin prokázána. Místo nich byly nalezeny 16 $\alpha$ ,17-dihydrodioly, což vede k závěru, že epoxidy jsou *in planta* enzymaticky či neenzymaticky hydratovány kyselé katalyzovanou reakcí.

Dalším druhem deaktivace GAs je přeměna jejich C-6 karboxylových skupin na biologicky neaktivní metyl ester, jak bylo ukázáno na experimentu s vyvíjejícími se semeny *Arabidopsis*, u nichž byly nalezeny GA-specifické metyltransferázy (GAMT) zodpovědné za tento proces (Varbanova a kol., 2007). Substráty pro GAMT jsou C<sub>19</sub>-GAs, přičemž nadprodukce metylesterů těchto GAs vede opět k vytvoření zakrslého fenotypu rostliny. Dalším významným, pravděpodobně reverzibilním, způsobem deaktivace GAs je tvorba konjugátů s glukózou, které mají buď charakter éterů, nebo esterů (Schneider a Schliemann, 1994). GA-O-glucosyl éter (GA-O-Glc) vzniká konjugací ke glukóze přes hydroxy skupinu, zatímco GA-glucosyl ester je produktem konjugace přes 7-karboxylovou skupinu. Nejběžnějšími místy pro -O-Glc konjugaci jsou uhlíky C-2, C-3 and C-13 v molekule GA. Má se za to, že biologicky neaktivní glukosylované GAs jsou zásobní formou těchto hormonů, tj. jsou hydrolyzovány zpět na aktivní formu, např. v pro stimulaci klíčení semen (Schneider a kol., 1992). Některé experimenty naznačují, že zásobárnou konjugátů by mohly být plastidy (Jin a kol., 2011).

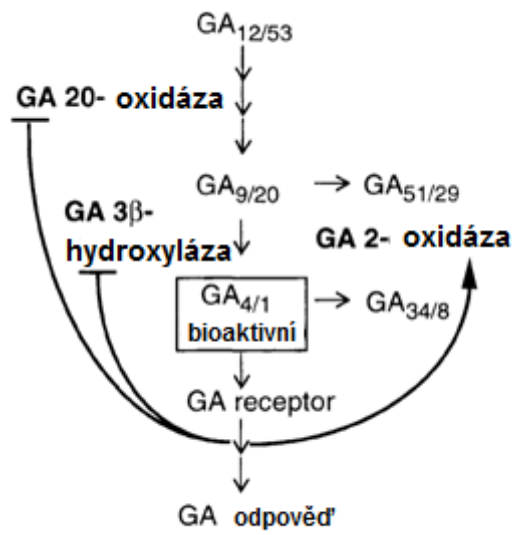
### 3.3.4 Regulace homeostázy a signalingu giberelinů

Biochemicky zaměřené studie GA biosyntetických a „response“ mutantů na několika rostlinných druzích ukázaly, že hladiny GAs jsou kontrolovány „feedback regulačním“ procesem (Thomas a kol., 2005). Následné klonování genů kódujících biosyntetické enzymy GAs vedlo ke zjištění, že tato regulace je zprostředkována transkripční kontrolou specifických ODDs (GA20ox, GA3ox, GA2ox). Na základě těchto poznatků se zdá být patrné, že giberelinem zprostředkované transkripční změny v ODD genech působí změny v hladinách metabolických enzymů, které je kódují. To v konečném důsledku vede ke

změnam v toku GAs skrz tuto dráhu, která je nutná pro kontrolu hladin bioaktivních GAs. Transkripčními regulátory působení GAs jsou tzv. DELLA proteiny (DELLAs). Název je odvozen ze zkratk sekvence pěti aminokyselin vyskytujících se na N-koncové doméně proteinů: asparagová kyselina (D), kyselina glutamová (E), leucin (L), leucin (L), a alanin (A) - Urbanová a kol., 2011. DELLAs interagují s transkripčními faktory (látky, jako je například protein, který reguluje transkripci genu). Například, DELLAs v *Arabidopsis* potlačuje působením světla regulované transkripčními faktory PIF3 a PIF4, které podporují růst hypokotylu. DELLAs se účastní udržování homeostázy GA a v některých případech působí jako body sblížující GA a ostatní signální dráhy. Jsou přímými účastníky vzájemného působení GA a některých ostatních fytohormonů, např. auxinů. GAs spouštějí degradaci DELLA proteinů pomocí 26S proteasomu (obrovský proteinový komplex uvnitř jádra a cytosolu všech eukaryotických buněk, jehož hlavní funkcí je odbourávat nepotřebné nebo poškozené proteiny). Mechanismus tohoto procesu je takový, že GA dosedá do kapsy svého receptoru, kterým je GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1). Ten je znám od roku 2008, kdy byla publikována krystalová struktura jeho komplexu s DELLA hned dvěma skupinami vědců najednou v tomtéž čísle časopisu *Nature* (Murase a kol., 2008; Shimada a kol., 2008). Navázáním GA na GID1 dojde ke konformační změně GID1, jež se následně váže na proteiny DELLA za vzniku komplexu GA-GID1-DELLA (Obr. 7a). Takto vzniklý komplex je ubikvitován a následně degradován. Sled popsanych dějů představuje molekulární mechanismus umožňující rostlinám reagovat na GA signály a tím měnit jejich růst a vývoj v reakci na změny v životním prostředí (Ubeda-Tomas a kol., 2008) - (Obr. 7b)



**Obr. 7a.** Signaling giberelinů a mechanismus zpětnovazebné regulace (upraveno a převzato z Urbanová a kol., 2011).



**Obr. 7b.** Regulace homeostázy biosyntézy GA (upraveno a převzato z Yamaguchi a Kamiya, 2000).

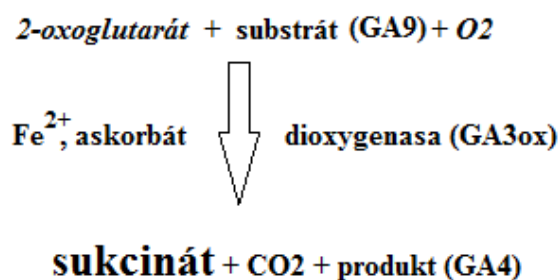


### 3.4 Mono- a dioxygenázy v biosyntéze giberelinů

Monooxygenázy a dioxygenázy katalyzují stejné typy reakcí: hydroxylaci, denaturaci, oxidaci alkoholu a aldehydu, které jsou v některých případech spojeny s přesmykem a štěpením C-C vazby. Klíčovým rozdílem mezi těmito skupinami enzymů je původ jejich substrátů. Monooxygenázy obecně působí na substráty nízké polariry, které jsou součástí membrán, zatímco dioxygenázy používají polárnější, hydrofilní intermediáty. Hlavními dioxygenázami v biosyntéze GAs jsou GA 20-oxidázy (GA20ox), 3 $\beta$ -hydroxylázy (GA3ox) a 2 $\beta$ -hydroxylázy (GA2ox, Yamaguchi a Kamiya, 2000). GA20ox jsou zodpovědné za oxidaci hydroxy skupiny vázané na uhlíku C-20 nejprve na aldehyd (GA<sub>24</sub>, GA<sub>19</sub>) a následně na karboxyl, který dekarboxyluje za vzniku laktonu (GA<sub>9</sub>, GA<sub>20</sub>). Tyto tři následné reakce jsou prvními třemi kroky biosyntézy GA odehrávající se v cytosolu rostlinných buněk. GA3ox, jak známo, přeměňují GAs prekurzory na biologicky aktivní hormony a GA2ox produkují jejich inaktivní metabolity. Některé z ODDs jsou enzymy polyfunkčními, tzn. že jsou schopny katalyzovat více reakcí. Na druhou stranu existují i polygenní enzymy, díky kterým není stejný enzym produkován stejným genem, ale dokonce skupinou genů, z nichž může být každý jinak regulován.

#### 3.4.1 2-oxoglutarát dependentní dioxygenázy v biosyntéze giberelinů

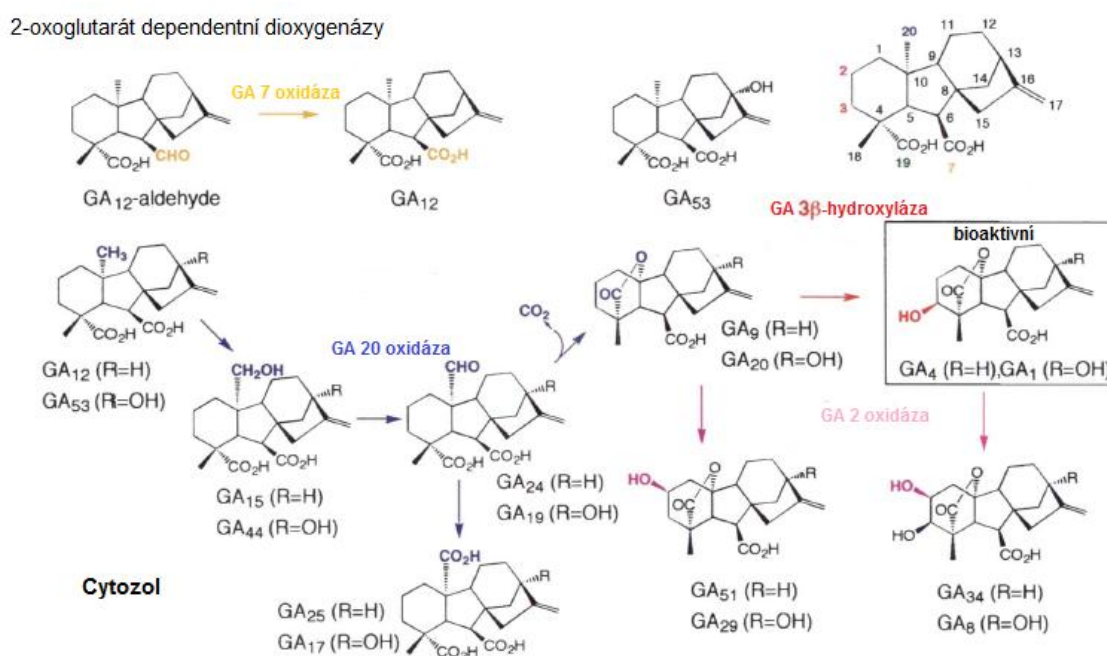
Enzymy, podílející se na třetí fázi biosyntetické dráhy vedoucí k tvorbě giberelinů o nižší hydrofobicitě, jsou rozpustné oxidázy, které katalyzují oxidační reakce různých organických sloučenin. Dioxygenázy jsou enzymy katalyzující reakce, ve kterých jsou oba atomy molekulárního kyslíku začleněny do substrátu. Jak název napovídá, tyto enzymy využívají 2-oxoglutarát jako kosubstrát a navíc vyžadují přítomnost Fe<sup>II</sup> a askorbátu pro maximální enzymatickou aktivitu (Obr. 8). Výjimku tvoří 1-aminocyklopropan-1-karboxylát (ACC) oxidáza, která katalyzuje závěrečný krok v biosyntéze etylenu za použití askorbátu jako ko-substrátu (Dong a kol., 1992).



Obr. 8. Obecný mechanismus reakce katalyzovaný ODD

V reakci je použit molekulární kyslík, aby byl 2-oxoglutarát převeden na sukcinát a zároveň došlo ke vzniku vysoce valenční ferrylové sloučeniny ( $Fe^{IV}=O$ ). Ta poté reaguje s giberelinovým substrátem za vzniku příslušného produktu. Reakci lze využít ke studiu potenciálních inhibitorů biosyntézy bioaktivních GAs.

2-oxoglutarát představuje klíčovou molekulu v cyklu trikarboxylových kyselin (TCA) sloužící jako nezbytný substrát pro ODDs (Lancien a kol., 2000; Scheible a kol., 2000). Tyto enzymy jsou v přírodě široce rozšířené a jsou zapojeny do řady důležitých biochemických procesů. Byly identifikovány v mnoha organismech od prokaryotních po eukaryotní a zároveň představují důležité metabolity na rozhraní uhlíkového/dusíkového metabolismu (Hodges, 2002). Některé z těchto enzymů jsou schopny provádět posttranslační modifikace proteinů; ukázkovým příkladem je prolyl 4-hydroxyláza, která se podílí na syntéze kolagenu (Roach a kol., 1995, 1997).



**Obr. 9.** Třetí fáze biosyntézy GAs katalyzována ODD enzymy

Jak bylo uvedeno výše, oxidace giberelinu v poloze C-7, z aldehydu na karboxylovou kyselinu, může být katalyzována buď dioxygenázami nebo monooxygenázami (Obr. 9). Bylo prokázáno, že aktivita dioxygenáz je větší při velmi nízkém pH (optimum), zatímco u monooxygenáz při pH neutrálním, tj. pH ~ 7 (Lange a kol., 1994). Syntéza růstově aktivních giberelinů GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub> z jejich příslušných prekurzorů je katalyzována rozpustnými oxidázami, které používají 2-oxoglutarát jako ko-substrát a jsou známy jako 3β-hydroxylázy (Hedden a Kamiya, 1997). Tyto aktivní GAs jsou deaktivovány hydroxylací C-2β, katalyzovanou dalším souborem dioxygenáz, tentokrát 2β-hydroxylázami (Hedden a Thomas, 2012).

GA 20-oxidázy byly prvními oxygenázami v biosyntéze GA, pro které byly k dispozici cDNA a genomové klony (Lange a kol., 1994). Následně byly pro několik druhů popsány cDNA klony kódující tyto enzymy (Garcia-Martinez a kol., 1997). Multifunkčnost enzymů GA 20-oxidáz spočívá v tom, že katalyzují postupnou oxidaci C-20 přes alkohol na aldehyd, díky kterému dochází k vytvoření C-19 skeletu tím, že vytváří 4,10 - laktonový kruh. Meziprodukty alkoholu ( $GA_{15}$  a  $GA_{37}$ ) musí být ve své otevřené formě laktonu (bez alkoholu) katalyzovány enzymem. Tyto GAs jsou extrahovány z rostlin v jejich uzavřené  $\delta$ -formě laktonu ( $GA_{15}$  uzavřená laktonová forma,  $GA_{37}$  uzavřená laktonová forma), který již není oxidován GA 20-oxidázou. I když není objasněno, zda se tato forma přirozeně v rostlinách vyskytuje, je zajímavé podotknout, že bezbuněčné extrakty špenátu obsahují enzym schopný katalyzovat přeměnu  $\delta$ -laktonu do určitých volných forem alkoholu (Ward a kol., 1997).

Kromě toho probíhá i vedlejší reakce oxidace aldehydu na karboxylovou kyselinu. S výjimkou enzymu z nezralých dýňových semen, karboxylové kyseliny, které jsou biologicky inaktivní a nemohou být metabolizovány na C-19 GAs, jsou minoritními produkty. Zajímavostí je, že toto poměrné zastoupení produktů je pozměněno enzymem, který sám produkuje zejména karboxylové kyseliny (Lange, 1994). Tento enzym je zodpovědný za vznik trikarboxylových kyselin GAs, jako jsou  $GA_{13}$  a  $GA_{43}$ , které jsou ve vysokých koncentracích přítomny ve vyvíjejících (dozrávajících) semenech dýně, ale nemají zde žádnou funkci.

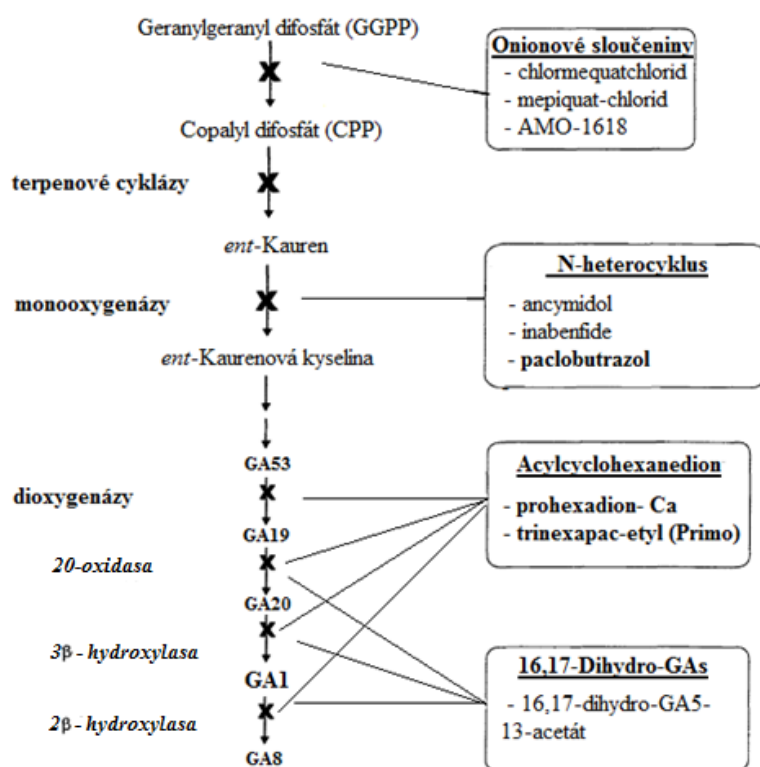
GA oxidázy se ukazují býti velmi zajímavé jako regulační enzymy v biosyntéze GA. Bylo prokázáno, že exprese genů GA 20-oxidázy, která je dána obsahem transkriptu, je silně potlačována GA ve smyslu zpětné regulace (Phillips a kol., 1995; Toyomasu a kol. 1997; Xu a kol., 1995) a může být regulována po dlouhé dny v *Arabidopsis* (Xu a kol., 1995) a špenátu (Wu a kol., 1996). Postupná oxidace C-20 z metylu na aldehyd může být považovaná za postupné hydroxylace na tomto atomu, stejně tak jako následná oxidace aldehydu na karboxylovou kyselinu. Avšak mechanismus, kterým se ztrácí uhlík C-20 za současného vzniku  $\gamma$ -laktonu stále není objasněn.

Po vytvoření C-19 skeletu enzym  $3\beta$ -hydroxyláza katalyzuje hydroxylaci na C-3 uhlíku u  $GA_{12}$  nebo  $GA_{53}$ . Tyto enzymy mají obecně široké spektrum substrátů a tedy nescificky katalyzují časnou C-3 hydroxylaci, ale také  $3\beta$ -hydroxylaci v pozdních C-3 hydroxylovaných drahách. Např. jedna dýně kódovaná enzymem GA3ox3 specificky katalyzuje pozdní hydroxylaci  $GA_9$  a  $GA_4$ . V endospermu dýně se pak chovají zcela odlišně oproti enzymům vyskytujících se u hrachu a u *Arabidopsis* (Lange a kol., 1997). Krok, ve kterém je  $GA_{12}$  přeměněn na neaktivní  $GA_9$  je charakterizován jako 13-

nehydroxylovaná dráha. Naopak u  $GA_{53}$ , který je konvertován přes  $GA_{44}$  na neaktivní  $GA_{20}$  se označuje dráhou 13-hydroxylovanou (Sponsel, 1995).  $GA3ox$  hydroxylyjí  $C_{20}$ -GAs stejně efektivně jako  $C_{19}$ -GA. Kromě toho mají i  $2\beta$ -hydroxylázovou aktivitu, jež se vyskytuje pouze u trikarboxylových kyselin GAs. Dochází k tomu, že  $GA_{25}$  je enzymem  $3\beta$ -hydroxylázou převeden na  $GA_{13}$  a následně  $2\beta$ -hydroxylázou na  $GA_{43}$ . 13-nehydroxylovaný substrát  $GA_9$  dává u semen přednost 13-hydroxylované  $GA_{20}$ . Další konverze nenasycených produktů probíhá díky 2,3-didehydro- $GA_9$ , který je převeden na  $GA_5$ , ze kterého nakonec vzniká bioaktivní  $GA_3$  (Obr. 15) – viz kapitola 5.4. Reakce se iniciuje odstraněním  $1\beta$ -H, na který navazuje přesmyk dvojně vazby z C-2,3 na C-1,2 a hydroxylace na  $C\beta$ -3. Přímá hydroxylace z  $GA_5$  v  $1\beta$ - poloze a tvorba 2,3 epoxidu byly pozorovány jako vedlejší reakce (Albone a kol., 1990).

### 3.5 Inhibitory biosyntézy giberelinů

S ohledem na funkci inhibitoru a místo jeho působení v biosyntéze GAs se inhibitory dělí do základních 4 skupin: „onium“ sloučeniny, sloučeniny s heterocyklem obsahujícím atom dusíku, látky strukturně napodobující 2-oxoglutarát a 16,17-dihydroderiváty GA<sub>5</sub> (Rademacher, 2000). Přehled míst, kde tyto inhibitory interagují s biosyntézou GAs je uveden v Obr. 10.



Obr. 10. Schéma působení inhibitorů GA biosyntézy (upraveno a převzato z Rademacher, 2000).

Z praktického (agronomického) hlediska jsou tyto komerčně připravované látky využívány hlavně při ochraně obilnin proti poléhání a podpoře odnožování (Rademacher, 1991).

#### 3.5.1 Onium sloučeniny

Do této skupiny se řadí několik látek nesoucích kladně nabitě amoniové, fosfoniové nebo sulfoniové skupiny, které jsou schopny blokovat biosyntézu GA ještě před vznikem ent-kaurenu. Nejvýznačnějšími zástupci této skupiny jsou chlormekvat chlorid (Tolbert, 1960) a mepikvat chlorid (Zeeh a kol., 1974). Chlormekvat chlorid inhibuje CPP syntázu jak

v *Gibberelle fujikuroi*, tak i ve vyšších rostlinách. *ent*-Kauren syntáza je touto látkou rovněž inhibována, ale jen v malé míře. V důsledku aplikace tohoto inhibitoru byly nalezeny významně redukováné hladiny GA<sub>1</sub> ve stoncích i zrnech pšenice *Triticum aestivum* (Lenton a kol., 1987). Snížené hladiny GA<sub>12</sub>, GA<sub>53</sub>, GA<sub>44</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>1</sub> a GA<sub>8</sub> byly detekovány rovněž u dvou druhů čiroku *Sorghum bicolor* (Lee a kol., 1998) a u eukalyptu způsobil tento inhibitor redukci hladin GA<sub>20</sub> a opět GA<sub>1</sub> (William a kol., 1999).

### 3.5.2 Sloučeniny s heterocyklem obsahujícím atom dusíku

V současnosti je známa nepřeborná řada syntetických sloučenin s heterocyklem obsahujícím atomu dusíku (většinou pyrimidinové nebo triazolové deriváty), z nichž každá působí většinou efektivně jen u určitého(tých) druhu(ů) rostlin. Obecně jde o látky, které jsou schopny inhibovat v biosyntéze GAs enzymy typu monooxygenáz, tj. hlavně oxidativní kroky od *ent*-kaurenu ke kyselině *ent*-kaurenové (Graebe, 1987; Miki a kol., 1990). Další biosyntetické kroky, jichž se monooxygenázy rovněž účastní, se zdají být tímto typem inhibitoru nedotčeny. Monooxygenázy cytochromu P450 spadají do skupiny metaloproteinů, jelikož obsahují sloučeninu hem, jejímž hlavním úkolem je přenesení hydroxylové skupiny z molekulárního kyslíku na uhlík (Sponsel, 1995). Dusíkový atom v heterocyklu inhibitoru je klíčovým místem pro inhibici, neboť jeho volný elektronový pár nahrazuje právě kyslík ve vazebném místě a k přenosu na uhlík (*ent*-kauren) pak nedochází (Coolbaugh a kol., 1976, 1978; Luster a kol., 1993). Nejběžněji používanými zástupci inhibitorů z této skupiny jsou paklobutrazol a unikonazol-P (Rademacher, 2000).

### 3.5.3 Látky strukturně napodobující 2-oxoglutarát

Sloučeniny z této skupiny inhibitorů GAs interferují s pozdějšími kroky v jejich biosyntéze (Rademacher, 2000). Jde o reakce, kde je 2-oxoglutarát ko-substrátem dioxygenáz. Inhibice GA biosyntézy a metabolismu je založena na strukturní podobnosti 2-oxoglutarátu, přirozeného ko-substrátu dioxygenázy, a inhibitoru. Inhibovány jsou hlavně hydroxylace v poloze 3 $\beta$  (např. tvorba bioaktivní GA<sub>1</sub> z prekurzoru GA<sub>20</sub>) a pak hydroxylace v poloze 2 $\beta$  (konverze bioaktivní GA<sub>1</sub> na její inaktivní katabolit GA<sub>8</sub>). Významnou skupinu syntetických látek s těmito inhibičními vlastnostmi tvoří

acylcyklohexandiony a z nich pak zejména prohexadion-kalcium a trinexapak-etyl (Griggs a kol., 1991; Brown a kol., 1998). Retardace růstu způsobená acylcyklohexandiony může být zvrácena pouze gibereliny, které jsou aktivní samy o sobě a nepotřebují být aktivovány metabolicky. Inhibice prohexadionem nebo trinexapak-etylem pak paradoxně vede ke zvýšení prodloužení stonku, protože v pletivu je inhibována degradace bioaktivních GAs, které se zde nahromadily. Prohexadion má velké uplatnění v oblasti sadařství, kde se uplatňuje v modulaci ovocných stromů, dále snižuje výskyt plísňových a bakteriálních onemocnění zejména u rýže (Kim a kol., 2007) a dokonce se podílí při pěstování arašídů na snížení jejich vegetativního růstu, čímž dopomáhá lepší sklizni (Mitchem a kol., 1996).

Trinexapak-etyl je po aplikaci přijímán všemi (zelenými) částmi rostlin, které zapříčiní jeho rychlý rozvod po meristému, zároveň se jeho účinek projeví zpomalením prodloužovacího růstu, zesílením stěn stébla s následným minimálním rizikem polehávání rostliny (Espindula a kol., 2009), poklesem evapotranspirace (výdej vody v podobě vodní páry z rostlin), zvyšuje koncentraci chlorofylu v listech (Ervin a Koski 2001), efektivnost využití živin (McCann a Huang, 2008), dokonce zvyšuje odolnost rostliny vůči vysokým teplotám (Zhang a kol., 2003).

### 3.5.4 16,17-dihydro-deriváty GA<sub>5</sub>

16,17-dihydro-GA<sub>5</sub> deriváty, známé jako 16,17-dihydro-GAs, představují nejnovější typ inhibitorů GA biosyntézy. Jde o látky, které podobně jako acylcyklohexandieny, inhibují dioxygenázy účastníci se pozdních reakcí v biosyntéze GAs, zejména 3 $\beta$ -hydroxylaci (Juntilla a kol., 1997; Takagi a kol., 1994). Přirozeně se tyto sloučeniny vyskytují u vyšších rostlin v GA-produkujících houbách, největší výskyt je ale zaznamenán u lipnicovitých rostlin (Rademacher, 2000), kde rovněž inhibují 3 $\beta$ -hydroxylaci a tím současnou přeměnu GA<sub>20</sub> na růstově bioaktivní GA<sub>1</sub>. U lipnicovitých rostlin (jednoděložné, v češtině obecně označované jako trávy) působí jako silné růstové zpomalovače, málo efektivní jsou u rostlin dvouděložných. Nedávné studie ukázaly, že ošetření rostlin 16,17-dihydro-GA<sub>5</sub> vede ke změnám hladin GAs podobným účinku acylcyklohexandionů, tj. ke snížení hladin bioaktivní GA<sub>1</sub> zatímco její neaktivní prekurzor GA<sub>20</sub> se v pletivu signifikantně akumuluje (Juntilla a kol., 1997; Foster a kol., 1997). Nejaktivnějším růstovým retardantem z této skupiny je 13-*O*-acetát-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>, pomocí něhož byly prokázány účinky na pšenici a ječmeni rostoucími ve skleníku už při použití 500 mg na hektar osevni plochy (Rademacher a kol., 1999). Nicméně, u

ostatních rostlin se účinek 13-*O*-acetát-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub> a jeho derivátů na zkracování stonku rostlin vůbec neprojevil. Zároveň bylo povrženo, že i jiné 16,17-dihydro GAs, např. 16,17-GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub> a GA<sub>1</sub>, nemají na délku stonku žádný vliv (Olsen a Junttila, 1997). Lze tudíž soudit, že 16,17-dihydro GAs, zejména 16,17-dihydro GA<sub>5</sub>, interagují s tvorbou bioaktivních GAs specificky pouze u trav, kde svou strukturou kompetují s přirozenými GA substráty, např. GA<sub>20</sub>, o vazebná místa příslušných enzymů (Takagi a kol., 1994). *Endo* forma 13-*O*-acetát-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub> je méně aktivní než dříve zmíněná *exo* forma této sloučeniny (Rademacher a kol., 1999). Podobně je tomu u 17-alkyl derivátů 16,17-dihydro GA<sub>5</sub> (Mander a kol., 1998). Rovněž záměna substituentu na C-13 za ester nebo éter jiné délky řetězce než je acetyl nevedla k vyšší aktivitě, naopak aktivita příslušného derivátu byla vždy nižší než 13-*O*-acetyl derivátu 16,17-dihydro GA<sub>5</sub>. Relativně vysokou aktivitu srovnatelnou s 13-*O*-acetyl derivátem vykazoval také 13-*n*-propoinyl a 13-*O*-etyléter derivát (Rademacher a kol., 1999).



### 3.6 Metody chemické analýzy giberelinů

Gibereliny (GAs) se chovají jako slabé organické kyseliny s  $pK_a \approx 4.0$  s tetracyklickým skeletem obsahujícím 19 nebo 20 uhlíkových atomů (Obr. 3; Urbanová a kol., 2011). Nevykazují žádné spektrální charakteristiky jako je absorpce v UV oblasti (pouze pod 220 nm) nebo fluorescence, díky kterým by se mohly snadno odlišit od jiných organických kyselin. Některé GAs jsou vysoce oxidující molekuly s mnoha funkčními skupinami, jež mohou být poměrně nestabilní, zejména ve vodných roztocích při extrémním pH a při zvýšených teplotách. Při teplotě nad 100 °C může ve vodných roztocích dojít až k jejich úplné degradaci. Z toho důvodu by měly být extrakční a purifikační postupy prováděny v rozmezí pH 2.5-8.5 a při teplotách do 40 °C. Stejně tak jako je to typické u ostatních rostlinných hormonů, i GAs se vyskytují v rostlinných pletivech ve velmi nízkých koncentracích (pg-ng/g čerstvé hmoty, FW), a to zejména ve vegetativních orgánech rostliny (kořeny, stonky, listy). Naopak reprodukční orgány (například semena, květy) obsahují často až 1000-násobně vyšší hladiny těchto hormonů (Tarkowská a kol., 2014). Pro samotnou detekci jsou proto zapotřebí velice citlivé instrumentální metody. V důsledku nízkých koncentrací GAs v přenosu signálu a ve zpětnovazebné regulaci rostlinných pletiv se často používají velmi zdlouhavé a na práci náročné prekoncentrační kroky, díky kterým dochází k odstranění rušivých látek (např. lipidy, proteiny, pigmenty) z hrubých rostlinných extraktů, s cílem zajistit dostatečně čistý výtěžek GAs pro koncovou analýzu.

#### 3.6.1 Příprava vzorků

Klíčovým krokem v jakékoliv chemické analýze je příprava vzorků a to zejména u analytů přítomných ve stopovém (ppm) nebo ultrastopovém množství (ppt až ppq) ve složitých maticích (Tarkowski a kol., 2009). Celý pracovní postup zahrnuje 3 hlavní části: homogenizace vzorku, extrakce a purifikace.

##### *1. Homogenizace rostlinného materiálu*

Hlavní úkol homogenizace spočívá v rozbití stěn buněk tvořících pletivo, což je klíčová operace stěžejní pro následnou extrakci látek obsažených uvnitř buněk. Řada látek totiž vzniká a je přeměňována pouze uvnitř buněk a nikoliv v mezibuněčných prostorech pletiv. V poslední době homogenizaci za pomoci tekutého dusíku v třecí misce pomocí tloučku

nahrazují kulové mlýnky (Tarkowská a kol., 2014). Aby se zabránilo enzymatické nebo chemické degradaci GAs, probíhá proces homogenizace při nízké teplotě (4 °C).

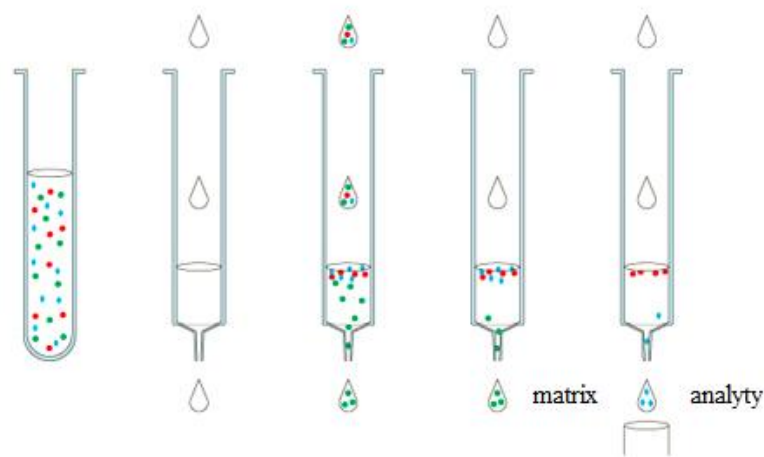
## 2. *Extrakce*

Po homogenizaci vzorku obvykle následuje proces extrakce, při které je vhodné použít minimálně desetinásobek vhodného organického rozpouštědla z důvodu dosažení kvantitativní extrakce přírodních látek z rostlinného vzorku. Nejčastěji používanými extrakčními rozpouštědly je vychlazený 100 % metanol, vodný metanol (80 % v/v), vodný metanol okyselený kyselinou mravenčí (0.05 %, v/v), nebo směs isopropanolu:ledové kyseliny octové (Urbanová a kol., 2013). Nezbytnou součástí postupu je také přidání odpovídajících vnitřních standardů (obvykle stabilním izotopem značených GAs) ke sledování možných ztrát při samotném čištění. Aby došlo k vyextrahování GAs do extrakčního média a vytvořila se tak rovnováha mezi izotopově značenými GAs a jejich endogenními analogy, probíhá obvykle extrakce několik hodin. Dalším možným krokem, kterým lze podpořit porušení buněčných stěn a docílit tak vyšších výtěžků extrakce GAs, je použití ultrazvuku, tzv. sonifikace. Při té se využívá akustického vlnění, jehož frekvence leží nad hranicí slyšitelnosti lidského ucha, tj. nad 20 kHz. Postupně dochází ke zvýšené rozpustnosti buněčných stěn s následnou kavitací. Proces kavitace představuje stav, při němž se vytvoří malé bubliny, uvnitř kterých vznikne vakuum. Ty s jejich následným zánikem vyvolávají proudění kapaliny spojené se zvýšenou teplotou a tlakem. Další možnou metodou extrakce by mohla být extrakce kapalinou v superkritickém stavu (zahříváním za současného zvýšení tlaku kapaliny nad její kritický bod), která však pro extrakci GAs zatím nebyla použita. Superkritická kapalinová extrakce (SFE) je metoda založená na solvatačních vlastnostech superkritické kapaliny. Nejčastěji je pro tento účel používán oxid uhličitý CO<sub>2</sub> pro své výborné fyzikální vlastnosti a svou bezpečnost (Handa a kol., 2008). Jednou z hlavních výhod tohoto postupu je, že v průběhu extrakce nedochází k vzniku odpadu ve formě organických rozpouštědel.

## 3. *Purifikace*

Přečištění rostlinných extraktů je obvykle dosaženo jednou ze dvou hlavních metod.

- Extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE)
- Extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE)



**Obr. 11.** Schéma purifikace za pomoci SPE  
(obrázek přejet a upraven z <http://www.biotage.co.jp/isolutemyco>)

Princip extrakce kapalina-kapalina (LLE) je založen na rozdílné rozpustnosti analytu ve dvou nemísitelných rozpouštědlech (Nováková a Vlčková, 2009). V případě GAs se používá nejčastěji dělení mezi metanol a etylacetát (Coles a kol., 1999; Peng a kol., 1999). Alternativně a v poslední době čím dál častěji se extrakce kapalina-kapalina nahrazuje extrakcí na pevné fázi (SPE). U extrakce na pevné fázi obsahují SPE kolony pevné sorbenty různých chemických vlastností, ke kterým jsou GAs vázány na základě chemických interakcí. Následným promytím vhodným rozpouštědlem dojde k odstranění rušivých látek ze sorbentu kolony a gibereliny se z něj poté eluují za použití rozpouštědla, které způsobí porušení vazeb mezi sorbentem a analytem. SPE je z hlediska úspory a efektivity na spotřebu organického rozpouštědla mnohem výhodnější než LLE (Štulík a kol., 2004). Nejčastěji používanými sorbenty pro SPE giberelinů je reverzní fáze C18 (Moritz a kol., 1995; Coles a kol., 1999) a její kombinace s aniontově-výměnným sorbentem s ohledem na fakt, že intaktní GAs jsou kyselinami (Urbanová a kol., 2013).

### 3.6.2 Instrumentální metody analýzy giberelinů

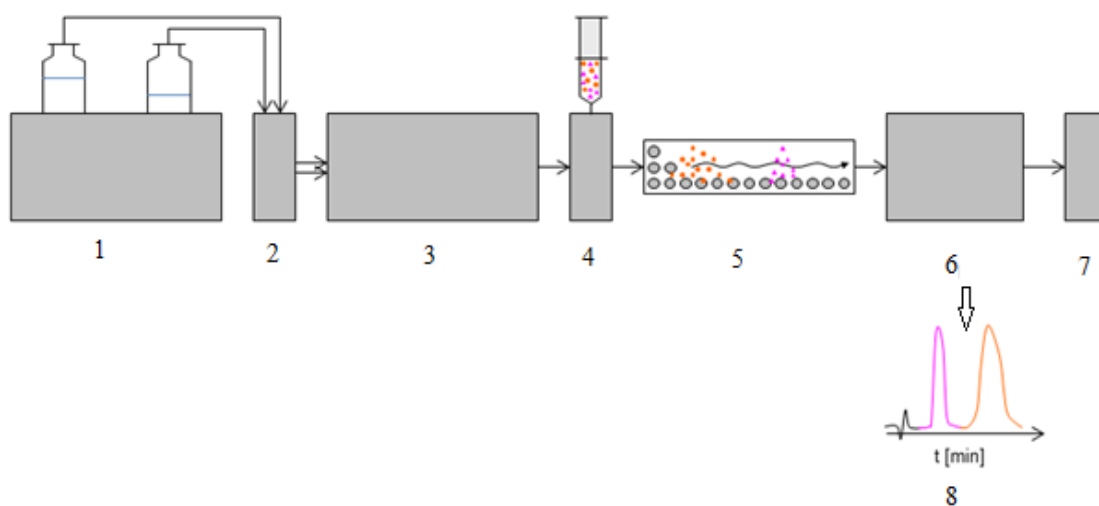
Metody plynové nebo kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, LC-MS) tvoří hlavní pilíře instrumentální analýzy GAs, neboť pomocí nich lze dosáhnout velice nízkých detekčních limitů potřebných k detekci těchto látek vyskytujících se ve stopových až ultrastopových množstvích. První zmínky o analýze GAs pochází již z 60tých let 20. století, kdy byly GAs analyzovány za pomoci GC-MS (Pryce a kol., 1967; MacMillan a Pryce, 1968; Binks a kol., 1969). Dodnes je tato metoda široce používanou

jak pro identifikaci, tak pro kvantifikaci GAs ve formě těkavých metylestertrimetylsilyleterů. Kvantitativní analýza GA je obvykle dosažena metodou izotopového ředění, která poskytuje vysokou přesnost (Urbanová a kol., 2013). Pro získání dostatečné selektivity detekce se využívá tzv. multiple reaction monitoring (MRM), tj. monitorování hmotnostních přechodů prekurzorového a produktového iontu charakteristických pro daný GA. Tato metoda rovněž pomáhá řešit problémy s interferujícími sloučeninami.

### 3.6.3 Kapalinová chromatografie (LC)

Pro menší náročnost při přípravě vzorku (odpadá nutnost derivatizace vzorku) jsou v dnešní době pro analýzu GAs nejvíce používány zejména metody kapalinové chromatografie ve spojení s MS (Varbanova a kol., 2007; Ayele a kol., 2010; Urbanová a kol., 2013) - viz níže. Metoda kapalinová chromatografie (zejména vysoce účinná kapalinová chromatografie – HPLC) zaujímá v dnešní době jednu z nejvíce rozšířených metod využívaných obecně k separaci a kvantifikaci netěkavých látek. Princip je založen na rozdílných interakcích sloučenin obsažených ve vzorku unášeného mobilní fáze s fází stacionární, která je umístěna v chromatografické koloně. Analyty, které opouští kolonu nejrychleji, atrahují k mobilní fázi, neboť jejich vlastnosti se spíše podobají vlastnostem fáze mobilní než fáze stacionární. Na druhou stranu analyty, které jsou na základě různých fyzikálně-chemických vlastností zpomalovány, jsou k sorbentu v koloně přitahovány více či méně silně, proto dochází k jejich rozdělení v čase, který je charakteristický pro každou sloučeninu za nastavených podmínek. Bývá označován jako čas retenční, tj. čas, který stráví látka v chromatografické koloně (<http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en-CZ&cid=10048919>). Klasická sloupcová chromatografie dokáže s pomocí vakua a gravitace oddělit částice o průměru větších 50  $\mu\text{m}$ , zatímco u menších částic (< 5  $\mu\text{m}$ ) je k vytvoření požadovaného průtoku rozpouštědla zapotřebí vytvoření mnohem většího tlaku. Tato metoda byla označena jako vysoce účinná kapalinová chromatografie (*angl.* High Performance Liquid Chromatography, HPLC) a umožňuje použití tlaků až 400 bar (6 000 psi) oproti původním 35 bar (500 psi). Pro analýzu GAs byla HPLC využita většinou tam, kde u analyzovaných vzorků docházelo k nadprodukci GAs, jako tomu je např. u hub rodu *Fusarium* (Bhalla a kol., 2010). HPLC je dále používána jako frakcionační krok před derivatizací a následnou analýzou pomocí GC-MS (Jones a kol., 1980; Mauriat a Moritz, 2009; Magome a kol., 2013).

V posledním desetiletí se využívá nového formátu HPLC, tzv. ultra účinné kapalinové chromatografie (*angl.* Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC), která využívá sorbentů o velikosti částic menších než 2  $\mu\text{m}$  a dokáže tak pracovat při hodnotách tlaku až 1000 bar (15 000 psi). Tím je dosaženo vysoké účinnosti separace v důsledku nárůstu počtu teoretických pater, což má dále za následek docílení většího rozlišení, citlivosti a vyšší rychlosti separace. Tohoto formátu kapalinové chromatografie bylo použito pro separaci 14 GAs po náročné pětikrokové purifikaci rostlinného vzorku v množství 200 mg lyofilizovaného pletiva (DW, Varbanova a kol., 2007; Ayele a kol., 2010). Dále pak byla UHPLC použita a při separaci 20 GAs zahrnujících biosyntetické prekurzory, bioaktivní GAs i jejich katabolity ve 100 mg FW rostlinného vzorku odpovídající zhruba 10 mg DW (Urbanová a kol., 2013). UHPLC hraje rovněž hlavní roli u analytických metod založených na simultánní analýze několika rostlinných hormonů v jednom chromatografickém kroku, tzv. „hormone profiling“ (Kojima a kol., 2009; Van Meulebroek a kol., 2012).



**Obr. 12.** Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie

1-Mobilní fáze, 2- degaser, 3- Pumpa, 4- Nástřikový port, 5- Kolona, 6- Detektor, 7- Odpad, 8- Data

(obr. převzat a upraven z [www.mpipmainz.mpg.de/3250439/HPLC](http://www.mpipmainz.mpg.de/3250439/HPLC))

### 3.6.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Jedna z nejvíce využívaných detekčních metod v analytické chemii, hmotnostní spektrometrie (MS), bývá zejména využívána pro své výhodné online spojení se separačními technikami GC nebo LC, čímž lze získat o daném analytu jak kvalitativní, tak kvantitativní informace. Princip této instrumentální techniky spočívá v převedení molekul analytu na ionty, které jsou separovány na základě poměru jejich hmotnosti k náboji ( $m/z$ )

a následně detekovány v hmotnostním analyzátoru. Výstupem detektoru je pak signál přímo úměrný množství dopadajících iontů. Proces ionizace probíhá v části MS nazývaném iontový zdroj. K běžným technikám ionizace se řadí např. chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) či ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), ionizace nárazem elektronů (EI), chemická ionizace (CI), ionizace fotony (PI) a nejčastěji používaná ionizace elektrosprejem (ESI). Nedílnou součástí spektrometru představuje hmotnostní analyzátor, který svou funkcí umožňuje rozdělit směs iontů podle hodnoty  $m/z$ , v případě analyzátorů doby letu (TOF) je pak vyhodnocován čas, za který urazí ion dané hmotnosti dráhu určenou definovanou délkou letové trubice k detektoru. Nejčastěji používaným analyzátozem pro účely kvantitativní analýzy je kvadrupólový hmotnostní analyzátor. Ten je složen ze čtyř rovnoběžných kovových tyčí rozmístěných kolem středu osy, kolem které se pohybují samotné ionty. Ke dvěma protilehlým tyčím je přivedeno kladné jednosměrné napětí, naopak na zbylé dvě tyče záporné jednosměrné napětí. Oscilace nastane v době, když se ionty dostanou do středu osy. K postupnému propouštění iontů do detektoru dochází v případě pravidelné změny hodnot stejnosměrného napětí. Zařazením tří kvadrupólů za sebou vzniká tzv. trojitý kvadrupól (MS/MS), jehož funkce spočívá ve fragmentaci prekurzorových iontů selektovaných prvním kvadrupólem v kolizní cele (druhý kvadrupól) a následné detekci produktových iontů třetím kvadrupólem. Fragmentace v kolizní cele je zajištěna přívodem kolizního plynu (nejčastěji helia). Výsledkem je hmotnostní spektrum vyjadřující vztah prekurzorového iontu s jeho specifickými produktovými ionty (Willoughby a kol., 1998). Metody analýzy GAs s MS detekcí využívají různé druhy hmotnostních analyzátorů i různé ionizační techniky. Zatímco u MS detekce po předchozí separaci GAs na plynověchromatografické koloně se využívá téměř výhradě ionizace proudem letících elektronů (*angl.* electron impact ionisation; Moritz a Olssen, 1995; King a kol., 2001), u MS analýzy spojené s LC se nejčastěji setkáváme s ionizací pomocí elektrospreje (Varbanova a kol., 2007; Kojima a kol., 2009; Urbanová a kol., 2013). Různí autoři volí i různé metody MS detekce GAs. Nejčastěji jde o analyzátory pracující na principu trojitého kvadrupólu (Kojima a kol., 2009; Urbanová a kol., 2013), kombinace kvadrupólu a TOF analyzátoru (QTOF, Varbanova a kol., 2007; Ayele a kol., 2010) a nově také Orbitrapu (Van Meulebroek a kol., 2012). Hlavní výhodou tohoto analyzátoru je, že nevyužívá magnetické pole k zachycení iontů, ale měří závislost proudu indukovaného oscilací iontů na čase. Tato závislost je přeměněna následnou Fourierovou transformací, která umožní určit poměr  $m/z$  související s frekvencí oscilace iontů (Lange a kol., 2014).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Biologický materiál

Pro studium role GA3ox inhibitorů byla použita semena řeřichy seté *Lepidium sativum* z hobby série prodávané v běžné prodejní síti (Nohel Garden a.s., ČR).

### 4.2 Chemikálie

Tween 20 (Merck, Německo)

Etanol (Merck, Německo)

Hydroxid draselný p.a. (LachNer, Česká republika)

Deionizovaná voda (Milli-Q, Millipore, USA)

Sacharóza p.a. (LachNer, Česká republika)

Murashige & Skoog médium včetně vitamínů (Duchefa Biochemie B. V., Nizozemsko)

LB médium Lauria-Broth (Sigma-Aldrich, Německo)

Plant agar (Duchefa Biochemie B. V., Nizozemsko)

expresní buňky T7express (New England Biolabs)

Metanol LC grade (Merck KGaA, Německo)

Amoniak – 25% vodný roztok (Merck KGaA, Německo)

Kyselina octová p.a. (98%, Sigma Aldrich, Německo)

Hydrogenuhlíčitán amonný (Sigma-Aldrich, Německo)

TRIS hydrochlorid ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina  $\alpha$ -ketoglutarová, sodná sůl ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

Hovězí sérový albumin ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

Síran železnatý heptahydrát (ACS reagent,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

Kataláza izolovaná z hovězích jater (lyofilizovaná, 2 000 - 5 000 jednotek/mg proteinu, Sigma-Aldrich, Německo)

Standardy gibberelinů GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>6</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>8</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>12</sub> a GA<sub>12</sub>-aldehyd, GA<sub>13</sub>, GA<sub>15</sub>, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub>, GA<sub>24</sub>, GA<sub>29</sub>, GA<sub>34</sub>, GA<sub>44</sub>, GA<sub>51</sub> a GA<sub>53</sub> a jejich odpovídající [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] značená analoga (OlchemIm, Česká republika)

### 4.3 Pracovní materiál

Pipety a špičky – Eppendorf (Eppendorf, Česká Republika), Hamilton (Hamilton Bonaduz AG, Švýcarsko), ThermoScientific (ThermoFisher Scientific, Česká Republika)

SPE kolony: Bond Elut Plexa, 60mg/1mL (Agilent Technologies, USA)

Bond Elut C18, 100mg/1 mL (Agilent Technologies, USA)

Oasis® HLB, 30 mg/1 ml (Waters, Irsko)

Oasis® MAX, 30 mg/1 ml (Waters, Irsko)

Plastové Petriho misky pro výsev *Lepidivum sativum in vitro* (rozměr 12x12 cm, Greiner Bio-One, Rakousko)

Homogenizační kuličky o průměru 2 mm z ZrO<sub>2</sub> (Next Advance Inc., USA)

Zkumavky z borosilikátového skla 12x75 mm (FisherBrand, USA)

Porcelánová třecí miska s tloučkem

Erlenmayerovy baňky

LC vialky 2 ml, 9 mm ID (Sigma-Aldrich, USA)

Inserty s kónickým dnem (200 µl, Supelco, USA)

Mikrozkumavky typu eppendorf 2 ml (Brand, Německo)

Nylonové filtry 25 mm o velikosti pórů 0,45 µm (Labicom, Česká republika)

### 4.4 Přístrojové vybavení

Millipore Simplicity 185 – zařízení na přípravu ultračisté vody (Millipore, USA)

Transsonic 310 – ultrazvuková lázeň (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)

Infrared Vortex Mixer - WIZARD – přístroj pro míchání vzorků (VELP Scientifica, Itálie)

SPE manifold Visiprep™ – zařízení pro solid-phase extrakci (Supelco, USA)

Sartorius CPA225D – analytické váhy (Sartorius Weighing Technology, Německo)

Acquity UPLC™ – ultra-účinný kapalinový chromatograf (Waters, USA)

Acquity CSH® C<sub>18</sub>; 2.1x50 mm, 1.7µm – chromatografická kolona (Waters, Irsko)

Xevo® TQ MS – tandemový hmotnostní spektrometr (Waters MS Technologies, Velká Británie)

Avanti™ 30 – centrifuga (Beckman, USA)

Heraeus Biofuge Stratos – centrifuga (ThermoScientific, Německo)

Oakton® pH 700 Benchtop Meter – pH metr (Cole – Parmer, USA)

ThermoShaker TS 100 – termostatovaná třepačka (Biosan, Lotyšsko)

Sanyo – autokláv (Sanyo Electric Co., Japonsko)



Holten-Lamin Air – laminární box (Thermo Scientific, USA)

MM301 – kulový mlýnek (Retsch, Německo)

TurboVap® LV – evaporační systém (Caliper Life Sciences, USA)

STUART® SB3 stolní laboratorní rotátor (Bibby Scientific, Velká Británie)

Acid Resistant Centrivap – vakuový koncentrátor (Labconco, USA) MassLynx™, verze 4.1

– software pro sběr a analýzu LC-MS dat (Waters, USA)

## 4.5 Pracovní postupy

### 4.5.1 Exprese *GA3ox2*, jeho extrakce a purifikace

Plasmidy nesoucí gen *GA3ox2* byly transformovány do expresních buněk T7express. Následně byla připravena prekultura bakterií *E. coli* ve sterilních tubách v 10 ml LB media s 1 % glukosou, ampicilinem a příslušným klonem. Takto připravené prekultury byly inkubovány při 37 °C a 200 rpm přes noc. Na druhý den byly připraveny LB média s ampicilinem do 500 ml Erlenmayerových baněk. Prekultury byly centrifugovány (5 min, 4000 g, 20 °C) a pelety resuspendovány v 10 ml LB média s ampicilinem. Potom byly takto rozsuspendované pelety přidány ke zbytku LB média a inkubovány při 30 °C a 180 rpm do doby, než se optická densita při vlnové délce 600 nm přiblížila hodnotě 0.6. Takto připravené kultury byly indukovány přidavkem 0.5 mM IPTG a ponechány na třepače 5 hodin při 25 °C a 200 rpm. Poté byla kultura centrifugována při 4000 g po dobu 20 minut a 10 °C a pelety byly zmrazeny při -20 °C. Celý postup byl později opakován, přičemž výsledné pelety byly uskladněny při -80 °C (další zpracování viz odst. 4.5.4).

### 4.5.2 Sterilizace semen řechy seté

Semena *L. sativum* byla odebrána do čisté zkumavky a sterilizována dvěma způsoby: 1. metodou povrchové sterilizace, kdy byl k semenům *L. sativum* přidán 70 % roztok etanolu obsahující Tween20 bez následného oplachu sterilní vodou a 2. metodou povrchové sterilizace pomocí 70 % EtOH s následným oplachem povrchu semen sterilní deionizovanou vodou. Po 5 minutovém třepání byl v obou případech za sterilních podmínek v laminárním boxu roztok odebrán pipetou se sterilní špičkou. Celý postup byl opakován třikrát.

### 4.5.3 Příprava kultivačního média dle Murashige & Skooga

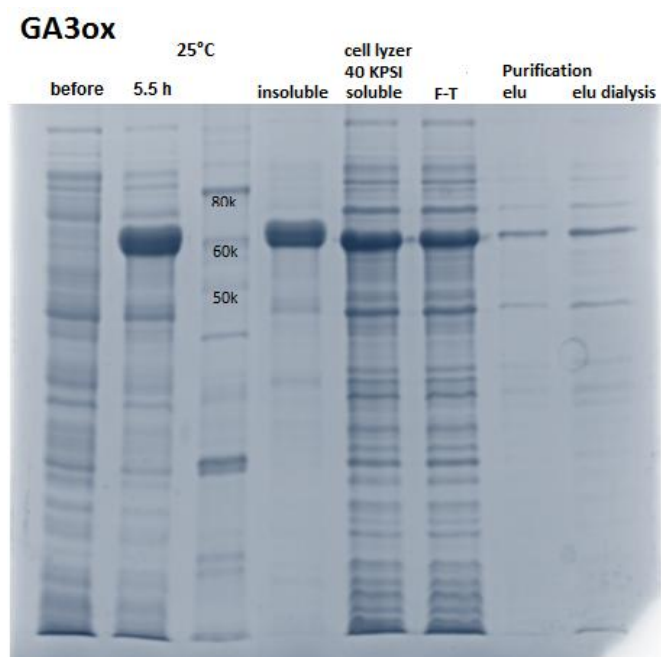
Plné MS médium pro kultivaci *L. sativum in vitro* bylo připraveno o složení 4.4 g/100 ml MS soli včetně vitamínů, 5 g/l rostlinného agaru a 3 % sacharózy s finální úpravou jeho pH na hodnotu 5.6 pomocí nasyceného roztoku KOH.

### 4.5.4 Příprava mobilní fáze pro UHPLC

Pro UHPLC analýzu giberelinů byla použita 10 mM HCOOH (FA) ve vodě (v/v) - mobilní fáze B, která byla připravena v 500 ml odměrné baňce rozpuštěním 192.5  $\mu$ l 98 % HCOOH v deionizované vodě (Milli-Q). Mobilní fázi A tvořil 100 % metanol (MeOH).

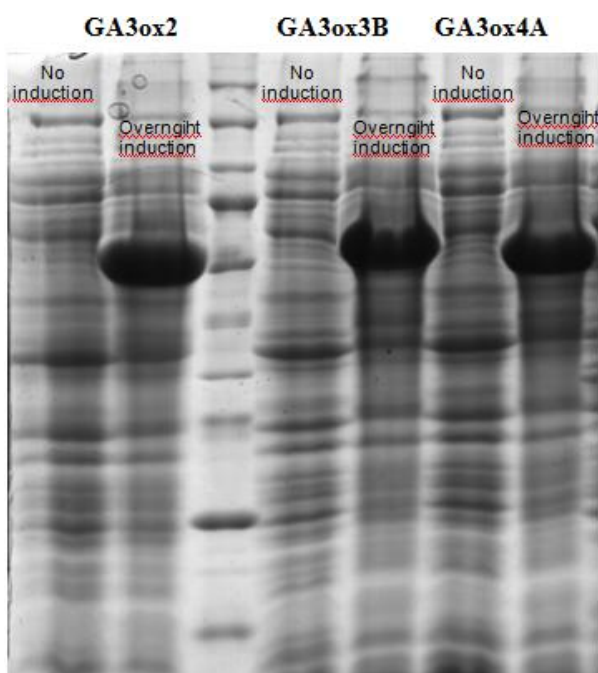
### 4.5.5 Test aktivity GA3ox enzymu *in vitro* – reakce dle MacMillan a kol., 1997

Enzym GA3ox byla připraven dle postupu v odstavci 4.5.1 a jeho přítomnost byla potvrzena gelovou elektroforézou (viz Obr. 13). Lyzát GA3ox byl purifikován dvěma postupy vedoucími k izolaci enzymu označeného jako GA3ox lyzer a GA3ox sonic (Dr. Kopečný a Dr. Kopečná, uskladněno při - 20 °C) - Obr. 13a.



**Obr. 13a.** Gelová elektroforéza GA3ox enzymu uskladněného při - 20°C (Dr. Kopečný, Dr. Kopečná, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, CR Haná, Olomouc).

První krok provedení *in vitro* enzymatické reakce, tj. reakce izolovaného enzymu GA3ox s vybranými giberelinovými substráty GA<sub>9</sub> a GA<sub>20</sub> spočíval v inkubaci 100 µl reakční směsi připravené smícháním 50 µl enzymu, 42 µl 100 mM Tris pufru o pH 7.5, 5 µl směsi kofaktorů (4 mM 2-oxoglutarát, 5 mM Fe<sup>II</sup>, 4 mM askorbátu, 2 mg/ml BSA) a 3 µl substrátu obsahujícího 45 ng GA<sub>9</sub> po dobu 60 minut při 30 °C a stálém třepání o frekvenci 450 rpm (termostatovaná třepačka). Následovalo zastavení reakce pomocí přidavku 10 µl 98 % kyseliny octové, které bylo zároveň spojeno s precipitací proteinu. Ten byl z reakční směsi odstraněn centrifugací při 5500 rpm po 3 minuty. Vzniklý supernatant byl následně naředěn přidavkem 900 µL Milli-Q vody na celkový objem 1 ml a purifikován za použití extrakce na pevné fázi (SPE). Purifikace byla optimalizována s ohledem na vlastnosti použitého SPE sorbentu, tj. pro zjištění nejvyšší návratnosti giberelinů byly testovány dva sorbenty typu C<sub>18</sub> (polymerní sorbent Bond Elut Plexa a klasický sorbent na silikagelovém základě Bond Elut C<sub>18</sub>) a jeden směsný sorbent na bázi polymerní C<sub>18</sub> s příměsí silného katektu (Oasis MAX). Po odpaření vzorku do sucha při 37 °C buď pod proudem dusíku nebo pomocí vakuového koncentrátoru, následovala jeho rekonstrukce v 50 µl mobilní fáze (10 % MeOH, 90 % 10 mM kyseliny mravenčí) a nástřik na UHPLC-MS/MS v objemu 15 µl. Celý postup byl stejným způsobem rovněž zopakován pro substrát GA<sub>20</sub> přidávaný do reakce ve stejném množství, tj. 45 ng. V dalším kroku byl selektován GA3ox lyzer jako aktivnější z dvojice enzymů ten byl následně připraven ve třech opakováních označených jako GA3ox2, GA3ox3B a GA3ox4A (Dr. Kopečný, uskladněno při -80 °C, Obr. 13b).



**Obr. 13b.** Gelová elektroforéza GA3ox enzymu uskladněného při -80°C (Dr. Kopečný, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, CR Haná, Olomouc.

Nejvyšší výtěžek předpokládaného produktu poskytoval GA3ox2, tudíž s ním byl proveden rovněž experiment ověřující návratnost substrátu a identitu předpokládaného produktu, kdy byla reakce GA3ox2 provedena s přidavkem D<sub>2</sub>-GA<sub>9</sub>, GA<sub>4</sub> i bez substrátu, přičemž D<sub>2</sub>-GA<sub>9</sub> a GA<sub>4</sub> (oba 45 ng) byly přidány do reakční směsi těsně před zastavením reakce pomocí kyseliny octové. Reakce s GA3ox2 byla dále optimalizována s ohledem na délku inkubační doby (60, 120 a 180 min) a stejně tak množství vlastního enzymu vkládaného do reakce bylo vybráno po předchozím testování (10, 30, 50 a 70 µl).

#### **4.5.6 Test aktivity GA3ox enzymu *in vitro* - reakce navržena dle McNeil a kol., 2005**

Směs substrát/kofaktor tvořená 1 mM DTT, 0.6 mg/ml katalázy, 4 mM 2-oxoglutarátu, substrátu (45 ng) a 50 mM-Tris pufru pH 7.5 v celkovém objemu 44 µl byla zahřívána na teplotu 37 °C po dobu 5 min. Mezitím byla stranou připravena směs enzym/Fe<sup>II</sup> tvořená enzymem (GA3ox2) a Fe<sup>II</sup> (připraven jako 500 mM zásobní roztok síranu železnatého ve 20 mM HCl a ředěný vodou na 50 µl) při laboratorní teplotě a tato směs byla míchána po dobu 3 min. Enzymatická reakce byla iniciována přidavkem 6 µl směsi enzym/Fe<sup>II</sup> ke směsi substrát/kofaktor. Zastavení reakce bylo provedeno po 5 min přidavkem 100 µl 0.5 M HCl. Vzorek byl následně centrifugován při rychlosti 2 773 g po 3 minuty. Supernatant byl napipetován do čisté zkumavky a odpařen pod proudem dusíku do sucha, popř. na vakuové odparce při 37 °C. Dále následovalo jeho rozpuštění v 50 µl mobilní fáze (10% MeOH, 90 % 10 mM kyseliny mravenčí) a nástřik na UHPLC-MS/MS v objemu 15 µl.

#### **4.5.7 Kultivace rostlin řeřichy seté *in vitro***

MS médium s agarem a 3% sacharózy připravené dle postupu výše (kap. 4.5.3) bylo po sterilizaci v autoklávu ještě v horkém stavu rozlito v laminárním boxu v objemu 70 ml do každé z připravených čtvercových Petriho misek o rozměru 12x12 cm (dál jen vertikální desky). Během chlazení a tuhnutí kultivačního média v deskách byla rovněž v laminárním boxu, provedena sterilizace semen řeřichy (postup viz výše). Semena byla vyseta na vertikální desky ve dvou řadách, jarovizována po dobu 3 dnů (4 °C, tma) a následně kultivována v růstové komoře při teplotě 22 °C po dobu 4 dnů za světelných podmínek odpovídajících krátkému dni, tj. 8 h světlo/ 16 h tma, aby nebylo u rostlin indukováno kvetení (řeřich setá je dlouhodobě rostlinou, u níž je kvetení urychlováno fotoperiodou delší než hraniční délka dne, tj. 10 - 14 h, a naopak bylo dosaženo takového vývoje, při

němž je zajištěn zisk co největší listové plochy a zároveň maximální denní obrat zásob uhlíku ve všech růstových fázích listů - Berenfäller a kol., 2015). Paralelní kultivace stejným způsobem vysetých semen probíhala za tmy při teplotě 19 °C. Po uplynutí 4 dnů byly u všech semenáčků řeřichy změřeny délky kořene a nadzemní části pomocí aplikace ImageJ (více viz kapitola 4.5.8). Čtyřdenní semenáčky řeřichy *Lepidium sativum* byly pomocí pinzety odebrány z vertikálních desek do připravených plastových zkumavek, hluboce zmrazeny pomocí tekutého dusíku a uskladněny při - 80 °C do doby následné extrakce a purifikace. V experimentu s inhibitory GA3ox (13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>, GA<sub>5</sub> a prohexadionu) byl do 70 ml sterilního kultivačního MS média přidán vždy jeden testovaný inhibitor v množství 25 µg a to pak bylo následně nalito do připravené vertikální desky.

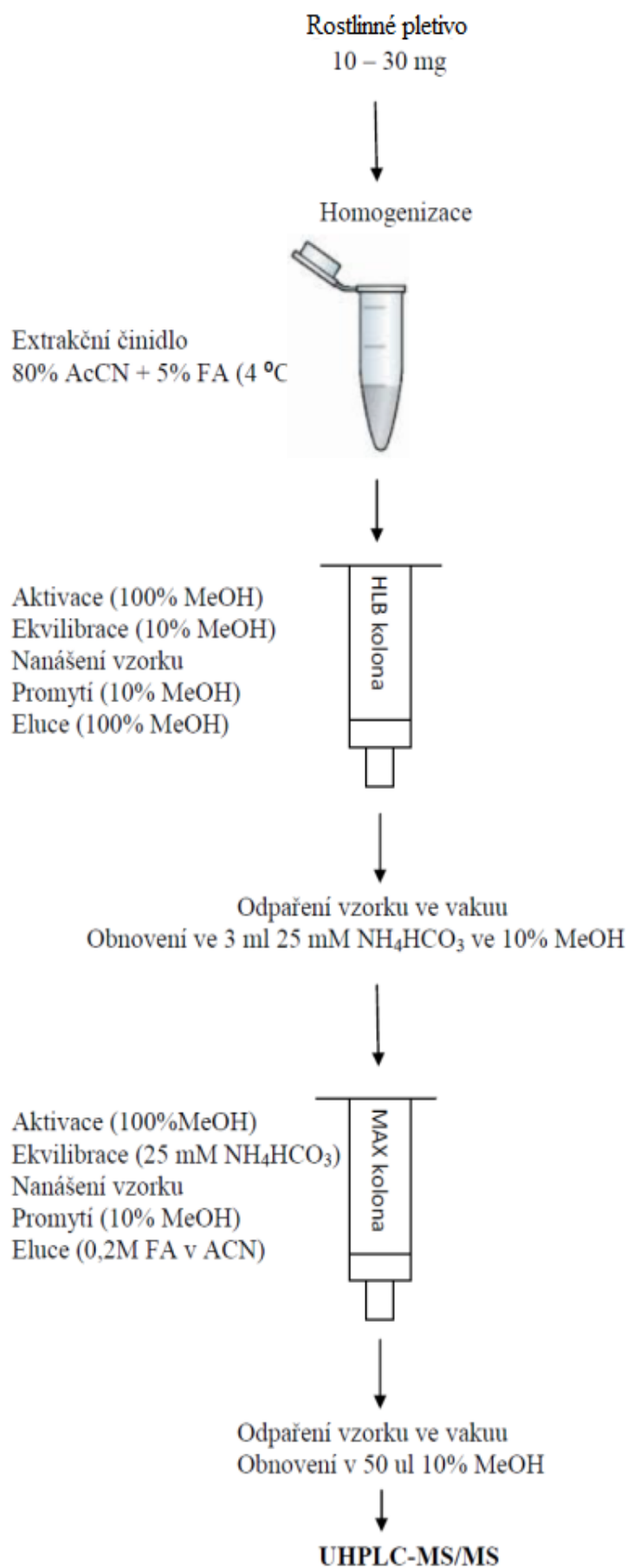
#### **4.5.8 Stanovení průměrné délky kořene a nadzemní části semenáčků řeřichy seté *L. sativum* pomocí programu ImageJ**

ImageJ je program, který umožňuje analýzu obrazu, tj. analýzu bitmapové grafiky. Jde o volně přístupnou aplikaci, která je k dispozici na adrese <http://imagej.nih.gov/ij/>. V prostředí programu je možné upravovat 6-bitové, 16-bitové i 32-bitové obrázky ve formátu TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS a RAW. Pomocí tohoto programu byly analyzovány fotografie 4-denních semenáčků řeřichy seté *Lepidium sativum* za účelem přesného vyhodnocení jejich velikosti, tj. měření délky její nadzemní i kořenové části. Postup práce spočíval nejprve ve vyznačení oblasti, jejíž parametry byly známy (velikost pravítka) pomocí ikony Straight line. Dále byla zadána hodnota známého rozměru do kolonky Known distance (konkrétně 3 cm z vyfoceního pravítka) jejíž jednotky byly následně převedeny z centimetrů na milimetry. V dalším kroku byl označen každý kořen rostliny, resp. její nadzemní části pomocí funkce Segment line a změřen pomocí funkce Measure. Všechny tyto úkony byly provedeny u: (a) semenáčků řeřichy kultivovaných po dobu 4 dnů za světelných podmínek v režimu 8/16h (světlo/tma) při 22 °C a b) semenáčků řeřichy kultivovaných za tmy po dobu 4 dnů při teplotě 19 °C. Získané hodnoty byly následně zpracovány pomocí programu MS Excel, kde byla vypočítána průměrná délka kořenů a nadzemní části rostliny včetně směrodatných odchylek všech získaných hodnot za použití vždy tří biologických replikátů.

#### 4.5.9 Příprava biologického materiálu pro analýzu giberelinů pomocí UHPLC-MS/MS

Kvantifikace giberelinů byla provedena dle Urbanová a kol., 2013 s určitými modifikacemi (Schéma viz Obr. 14). Rostlinný materiál kultivovaný za výše uvedených podmínek (kapitola 3.5.7) byl zhomogenizován v třecí misce pomocí tloučku a tekutého dusíku, navážen do 2 ml mikrozkušavek v triplicátech po 10, 20 a 30 mg FW. Po přidání 1 ml vychlazeného 80 % ACN obsahujícího 5 % kyseliny mravenčí (FA) jako extrakčního činidla a směsi 19 vnitřních standardů v množství 50 pmol/vzorek byly do každé mikrozkušavky přidány dvě 2-mm kuličky z ZrO<sub>2</sub>. Za použití a vibračního mlýnku MM301 pracujícího při frekvenci 27 Hz po dobu 3 minut bylo rostlinné pletivo rozemleto do jemné konzistence a extrahováno přes noc při teplotě 4 °C a frekvenci 17 ot/min za použití laboratorního rotátoru Stuart SB3. Druhý den byly hrubé extrakty zcentrifugovány po dobu 10 min při 4 °C a 36 670 g. Supernatanty byly odpipetovány do čistých borosilikátových zkumavek, k peletu byl přidán 1 ml extrakčního činidla a po promíchání směsi na vortexu byly vzorky ještě reextrahovány po 60 minut při 4 °C. Po reextrakci byly vzorky centrifugovány a supernatanty přidány k prvnímu extrakčnímu podílu. Spojené extrakty byly odpařeny k suchu ve vakuu, následně rekonstruovány v 300 µl 100 % MeOH, sonikovány, naředěny 2.7 ml Milli-Q vody a nakonec přečištěny nejprve přes Oasis HLB SPE kolony a následně přes Oasis MAX SPE kolony (obojí 60 mg/3ml). Pro SPE purifikaci byla použita souprava Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold. Kolonky HLB byly aktivovány 3 ml 100 % MeOH a ekvilibrovány 3 ml 10 % MeOH. Poté na ně byly nanášeny extrakty jednotlivých vzorků o rychlosti průtoku 0.75 ml/min. Následovalo promytí 3 ml 10 % MeOH a eluce 3 ml 100 % MeOH. Vzorky byly poté odpařeny do sucha ve vakuovém koncentrátoru. Před purifikací na MAX kolonkách bylo k odpařeným vzorkům přidáno 300 µl 100 % MeOH, který byl následně doplněn na 2.7 ml 25 mM-NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Sorbent MAX kolonek byl aktivován 3 ml 100% MeOH a ekvilibrován 3 ml 25 mM-NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Posléze byly nanášeny extrakty vzorků, následovalo promytí 3 ml 10% MeOH a závěrečná eluce 3 ml 0.2M FA v ACN do čistých zkumavek. Eluáty byly odpařeny do sucha pod proudem dusíku pomocí odpařovacího systému TurboVap. Odpařené vzorky byly skladovány v mrazáku při teplotě - 20 °C až do analýzy pomocí UHPLC-MS/MS (Obr. 14).

K odpařeným vzorkům bylo přidáno 50 µl 10 % MeOH, vzorky byly sonifikovány, přefiltrovány přes nylonový filtr, převedeny do inzertů v LC vialkách a nastříknuty na UHPLC-MS/MS v objemu 15 µl.



**Obr. 14.** Schéma purifikačního protokol pro izolaci giberelinů z rostlinných pletiv.

#### 4.5.10 Stanovení giberelinů metodou UHPLC-MS/MS

K separaci a kvantifikaci giberelinů byla využita ultra-účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS/MS) na bázi trojitého kvadrupólu. Ionizace giberelinů (GAs) jako intaktních karboxylových kyselin probíhala za pomoci elektrospreje pracujícího v negativním módu ((-)-ESI). Optimalizované podmínky pro jednotlivé giberelinové analyty jsou uvedeny v Tabulce 1. Pro samotnou separaci byla použita chromatografická kolona Acquity UPLC® CSH C<sub>18</sub> o rozměrech 2.1 x 50 mm a velikosti částic sorbentu 1.7 μm.

Tabulka 1 – Optimalizované podmínky UHPLC(-)ESI/MS/MS metody pro jednotlivé analyty (převzato z Urbanová a kol., 2013)

<b>Analyt</b>	<b>MRM přechod</b>	<b>Napětí na kóně [V]</b>	<b>Kolizní energie [V]</b>
GA <sub>8</sub>	363 > 275	25	18
GA <sub>29</sub>	347 > 259	30	15
GA <sub>3</sub>	345 > 239	25	14
GA <sub>1</sub>	347 > 259	32	18
GA <sub>6</sub>	329 > 119	30	26
GA <sub>5</sub>	329 > 145	28	24
GA <sub>20</sub>	331 > 287	32	19
GA <sub>44</sub>	345 > 301	32	21
GA <sub>19</sub>	361 > 273	32	23
GA <sub>34</sub>	347 > 259	30	27
GA <sub>51</sub>	331 > 287	33	17
GA <sub>7</sub>	331 > 257	25	18
GA <sub>4</sub>	347 > 329	33	18
GA <sub>53</sub>	347 > 329	35	24
GA <sub>24</sub>	345 > 257	35	26
GA <sub>9</sub>	315 > 271	32	23
GA <sub>15</sub>	329 > 257	37	22
GA <sub>12</sub>	331 > 313	35	23

Purifikované extrakty rostlinných pletiv rekonstruované v 50 μl mobilní fáze (10 % MeOH, 90 % 10 mM FA) byly převedeny do 2 ml LC vialek s 0.2 ml kónickým inzertem a



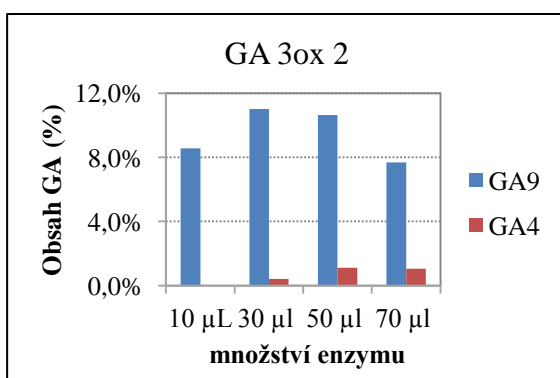
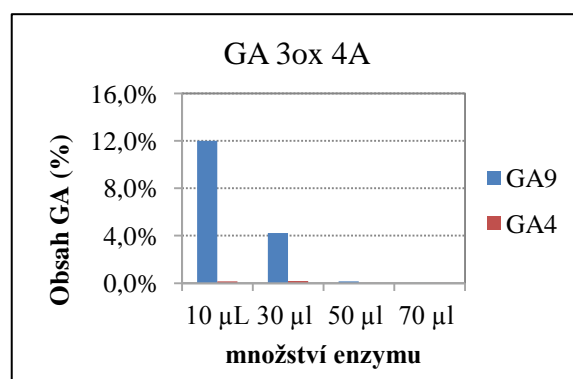
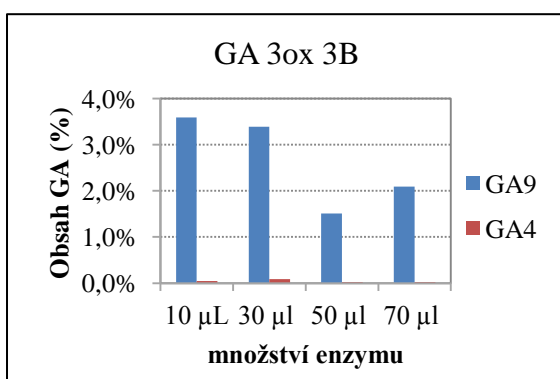
nastříknuty v objemu 15  $\mu$ l na kolonu s reverzní fází temperovanou na 40 °C. Gibbereliny byly separovány v lineárním gradientu tvořeném pomocí MeOH (mobilní fáze A) a 10 mM FA (mobilní fáze B) v poměru od 10:90 (v/v) do 60:40 (v/v) za 15 min. při průtoku mobilní fáze 0.25 ml/min. Kolona byla následně promyta 100 % MeOH (0.75 ml) a ekvilibrována na počáteční podmínky (10:90, A:B) (v/v) po dobu 2.5 min.

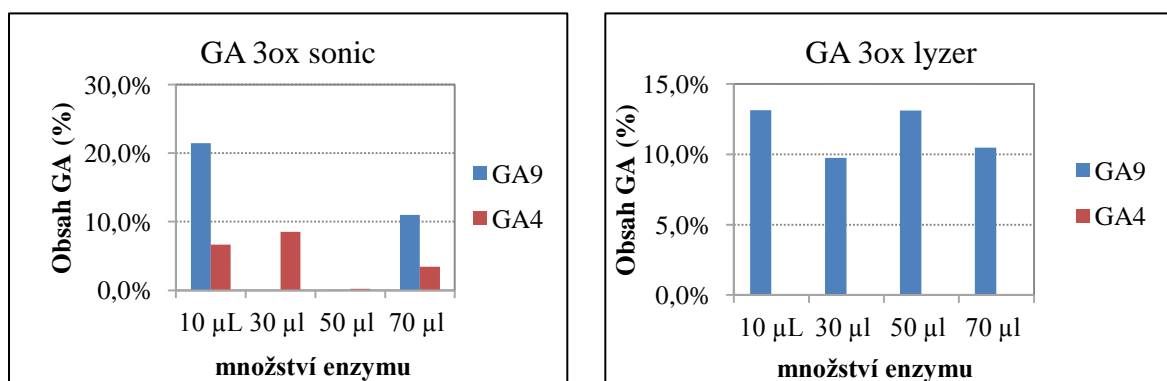
MS data byla zaznamenána v MRM módu s následujícími parametry MS: kapilární napětí 1.5 kV; teplota zdroje 150 °C; napětí na kóně 30 V; teplota desolvatačního plynu (dusík) 650 °C a jeho průtok byl 650 l/hod. Doba prodlevy (dwell time) pro každý MRM kanál byla vypočtena na 16 skenovacích bodů na pík s mezikanálovým zpožděním 0.1 s. Všechna data byla posléze zpracována pomocí programu MassLynx™, ver. 4.1.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

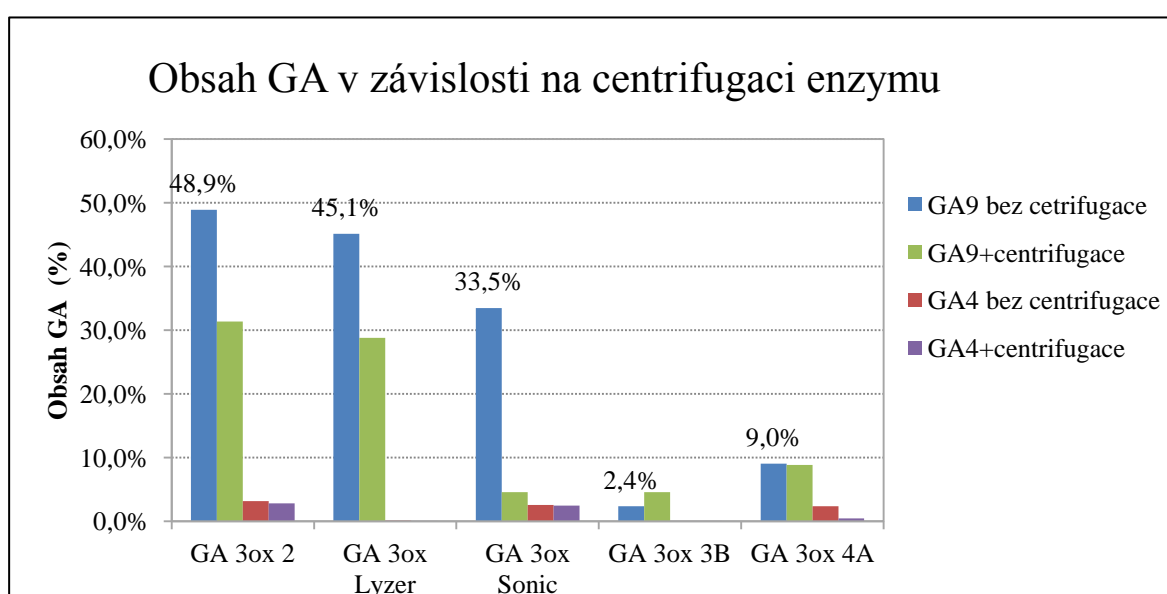
### 5.1 Detekce giberelinů po reakcích s enzymem GA3ox *in vitro*

V těchto experimentech bylo cílem zjistit, zdali dochází k detekci GAs, tj. produktů reakce GA3ox s daným substrátem (GA<sub>9</sub>, GA<sub>20</sub>). Reakce *in vitro* byla navržena s cílem vytvořit enzymatický systém, který by byl základem pro budoucí testování synteticky připravených inhibitorů těchto významných biosyntetických enzymů giberelinů (GAs). Nejprve byla reakce provedena dle MacMillan a kol., 1997 (kapitola 4.5.5). Z výsledků experimentů bylo zjištěno, že až na výjimky (GA3ox sonic, kde bylo nalezeno 8.5 % GA<sub>4</sub> v případě použití 30 μl enzymu v *in vitro* reakci – Graf 1) k detekci těchto fytohormonů, které by měly být předpokládanými produkty reakce GA3ox se substrátem (GA<sub>9</sub>→GA<sub>4</sub>, GA<sub>20</sub>→GA<sub>1</sub> – viz schéma biosyntézy, Obr. 5), nedochází. Byla zjišťována příčina tohoto stavu zahrnující optimalizaci množství enzymu v reakci, množství substrátu, zda s precipitací proteinu při purifikaci vzorku nedochází k adsorpci reakčních produktů či zda ke ztrátám analytů nedochází při samotné purifikaci pomocí SPE. Ukázalo se, že množství enzymu (testováno 10, 30, 50 a 70 μl lyzátu, viz kapitola 4.5.5) použitého v reakci nemá zásadní vliv na průběh reakce, purifikace rovněž neovlivňuje dosažený výsledek (Graf 1), stejně jako centrifugace nemá žádný zásadní vliv na obsah GAs ve směsi po *in vitro* reakci s GA3ox (Graf 2).





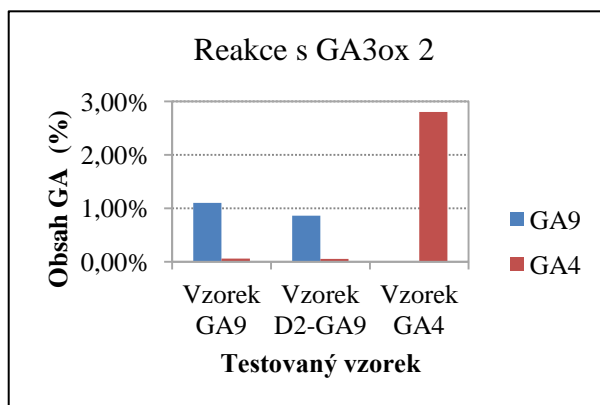
**Graf 1.** Závislost obsahu GAs na množství enzymu, purifikováno přes C<sub>18</sub>, centrifugováno.



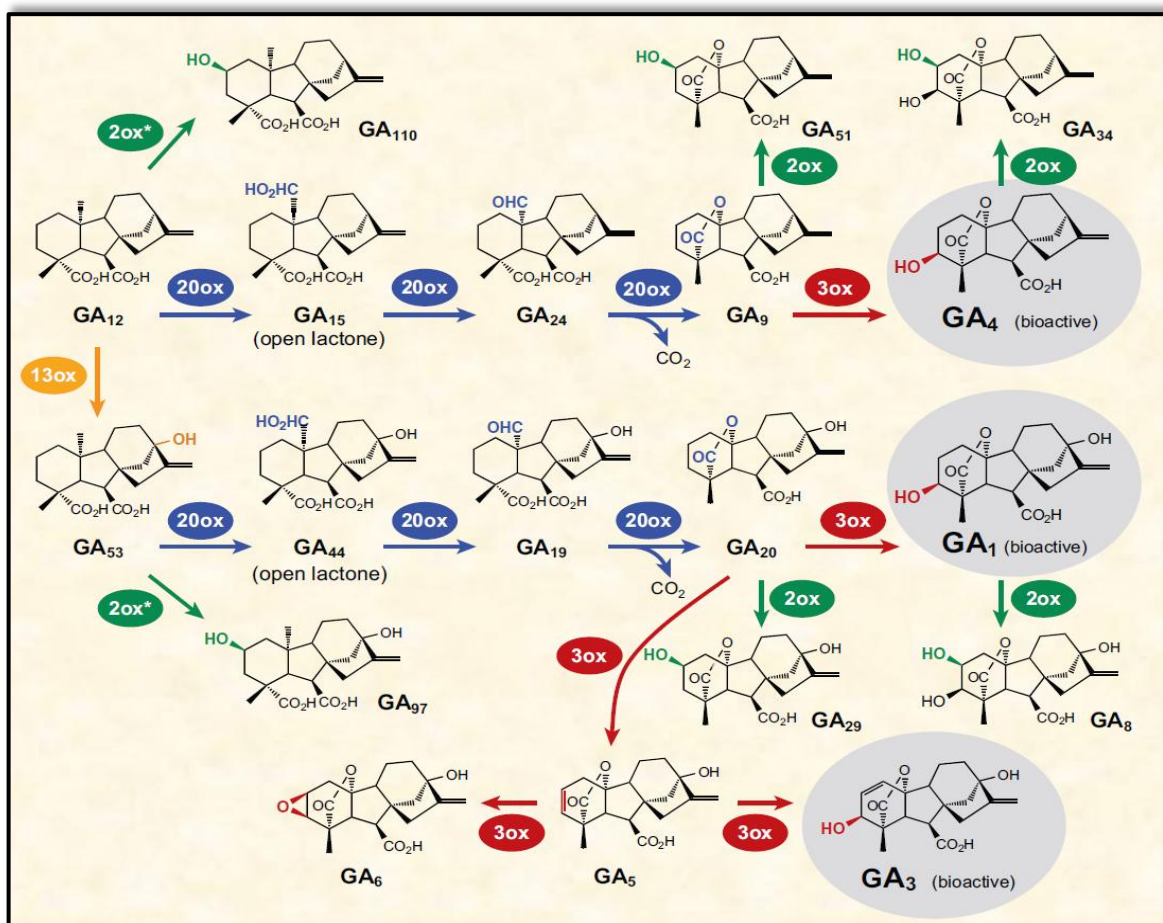
**Graf 2.** Závislost obsahu GA (substrát GA<sub>9</sub> a produkt GA<sub>4</sub>) na centrifugaci enzymu.

Vzhledem k tomu, že design experimentu dle MacMillan a kol., 1997 (kapitola 4.5.5), neposkytl optimální a uspokojivé výsledky (tvorba produktu min. 80 %), bylo cílem pokusit se o jiný způsob provedení reakce. U reakce dle MacMillan a kol., 1997 byly smíchány substrát, kofaktory i enzym v jednom kroku, tudíž bylo testováno zda k úspěšné přeměně substrátu na produkt pomocí GA3ox dojde, když se smíchají nejdříve enzym a Fe<sup>II</sup> a až následně se k této směsi přidá směs substrát/kofaktor (provedení podle McNeil a kol., 2005; kapitola 4.5.6). Výsledky měření však ukázaly, že ani při použití tohoto pracovního postupu nedochází k požadované tvorbě produktu (GA<sub>4</sub> nebo GA<sub>1</sub>, viz schéma 1). Na základě těchto poznatků, kdy ani v jednom ze dvou způsobů provedení enzymatické reakce *in vitro* nedošlo k pozitivní detekci jejich produktů, byly výsledky konzultovány s prof. Peterem Heddenem, který objasnil, že ze tří lyzátů označených jako GA3ox2,

GA3ox3B a GA3ox4A má pouze GA3ox2 opravdu funkci 3 $\beta$ -hydroxylázy, zatímco ostatní dva enzymy vykazují funkci 1 $\beta$ -hydroxylázy. Produktem reakce tohoto enzymu s GA<sub>9</sub> by tedy neměla být GA<sub>4</sub>, nýbrž GA<sub>61</sub>, tj. 1-hydroxy izomer GA<sub>4</sub>. Tato látka není v použité UHPLC-MS/MS metodě pro detekci a kvantifikaci zahrnuta, tudíž nebyla tato skutečnost zjištěna dříve. Ani v případě *in vitro* reakce s přidavkem 45 ng D<sub>2</sub>-GA<sub>9</sub> a GA<sub>4</sub> (těsně před přidavkem 98 % kyseliny octové, kapitola 4.5.5) nebyly tyto sloučeniny detekovány v takovém množství v jakém do reakce vstoupily (Graf 3).



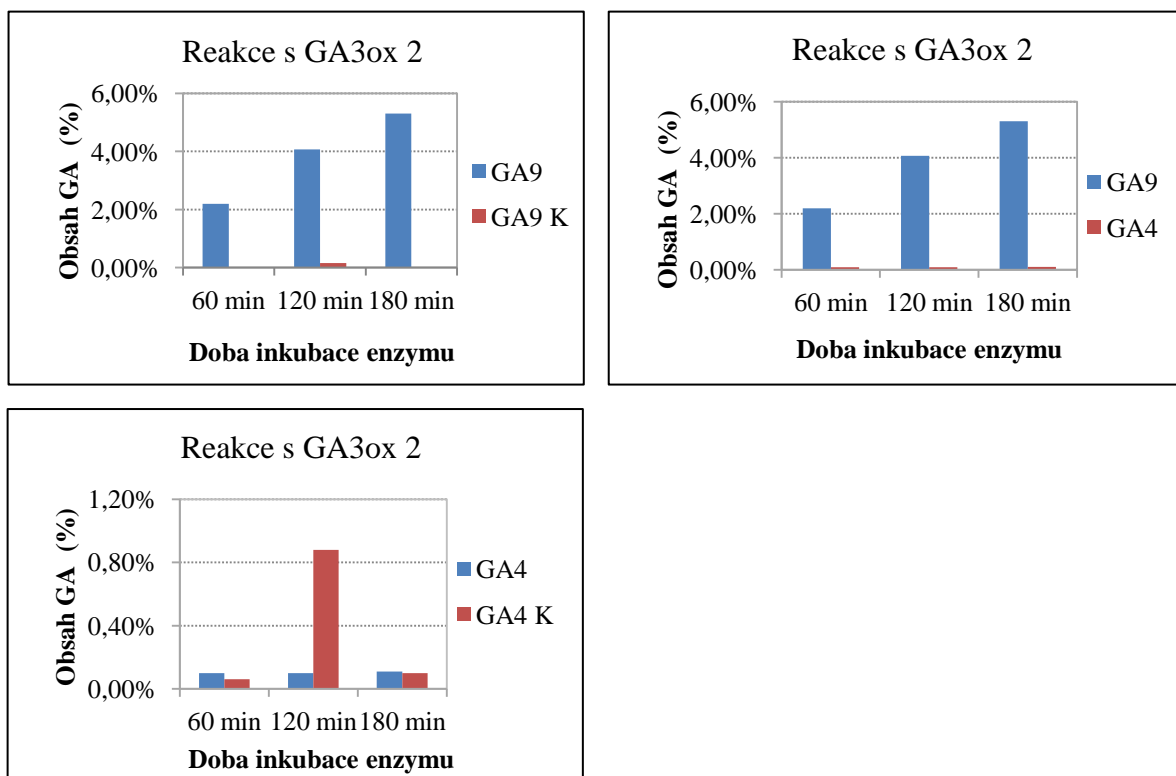
Graf 3. Test návratnosti a produkce GAs *in vitro* reakcí s GA3ox vzorku



Obr. 15. Schéma biosyntézy giberelinů.

## 5.2 Vliv délky reakční doby na obsah giberelinů v reakční směsi

V dalších experimentech byl testován vliv reakční doby na přeměnu GA substrátů GA3ox *in vitro*. Byla testována reakční doba 60 min, 120 min a 180 min při zachování dříve použité teploty 30 °C a frekvence míchání reakční směsi 450 rpm po celou dobu průběhu reakce, která byla zastavena přidávkem 98 % kyseliny octové.



**Graf 4.** Závislost obsahu GAs na době kultivace

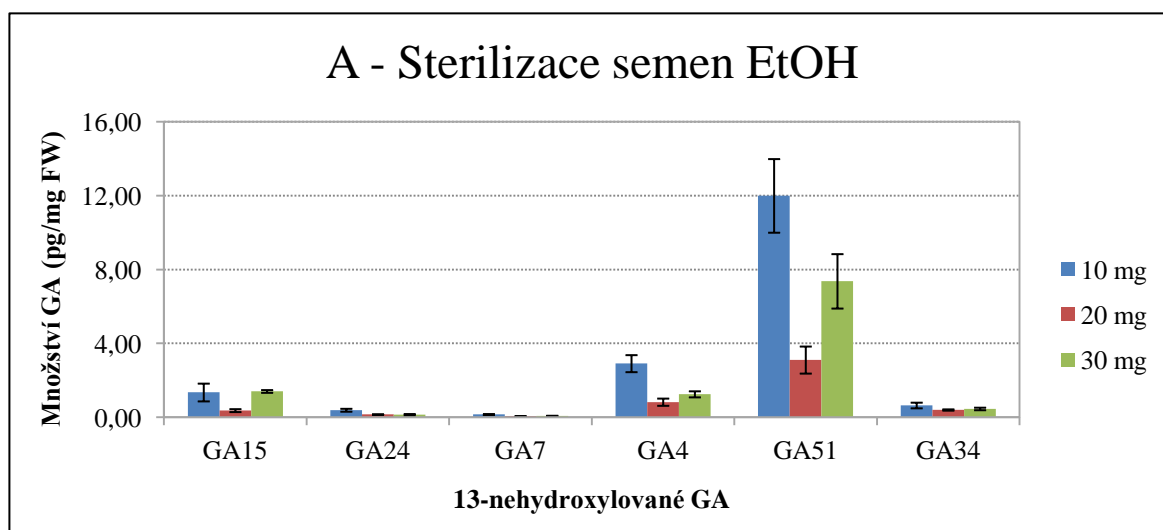
Jak je patrné z Grafu 4, obsah GA roste s prodlužující se dobou inkubace reakční směsi, vyjma kontrolního vzorku GA<sub>4</sub> (reakce s GA3ox2 bez substrátu), u kterého byl zaznamenán nejvyšší výtěžek už po 120 min (0.88 %) v porovnání s ostatními testovanými reakčními dobami. Ze získaných výsledků vyplývá, že ve většině případů působením enzymu typu 3β-hydroxylázy (GA3ox2) nedochází za testovaných *in vitro* podmínek k přeměně GA<sub>9</sub> ani GA<sub>20</sub> za tvorby bioaktivních GAs, tj. GA<sub>4</sub>, resp. GA<sub>1</sub>. Je s podivem, že množství GA<sub>9</sub> roste vlivem prodlužující se inkubační doby. Po 60 min bylo detekováno 2.20 % z původního množství GA<sub>9</sub> přidávaného do reakce s enzymem, po 120 min pak bylo nalezeno 4.07 % a po 180 min. 5.30 %, ačkoliv jeho obsah by měl v průběhu času naopak klesat v důsledku jeho přeměny enzymem na příslušný produkt (GA<sub>4</sub>).

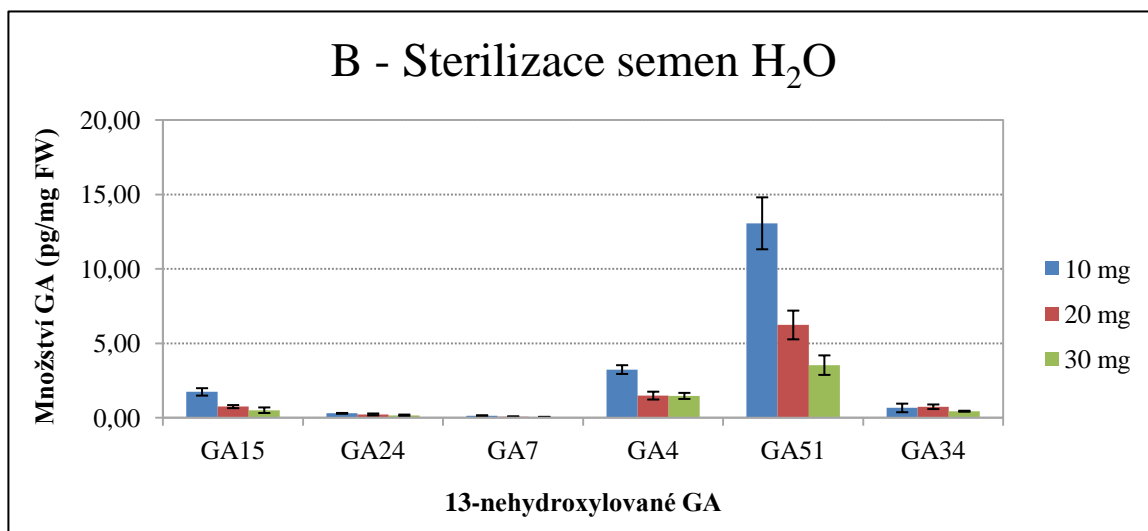
Vzhledem k negativním výsledkům získaným při *in vitro* experimentech s GA3ox enzymem, bylo rozhodnuto ověřit vliv vybraných inhibitorů 3β-hydroxyláz účastnících se produkce bioaktivních giberelinů přímo na rostlinách, tj. sledovat vliv inhibice přirozené

GA3ox na hladiny bioaktivních GAs včetně jejich biosyntetických prekurzorů a následně i na hladiny jejich neaktivních metabolitů. Zároveň byl sledován vliv inhibitorů GA3ox na délku nadzemní části (včetně délky kořene), neboť GAs mají zásadní vliv, kromě jiného, právě na délku stonku (Cosgrove a Sovonick-Dunford, 1989).

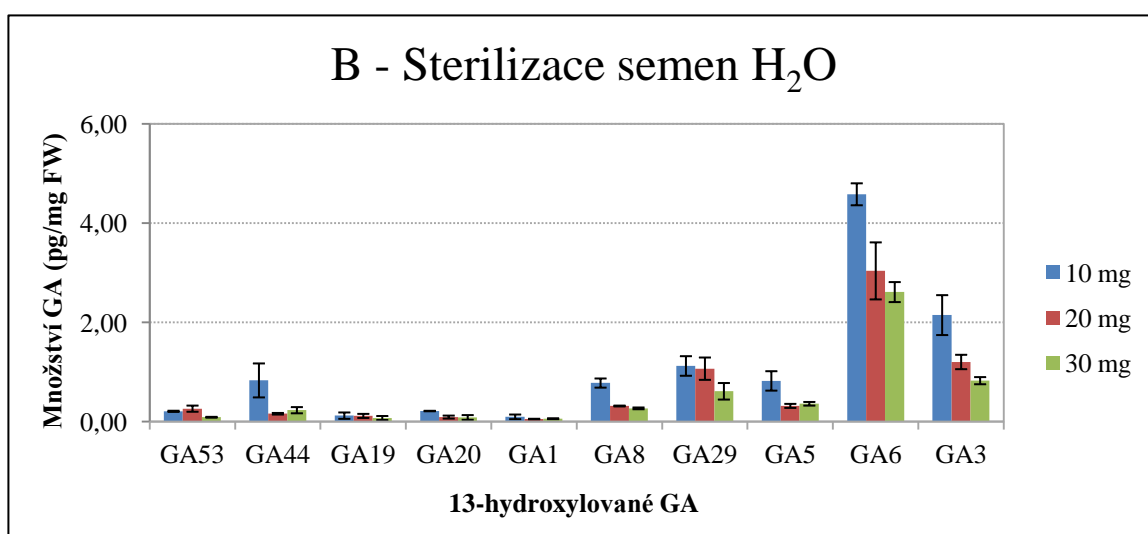
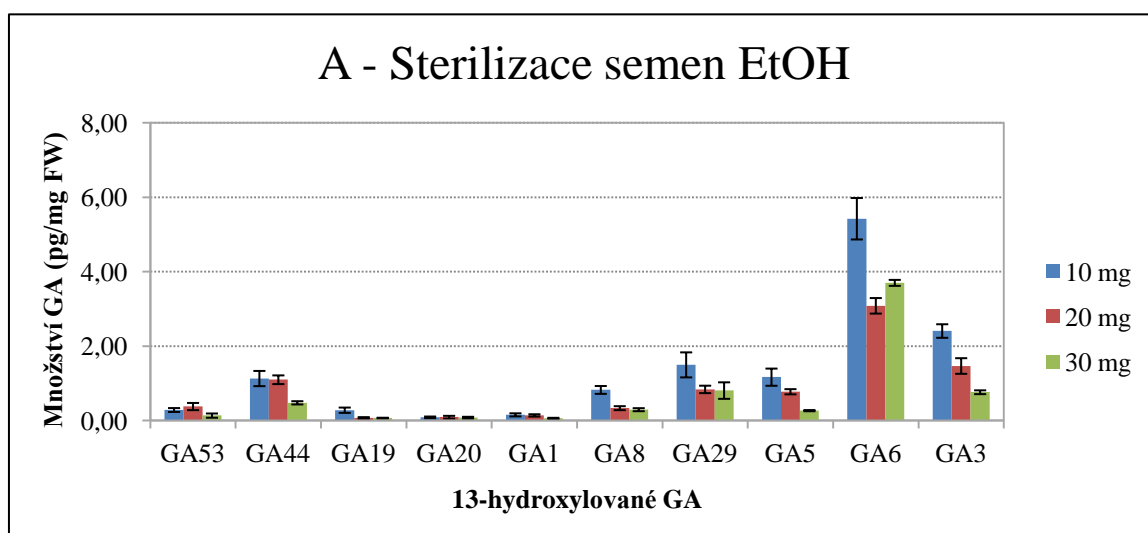
### 5.3 Optimalizace postupu povrchové sterilizace semen řeřichy seté *Lepidium sativum* s ohledem na vliv endogenních hladin sledovaných giberelinů

Semena řeřichy seté *Lepidium sativum* o navážkách 10, 20, 30 mg (vždy ve třech technických replikátech) byla sterilizována dvěma způsoby metodou povrchové sterilizace pomocí 70 % EtOH s 0.1 % Tween 20 bez následného oplachu sterilní vodou a s oplachem povrchu semen sterilní vodou (pracovní postup viz kapitola 4.5.2). V tomto experimentu byl sledován vliv sterilizace na endogenní hladiny 13-hydroxylovaných a 13-nehydroxylovaných GAs v semenech řeřichy *L. sativum*. Cílem bylo zjistit, zda povrchová sterilizace pomocí 70 % EtOH není moc drastickou metodou sterilizace s ohledem na tloušťku osemení semen řeřichy a neovlivňuje tak významně případně fyziologické procesy spojené s biosyntézou giberelinů. Bez následného oplachu vody by pak semena rychle schla v proudu vzduchu v laminárním boxu a mohla se buď ihned použít k výsevu na vertikální desky, nebo uschovat pro další použití. S oplachem semen sterilní vodou se tento proces prodlužuje, protože semena déle schnou kvůli nižší těkavosti vody oproti 70 % EtOH.





**Graf 5.** Vliv druhu sterilizace semen *L. sativum* na hladiny 13-nehydroxylovaných giberelinů. A – sterilizace 70% etanolem bez oplachu sterilní vodou, B – sterilizace etanolem s následným oplachem sterilní vodou.

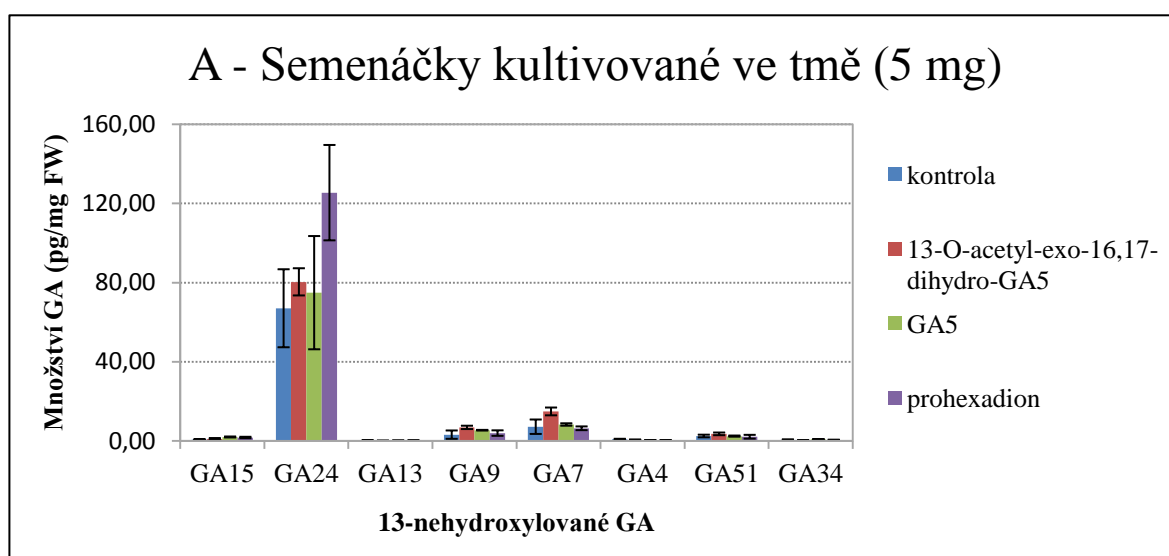


**Graf 6.** Vliv druhu sterilizace semen *L. sativum* na hladiny 13-hydroxylovaných giberelinů. A – sterilizace 70% etanolem bez následného oplachu sterilní vodou, B – sterilizace etanolem s následným oplachem sterilní vodou.

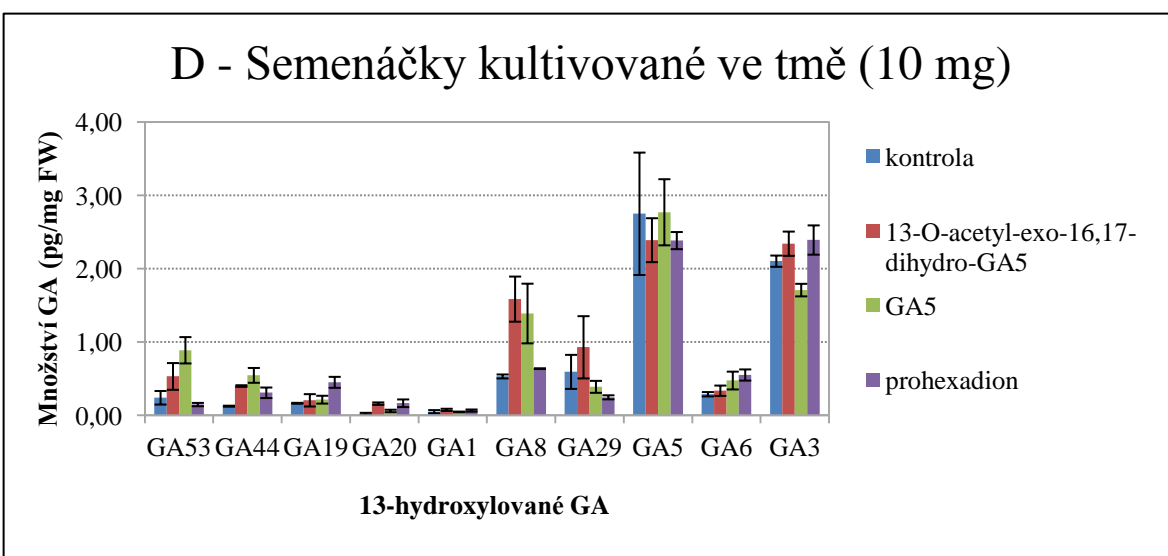
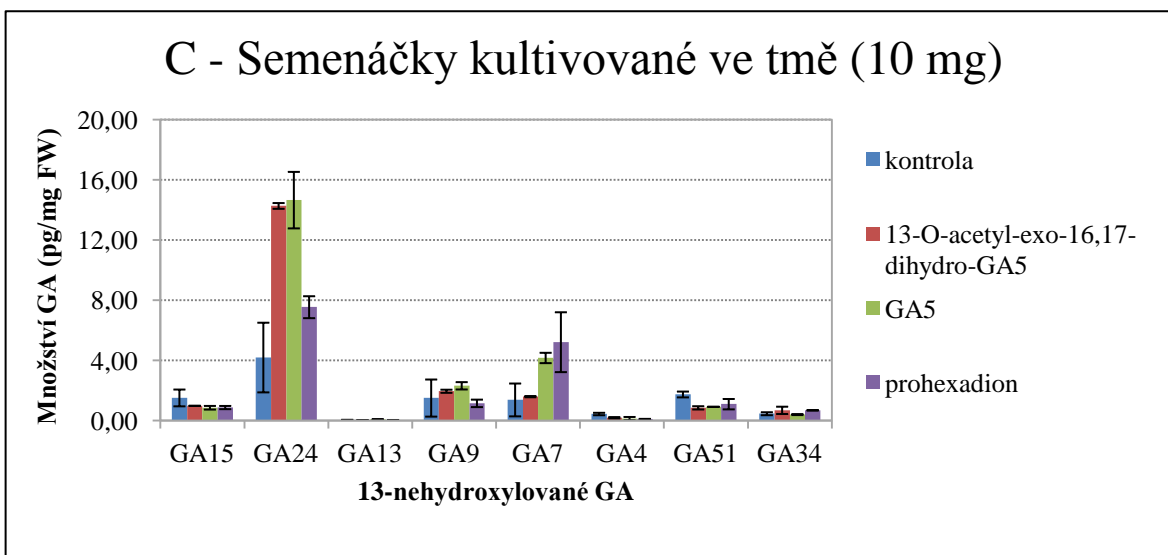
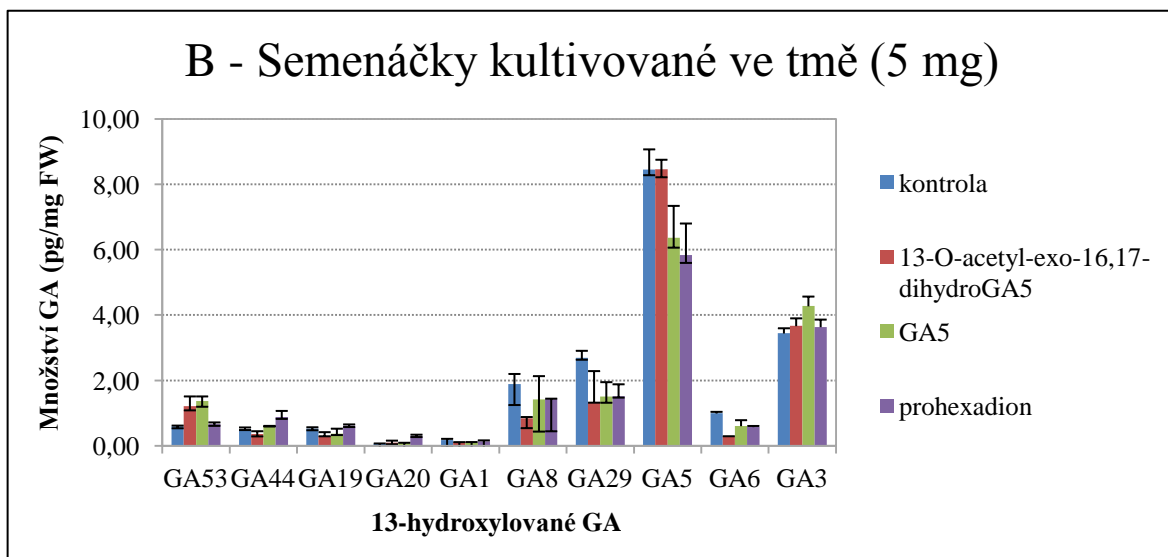
Výsledky ukázaly, že postup sterilizace nemá zásadní vliv ani na endogenní hladiny 13-hydroxylovaných GAs, ani na hladiny jejich 13-nehydroxylovaných analog v semenech řechy seté (Graf 5 a 6). Pro sterilizaci pak byl proto použit postup sterilizace pomocí 70% EtOH bez následného oplachu sterilní vodou, čímž bylo dosaženo rychlejšího schnutí semen před jejich dalším použitím, příp. uskladněním. Z grafů rovněž vyplývá, že optimální navážka semen řechy je 10 mg FW, kdy je získán nejlepší signál pro většinu sledovaných GAs, neboť je zde v nejmenší míře pozorován tzv. matriční efekt. Při sterilizaci semen byly detekovány relativně vysoké hladiny GA<sub>6</sub>, což je v souladu s dříve publikovanými výsledky (Oracz a kol., 2012).

#### 5.4 Studium role GA3ox inhibitorů na endogenní hladiny giberelinů

Semena *L. sativum* sterilizovaná 70 % EtOH s 0.1 % Tween 20 byla kultivována na čtyřech různých vertikálních deskách obsahujících MS médium, kdy tři z nich obsahovaly příslušný inhibitor (13-*O*-exo-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>, GA<sub>5</sub> a prohexadion) a poslední byla prosta inhibitoru (kontrola). Semena byla kultivovaná nejdříve za tmy při 19 °C a následně za krátkého dne (8h světlo/16 h tma) při 22 °C s cílem najít korelaci mezi světelnými podmínkami, použitím inhibitoru GA3ox a hladinami GAs u těchto rostlin. Ačkoli bylo dříve zjištěno, že navážka 10 mg FW je vhodná pro analýzy giberelinů v semenáčcích řechy, byla v tom experimentu ještě testována navážka 5 mg FW, aby bylo zjištěno, zda i tato je ještě dostatečná pro úspěšnou detekci GAs a zároveň se ještě případně sníží matriční efekt.







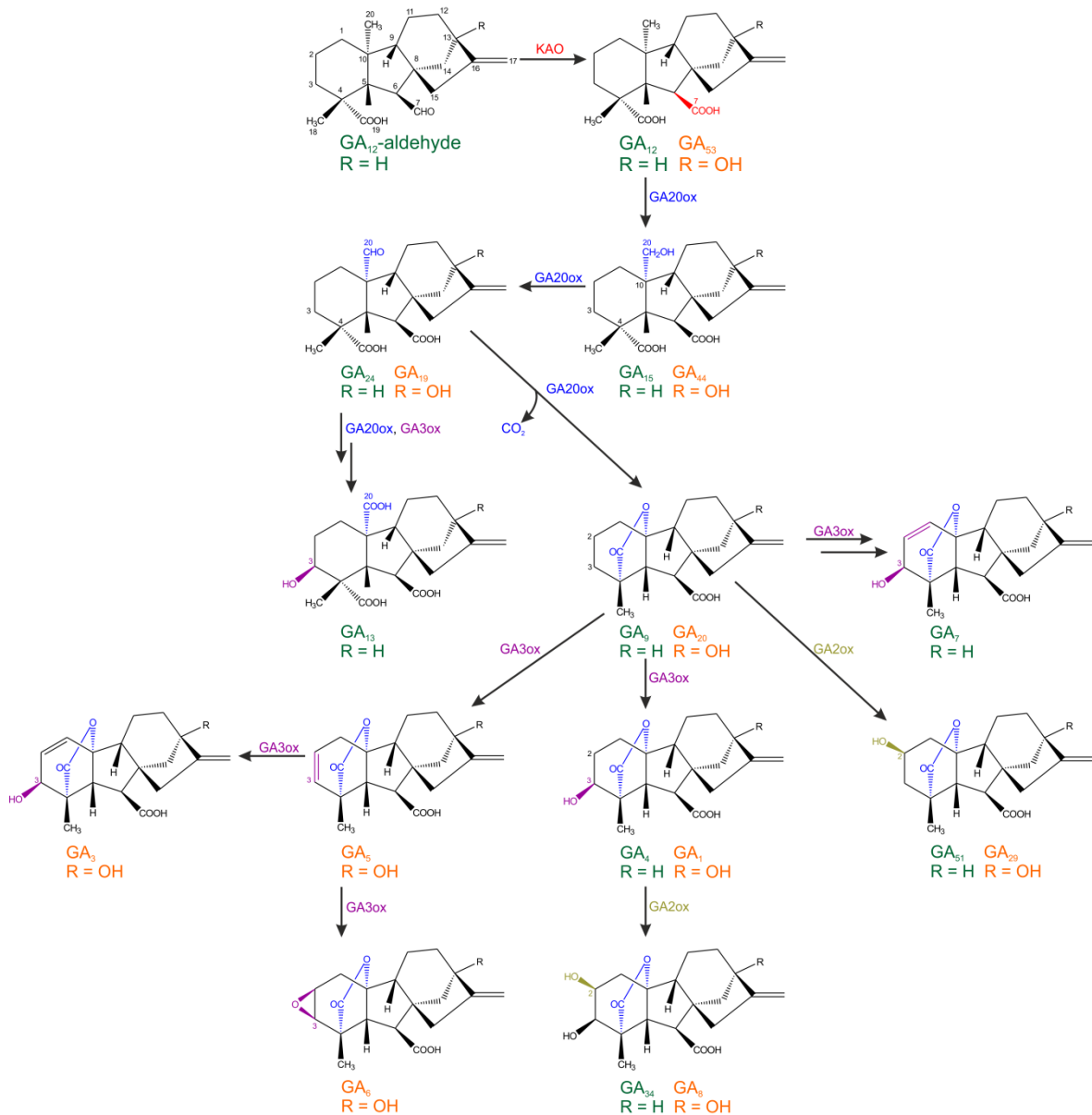
**Graf 7.** Hladiny giberelinů v semenáčcích *Lepidium sativum* kultivovaných za tmy při teplotě 19 °C (navážka 5 mg – A, B a 10 mg FW – C, D).

Jak vyplývá z grafu 7, navážka 5 mg se ukázala být optimální pro vyšší odezvu GAs v použité UHPLC-MS/MS metodě ve srovnání s odezvami GAs nalezenými při použití navážky 10 mg FW. Rozdíly v odezvách GAs pro navážku 5 a 10 mg FW jsou až 16tinásobné konkrétně u zástupců 13-nehydroxylovaných GAs (Graf 7A a 7C), zatímco u jejich analog s hydroxy skupinou v poloze 13 jsou rozdíly v průměru zhruba trojnásobné (Graf 7 B, D). Navážka 10 mg tedy umožňuje detekci sledovaných látek, ale hladiny GAs se zde díky matričnímu efektu mnohdy blíží limitu detekce metody (LOD), což se projevuje zejména vysokými hodnotami směrodatných odchylek stanovení.

Co se týká vlivu jednotlivých inhibitorů na biosyntézu giberelinů (Obr. 15) bylo zjištěno, že mnohem více je jimi ovlivněna dráha 13-nehydroxylovaných GAs, tj.  $GA_{15} \rightarrow GA_{24} \rightarrow GA_9$  ( $GA_{13}$ )  $\rightarrow GA_4 \rightarrow GA_{34}(GA_{51})$  – Graf 7 A,C, než dráha 13-hydroxy GAs, tj.  $GA_{53} \rightarrow GA_{44} \rightarrow GA_{19} \rightarrow GA_{20} \rightarrow GA_1$  ( $GA_3, GA_5, GA_6$ )  $\rightarrow GA_8$  - Graf 7 B, D. Všechny použité inhibitory jsou látkami, které blokují  $3\beta$ -hydroxylaci ( $GA3ox$ ), tj. klíčovou reakci vedoucí k tvorbě bioaktivních GAs (Rademacher, 2000). To vede k nahromadění těch GAs, které jsou substráty  $GA3ox$ . Jedná se zejména o akumulaci  $GA_{24}$  (Graf 7C). Nejpotentnějším se v tomto ohledu zdá být prohexadion, který způsobuje nahromadění tohoto GA ve dvojnásobku oproti kontrole. Ostatní tři inhibitory nepůsobí v tomto smyslu signifikantně, tj. hladiny  $GA_{24}$  jsou ve vzorcích řeřichy pěstované za jejich přítomnosti srovnatelné s hladinami  $GA_{24}$  ve vzorcích kontrolních. Zvláštní situace nastává v případě 13-hydroxy GAs, kdy jsou pozorovány relativně vysoké hladiny  $GA_5$  a  $GA_3$  (Graf 7B) bez ohledu na přítomnost jakéhokoli inhibitoru  $GA3ox$ , což vede k závěru, že u této biosyntetické dráhy z nějakého důvodu nedochází k úplné inhibici  $GA3ox$ . Ukazuje se zde zároveň, že inhibitor 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro- $GA_5$  nemá na inhibici  $GA3ox$  v dráze 13-hydroxy GAs v řeřiše vůbec žádný vliv, neboť hladiny produktů  $3\beta$ -hydroxylace dosahují hodnot srovnatelných s kontrolou. Tím se potvrzuje, že tento typ inhibitoru je účinný pouze u některých rostlinných druhů (lipnicovité) jak uvádí Rademacher (2000).

KAO - cytochrom P450 monoxygenáza (P450)

GA20ox, GA3ox, GA2ox - 2-oxoglutarát-dependentní dioxygenázy (2ODDs)



GA20ox katalyzuje sekvenční oxidaci C-20 včetně jeho ztráty C-20 ve formě CO<sub>2</sub> a tvorby γ-lactone. GA20ox je tudíž odpovědná za produkci C<sub>19</sub>-GAs za použití C<sub>20</sub>-GAs jako substrátů.

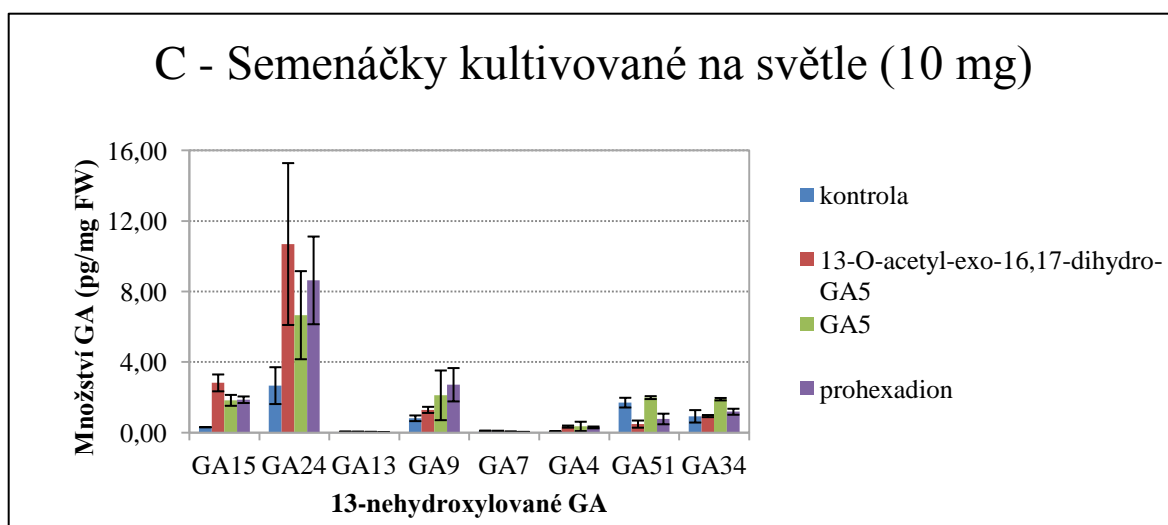
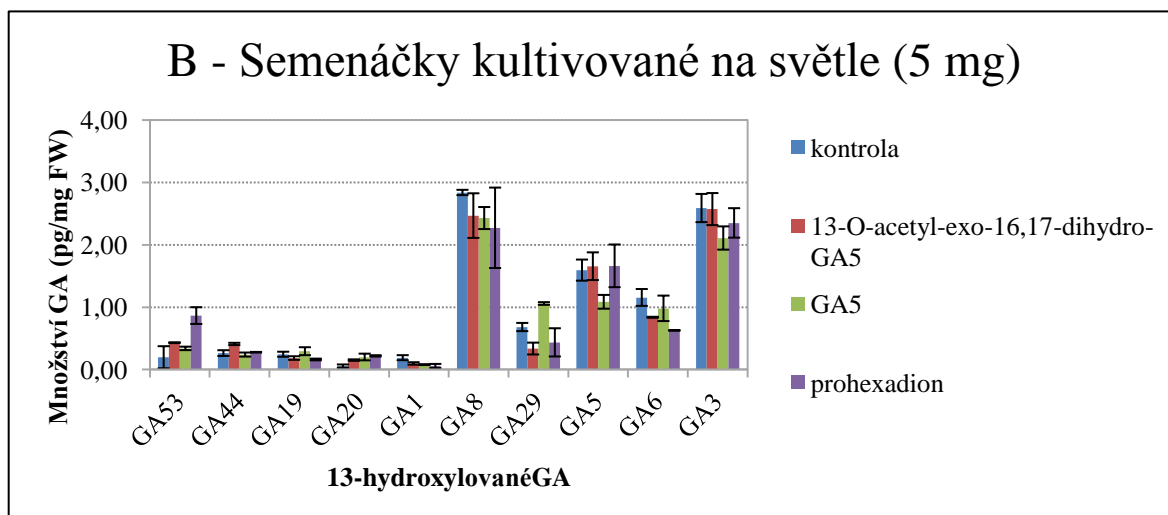
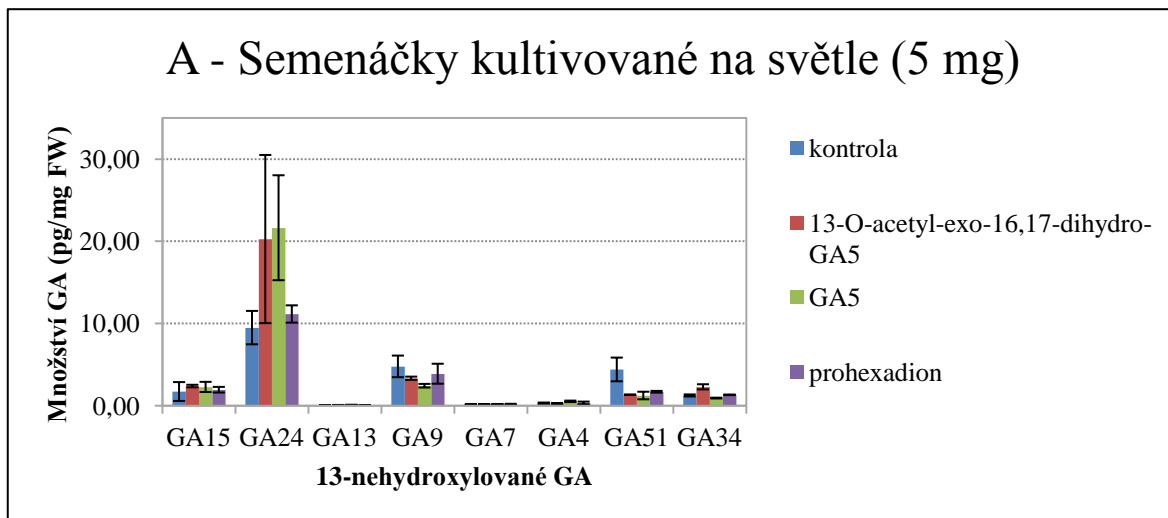
GA3ox přeměňuje neaktivní prekurzory (GA<sub>9/20</sub>) na bioaktivní GA<sub>4,11</sub>, GA<sub>3</sub> a GA<sub>6</sub> z GA<sub>20</sub> přes GA<sub>5</sub>.

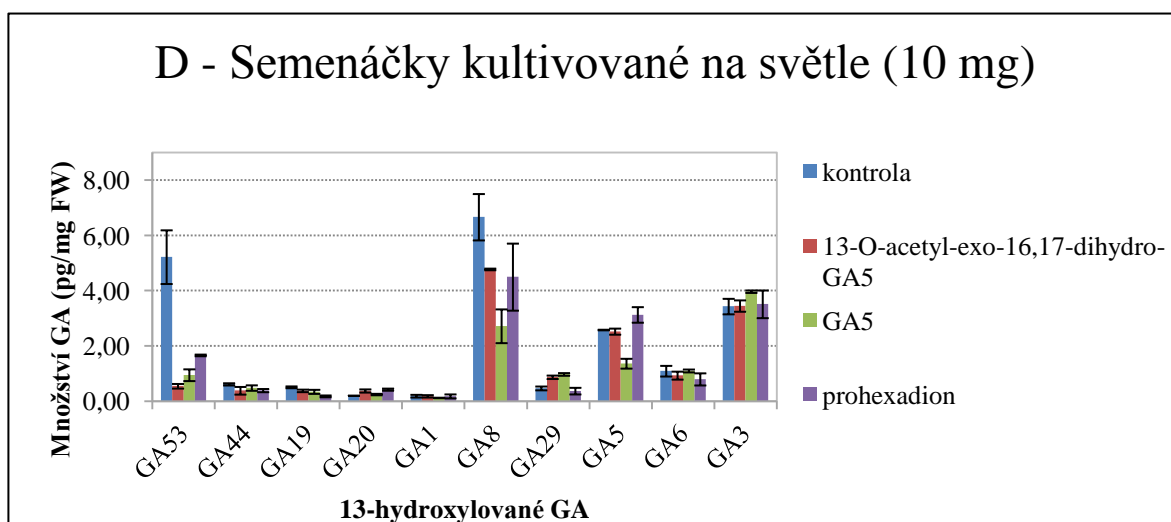
GA2ox zodpovědný za inaktivaci bioaktivních GAs tvorbou jejich 2-hydroxy metaolitů

**Obr 15.** Schéma biosyntézy giberelinů včetně biosyntetických enzymů (převzato a upraveno z Urbanová a kol., 2013) .

V dalším experimentu byla semena *L. sativum* kultivovaná za podmínek krátkého dne (8h světlo/16 h tma) při teplotě 22 °C opět na čtyřech různých médiích, kdy tři z nich opět obsahovaly příslušný inhibitor (13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>, GA<sub>5</sub> a proxexadion), zatímco jedno médium inhibitor neobsahovalo (kontrola). Cílem experimentu bylo zjistit,

zda světlené podmínky ovlivňují hladiny obou sledovaných skupin GAs a zda případně dochází ke změně poznatků získaných v experimentu provedeném za nepřístupu světla.





**Graf 8.** Hladiny giberelinů v semenáčcích *L. sativum* kultivovaných za krátkého dne (8h světlo/16h tma) při teplotě 22 °C – navážka 5 – A, B; navážka 10 mg – C, D.

Co se týká porovnání navážky 5 a 10 mg, i zde se potvrdilo, že navážka 5 mg umožňuje vyšší odezvy GAs než je tomu u navážky 10 mg FW (Graf 8 A vs. C, B vs. D). I za krátkého dne bylo pozorováno nahromadění GA<sub>24</sub> u semenáčků kultivovaných na inhibitoru, i když jeho hladiny byly ve srovnání s hladinami nalezenými v semenáčcích pěstovaných za tmy cca šestkrát nižší (Graf 8A). Vliv prohexadionu zde ovšem nebyl tentokrát žádný, tj. hladiny GA<sub>24</sub> dosahovaly hodnot srovnatelných s kontrolou. V dráze 13-hydroxy GAs byly opět nalezeny relativně vysoké koncentrace GA<sub>5</sub> a GA<sub>3</sub>, popř. GA<sub>6</sub> podobně jako v temnostním experimentu, ale novinkou bylo nalezení vysokých hladin GA<sub>8</sub> (podobné jako u GA<sub>3</sub>), který je degradačním produktem GA<sub>1</sub>. Protože ani jeden z jejich prekurzorů se v analyzovaných pletivech nevyskytoval v takové míře, nebylo nalezeno logické odůvodnění tohoto stavu. V tomto místě by tedy příslušelo experiment zopakovat.

### **5.5 Stanovení průměrné délky kořene a nadzemní části semenáčků řerichy seté *L. sativum***

Na obrázcích 16, 17 a 18 jsou zobrazeny 4denní semenáčky *L. sativum*, u nichž byla změřena průměrná délka kořene a následně i průměrná délka její nadzemní části pomocí programu ImageJ. Naměřené hodnoty jsou vneseny do grafů 9 a 10.



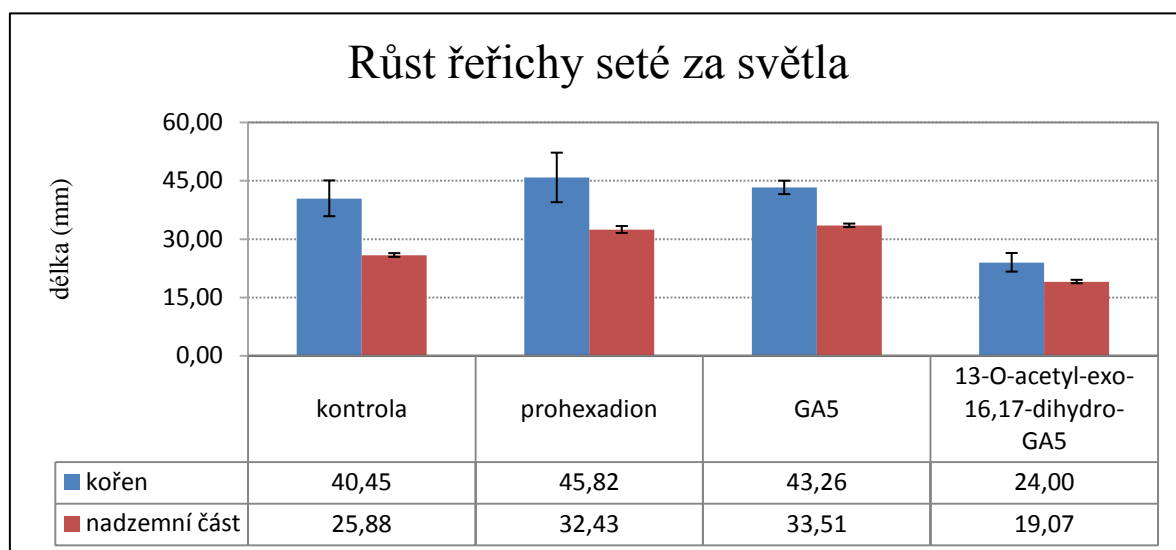
**Obr. 16.** 4denní semenáčky řepičky seté *L. sativum* rostoucí bez přítomnosti inhibitoru (K) a v přítomnosti 25 ng 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub> – inhibitoru biosyntézy giberelinů. Kultivováno za sterilních podmínek na 70 ml MS média s 3 % sacharózy, světelný režim 8h světlo/16 h tma, teplota 22 °C.



**Obr. 17.** 4denní semenáčky řepičky seté *L. sativum* rostoucí bez přítomnosti inhibitoru (K) a v přítomnosti 25 ng GA<sub>5</sub> – inhibitoru biosyntézy giberelinů. Kultivováno za sterilních podmínek na 70 ml MS média s 3 % sacharózy, světelný režim 8h světlo/16 h tma, teplota 22 °C.



**Obr. 18.** 4denní semenáčky řeřichy seté *L. sativum* rostoucí bez přítomnosti inhibitoru (K) a v přítomnosti 25 ng prohexadion – inhibitoru biosyntézy giberelinů. Kultivováno za sterilních podmínek na 70 ml MS média s 3 % sacharózy, světelný režim 8h světlo/16 h tma, teplota 22 °C.

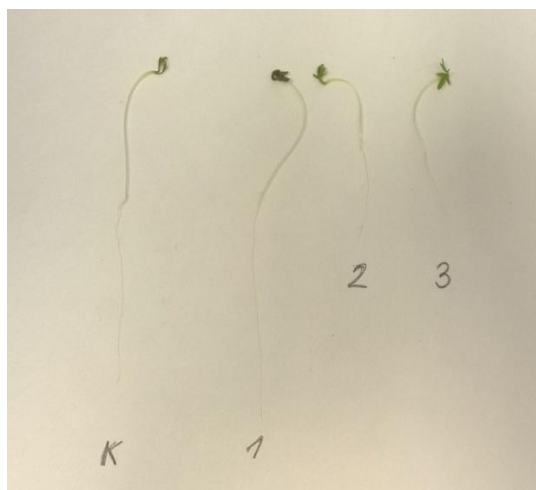


**Graf 9.** Závislost růstu řeřichy seté na druhu inhibitoru biosyntézy giberelinů. Kultivace za světelného režimu 8h světlo/16h tma.

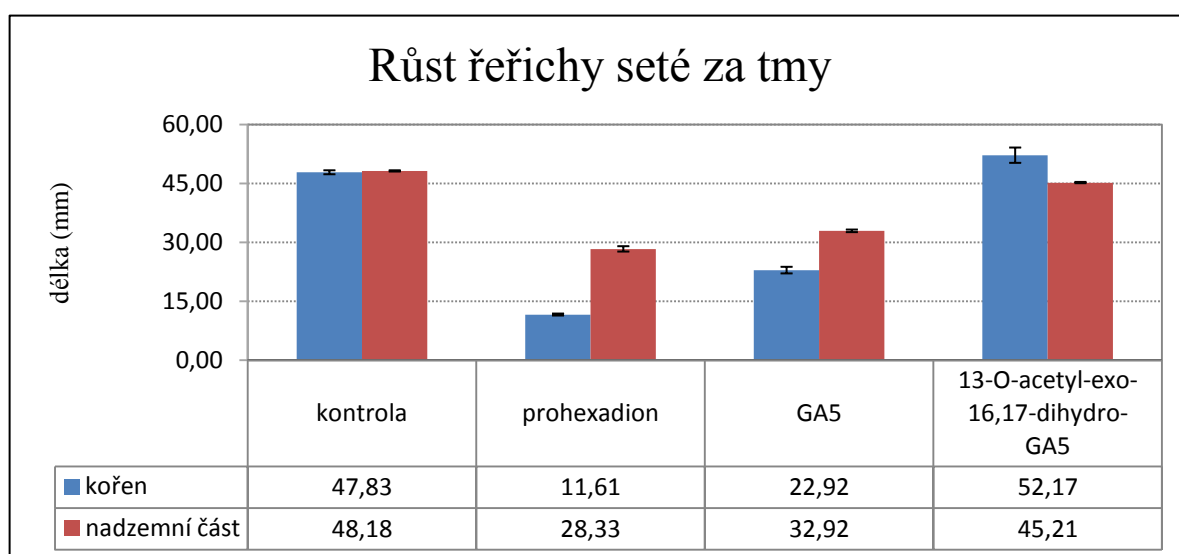
U všech semenáčků *L. sativum* kultivovaných za světla byla naměřena průměrná délka kořenové části vždy větší než průměrná délka části nadzemní (Graf 9). Délka nadzemní i kořenové části u semenáčků rostoucích na médiu obsahující prohexadion a GA<sub>5</sub> byla srovnatelná s týmiž hodnotami u kontrolních rostlin. Na médiu obsahující inhibitor 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydroGA<sub>5</sub> byla detekována nejmenší průměrná délka kořene semenáčků *L. sativum* (24 mm, Graf 9), což znamená, že tyto rostliny měly kořen



v průměru cca o 40 % kratší než rostliny kontrolní. Podobná situace byla pozorována i u velikosti nadzemní části rostliny (19.07 mm), jejíž délka dosahovala zhruba 76 % délky kontrolních rostlin (Graf 9). U semenáčků *L. sativum* rostoucích na médiu obsahující prohexadion a/nebo GA<sub>5</sub> činila průměrná délka kořene téměř dvojnásobek velikosti v porovnání s 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydroGA<sub>5</sub>. Prokázalo se tedy, že za zvolených podmínek kultivace a použité koncentrace inhibitoru dochází k inhibici růstu rostlin řechy pouze v případě použití 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>. Ostatní inhibitory za dobu 4 dnů růstu semenáčků *L. sativum* podle získaných dat zpomalení prodlužovacího růstu rostliny nezpůsobují. Tyto výsledky jsou v souladu s daty získanými kvantifikací giberelinů (kapitola 5.4). Zde se ukázalo, že klíčovými hráči biosyntézy GAs jsou 13-nehydroxylované GAs, přičemž v důsledku inhibice GA3ox dochází k akumulaci GA<sub>24</sub> (Graf 8 A,C) a biosyntéza bioaktivních GAs (GA<sub>1</sub>, GA<sub>7</sub>) je potlačena.



**Obr. 19.** 4denní semenáčky řechy seté *L. sativum* rostoucí bez přítomnosti inhibitoru biosyntézy giberelinů (K) a za jeho přítomnosti: (1) 25 ng 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17dihydro-GA<sub>5</sub>, (2) 25 ng GA<sub>5</sub> a (3) 25 ng prohexadionu. Kultivováno za sterilních podmínek na 70 ml MS média s 3 % sacharózy, 24 h tma, teplota 19 °C.



**Graf 10.** Závislost růstu řechy seté na druhu inhibitoru biosyntézy giberelinů. Kultivace za tmy.



4-denní kultivace semenáčků řeřichy seté *L. sativum* kultivovaných za sterilních podmínek za tmy při teplotě 19 °C vedla k produkci rostlin majících nadzemní i kořenovou část stejně dlouhou (Graf 10, kontrola). Na rozdíl od rostlin rostoucích za krátkého dne s inhibitorem GA3ox, kde byla naměřena většinou délka kořene větší než délka nadzemní části, u rostlin rostoucích za tmy pozorujeme opačný jev (vyjma semenáčků rostoucích s přidavkem 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>). Míra inhibice růstu zde roste v pořadí 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub> > GA<sub>5</sub> > prohexadion. Naposledy zmíněný inhibitor GA3ox je schopen za tmy inhibovat růst nadzemní části semenáčku *L. sativum* z cca 41 %, zatímco růst kořene byl potlačen až ze 75 % (Graf 10). Tyto výsledky jsou v souladu s kvantifikačními daty, kde hladina bioaktivní GA<sub>7</sub> dosahuje minimální hodnoty právě u semenáčků kultivovaných na médiu s prohexadionem a akumulace jeho prekurzoru GA<sub>24</sub> je zde nejvyšší (Graf 7 A).

Světlo představuje jeden z hlavních environmentálních faktorů, který ovlivňuje růst a vývoj rostliny. Současné studie naznačují, že se světelné procesy neodmyslitelným způsobem podílejí na regulaci produkce rostlinných hormonů (Symons a Reid, 2003), včetně změn v koncentracích GAs během klíčení semen (Oh a kol., 2006; Seo a kol., 2006). U některých rostlinných druhů mají účinky světla na klíčení semen inhibiční účinek, u jiných naopak dlouhodobé nebo krátkodobé vystavení semene světlu klíčení stimuluje (Meeuse, 2011). Řeřicha patří mezi dlouhodobé rostliny, tj. takové, u nichž je kvetení urychlováno fotoperiodou delší než hraniční délka dne (10-14 h). Řeřicha podobně jako huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) patří mezi rostliny z čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) s krátkou generační dobou (doba potřebná k vytvoření 1 generace).

Zásadní význam pro klíčení semen u *A. thaliana* mají samotné gibereliny (Debeaujon a kol., 2000). Jak uvedeno v kapitole 3.1, k dnešnímu dni je v přírodě známo více než 130 různých GAs, ale pouze několik z nich je bioaktivních. Účinky světla na hladiny bioaktivních GAs (GA<sub>1</sub>) v rostlinách byly poprvé zaznamenány v hlávkovém salátě *Lactuca sativa* (Ait-Ali a kol., 1999; Toyomasu a kol., 1992; Gil a García-Martínez, 2000; O'Neill a kol., 2000).

Klíčení semen za světla nejvíce ovlivňují 13-hydroxy GAs (GA<sub>5</sub> a GA<sub>3</sub>, popř. GA<sub>6</sub>), ale také GA<sub>8</sub> (podobně jako u GA<sub>3</sub>), který je degradačním produktem GA<sub>1</sub>. Při kultivaci za tmy klíčení semen pozitivně ovlivňují GA<sub>5</sub> a GA<sub>3</sub>. Tato data jsou v souladu s výsledky Liu a kol. (2005), kde došlo ke klíčení semen pouze po aplikacích GA<sub>4</sub> nebo GA<sub>3</sub>. Výsledky nám současně potvrdili, že za světla inhibitory giberelinů prokazatelně brzdí růst semenáčků, zatímco za tmy byl jejich vliv naopak stimulační (kromě 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>). Podle Levitta (1980) rostliny kultivované za vysoké

intenzity osvětlení dorůstají kratších rozměrů v důsledku interakce mezi fytochromovým systémem a biosyntézou GAs. Snížení výšky rostliny v důsledku zvýšené intenzity světla je tedy výsledkem snížené hladiny GAs, což potvrzují i námi získané výsledky (kapitola 5.4).

## 6 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce byla izolace a stanovení aktivity 3 $\beta$ -hydroxylázy při *in vitro* reakci vedoucí k tvorbě bioaktivních giberelinů za současného studia jejich inhibitorů přímo v rostlině. Ke kvantifikaci giberelinů bylo využito metody UHPLC(-)ESI-MS/MS. Purifikace vzorků byla provedena pomocí dvou SPE kroků s použitím polymerní reverzní fáze (kolonky HLB) a kombinace reverzní fáze s iontově-výměnným sorbentem (MAX kolonky).

V prvních dvou experimentech týkajících se práce s GA3ox *in vitro* se ukázalo, že množství enzymu GA3ox (testováno 10-70  $\mu$ l lyzátu) použitého v *in vitro* reakci nemá zásadní vliv na její průběh, purifikace vzniklé směsi rovněž neovlivňovala dosažený výsledek, a ani centrifugace neměla žádný zásadní vliv na obsah GAs ve směsi po *in vitro* reakci s GA3ox. Ačkoli tedy byla provedena řada optimalizačních experimentů, získání produktů enzymatické reakce GA3ox s příslušnými substráty nebylo úspěšné.

Ve třetím experimentu byl sledován vliv sterilizace na endogenní hladiny 13-hydroxylovaných a 13-nehydroxylovaných GAs v semenech řeřichy seté *L. sativum*. Bylo dosaženo závěru, že postup sterilizace neměl zásadní vliv na endogenní hladiny 13-hydroxylovaných GAs, ani na hladiny 13-nehydroxylovaných GAs v semenech *L. sativum*. Nejlepší signál umožňovala navážka 10 mg FW, jelikož byl v minimálním procentu zastoupen matriční efekt a hladiny všech sledovaných GAs byly dostatečně vzdáleny od LOD.

Ve čtvrtém experimentu byl studován vliv GA3ox inhibitorů na endogenní hladiny GAs ve 4denních semenáčcích *L. sativum*. Optimální navážkou pro vyšší odezvu GAs použitou UHPLC-MS/MS metodou se ukázalo být 5 mg, oproti 10 mg FW. Bylo zjištěno, že dráha 13-nehydroxylovaných GAs byla v tomto rostlinném pletivu ovlivněna mnohem více než dráha 13-hydroxylovaných GAs. Jednalo se především o akumulaci GA<sub>24</sub>, v případě 13-hydroxylovaných GAs pak GA<sub>5</sub> a GA<sub>3</sub>. Nejpotentnějším se v tomto ohledu zdal být prohexadion, který způsoboval nahromadění tohoto GA ve dvojnásobku oproti kontrole.

V pátém experimentu byla naměřena průměrná délka kořenové části 4denních semenáčků řeřichy pěstované za světla vždy větší než průměrná délka části nadzemní. Za daných podmínek kultivace, byla na médiu obsahující inhibitor 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydroGA<sub>5</sub>, detekována nejmenší průměrná délka kořene (24 mm) semenáčků *L. sativum*,

což znamenalo, že tyto rostliny měly kořen v průměru cca o 40 % kratší než rostliny kontrolní. Podobná situace byla pozorována i u velikosti nadzemní části rostliny, jejíž délka dosahovala zhruba 76 % délky kontrolních rostlin. Dále se prokázalo, že za zvolených podmínek kultivace a použité koncentrace inhibitoru docházelo k inhibici růstu rostlin *L. sativum* pouze v případě použití 13-*O*-acetyl-*exo*-16,17-dihydro-GA<sub>5</sub>. Ostatní inhibitory (GA<sub>5</sub>, prohexadion) za dobu 4 dnů růstu semenáčků *L. sativum* podle získaných dat zpomalení prodlužovacího růstu rostliny nezpůsobovaly. Ukázalo se, že klíčovými hráči biosyntézy GAs jsou 13-nehydroxylované GAs, přičemž v důsledku inhibice GA3ox docházelo k akumulaci GA<sub>24</sub> a biosyntéza bioaktivních GAs (GA<sub>1</sub>, GA<sub>7</sub>) byla potlačena.

Všechny dílčí cíle, až na první z nich, byly splněny. V dalších experimentech by bylo vhodné provést kultivace semen *L. sativum* po různý počet dnů a při různé délce dne i tmy a v neposlední řadě studovat vliv těchto inhibitorů v různých koncentracích na biosyntézu giberelinů u těchto experimentálních rostlin.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ait-Ali T, Frances S, Weller JL, Reid JB, Kendrick RE, Kamiya Y** (1999) Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol* **121**, 783–791.
- Albone KS, Gaskin P, MacMillan J, Phinney BO, Willis CL** (1990) Biosynthetic origin of gibberellin A<sub>3</sub> and gibberellin A<sub>7</sub> in cell-free preparations from seeds of *Marah macrocarpus* and *Malus domestica*. *Plant Physiol* **94**, 132–142.
- Amasino R** (2004) Take a cold flower. *Nature Genet* **36**, 111–112.
- Appleford NEJ, Evans DJ, Lenton JR, Gaskin P, Croker SJ, Devos K, Phillips AL, Hedden P** (2006) Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta* **223**, 568–582.
- Ayele BT, Magnus V, Mihaljevic S, Prebeg T, Čož-Rakovac R, Ozga JA, Reinecke DM, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, Salopek-Sondi B** (2010) Endogenous gibberellin profile during Christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit development. *J Plant Growth Regul* **29**, 194–209.
- Baerenfaller K, Massonnet C, Hennig L, Russenberger D, Sulpice, Walsh S, Stitt M, Granier C, Gruissem W** (2015) A long photoperiod relaxes energy management in *Arabidopsis* *Lea* six. *Curr Plant Biol* **2**, 34–45.
- Bhalla K, Singh SB, Agarwal R** (2010) Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. *Environ Monit Assess* **167**, 515–520.
- Binks R., MacMillan J, Pryce R** (1969) Combined gas chromatography-mass spectrometry of the methyl esters of gibberellins A<sub>1</sub> to A<sub>24</sub> and their trimethylsilyl ethers. *Phytochemistry* **8**, 271–284.
- Bömke C, Rojas MC, Gong F, Hedden P, Tudzynski B** (2008) Isolation and characterization of the gibberellin biosynthetic gene cluster in *Sphaceloma manihoticola*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 5325–5339.
- Brown RGS, Yan L, Beale MH, Hedden P** (1998) Inhibition of gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase by novel acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry* **47**, 679–687.
- Cetkovská K** (2006) FRI a FLC - nejvýznamnější geny indukce kvetení u modelového objektu *Arabidopsis thaliana*. [online]. [cit. 2015-02-14]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce: Pavel Lízal. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/106847/prif\\_b/](http://is.muni.cz/th/106847/prif_b/)
- Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, GarciaLepe R, Lewis MJ, Hedden P** (1999) Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* **17**, 547–556.

- Coolbaugh RC, Hamilton R** (1976) Inhibition of *ent*-kaurene oxidation and growth by  $\alpha$ -Cyclopropyl- $\alpha$ -(*p*-methoxyphenyl)-5-pyrimidine methyl alcohol. *Plant Physiol* **57**, 245–248.
- Coolbaugh RC, Hirano SS, West CA** (1978) Studies on the specificity and site of action of  $\alpha$ -Cyclopropyl- $\alpha$ -[*p*-methoxyphenyl]-5-pyrimidine methyl alcohol (Ancymidol), a plant growth regulator. *Plant Physiol* **62**, 571–576.
- Cosgrove DJ, Sovonick-Dunford SA** (1989) Mechanism of gibberellin-dependent stem elongation in peas. *Plant Physiol* **89**, 184–191.
- Curtis PJ, Cross BE** (1954) Gibberellic acid – A new metabolite from the filtrates of *Gibberella-fujikuroi*. *Chem Ind* **35**, 1066–1066.
- Davière J-M, Achard P** (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* **140**, 1147–1151.
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koormneef M** (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**, 403–413.
- Dong JG, Fernandez-Maculet JC a Yang SF** (1992) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9789–9783.
- Elliott RC, Ross JJ, Smith JL, Lester DR, Reid JB** (2001) Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea. *J Plant Growth Regul* **20**, 87–94.
- Ervin EH, Koski AJ** (2001) Trinexapac-ethyl increases Kentucky bluegrass leaf cell density and chlorophyll concentration. *Hortscience* **36**, 787–789.
- Espindula MC, Rocha VS, Grossi JAS, Souza MA, Souza LT, Favarato LF** (2009) Use of growth retardants in wheat. *Planta daninha* **27**, 379–387.
- Foster KR, Lee IJ, Pharis RP, Morgan PW** (1997) Effects of ring D-modified gibberellins on gibberellin levels and development in selected *Sorghum bicolor* maturity genotypes. *J Plant Growth Regul* **16**, 79–87.
- Garcia-Martinez JL, Lopez-Diaz I, Sanchez-Beltran MJ, PhiUips AL, Waard DA, Gaskin P, Hedden P** (1997) Isolation and transcript analysis of gibberellin 20-oxidase genes in pea and bean in relation to fruit development. *Plant Mol Biol* **33**, 1073–1084.
- Gil J, García-Martinez IL** (2000) Light regulativ of gibberellin A (1) content and expression of genes coding for GA 20-oxidase and GA 3 beta-hydroxylase in etiolated pea seedling. *Plant Physiol* **108**, 223–229.
- Graebe JE** (1987) Gibberellin biosynthesis and control. *Annu Rev Plant Physiol* **38**, 419–465.
- Griggs DL, Hedden P, Temple-Smith KE, Rademacher W** (1991) Inhibition of gibberellin 2 $\beta$ -hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry* **30**, 2513–2517.

- Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD** (2008) Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, ICS UNIDO, Italy.
- Harada H, Yokota T** (1970) Isolation of gibberellin A<sub>8</sub>-glucoside from shoot apices of *Athaea rosea*. *Planta* **92**, 100–104.
- Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y** (2008). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* **21**, 1328–1339.
- Hedden P, Kamiya Y** (1997) Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 431–460.
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**, 523–530.
- Hedden P, Thomas S** (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* **444**, 11–25.
- Hodges M** (2002) Enzyme redundancy and their portance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J Exp Bot* **53**, 905–916.
- Hori S** (1898) Some observations on ‘Bakanae’ disease of the rice plant. *Mem Agric Res Sta (Tokyo)* **12**, 110–119.
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sentoku N, Kitano H, Matsuoka M, Kobayashi M** (2001) Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8909–8914.
- Jin S, Kanagaraj A, Verma D, Lange T, Daniell H** (2011) Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of beta-glucosidase results in elevated phytohormone levels associated with significant increase in biomass and protection from aphids or whiteflies conferred by sucrose esters. *Plant Physiol* **155**, 222–235.
- Jones MG, Horgan R, Hall MA** (1980) Endogenous gibberellins in the potato (*Solanum tuberosum*) *Phytochemistry* **27**, 7–10.
- Junttila O, King RW, Poole A, Kretschmer G, Pharis RP, Evans LT** (1997) Regulation in *Lolium temulentum* of the metabolism of gibberellin A(20) and gibberellin A(1) by 16,17-dihydro GA(5) and by the growth retardant, LAB 198 999. *Aust J Plant Physiol* **24**, 359–369.
- Kaneko M, Itoh H, Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M** (2003) Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? *Plant J* **35**, 104–115.
- Kasahara H, Hanada A, Kuzuyama T, Takagi M, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2002) Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 45188–45194.

- Kim HY, Lee IJ, Hamayun M, Kim JT, Won JG, Hwang IC, Kim KU** (2007) Effect of prohexadione calcium on growth components and endogenous gibberellins contents of rice (*Oryza sativa* L.) *J Agron Crop Sci* **193**, 445–451.
- King RW, Moritz T, Evans LT, Junttila O, Herlt AJ** (2001) Long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. *Plant Physiol* **127**, 624–632.
- Kojima M, Kamada-Nobusada T, Komatsu H, Takei K, Kuroha T, Mizutani M, Ashkari M, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M, Suzuki K, Sakakibara H** (2009) Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol* **50**, 1207–1214.
- Koornneef M, van der Veen JH** (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theor Appl Genet* **58**, 257–263.
- Kurosawa E** (1926) Experimental studies on the nature of the substance secreted by the “bakanae” fungus. *Nat. Hist. Soc. Formosa* **16**, 213–227.
- Lancien M, Gadal P, Hodges M** (2000) Enzyme redundant cyand their portance of 2-oxoglutarate in higher plant amonium assimilation. *Plant Physiol* **123**, 817–824.
- Lange O, Damoc E, Wieghaus A, Makarov A** (2014) Enhanced Fourier transform for Orbitrap mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* **369**, 16–22.
- Lange T** (1994) Purification and partial amino-acid semence of gibberellin 20-oxidase from *Cucurbita maxima* L. endosperm. *Planta* **195**, 108–115.
- Lange T, Robatzek S a Frisse A** (1997) Cloning and expression of gibberellin 2 $\beta$ , 3 $\beta$ -hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm. *Plant Cell* **9**, 1459–1467.
- Lange T** (1998) Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta* **204**, 409–419.
- Lee DJ, Zeevaart JAD** (2002) Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. *Plant Physiol* **130**, 2085–2094.
- Lee IJ, Foster KR, Morgan PW** (1998) Effect of gibberellin biosynthesis inhibitors on native gibberellin content and floral initiation in *Sorghum bicolor*. *J Plant Growth Regul* **17**, 185–195.
- Lenton JR, Hedden P, Gale MD** (1987) Gibberellin insensitivity and depletion in wheat – consequences for development. In: *Hormone Action in Plant Development*, Hoat GV, Lenton JR, Jackson MB, Atkin RK (editors), London, pp 145–160.
- Leubner-Metzger G** (2001) Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* **213**, 758–763.
- Levitt J** (1980) Response sof plants to environmental stresses: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses, Vol. 1. Academic press. New York, USA.



- Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J** (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol* **1**, 643–652.
- Liu PP, Koizuka N, Homrichhausen TM, Hewitt JR, Martin RC, Nonogaki H** (2005) Large-scale screening of Arabidopsis enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *Plant J* **41**, 936–944.
- Luster DG, Miller PA** (1993) Triazole plant growth regulator binding to native and detergent-solubilized plant microsomal cytochrome P450. *Pest Biochem Physiol* **46**, 27–39.
- MacMillan J** (1997) Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Nat Prod Rep.* **14**, 221–243.
- MacMillan J, Pryce RJ** (1968) Further investigations of gibberellins in *Phaseolus multiflorus* by combined gas chromatography-mass spectrometry - the occurrence of gibberellin A20 (pharbitis gibberellin) and the structure of compound b. *Tetrahedron Lett* **9**, 1537–1664.
- Magome H, Nomura T, Hanada A, Takeda-Kamiya N, Ohnishi T, Shinma Y, Katsumata T, Kawaide H, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2013) *CYP714B1* and *CYP714B2* encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 1947–1952.
- Macháčková I** (1998) Růst a vývoj: růstové regulátory. In: Fyziologie rostlin. Praha: Academia (1. vydání) ISBN 80-200-0586-2.
- Mander LN, Adamson G, Bhaskar VK, Twitchin B, Camp D, King RW, Evans LT** (1998) Effects of 17-alkyl-16,17-dihydrogibberellin A(5) derivatives on growth and flowering in *Lolium temulentum*. *Phytochemistry* **49**, 1509–1515.
- Mauriat M, Moritz T** (2009) Analyses of *GA20ox*- and *GIDI*-overexpressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *Plant J* **58**, 989–1003.
- McCann SE, Huang B** (2008) Drought responses of Kentucky bluegrass and creeping bentgrass as affected by abscisic acid and trinexapac-ethyl. *J Am Soc Hortic Sci* **133**, 20-26.
- McNeil LA, Bethge L, Hewitson KS, Schofield CL** (2005) A fluorescence-based assay for 2-oxoglutarate-dependent oxygenases. *Anal Biochem* **336**, 125–131.
- Meeuse BJD** (2011) Encyclopedia Britannica Online, seed and fruit.
- Miki T, Kamiya Y, Fukasawa M, Ichikawa T, Sakurai A** (1990) Sites of inhibition by a plant-growth regulator, 4-chloro-2-(alpha-hydroxybenzyl)-isonicotinanilide (inabenfide), and its related compounds in the biosynthesis of gibberellins. *Plant Cell Physiol* **31**, 201–206.
- Mitchem WE, York AC, Batts RB** (1996) Peanut response to prohexadione calcium, a new plant growth regulator. *Peanut Sci* **23**, 1–9.

- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I** (2003) The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* **35**, 613–623.
- Moritz T, Olsen JE** (1995) Comparison between high-resolution selected-ion monitoring, selected reaction monitoring, and four-sector tandem mass-spectrometry in quantitative-analysis of gibberellins in milligram amounts of plant-tissue. *Anal Chem* **67**, 1711–1716.
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*. *Nature* **456**, 459–463.
- Nováková L, Vlčková H** (2009) A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal Chim Acta* **656**, 8–35.
- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI a Choi G** (2006) Light activates the degradation of *PIL5* protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 124–139.
- Olsen JE, Junttila O** (1997) Growth-promoting activity of gibberellins on shoot elongation in *Salix pentandra* is reduced by 16,17-dihydro derivatisation. *Plant Physiol* **99**, 63–66.
- O'Neill DP, Ross JJ, Reid JB** (2000) Changes in gibberellin A(1) levels and response during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol* **124**, 805–812.
- Oracz K, Voegelé A, Tarkowská D, Jacquemoud D, Turečková V, Urbanová T et al** (2012) Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extensit growth and endosperm rupture. *Plant Cell Physiol* **53**, 81-95.
- Pavlová L.** (2005) Fyziologie rostlin. Praha: Karolinum, Univerzita Karlova v Praze, 2005, str. 253. ISBN 80-246-0985-1.
- Pavlová L, Fischer L** (2011) Růst a vývoj rostlin. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 325 s. ISBN 978-80-246-1913-2.
- Peng J, Richards DE, Moritz T, Caño-Delgado A, Harberd NP** (1999) Extragenic suppressors of the *Arabidopsis gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* **119**, 1199–1208.
- Phillip AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P** (1995) Isolation and expression of free gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **108**, 1049–1057.
- Podlešáková K, Tarkowská D, Pěňčík A, Oklešťková J, Turečková V, Floková K, Tarkowski P** (2012) Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem listy* **106**, 373–379.
- Procházka S, Macháčková a kol.** (2003) Fyziologie rostlin. Praha, Akademia Praha: 484. ISBN: 80-200-0586-2.

- Procházka S, Šebánek J** (1997) *Regulátory rostlinného růstu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1997, 395 s. ISBN 80-200-0597-8.
- Pryce RJ, MacMillan J, McCormic A** (1967) The identification of bamboo gibberellin in *Phaseolus multiflorus* by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Tetrahedron Lett* **8**, 5009–5011.
- Rademacher W** (1991) Inhibitors of gibberellin biosynthesis: applications in agriculture and horticulture. In: *Gibberellins*, Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J (editors), Springer-Verlag, Berlin, pp. 296–310. ISBN 0-387-97259-5.
- Rademacher W, Pharis RP, Mander LN** (1999) Agricultural use of new GA derivatives. *Crop Sci Soc Jap* **68**, 362–367. **Rademacher W** (2000) Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 501–531.
- Roach PL, Clifton IJ, Fulop V, Harlos K, Burton GJ, Hajdu J, Andersson I, Schofield CJ, Baldwin JE** (1995) Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature* **375**, 700–704.
- Roach PL, Clifton IJ, Hensgens CMH, Shibata N, Schofield CJ, Hajdu J, Baldwin JE** (1997) Structure of isopenicillin A synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation. *Nature* **387**, 827–830.
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K** (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* **134**, 1642–1653.
- Salaš P** (2003) Modernizace výukového procesu u předmětů ovocné, okrasné školkařství a ovocnářství. Sborník přednášek z odborného semináře. Lednice na Moravě, 2003. ISBN 80-7157-715-4.
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E** (2006) Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant J* **48**, 354–366.
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M** (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**, 520–523.
- Scheible WR, Krapp A, Stitt M** (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant Cell Environ* **23**, 1155–1167.
- Schneider G, Jensen E, Spray CR, Phinney BO** (1992) Hydrolysis and reconjugation of gibberellin A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays* L. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8045–8048.

- Schneider G, Schliemann W** (1994) Gibberellin conjugates – an overview. *Plant Growth Regulation* **15**, 247–260.
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JAD, Amasino RM** (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**, 151–163.
- Smith H, Hilton JR** (1980) The presence of phytochrome in purified barley etioplasts and its in vitro regulation of biologically-active gibberellin levels in etioplasts. *Planta* **148**, 312–318.
- Sponsel VM** (1995) Gibberellin biosynthesis and metabolism. In: Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. Davies PJ, London, Kluwer Academic, pp 66–97. ISBN 0792329848.
- Spray CR, Kobayashi M, Suzuki Y, Phinney BO, Gaskin P, MacMillan J** (1996) The *dwarf-1 (dt)* mutant of *Zea mays* blocks three steps in the gibberellin-biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 10515–10518.
- Stodola FH, Raper KB, Fennel DI, Conway HF, Sohns VE, Langford CT, Jackson RW** (1955) The microbiological production of gibberellins A and X. *Arch Biochem Biophys* **54**, 240–245.
- Symons GM, Reid JB** (2003) Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* **216**, 422–431.
- Šetlík I, Seidlová F, Šantrůček J** (2004) Fyziologie rostlin [on-line]. [cit. 2015-1-14]. Dostupné z [http://kfr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220\\_S02.pdf](http://kfr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_S02.pdf)
- Štulík K, Ševčík J, Pacáková V, Jelínek I, Coufal P, Bosáková Z** (2004) Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- Taiz L, Zeiger E** (2010) *Plant Physiology*, 545–578, Sinauer Associates, Inc., USA. ISBN 978-0878938667.
- Takagi M, Pearce DW, Janzen LM, Pharis RP** (1994) Effect of exo-16,17-dihydro-gibberellin A<sub>5</sub> on gibberellin A<sub>20</sub> metabolism in seedlings of dwarf rice (*Oryza sativa* L. cv. Tan-ginbozu). *Plant Growth Regul* **15**, 207–213.
- Takahashi N, Kitamura H, Kawarada A, Seta Y, Takai M, Tamura S, Sumiki Y** (1955) Biochemical studies on "bakanae" fungus. Part XXXIV. Isolation of gibberellins and their properties. *Bull Agr Chem Soc Japan* **19**, 267–281.
- Tarkowská D, Novák O, Floková K, Tarkowski P, Turečková V, Grúz J, Rolčík J, Strnad M** (2014) Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55–76.
- Tarkowski P, Ge L, Yong JWH, Tan SN** (2009) Analytical methods for cytokinins. *Trends Anal Chem* **28**, 323–335.
- Thomas SG, Rieu I, Steber CM** (2005) Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm* **72**, 289–338.

- Tolbert NE** (1960) (2-Chloroethyl)trimethylammonium chloride and related compounds as plant growth substances. 1. Chemical structure and bioassay. *J Biol Chem* **235**, 475–479.
- Toyomasu T, Kawaide H, Sekimoto H, von Numer C, Phillips AL, Hedden P, Kamiya Y** (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Plant Physiol* **99**, 111–118.
- Toyomasu T, Yamane H, Yamaguchi I, Murofishi N, Takahashi N, Inoue Y** (1992) Control by light of hypocotyl elongation and levels of endogenous gibberellins in seedlings of *Lactuca sativa* L. *Plant Cell Physiol* **33**, 695–701.
- Tudzynski B, Rojas MC, Gaskin P, Hedden P** (2002) The gibberellin 20-oxidase of *Gibberella fujikuroi* is a multifunctional monooxygenase. *J Biol Chem* **277**, 21246–21253.
- Ubeda-Tomas S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ** (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* **10**, 625–628.
- Urbanová T, Tarkowská D, Strnad M, Hedden P** (2011) Gibberellins-terpenoid plant hormones: biological importance and chemical analysis. *Collect Czech Chem Commun* **76**, 1669–1686.
- Urbanová T, Tarkowská D, Novák O, Hedden P, Strnad M** (2013) Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* **112**, 85–94.
- Van Meulebroek L, Bussche JV, Steppe K, Vanhaecke L** (2012) Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant. *J Chromatogr A* **1260**, 67–80.
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Je Ma Ch, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermel S, Weiss D, Pichersky E** (2007) Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**, 32–45.
- Ward JL, Jackson GS, Beale MH, Gaskin P, Hedden P, Mander LN, Phillips AL, Seto H, Talon M, Willis CL, Wilson TM, Zeevaart JAD** (1997) Stereochemistry of oxidation of gibberellin 20-alcohols, GA and GA<sub>44</sub>, to 20-aldehydes by gibberellin 20-oxidases. *Chem Commun*, 13–14.
- William DR, Ross JJ, Reid JB, Potts BM** (1999) Response of *Eucalyptus nitens* seedlings to gibberellin biosynthesis inhibitors. *Plant Growth Regul* **27**, 125–129.
- Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S** (1998) A Global View of LC/MS, pp. 56–57, Global View Publishing, Pittsburgh.
- Wu K, Gage DA, Zeevaart JAD** (1996) Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiol* **110**, 547–554.

- Xu YL, Wu K, Peeters AJM, Gage D, Zeevaart JAD** (1995) The GA<sub>5</sub> locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberelin 20-oxidase: Molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 6640–6644.
- Yabuta T, Kanabe S, Hayashi T** (1934) Chemistry of the „bakanae“ fungus-1: Fusaric acid: A new product of the „bakanae“ fungus. *J Agr Chem Soc Japan* **10**, 1059–1968.
- Yabuta T** (1935) Biochemistry of the ‘bakanae’ fungus of rice. *Agric Hort (Tokyo)* **10**, 17–22.
- Yabuta T, Sumiki Y** (1938) On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. *J Agr Chem Soc Japan* **14**, 1526.
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Ann Rev Plant Biol* **59**, 225–251.
- Yamaguchi S, Kamiya Y** (2000) Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* **41**, 251–257.
- Zeeh B, König KH, Jung J** (1974) Development of a new plant growth regulator with biological activity related to CCC. *Kemia (Helsinki)* **6**, 621–623.
- Zhang XZ, Ervin EH, Schmidt RE** (2003) Plant growth regulators can enhance the recovery of Kentucky bluegrass sod from heat injury. *Crop Sci* **43**, 952–956.
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z** (2006) Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* **18**, 442–456.

[www.agriskmanagementforum.org](http://www.agriskmanagementforum.org)

Staženo 15.10. 2015

<http://www.salviaparadise.cz/clanky-rady-navody-kliceni-semen-vysev-c-254255.html>

Staženo 18.10. 2015

<http://www.biotage.co.jp/isolutemyco>

staženo 26.11. 2015

<http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en-CZ&cid=10048919>

Staženo 25.11. 2015

[www.mpipmainz.mpg.de/3250439/HPLC](http://www.mpipmainz.mpg.de/3250439/HPLC)

Staženo 6.10. 2015

<http://imagej.nih.gov/ij/>

Staženo 25.2. 2016