

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Strigolaktony – nová skupina fytohormonů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Jakub Kořistka
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Tato diplomová práce byla podpořena grantovým projektem IGA PrF_2016_024.

Rád bych na tomto místě poděkoval mému školiteli doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. a Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, jejich cenné rady a připomínky. Dále bych rád poděkoval Ing. Miroslavu Hýblovi, Ph.D. z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v. v. i. (pracoviště Olomouc) za pomoc při pěstování biologického materiálu. Děkuji také Mgr. Vlastimilu Maškovi, Ph.D. z Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci za pomoc při měření a vyhodnocování infračervených a Ramanových spekter. Velké díky patří také všem mým kolegům z laboratoře za ochotu pomoci a za příjemnou atmosféru na pracovišti. V neposlední řadě děkuji rodině a přítelkyni za jejich lásku, trpělivost a podporu v každodenním životě.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Kořistka
Název práce	Strigolaktony – nová skupina fytohormonů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Strigolaktony jsou nejmladší skupinou fytohormonů. Podílí se na regulaci větvení, růstu kořenů a apikální dominanci. Kromě toho ovlivňují odpověď rostliny na stresové podmínky při vysoké salinitě nebo období sucha.

Tato práce je věnována studiu metabolismu strigolaktonů. Na místo nestabilních přirozeně se vyskytujících strigolaktonů byl použit jejich syntetický analog GR24. Pomocí UHPLC-MS/MS byl potvrzen HO-GR24 v číroku a nově byly identifikovány oxidační produkty HO-GR24 a O=GR24 u rajčete.

V neposlední řadě se také podařilo úspěšně otestovat použití dalších spektroskopických technik pro confirmaci produktu oxidace a otestovat germinační aktivitu oxidačních produktů analoga GR24 na semenech parazitické rostliny *Striga hermonthica*. Infračervená spektroskopie je vhodná identifikační metoda pro studované strigolaktony, její citlivost je však výrazně nižší než u UHPLC-MS/MS. Germinační aktivita produktů oxidace je ve srovnání s parentní molekulou nižší.

Klíčová slova	strigolaktony, výskyt, biosyntéza, biologická aktivita
Počet stran	91
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Kořistka
Title	Strigolactones – a new group of plant hormones
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

Strigolactones are the youngest group of plant hormones. They control branching, root growth and apical dominance. They also affect plant response to stress conditions during high salinity and drought.

This work is devoted to the study of metabolism of strigolactones. For this study we used synthetic analogue GR24 because of its higher stability.

Oxidation product HO-GR24 was confirmed in sorghum and we newly identified oxidation products HO-GR24 and O=GR24 in tomato by UHPLC-MS/MS.

Finally, we also managed to successfully test the use of other spectroscopic techniques for confirmation of the oxidation products. We also test germination activity of these products on the seeds of parasitic plant *Striga hermonthica*. Infrared spectroscopy is a suitable method for their identification, but its sensitivity is significantly lower than for UHPLC-MS/MS. Oxidation products have a lower germination activity than GR24.

Keywords	strigolactones, occurrence, biosynthesis, biological activity
Number of pages	91
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši s klíčovými slovy – strigolaktony; výskyt; biosyntéza; biologická aktivita.
2. Studium oxidačních reakcí.
3. Studium stability syntetického analoga GR24.

OBSAH

1 Úvod	1
2 Současný stav řešení problematiky	2
2.1 Úvod do problematiky strigolaktonů	2
2.1.1 Struktura strigolaktonů	2
2.1.2 Biosyntetická dráha strigolaktonů	4
2.1.3 Biosyntéza rostlinných karotenoidů	5
2.1.4 Biosyntéza strigolaktonů	7
2.1.5 Signální dráha strigolaktonů	8
2.1.6 Interakce s ostatními fytohormony a regulace biosyntézy	9
2.1.6.1 Auxiny	9
2.1.6.2 Kyselina abscisová	10
2.1.6.3 Salinita a sucho	11
2.1.6.4 Fosfát	11
2.1.7 Syntetická analoga strigolaktonů	12
2.2 Parazitické rostliny	15
2.2.1 Rod <i>Striga</i> a <i>Orobanche</i>	16
2.2.2 Životní cyklus	18
2.2.3 Ochrana před parazitickými rostlinami	21
2.3 Cytochrom P450	25
2.3.1 Dělení cytochromů P450	25
2.3.2 Průběh katalytické reakce	26
2.4 Metody	28
2.4.1 Infračervená spektroskopie	28
2.4.2 Ramanova spektroskopie	29
2.4.3 Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR)	30
2.4.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)	31
2.4.5 Kapalinová chromatografie	32
3 Experimentální část	34
3.1 Materiál a chemikálie	34
3.1.1 Chemikálie	34
3.1.2 Materiál	35
3.1.2.1 Biologický materiál	36
3.1.3 Přístrojové vybavení	36
3.2 Metody	38
3.2.1 Chromatografické metody (UHPLC-MS/MS)	38
3.2.1.1 Optimalizace detekce MS	39
3.2.1.2 Měření kolizních spekter	40
3.2.1.3 Sběr chromatografických frakcí	40
3.2.2 UV absorpční spektrum syntetického analoga GR24	41
3.2.3 Infračervená spektroskopie	41
3.2.4 Ramanova spektroskopie	41
3.2.5 Stabilita syntetického analoga GR24 ve vodných roztocích	42
3.2.5.1 Stabilita v pufrch o pH 7	42
3.2.5.2 Stabilita v pufrch o pH 6	43
3.2.5.3 Stabilita v přítomnosti fosfátu	43
3.2.5.4 Stabilita v kultivačním médiu Hoagland	43
3.2.6 Studium biokonverze syntetického analoga GR24	43
3.2.6.1 Hydroponický systém	44

3.2.6.1.1 Příprava zásobního roztoku Fe-EDTA	46
3.2.6.1.2 Příprava kultivačního roztoku ½ Hoagland	46
3.2.6.2 Pěstování v perlitu	47
3.2.7 Macerace	47
3.2.8 Metody purifikace	47
3.2.9 Monitoring rozkladu kyseliny skořicové	48
3.2.9.1 Kultivace biologického materiálu	48
3.2.9.2 Homogenizace a extrakce	49
3.2.9.3 Monitoring rozkladu pomocí UHPLC-MS/MS	50
3.2.10 Germinační testy <i>Striga hermonthica</i>	51
3.2.10.1 Sterilizace semen	51
3.2.10.2 Kondicionace semen	51
3.2.10.3 Příprava stimulačních roztoků	52
3.2.10.4 Ošetření semen stimulačním roztokem	52
3.2.10.5 Vyhodnocení germinačního testu	52
3.2.11 Bioinformatická část	52
4 Výsledky	53
4.1 Metoda UHPLC-MS/MS	53
4.1.1 Optimalizace metody detekce UHPLC-MS/MS	53
4.1.2 Interpretace specifických fragmentů	56
4.1.3 Parametry metody separace UHPLC-MS/MS	57
4.2 Spektroskopické techniky	58
4.2.1 Infračervená spektroskopie	58
4.2.2 Ramanova spektroskopie	61
4.3 Stanovení návratnosti purifikace pro extrakci na pevné fázi	62
4.4 Monitoring rozkladu kyseliny skořicové cytochromy P450	64
4.5 UV absorpční spektrum syntetického analoga GR24	65
4.6 Stabilita GR24 ve vodných roztocích	66
4.6.1 Kultivační médium Hoagland	66
4.6.2 Fosfátový pufr pH 6	67
4.6.3 Pufry pH 6	68
4.6.4 Pufry pH 7	69
4.7 Studium oxidace GR24	70
4.7.1 Pěstování za sníženého obsahu fosfátu	70
4.7.2 Pěstování za standardních podmínek	70
4.8 Germinační testy	74
4.9 Bioinformatická část	76
5 Diskuze	78
6 Závěr	82
7 Literatura	83
8 Seznam použitých zkratk a symbolů	90

1 Úvod

Rostlinné hormony neboli fytohormony, patří mezi přirozené metabolity rostlin, které regulují jejich růst a vývoj. Tyto látky jsou produkovány v různých částech rostliny, odkud jsou poté transportovány do místa účinku, kde působí ve velmi nízkých koncentracích. Vyvolání fyziologické odpovědi je způsobeno zachycením signálu speciálními receptory následované vyvoláním reakce, která může mít ve výsledku stimulační nebo inhibiční charakter. Jejich efekt je pleiotropní, což znamená, že je závislý na více faktorech. Mezi tyto faktory patří například typ látky, její koncentrace, vývojové stádium nebo fyziologický stav. Podle typu a funkce jsou fytohormony děleny do několika skupin (Taiz a Zenger, 2010). Jejich působením často dochází k vzájemné interakci, která může probíhat na několika úrovních – úroveň metabolismu, transportu, přenosu signálu nebo ovlivnění genové exprese (Pernisová *et al.*, 2011). Stejně nebo podobné vlastnosti fytohormonů mohou vyvolat také sloučeniny s podobnou strukturou, které nejsou v rostlinách syntetizovány. Tyto látky označujeme jako růstové regulátory.

Jelikož se všechny fytohormony nacházejí v rostlinách ve velmi nízkých koncentracích, je nutné pro jejich studium disponovat metodami, které by dovolily jejich kvalitativní i kvantitativní analýzu. V dnešní době je nejrozšířenější technikou ultraúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (UHPLC-MS).

2 Současný stav řešené problematiky

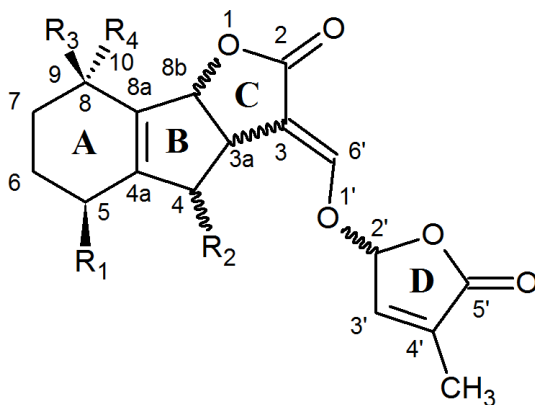
2.1 Úvod do problematiky strigolaktonů

Strigolaktony reprezentují novou skupinu fytohormonů. První zástupce byl objeven již v 60. letech 20. století v exudátech kořenů bavlníku (Cook *et al.*, 1966). Struktura této molekuly, která dostala název strigol, byla určena až o téměř 20 let později pomocí metody rentgenové krystalografie (Brooks *et al.*, 1985). Mezi fytohormony se ale řadí až od roku 2008, kdy byly zjištěny schopnosti strigolaktonů inhibovat větvení (Gomez-Roldan *et al.*, 2008). Strigolaktony, jakožto signální molekuly, působí jak endogenně v těle rostliny, tak exogenně v rhizosféře. Jako endogenní signální molekuly hrají svou roli hned v několika růstových procesech zahrnujících růst a formaci laterálních a adventivních kořenů, prodlužování kořenových vlásků, indukují sekundární růst a ovlivňují větvení nadzemní části rostliny (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Kapulnik *et al.*, 2010). Kromě tohoto také ovlivňují odpověď rostliny na stresové podmínky sucha a vysoké salinity. Jako exogenní signální molekuly hrají důležitou roli v arbuskulární mykorrhize a také při indukci klíčení semen parazitických rostlin čeledi *Orobanchaceae* (Cook *et al.*, 1966; Akiyama *et al.*, 2005).

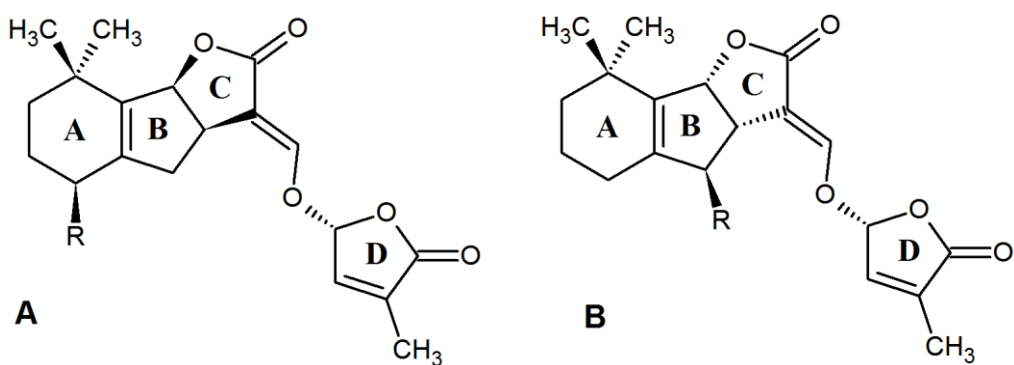
2.1.1 Struktura strigolaktonů

Přírozeně se vyskytující strigolaktony jsou po chemické stránce sloučeniny odvozené od karotenoidů (Matusova *et al.*, 2005). Hlavní část v jejich struktuře tvoří tricyklický lakton (ABC kruh), který může dále obsahovat různě navázané substituenty na AB kruhu. Tyto modifikace vedou ke vzniku různých strigolaktonů, například hydroxylace na uhlíku C4, C5 a C9 vede k molekule orobancholu, strigolu, případně k sorgomolu. Kromě již uvedené hydroxylace může také probíhat methylace, epoxidace nebo oxidace. ABC část je připojena přes enol-etherovou vazbu k α , β nenasyceném furanovému zbytku, který se označuje také jako D kruh a je charakteristický pro všechny přírozeně se vyskytující strigolaktony. Na CD části molekuly strigolaktonu nedochází k žádným modifikacím. Tato část je důležitá pro biologickou aktivitu strigolaktonů, a proto zůstává zachována beze změn (Zwanenburg a Pospíšil, 2013). Dodnes je známo 19 zástupců přírozeně se vyskytujících strigolaktonů, které rozdělujeme do dvou základních skupin, a to na základě rozdílné stereochemie na 8b uhlíku v BCD části molekuly. Dělíme je na strigolaktony

odvozené od strigolu (*S*-stereochemie) nebo orobancholu (*R*-stereochemie; Xie *et al.*, 2010).

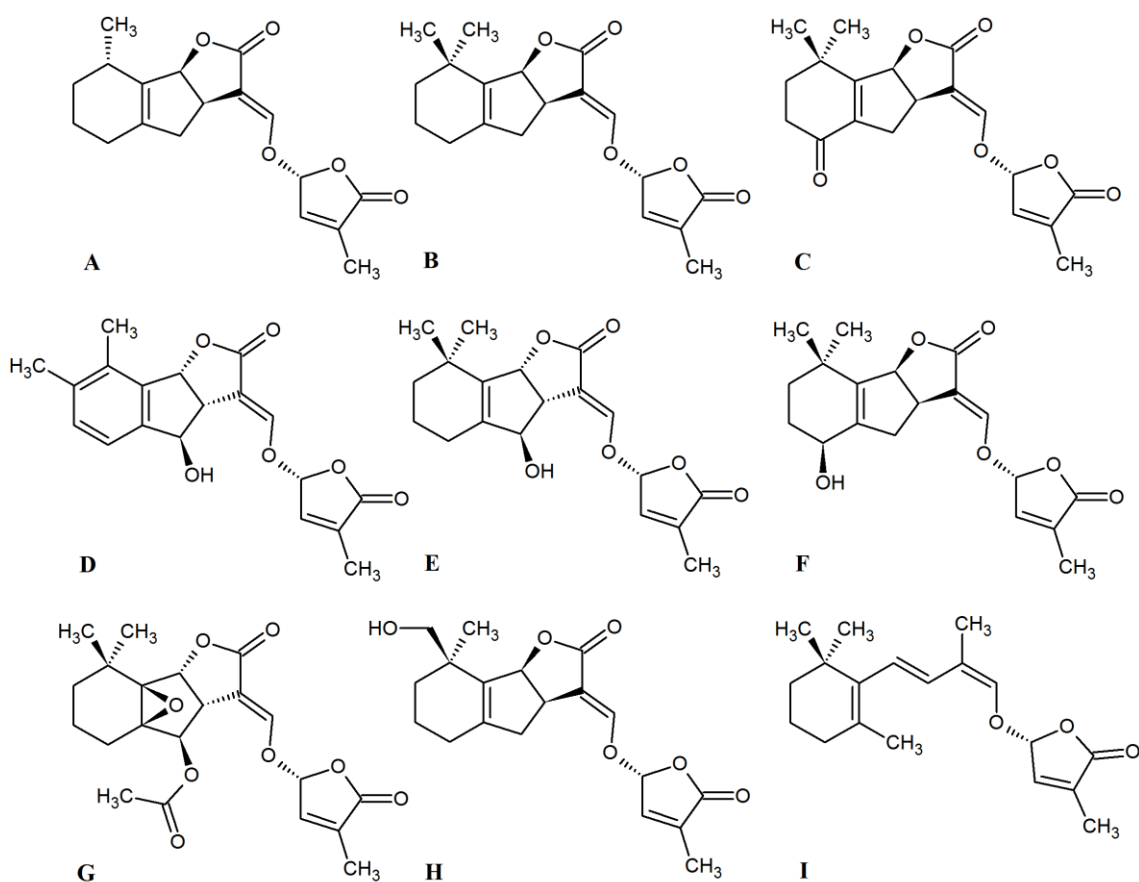


Obr. 1 Obecný strukturní vzorec strigolaktonu (převzato z Čavar *et al.*, 2014).



Obr. 2 Strukturní vzorce – rozdílná stereochemie na 8b uhlíku.

A – Strigol (*S*-stereochemie); B – Orobanchol (*R*-stereochemie)



Obr. 3 Strukturální vzorce některých zástupců přirozeně se vyskytujících strigolaktonů (převzato z Čavar *et al.*, 2014).

A – Sorgolakton; B – 5-Deoxystrigol; C – Strigon; D – Solanakol; E – Orobanchol; F – Strigol; G – Fabacyl acetát; H – Sorgomol; I – Karlakton

2.1.2 Biosyntetická dráha strigolaktonů

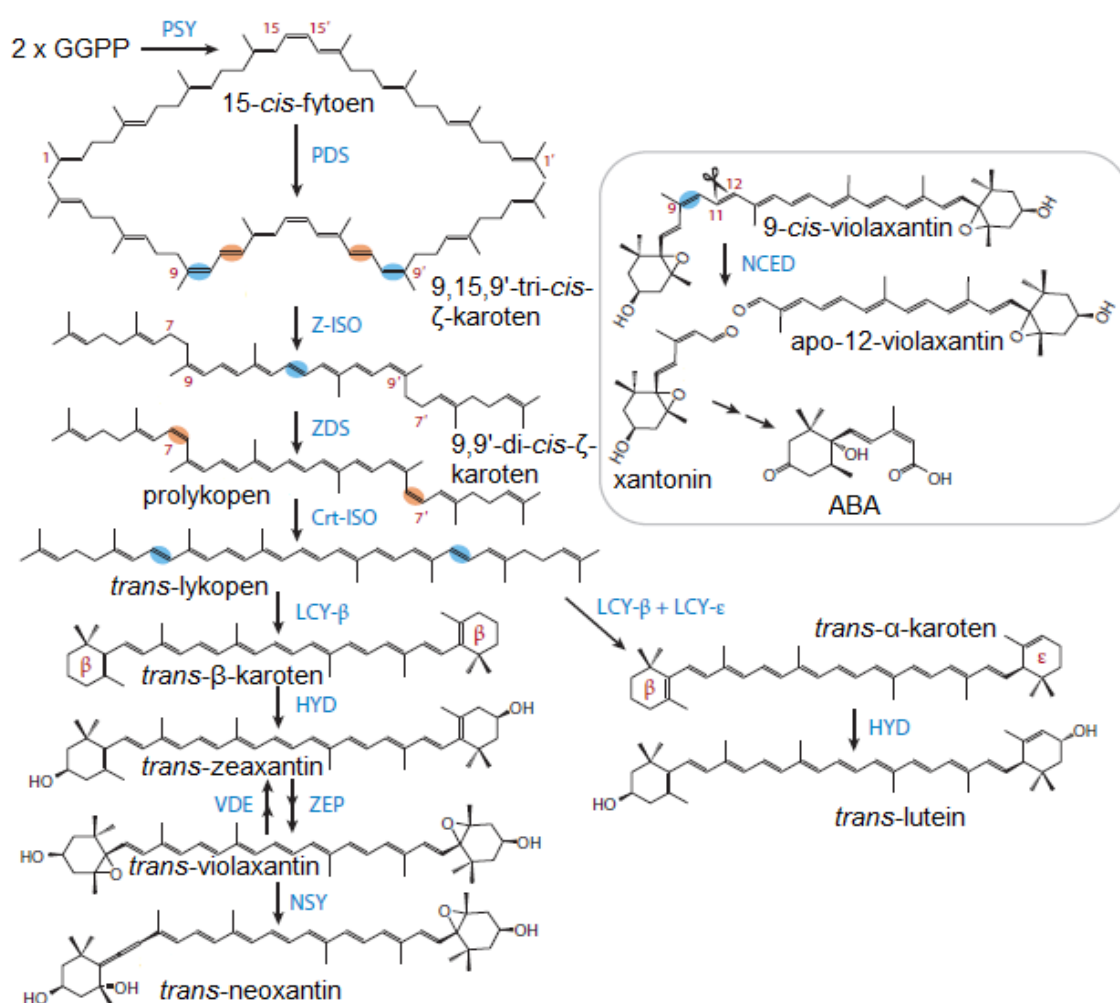
Ve snaze objevit biosyntetickou dráhu strigolaktonů byly aplikovány různé inhibitory různých biosyntetických drah na rostlinách kukuřice a čiroku (Matusova *et al.*, 2005). Poté následoval screening kořenových exudátů pro zjištění aktivity klíčení na semenech strigy, který odhalil, že exudáty ošetřených rostlin fluoridonem vykazují sníženou schopnost stimulace klíčení parazitických rostlin (Matusova *et al.*, 2005). Díky tomuto zjištění vzešla prvotní myšlenka, že biosyntetická dráha strigolaktonů začíná s karotenoidním substrátem, jako například β -karotenem, který je štěpen pomocí karotenoid štěpící dioxygenasy (CCD = carotenoid cleavage dioxygenase; EC 1.13.11.X). Další modifikace jako hydroxylace, dekarboxylace a oxidace mohou vést ke vzniku A, B a C kruhu. D kruh, u kterého stále nebyl zjištěn jeho původ, se enzymaticky spojí s ABC částí (ATP-vázající kazeta) v posledním kroku za vzniku 5-deoxystrigolu, který se

považuje za prekurzor pro všechny ostatní přírodní strigolaktony (Rani *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2010).

2.1.3 Biosyntéza rostlinných karotenoidů

Karotenoidy jsou isoprenoidní barviva obsahující ve své struktuře bohatý systém konjugovaných dvojných vazeb. Tyto sloučeniny jsou syntetizovány všemi fotosyntetizujícími a také mnohými heterotrofními organismy (Fraser a Bramley, 2004; Walter a Strack, 2011). Karotenoidy můžeme rozdělit do dvou základních skupin na karoteny neobsahující atom kyslíku ve své struktuře, a na xantofyly, který jej obsahují. Kromě toho je můžeme také dále dělit dle počtu a stereochemie (*cis/trans* konformace) konjugovaných dvojných vazeb. Všechny tyto vlastnosti ovlivňují jejich barvu. Karotenoidy jsou nepostradatelné pro fotosyntézu, jsou přítomny ve většině orgánů a tkání, kde se akumulují ve všech typech plastidů (Howitt a Pogson, 2006). Biosyntéza karotenoidů je lokalizována v plastidech a začíná fytoen synthasou (EC 2.5.1.32), kdy dochází ke kondenzaci dvou molekul geranylgeranyl difosfátu (C₂₀) za vzniku bezbarvé sloučeniny 15-*cis*-fytoenu (C₄₀). Poté následuje série dehydrogenačních a isomeračních reakcí katalizovaných enzymy fytoen desaturasou (EC 1.3.5.5), ζ -karoten isomerasou (EC 5.2.1.12), ζ -karoten desaturasou (EC 1.3.5.6) a karoten isomerasou (EC 5.2.1.12). Výsledkem těchto reakcí je barvivo *trans*-lykopen, které obsahuje 11 konjugovaných dvojných vazeb. V tomto kroku se biosyntéza karotenoidů u rostlin rozděluje do dvou samostatných drah, a to na alfa a beta větev. Ve větvi α dochází ke vzniku α -karotenu obsahujícího β - a ϵ -iononový kruh vložený enzymy lykopen- β - a lykopen- ϵ -cyklasou (EC 5.5.1.19; EC 5.5.1.18). Ve větvi β dochází ke vzniku β -karotenu obsahujícího dva β -iononové kruhy vložené enzymem lykopen- β -cyklasou (EC 5.5.1.19). Tyto kruhy se liší lokalizací svých dvojných vazeb. V obou drahách poté následuje hydroxylace α - a β -karotenu za vzniku zeaxantinu a luteinu. Tato reakce je katalyzována dvěma strukturně nepříbuznými typy enzymů s překrývající se substrátovou specifitou (Fiore *et al.*, 2006). Zeaxantin je dále přeměněn enzymem zeaxantin epoxidasou (EC 1.14.13.90) přes meziprodukt anteraxantin na violaxantin, který může být převeden zpět na zeaxantin enzymem violaxantin de-epoxidasou (EC 1.23.5.1). Violaxantin je prekurzorem neoxantinu, u kterého zatím není přesně objasněna celá jeho biosyntéza (Neuman *et al.*, 2014). *trans*-violaxantin a *trans*-neoxantin jsou poté přeměněny na příslušné 9-*cis* a 9-*cis*

isomery za přítomnosti dosud neznámých *cis/trans* isomeras. 9-*cis*-violaxantin a 9-*cis*-neoxantin slouží také jako prekurzory pro biosyntézu abscisové kyseliny (ABA), která patří mezi fytohormony (Schwartz *et al.*, 1997). Složení a koncentrace karotenoidů v rostlinné buňce jsou různé a odvíjí se od daného typu plastidu (Howitt a Pogson, 2006; Ruiz-Sola a Rodríguez-Concepción, 2012). Chloroplasty obsahují velké množství karotenoidů (jejich složení je zhruba 45 % luteinu, 25-30 % β -karotenu a 10-15 % violaxantinu a neoxantinu). Opakem jsou například leukoplasty u *Arabidopsis* lokalizované v kořenech, které jich obsahují pouze malé množství (30 % lutein, 25 % β -karoten a 45 % β -xantofyl; Britton, 1995; Maass *et al.*, 2009).

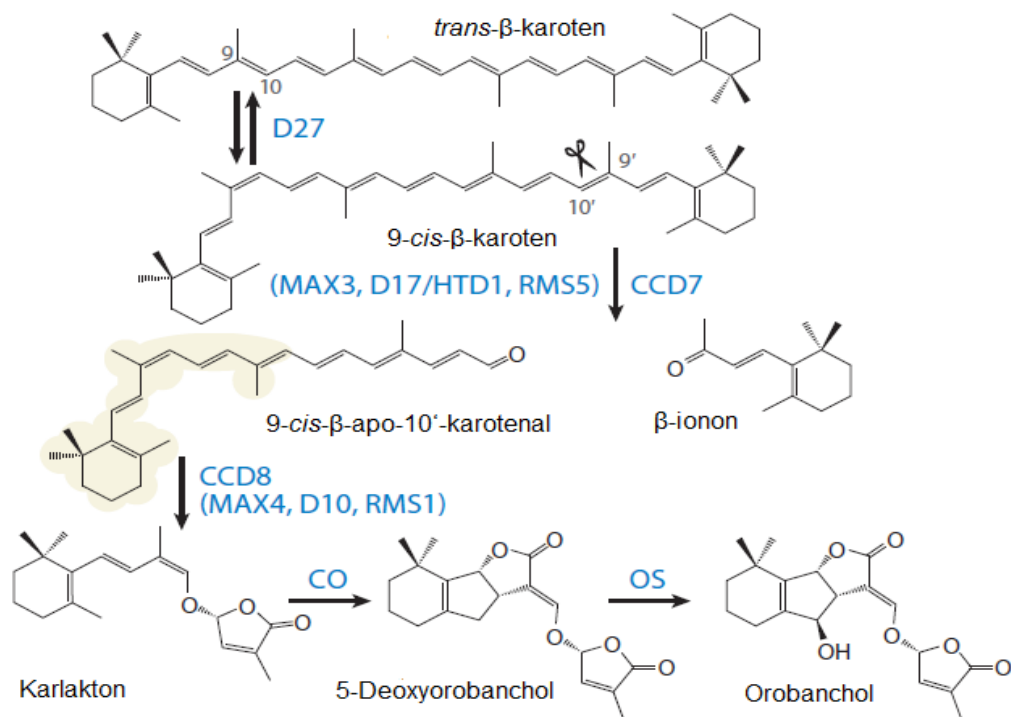


Obr. 4 Biosyntetická dráha karotenoidů v rostlinách (převzato z Al-Babili a Bouwmeester, 2015).

GGPP – geranylgeranyl difosfát; PSY – fytoen synthasa; PDS – fytoen desaturasa; Z-ISO – ζ -karoten isomerasa; ZDS – ζ -karoten desaturasa; Crt-ISO – karoten isomerasa; LCY- β – lykopen β -cyklasa; LCY- ϵ – lykopen- ϵ -cyklasa; HYD – hydroxylasa; ZEP – zeaxantin epoxidasa; VDE – violaxantin de-epoxidasa; NSY – neoxantin synthasa; ABA – abscisová kyselina; NCED – 9-*cis*-epoxy-karotenoid dioxygenasa

2.1.4 Biosyntéza strigolaktonů

Biosyntéza strigolaktonů, jakožto nové větve v biosyntéze rostlinných karotenoidů, vychází z β -karotenu. Prvním krokem biosyntézy je reverzibilní isomerace za účasti enzymu D27 (EC 5.2.1.14), kdy dochází k isomeraci na C9 uhlíku všech *trans*- β -karotenů za vzniku 9-*cis*- β -karotenu. Enzym D27 (DWARF27) byl poprvé charakterizován v rýži a následně v *Arabidopsis* (Lin *et al.*, 2009; Mark T. Waters *et al.*, 2012a). Jedná se o malý protein obsahující železo s lokalizací v plastidech, kde je exprimován v cévních buňkách kořenů rostlin (Lin *et al.*, 2009). Vzniklý meziprodukt 9-*cis*- β -karoten slouží jako substrát pro štěpící CCD enzymy. Prvním z nich je CCD7 (EC 1.13.11.68), který katalyzuje štěpení 9-*cis*- β -karotenu na 9-*cis*- β -apo-10'-karotenal. Dále se biosyntézy účastní také CCD8 (EC 1.13.11.70), který navazuje na CCD7 a pokračuje ve štěpení a zprostředkování molekulárního přesmyku. Je také zodpovědný za vnesení atomů kyslíku do vzniklé struktury za vzniku butenolidového kruhu (Alder *et al.*, 2012). Výsledkem reakcí je prekurzor strigolaktonů označovaný jako karlakton, který je poté přeměňován za účasti skupiny enzymů cytochromů P450. Enzym nebo skupina enzymů je zodpovědná za tvorbu BC kruhu při přeměně na bioaktivní molekulu strigolaktonu (Booker *et al.*, 2005). Je velmi obtížné určit, jakým způsobem se cytochromy P450 zapojují do oxidačních reakcí v této biosyntetické dráze. Příkladem může být gen MAX1 u *Arabidopsis thaliana*, který se účastní dráhy přeměny (Z)-(R)-karlaktonu na orobanchol. U rýže bylo zjištěno 5 homologů MAX1, u dvou z nich se již podařilo zjistit jejich enzymatickou funkci. Prvním z nich je Os900 (karlakton oxidasa; EC 1.13.11.51), který katalyzuje přeměnu (Z)-(R)-karlaktonu na *ent*-2'-*epi*-5-deoxystrigol. Druhým enzymem je Os1400 (orobanchol synthasa, *ent*-2'-*epi*-5-deoxystrigol-4-hydroxylasa), který katalyzuje následnou hydroxylaci na uhlíku C4 za tvorby orobancholu. Doposud nebyla identifikována řada enzymů, která se účastní oxidačních reakcí (Alder *et al.*, 2012). Strigolaktony následně podstupují řadu reakcí, při kterých dochází k jejich modifikaci. Tou nejdůležitější je pravděpodobně hydrolýza, která je nezbytná pro jejich signalizační funkci (Hamiaux *et al.*, 2012). Strigolaktony vykazují nestabilitu ve vodném prostředí z důvodu přítomnosti enol-etherové vazby nacházející se mezi C a D kruhem, kde snadno dochází k nukleofilnímu ataku s následným štěpením vazby (Mangnus a Zwanenburg, 1992).

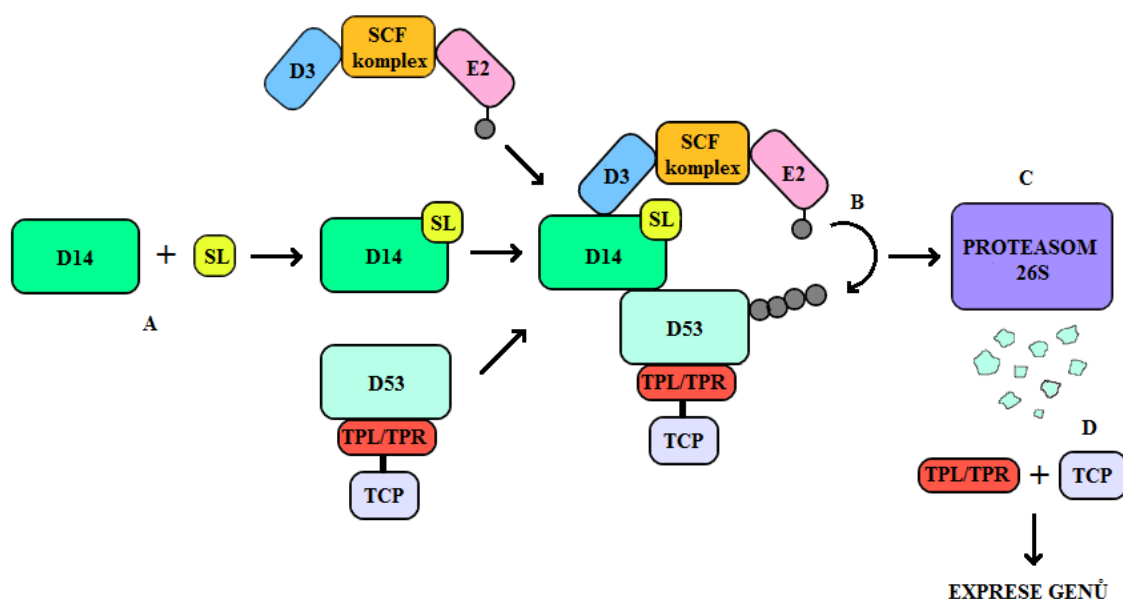


Obr. 5 Biosyntéza strigolaktonů (převzato z Al-Babili a Bouwmeester, 2015).

Prvním krokem je isomerace *trans*-β-karotenu enzymem D27 na 9-*cis*-β-karoten. Následuje štěpení enzymem CCD7 na 9-*cis*-β-apo-10'-karotenal a β-ionon. 9-*cis*-β-apo-10'-karotenal je dále přeměněn enzymem CCD8 na karlakton, který pak slouží jako substrát pro karlakton oxidasu (CO). Vzniklý 4-deoxyorobanchol je následně enzymem orobanchol synthasou (OS) převeden na orobanchol vnesením hydroxy skupiny na C4 uhlíku.

2.1.5 Signální dráha strigolaktonů

Signální dráha strigolaktonů začíná v cytoplasmě navázáním bioaktivní molekuly strigolaktonu na ko-represor D14, na kterém po připojení dochází ke změnám konformace (Mark T. Waters *et al.*, 2012b). Ko-represor D14 s navázanou molekulou strigolaktonu je poté transportován do jádra, kde je na něj připojen protein D53. Na protein D53 jsou za normálních podmínek navázány ko-represory označované jako TPL/TPR (topless/topless co-repressors), čímž se brání expresi transkripčního faktoru TCP důležitého pro spuštění exprese genů indukovaných strigolaktony (Kong *et al.*, 2014). Ko-represor D14 obsahující molekulu strigolaktonu s připojeným proteinem D53 tvoří společně s ubiquitin ligasou SCF^{D2} komplex. Navázaná ligasa označí protein D53 ubiquitinem, čímž poté dojde k jeho následnému odbourání v proteasomu 26S. Znemožnění navázání ko-represorů TPL/TPR na D53 dochází k uvolnění transkripčního faktoru TCP. TCP spouští expresi genů indukovaných strigolaktony a dojde k vyvolání odezvy (Zhou *et al.*, 2013).



Obr. 6 Signální dráha strigolaktonů (převzato z Zhou *et al.*, 2013).

A – Navázání biologicky aktivní molekuly strigolaktonu (SL) na ko-represor D14. B – Ubiquitinace proteinu D53 ubiquitin ligasou SCF. C – Odbourání označeného proteinu D53 ubiquitinem v proteasomu 26S. D – Uvolnění ko-represorů TPL/TPR a transkripčního faktoru TCP, což vede k indukci exprese genů.

2.1.6 Interakce s ostatními fytohormony a regulace biosyntézy

Stejně tak jako u ostatních rostlinných hormonů, tak také u strigolaktonů platí, že jejich biosyntéza a aktivita je regulována komplexní sítí, na kterou mají vliv i ostatní fytohormony. Dle dosavadních znalostí mezi tyto hormony patří auxiny a kyselina abscisová. Kromě těchto fytohormonů dochází k ovlivnění biosyntézy strigolaktonů také vlivem stresových podmínek, jako je například nedostatek fosforu nebo vysoká salinita prostředí (Al-Babili a Bouwmeester, 2015).

2.1.6.1 Auxiny

Auxiny jsou skupinou fytohormonů, která reguluje téměř všechny aspekty rostlinného růstu a vývoje. Většina auxinů u rostlin je syntetizována ve vzrostlém vrcholu a v mladých listech. Odtud jsou auxiny dále transportovány do kořenů a větví za účasti auxinových transportérů. Při transportu se vytváří auxinový gradient skrz celou rostlinu. Lokální koncentrace auxinů a jejich gradient určuje biologickou aktivitu v rostlině. Tento systém je poháněn pomocí polárního auxinového transportu (PAT), což je specializovaný

system, který řídí přenos auxinů z buňky do buňky. Směr PAT je řízen výtokovými přenosovými proteiny (PIN). Strigolaktony snižují PAT odebráním PIN1 z plasmatické membrány ve vaskulárních buňkách (Shinohara *et al.*, 2013). Tato inhibice vede ke snížení kapacity PAT, což brání exportu auxinů z axilárních pupenů (Crawford *et al.*, 2010). Strigolaktony ale mají opačný efekt na PIN2 proteiny, které se nacházejí v kořenech, kde dochází jejich vlivem ke zvýšení PAT (Koltai, 2014). Nicméně auxiny jsou hlavním regulátorem biosyntézy strigolaktonů, jelikož udržují základní transkripční úroveň enzymů CCD7 a CCD8. Biosyntéza strigolaktonů je regulována mechanismem negativní zpětné odpovědi, která kontroluje expresi genů biosyntézy. U strigolakton deficientních mutantů *Arabidopsis max3* a *max4* nebo rýže d10 bylo pozorováno zvýšení exprese u těchto genů (Arite *et al.*, 2007; Hayward *et al.*, 2009). Navíc bylo zjištěno, že aplikace syntetického analoga strigolaktonů GR24 inhibuje expresi genů MAX3 a MAX4 u *Arabidopsis* (Mashiguchi *et al.*, 2009). Kromě přímé lokální inhibice je pravděpodobně biosyntéza strigolaktonů také pod kontrolou vzdálené zpětnovazebné smyčky udržované PAT, kdy vysoké hladiny strigolaktonů vedou k inhibici jejich biosyntézy snížením vodivosti auxinů (Foo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Hayward *et al.*, 2009).

2.1.6.2 Kyselina abscisová

Dalším fytohormonem je kyselina abscisová. Tato sloučenina je důležitá jako regulátor odpovědi rostliny na abiotický stres a je přítomná v několika vývojových procesech. Biosyntéza strigolaktonů i abscisové kyseliny vychází ze stejného prekursoru 9-*cis* karotenoidu. Spekuluje se, zdali se oba fytohormony navzájem ovlivňují na biosyntetické úrovni a jestli indukce kyseliny abscisové vede k ovlivnění tvorby strigolaktonů a naopak. První otázkou je, zdali enzym D27, který je součástí biosyntetické dráhy strigolaktonů, produkuje 9-*cis*-violaxanthin nebo 9'-*cis*-neoxanthin jako prekursor pro kyselinu abscisovou. Druhá otázka se týká enzymu CCD7, u kterého se zatím neví, zdali štěpí 9-*cis*-violaxanthin nebo 9'-*cis*-neoxanthin, a tím negativně ovlivňuje biosyntézu kyseliny abscisové při kompetici o substrát. Do současnosti nebyla na tuto otázku nalezena odpověď, a je tedy velmi pravděpodobné, že enzymy potřebné pro biosyntézu strigolaktonů neovlivňují biosyntézu kyseliny abscisové (Bruno *et al.*, 2014). Naopak bylo ale dokázáno, že kyselina abscisová dokáže ovlivnit biosyntézu strigolaktonů. Kořenové exudáty z geneticky modifikovaných rostlin kukuřice *vp14* a

rajčete *notabilis*, které byly ABA deficientní, obsahovaly nižší hladinu strigolaktonů (Schwartz *et al.*, 1997; Burbidge *et al.*, 1999; Matusova *et al.*, 2005; López-Ráez *et al.*, 2010). Tento úbytek je pravděpodobně způsoben sníženou transkripcí genů kódujících CCD7 a CCD8 důležitých pro biosyntézu strigolaktonů (López-Ráez *et al.*, 2010). Dalším důkazem podporující tuto domněnku je ošetření rostliny *Arabidopsis* kyselinou abscisovou, kdy po ošetření došlo ke snížení úrovně transkripce CCD7 a CCD8, která se navrátila do normálu za 1 hodinu od aplikace (Ha *et al.*, 2014).

2.1.6.3 Salinita a sucho

Bylo zjištěno, že *max2* mutantní rostliny *Arabidopsis* jsou hypersensitivní na stress vyvolaný suchem a dochází u nich k většímu výparu vody než u nemutantních linií. K tomuto pravděpodobně dochází vlivem tenčí vrstvy kutikuly a neefektivním zavíráním stomat způsobeným sníženou citlivostí na kyselinu abscisovou (Bu *et al.*, 2014; Ha *et al.*, 2014). Analýza transkriptomu potvrdila sníženou expresi u velkého počtu genů v listech mutanta *max2* v porovnání s nemutantní linií (Ha *et al.*, 2014). Dále bylo pozorováno, že u mutanta *max2* dochází ke zvýšené expresi u fotosyntetických genů, které jsou u nemutantních linií při dehydrataci potlačeny. Tímto bylo dokázáno, že MAX2 hraje významnou roli v regulaci na odezvu při abiotickém stresu. *max3* a *max4* mutanti *Arabidopsis* vykazují zvýšenou sensitivitu na sucho a vysokou salinitu. Také se u nich objevuje snížená citlivost stomat na kyselinu abscisovou. Aplikace syntetického analoga strigolaktonu GR24 vedlo ke snížení citlivosti k suchu u mutantů i u nemutantních jedinců (Ha *et al.*, 2014).

2.1.6.4 Fosfát

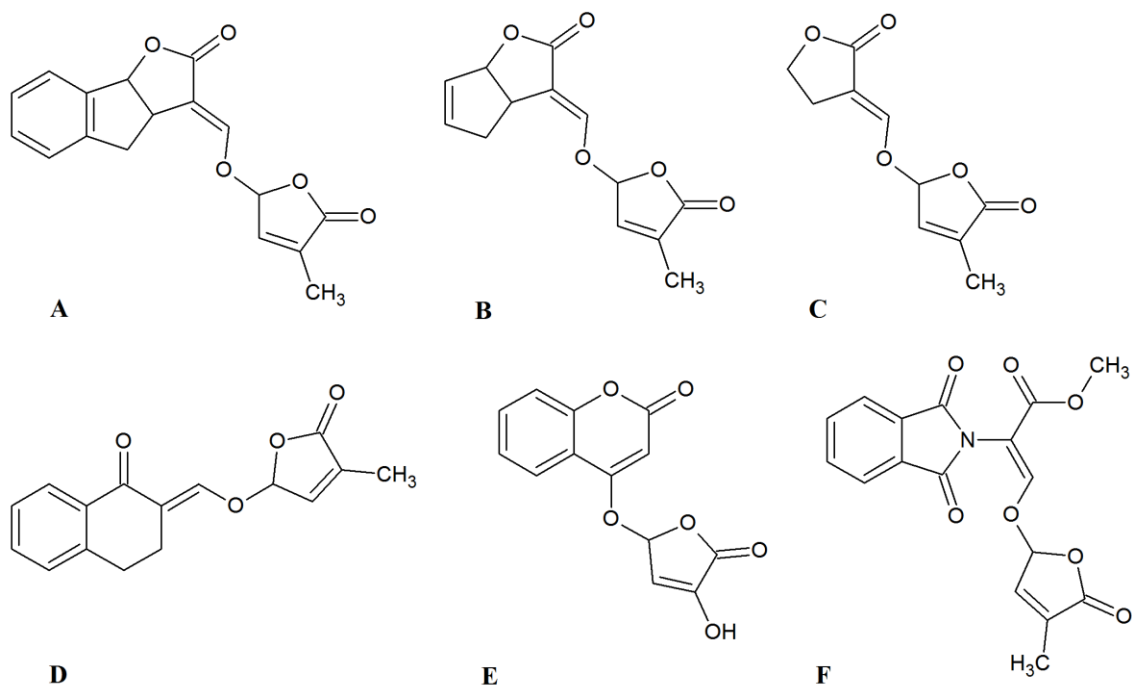
Fosfor patří mezi základní prvek potřebný ve výživě rostlin. Je součástí několika životně důležitých molekul včetně DNA, RNA a ATP. V půdě je pro rostliny špatně přístupný, protože je přítomen v anorganické formě fosfátu. Fosfát tvoří nerozpustné komplexy, a tudíž se z něho často stává faktor limitující růst u rostlin (Péret *et al.*, 2011). Pro vyřešení tohoto problému si rostliny pozměnily růstový model a tvoří symbiózu s mykorhizními houbami patřících do oddělení *Glomeromycota* (Smith a Smith, 2011). Produkce strigolaktonů a jejich vypouštění kořeny je podporováno snížením příjmu fosfátu a méně

pak nedostatkem dusičnanů. Při vysoké hladině fosforu dochází ke zpomalení biosyntézy strigolaktonů a jejich vypouštění (Jamil *et al.*, 2011, 2012; Yoneyama *et al.*, 2013). Dostupnost fosfátu reguluje jejich biosyntézu a transport na transkripční úrovni, kdy při jeho nedostatku dochází k nárůstu exprese CCD7, CCD8, D27 a MAX1 (Bonneau *et al.*, 2013). Exprese D27 a MAX1 je kontrolována dvěma transkripčními faktory, nodulační signální dráhou 1 a 2 (NSP1, NSP2), které jsou potřebné pro zajištění rhizobiální a mykorhizní symbiózy (Liu *et al.*, 2011). U mutantů *nsp1* je snížena transkripce D27 na minimum, u mutantů *nsp2* zhruba na 20 % v porovnání s nemutantní rostlinou (Liu *et al.*, 2011). Při nedostatku fosforu u rostlin dochází k redukci větvení kořene (Luquet *et al.*, 2005; Umehara *et al.*, 2010; Kohlen *et al.*, 2012) a ke změně jeho architektury. Mění se také poměr růstu kořenové a nadzemní části, kdy růst nadzemní části je redukován na úkor kořenové. U *Arabidopsis* vede nedostatek fosfátu ke vzniku mělčího kořenového systému s hustším kořenovým vlášením a delšími laterálními kořeny (Péret *et al.*, 2011). Tato změna v kořenové architektuře přispívá k lepšímu přístupu k fosfátu, který se obvykle akumuluje ve vrchních částech půdy (Lynch a Brown, 2001). Mutanti *max2* a *max4* projevují opožděnou reakci u změny kořenového vlášení při nedostatku fosfátu. U mutantu *max2* bylo také pozorováno snížení úrovně exprese několika genů aktivovaných nedostatkem fosfátu, což dokazuje ovlivnění strigolaktony (Mayzlish-Gati *et al.*, 2012). Vlivem přesunu živin do kořenů nastává u rostlin vlivem nedostatku fosfátu ke snížení větvení u nadzemní části rostliny (Luquet *et al.*, 2005; Umehara *et al.*, 2010). Zpětné dodání fosfátu rostlině vede ke snížení hladin strigolaktonů a k dramatickému snížení exprese genů kódujících D10, D27 a D17/HTD1 u rýže. Aplikace hnojiva vede ke stejnému účinku u čiroku, rýže a kukuřice (Jamil *et al.*, 2011, 2012).

2.1.7 Syntetická analoga strigolaktonů

Pro studium a lepší pochopení biologických funkcí, biosyntézy, degradace a mechanismu účinku strigolaktonů se používají různé uměle připravené sloučeniny, které mají podobnou chemickou strukturu, ale nižší biologickou aktivitu než přírodně vyskytující se strigolaktony. Tyto sloučeniny se nazývají také jako syntetická analoga. Výhodou těchto sloučenin je především jejich vyšší stabilita a dostupnost (Besserer *et al.*, 2006; Ruyter-Spira *et al.*, 2011). Při přípravě syntetických analog je nepostradatelná znalost vlivu

struktury na biologickou aktivitu. Výsledkem je zjištění, že část CD ve struktuře sloučeniny je nepostradatelná pro biologickou aktivitu strigolaktonů (Mangnus *et al.*, 1992). Tato skutečnost umožnila navrhnout syntézu takových látek, které mají podstatně jednodušší chemickou strukturu než přírodní strigolaktomy, ale přesto vykazují podobnou biologickou aktivitu (Nefkens *et al.*, 1997; Zwanenburg a Pospíšil, 2013). Mezi první syntetická analoga strigolaktonů patří série označovaná jako GR (Nefkens *et al.*, 1997). Tato série obsahuje tři zástupce s označením GR5, GR7 a GR24 lišící se vzájemně přítomností nebo nepřítomností A nebo AB části (Johnson *et al.*, 1981). Kromě této série existují i další úspěšně testovaná syntetická analoga – například Nihmegen-1 (Nijm), který se vyznačuje menší biologickou aktivitou než GR24, ale na druhou stranu má daleko vyšší stabilitu než již zmíněný GR24. Mezi další zástupce patří kumarinový derivát strigolaktonu označovaný jako Cou nebo tetralonový derivát s označením Tet (Nefkens *et al.*, 1997; Mwakaboko a Zwanenburg, 2011a, 2011b). Všechna syntetická analoga sdílejí společný stavební prvek ve své struktuře, a to že obsahují butenolidový kruh a enol-etherovou vazbu (Kannan a Zwanenburg, 2014). V současnosti GR24 je světově nejvíce používaným syntetickým analogem. Tento analog byl připraven na základě získaných poznatků při testování různých stimulantů klíčení parazitických semen rostlin rodů *Striga* a *Orobancha* (Besserer *et al.*, 2006). Struktura sloučeniny GR24 je podobná struktuře přírodního strigolaktonu strigolu. Jediný rozdíl je ve stavbě A kruhu, který byl nahrazen u GR24 aromatickým jádrem. GR24 je široce využíván nejen *in vitro* při studiu indukce klíčení semen parazitických rostlin, ale také slouží jako referenční sloučenina pro porovnání biologických aktivit u ostatních syntetických analog strigolaktonů. GR24 vykazuje velmi vysokou biologickou aktivitu již při velmi nízkých koncentracích 10^{-10} mol·l⁻¹. V porovnání s ostatními syntetickými analogy, například analogem GR7, který obsahuje pouze BCD kruh, dochází k indukci klíčení semen až při koncentraci 10^{-7} mol·l⁻¹ (Besserer *et al.*, 2006).



Obr. 7 Strukturní vzorce některých zástupců syntetických analog strigolaktonů.

A – GR24; B – GR7; C – GR5; D – Tet; E – Cou; F – Nijm

2.2 Parazitické rostliny

Zhruba 1 % všech krytosemenných rostlin (okolo 3500-4000 druhů) patří mezi hemiparazitické (fotosynteticky aktivní) nebo holoparazitické (fotosynteticky neaktivní) rostliny, a tudíž jsou závislé na vodě, živinách a zásobních látkách z hostitelské rostliny (Nickrent *et al.*, 1998). Mimo jiné parazitické rostliny také využívají látky produkované hostitelskou rostlinou, a to zejména sekundární metabolity získané přes haustoria, což je orgán, který tvoří spojení mezi parazitem a hostitelem. Bylo zjištěno, že parazitické rostliny nejen odebírají a sami regulují příjem látek z hostitele, ale také si samy dokáží syntetizovat látky nezbytné pro jejich růst a rozvoj (Stewart a Press, 2003). V závislosti na místě přichycení parazitické rostliny je rozděluje do dvou skupin, a to na parazity napadající stonek nebo napadající kořen. V podstatě každá parazitická rostlina se může zachytit na jakémkoliv hostiteli, ale pouze holoparazitické rostliny mohou přežít a dokončit svůj životní cyklus jen na pro ně vhodném hostiteli. Z tohoto důvodu se u některých parazitických rostlin vyvinul systém, který až po nalezení vhodného hostitele na základě přítomnosti specifických látek v prostředí indukuje klíčení semen (Runyon *et al.*, 2006). Parazitické rostliny napadající stonek klíčí bez ohledu na přítomnost hostitele. Druhou skupinou jsou parazitické rostliny napadající kořeny hostitelských rostlin (Musselman, 1980; Joel *et al.*, 2007). Tyto rostliny stráví většinu svého životního cyklu v půdě, pouze jejich kvetení probíhá nad povrchem. Na rozdíl od parazitických rostlin, které napadají stonek, je životní cyklus u parazitů napadajících kořeny hostitelské rostliny úzce spojen s životním cyklem jejich hostitele. Příkladem je interakce mezi hostitelem a parazitem při indukci klíčení. Parazitická semena nezačnou klíčit při nepřítomnosti germinačních stimulantů, které produkuje a vylučuje hostitelská rostlina kořeny (Joel *et al.*, 1995).

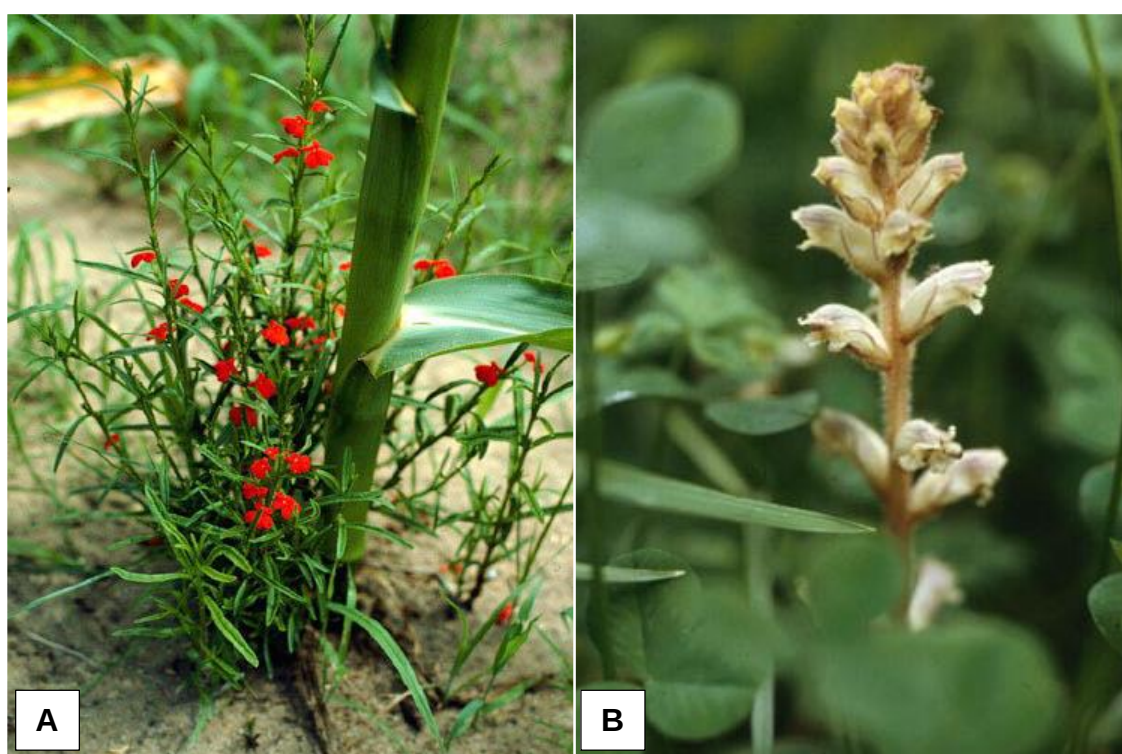
2.2.1 Rod *Striga* a *Orobanche*

Tab. 1 Zařazení rodu *Striga* a *Orobanche* do systému (itis.gov – Integrated Taxonomic Information System).

Říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení	rostliny krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	vyšší dvouděložné rostliny (<i>Rosophida</i>)
Řád	hluchavkotvaré (<i>Lamiales</i>)
Čeleď	zárázovité (<i>Orobanchaceae</i>)
Rod	<i>Striga</i> / <i>Orobanche</i>

Název *Striga* pochází z latiny, v překladu znamená čarodějnice a většina druhů jsou obecně známi jako „witchweed“ (Musselman, 1980). Rod *Striga* patří mezi jednoleté hemiparazitické rostliny a řadíme do něj kolem 30 zástupců. Rostliny dorůstají výšky 10-50 cm a je pro ně charakteristické vstřícné uspořádání listů, kdy jsou dva listové základy umístěny proti sobě po stranách. Dalším znakem jsou nepravidelné květy s výrazným prohnutím korunového tubusu. Barva květů je různá, může být růžová, červená, bílá, fialová nebo žlutá. Plodem je tobolka obsahující 250-500 semen o velikosti 200-300 µm. Rostlina za rok může vyprodukovat až 500 000 semen, která v půdě přežijí až po dobu 10 let (Berner *et al.*, 1995). Mezi nejlépe prostudované zástupce rodu *Striga* patří ty druhy, které způsobují největší ekonomické škody na úrodě. Mezi ně patří zejména *S. hermonthica*, *S. asiatica* a *S. gesnerioides*. Název *Orobanche* pochází z řeckého slova *orobos*, což v překladu doslova znamená zardousit. Rostliny rodu *Orobanche* se řadí mezi obligátní holoparazity, tudíž jsou plně závislé na svém hostiteli. Dorůstají výšky 20-60 cm, jejich lodyha je jednoduchá a zřídka kdy větvená. Listy jsou nahrazeny pouze zašpičatělými listeny ve tvaru šupiny. Jelikož postrádají barvivo chlorofyl, mají tyto rostliny typické zbarvení těla, které bývá nejčastěji hnědé, oranžové nebo tmavě fialové. Květy jsou oboupohlavné, bílé, žluté nebo modré barvy, které tvoří květenství o 10 až 20 květech. Kalich má zvonkovitý tvar. Plodem je tobolka obsahující zhruba 2 000 drobných semen. Jedna rostlina může mít za rok až 200 000 semen, která dokáží v půdě přežít po dobu 5 až 10 let. Rozdílné je také podnebí, v kterém se vyskytují. *Striga* roste v tropickém teplém podnebí na území Austrálie, západní a východní Afriky, Indie, Číny a Indonésie. Na rozdíl od rodu *Striga* jsou zástupci rodu *Orobanche* více rozšířeny v subtropickém a mírném podnebí severní polokoule, a to zejména na území severní Ameriky, západní Asie, zemích Blízkého východu a v oblastech kolem

Středozemního moře, včetně zemí jižní Evropy. Do rodu *Orobanche* se řadí přes 200 zástupců, a jelikož je více rozšířen v severních teplých oblastech vyspělého světa, je známo více druhů a je také lépe prostudován. Na druhou stranu rod *Striga* je daleko závažnějším zemědělským problémem, protože napadá převážně zemědělské plodiny v oblastech, kde roste pouze omezené množství druhů plodin (Musselman, 1980). Mezi typické hostitelské rostliny rodu *Striga* patří čirok, proso, kukuřice, rýže a cukrová třtina. U rodu *Orobanche* patří mezi typické hostitele například rajče, zelí, paprika, slunečnice nebo fazole (Musselman, 1980).



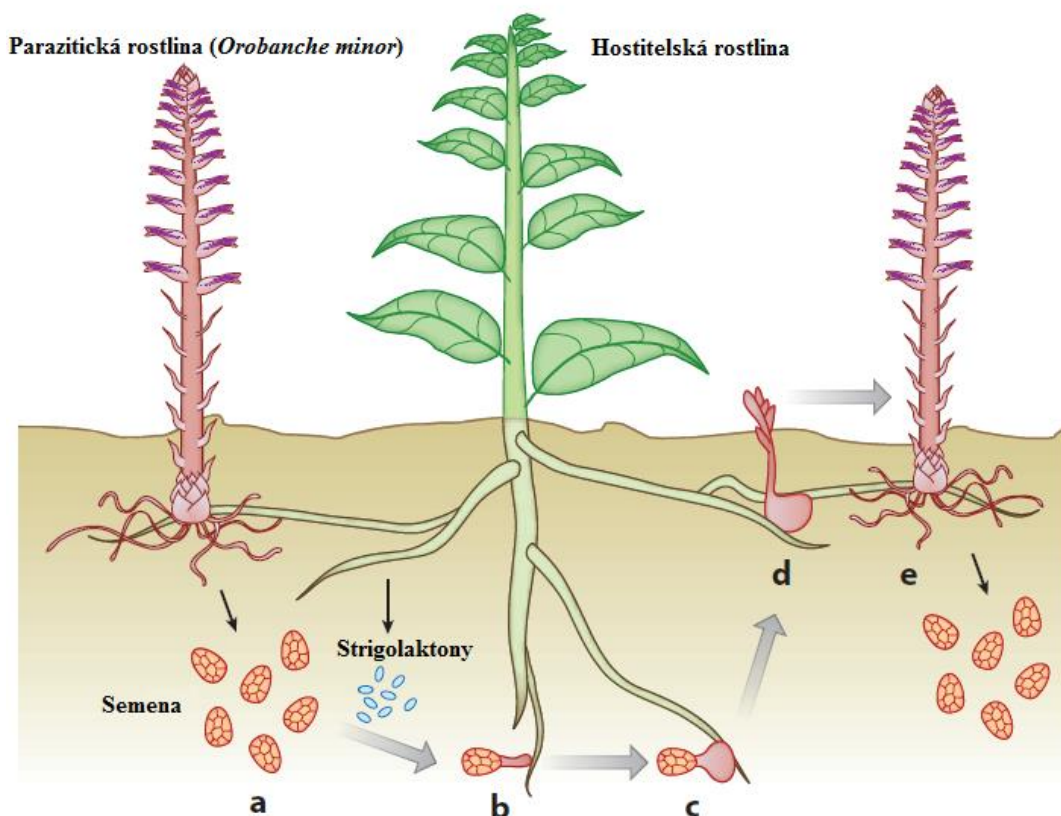
Obr. 8 A – parazitická rostlina *Striga asiatica* na hostitelské rostlině kukuřice seté (*Zea mays*).
B – parazitická rostlina *Orobanche minor* na hostitelské rostlině jetelu (*Trifolium*; Nickrent et al., 1998).

2.2.2 Životní cyklus

Životní cyklus parazitických rostlin rodu *Striga* i *Orobanch*e odráží jejich vysokou specializaci pro parazitický život. Klíčovou roli hraje enormní množství malých semen, která se snadno roznáší vodou, vzduchem i zvířaty a přežijí v půdě déle než 10 let (Atera *et al.*, 2011). Pro klíčení semen je potřeba přítomnost vhodné hostitelské rostliny, protože parazitická semena přežijí pouze 3-7 dní od začátku jejich klíčení. Pokud nedojde ke spojení s hostitelem, semena odumřou (Berner *et al.*, 1995). Klíčení semen je závislé na přítomnosti stimulantů klíčení vypouštěných kořeny hostitelské rostliny. Semena musí projít přes několik fází, první z nich je tzv. kondicionace, kdy okolní prostředí musí splňovat vhodné podmínky, a to hlavně ideální vlhkost a teplotu. Tato fáze trvá po dobu 7-14 dnů a až po ukončení této fáze může semeno reagovat na stimulanty klíčení. Pokud ale po ukončení kondicionace nedojde k rozpoznání signálu stimulantu klíčení, tak semeno upadá do sekundárního stavu dormance (Cardoso *et al.*, 2011). Druhou fází po kondicionaci je tzv. předpřípravné období, kdy dochází k přípravě na klíčení. Doba potřebná pro tento krok jsou zhruba 2 týdny, a to jak u studovaných *S. hermonthica*, *S. densiflora*, *S. gesnerioides*, tak i pro *O. minor* a *O. crenata* (Reid a Parker, 1979). Po indukci klíčení dochází k vytvoření a růstu haustoria směrem ke kořenům hostitele za využití chemotropismu. Při kontaktu dojde k zastavení růstu a haustorium se přichytí ke kořenům hostitele a nakonec pronikne do primární kůry (cortex). Většina druhů rodu *Striga* a *Orobanch*e vyžaduje velmi malou vzdálenost od svého hostitele, a to v řádech několika milimetrů, aby bylo zahájeno jejich klíčení. Vhodná teplota pro indukci klíčení se liší v závislosti na daném druhu, obecně rostliny rodu *Striga* preferují vyšší teplotu (25-35 °C) než rostliny rodu *Orobanch*e (10-20 °C). Tento rozdíl je dán adaptací na různou teplotu podnebí jejich výskytu (Musselman, 1980; Nickrent *et al.*, 1998). Do 12 hodin od připojení dochází k reorganizaci meristému. Pro tento krok je nezbytná účast faktorů indukujících růst haustorií. Nejlépe takto prostudovaným přírodně se vyskytujícím faktorem je sloučenina 2,6-dimethoxy-*p*-benzochinon (DMBQ), která je produktem oxidace ligninu a dekarboxylace fenolových kyselin přítomných v buněčné stěně rostlin (Chang a Lynn, 1986). Tento model zachycení signálu DMBQ je založen na vypuštění DMBQ z buněčné stěny hostitele a jeho následného vstupu do parazitické buňky. DMBQ je za přítomnosti NAD(P)H-dependentní chinon reduktasy (QR1) redukován na nestabilní meziprodukt semichinon, který je potřebný pro vývoj haustoria. Kromě QR1 je zde přítomna také druhá chinon reduktasa (QR2), která slouží pouze jako

paralelní detoxifikační dráha pro regulaci rovnováhy mezi chinonem a semichinonem. Do 24 hodin od kontaktu nastává zastavení dělení buněk v radiální špičce a začíná hypertrofická růstová fáze (Hood *et al.*, 1998). Proniknutí hostitelským epidermis je zprostředkováno protažením distálních buněk v protodermu nebo epidermu následované jejich dělením, což vede k prorůstání do cortexu hostitelské rostliny. Jakmile dojde k proniknutí do endodermu hostitele, tak se většina distálních buněk haustoria začne dělit a prodlužovat. Po prolomení skrz endodermis se naváže vaskulární připojení. K proniknutí slouží specializovaná struktura tzv. oskulum (Dörr, 1997). Celý proces penetrace je dokončen za 48 až 72 hodin od kontaktu s hostitelskými kořeny (Hood *et al.*, 1998). Při spojení parazita s hostitelem dojde pouze k vytvoření připojení přes xylém, ale nikoli přes floém. Do 24 hodin od dokončení připojení dochází ke zvětšení kotyledonu a zániku osemení u parazitických semen (Hood *et al.*, 1998). Haustorium slouží u všech parazitických rostlin jako rozhraní mezi hostitelem a parazitem. Spousta rostlin je rezistentní vůči napadení parazitickou rostlinou. U většiny nehostitelských rostlin dochází k penetraci parazita a k počátečnímu vytvoření haustoria, ale poté je infekce ukončena v cortexu. U jednoděložných hostitelských rostlin bylo pozorováno vyvolání hypersenzitivní reakce na infekci způsobující smrt parazita (Hood *et al.*, 1998). Po úspěšném vytvoření spojení přes xylém začíná parazitická rostlina tvořit adventivní kořeny a roste směrem nahoru. Adventivní kořeny jsou schopny produkovat laterální (sekundární) haustoria, která napadají stejnou nebo blízkou hostitelskou rostlinu. Tento typ haustorií je evolučně starší než primární nebo terminální haustoria (Westwood *et al.*, 2010). V přírodě dochází obvykle k napadení jednoho hostitele více parazitickými rostlinami naráz, čímž dojde k vysokému odběru živin a asimilátů. Někteří zástupci obou parazitických rodů dokáží sami svým kořenovým systémem přijímat minerální látky včetně fosforu, draslíku, železa a síry (Musselman, 1980). Bylo zjištěno, že při infekci je obsah dusíku u parazita nejméně dvakrát tak vyšší než u hostitele (Agabawi a Younis, 1965). Dusík je za normálních podmínek transportován z kořenů do nadzemní části rostliny floémem, ale při nedostatku cukrů může být transportováno méně dusíku. Toto vede k redukci syntézy aminokyselin a cukrů, což má za následek omezení celkového růstu a vede k fyziologickým změnám hostitelské rostliny (Musselman, 1980). Dále u hostitele dochází ke snížení úrovně fotosyntézy, a to konkrétně k redukci rychlosti elektronového transportu přes fotosystém II (Rodenburg *et al.*, 2007). U napadených rostlin je také pozorována změna hladin u některých fytohormonů, zejména abscisové kyseliny, cytokininů a giberelinové kyseliny (Musselman, 1980; Taylor *et al.*, 1996).

Zatím není znám přesný princip, jak parazit dokáže manipulovat s homeostatickou hladinou fytohormonů u hostitele a jak tyto změny celkově ovlivňují parazitismus. Poté co parazit rodu *Striga* proroste na zemský povrch, začíná sám fotosyntetizovat. Nicméně fixace oxidu uhličitého je velmi nízká a respirace za tmy vysoká. Tento jev vede k negativnímu přísunu uhlíku za 24 hodinovou periodu, což činí *Strigu* závislou na svém hostiteli (Press *et al.*, 1987). Listy *Strigy* jsou charakteristické přítomností vrstvy degenerovaných palisádových buněk a nízkým obsahem chloroplastů v buňkách. Vysoká rychlost transpirace u *Strigy* ukazuje, že většina asimilátů z hostitele je získávána přes transpirační tah. Při zvýšené vzdušné vlhkosti dochází k inhibici růstu parazita, proto nejen zástupci rodů *Striga* a *Orobancha*, ale i ostatní parazitické rostliny, preferují pro svůj růst otevřené slunné místo, kde dochází ke zvýšené transpiraci. Ke kvetení dochází zhruba po 4 týdnech od spojení s hostitelem (Berner *et al.*, 1995). Po opylení květů se vytvoří tobolky, které zhruba do 4 týdnů od opylení prasknou. Po prasknutí dojde k vypuštění drobných semen, která v půdě musí uzrát. Doba zrání je kolem 6 měsíců a slouží pravděpodobně k tomu, aby se předešlo brzkému vyklíčení v deštivém období na konci roku, kdy již nejsou dostupní žádní vhodní hostitelé. Po uzrání je semeno připraveno k vyklíčení a celý cyklus se může opakovat (Berner *et al.*, 1997).



Obr. 9 Životní cyklus parazitické rostliny *Orobancha minor* (převzato z Xie *et al.*, 2010).

A – Klíčení semen je indukováno látkami z hostitelské rostliny. B – Kontakt a připojení vyklíčených semen haustoriem ke kořenům hostitelské rostliny. C-D – Parazit roste a vyvíjí se po několik týdnů v podzemí, než dochází ke kvetení nad zemí. E – Parazitická rostlina produkuje obrovské množství semen, která zůstávají v půdě životaschopná po dobu několika let.

2.2.3 Ochrana před parazitickými rostlinami

Parazitické rostliny rodů *Orobancha*, *Phelipanche* a *Striga* způsobují každoročně obrovské škody v zemědělství, a to zejména v Africe, Asii a v oblastech kolem Středomořího moře (Parker, 2009, 2012). Odhady hovoří o tom, že jen rod *Striga* v Africe způsobuje každoroční škody v zemědělství přes 10 miliard amerických dolarů a ovlivňuje nepřímě životy více než 100 milionů lidí (Ejeta a Gressel, 2007). Vlivem postupného oteplování podnebí mírného pásu a změně klimatu dochází k rozšiřování některých zástupců rodů *Striga* a *Orobancha* i do jižní Evropy a severní Ameriky, což může v budoucnu představovat obrovský problém pro zdejší zemědělství (Grenz a Sauerborn, 2007). Je vyvíjeno značné úsilí ve vývoji účinných metod v boji proti těmto parazitickým rostlinám, aby se zabránilo dalším škodám na úrodě. Do současnosti bylo

publikováno několik různých přístupů, bohužel žádný z nich nebyl zatím natolik úspěšný, aby se začal široce využívat i v praxi. Největším problémem v boji proti těmto parazitickým rostlinám je počet semen, která dokáže jediná rostlina vyprodukovat. Tato semena dokáží přežít v půdě v neaktivní formě velmi dlouhou dobu, a to až 10 let (Rubiales *et al.*, 2009). Proto se vědci zaměřují na objevení postupu, který by dokázal zabránit v šíření parazitických rostlin a ochránil zemědělské plodiny, které patří do skupiny hostitelských rostlin. Mezi nejstarší metodu patří ruční vytrhávání vyklíčených parazitických rostlin, což je značně pracné a neefektivní (Kannan a Zwanenburg, 2014). Dalším přístupem je například šlechtění rezistentních druhů rostlin. Tato technika je ale velmi náročná, jelikož je potřeba využít velké množství selekčních technik. Navíc bylo zjištěno, že rezistence zhruba po pěti letech zmizí (Joița *et al.*, 2009). Dalším možným způsobem je použití herbicidů, které vykazují vysokou účinnost, ale při jejich použití může docházet také k samotnému ovlivnění hostitelské rostliny a zamoření životního prostředí toxickými látkami při užití neselektivních a vysoce toxických sloučenin v přípravcích (Hearne, 2009; Parker, 2009, 2012; Rubiales *et al.*, 2009). Jako další možná cesta v boji s parazitickými rostlinami se ukázala tzv. metoda sebevražedného klíčení. Tato metoda spočívá v aplikaci roztoku stimulantů klíčení parazitických semen do půdy před samotnou výsadbou semen plodin. Dochází k indukci klíčení parazitických semen, která odumřou, jelikož nedojde k interakci s hostitelem. Parazitická rostlina dokáže vyklíčit v nepřítomnosti vhodného hostitele, ale nedokáže sama přežít (Johnson *et al.*, 1981). V této metodě bohužel narážíme na problém omezené stability strigolaktonů v půdě. Stabilita strigolaktonů je velkou mírou ovlivněna pH prostředí, kdy se stoupající bazicitou klesá jejich stabilita (Johnson *et al.*, 1981; Babiker *et al.*, 1988). Jako možné řešení se jeví použití právě syntetických analog strigolaktonů, které by vykazovaly vyšší stabilitu. Na základě dosud zjištěných poznatků o biologické aktivitě strigolaktonů se podařilo úspěšně otestovat syntetická analoga v půdních podmínkách. V závislosti na použitém analogu a druhu parazitické rostliny se procentuální úspěšnost pohybovala mezi 18 až 98 % (Kgosi *et al.*, 2012). První větší úspěch v boji proti parazitickým rostlinám zaznamenal syntetický analog strigolaktonu s názvem Nijmegen-1 (Nijm), který byl aplikován na rostliny tabáku napadené parazitem *Orobanche cumana* (Zwanenburg *et al.*, 2009). Při tomto experimentu byla použita speciální emulze, která zabránila předčasné hydrolýze syntetického analoga, čímž umožnila proniknutí sloučeniny i do spodních vrstev půdy. Opačným přístupem v boji s parazity je naopak využití nestability stimulantů klíčení parazitických rostlin v půdě

(Babiker a Hamdoun, 1982). Jak již bylo zmíněno, tak strigolaktony a jejich syntetická analoga jsou nestabilní při vyšším pH. Proto byla navržena aplikace roztoku boraxu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) na půdu. Roztok boraxu má slabě bazické vlastnosti a mezi jeho výhody patří prakticky neměnnost pH s jeho koncentrací. Princip této metody spočívá v tom, že se stimulanty klíčení produkované hostitelskou rostlinou do půdy v jeho přítomnosti díky bazickému pH rychle rozloží a nedostanou se tak k semenům parazitických rostlin, a tím nedojde k indukci klíčení. Výhodou boraxu je, že jde o levnou a přitom ekologicky šetrnou sloučeninu (Castro a Brighenti, 2007). Při této aplikaci se musí ale brát v potaz vlastnosti různých typů půd, a také použití v dlouhodobém horizontu, kdy by mohlo dojít ke zvýšení obsahu bóru v půdě, a tím by mohlo dojít k intoxikaci rostlin. Jako alternativa k boraxu by mohla být thiomočovina (H_2NCSNH_2). Tato sloučenina reaguje v tautomerní formě iminothiolu, která obsahuje α a β nesaturované enonové jednotky, stejně tak jako klasické thioly, díky čemuž dochází k oddělení D kruhu a následné deaktivaci strigolaktonu (Mangnus a Zwanenburg, 1992). Obdobně jako v případě boraxu je thiomočovina levná, dostupná a ekologicky šetrná sloučenina. Navíc působí jako bioregulátor stimulace růstu a hraje důležitou roli antioxidantu při ochraně rostliny (Mathur *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2013). Další strategií, tentokrát na genetické úrovni, je metoda s názvem VIGS (virus induced gene silencing). Zde se využívá cíleného umlčení genu pomocí aplikace rekombinantního viru do rostliny za využití obranného mechanismu rostlin PTGS (post-transkripční umlčení genu = post-transcriptional gene silencing; Voinnet, 2001). VIGS vektory jsou obvykle standardní binární Ti-plasmidy, které obsahují virální genom a fragment hostitelského cílového genu. Vektory jsou zavedeny do rostlin pomocí infekce bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která vede k přenosu T-DNA obsahující virální genom do genomu hostitele, kde poté dochází k jeho transkripci a translaci (Lu *et al.*, 2003; Robertson, 2004). Následkem je produkce dvouvláknové RNA (dsRNA), která je způsobena samovolným skládáním virální jednovláknové RNA (ssRNA) do harpinů nebo komplementárních sekvencí odvozených od paralelní a antiparalelní virální jednovláknové RNA (ssRNA; Donaire *et al.*, 2009). Takto složené dvouvláknové RNA (dsRNA) jsou poté štěpeny na kratší fragmenty o délce 21 až 24 nukleotidů (Voinnet, 2001; Lu *et al.*, 2003; Robertson, 2004). Tyto siRNA jsou poté inkorporovány do RNA indukovanému umlčujícímu komplexu (RISC = RNA-induced silencing complex), který řídí štěpení komplementární RNA (Waterhouse a Fusaro, 2006; Ding a Voinnet, 2007). Signál pocházející z viru je poté zesílen a rozšířen po celé rostlině (Kalantidis *et al.*, 2008). VIGS vede ke snížení exprese cílového genu

(Voinnet, 2001). Tato metoda byla využita například při zkoumání rostliny *Nicotiana benthamiana* napadené parazitickou rostlinou *Phelipanche aegyptiaca*. Listy u hostitelské rostliny byly ošetřeny VIGS, což mělo „vypnout“ geny kódující enzymy CCD7 a CCD8, které se účastní biosyntetické dráhy strigolaktonů. Výsledkem bylo zastavení vývoje infekce. Počet infekcí napadených rostlin *Nicotiana benthamiana* ošetřených pomocí VIGS bylo v porovnání s neošetřenými kontrolními rostlinami o 90 % nižší. Předpokládá se, že ke snížení infekce došlo z důvodu nedostatku endogenních strigolaktonů, jejichž biosyntéza byla zastavena umlčením genů kódující enzymy potřebné v této biosyntetické dráze (Aly *et al.*, 2014). Při použití těchto metod je ale potřeba brát v potaz, že strigolaktomy plní i funkci fytohormonů. Tudíž vzniklá disbalance může narušit normální vývoj rostliny (větvení, apikální dominance atd.).

2.3 Cytochrom P450

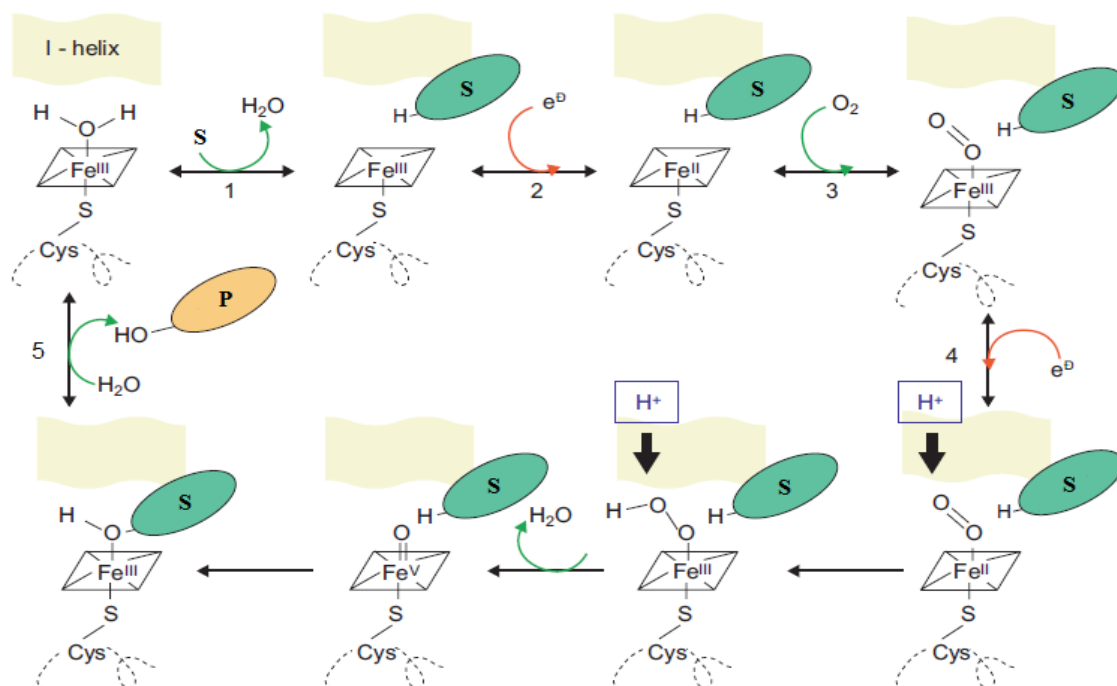
Cytochrom P450 je skupina proteinů pojmenovaná dle svého absorpčního maxima v redukovaném stavu při vlnové délce 450 nm, kdy obsahují navázanou karbonylovou skupinu ve svém skeletu. Tato skupina patří mezi jednu z největších rodin enzymů. Geny kódující P450 (také nazývány jako CYP) jsou přítomny v genomech všech živých organismů včetně rostlin. Jejich sekvence aminokyselin se navzájem velmi liší, ale u všech byl zachován jejich typický strukturní prvek v průběhu evoluce, čímž je hemo-thiolátová část. Tato část patří mezi nejvíce konzervativní části a je spojena s hem vázající se skupinou. Zde nalezneme společný prvek stejný pro všechny zástupce, a to funkci cysteinové části sloužící jako pátý axiální ligand atomu železa v hemu. Další společnou vlastností všech P450 je využívání elektronů z NAD(P)H ke katalytické aktivaci molekulárního kyslíku, což vede k místně- a stereo-specifickému oxidativnímu ataku substrátu. Reakce, kterých se účastní P450, jsou velmi různorodé. Tyto enzymy se zúčastňují nepřeberného množství životních procesů, např. asimilace uhlíku, biosyntézy hormonů nebo strukturních stavebních látek. V prokaryotech jsou P450 rozpustné proteiny, v eukaryotech jsou obvykle připojeny k endoplasmatickému retikulu nebo vnitřní mitochondriální membráně. Enzymy P450 katalyzují také mnoho reakcí, které jsou důležité v metabolismu léků nebo které mají praktické využití v průmyslu. Jejich ekonomický dopad je tedy značný (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000).

2.3.1 Dělení cytochromů P450

Enzymy patřící do rodiny P450 se dají rozdělit do čtyř základních tříd v závislosti na způsobu přenosu elektronů z NAD(P)H do svého katalytického místa. Enzymy patřící do třídy I vyžadují reduktasu obsahující FAD a redoxin obsahující železo a síru. Enzymy ve třídě II vyžadují pouze reduktasu obsahující FAD/FMN pro přenos elektronů. Třída III jsou samostatné enzymy a nepotřebují žádný donor elektronů. U enzymů ve třídě IV dochází k příjmu elektronů přímo z NAD(P)H bez účasti potřebného přenašeče. Tato klasifikace vzájemných interakcí s redoxními partnery není dána evolucí cytochromu P450 (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000).

2.3.2 Průběh katalytické reakce

Aktivní místo cytochromu P450 obsahuje ve svém centru hemovou skupinu a atom železa, který je vázán k proteinu přes cystein-thiolátový ligand. Cysteinová struktura je konzervativní pro všechny známé CYP (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000). Vzhledem k rozsáhlé škále reakcí katalyzovaných CYP se mohou jednotlivé vlastnosti a aktivita lišit. Obecně se ale dá jejich katalytický cyklus popsat následovně. V prvním kroku dochází k navázání substrátu, který je v blízkosti hemové skupiny na straně opačné k thiolátu. Substrát způsobuje změny v konformaci aktivního místa, často dochází k vytlačení molekuly vody z hemového železa a ke změně jeho stavu z nízko spinového na vysoko spinový (Poulos *et al.*, 1987; Meunier *et al.*, 2004). Po napojení substrátu následuje zahájení přenosu elektronu z NAD(P)H za účasti cytochrom P450 reduktasy nebo jiné přidružené reduktasy (Sligar *et al.*, 1979). Poté dochází k napojení molekulárního kyslíku do hemového centra na atom železa. Dochází k přenosu druhého elektronu, a to buď z cytochromu P450 reduktasy, ferredoxinu nebo cytochromu *b5*. Tento krok vede u aduktu Fe-O₂ ke vzniku krátkodobého peroxo stavu. Takto vytvořená peroxo skupina je poté rychle dvakrát protonizována. Následně se odštěpí jedna molekula vody a vytvoří se vysoce reaktivní molekula železa v oxidačním stavu IV spojená s atomem kyslíku (ferryl). Při tomto kroku se oxidovaný ekvivalent nachází nad porfyrinem a ligandem thiolátu (Rittle a Green, 2010). Po opuštění produktu z aktivního místa se enzym vrací do svého původního stavu a dochází k navázání molekuly vody zpět na své původní místo. V závislosti na substrátu a enzymu mohou enzymy rodiny P450 katalyzovat širokou škálu reakcí, např. dealkylaci, dehydrataci, dehydrogenaci, isomeraci, dimerizaci nebo redukci (Mansuy, 1998). Kromě tohoto jsou CYP nedílnou součástí biosyntézy strigolaktonů. Prekurzor karlakton je přeměňován řadou reakcí, v kterých právě hrají svou klíčovou roli enzymy z rodiny cytochromů P450 (viz Kap. 2.1.4).



Obr. 10 Schéma katalytické mechanismu cytochromu P450 (S – substrát; P – produkt; převzato z Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000).

1 – Navázání substrátu a odštěpení molekuly vody. 2 – Přenos elektronu z NAD(P)H a navázání molekulárního kyslíku na atom železa. 3 – Přenos druhého elektronu a vznik Fe-O₂ aduktu. 4 – Protonizace vzniklé peroxoskupiny a odštěpení vody. 5 – Opuštění produktu a navázání molekuly vody zpět do aktivního místa.

2.4 Metody

2.4.1 Infračervená spektroskopie

Infračervené záření je část elektromagnetického spektra nacházejícího se mezi viditelnou a mikrovlnnou oblastí. Pomocí infračervené spektroskopie (IČ) se sledují vibrační a rotační přechody v molekulách. Pokud dojde ke změně vibračních nebo rotačních stavů současně se změnou dipólových momentů, dochází k absorpci záření charakteristického pro danou vazbu v pozorované molekule. Dle konvence IČ spektroskopii dělíme dle vlnových délek záření na daleké (FIR), střední (MIR) a blízké (NIR). Pro praktické využití při identifikaci organických molekul se nejčastěji využívá střední IČ oblast s rozsahem 4000 až 400 cm^{-1} , protože zde dochází ke vzniku největšího počtu absorpčních pásů u organických sloučenin. Oblasti, v kterých tyto látky absorbují IČ záření, můžeme rozdělit na dvě části, a to na oblast vibrací valenčních (4000-1500 cm^{-1}) a oblast vibrací deformačních (1500-500 cm^{-1}). V oblasti valenčních vibrací nalezneme absorpční pásy přítomných funkčních skupin. Tyto vlnočty se vyznačují svou vysokou specifitou a nízkou závislostí na zbytku molekuly. Díky tomu dokážeme zjistit přítomnost funkčních skupin. V oblasti vibrací deformačních detekujeme projevy deformací. I malé změny ve struktuře sloučeniny mají silný vliv na soubor frekvencí v této oblasti. Tato část spektra je proto také často nazývána jako „oblast otisku palce“ díky nezaměnitelnosti pro každou sloučeninu. Tohoto jevu se dá využít při identifikaci neznámé látky na základě srovnání měřených spekter s referenčními, jelikož neexistují žádné dvě rozdílné sloučeniny s identickým spektrem v této oblasti. Mezi výhody IČ spektroskopie patří možnost měřit vzorky ve všech skupenských stavech. Pro měření kapalných vzorků se nejčastěji využívá kyvet vyrobených z halogenidů alkalických kovů. Tyto kyvety i rozpouštědla používaná při měření nesmí obsahovat vodu. Použité rozpouštědlo se volí dle oblasti, ve které se měří vzorek, aby vykazovalo co nejmenší absorpci. Při měření pevných vzorků se používá technika KBr tablet, kde se malé množství rozdrceného vzorku smíchá s bromidem draselným. Poté se z této homogenní směsi vylisuje při vysokém tlaku tableta. Tlakem vznikne tenká vrstva KBr na povrchu tablety, která odráží jen malé množství IČ záření, tudíž nedochází k velkým ztrátám jeho intenzity při odrazu. Další možností je použití techniky KBr difúzní reflektance, kde je rozdrcený vzorek spolu s KBr umístěn v kovové misce a je detekováno odražené záření. Výhodou je potřeba menšího množství vzorku a kratší časová náročnost (Silverstein *et al.*, 2006; Field *et al.*, 2011).

2.4.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je komplementární metodou k infračervené spektroskopii. Identifikační schopnosti obou metod jsou srovnatelné. Ramanova spektra stejně jako IČ spektra poskytují informace o rotačních a vibračních pohybech molekul. U Ramanovy spektroskopie se na rozdíl od absorpce u IČ spektroskopie využívá rozptylu. Jedná se o všestrannou metodu pro identifikaci látek, určování jejich složení i struktury. Výhodou je měření látek ve všech skupenstvích včetně vodných roztoků. Další nespornou výhodou je měření povrchů materiálů nebo biologických systémů. Pro kvalitativní analýzu lze porovnávat získaná spektra se spektry čistých látek pomocí dostupných knihoven. Ramanova spektroskopie se dá použít i pro metodu kvantitativní analýzy, kde je ale potřeba počítat s faktory, které dokáží tato měření ovlivnit. Zejména se jedná o stabilní hodnotu výkonu použitého laseru nebo hloubky průniku záření do vzorku. Pro Ramanovu spektrometrii se nejčastěji používají disperzní spektrometry. Kromě nich ale existují také spektrometry s Fourierovou transformací. Spektrometr obsahuje zdroj excitujícího záření, kterým je nejčastěji laser. Zde se dle aplikace mohou použít různé typy laserů pokrývající viditelnou (VIS), blízkou infračervenou (NIR) nebo ultrafialovou oblast (UV). Mezi další části spektrometru patří komora, optika, disperzní prvek a detektor. Podstatou Ramanova rozptylu je zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly, který je vyvolaný interakcí s fotonem dopadajícího záření provázený vyzářením fotonu rozptýleného záření za splnění podmínky zákona o zachování energie (Smith a Dent, 2004; Schrader, 2008). Existuje několik technik měření. První z nich je rezonanční Ramanova spektroskopie SE(R)RS, která využívá rezonanční Ramanův efekt založený na přiblížení vlnové délky záření k maximu absorpčního pásu u sledovaného vzorku. Díky tomuto dochází k nárůstu intenzity těchto pásů až o několik řádů. Tato technika nachází využití při studiu složitých látek. Dalším typem je povrchem zcitlivělá Ramanova spektroskopie označována jako SERS. Přesný mechanismus není dosud znám, přesto je metoda používána již řadu let (Fleischmann *et al.*, 1974). Existují dvě hypotézy. První elektromagnetická hypotéza předpokládá zvýšení intenzity elektromagnetického záření pole na kovovém povrchu. Naopak druhá chemická hypotéza předpokládá, že dochází k chemické adsorpci pozorované molekuly na kovový povrch, a tím dojde ke zvýšení polarizace adsorbátu (Otto, 2005). Při měření lze využít dva typy substrátů, a to elektrod z ušlechtilých kovů nebo koloidů připravených chemickou redukcí solí příslušných kovů ve vodných nebo nevodných prostředích (Li *et*

al., 2005). Výhodou koloidů je zejména jejich snadná příprava. Touto metodou lze studovat látky od malých molekul (aminokyseliny, metabolity) až po velké složité systémy (proteiny, DNA, polynukleotidy; Drachev *et al.*, 2005; Vo-Dinh *et al.*, 2005).

2.4.3 Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR)

NMR je spektroskopická metoda založená na absorpci radiofrekvenčního elektromagnetického záření jádru některých atomů v molekulách analyzované látky, které jsou umístěny v magnetickém poli. Při analýze se využívá zkoumání chování těchto atomových jader. Atomové jádro se skládá z kladně nabitých částic protonů a neutrálně nabitých částic neutronů. Každá částice má svůj spin, který představuje její směr rotačního pohybu. Spin může nabývat hodnot $+1/2$ nebo $-1/2$. Součet všech spinů částic přítomných v jádře je označován jako jaderný spin. Tento údaj je důležitý pro NMR spektrometrii, jelikož nám říká, zdali je daná látka vhodná pro měření či nikoliv. Pro měření jsou nejvýhodnější jádra se spinem $1/2$ (například ^1H nebo ^{13}C). V základním stavu, kdy nepůsobí žádné magnetické pole, mají spiny náhodné uspořádání a stejnou energii. Pokud je ale vystavíme silnému vnějšímu magnetickému poli, dojde k jejich rozdělení do dvou hladin. Jedna hladina bude mít vyšší energii, druhá hladina naopak nižší energii oproti základnímu stavu. Na hladině s nižší energií se bude nacházet větší počet spinů než na hladině s vyšší energií. Čím bude magnetické pole silnější, tím bude docházet k většímu rozdílu v počtu spinů mezi jednotlivými hladinami. Pokud takto rozštěpený systém ozáříme radiofrekvenčním zářením, dojde k absorpci a excitaci některých spinů na vyšší hladinu. Po ukončení ozařování dojde k deexcitaci, která je následně měřena. Pro získání co nejvyšší intenzity NMR signálu je potřeba použít silné magnetické pole, které je zajištěné solenoidem vyrobeného ze supervodivého materiálu ochlazeného na velmi nízkou teplotu kapalným héliem. Cívkou prochází vysoký proud, čímž dochází k vytvoření silného magnetického pole. Pro zajištění lepšího chlazení je celá cívka zapečetěna v nádobě, která je dále umístěna do vnějšího obalu chlazeného kapalným dusíkem. Izolaci mezi stěnami jednotlivých nádob zajišťuje vakuum. Kromě magnetu se NMR přístroj skládá ještě ze sondy, do které se vkládá vzorek. Tato sonda také obsahuje cívky pro příjem a vysílání, zesilovač a vysílač radiofrekvenčního záření (Böhm a Smrčková, 1995; Field *et al.*, 2011; Silverstein *et al.*, 2006).

NMR se stala jednou z předních technik pro určování struktury organických sloučenin. Je to jediná spektrometrická metoda, u které se očekává kompletní analýza a interpretace celého spektra. NMR, na rozdíl od hmotnostní spektrometrie, patří mezi nedestruktivní metody, tudíž lze analyzovaný vzorek znovu použít. Pro samotnou analýzu je potřeba většího množství vzorku než v hmotnostní spektroskopii. Nejběžněji používaným rozpouštědlem používaným v NMR je chloroform-d (CDCl_3) díky svým dobrým rozpouštěcím vlastnostem a relativně nízké reaktivitě. Dalšími používanými rozpouštědly jsou benzen-d6 (C_6D_6), aceton-d6 (CD_3COCD_3) nebo těžká voda (D_2O ; Böhm a Smrčková, 1995).

2.4.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která slouží ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Je založena na pohybu iontů v plynném stavu, které se pohybují ve vakuu vlivem elektrického pole. Tento pohyb je podle typu použitého analyzátoru ovlivňován pomocí magnetického či elektrického pole. Hmotnostní spektrometry se skládají z tří hlavních částí. První částí je iontový zdroj, ve kterém vznikají ionty v plynném stavu. Druhou částí je hmotnostní analyzátor, v němž dochází k separaci iontů podle m/z . Třetí částí je vlastní detektor, kde se jednotlivé ionty převádějí na elektrický signál (Field *et al.*, 2011).

Před měřením na hmotnostním spektrometru je nutné analyt převést na těkavou formu a ionizovat neutrální molekuly na nabitě ionty. Existuje několik technik ionizace. Nejběžnější je ionizace elektronovým nárazem (EI), která se nejčastěji používá k detekci pozitivně nabitých iontů a méně k detekci negativně nabitých iontů. Energie elektronu odpovědného za ionizační proces může být různá, ale musí být dostatečná pro vyražení elektronu z molekuly. Čím vyšší energie je použita, tím dochází k větší fragmentaci molekulárního iontu. Alternativou k ionizaci elektronovým nárazem je ionizace chemická (CI), kde se využívá ionizace nosného plynu (nejčastěji methan nebo amoniak) nárazem elektronů, čímž dochází k vytvoření iontů plynu. Tyto ionty poté ionizují samotný vzorek. CI je měkčí ionizační technika než EI, což má za následek menší fragmentaci molekulového iontu. Dalšími měkkými ionizačními technikami jsou MALDI a ionizace elektrosprejem. V technice MALDI se využívá k ionizaci laser. Laserové pulsy ionizují a odpařují vzorek smíchaný s vysoce absorbující matricí. Tímto dochází ke vzniku iontů, které poté putují do hmotnostního detektoru (Field *et al.*, 2011).

Další technikou je ionizace elektrosprejem (ES). Tato technika ionizace je často využívána u vysokoúčinné kapalinové chromatografie při zapojení s hmotnostním detektorem (LC-ESI-MS). Analyt se v prvním kroku převede z mobilní fáze na ionty v plynném stavu. Toho je docíleno zavedením mobilní fáze kapilárou do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Zde dochází ke sprejování společně s inertním plynem přes trysku s hrotem, na který se vkládá vysoké napětí (v řádech kV). Tímto se tvoří drobné nabitě kapky, ze kterých rychlým odpařením rozpouštědla za zvýšené teploty vznikají ionty. Ionizovaný analyt poté putuje do hmotnostního analyzátoru. Kvůli potřebě ionizace analytu je nutné používat vhodně zvolená těkavá rozpouštědla, aby nedocházelo ke kontaminaci iontového zdroje (Cole, 2010; Field *et al.*, 2011). Při studiu strigolaktonů se běžně používá trojitý kvadrupólový analyzátor, který nabízí vysokou citlivost a selektivitu. Tento analyzátor může pracovat jak v režimu MS, tak i v režimu MS/MS. Při detekci a následné kvantifikaci strigolaktonů se využívá režim MRM (multiple reaction monitoring), kde se sledují charakteristické produktové fragmenty rozpadu iontů zkoumaného analytu, což poskytuje vysokou selektivitu detekce.

2.4.5 Kapalinová chromatografie

Chromatografické metody patří do skupiny separačních metod založených na rozdílném dělení látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně a je jí nejčastěji pevná látka ve formě sorbentu, kterým protéká mobilní fáze. Nejrozšířenější uspořádání kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC = high performance liquid chromatography), kde je mobilní fáze přiváděna čerpadlem do systému za vysokého tlaku. HPLC nabízí mnoho výhod, mezi které patří hlavně rychlost analýzy, vysoké rozlišení separace a především možnost spojení s velkým množstvím různých typů detektorů dle potřeb daného experimentu. Cílem moderních trendů v kapalinové chromatografii je v první řadě získání co nejrychlejší separace při zachování stejného nebo lepšího rozlišení a účinnosti. Nástrojem pro splnění takovéto separace je zmenšování částic stacionární fáze. Z tohoto důvodu je HPLC postupně nahrazována ultraúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC = ultra-high performance liquid chromatography). V UHPLC je pro zvýšení účinnosti separace využíváno kolon se

stacionární fázi obsahující částice o velikosti 2 μm a menší. Zmenšení částic ale přineslo s sebou podstatné zvýšení zpětného tlaku v systému (až do 1000 bar), což klade zvýšené nároky na použitou instrumentaci. UHPLC systém musí obsahovat dostatečně výkonné čerpadlo, rychlý dávkovací systém s velmi přesným dávkováním i malých objemů a co nejmenší zpoždění gradientu. Na straně detektoru se klade důraz na vysokou frekvenci sběru dat. Například při zapojení UHPLC-MS se vyžaduje dostatečná skenovací rychlost z důvodu rychlosti analýzy, kdy se šířky jednotlivých chromatografických píků v základně pohybují v řádu sekund (Nováková a Douša, 2013). Spojení UHPLC s hmotnostním detektorem (LC-MS) představuje účinný nástroj například při studiu strigolaktonů.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Chemikálie

Aceton (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Acetonitril - gradient grade (J. T. Baker, Deventer, Nizozemsko)

Chlorid draselný (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Chlorid kobaltnatý hexahydrát (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Chlorid manganatý tetrahydrát (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Chlornan sodný (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Citrát sodný dihydrát (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Dichlormethan (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Dusičnan amonný (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Dusičnan draselný (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Dusičnan vápenatý tetrahydrát (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Ethylacetát (VWR International, Radnor, Pensylvánie, USA)

Ethylendiamintetraacetát sodný (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Fenylmethansulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (EC 1.1.1.49; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta, Praha, ČR)

Hydroxid amonný (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Hydroxid sodný (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Kyselina boritá (Penta, Praha, ČR)

Kyselina chlorovodíková (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Kyselina citronová (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Kyselina octová (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Methanol (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

n-Hexan (VWR International, Radnor, Pensylvánie, USA)

2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

MES (2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 Molybdenan amonný tetrahydrát (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)
 NADH (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 N,N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 Propan-2-ol (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 Sacharosa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 Síran hořečnatý heptahydrát (Penta, Praha, ČR)
 Síran měďnatý pentahydrát (Lach-ner s.r.o., Neratovice, ČR)
 Síran zinečnatý heptahydrát (Penta, Praha, ČR)
 Síran železnatý heptahydrát (Penta, Praha, ČR)
trans-skořicová kyselina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
trans-4-hydroxy-skořicová kyselina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 Tris (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

3.1.2 Materiál

Filtrační zkumavky 2 ml Micro-Spin 0,45 µm, nylon (Grace, Deerfield, IL, USA)
 Kolona Acquity UPLC BEH C8 130Å, 1,7 µm, 150 x 2,1 mm (Waters, Milford, MA, USA)
 Kolona Acquity UPLC BEH C18 130Å, 1,7 µm, 50 x 2,1 mm (Waters, Milford, MA, USA)
 Křemenná 10 mm kyveta 5 ml s víčkem (Starna Scientific Ltd; Hainault Essen, UK)
 Předkolona Acquity UPLC BEH C8 VanGuard 130Å, 1,7 µm, 5 x 2,1 mm (Waters, Milford, MA, USA)
 Předkolona Acquity UPLC BEH C18 VanGuard 130Å, 1,7 µm, 5 x 2,1 mm (Waters, Milford, MA, USA)
 SPE kolona – Supelclean Coconut Charcoal (2 g/6 ml) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 SPE kolona – Strata-X 33 µm polymerní RP (500 mg/6 ml) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
 SPE kolona – Supelclean LC-Si (500 mg/3ml) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)
 Sterilizační filtr Minisart NML Ophthalsart 17528 (Sartorius, Göttingen, Německo)
 Zkumavky z borosilikátového skla 12 x 75 mm (Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Velká Británie)

3.1.2.1 Biologický materiál

Osivo rajčete bylo získáno z kolekce genetických zdrojů rodu *Lycopersicon* L. vedené na pracovišti Sekce aplikovaného výzkumu zelenin a speciálních plodin, VÚRV, v. v. i. v Olomouci-Holici. Jedná se o původní českou odrůdu tyčkových rajčat (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Moravský granát (ECN: 09H6400073). Osivo čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*) bylo získáno z kolekce alternativních obilnin genové banky VÚRV v. v. i. Praha-Ruzyně. Jedná se o odrůdu – Ruzrok (ECN: 01Z1500041). Osivo hrachu (*Pisum sativum*) a bobu (*Vicia faba*) bylo získáno ze šlechtitelské stanice Selgen a.s. v Chlumci nad Cidlinou. Jedná se o odrůdy: Terno (hrách setý) a Merkur (bob obecný). Osivo kukuřice seté (*Zea mays*) je odrůda CELUX 225 dodávaná firmou Morseva s.r.o. (Olomouc, ČR).

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Sartorius R2000D (Sartorius AG, Goettingen, Německo)

Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer Europe B. V., Breda, Nizozemsko)

Centrifuga Microspin 12 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

Flow box SafeFast Elite (Faster, Cornaredo, Itálie)

FTIR spektrometr NICOLET iN10 včetně nástavce iZ10 pro měření ATR spekter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Hmotnostní detektor Shimadzu LCMS-8050 (SHIMADZU Handels GmbH, Kyoto, Japonsko)

Kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2 UHPLC (SHIMADZU Handels GmbH, Kyoto, Japonsko)

Konfokální Ramanův spektrometr WITec alpha 300 R+ (Witec, Ulm, Německo)

Magnetická míchačka Big Squid STAR (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)

Membránová vakuová pumpa D-Lab (Edwards, Crawley, Velká Británie)

Orbitální inkubátor ES-20 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

pH metr Elmetron CX-505 (Elmetron, Zabrze, Polsko)

Pipety Eppendorf Research/Research Plus v rozsahu 0,5-5000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Předvážky Adventurer Pro AV213C (Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Švýcarsko)

Software ControlPlus (Witec, Ulm, Německo)

Software LabSolutions (SHIMADZU Handels GmbH, Kyoto, Japonsko)

Software OMNIC 8.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Software Statistica 12 (StatSoft, Praha, ČR)

Spektrofotometr Agilent Cary 8454 (Santa Clara, Kalifornie, USA)

Spektrofotometr Shimadzu UV-2450 PC (SHIMADZU Handels GmbH, Kyoto, Japonsko)

Ultrazvuková lázeň Bandelin – Sonorex Digitec (Bandelin electronic, Berlín, Německo)

Vakuová komora (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Vakuový koncentrátor Concentrator plus (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Vakuová rotační odparka Büchi R-100 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švýcarsko)

Vortex ZX classic (VELP Scientifica, Usmate, Itálie)

3.2 Metody

3.2.1 Chromatografické metody (UHPLC-MS/MS)

Pro separaci syntetického analoga GR24 a jeho dvou oxidačních produktů keto a hydroxy GR24 byla použita chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C8 s předkolonou Acquity UPLC BEH C8 VanGuard. Použitými mobilními fázemi byla voda a acetonitril. Průtok mobilní fáze byl po celou dobu analýzy $0,35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Kolonový termostat byl nastaven na teplotu $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro separaci se využilo gradientové eluce (Tab. 2). Detekce probíhala na trojitém kvadrupólovém hmotnostním analyzátoru za těchto podmínek: teplota zdroje $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, desolvatační teplota $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, kolizní plyn argon, desolvatační plyn dusík s průtokem $3 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tab. 2 Podmínky UHPLC analýzy pro separaci GR24, O=GR24 a HO-GR24.

t [min]	Průtok [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]	voda [%]	acetonitril [%]
0	0,35	70	30
4		70	30
8		40	60
10		10	90
11,5		10	90
15		STOP	

3.2.1.1 Optimalizace detekce MS

Optimalizace detekce na hmotnostním kvadrupólovém analyzátoru proběhly za použití krátké chromatografické kolony Acquity UPLC BEH C18 s předkolonou Acquity UPLC BEH C18 VanGuard za isokratických podmínek (25% acetonitril pro GR24; 22% acetonitril pro O=GR24 a HO-GR24) při průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a teplotě kolonového termostatu $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Byl použit standard GR24 a jeho oxidačních produktů o koncentraci $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ rozpuštěný v mobilní fázi.

Tab. 3 Identifikace GR24 a jeho oxidačních produktů – prekurzorové ionty a jejich charakteristické fragmenty.

Analyt	Prekurzorový iont [M+H] ⁺	Q1 [eV]	Kolizní energie [eV]	Q3 [eV]	Charakteristický fragment <i>m/z</i>
GR24	299,00	-21	-18	-19	97,10
			-9	-13	184,95
			-7	-29	281,05
O=GR24	313,00	-11	-18	-18	97,00
			-11	-21	199,15
			-7	-24	217,15
HO-GR24	315,00	-22	-20	-19	97,00
			-22	-14	129,15
			-9	-23	201,10

3.2.1.2 Měření kolizních spekter

Pro měření kolizních spekter studovaných látek byly použity stejné podmínky jako v Kap. 3.2.1. Hmotnostní detektor se nastavil do režimu snímání produktů rozpadu parentní látky (product ion scan) v pozitivním módu ionizace. Rozsah měření byl 50-320 m/z . Prekurzorové ionty a kolizní energie byly nastaveny dle Tab. 4.

Tab. 4 Podmínky pro měření kolizního spektra jednotlivých analytů.

Analyt	Prekurzorový iont $[M+H]^+$	Kolizní energie [eV]
GR24	299,00	-18
O=GR24	313,00	-18
HO-GR24	315,00	-22

3.2.1.3 Sběr chromatografických frakcí

Pro sběr frakcí se použila stejná chromatografická kolona a podmínky jako v Kap. 3.2.1. Jednotlivé frakce obsahující separované analyty HO-GR24 (3,8-4,5 minut), O=GR24 (5,1-5,8 minut) a GR24 (8,0-8,7 minut) se postupně odebíraly za chromatografickou kolonou do vialek. Odebrané frakce se odpařily do sucha za pomoci vakuového koncentrátoru při teplotě 30 °C. Odpařené frakce se rozpustily v 10 μ l acetonitrilu. Následně se přenesly na měřicí krystal u infračervené spektroskopie, rozpouštědlo se nechalo odpařit a spustilo se měření.

3.2.2 UV absorpční spektrum syntetického analoga GR24

Absorpční spektrum v oblasti 220-300 nm bylo stanoveno na dvoupaprskovém spektrofotometru pro 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok standardu GR24 rozpuštěného ve vodě. Měření probíhalo v křemenné 10 mm kyvetě za laboratorní teploty.

3.2.3 Infračervená spektroskopie

IČ spektra látek GR24, O=GR24 a HO-GR24 byla měřena na přístroji NICOLET iN10 s nástavcem iZ10 pro měření ATR spekter. Analýza probíhala na stabilizované a vytemperované aparatuře na teplotu 25 °C. Spektrální rozsah měření byl nastaven na 650-4000 cm^{-1} s rozlišením naměřených dat 4 cm^{-1} . V prvním kroku bylo změřeno pozadí (256 skenů). Ihned poté byl na ATR krystal (ZnSe) nanesen vzorek, definovaným způsobem přitlačen pro maximální kontakt s povrchem ATR krystalu a spuštěno jeho měření (64 skenů).

3.2.4 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektra látek GR24, O=GR24 a HO-GR24 byla měřena na přístroji WITec alpha 300 R+. Analýza probíhala na stabilizované a vytemperované aparatuře na teplotu 25 °C. Na podložní sklíčko z leštěného CaF_2 bylo umístěno několik krystalků analytu. Pomocí mikroskopických objektivů (5x, 10x, 20x, 50x zvětšení) při pozorování ve světlém poli (Bright Field) byl vzorek lokalizován a aparatura přepnuta do měřicího módu. Spektrální rozsah měření byl nastaven na 0-3800 cm^{-1} s rozlišením naměřených dat 4,3 cm^{-1} . Jemným posunem vzdálenosti objektivu od vzorku a postupným zvyšováním intenzity excitačního záření byl optimalizován signál. S ohledem na možnou fotodegradaci vzorku byla použita jen malá intenzita excitačního záření (přibližně 10 % maximální intenzity, 5 mW), což bylo kompenzováno prodloužením akumulačního času (10 sekund). Výsledná spektra jsou průměrem z 10 akumulací.

3.2.5 Stabilita syntetického analoga GR24 ve vodných roztocích

Všechna následující měření stability syntetického analoga GR24 byla provedena spektrofotometricky, a to následujícím způsobem: do uzavíratelné kyvety z křemičitého skla o celkovém objemu 5 ml se vložilo magnetické míchadlo. Poté se přidalo 2995 μl daného roztoku a 5 μl standardu GR24 o koncentraci $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ rozpuštěného v dimethylformamidu (DMF). Do slepého vzorku se místo roztoku standardu GR24 přidalo 5 μl DMF. Měření absorbance při vlnové délce 239 nm probíhalo po dobu 24 hodin v 60 minutových intervalech a teplotě 25 °C.

3.2.5.1 Stabilita v pufrch o pH 7

Pro studium oxidačních reakcí přeměny GR24 cytochromy P450 bylo potřeba nalézt vhodný pufr o pH 7,00, ve kterém by analog GR24 vykazoval co nejvyšší stabilitu a zároveň by byl kompatibilní s použitými rostlinnými cytochromy P450. Byly testovány roztoky pufrů připravených dle Tab. 5.

Tab. 5 Příprava roztoků pufrů (100 ml; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 7,00).

Roztok	Složení
HEPES	2,38 g HEPES + NaOH (úprava pH)
Fosfátový pufr	39 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ + 61 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$
Fosfocitrátový pufr	43,6 ml $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ + 6,5 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kys. citronová
MES	1,952 g MES + NaOH (úprava pH)
Tris-HCl	1,211 g Tris + HCl (úprava pH)

3.2.5.2 Stabilita v pufrch o pH 6

Stabilita GR24 byla pro porovnání stanovena také ve vybraných roztocích pufrů o pH 6,00 připravených dle Tab. 6.

Tab. 6 Příprava roztoků pufrů (100 ml; 0,1 mol·l⁻¹; pH 6,00).

Roztok	Složení
citrátový pufr	0,242 g kyselina citronová + 2,569 g citrát sodný dihydrát
fosfátový pufr	87,7 ml 0,1 mol·l ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ + 12,3 ml 0,1 mol·l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄
mravenčanový pufr	385 µl 98% kys. mravenčí + hydroxid amonný (úprava pH)
octanový pufr	94,8 ml 0,1 mol·l ⁻¹ octan sodný + 5,2 ml 99% kyselina octová

3.2.5.3 Stabilita v přítomnosti fosfátu

Pro měření stability GR24 byl použit fosfátový pufr (pH 6,00) o různé koncentraci (0,1; 0,25; 0,5 a 1 mol·l⁻¹). Zásobní roztok byl připraven smícháním 877 ml 1 mol·l⁻¹ NaH₂PO₄ a 123 ml 1 mol·l⁻¹ Na₂HPO₄. Poté se postupným ředěním připravily roztoky o nižší koncentraci.

3.2.5.4 Stabilita v kultivačním médiu Hoagland

Stabilita GR24 byla testována také v kultivačním médiu Hoagland o pH 6,00 s různým obsahem fosforu, který se připravil dle postupu uvedeného v Kap. 3.2.6.1.2.

3.2.6 Studium biokonverze syntetického analoga GR24

Pro studium oxidačních produktů GR24 v rostlinách se použily dva různé přístupy. Prvním z nich bylo přenesení rostlin pěstovaných v perlitu do hydroponického systému, kde docházelo k postupnému snižování obsahu fosforu v kultivačním médiu (Kap. 3.2.6.1). Ve druhém přístupu se zcela přeskočil proces pěstování rostlin v hydroponii, ale rovnou došlo k odebrání kořenového systému u rostlin pěstovaných v perlitu, ke kterým se přidal analog GR24 (Kap. 3.2.6.2).

3.2.6.1 Hydroponický systém

Vypěstované 3 týdenní rostliny v perlitu byly přeneseny do hydroponického systému. Vyjmutým rostlinám se opatrně opláchly kořeny vodou, čímž se zbavily nečistot. Pro hydroponii se použily nádoby o objemu 350 ml. V každé nádobě bylo umístěno vždy 9 kusů rostlin a 150 ml kultivačního média, které bylo po celou dobu experimentu provzdušňováno. Pro indukci transkripce genů podílejících se na biosyntetické dráze strigolaktonů se využilo postupného snížení obsahu fosforu v kultivačním médiu (Tab. 7). V 13. dnu probíhajícího experimentu se do kultivačního média přidal analog GR24 ($15 \mu\text{l } 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Po 24 hodinách došlo k vyjmutí rostlin ze systému a ukončení experimentu. Následně se odvážíly 3 g odebraných kořenů, které se vložily do 100 ml Erlenmayerovy baňky. Takto připravený biologický materiál se zpracoval dle postupu uvedeného v Kap. 3.2.7.

Tab. 7 Složení hydroponického média v průběhu kultivace.

Den	Kultivační médium
1.	voda
2. – 5.	$\frac{1}{2}$ Hoagland ($250 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfát)
6. – 9.	$\frac{1}{2}$ Hoagland ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfát)
10. – 11.	$\frac{1}{4}$ Hoagland ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfát)
12.	$\frac{1}{4}$ Hoagland (bez fosfátu)
13.	voda + přídavek GR24

Tab. 8 Příprava zásobních roztoků.

Roztok č.	Složka	Koncentrace [mol·l ⁻¹]	Navážka [g·l ⁻¹]
I	Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	1	236,2
II	KNO ₃	1	101,1
III	NH ₄ NO ₃	0,5	40,0
IV	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25	61,6
V	KH ₂ PO ₄	0,25	34,0
VI	KCl	0,25	18,6
VII	H ₃ BO ₃	0,05	3,092
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,004	0,792
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,004	1,15
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,001	0,25
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,0003	0,072
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,00015	0,186

Pozn.: Roztok č. I se sterilizuje přefiltrováním přes antimikrobiální filtr; ostatní roztoky se sterilizují autoklávováním (15 minut při 121 °C). Roztoky č. I a II se skladují při laboratorní teplotě, ostatní roztoky při 4 °C.

3.2.6.1.1 Příprava zásobního roztoku Fe-EDTA

Zásobní roztok Fe-EDTA se připravuje smícháním dvojice roztoků A a B. Pro přípravu roztoku A je potřeba rozpustit 33,3 g Na_2EDTA v 500 ml roztoku vody obsahující hydroxid sodný (100,4 ml $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH) ohřátý na teplotu 30°C . Pro přípravu roztoku B je nutné rozpustit 24,9 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ v 300 ml ohřátého roztoku vody na teplotu 70°C , která obsahuje kyselinu chlorovodíkovou (4 ml $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl). Poté takto připravené roztoky se pomalu smíchají dohromady, doředí se vodou na objem 950 ml a ponechá se míchat po dobu 24 hodin za laboratorní teploty. Po uplynutí této doby je potřeba upravit finální objem na 1000 ml, sterilizovat autoklávováním (15 min při teplotě 121°C) a skladovat při 4°C .

3.2.6.1.2 Příprava kultivačního roztoku ½ Hoagland

Pro přípravu 10 litrů kultivačního roztoku ½ Hoagland se postupně napipetovaly objemy jednotlivých zásobních roztoků (Tab. 9), přidalo se 5 g MES a výsledné pH se upravilo na hodnotu 6,00 pomocí roztoku NaOH (Waters *et al.*, 2012). Pro kultivační média s nižším obsahem fosforu se přidával menší objem roztoku č. V, který je zdrojem fosforu.

Tab. 9 Příprava kultivačních roztoků Hoagland (v ml na 10 litrů média).

Roztok	A	B	C	D
I	20	20	10	10
II	20	20	10	10
III	10	10	5	5
IV	20	20	10	10
V	10	2	1	---
VI	2	2	1	1
VII	5	5	2,5	2,5
Fe-EDTA	4	4	2	2

A – ½ Hoagland ($250 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfát); B – ½ Hoagland ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfát); C – ¼ Hoagland ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfát); D – ¼ Hoagland bez fosfátu

3.2.6.2 Pěstování v perlitu

Pro experiment se použily 3 týdenní rostliny pěstované v perlitu. Rostlinám se odebral kořenový systém, opláchl se vodou a osušil. Odvážily se 3 g kořenů, které se poté vložily do 100 ml Erlenmayerovy baňky. Přidalo se 50 ml vody a analog GR24 ($15 \mu\text{l } 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Erlenmayerova baňka se zakryla parafilmem a roztok se nechal inkubovat ve tmě za stálého míchání po dobu 24 hodin a teplotě 25 °C. Poté se roztok vody opatrně odlil. S biologickým materiálem se pokračovalo dle postupu uvedeného v následující Kap. 3.2.7.

3.2.7 Macerace

Do 100 ml Erlenmayerovy baňky, ve které bylo odvážené množství kořenů, se přidalo 30 ml ethylacetátu (před použitím redestilován na vakuové rotační odparce při teplotě 40 °C a tlaku 240 mbar). Erlenmayerova baňka se zakryla parafilmem a vložila do ultrazvukové lázně na 5 minut. Poté se kořeny nechaly macerovat při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin ve tmě. Po uplynutí 24 hodin se roztok ethylacetátu přefiltroval přes nylonovou síťku a odpařil do sucha na dusíkové odparce. Kultivační médium i vzniklý odparek se poté purifikovaly extrakcí na pevné fázi (Kap. 3.2.8).

3.2.8 Metody purifikace

Pro purifikaci a izolaci analogu GR24 a jeho oxidačních produktů se využila extrakce na pevné fázi (SPE). Pro izolaci exudátů z kultivačního média se použila SPE kolona naplněná aktivním uhlím, kdy se po odebrání rostlinného materiálu médium nanese na kolonu dle protokolu uvedeného v Tab. 10. Kořenový extrakt se purifikoval pomocí SPE kolony obsahující silikagel (Tab. 11; Ueno *et al.*, 2015) nebo SPE kolony obsahující polymerní sorbent (Tab. 12). Pro dokonalé rozpuštění odparku se použila ultrazvuková lázeň. Jednotlivé frakce se jímaly do borosilikátových zkumavek. Po odpaření rozpouštědla na vakuovém koncentrátoru při teplotě 30 °C byly tyto vzorky rozpuštěny v 50 μl mobilní fáze (30% acetonitril), přefiltrovány přes mikro spin (1 minuta; 7500 g) a změřeny pomocí UHPLC-MS/MS.

Tab. 10 SPE kolona s aktivním uhlím (Supelclean Coconut Charcoal; 2 g/6 ml) - jednotlivé kroky a objemy rozpouštědel použité při SPE purifikaci.

Krok – rozpouštědlo	Objem [ml]
Ekvilibrace – voda	10
Nanesení vzorku	50
Promytí – voda	50
Eluce – aceton	10

Tab. 11 SPE kolona obsahující silikagel (Supelclean LC-Si; 500 mg/3 ml) - jednotlivé kroky a objemy rozpouštědel použitých při SPE purifikaci.

Krok – rozpouštědlo	Objem [ml]
Aktivace – dichlormethan:ethylacetát (3:1)	10
Ekvilibrace – hexan	10
Nanesení vzorku - hexan	10
Promytí – dichlormethan:hexan (4:1)	10
Eluce – dichlormethan:ethylacetát (3:1)	10

Tab. 12 SPE kolona s polymerním sorbentem (Strata-X; 500 mg/6 ml) - jednotlivé kroky a objemy rozpouštědel použité při SPE purifikaci.

Krok – rozpouštědlo	Objem [ml]
Aktivace – acetonitril	10
Ekvilibrace – 5% acetonitril	10
Nanesení vzorku - 5% acetonitril	10
Promytí – deionizovaná voda	10
Eluce – acetonitril	10

3.2.9 Monitoring rozkladu kyseliny skořicové

3.2.9.1 Kultivace biologického materiálu

Semena kukuřice byla sterilizována ponořením do roztoku 70% ethanolu po dobu 2 minut a poté se přenesla na 5 minut do 1% roztoku chlornanu sodného. Nakonec se semena propláchla sterilizovanou vodou. Takto ošetřená semena se poté asepticky umístila do Petriho misek na sterilizovaný filtrační papír, který se předem navlhčil sterilizovanou vodou. Uzavřená miska se zaizolovala po obvodu parafilmem a vložila na 24 hodin do tmy za laboratorní teploty. Po uplynutí této doby se miska se semeny zakryla alobalem a přenesla do inkubátoru nastaveného na teplotu 25 °C. Dle potřeby se v průběhu kultivace

asepticky přidávala sterilizovaná voda. Po vyklíčení se odebíral biologický materiál po 5, 7, 9, 11 a 14 dnech.

3.2.9.2 Homogenizace a extrakce

Z odebraného materiálu se odvážilo 2 g klíčků, které se přenesly se do 15 ml falkony obsahující 4 ml vychlazeného extrakčního pufru na teplotu 4 °C. Složení extrakčního pufru je uvedeno v Tab. 13. Pomocí mixéru došlo k homogenizaci. Vzniklá směs se přefiltrovala pomocí mikro spinu na centrifuze (3 minuty, 10 000 g). 250 µl filtrátu se odebralo, připravil se roztok dle Tab. 14 a nakonec se přidalo 0,4 U glukosa-6-fosfát dehydrogenasy. Vzniklá směs se nechala inkubovat za stálého míchání po dobu 20 minut při teplotě 25 °C. Poté se přidalo 30 µl 4 mol·l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové, čímž došlo k okyselení směsi a zastavení enzymatické reakce. Roztok byl převeden do vialky a analyzován pomocí UHPLC-MS/MS (Kap. 3.2.7.3).

Tab. 13 Složení extrakčního fosfátového pufru (0,1 mol·l⁻¹; pH=7,00).

Složka	Koncentrace [mmol·l ⁻¹]
sacharosa	250
EDTA	1
kys. askorbová	40
fenylmethansulfonyl fluorid	1
β-merkaptoethanol	10

Tab. 14 Složení směsi pro monitoring rozkladu kys. skořicové (finální objem 300 µl).

Složka	Koncentrace [mmol·l ⁻¹]
glukosa-6-fosfát	3
NADPH	0,1
kys. <i>trans</i> -skořicová	0,2

3.2.9.3 Monitoring rozkladu pomocí UHPLC-MS/MS

Pro měření obsahu cytochromů P450 v klíčcích kukuřice se využila reakce přeměny kyseliny skořicové na kyselinu hydroxyskořicovou katalyzovanou přítomnými cytochromy P450 (Olry *et al.*, 2007). Pro stanovení obsahu se využilo porovnání s vnějším standardem kyseliny skořicové. Měření probíhalo pomocí UHPLC s detekcí na kvadrupólovém hmotnostním analyzátoru. Pro separaci byla použita chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C8 s předkolonou Acquity UPLC BEH C8 VanGuard. Použitými mobilními fázemi byly 15 mmol·l⁻¹ kys. mravenčí a acetonitril. Průtok mobilní fáze byl po celou dobu analýzy 0,35 ml·min⁻¹. Termostat kolony byl nastaven na teplotu 40 °C. Pro separaci se využilo gradientové eluce (Tab. 15). Podmínky na hmotnostním spektrometru byly tyto: teplota zdroje 250 °C, desolvatační teplota 300 °C, kolizní plyn argon, desolvatační plyn dusík s průtokem 3 l·min⁻¹.

Tab. 15 Podmínky UHPLC analýzy pro separaci skořicové a hydroxyskořicové kyseliny.

t [min]	Průtok [ml.min ⁻¹]	15 mmol·l ⁻¹ kys. mravenčí [%]	acetonitril [%]
0	0,35	95	5
0,8		95	5
1,2		90	10
1,9		90	10
2,4		85	15
3,7		85	15
4		79	21
5,2		79	21
5,7		73	27
9		50	50
11		0	100
12		0	100
12,2		95	5
15		STOP	

Tab. 16 Detekce skořicové a hydroxyskořicové kyseliny – prekurzorové ionty a jejich charakteristické fragmenty.

Analyt	Prekurzorový iont [M-H] ⁻	Q1 [eV]	Kolizní energie	Q3 [eV]	Charakteristický fragment <i>m/z</i>
kys. skořicová	147,00	10	16	23	61,90
			24	28	77,00
			14	18	103,00
kys. hydroxyskořicová	162,80	18	35	18	93,00
			14	23	119,15

3.2.10 Germinační testy *Striga hermonthica*

3.2.10.1 Sterilizace semen

Semena rostliny *Striga hermonthica* byla sterilizována ve vodném roztoku, který obsahoval 2% chlornan sodný a 1% Triton X-100 za intenzivního míchání. Po 5 minutách míchání se semena vyjmula z roztoku filtrací přes skleněnou fritu a důkladně se promyla demineralizovanou vodou. Promytá semena se poté vyjmula a nechala sušit ve flow-boxu po dobu 3 hodin.

3.2.10.2 Kondicionace semen

Pro kondicionaci semen se do Petriho misky vložily 2 vrstvy filtračního papíru o průměru 9 cm, který se navlhčil 3 ml demineralizované vody. Doprostřed se umístily 3 kusy disků filtračního papíru ze skelných vláken o průměru 10 mm. Na každý z nich se poté přidalo zhruba 25 kusů sterilizovaných semen, které se rozprostřely po celé jeho ploše. Nakonec se semena zakryla druhým diskem filtračního papíru ze skelných vláken a opatrně se přidaly další 3 ml demineralizované vody. Petriho miska se uzavřela víčkem, vložila do uzavíratelného sáčku z polyethylenu a nechala se inkubovat ve tmě při teplotě 27 °C po dobu 11 dnů.

3.2.10.3 Příprava stimulačních roztoků

Testovacími látkami byly GR24, HO-GR24 a O=GR24. Rozpuštěním standardu v acetonu byl připraven 1 ml zásobního roztoku o koncentraci $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro každou z testovaných látek. Tento roztok byl poté dále ředěn na finální koncentrace 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} a $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.2.10.4 Ošetření semen stimulačním roztokem

Po kondicionaci byly disky vyjmuty z Petriho misky a vysušeny filtračním papírem. Petriho miska se vyčistila, vložily se do ní dva vyseknuté prstence z filtračního papíru o vnějším průměru 9 cm a s vnitřním průměrem 8 cm, které se poté navlhčily 1 ml demineralizované vody. Vysušené disky se semeny se umístili doprostřed misky a každý se ošetřil 100 μl stimulačního roztoku o dané koncentraci. Jako negativní kontrola se použil 0,1% roztok acetonu. Tento proces se zopakoval pro celou koncentrační řadu připravených stimulačních roztoků. Petriho miska se poté uzavřela víčkem, umístila zpět do uzavíratelného polyethylenového sáčku a nechala inkubovat ve tmě při teplotě 27 °C po dobu 6 dnů.

3.2.10.5 Vyhodnocení germinačního testu

Po ukončení inkubační doby se počítalo procento vyklíčených semen pod světelným mikroskopem pro každý disk a koncentraci. Za vyklíčené se považuje každé semeno, u kterého dojde k protrhnutí osemení kořenem.

3.2.11 Bioinformatická část

Pro porovnání se použil software BLAST-P a databáze NT. Hledání bylo zaměřeno na námi použité rostliny. Jako stropní hodnota se nastavila $1 \cdot 10^{-6}$ (E-value). Poté se na základě získaných dat přiřadila pro výsledné sekvence jejich buněčná lokalizace dle informací z databáze s pomocí softwaru Blast2GO. Na základě hodnoty E-value se sestavila tabulka a vybralo se prvních 20 záznamů s nejnižší hodnotou.

5 Diskuze

Studium oxidačních přeměn syntetického analoga strigolaktonu GR24 vyžaduje dostatečně citlivé metody pro jejich analýzu. Prvním cílem bylo tedy nalézt vhodné podmínky separace a detekce pro všechny tři studované látky pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie spojené s trojitým kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (UHPLC-MS/MS). Detekce pro každý z analytů byla testována v negativním i pozitivním módu ionizace včetně sodných aduktů. Syntetický analog GR24 a jeho dva oxidační produkty O=GR24 a HO-GR24 vykazují nejlepší ionizaci v pozitivním módu pro kvazimolekulární iont $[M+H]^+$. Na rozdíl od publikovaných dat detekce GR24 a hydroxylačního produktu HO-GR24 (Ueno *et al.*, 2015) byly v naší metodě detekce vybrány 3 fragmenty pro každou ze studovaných látek a následně charakterizovány. Pro detekci každého z analytů se používají 3 MRM přechody (jeden kvantifikační, zbylé dva kvalifikační) na rozdíl od 2 MRM přechodů ve výše uvedené publikaci. Separace proběhla v systému reverzních fází na chromatografické koloně Acquity UPLC BEH C8. Optimalizací chromatografických podmínek bylo dosaženo rozlišení separace pro první pár 6,180 (HO-GR24 a O=GR24) a pro druhý pár 15,567 (O=GR24 a GR24). Vysoké chromatografické rozlišení jsme si dali za cíl, abychom v případě potřeby tento chromatografický systém mohli použít i pro preparativní účely. Nakonec došlo k určení lineárního dynamického rozsahu, limitu detekce a kvantifikace. Lineární dynamický rozsah (4 řády), LOD a LOQ ve femtomolární oblasti odpovídají použité instrumentaci (UHPLC systém Nexera X2 a hmotnostní spektrometr LCMS-8050).

Kvůli velmi nízkým koncentracím studovaných látek a přítomnosti komplexní biologické matrice je nutné disponovat vhodnou metodou purifikace. Při vývoji purifikačního protokolu se vycházelo z protokolu purifikace publikovaného v práci Ueno *et. al* (2015). Pro purifikaci byla použita extrakce na pevné fázi (SPE), kde použitým sorbentem byl silikagel. Bohužel, tento purifikační protokol je časově velmi náročný a navíc v práci (Ueno *et. al* 2015) nejsou uvedeny návratnosti metody pro jednotlivé analyty. Naším cílem tedy bylo zjednodušit purifikační protokol a určit návratnosti pro všechny námi studované látky. Tento cíl byl splněn, optimalizací metody jednotlivých kroků se podařilo zkrátit potřebný čas purifikace na zhruba polovinu oproti původní metodě. Jako alternativa k extrakci na silikagelu byl také otestován komerčně dostupný polymerní sorbent Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA, USA), který poskytuje silnou

retenci pro analyt na základě vlastnosti sorbentu vázat analyt pomocí mechanismu vodíkových vazeb, hydrofobních interakcí a interakcemi mezi dvojnými vazbami. Výhodou polymerního sorbentu je vyšší kapacita kolony, jednodušší manipulace se sorbentem a v našem případě i použití menšího počtu vysoce těkavých rozpouštědel. Návratnosti obou sorbentů jsou pro námi studované látky srovnatelné. Pro polymerní sorbent se pohybují návratnosti od 58,3 do 64,9 %. V případě silikagelu se návratnosti pohybují od 64,8 do 70,0 % v závislosti na daném analytu. Jelikož jsou produkty oxidace vylučovány do prostředí, bylo nutné nalézt vhodný sorbent pro purifikaci studovaných látek z kultivačního média. Použila se kolona obsahující aktivní uhlí. Návratnosti purifikace kultivačního média se pohybují od 19,7 do 24,1 %. Tyto hodnoty návratností jsou pravděpodobně ovlivněny přítomnými solemi v roztoku. Návratnosti by mohly být zvýšeny například použitím jiného sorbentu. Zde se jako vhodný kandidát jeví komerčně dostupný polymerní sorbent Amberlite-xat 2 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), který se vyznačuje selektivním zachytáváním rozpustných organických látek z vodných roztoků.

Pro bezchybnou identifikaci látky je nutná kombinace alespoň dvou identifikačních metod. Z tohoto důvodu byla ověřována použitelnost Ramanovy a infračervené spektroskopie. Cílem bylo nalézt charakteristické spektrální markery jednotlivých látek odrážející jejich strukturní odlišnosti. Každá z látek obsahuje ve svém spektru daný spektrální marker (karbonylová skupina u O=GR24, hydroxylová skupina u HO-GR24 a -CH₂- skupina u parentní látky GR24), podle kterého by mělo být snadné tyto látky od sebe odlišit. Bylo zjištěno, že obě použité spektroskopické techniky jsou pro tento účel vhodné. Nicméně měření spekter je u infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací jednodušší a mnohem rychlejší. Kromě nalezení těchto spektrálních markerů se podařilo identifikovat i některé ze základních pásů v IČ spektrech. Nevýhodou Ramanovy spektroskopie je delší časová náročnost při hledání vhodných podmínek měření a vysoká fluorescence pozadí měřených látek, která může snížit citlivost. Další vhodnou technikou by byla nukleární magnetická spektroskopie (NMR), zde je ale potřeba vyššího množství vzorku, což není vždy možné.

Naměřené stability GR24 ve vodných roztocích (například v kultivačních médiích) jsou důležité při studiu oxidačních reakcí. Je potřeba znát přesné množství látky, které se v daném roztoku samovolně rozloží vlivem nestability a které se přemění na dané oxidační produkty. Získanými daty se podařilo rozšířit informace o stabilitě syntetických analog strigolaktonů (Kannan a Zwanenburg, 2014). Data ukazují, že stabilita GR24 klesá

s rostoucí koncentrací fosfátu v roztoku. Zde není bohužel přesný mechanismus působení fosfátu na molekulu GR24, který by tento jev vysvětlil.

Pro studium biosyntetické dráhy strigolaktonů a oxidace GR24 cytochromy P450 se používá jako modelová rostlina čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor*; Motonami *et al.*, 2013; Ueno *et al.*, 2015). Tato diplomová práce byla zaměřena na otestování oxidace i v dalších rostlinách. Pro experiment se využily dva přístupy. V prvním se rostliny pěstovaly v hydroponickém systému za postupného snižování obsahu fosfátu a GR24 byl přidán do vody k intaktním rostlinám. V druhém případě byly rostliny pěstovány v perlitu a GR24 byl přidán do vody k odděleným kořenům rostlin. U rostlin pěstovaných v hydroponickém systému nebyly detekovány námi studované oxidační formy analoga GR24. Pro rostliny pěstované v perlitu se podařilo detekovat oxidační formu O=GR24 a HO-GR24 u dvou z testovaných druhů rostlin. Získaná data potvrzují, že u rostliny čiroku dochází k oxidaci GR24 na jeho hydroxy formu HO-GR24 (Ueno *et al.*, 2015). Bohužel kvůli velmi nízkému obsahu oxidačního produktu ve vzorku nebyla možná jeho kvantifikace. Oxidace GR24 byla také potvrzena u rajčete (*Solanum lycopersicum*), kde byly detekovány obě oxidované formy (O=GR24 a HO-GR24). Následovala jejich kvantifikace a určení poměru vzniku oxidačních produktů, které bylo stanoveno na 1,59:1 (O=GR24:HO-GR24). Zároveň se určil úbytek GR24. Dle získaných výsledků došlo z původního množství 150 pmol GR24 k oxidaci 16,632 pmol (11,088 %) na O=GR24 a HO-GR24. Další 34,762 pmol (23,175 %) GR24 zůstalo nepřeměněno. Zbytek (cca 98,6 pmol) GR24 se pravděpodobně rozložil, byl dále přeměněn nebo se jej nepodařilo macerací rostlinného materiálu všechen převést do roztoku. Dle našich měření dojde ve vodě za daný čas k rozkladu 3,96 % GR24. Na rozdíl od dat publikovaných v Ueno *et al.*, 2015 jsme detekovali také oxidační produkt O=GR24. Na tomto místě je důležité zdůraznit, že námi identifikované oxidační produkty byly nalezeny pouze v kořenech rostlin, jejichž celistvost byla narušena. Biokonverze je tedy pravděpodobně druhově specifická a navíc závislá na celistvosti rostliny. U rostlin jež byly ošetřeny GR24 a v průběhu experimentu zůstaly intaktní, nebyl hydroxy ani keto derivát detekován. Identita oxidačních produktů byla potvrzena pouze UHPLC-MS/MS, tedy shodou retenčních časů a kolizních spekter se standardy. Snaha o identifikaci oxidačních produktů v HPLC frakcích pomocí IČ byla neúspěšná, pravděpodobně kvůli nízké citlivosti spektroskopie. Podle výpočtů by k takové identifikaci musela proběhnout přeměna 900 pmol GR24 prostřednictvím cca 18 g kořenů rajčat. Toto množství odpovídá zhruba 120 rostlinám rajčete o stáří 21 dnů.

Posledním experimentem bylo otestování germinační aktivity studovaných látek s využitím semen parazitické rostliny *Striga hermontica*. Získaná data se porovnála s GR24. Z výsledků můžeme usuzovat, že oxidační proces mění fyzikálně-chemické vlastnosti (polarita) a současně jejich biologickou aktivitu. Oba dva oxidační produkty vykazují nižší germinační aktivitu než parentní látka GR24. Tyto rozdíly jsou patrnější u nižších koncentrací, které se blíží ke koncentracím fyziologickým.

V předložené diplomové práci jsou prezentovány výsledky (i) testování stability GR24 ve vodných roztocích, (ii) oxidace GR24 za účasti cytochromů P450 na oxidační produkty O=GR24 a HO-GR24 a jejich kvantifikace. Cílů diplomové práce bylo dosaženo.

Jelikož strigolaktony jsou nejmladší objevenou skupinou fytohormonů, tak se do budoucna nabízí několik vhodných okruhů pro jejich další studium. Například studium metabolismu nebo interakcí s ostatními fytohormony (Taylor *et al.*, 1996; Al-Babili a Bouwmeester, 2015). V neposlední řadě bude zapotřebí syntetizovat interní standardy strigolaktonů pro jejich přesnou kvantifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.

6 Závěr

Tato diplomová práce je věnována studiu stability a přeměny syntetického analoga strigolaktonu GR24 na jeho oxidační produkty keto- a hydroxy- GR24 za účasti rostlinných cytochromů P450 ve vybraných rostlinách. Stability GR24 byly stanoveny v kultivačním médiu Hoagland a ve vodných roztocích pufrů o různém pH a koncentraci.

Kromě studia stability a oxidace byla pro purifikaci GR24 a jeho dvou oxidačních produktů vyvinuta purifikační metoda SPE (solid phase extraction). Oproti původní publikované metodě je tato metoda jednodušší a až o polovinu rychlejší. Kromě toho se také podařilo vyvinout dostatečně citlivou metodu finální analýzy UHPLC-MS/MS.

Pro další studium a jednoduchou identifikaci GR24 a jeho oxidačních produktů O=GR24 a HO-GR24 mohou být použity spektroskopické metody (Ramanova a infračervená spektroskopie). V této práci byly otestovány obě zmíněné metody. Analog GR24 včetně oxidačních produktů O=GR24 a HO-GR24 obsahuje ve svých spektrech specifické markery, které odrážejí strukturní odlišnosti studovaných molekul. Díky těmto markerům je možná jejich snadná identifikace. Bohužel tyto metody vyžadují výrazně větší množství analytu, než UHPLC-MS/MS.

Dále byl stanoven poměr vzniklých oxidačních produktů oxidace GR24 u rajčete, který je 1,59:1,5 (O=GR24:HO-GR24). Nakonec byla otestována jejich germinační aktivita na semenech parazitické rostliny *Striga hermonthica*. Bylo zjištěno, že oxidační proces mění fyzikálně-chemické vlastnosti a současně biologickou aktivitu. U obou dvou produktů je pozorována nižší germinační aktivita než u GR24.

7 Literatura

- Agabawi K. A., Younis A. E. (1965): Effect of nitrogen application on growth and nitrogen content of *Striga hermonthica*, Benth. and *Sorghum vulgare*, Lur. grown for forage. *Plant and Soil* **23**, 295–304.
- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005): Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827.
- Al-Babili S., Bouwmeester H. J. (2015): Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 161–186.
- Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-Babili S. (2012): The Path from β -Carotene to Carlactone, a Strigolactone-Like Plant Hormone. *Science* **335**, 1348–1351.
- Aly R., Dubey N. K., Yahyaa M., Abu-Nassar J., Ibdah M. (2014): Gene silencing of CCD7 and CCD8 in *Phelipanche aegyptiaca* by tobacco rattle virus system retarded the parasite development on the host. *Plant Signaling & Behavior* **9**, e29376.
- Arite T., Iwata H., Ohshima K., Maekawa M., Nakajima M., Kojima M., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **51**, 1019–1029.
- Atera E. A., Itoh K., Onyango J. C. (2011): Evaluation of ecologies and severity of *Striga* weed on rice in sub-Saharan Africa. *Agriculture and Biology Journal of North America* **2011**, 752–760.
- Babiker A. G. T., Hamdoun A. M. (1982): Factors affecting the activity of GR7 in stimulating germination of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. *Weed Research* **22**, 111–115.
- Babiker A. G. T., Ibrahim N. E., Edwards W. G. (1988): Persistence of GR7 and *Striga* germination stimulant(s) from *Euphorbia aegyptiaca* Boiss. in soils and in solutions. *Weed Research* **28**, 1–6.
- Berner D. K., Kling J. G., Singh B. B. (1995): *Striga* Research and Control: A Perspective from Africa. *Plant Disease* **79**, 652–660.
- Berner D. K., Winslow M. D., Awad A. E., Cardwell K. F., Raj D. M., Kim S. K. (1997): *Striga* research methods. Manual, The Pan-African *Striga* Control Network (PASCON) and the International Institute of Tropical Agriculture. ITTA, Ibadan, Nigérie, 81 stran.
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J.-C., Roux C., Bécard G., Séjalon-Delmas N. (2006): Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *PLoS Biol* **4**, e226.
- Böhm S., Smrčková S. (1995): Strukturní analýza organických sloučenin. VŠCHT Praha, Praha, ČR, 152 stran.
- Bonneau L., Huguet S., Wipf D., Pauly N., Truong H.-N. (2013): Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *The New Phytologist* **199**, 188–202.
- Booker J., Sieberer T., Wright W., Williamson L., Willett B., Stirnberg P., Turnbull C., Srinivasan M., Goddard P., Leyser O. (2005): MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental Cell* **8**, 443–449.
- Britton G. (1995): Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 1551–1558.
- Brooks D. W., Bevinakatti H. S., Powell D. R. (1985): The absolute structure of (+)-strigol. *The Journal of Organic Chemistry* **50**, 3779–3781.
- Bruno M., Hofmann M., Vermathen M., Alder A., Beyer P., Al-Babili S. (2014): On the substrate- and stereospecificity of the plant carotenoid cleavage dioxygenase 7. *FEBS letters* **588**, 1802–1807.
- Bu Q., Lv T., Shen H., Luong P., Wang J., Wang Z., Huang Z., Xiao L., Engineer C., Kim T. H., Schroeder J. I., Huq E. (2014): Regulation of drought tolerance by the F-box protein MAX2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **164**, 424–439.

- Burbidge A., Grieve T. M., Jackson A., Thompson A., McCarty D. R., Taylor I. B. (1999): Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **17**, 427–431.
- Cardoso C., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. J. (2011): Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanch* and *Phelipanche* spp. *Plant Science* **180**, 414–420.
- Castro C., Brighenti A. M. (2007): Compatibility of herbicides with boron fertilizers for weed desiccation and mineral nutrition of sunflower. *Helia* **30**, 1–13.
- Ćavar S., Zwanenburg B., Tarkowski P. (2014): Strigolactones: occurrence, structure, and biological activity in the rhizosphere. *Phytochemistry Reviews* **14**, 691–711.
- Cole R. B. (2010): Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, 2nd edition. ed. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New Jersey, USA, 846 stran.
- Cook C. E., Whichard L. P., Turner B., Wall M. E., Egley G. H. (1966): Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science (New York, N. Y.)* **154**, 1189–1190.
- Crawford S., Shinohara N., Sieberer T., Williamson L., George G., Hepworth J., Müller D., Domagalska M. A., Leyser O. (2010): Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development (Cambridge, England)* **137**, 2905–2913.
- Ding S.-W., Voinnet O. (2007): Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413–426.
- Donaire L., Wang Y., Gonzalez-Ibeas D., Mayer K. F., Aranda M. A., Llave C. (2009): Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* **392**, 203–214.
- Dörr I. (1997): How *Striga* Parasitizes its Host: a TEM and SEM Study. *Annals of Botany* **79**, 463–472.
- Drachev V. P., Thoreson M. D., Nashine V., Khaliullin E. N., Ben-Amotz D., Davisson V. J., Shalae V. M. (2005): Adaptive silver films for surface-enhanced Raman spectroscopy of biomolecules. *Journal of Raman Spectroscopy* **36**, 648–656.
- Ejeta G., Gressel J. (2007): Integrating New Technologies for *Striga* Control: Towards Ending the Witch-hunt. World Scientific, Hackensack, New Jersey, USA, 356 stran.
- Field L. D., Sternhell S., Kalman J. R. (2011): Wiley: Organic Structures from Spectra, 4th Edition. ed. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New Jersey, USA, 468 stran.
- Fiore A., Dall'osto L., Fraser P. D., Bassi R., Giuliano G. (2006): Elucidation of the beta-carotene hydroxylation pathway in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* **580**, 4718–4722.
- Fleischmann M., Hendra P. J., McQuillan A. J. (1974): Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **26**, 163–166.
- Foo E., Bullier E., Goussot M., Foucher F., Rameau C., Beveridge C. A. (2005): The Branching Gene RAMOSUS1 Mediates Interactions among Two Novel Signals and Auxin in Pea. *The Plant Cell* **17**, 464–474.
- Fraser P. D., Bramley P. M. (2004): The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* **43**, 228–265.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun E. A., Pillot J.-P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J.-C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C. A., Rameau C., Rochange S. F. (2008): Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194.
- Grenz J. H., Sauerborn J. (2007): Mechanisms limiting the geographical range of the parasitic weed *Orobanch crenata*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **122**, 275–281.
- Ha C. V., Leyva-González M. A., Osakabe Y., Tran U. T., Nishiyama R., Watanabe Y., Tanaka M., Seki M., Yamaguchi S., Dong N. V., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Herrera-Estrella L., Tran L.-S. P. (2014): Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 851–856.
- Hamiaux C., Drummond R. S. M., Janssen B. J., Ledger S. E., Cooney J. M., Newcomb R. D., Snowden K. C. (2012): DAD2 Is an α/β Hydrolase Likely to Be Involved in the Perception of the Plant Branching Hormone, Strigolactone. *Current Biology* **22**, 2032–2036.
- Hayward A., Stirnberg P., Beveridge C., Leyser O. (2009): Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiology* **151**, 400–412.

- Hearne S. J. (2009): Control-the Striga conundrum. *Pest Management Science* **65**, 603–614.
- Hood M. E., Condon J. M., Timko M. P., Riopel J. L. (1998): Primary Haustorial Development of *Striga asiatica* on Host and Nonhost Species. *Phytopathology* **88**, 70–75.
- Horák M., Papoušek D. (1976): Infračervená spektra a struktura molekul: použití vibrační spektroskopie při určování struktury molekul. Academia Praha, Praha, ČR, 836 stran.
- Howitt C. A., Pogson B. J. (2006): Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment* **29**, 435–445.
- Chang M., Lynn D. G. (1986): The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *Journal of Chemical Ecology* **12**, 561–579.
- Integrated Taxonomic Information System: <http://www.itis.gov> (10.3.2016)
- Jamil M., Charnikhova T., Cardoso C., Jamil T., Ueno K., Verstappen F., Asami T., Bouwmeester H. J. (2011): Quantification of the relationship between strigolactones and *Striga hermonthica* infection in rice under varying levels of nitrogen and phosphorus. *Weed Research* **51**, 373–385.
- Jamil M., Charnikhova T., Houshyani B., van Ast A., Bouwmeester H. J. (2012): Genetic variation in strigolactone production and tillering in rice and its effect on *Striga hermonthica* infection. *Planta* **235**, 473–484.
- Joel D. M., Hershenhorn J., Eizenberg H., Aly R., Ejeta G., Rich P. J., Ransom J. K., Sauerborn J., Rubiales D. (2007): Biology and Management of Weedy Root Parasites, in: Janick, J. (Ed.), Horticultural Reviews. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 450 stran.
- Joel D. M., Steffens J. C., Matthews D. E. (1995): Germination of Weedy Root Parasites. Springer Science & Business media, New York, New York, USA, 519 stran.
- Johnson A. W., Gowada G., Hassanali A., Knox J., Monaco S., Razavi Z., Rosebery G. (1981): The preparation of synthetic analogues of strigol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **0**, 1734–1743.
- Johnson X., Briche T., Dun E. A., Goussot M., Haurogné K., Beveridge C. A., Rameau C. (2006): Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiology* **142**, 1014–1026.
- Joița M. P., Fernandez-Martinez J. M., Sava E., Raranciuc S. (2009): Broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.), the most important parasite in sunflower. *Analele Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare Agricolă Fundulea* **77**, 49–56.
- Kalantidis K., Schumacher H. T., Alexiadis T., Helm J. M. (2008): RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell* **100**, 13–26.
- Kannan C., Zwanenburg B. (2014): A novel concept for the control of parasitic weeds by decomposing germination stimulants prior to action. *Crop Protection* **61**, 11–15.
- Kapulnik Y., Delaux P.-M., Resnick N., Mayzlish-Gati E., Wininger S., Bhattacharya C., Séjalon-Delmas N., Combier J.-P., Bécard G., Belausov E., Beeckman T., Dor E., Hershenhorn J., Koltai H. (2010): Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* **233**, 209–216.
- Kgosi R. L., Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Murdoch A. J. (2012): Strigolactone analogues induce suicidal seed germination of *Striga* spp. in soil. *Weed Research* **52**, 197–203.
- Kohlen W., Charnikhova T., Lammers M., Pollina T., Tóth P., Haider I., Pozo M. J., de Maagd R. A., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. J., López-Ráez J. A. (2012): The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *The New Phytologist* **196**, 535–547.
- Koltai H. (2014): Receptors, repressors, PINs: a playground for strigolactone signaling. *Trends in Plant Science* **19**, 727–733.
- Kong X., Zhang M., Ding Z. (2014): D53: The Missing Link in Strigolactone Signaling. *Molecular Plant* **7**, 761–763.
- Lee T. A. (1998): A Beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New Jersey, USA, 200 stran.
- Lin H., Wang R., Qian Q., Yan M., Meng X., Fu Z., Yan C., Jiang B., Su Z., Li J., Wang Y. (2009): DWARF27, an Iron-Containing Protein Required for the Biosynthesis of Strigolactones, Regulates Rice Tiller Bud Outgrowth. *The Plant Cell* **21**, 1512–1525.

- Liu W., Kohlen W., Lillo A., Op den Camp R., Ivanov S., Hartog M., Limpens E., Jamil M., Smaczniak C., Kaufmann K., Yang W.-C., Hooiveld G. J. E. J., Charnikhova T., Bouwmeester H. J., Bisseling T., Geurts R. (2011): Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *The Plant Cell* **23**, 3853–3865.
- Li X., Wang Y., Jia H., Song W., Zhao B. (2005): An in situ reduction method for preparing novel surface-enhanced Raman scattering substrates. *Journal of Raman Spectroscopy* **36**, 635–639.
- López-Ráez J. A., Kohlen W., Charnikhova T., Mulder P., Undas A. K., Sergeant M. J., Verstappen F., Bugg T. D. H., Thompson A. J., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. (2010): Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *The New Phytologist* **187**, 343–354.
- Luquet D., Zhang B. G., Dingkuhn M., Dexet A., Clément-Vidal A. (2005): Phenotypic Plasticity of Rice Seedlings: Case of Phosphorus Deficiency. *Plant Production Science* **8**, 145–151.
- Lu R., Martin-Hernandez A. M., Peart J. R., Malcuit I., Baulcombe D. C. (2003): Virus-induced gene silencing in plants. *Methods (San Diego, Calif.)* **30**, 296–303.
- Lynch J. P., Brown K. M. (2001): Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* **237**, 225–237.
- Maass D., Arango J., Wüst F., Beyer P., Welsch R. (2009): Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PloS One* **4**, e6373.
- Majer J., Jokl V., Schiller P., Svobodová D., Karlíček R., Kettman V., Pavelčík F., Kotrlý S., Týfa J. (1989): *Analytická chémia – učebnice pro farmaceutické fakulty*. Osveta, Martin, Slovensko, 365 stran.
- Mangnus E. M., Van Vliet L. A., Vandenput D. A. L., Zwanenburg B. (1992): Structural modifications of strigol analogs. Influence of the B and C rings on the bioactivity of the germination stimulant GR24. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1222–1229.
- Mangnus E. M., Zwanenburg B. (1992): Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by strigol and its synthetic analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1066–1070.
- Mansuy D. (1998): The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* **121**, 5–14.
- Mashiguchi K., Sasaki E., Shimada Y., Nagae M., Ueno K., Nakano T., Yoneyama K., Suzuki Y., Asami T. (2009): Feedback-regulation of strigolactone biosynthetic genes and strigolactone-regulated genes in *Arabidopsis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**, 2460–2465.
- Mathur N., Singh J., Bohra S., Bohra A., Vyas A. (2006): Improved productivity of mung bean by application of thiourea under arid conditions. *World Journal of Agricultural Sciences* **2**, 185–187.
- Matusova R., Rani K., Verstappen F. W. A., Franssen M. C. R., Beale M. H., Bouwmeester H. J. (2005): The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway. *Plant Physiology* **139**, 920–934.
- Mayzlish-Gati E., De-Cuyper C., Goormachtig S., Beeckman T., Vuylsteke M., Brewer P. B., Beveridge C. A., Yermiyahu U., Kaplan Y., Enzer Y., Wininger S., Resnick N., Cohen M., Kapulnik Y., Koltai H. (2012): Strigolactones are involved in root response to low phosphate conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **160**, 1329–1341.
- Meunier B., de Visser S. P., Shaik S. (2004): Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews* **104**, 3947–3980.
- Motonami N., Ueno K., Nakashima H., Nomura S., Mizutani M., Takikawa H., Sugimoto Y. (2013): The bioconversion of 5-deoxystrigol to sorgomol by the sorghum, *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Phytochemistry* **93**, 41–48.
- Musselman L. J. (1980): The Biology of *Striga*, *Orobanche*, and other Root-Parasitic Weeds. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 463–489.
- Mwakaboko A. S., Zwanenburg B. (2011a): Strigolactone analogs derived from ketones using a working model for germination stimulants as a blueprint. *Plant & Cell Physiology* **52**, 699–715.

- Mwakaboko A. S., Zwanenburg B. (2011b): Single step synthesis of strigolactone analogues from cyclic keto enols, germination stimulants for seeds of parasitic weeds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19**, 5006–5011.
- Nefkens G. H. L., Thuring J. W. J. F., Beenackers M. F. M., Zwanenburg B. (1997): Synthesis of a Phthaloylglycine-Derived Strigol Analogue and Its Germination Stimulatory Activity toward Seeds of the Parasitic Weeds *Striga hermonthica* and *Orobancha crenata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 2273–2277.
- Neuman H., Galpaz N., Cunningham F. X., Zamir D., Hirschberg J. (2014): The tomato mutation *nxd1* reveals a gene necessary for neoxanthin biosynthesis and demonstrates that violaxanthin is a sufficient precursor for abscisic acid biosynthesis. *The Plant Journal* **78**, 80–93.
- Nickrent D. L., Duff R. J., Colwell A. E., Wolfe A. D., Young N. D., Steiner K. E., dePamphilis C. W. (1998): Molecular Phylogenetic and Evolutionary Studies of Parasitic Plants, in: Soltis, D. E., Soltis, P. S., Doyle, J. J. (Ed.), *Molecular Systematics of Plants II*. Springer Science & Business media, New York, New York, USA, 557 stran.
- Nováková L., Douša M. (2013): Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Europrint, Praha, ČR, 235 stran.
- Olry A., Schneider-Belhaddad F., Heintz D., Werck-Reichhart D. (2007): A medium-throughput screening assay to determine catalytic activities of oxygen-consuming enzymes: a new tool for functional characterization of cytochrome P450 and other oxygenases. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **51**, 331–340.
- Otto A. (2005): The ‘chemical’ (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy* **36**, 497–509.
- Pandey M., Srivastava A. K., D’Souza S. F., Penna S. (2013): Thiourea, a ROS scavenger, regulates source-to-sink relationship to enhance crop yield and oil content in *Brassica juncea* (L.). *PloS One* **8**, e73921.
- Parker C. (2009): Observations on the current status of *Orobancha* and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science* **65**, 453–459.
- Parker C. (2012): Parasitic Weeds: A World Challenge. *Weed Science* **60**, 269–276.
- Péret B., Clément M., Nussaume L., Desnos T. (2011): Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* **16**, 442–450.
- Pernisová M., Kuderová A., Hejátko J. (2011): Cytokinin and auxin interactions in plant development: metabolism, signalling, transport and gene expression. *Current Protein & Peptide Science* **12**, 137–147.
- Poulos T. L., Finzel B. C., Howard A. J. (1987): High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *Journal of Molecular Biology* **195**, 687–700.
- Press M. C., Tuohy J. M., Stewart G. R. (1987): Gas exchange characteristics of the sorghum-striga host-parasite association. *Plant Physiology* **84**, 814–819.
- Rani K., Zwanenburg B., Sugimoto Y., Yoneyama K., Bouwmeester H. J. (2008): Biosynthetic considerations could assist the structure elucidation of host plant produced rhizosphere signalling compounds (strigolactones) for arbuscular mycorrhizal fungi and parasitic plants. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale* **46**, 617–626.
- Reid D. C., Parker C. (1979): Germination requirements of *Striga* spp. Prezentováno v Proceedings, Second International Symposium on Parasitic Weeds, North Carolina, 1979., s. 202–210.
- Rittle J., Green M. T. (2010): Cytochrome P450 Compound I: Capture, Characterization, and C-H Bond Activation Kinetics. *Science* **330**, 933–937.
- Robertson D. (2004): VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 495–519.
- Rodenburg J., Bastiaans L., Schapendonk A. H. C. M., Putten P. E. L. van der, Ast A. van, Dingemanse N. J., Haussmann B. I. G. (2007): CO₂-assimilation and chlorophyll fluorescence as indirect selection criteria for host tolerance against *Striga*. *Euphytica* **160**, 75–87.
- Rubiales D., Fernández-Aparicio M., Wegmann K., Joel D. M. (2009): Revisiting strategies for reducing the seedbank of *Orobancha* and *Phelipanche* spp. *Weed Research* **49**, 23–33.

- Ruiz-Sola M. Á., Rodríguez-Concepción M. (2012): Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **10**, e0158.
- Runyon J. B., Mescher M. C., Moraes C. M. D. (2006): Volatile Chemical Cues Guide Host Location and Host Selection by Parasitic Plants. *Science* **313**, 1964–1967.
- Ruyter-Spira C., Kohlen W., Charnikhova T., van Zeijl A., van Bezouwen L., de Ruijter N., Cardoso C., Lopez-Raez J. A., Matusova R., Bours R., Verstappen F., Bouwmeester H. (2011): Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiology* **155**, 721–734.
- Shinohara N., Taylor C., Leyser O. (2013): Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. *PLoS Biol* **11**, e1001474.
- Schrader B. (2008): Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New Jersey, USA, 807 stran.
- Schwartz S. H., Tan B. C., Gage D. A., Zeevaart J. A., McCarty D. R. (1997): Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science (New York, N.Y.)* **276**, 1872–1874.
- Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemble D. J. (2006): Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th edition. ed. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New Jersey, USA, 512 stran.
- Sligar S. G., Cinti D. L., Gibson G. G., Schenkman J. B. (1979): Spin state control of the hepatic cytochrome P450 redox potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **90**, 925–932.
- Smith E., Dent G. (2004): Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New Jersey, USA, 224 stran.
- Smith S. E., Smith F. A. (2011): Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 227–250.
- Stewart G. R., Press M. C. (2003): The Physiology and Biochemistry of Parasitic Angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* **41**, 127–151.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*, 5th edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 782 stran.
- Takikawa H., Imaishi H., Tanaka A., Jikumaru S., Fujiwara M., Sasaki M. (2010): Synthesis of optically active strigolactones: enzymatic resolution and asymmetric hydroxylation. *Tetrahedron: Asymmetry*, Henri Kagan: An 80th Birthday Celebration Special Issue – Part 1 **21**, 1166–1168.
- Taylor A., Martin J., Seel W. E. (1996): Physiology of the parasitic association between maize and witchweed (*Striga hermonthica*): is ABA involved? *Journal of Experimental Botany* **47**, 1057–1065.
- Ueno K., Ishiwa S., Nakashima H., Mizutani M., Takikawa H., Sugimoto Y. (2015): Regioselective and stereospecific hydroxylation of GR24 by *Sorghum bicolor* and evaluation of germination inducing activities of hydroxylated GR24 stereoisomers toward seeds of *Striga* species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**, 6100–6110.
- Umehara M., Hanada A., Magome H., Takeda-Kamiya N., Yamaguchi S. (2010): Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant & Cell Physiology* **51**, 1118–1126.
- Vo-Dinh T., Yan F., Wabuyele M. B. (2005): Surface-enhanced Raman scattering for medical diagnostics and biological imaging. *Journal of Raman Spectroscopy* **36**, 640–647.
- Voinnet O. (2001): RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in genetics: TIG* **17**, 449–459.
- Walter M. H., Strack D. (2011): Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Natural Product Reports* **28**, 663–692.
- Waterhouse P. M., Fusaro A. F. (2006): Plant science. Viruses face a double defense by plant small RNAs. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 54–55.
- Waters M. T., Brewer P. B., Bussell J. D., Smith S. M., Beveridge C. A. (2012a): The Arabidopsis Ortholog of Rice DWARF27 Acts Upstream of MAX1 in the Control of Plant Development by Strigolactones. *Plant Physiology* **159**, 1073–1085.

- Waters M. T., Bussell J. D., Jost R. (2012): Arabidopsis Hydroponics and Shoot Branching Assay. *Bio-protocol* **2012**.
- Waters M. T., Nelson D. C., Scaffidi A., Flematti G. R., Sun Y. K., Dixon K. W., Smith S. M. (2012b): Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in Arabidopsis. *Development* **139**, 1285–1295.
- Werck-Reichhart D., Feyereisen R. (2000): Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* **1**, 3003.1–3003.9.
- Westwood J. H., Yoder J. I., Timko M. P., dePamphilis C. W. (2010): The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 227–235.
- Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K. (2010): The Strigolactone Story. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 93–117.
- Yoneyama K., Xie X., Kisugi T., Nomura T., Yoneyama K. (2013): Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta* **238**, 885–894.
- Zhou F., Lin Q., Zhu L., Ren Y., Zhou K., Shabek N., Wu F., Mao H., Dong W., Gan L., Ma W., Gao H., Chen J., Yang C., Wang D., Tan J., Zhang X., Guo X., Wang J., Jiang L., Liu X., Chen W., Chu J., Yan C., Ueno K., Ito S., Asami T., Cheng Z., Wang J., Lei C., Zhai H., Wu C., Wang H., Zheng N., Wan J. (2013): D14-SCFD3-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature* **504**, 406–410.
- Zwanenburg B., Mwakaboko A. S., Reizelman A., Anilkumar G., Sethumadhavan D. (2009): Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science* **65**, 478–491.
- Zwanenburg B., Pospíšil T. (2013): Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Molecular Plant* **6**, 38–62.

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

ABA kyselina abscisová
CCD karotenoid štěpící dioxygenasy
Crt-ISO karoten isomerasa
CO karlakton oxidasa
C20 řetězec obsahující 20 atomů uhlíků
C30 řetězec obsahující 30 atomů uhlíků
C40 řetězec obsahující 40 atomů uhlíků
DMBQ 2,6-dimethoxy-*p*-benzochinon
DMF 2,2-dimethylformamid
dsRNA dvouvláknová RNA
ES elektrosprej
ESI ionizace elektrosprejem
FAD flavinadenindinukleotid
FMN flavinmononukleotid
FTIR infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GGPP geranylgeranyl difosfát
GR24 syntetický analog strigolaktonů
HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HP hypotetický protein
HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HYD hydroxylasa
IC chemická ionizace
IČ infračervená spektroskopie
Iden procentuální shoda nalezeného výsledku
LC kapalinová chromatografie
LCY-β lykopen β-cyklasa
LCY-ε lykopen-ε-cyklasa
MES 2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina
MRM monitorování více reakcí (multiple reaction monitoring)
MS hmotnostní spektrometrie
NADH nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma)
NADPH nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováná forma)
NCED 9-*cis*-epoxy-karotenoid dioxygenasa
NMR nukleární magnetická spektroskopie
NSP nodulační signální dráha
NSY neoxantin synthasa
OH-GR24 hydroxyderivát syntetického analoga strigolaktonů GR24 (hydroxy-GR24)
OS orobanchol synthasa
O=GR24 karbonylový derivát syntetického analoga strigolaktonů GR24 (keto-GR24)
PAT polární auxinový transport
PDS fytoen desaturasa
PIN výtokové přenosové proteiny
Pos míra podobnosti záznamu s hledanou sekvencí
PP předpokládaný protein
PSY fytoen synthasa
PTGS post-transkripční umlčení genu
QR NAD(P)H-dependentní chinon reduktasa
SPE extrakce na pevné fázi

ssRNA jednovláknová RNA
TQ počet srovnávaných aminokyselin
UHPLC ultraúčinná kapalinová chromatografie
UP neocharakterizovaný protein
VDE violaxantin de-epoxidasa
VIGS umlčování genů pomocí viru
ZDS ζ-karoten desaturasa
ZEP zeaxantin epoxidasa
Z-ISO ζ-karoten isomerasa