

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Stanovení *N*-glukosidu kyseliny  
indol-3-(yl)-octové (IAA-*N*-Glc) v rostlinách**

Autor:	<b>Daniela Škyvarová</b>
Studijní program:	1501R029 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Aleš Pěňčík, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2024

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Daniela Škyvarová
Název práce:	Stanovení <i>N</i> -glukosidu kyseliny indol-3-(yl)-octové (IAA- <i>N</i> -Glc) v rostlinách
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Aleš Pěňčík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Abstrakt:	<p>Prvním objeveným auxinem byla kyselina indol-3-(yl)-octová (IAA), jejíž hladina je v rostlinném pletivu udržována <i>de novo</i> biosyntézou, transportem, tvorbou neaktivních konjugátů a degradací. Metabolismus rostlinných hormonů auxinů je velmi komplexní. Jedním ze zásadních metabolických procesů kontrolujících hladinu aktivní IAA je glukosylace. IAA může být konjugována s glukózou za vzniku glukosylesteru IAA (IAA-Glc) či za vzniku <i>N</i>-glukosidu IAA (IAA-<i>N</i>-Glc). Druhý zmíněný metabolit byl dosud identifikován pouze v jednoděložných a nahosemenných rostlinách. V této práci byla testována návratnost metod extrakce na pevné fázi a optimalizována a validována analytická metoda pro stanovení IAA-<i>N</i>-Glc pomocí HPLC-MS/MS v <i>Pisum sativum</i> L. a <i>Arabidopsis thaliana</i> L. <i>N</i>-glukosid IAA byl následně detekován a kvantifikován v kotyledonu hrachu, čímž byla potvrzena jeho zásobní funkce během klíčení semene. Exogenní aplikací IAA byla potvrzena katabolická funkce IAA-<i>N</i>-Glc v kořeni hrachu. Získané výsledky poprvé potvrdily výskyt <i>N</i>-glukosidu IAA u dvouděložných rostlin a povedou k hlubšímu porozumění druhově závislého metabolismu IAA.</p>
Klíčová slova:	Fytohormon, auxin, metabolismus, glukosylace, <i>N</i> -glukosid kyseliny indol-3-(yl)-octové, HPLC-MS/MS
Počet stran:	64
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Daniela Škyvarová
Title of thesis:	Determination of glucopyranosyl-1- <i>N</i> -indole-3-acetic acid (IAA- <i>N</i> -Glc) in plants
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Aleš Pěncík, Ph.D.
The year of presentation:	2024
Abstract:	<p>The first auxin discovered was indole-3-(yl)-acetic acid (IAA), the level of which is maintained in the plant tissue by de novo biosynthesis, transport, formation of inactive conjugates and degradation. The metabolism of plant hormones auxins is very complex. One of the essential metabolic processes controlling the level of active IAA is glucosylation. IAA can be conjugated with glucose to form IAA-glucosyl ester (IAA-Glc) or glucopyranosyl-<i>N</i>-indole-3-acetic acid (IAA-<i>N</i>-Glc). The latter metabolite has so far only been quantified in monocots and gymnosperms. In this work, the recovery of solid phase extraction methods was tested and an analytical method for the determination of IAA-<i>N</i>-Glc by HPLC-MS/MS in <i>Pisum sativum</i> L. and <i>Arabidopsis thaliana</i> L. was optimized and validated. The IAA-<i>N</i>-Glc was quantified in cotyledon of pea, confirming its storage function during seed germination. The catabolic function of IAA-<i>N</i>-Glc in the pea root was confirmed by exogenous application of IAA. The results obtained for the first time confirmed the occurrence of IAA-<i>N</i>-Glc in dicotyledonous plants and will lead to a deeper understanding of the species-dependent metabolism of IAA.</p>
Keywords:	Phytohormone, auxin, metabolism, glucosylation, glucopyranosyl-1- <i>N</i> -indole-3-acetic acid, HPLC-MS/MS
Number of pages:	64
Number of appendices:	1
Language:	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Aleše Pěňčíka, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne 14. května 2024

*Daniela Škyvarová*



Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Aleši Pěnčíkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady ke zpracování této bakalářské práce. Děkuji také Mgr. Pavlu Hladíkovi za poskytnutí rostlinného materiálu a pomoc s kultivací rostlin.

Tato práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA\_PrF\_2024\_013).

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	12
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	13
2.1 Rostlinné hormony .....	13
2.2 Auxiny .....	13
2.3 Biosyntéza IAA .....	14
2.3.1 Trp-závislé dráhy .....	14
2.3.2 Trp-nezávislé dráhy .....	15
2.4 Transport a lokalizace IAA .....	15
2.5 Signalizace auxinů .....	16
2.6 Metabolismus auxinů .....	17
2.6.1 Amidové konjugáty auxinů .....	18
2.6.2 Oxidativní katabolismus IAA .....	18
2.6.3 Dráha GH3-DAO-ILR1 .....	19
2.6.4 Methylace .....	19
2.7 Glukosylace auxinů .....	21
2.7.1 Estery IAA .....	21
2.7.2 <i>N</i> -glukosidy IAA .....	21
2.7.3 Glukosyltransferázy .....	23
2.8 Glukosylace ostatních fytohormonů .....	26
2.9 Vliv stresu na metabolismus auxinů .....	27
2.10 Modelové rostliny .....	27
2.10.1 Huseníček rolní .....	27
2.10.2 Hrách setý .....	28
2.11 Analýza fytohormonů .....	28
2.11.1 Extrakce a purifikace .....	28
2.11.2 Identifikace a kvantifikace pomocí LC-MS/MS .....	30
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	32
3.1 Biologický materiál .....	32
3.2 Přístroje .....	32
3.3 Pomůcky .....	33
3.4 Chemikálie .....	33
3.5 Příprava roztoků .....	34
3.6 Metody a pracovní postupy .....	36
3.6.1 Příprava biologického materiálu .....	36
3.6.2 Extrakce a purifikace .....	37
3.6.2.1 Extrakce a purifikace metodou $\mu$ DSPE .....	37

3.6.2.2 Extrakce a purifikace metodou SPE v kolonkách.....	38
3.6.2.3 Extrakce a purifikace metodou in-tip $\mu$ SPE .....	39
3.6.3 Nastavení HPLC-MS/MS metody .....	39
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	41
4.1 Optimalizace MS/MS metody pro IAA- <i>N</i> -Glc.....	41
4.2 Test návratnosti IAA- <i>N</i> -Glc metodami extrakce na pevné fázi.....	41
4.3 Validace analytické metody pro stanovení IAA- <i>N</i> -Glc.....	42
4.4 Kvantitativní stanovení IAA- <i>N</i> -Glc v hrachu setém a huseníčku rolním.....	44
4.5 Tvorba IAA- <i>N</i> -Glc po exogenní aplikaci IAA .....	44
<b>5 DISKUZE</b> .....	48
<b>6 ZÁVĚR</b> .....	51
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	52
<b>PŘÍLOHA</b> .....	64

## SEZNAM ZKRATEK

- μDSPE – mikro-disperzní extrakce na pevné fázi
- μSPE – mikroextrakce na pevné fázi
- 2,4-D – kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
- 4-Cl-IAA – kyselina 4-chloro-indol-3-(yl)-octová
- ABA – kyselina abscisová
- ABCBs – *ATP-binding cassette subfamily B* transportéry
- ABLs – *ABP-like proteins*
- ABPs – *auxin binding proteins*
- AChE – acetylcholinesteráza
- AK – aminokyselina
- ARF – *auxin response factor*
- AUX1/LAX – přenašeč *auxin-resistant 1/like AUX1*
- AuxREs – *auxin response elements*
- C18 – oktadecyl (uhlíkový řetězec vázaný na sorbentu pro SPE)
- C8 – oktyl (uhlíkový řetězec vázaný na sorbentu pro SPE)
- CAMK – *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*
- CK – cytokinin
- CYP – enzymy monooxygenázové rodiny cytochromu P450
- DAO – *dioxygenase for auxin oxidation*
- DEDTCA – diethyldithiokarbamová kyselina
- DiOxIAA – 3-hydroxy-2-oxindol-3-(yl)-octová kyselina
- DiOxIAA-Asp – 3-hydroxy-2-oxindol-3-(yl)-acetylaspartát
- DiOxIAA-Glu – 3-hydroxy-2-oxindol-3-(yl)-acetylglutamát
- ESI – ionizace elektrosprejem
- FW – *fresh weight*, čerstvá hmota
- GH3 – Gretchen Hagen 3, IAA-acyl-acid-amidosyntetáza
- HLB – hydrofilně lipofilní sorbent
- HPLC – vysoce účinná kapalinová chromatografie
- IAA – kyselina indol-3-(yl)-octová
- IAA-Asp – indol-3-(yl)-acetylaspartát

IAA-Asp-*N*-Glc – indol-3-(yl)-acetylaspartát-*N*-β-D-glukóza  
IAA-Glc – indol-3-(yl)-acetyl-β-D-glukóza  
IAA-Glu – indol-3-(yl)-acetylglutamát  
IAAld – indol-3-(yl)-acetaldehyd  
IAA-Leu – indol-3-(yl)-acetylleucin  
IAA-*N*-Glc – *N*-β-D-glukopyranosyl kyseliny indol-3-(yl)-octové  
IAA-Phe – indol-3-(yl)-acetylfenylalanin  
IAM – indol-3-(yl)-acetamid  
IAMT1 – methyltransferáza 1  
IAN – indol-3-(yl)-acetonitril  
IAOx – indol-3-(yl)-acetaldoxim  
IAR3 – aminohydroláza *IAA-alanin resistant 3*  
IBA – kyselina indol-3-(yl)-máselná  
IGP – indol-3-(yl)-glycerofosfát  
ILL – aminohydroláza *ilr-like protein*  
ILR1 – aminohydroláza *IAA-leucine resistant 1*  
INS – indolsyntetáza  
IPyA – kyselina indol-3-(yl)-pyrohroznová  
JA – kyselina jasmonová  
LC – kapalinová chromatografie  
LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií  
LC-MS/MS – kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií  
MALDI – ionizace desorpce laserem v přítomnosti matrice  
MAPKs – *mitogen-activated protein kinases*  
MCX – *polymer mixed-mode sorbent*  
MeIAA – methylester kyseliny indol-3-(yl)-octové  
MES17 – methyltransferáza 17  
MeSA – methylester kyseliny salicylové  
MRM – *multiple reaction monitoring*  
MS – hmotnostní spektrometrie  
MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

NAA – kyselina  $\alpha$ -naftyloctová  
NGT – *N*-glukosyltransferáza  
NH<sub>2</sub> – aminopropyl (sorbent)  
NIT – nitriláza  
Orbitrap – hmotnostní analyzátor iontové pasti  
OST – oligosacharyltransferáza  
oxIAA – 2-oxoindol-3-(yl)-octová kyselina  
oxIAA-Asp – 2-oxoindol-3-(yl)-acetylaspartát  
oxIAA-Glc – 2-oxoindol-3-(yl)-acetyl- $\beta$ -D-glukóza  
PAA – kyselina fenyloctová  
PID – PINOID AGC kináza  
PILs – *PIN-like* proteiny  
PIN – *pin-formed* přenašeče  
PRS – propylsulfonová kyselina (sorbent)  
QqQ – trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr  
Q-TOF – kvadrupólový spektrometr doby letu  
ROPs – *RHO-like GTPases from plants*  
SA – kyselina salicylová  
SA-Glc – glukosid kyseliny salicylové  
SCF<sup>TIR1</sup> – ubikvitinová ligáza E3 s receptorem TIR1  
SCX – benzensulfonová kyselina (sorbent)  
SIM – *single ion monitoring*  
SPE – *solid phase extraction*, extrakce na pevné fázi  
SRM – *selected reaction monitoring*  
TA – kyselina tuberonová  
TAA1 – *Tryptophan-aminotransferase of Arabidopsis 1*  
TARs – *TAA1-related proteins*  
TIR1 – *transport inhibitor response 1*  
TIR1/AFBs-AUX/IAA-ARFs – signální dráha *transport inhibitor response 1/auxin signaling F-box proteins-auxin/IAA-auxin response factors*  
TOF – průletový analyzátor

TGW6 – *thousand-grain weight 6*

UDP – uridindifosfát

UDP-Glc, UDPG – uridindifosfátglukóza

UGT – uridindifosfátglukosyltransferáza

UHPLC – ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie

UVB – ultrafialové záření typu B

WAT1 – vakuolární přenašeč *walls are thin 1*

YUCCA – rodina flavin-monooxygenáz

TMKs – transmembránové kinázy

# 1 ÚVOD

Auxiny patří mezi základní rostlinné hormony. Mají vliv na široké spektrum vývojových procesů, od embryogeneze, elongaci kořenů, po růst výhonku za světlem. Nejznámějším přírodním auxinem je kyselina indol-3-(yl)-octová (IAA), jejíž homeostáza je v rostlině udržována *de novo* biosyntézou, transportem, tvorbou neaktivních metabolitů a degradací.

Glukosylace je jedním ze zásadních metabolických procesů kontrolujících hladinu aktivního fytohormonu v rostlinném pletivu. Ke glukosylaci může docházet v případě IAA na karboxylové skupině, nebo na atomu dusíku. Glukosylester IAA (IAA-Glc) je již dlouho známou zásobní formou IAA semenáčků v rané fázi embryogeneze. V případě *N*-glukosidu IAA (IAA-*N*-Glc) se předpokládá podobná funkce.

Ačkoliv IAA-*N*-Glc byl již detekován v semenech několika druhů rostlin, dosud nebyl kvantifikován. Cílem této práce je zvolení vhodné metody extrakce a purifikace IAA-*N*-Glc, optimalizace a validace analytické metody pro stanovení této látky pomocí hmotnostní spektrometrie a následné prokázání přítomnosti a kvantifikace IAA-*N*-Glc v různých druzích rostlin. Jedním z cílů práce je taktéž vypracování literární rešerše na téma metabolismu auxinů.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

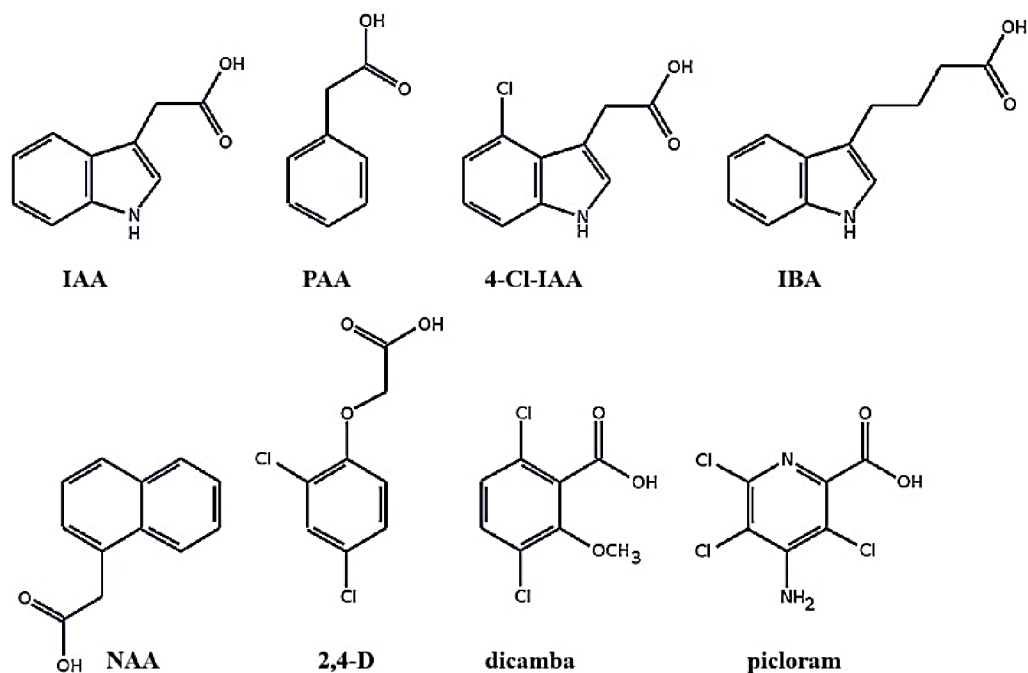
### 2.1 Rostlinné hormony

Biologické procesy v rostlinách jsou stejně jako u živočichů řízeny hormony. Jedná se o fytohormony neboli rostlinné signální molekuly ovlivňující ve velmi nízkých koncentracích růst a vývoj rostlin, organogenezi, reprodukci a odolnost rostlin vůči stresu. Biosyntéza fytohormonů se v jednotlivých pletivech liší a často bývá specificky lokalizována. Pro optimální působení hormonu v rostlině je klíčové udržování jeho homeostázy, tedy regulace hladiny aktivního hormonu. Jelikož se jedná o signální molekuly, je pro jejich účinek nutná přítomnost receptoru či sekundárního přenašeče. Ten umožňuje přenos signálu či aktivaci regulační dráhy, což může zahrnovat spuštění či zastavení transkripce odpovědných genů.

Mezi základní rostlinné hormony řadíme auxiny, brassinosteroidy, cytokininy, ethylen, gibbereliny, kyselinu abscisovou, kyselinu jasmonovou a strigolaktony. Jedná se o látky přirozeně se v rostlinách vyskytující. Jejich obsah v rostlinách je druhově závislý. Taktéž byly syntetizovány jejich analogy se stejnými fyziologickými účinky a vyšší stabilitou. Právě pro vyšší stabilitu a schopnost odolávat degradačním procesům rostlinného metabolismu jsou hojně využívány v zemědělství jako herbicidní látky.

### 2.2 Auxiny

Většina auxinů jsou kyseliny s indolovým kruhem a vedlejším řetězcem obsahujícím karboxylovou skupinu. Výjimkou je například kyselina fenyloctová (PAA), která je karboxylovou kyselinou obsahující fenylovou funkční skupinu (Obr. 1). Mezi přirozeně se vyskytující auxiny řadíme především kyselinu indol-3-(yl)-octovou (IAA), první objevený auxin z 30. let 20. století (Went a Thimann, 1937), dále kyselinu 4-chlor-indol-3-(yl)-octovou (4-Cl-IAA), kyselinu indol-3-(yl)-máselnou (IBA) a PAA (Obr. 1). Syntetické auxiny jsou strukturálními analogy těch přírodních. Patří zde kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA), kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), kyselina 3,6-dichloro-2-methoxybenzoová (dicamba) a kyselina 4-amino-3,5,6-trichloropikolinová (picloram).



Obr. 1: Vzorče přírodních (IAA, PAA, 4-Cl-IAA, IBA) a syntetických (NAA, 2,4-D, dicamba, picloram) auxinů.

Auxiny ovlivňují apikální dominanci, embryogenezi, inhibici růstu apikálního kořene, iniciaci kořenového meristému, růstové pohyby (tropismy), prodlužování buněk koleoptilí a internodií, tvorbu adventivních a postranních kořenů a dělení buněk kalusu za společného působení cytokininu (Pavlová a Fischer, 2011, Olatunji et al., 2017). Působení auxinu na rostlinné buňky je silně ovlivněno jeho koncentrací a lokalizací (Leyser, 2006). Homeostáza auxinů je v rostlinách formována jejich *de novo* biosyntézou, mezibuněčným i vnitrobuněčným transportem a metabolickou deaktivací aktivní molekuly, případně jejím uvolňováním z neaktivních konjugátů (Ludwig-Müller, 2011). Jednou z možných metabolických drah velmi významně se podílející na homeostáze auxinu je glukosylace (Tognetti et al., 2010, Jin et al., 2013).

## 2.3 Biosyntéza IAA

### 2.3.1 Trp-závislé dráhy

IAA je majoritně syntetizována drahou závislou na tryptofanu v apikálním meristému stonku, meristému kořene a rychle se dělících buňkách mladých listů. Její prekurzor L-tryptofan je syntetizován Shikimatovou drahou v chloroplastech (Maeda a Dudareva, 2012). U různých

rostlinných čeledi se mohou meziprodukty dráhy lišit. Ve většině rostlin je tryptofan nejprve deaminován na kyselinu indol-3-(yl)-pyrohroznovou (IPyA) za katalýzy TRYPTOFAN-AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1) či TAA1-RELATED PROTEINS (TARs) (Kasahara, 2016). Finálním krokem je oxidace na IAA za katalýzy monooxygenáz z rodiny YUCCA (Mashiguchi et al., 2011, Stepanova et al., 2011, Won et al., 2011). U rýže seté bylo zjištěno, že auxin negativně reguluje své biosyntetické geny *OsYUCCA1*, *OsYUCCA2*, *OsYUCCA8* a *OsYUCCA11* (Yamamoto et al., 2007).

Další možnou Trp-závislou dráhou biosyntézy IAA je přeměna tryptofanu na indol-3-(yl)-acetaldoxim (IAOx) za katalýzy enzymů z cytochrom P450 monooxygenázové rodiny (CYP) (Zhao et al., 2002). Následuje přeměna na indol-3-(yl)-acetonitril (IAN), jejíž enzym není znám, a poté přeměna na výslednou IAA za katalýzy nitrilázy (NIT) u čeledi *Brassicaceae* (Sugawara et al., 2009, Korasick et al., 2013).

Některé patogenní bakterie napadající rostliny také dokáží syntetizovat IAA. Bakterie *Pseudomonas savastanoi* a *Agrobacterium tumefaciens* syntetizují IAA z tryptofanu přeměnou přes indol-3-(yl)-acetamid (IAM) (Patten et al., 2012, Aragón et al., 2014).

### 2.3.2 Trp-nezávislé dráhy

Mutanti pozbývající syntézu tryptofanu jsou schopni syntézy IAA, což dokazuje přítomnost alternativní biosyntetické dráhy nezávislé na tryptofanu (Wright et al., 1991, Normanly et al., 1993). Tato alternativní dráha zahrnuje přeměnu indol-3-(yl)-glycerolfosfátu (IGP) na IPyA. Další variantou je přeměna IGP na IAN a poté na IAA. Dráha nezávislá na tryptofanu může také vycházet z indolu, který může být následně přeměněn na IAN nebo na IPyA (Pavlová a Fischer, 2011). Další kroky biosyntézy IAA z těchto meziproduktů jsou totožné s kroky biosyntézy závislé na tryptofanu uvedenými výše.

## 2.4 Transport a lokalizace IAA

Primární transport auxinu na buněčné úrovni je závislý na chemických vlastnostech a aktivitě IAA, potažmo její disociované formy  $IAA^-$  (Chua et al., 1998, Petrášek et al., 2006). Na základě její formy může dojít k vstupu (influxu) do buňky či výstupu (effluxu) z buňky ven. Disociovaná forma  $IAA^-$  převažuje v cytoplazmě buňky, kde se pH blíží neutrálnímu, a IAA jako slabá kyselina odštěpuje vodíkový proton. Apoplast je kyselější, pH se pohybuje mezi 4,5 a 5,5, a IAA se zde z části vyskytuje v nedisociované formě (Barbez et al., 2017).

Plazmatická membrána je průchozí pouze pro IAA, pro disociovanou IAA<sup>-</sup> je až 1 000x méně propustná (Raven, 1975). Disociovaná IAA<sup>-</sup> je tedy po odštěpení H<sup>+</sup> držena v buňce. Uplatněním koncentračního spádu influx nedisociované IAA pokračuje do vyrovnání koncentrací v apoplastu a buňce (Rubery a Shelldrake, 1974). K influxu auxinu do buňky je nutný protonový gradient přes plazmatickou membránu. Influx probíhá buď difúzí spojenou s vstupem jednoho protonu, nebo kotransportem s dvěma protony pomocí přenašeče AUXIN-RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) lokalizovaném v membráně polárně (Friml, 2010).

Efflux auxinu z buňky do apoplastu je zprostředkován pomocí PIN-FORMED (PIN) přenašečů a ATP-BINDING CASSETTE subfamily B transportérů (ABCBs) (Petrášek a Friml, 2009). Lokalizace PINů na buněčné membráně vykazuje výraznou polarizaci, zatímco ABCBs mají apolární lokalizaci. Lokalizace PINů je ovlivněna fosforylačně kinázami (Ca<sup>2+</sup>/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN kináza – CAMK, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN kinázy – MAPKs, PINOID AGC kináza - PID) (shrnutí v Bassukas et al., 2022). Transportéry ABCBs se mohou také podílet na importu IAA do buňky (Kamimoto et al., 2012, Kubeš et al., 2012). Transportéry PIN přenášejí disociovanou IAA<sup>-</sup>. Je bráno v úvahu, že PINy mohou sloužit zároveň jako kotransportéry jiných iontů a pro IAA<sup>-</sup> slouží pouze jako facilitátory difúze. A to na základě podobnosti se žlučovým acid-Na<sup>+</sup> symportérem, který využívá na přenos kyseliny energii z Na<sup>+</sup> gradientu (Ung et al., 2022).

Na membráně endoplazmatického retikula se nachází transportéry PIN a PIN-like proteins (PILs) umožňující transport IAA a ovlivňující její signalizaci (Mravec et al., 2009, Feraru et al., 2022). Endoplazmatické retikulum zprostředkovává influx IAA do jádra (Middleton et al., 2018). V endoplazmatickém retikulu je zvýšený podíl aktivní IAA vůči neaktivním formám hormonu, na rozdíl od zbytku buňky (Včelařová et al., 2021). K přenosu IAA ven z vakuoly jsou využívány vakuolární přenašeče WALLS ARE THIN 1 (WAT1) (Ranocha et al., 2013).

## 2.5 Signalizace auxinů

Auxin, fytohormon s širokým spektrem působení, vykazuje své účinky prostřednictvím vazby na receptor, který zprostředkovává přenos signálu. Vzhledem k tomu, že účinky auxinu se liší v závislosti na konkrétním rostlinném orgánu, je pro správný účinek zásadní jeho specificky lokalizovaná přítomnost. V kořenech dochází působením auxinu k inhibici růstu, zatímco v nadzemní části auxin podporuje prodloužení buněk.

IAA je zpětnovazebný hormon, který reaguje na svou vlastní hladinu transkripce auxin-responsive genů. Touto interakcí spouští v případě vysoké hladiny svou deaktivaci. Katabolity auxinů mají taktéž zpětnovazebnou odpověď, kdy mohou aktivovat či utlumovat jiné dráhy degradace nebo aktivace metabolitů auxinů. Důležitou signální drahou je TIR1/AFBs-AUX/IAA-ARFs (*transport inhibitor response I/auxin signaling F-box proteins-auxin/IAA-auxin response factors*), která vede k změně transkripce těchto genů. IAA může aktivovat svůj transkripční faktor RHO-LIKE GTPases FROM PLANTS (ROPs) zodpovědný za přepis genů spojených s vývojem a morfogenezi rostliny (Enders et al., 2017).

Časné geny regulované auxinem s velmi rychlou odpovědí obsahují v promotoru *auxin response elements* (AuxREs), na které jsou vázány *trans*-faktory ARFs. Nejčastěji se vážou jako dimery. ARFs jsou v inaktivovaném stavu vázány na regulační proteiny neboli transkripční represory AUX/IAA. Jejich uvolnění k vazbě s AuxRE je umožněno degradací AUX/IAA v proteasomu 26S. Degradace je započata díky vazbě IAA na TIR1 receptor ubikvitinové ligázy E3 (SCF<sup>TIR1</sup>), která po navázání IAA uvolní ubikvitin označující AUX/IAA pro degradaci (Pavlová a Fischer 2011). Exprese auxinových genů může být taktéž ovlivněna stresem (Jain a Khurana, 2009).

K extracelulární percepci auxinu v apoplastu jsou využívány receptory *auxin binding proteins* (ABPs; ABL1 a ABL2), které zprostředkovávají fosforylaci substrátu uvnitř buňky díky interakci s transmembránovými kinázami (TMKs) (Yu et al., 2023).

Byl navržen model regulace rostlinného růstu a vývoje koordinací IAA a PAA (Mashiguchi et al., 2019). PAA i IAA reguluje expresi několika *auxin-responsive* genů přes TIR1/AFBs-AUX/IAA dráhu (Sugawara et al., 2015, Shimizu-Mitao a Kakimoto, 2014).

## 2.6 Metabolismus auxinů

Hladina volné IAA je v rostlině regulována, kromě *de novo* biosyntézy, prostřednictvím nevratného oxidativního katabolismu a reverzibilní konjugace s cukry nebo aminokyselinami. Hladiny jednotlivých metabolitů se u různých rostlinných druhů velmi liší. Různé rostlinné druhy upřednostňují jinou strategii k udržení homeostázy IAA. U jednoděložných rostlin mají majoritní zastoupení estery IAA (Ludwig-Müller, 2011). Amidy IAA jsou hlavními metabolity u většiny dvouděložných rostlin (Tam et al., 2000, Bajguz a Piotrowska, 2009, Hladík et al, 2023).

### 2.6.1 Amidové konjugáty auxinů

Syntéza amidů IAA s různými aminokyselinami je katalyzována enzymy z rodiny GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) (Staswick et al., 2005). Jejich zásobní funkce byla potvrzena aplikací amidokonjugátů rostlině, která měla za následek fenotyp způsobený IAA (LeClere et al., 2002). Amidová vazba je štěpena amidohydrolázami IAA-LEUCIN RESISTANT 1 (ILR1), ILR1-LIKE PROTEINs (ILLs) a IAA-ALANIN RESISTANT (IAR3). Poslední jmenovaná hydroláza je využívána během osmotického stresu u huseníčku rolního, kdy svou hydrolytickou aktivitou umožňuje morfologické změny kořene (Kinoshita et al., 2012). GH3 je aktivní i vůči PAA (Staswick et al., 2005, Sugawara et al., 2015). Aktivita GH3 moduluje poměr IAA a PAA v huseníčku rolním (Aoi et al., 2020b). Rodina GH3 amidosyntetáz konjuguje i další fytohormony, jako je kyselina jasmonová (Staswick et al., 2005).

U huseníčku rolního tvoří amidové konjugáty až 90 % z celkového IAA poolu (Tam et al., 2000). Z toho IAA-Asp a IAA-Glu tvoří pouze 2 %, zbytek tvoří IAA vázaná amidovou vazbou na peptidy či proteiny. V rýži a smrku byly nejčastěji zastoupenými amidovými konjugáty IAA-Asp a IAA-Glu (Östin et al., 1998, Matsuda et al., 2005, Brunoni et al., 2020). V huseníčku rolním byly zaznamenány konjugáty IAA také s dalšími aminokyselinami: alaninem, leucinem a tryptofanem (Kowalczyk a Sandberg, 2001, Staswick, 2009). Konjugáty IAA s fenylalaninem, glycinem a valinem byly objeveny v čemeřici černé (Pěňčík et al., 2009). K tvorbě IAA-AK konjugátů, zejména IAA-Asp, dochází v případě nutnosti rychlé inaktivace IAA po exogenní aplikaci (Östin et al., 1998). IAA-peptidy jsou majoritním amidovým konjugátem u fazole (Bialek a Cohen, 1986).

### 2.6.2 Oxidativní katabolismus IAA

Další formou deaktivace IAA je oxidace za nutné přítomnosti molekulárního kyslíku. Oxidace je katalyzována enzymem DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION (DAO) (Zhao et al., 2013). Oxidací IAA v poloze C2 vzniká ireverzibilní metabolit oxIAA (Östin et al., 1998, Pěňčík et al., 2013), jehož aktivita je nutná pro tvorbu fertilního pylu, následný rozpad prašníku a iniciaci klíčení semene u rýže (Zhao et al., 2013). Oxidovaná IAA může být dále konjugovaná s glukózou za katalýzy glukosyltransferázy UGT74D1 (Tanaka et al., 2014). Značné zastoupení oxIAA-Glc mezi metabolity IAA bylo prokázáno v semenáčcích huseníčku (Kai et al., 2007a, Hladík et al. 2023). Velmi často bývají oxidovány amidové konjugáty IAA (Kai et al., 2007a), ke kterým má DAO vyšší substrátovou afinitu (Hayashi et al., 2021, Müller et al., 2021). Z amidových konjugátů mohou být oxidovány IAA-Asp, IAA-Glu, IAA-Leu a IAA-Phe (Hladík et al., 2023). Vzniklý produkt může být hydrolyzován pomocí ILR1/ILL na inaktivní oxIAA (Hayashi et al., 2021). Dalším oxidovaným metabolitem je DiOxIAA,

neaktivní a ireverzibilní forma, jejíž mechanismus tvorby je neznámý (Isobe a Miyagawa, 2022). Jedním z předpokladů je, že DiOx metabolity IAA vznikají z aminokyselinových konjugátů IAA (Östin et al., 1992).

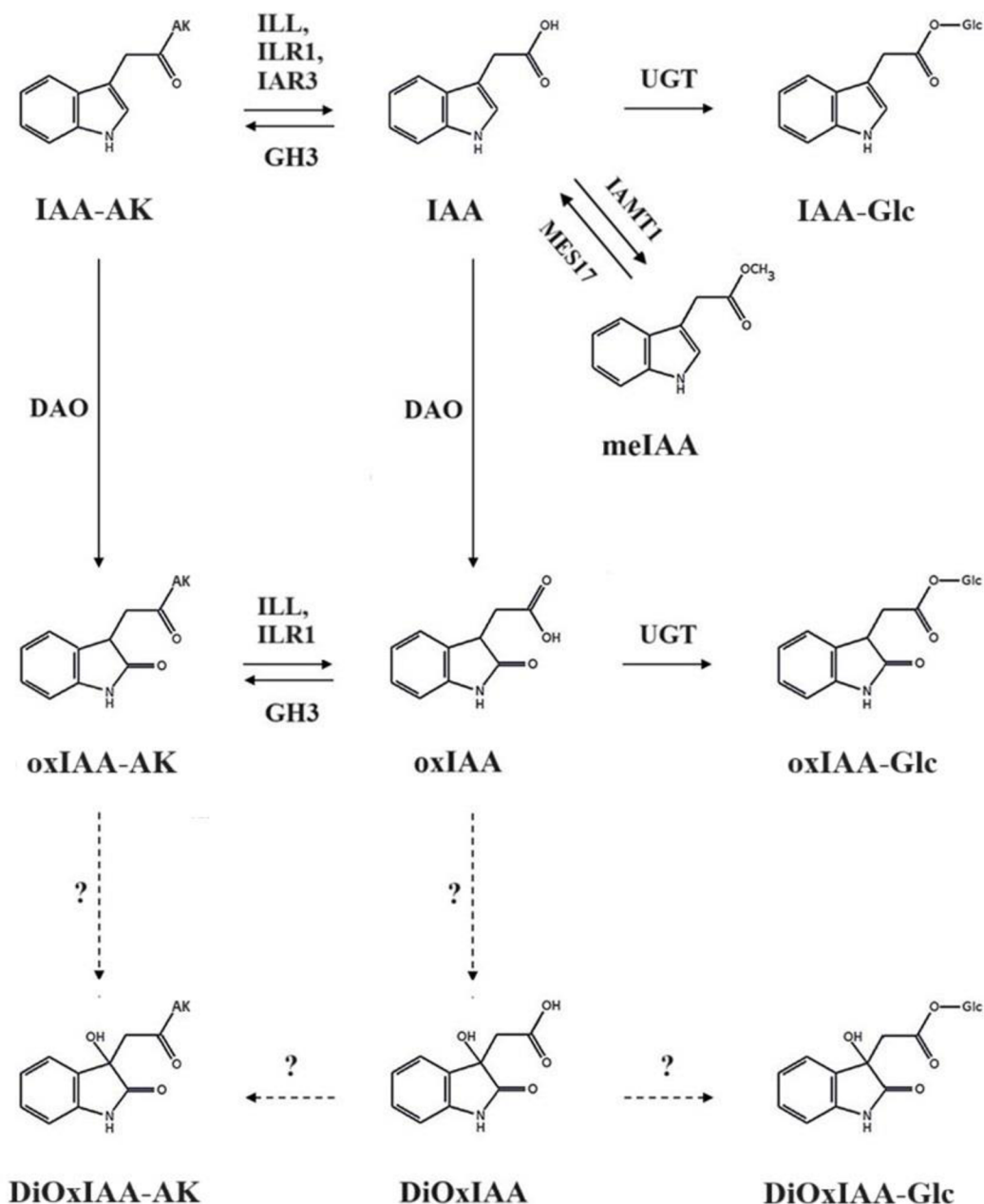
Hlavním oxidačním metabolitem byl v hrachu zaznamenán oxIAA-Asp a v huseníčku oxIAA-Glc, a druhým nejhojnějším metabolitem byla u obou druhů oxIAA. Dále byla také zkoumána pšenice, u které byla nejhojnějším oxidovaným metabolitem ve výhoncích oxIAA. V pšenici během vývoje došlo k akumulaci oxIAA-Glc v kořenech (Hladík et al., 2023).

### **2.6.3 Dráha GH3-DAO-ILR1**

Dříve bylo metabolické působení enzymů GH3, DAO a ILR1 považováno za na sobě nezávislé a oddělené ve více různých drahách. Nedávná studie prokázala, že u huseníčku se GH3, DAO a ILR1 podílejí na jedné lineární dráze inaktivace IAA (Hayashi et al., 2021) (Obr. 2). Rodina GH3 se vyskytuje napříč celou rostlinnou říší (Okrent a Wildermuth, 2011). Dioxygenáza DAO je přítomna pouze u krytosemenných rostlin, čímž je přítomnost GH3-DAO-ILR1 dráhy omezena jen na oddělení krytosemenných rostlin (Hayashi et al., 2021, Brunoni et al., 2023). Méně často dochází k opačnému postupu, kdy GH3 enzym konjuguje oxIAA s aminokyselinami. Tento postup je ale velmi druhově závislý (Brunoni et al., 2023). Inhibicí GH3 pomocí selektivního inhibitoru kakeimidu byla dokázána schopnost GH3 katalyzovat konjugaci aminokyselin s IAA a oxIAA u smrku (Fukui et al., 2022, Brunoni, et al. 2023). Důležitost role DAO byla potvrzena u semenáčků huseníčku exogenní aplikací IAA-AK, který byl dále metabolizován převážně na oxIAA-AK (Hayashi et al. 2021).

### **2.6.4 Methylace**

Methylester IAA (meIAA) je pouze zásobní látkou a je intaktní v auxinové signalizaci (Li et al., 2008). Methylace IAA hraje důležitou roli v gravitropickém růstu endodermis hypokotylu (Abbas et al., 2018). Methylace probíhá za katalýzy IAA karboxyl methyltransferázy 1 (IAMT1), jejíž katalytická aktivita má také vliv na vývoj listu (Qin et al., 2005, Korasick et al., 2013). IAMT1 dokáže také konvertovat PAA (Takubo et al., 2020). Methylesteráza 17 (MES17) uvolňuje z methylesteru aktivní IAA (Yang et al., 2008).



Obr. 2: Schéma metabolismu IAA v *Arabidopsis thaliana*. Plnou čarou vyznačeny reakce katalyzované známým enzymem. Přerušovanou čarou vyznačeny reakce katalyzované neznámým enzymem. (dle Hayashi et al., 2021)

DiOxIAA – kyselina 3-hydroxy-2-oxindol-3-(yl)-octová, IAA – kyselina indol-(3)-yl-octová, meIAA – methylester IAA, oxIAA – kyselina 2-oxo-indol-3-(yl)-octová, AK – aminokyselina, Glc – glukóza, DAO – DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION, GH3 – GRETCHEN HAGEN 3, IAMT1 – IAA karboxyl methyltransferáza 1, IAR3 – IAA-ALANIN RESISTANT 3, ILL – ILR1-LIKE PROTEIN, ILR1 – IAA-LEUCIN RESISTANT 1, MES17 – methylesteráza 17, UGT – UDP-glukosyl-transferáza



## 2.7 Glukosylace auxinů

Glukosylace je velmi důležitou modifikací vyskytující se u všech eukaryotických organismů (Meech a Mackenzie, 1997). V metabolismu auxinů je taktéž významnou reakcí regulující homeostázu IAA (Ostrowski a Jakubowska, 2014). IAA může být glukosylována na atomu dusíku nebo kyslíku karboxylové skupiny. Konjugací s cukrem získá IAA větší stabilitu a rozpustnost ve vodě, což ulehčuje její transport a uchování (Jones a Vogt, 2001). Předpokládá se, že *N*-glukosid IAA (IAA-*N*-Glc) je stabilnější než *O*-glukosylester IAA (IAA-Glc) (Yin et al., 2021). K aktivaci IAA z konjugátu s glukózou je nutná syntéza hydrolytických enzymů během vývoje a dozrávání semene (Kai et al., 2007b). Hydrolázy glukosidů IAA nebyly dosud zcela identifikovány. Jedinou identifikovanou hydrolázou je TGW6 (*thousand-grain weight 6* gen) z rýže (Ishimaru et al., 2013).

### 2.7.1 Estery IAA

Estery IAA mají převážně zásobní funkci. Vznikají nejčastěji esterifikací kyslíku karboxylové skupiny IAA katalyzovanou specifickými UDP-glukosyl-transferázami (UGT) (Szerszen et al., 1994). Pomocí hydroláz dochází k uvolnění aktivní IAA z esterového metabolitu (Jakubowska a Kowalczyk, 2005).

Bylo zjištěno, že estery IAA jsou hlavní konjugovanou formou auxinu v semenech celé řady hospodářsky významných plodin, včetně kukuřice, rýže, nebo pšenice (Bandurski a Schulze, 1977), kde slouží jako hlavní zdroj aktivní IAA při klíčení. Endogenní přítomnost IAA-Glc a oxIAA-Glc byla opakovaně potvrzena v huseníčku rolním, kde oxIAA-Glc představuje majoritní konjugát ze všech dosud identifikovaných nízkomolekulárních metabolitů IAA (Porco et al., 2016, Pěničik et al., 2018, Hladík et al., 2023). IAA-Glc je v semenáčku huseníčku akumulována převážně v kořenovém pletivu (Ljung et al., 2001). Kromě huseníčku byl IAA-Glc stanoven ve vegetativních částech hrachu setého, naopak v kukuřici a pšenici detekován nebyl (Hladík et al., 2023). V semenech kukuřice byl identifikován esterový konjugát IAA-*myo*-inositol, který slouží jako důležitý zdroj IAA během klíčení (Hall, 1980, LeClere et al., 2002). Dále byly v rostlinách zaznamenány metabolity IAA-glykany a IAA-glykoproteiny, jejichž funkce ale zůstává nedoložená (Korasick et al., 2013).

### 2.7.2 *N*-glukosidy IAA

Jelikož indolový kruh obecně může podléhat acylaci, glukosylaci, halogenaci a prenylaci, byla velmi pravděpodobná existence *N*-glukosylované IAA. Tento předpoklad vedl k objevu

IAA-*N*-Glc a jejího amidového konjugátu IAA-Asp-*N*-Glc v borovici lesní (Ljung et al., 2001). Objev byl následován detekcí *N*-β-D-glucopyranosylu IAA v hydrolyzátu rýže (Kai et al., 2007b). Pomocí hmotnostní spektrometrie je možné rozeznat IAA-Glc a IAA-*N*-Glc, přestože se jedná o látky o stejné molekulární hmotnosti, a to na základě rozdílného retenčního času a vzniklých fragmentů molekul. Pro potvrzení, že se skutečně jedná o modifikaci indolového kruhu, byla využita metoda alkalické hydrolyzy, kdy dochází k odštěpení glukózy konjugované na karboxylovou skupinu IAA. Produkty hydrolyzy byly podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru s předpokladem, že kterýkoliv metabolit IAA dá chinolinový iont (štěp indol-3-(yl)-acetylu) s *m/z* 130. Následně byly identifikovány ostatní fragmenty a určen prekurzorový iont. Byla zaznamenána fragmentační stopa patřící glukosidu IAA; *m/z* 338 – 218 – 176 – 130. Možnost, že by se jednalo o IAA-Glc, byla ale vyloučena z důvodu provedení silné alkalické hydrolyzy, která by glukosylester IAA s glukózou navázanou přes *C3* rozštěpila. Navíc *O*-glukosylester IAA má charakteristické fragmenty *m/z* 218 a 248. Předpokládá se tedy, že se jednalo o glukózu vázanou přes *N1* atom IAA (Kai et al., 2007b, Yin et al., 2021).

*N*-glukosid IAA byl dále detekován v kukuřici (Kai et al., 2007b). V kořenech rýže byly objeveny jeho konjugované formy s aminokyselinami aspartátem a glutamátem (IAA-Asp-*N*-Glc, IAA-Glu-*N*-Glc), zatímco volný IAA-*N*-Glc byl detekován pouze v semenech. Během vegetativního růstu semenáčku rýže docházelo k nárůstu hladiny konjugátů IAA-*N*-Glc, zatímco hladina konjugátů IAA-Asp a IAA-Glu klesala. Po celou sledovanou dobu vývoje rýže byly hladiny IAA-AK-*N*-Glc výrazně vyšší než IAA-AK. V obou případech převažovaly konjugáty s Asp nad konjugáty s Glu (Kai et al., 2007b).

Aminokyselinové konjugáty *N*-glukosidu IAA jsou testovány pro možné využití ve farmakologii a medicíně jako protizánětlivé látky (Cheng et al., 2020).

### **Zásobní a katabolická forma IAA-*N*-Glc**

Zásobní funkce IAA-*N*-Glc a využití v raném stádiu embrya se usuzuje na základě jeho přítomnosti v semenech. Pravděpodobně IAA-*N*-Glc doplňuje nebo nahrazuje zásobní funkci esterů IAA během klíčení.

Během raného vývoje embrya, rýhování, dochází k dělení buněk, které se následně prodlužují, a jsou základem iniciál semenáčku (Sandberg et al., 1987). S těmito změnami koreluje metabolismus IAA, který zprostředkovává právě elongaci buněk. Byl proveden pokus s klíčovými semeny borovice lesní, které byly testovány na přítomnost IAA a jejích metabolitů v jednotlivých fázích vývoje semenáčku (Ljung et al., 2001). Během prvních 48 hodin od začátku bobtnání došlo k zvyšování hladiny volné IAA až k 100 ng/g FW. Tento nárůst koreloval s poklesem hladiny IAA-*N*-Glc a IAA-Asp-*N*-Glc, které byly majoritními konjugáty

obsaženými v semeni. Lze tedy konstatovat, že aktivní IAA byla uvolněna hydrolyticky z těchto konjugátů a v raném stádiu není potřeba *de novo* syntézy IAA. Po 48 hodinách začala hladina volné IAA klesat, čímž se iniciovala elongace kořene a indukce tvorby hypokotylu. Po čtvrtém dni byla započata *de novo* biosyntéza IAA z tryptofanu, čímž byl aktivován katabolismus. Mezi čtvrtým a šestým dnem byla všechna zásobní konjugovaná IAA spotřebována a začaly se objevovat první produkty metabolismu IAA jako amidové konjugáty. Ty byly ale velmi rychle glukosylovány za vzniku IAA-AK-*N*-Glc, který už neslouží jako zásobní forma, nýbrž jako ireverzibilní katabolit. Pokus potvrdil dvojí funkci IAA-*N*-Glc, zásobní funkci v embryu, kdy je pro semeno výhodnější a rychlejší brát potřebné látky ze zásoby, a katabolickou funkci ve vegetativním pletivu. U dalšího zástupce nahosemenných rostlin, jinanu dvoulaločného, dochází také k hyperakumulaci IAA-*N*-Glc v semenech (Yin et al., 2021). *N*-glukosid IAA byl také detekován u zástupce hub – pavučince hnědého (*Cortinarius brunneus*) (Teichert et al., 2008).

U jinanu dvoulaločného bylo prokázáno, že tvorba IAA-AK-*N*-Glc je možná dvěma způsoby, a to prvně tvorbou amidokonjugátu a následnou glukosylací, kde se předpokládá zapojení enzymů GbGH3.5 a GbNGT1 (Yin et al., 2021), nebo prvně glukosylací a následným připojením aminokyseliny. Vznik IAA-AK-*N*-Glc glukosylací z IAA-AK byl potvrzen přidávkou exogenní deuteriem značené IAA-AK v rýži seté (Kai et al., 2007b). Testem s mutanty jinanu dvoulaločného s utlumeným genem pro GbNGT1 bylo dokázáno, že *N*-glukosyltransferáza GbNGT1 umožňuje glukosylaci konjugátu IAA-AK na pozici dusíku (Yin et al., 2021). Lze tedy konstatovat, že *N*-glukosylace konjugátů IAA-AK je inaktivačním procesem.

### 2.7.3 Glukosyltransferázy

Prvním objeveným genem kódujícím UGT byla *ZmIAAGLU* (IAGLU) v kukuřici seté, následně v huseníčku rolním, kvěťáku, okřešku, rajčeti, rýži, sóji a tabáku (Szerszen et al., 1994). IAGLU ovlivňuje morfologii listu a vývoj květu.

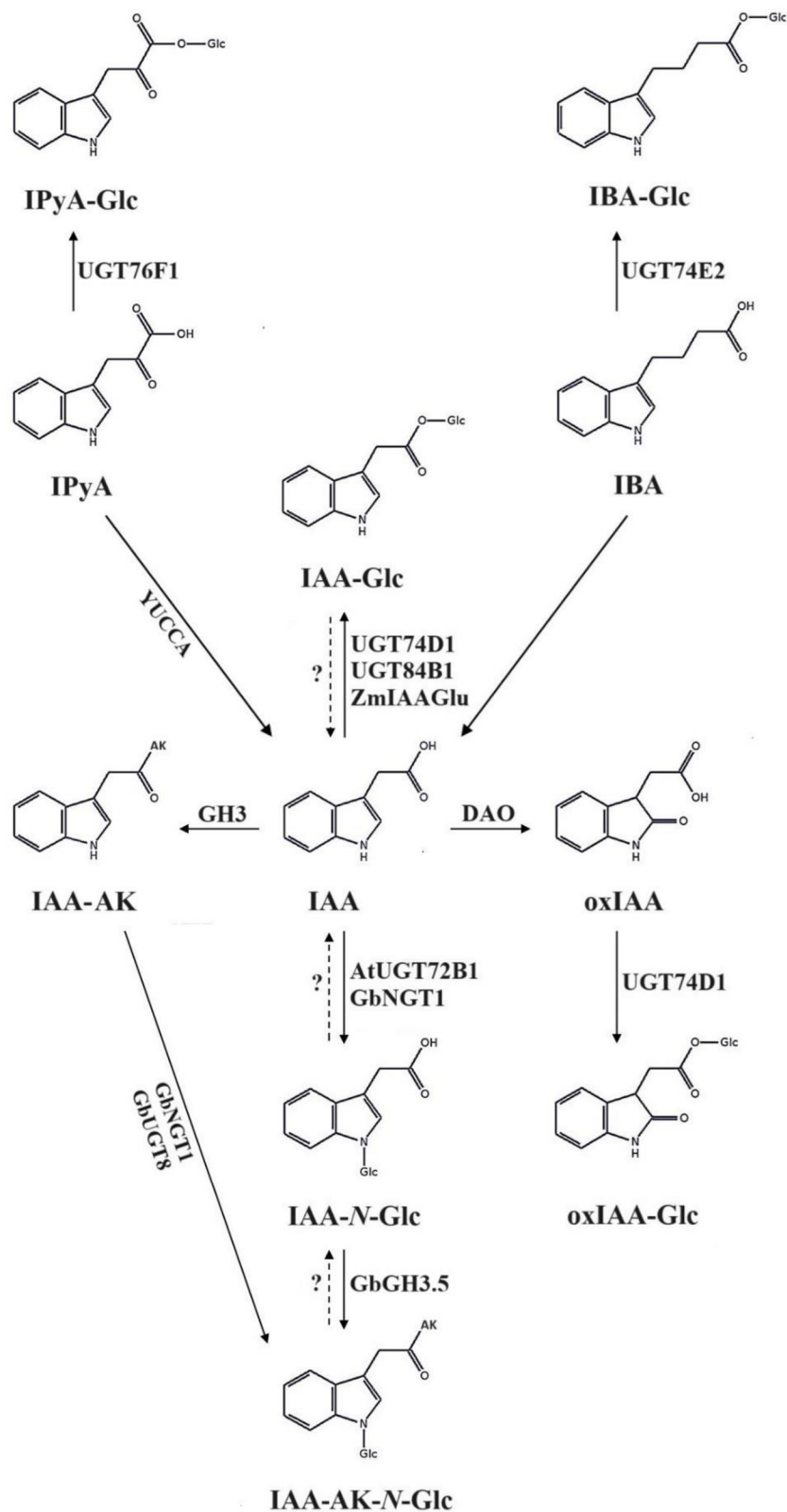
Pro identifikaci genů UGTs byly využity modelové rostliny huseníček rolní a rýže setá. V huseníčku rolním bylo identifikováno celkem 115 a v rýži 200 genů kódujících UGTs (Yu et al., 2017), z toho v případě rýže bylo 12 čistě auxinových. Jedním z nich je *OsIAGT1* kódující UGT, která má největší aktivitu při pH 8 a má vyšší substrátovou afinitu vůči přírodním auxinům IAA a IBA. Exprese tohoto genu je vyvolána auxinem a je lokalizována v dospělých listech a stonku, kde již přítomnost aktivní IAA ve vysokých koncentracích není vyžadována. V mladých listech je *OsIAGT1* exprimován v mnohem menší míře. Nadprodukce genu *OsIAGT1* došlo k redukovanému růstu rýže (Liu et al., 2019). Overexprese genů pro

UGTs zároveň zvyšovala hladinu aktivní IAA, což poukazuje na možnost existence hydroláz štěpících IAA-Glc (Jackson et al., 2002).

Existuje široké spektrum UGTs s velmi rozmanitou substrátovou specifitou (Obr. 3). Glukosyltransferázy UGT84B1, UGT84B2, UGT75B1, UGT75B2 a UGT74D1 jsou schopny glukosylovat IAA a další jak přírodní, tak i syntetické auxiny (Jackson et al., 2001, Jin et al., 2013). Bylo zjištěno, že UGT84B1 je schopna glukosylace PAA *in vitro* (Aoi et al., 2020a). UGT74D1 katalyzuje glukosylaci IAA i oxIAA a má vyšší expresi ve vegetativních pletivech (Jin et al., 2013, Tanaka et al., 2014). AtUGT72B1 má duální funkci jako *O*- a *N*-glukosyltransferáza (Brazier-Hicks et al., 2007). Nejaktivnějšími enzymy jsou u většiny rostlinných druhů UGT74D1 a UGT84B1, u huseničku rolního to je UGT84B1 (Jackson et al., 2001, Jackson et al., 2002, Jin et al., 2013). UGT76F1 je zapojena do regulace biosyntézy IAA v hypokotylu inaktivací jejího prekurzoru indol-3-(yl)-pyruvátu (Chen et al., 2020). UGT74E2 katalyzuje glukosylaci IBA (Jin et al., 2013). Poruchy ve funkčnosti těchto enzymů způsobovaly poškození architektury výhonku a narušení odpovědi na stres (Liu et al., 2019).

Doposud byla identifikována jediná výhradní *N*-glukosyltransferáza GbNGT1 v jinanu dvoulaločném. Overexpresi *GbNGT1* vneseného do huseničku rolního byl zjištěn vliv tvorby IAA-*N*-Glc na růst kořene, kdy byly zaznamenány delší kořeny zřejmě díky zprostředkování distribuce IAA až do kořenové čepičky. GbNGT1 obsahuje genetickou informaci rekombinantních proteinů z genu glukosyltransferázy GbUGT8, která je schopná glukosylace IAA-Asp s UDP-glukózou. Dále mohou být glukosylovány amidové konjugáty IAA s glutamátem, glycinem a leucinem, avšak pouze na pozici dusíku indolového cyklu. NGT1 je velmi citlivá na volné elektronové páry a v nadbytečné přítomnosti donorů či akceptorů elektronů se stává neaktivní. To nastává v případě, že v blízkosti glukosylovaného dusíkového atomu se nachází hydroxylová skupina, ethyl či methyl. To je zřejmě následkem či důsledkem toho, že se jedná o čistě *N*-glukosyltransferázu, která nekatalyzuje glukosylaci na jiných atomech. Nedokáže glukosylovat analogy IAA - IBA, IPA, NAA a indolové deriváty. Její enzymatická aktivita rovněž velmi závisí na její sterické stabilitě. pH optimum má v rozmezí 5 až 7 (Yin et al., 2021).

Podobnou funkci u eukaryot má oligosacharyltransferáza (OST), která ale není s NGT příbuzná. OST katalyzuje vznik vazby mezi amidem kyseliny asparagové na vedlejším řetězci proteinu a *C1* uhlíku redukujícího konce cukru (Naegeli et al., 2014).



Obr. 3: Schéma glukosylačních drah IAA, jejich metabolitů a prekurzorů. Plnou čarou vyznačeny reakce katalyzované známým enzymem. Přerušovanou čarou vyznačeny reakce katalyzované neznámým enzymem. (dle Jackson et al., 2001, Ljung et al., 2001, Jin et al., 2013, Chen et al., 2020, Yin et al., 2021)

IAA – kyselina indol-(3)-yl-octová, IAA-N-Glc – N-glukosid IAA, IBA – kyselina indol-3-(yl)máselná, IPyA – kyselina indol-3-(yl)-pyrohroznová, oxIAA – kyselina 2-oxo-indol-3-(yl)-octová, YUCCA – indol-3-(yl)-acetaldehydoxidáza, AK – aminokyselina, Glc – glukóza, DAO – DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION, GH3 – GRETCHEN HAGEN 3, NGT – N-glukosyltransferáza, UGT – UDP-glukosyl-transferáza

## 2.8 Glukosylace ostatních fytohormonů

Glukosylace je velmi rozšířeným způsobem deaktivace fytohormonů. Dochází k ní u všech známých fytohormonů a ztráta její funkce vede k silnému ovlivnění fenotypu rostliny (Ostrowski a Jakubowska, 2014). Mezi cukerné donory se řadí glukóza, ribóza, galaktóza, xylóza, ramnóza a glukuronát. UGTs obsahují reziduum His19/20, které odpovídá za odtržení protonu z karboxylové skupiny fytohormonu, čímž dochází k formaci oxyaniontu, který umožňuje nukleofilní atak uhlíku C1 glukózy na hydroxylovou skupinu (Wang, 2009). Glukosylace má celkově u všech fytohormonů především ochrannou funkci vůči degradaci, zvyšuje polaritu a rozpustnost fytohormonu, a tedy umožňuje jeho snazší transport a ukládání do vakuol.

Cytokininy (CK) vykazují fytohormonální aktivitu díky purinovému jádru (Bajguz a Piotrowska, 2009). Bylo zjištěno, že u cytokininů konjugace s glukosidem je zodpovědná za ochranu před oxidační degradací (Ostrowski a Jakubowska, 2014). Cytokininové UGTs mají substrátovou stereospecifitu. První cytokininová UGT se substrátovou specifitou vůči *trans*-zeatinu byla izolována z *Phaseolus lunatus* (Bajguz a Piotrowska, 2009). Dále byly identifikovány cisZOG1 a cisZOG2 u *Phaseolus lunatus* a ZOX1 u *Phaseolus vulgaris*. Mezi potenciálními GTs jsou enzymy vysoce homologní k výše uvedeným. Jedná se o GmGT1 a GmGT2 nalezené u *Glycine max*, PIGT2 a PIGT3 u *Phaseolus lunatus* a PVGT2 u *Phaseolus vulgaris* (Ostrowski a Jakubowska, 2014). Pokles hladiny aktivního cytokininu způsobený tvorbou glukosylovaných metabolitů má za následek menší apikální meristém, tenčí výhonky, šípovité listy a silné kořeny (Veitch et al., 2003). U huseníčku rolního byly popsány tři NGTs UGT76C1, UGT76C2 a UGT85A1 (Šmehilová et al., 2016). CK glukosylované v poloze N7 a N9 jsou ireverzibilními metabolity (Dwivedi et al., 2010). UGT76C1 a UGT76C2 katalyzují glukosylaci CK převážně v poloze N7, méně v N9 a N6. Cytokininy glukosylované na atomu kyslíku jsou reverzibilní (Hou et al. 2004).

V případě fytohormonu kyseliny abscisové (ABA) byly objeveny specifické UGTs u vigny hranaté (*Vigna angularis*), které obsahovaly dokonce tři reakční místa pro N-glukosylaci. Preferované pH působení těchto enzymů je v rozmezí 6 až 7,4. V huseníčku rolním bylo identifikováno šest UGTs s O-glukosylační aktivitou vůči ABA: UGT84B1,

UGT75B1, UGT84B2, UGT71B6, UGT75B2 a UGT73B1 (Ostrowski a Jakubowska, 2014). Dále byla identifikována UGT71B6 (Priest et al., 2006). Jejich aktivita může být vyhraněna vůči stereoizomerům (Lim et al., 2005). Vyšší aktivitu vykazovaly tyto UGTs vůči syntetickým derivátům ABA. Glukosylace ABA hraje důležitou roli během vývoje kotyledonu. Exprese genů UGTs je řízena specifickými tkáňovými promotory (Ostrowski a Jakubowska, 2014).

## 2.9 Vliv stresu na metabolismus auxinů

Na obsah IAA a jejích metabolitů v rostlině má vliv také abiotický stres, kde lze zařadit zasolení, které způsobuje jak vylučování IAA a jejích konjugátů z rostliny ven, tak jejich akumulaci v rostlinném pletivu. Mezi vylučovanými konjugáty z rýže seté byly detekovány oxidované metabolity oxIAA, DiOxIAA, DiOxIAA-Asp a DiOxIAA-Glu. Ve stonku se hromadily oxidované metabolity OxIAA a DiOxIAA, které tvořily 54 % auxinového poolu. V kořeni byly akumulovány konjugáty s aminokyselinami a glukózou a také *N*-glukosidový konjugát IAA-Asp-*N*-Glc. Zatímco v médiu, ve kterém byly pokusné rostliny pěstovány, došlo k zvýšení hladiny volné IAA 39x (Isobe a Miyagawa, 2022).

Stres zvyšuje expresi enzymu GH3, který ve stonku rýže inaktivuje IAA konjugací se stresovým markerem rostlin glutamátém (Isobe a Miyagawa, 2022). Dále je zvyšována exprese IAA biosyntetického genu *YUCCA7* (Lee et al., 2012). Zvýšená tolerance vůči suchu byla potvrzena exogenním dodáním IAA (Isobe a Miyagawa, 2022).

## 2.10 Modelové rostliny

### 2.10.1 Huseníček rolní

Huseníček rolní, *Arabidopsis thaliana* L., je dvouděložná rostlina z čeledi brukvovité (*Brassicaceae*). Jedná se o druh s kosmopolitním rozšířením, ve střední Evropě je jeho výskyt původní. Huseníček je jednoletou bylinou dorůstající velikosti 5 až 30 cm. Listy má jednoduché střídavé a v přízemní růžici. Během dubna a května kvete bílými květy uspořádanými v hroznovitém květenství. Po opylení hmyzem či autogamicky vzniká plod typu šešule s drobnými hnědo-oranžovými semeny. Optimálním stanovištěm huseníčku rolního jsou suché písčité trávníky.

Ačkoliv huseníček je mnoha lidmi považován za plevel, našel své využití v molekulární biologii a rostlinné fyziologii jako modelový organismus. To především z důvodu malého

jaderného genomu, který byl prvním kompletně osekvenovaným rostlinným genomem. Dále díky velmi jednoduchému a rychlému pěstování v laboratorních podmínkách.

### **2.10.2 Hrách setý**

Hrách setý, *Pisum sativum* L., je dvouděložná rostlina čeledi bobovité (*Fabaceae*). Jedná se o kulturní jednoletou bylinu původem ze Středomoří. Dorůstá velikosti 30 až 150 cm. Listy jsou sudozpeřené a střídavé. Je to popínavá rostlina s úponky a palisty. Kvetे od června do září bílými nebo fialovými květy v hroznovitém květenství. Plodem je lusk obsahující světle hnědá semena. K zisku základní živiny, dusíku, využívá symbiózy s bakteriemi rodu *Rhizobium* v hlízkách kořenů. Genom mendelovské modelové rostliny byl kompletně osekvenován v roce 2019 (Kreplak et al., 2019).

## **2.11 Analýza fytohormonů**

K detekci a kvantifikaci fytohormonů je nutno použít vhodný postup přípravy biologického materiálu. Jedná se o nejpomalejší, ale zároveň velmi důležitý krok analýzy (Chen et al., 2008). Zahrnuje odběr a úpravu vzorku, uvolnění analytu z matrice, přečištění a odstranění interferujících látek a následné zakoncentrování analytu, jelikož námi stanovované fytohormony jsou v rostlinném pletivu obsaženy ve velmi malých koncentracích (Du et al., 2012).

### **2.11.1 Extrakce a purifikace**

Prvním krokem k úspěšné analýze biologického materiálu je jeho homogenizace, která slouží k uvolnění tekutého obsahu buněk do extrakčního roztoku. K rozrušení buněčných stěn se využívá hlubokého zmrazení v tekutém dusíku, nadrcení homogenizačními kuličkami z oxidu zirkoničitého v kulovém mlýnu či homogenizace v třecí misce pomocí tloučku (Harrison, 2011). Je nutné udržet rostlinný vzorek ve stabilním stavu tak, aby nedošlo k aktivaci degradačních enzymů. To zajišťujeme chlazením a použitím vhodného extrakčního činidla. Činidlo musí být zvoleno tak, aby poskytovalo vysoký výtěžek analytu a v ideálním případě minimální výtěžek ostatních látek přítomných v rostlině (Porfirio et al, 2016). Mezi nejčastěji používané činidla řadíme acetonitril, methanol či jeho směs s vodnými roztoky kyseliny mravenčí nebo octové. Dále mohou být využity pufrы: fosfátový, sodnofosfátový nebo Bieleškého činidlo (Bielecki, 1964). Z důvodu zabránění oxidace rostlinného materiálu,



především analytu, je do extrakčního činidla přidáváno antioxidační činidlo DEDTCA (diethyldithiokarbamová kyselina) (Ernsten et al., 1986).

Purifikace extraktu slouží k především k separaci námi analyzované látky od matrice (McDougall a Hillman, 1978). Základními purifikačními metodami jsou LLE (*liquid liquid extraction*) a SPE (extrakce na pevné fázi, *solid phase extraction*). Pro purifikaci auxinů je nejčastěji využíváno SPE metody, kdy dochází k selektivnímu zadržení analytu na pevné fázi (Porfírio et al., 2016). Většina fytohormonů, včetně auxinů, je kyselé povahy. Právě okyselení prostředí umožňuje vazbu IAA v nedisociované formě na stacionární fázi (Fu et al., 2011).

Metoda SPE byla pro auxiny vyvinuta v několika variantách: SPE v kolonkách (Novák et al., 2012), miniaturizovaná purifikační metoda in-tip  $\mu$ SPE využitelná pro velmi malé množství, 1 až 5 mg FW, rostlinného materiálu (Pěňčík et al., 2018, Šíroková et al., 2022), magnetické molekulárně vtištěné polymery (Zhang et al., 2010), imunoafinitní SPE (Pěňčík et al., 2009) a disperzní SPE (Petřík et al., nepublikováno). Jelikož stabilita stacionární fáze závisí na pH prostředí, je výhodné jako rozpouštědlo vzorku v tomto případě použít sodnofosfátový pufr (Sundberg, 1990). Při nízkém pH dochází k hydrolyze fáze vázané na silikagelu a při vysokém pH dochází k rozpouštění silikagelu. Eluce se provádí zvýšením síly mobilní fáze (Fu et al., 2011).

Stacionární fáze (sorbent) se volí dle polaritě analytu. Nejlepších výsledků dosahuje stacionární fáze o stejné polaritě jako analyt. Hydrofobních interakcí se využívá u nepolárních (reverzních) fází, kdy vznikají indukované dipóly (přitažlivé a odpuzivé síly). Mezi nepolární sorbenty se řadí kopolymer polystyrendivinylnbenzenu (SBD-XC), nepolárně modifikovaný silikagel s navázanými řetězci oktadecylu (C18), oktylu (C8), či s cyklohexyly, fenyly nebo kyanopropyly. Pro analýzu fytohormonů je z nepolárních sorbentů nejčastěji používaný sorbent C18 (Izumi et al., 2009). Polární (normální) fáze se využívají pro silně elektronegativní látky. Volí se ze sorbentů: silikagel s hydroxylovými skupinami, oxid hlinitý nebo fosforyl. Dalším typem stacionárních fází jsou ty, které využívají elektrostatických interakcí mezi opačně nabitými skupinami iontoměničce a analytu. Sorbenty jsou buď typu anex (silikagel s navázanou kladně nabitou sloučeninou) nebo katex (silikagel se záporně nabitou sloučeninou) často kombinované s nepolární fází, na které dochází k sekundární interakci. Řadí se zde benzensulfonová kyselina (SCX), propylsulfonová kyselina (PRS) a aminopropyl ( $\text{NH}_2$ ). Nejnovějšími sorbenty jsou směsné kombinující většinou dva typy materiálů, čímž dochází k snížení počtu purifikačních kroků (Tarkovská et al., 2014). Pro purifikaci auxinů se osvědčil hydrofilně lipofilní sorbent (Oasis® HLB) (Novák et al., 2012). Jedná se o kopolymer hydrofilního *N*-vinylpyrrolidonu a lipofilního divinylnbenzenu. Má vyšší retenci pro polární látky, je velmi stabilní a jeho případné vyschnutí nemá vliv na výtěžnost analytu. Pro purifikaci

auxinů byla vyvinuta in-tip  $\mu$ SPE, která využívá směsný sorbent: SDB-XC a C18 (Pěňčík et al., 2018). Dále byla vyvinuta metoda disperzní  $\mu$ SPE pro izolaci auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové (Petřík et al., nepublikováno). Ta využívá disperzních částic sorbentů Oasis® HLB a MCX (polymerní mixed-mode sorbent s kationtovýměnnými skupinami: polystyren-divinylbenzenem a aromatickými sulfonovými kyselinami).

### 2.11.2 Identifikace a kvantifikace pomocí LC-MS/MS

Pro stanovení IAA a jejích metabolitů, jejichž hladina je v rostlině velmi nízká (typicky v řádech desítek až stovek pmol na gram čerstvé hmoty), je nejčastěji využívanou metodou kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Tarkowská et al., 2014). Kapalinová chromatografie je separační metoda založená na principu rozdílné distribuce látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi, mobilní a stacionární fází. Rozdílná distribuce látek může být zapříčiněna rozdílnou adsorpcí, vylučováním, rozdělováním, iontovýměnou či stereochemickými interakcemi s částicemi kolony. Na základě velikosti částic stacionární fáze kolony a využívaného tlaku dělíme kapalinovou chromatografii na HPLC (high performance liquid chromatography) a UHPLC (ultra high performance liquid chromatography). Uvedením UHPLC metody pracující s vyšším tlakem a menšími částicemi než HPLC se doba potřebná k analýze jednoho vzorku snížila z řádu minut do řádu sekund. Čímž byla zvýšena účinnost a citlivost analýzy (Fu et al., 2011).

Stacionární fázi v kapalinové chromatografii představují částice kolony. Nejčastěji je využívána reverzní fáze, která se skládá z chemicky modifikovaného silikagelu, polymeru nebo porézního grafitu v kombinaci s polární mobilní fází. Reverzní fáze bývají typicky stabilní v rozsahu pH od 2 do 7,5 vhodném pro separaci fytohormonů kyselé povahy (Fu et al., 2011).

Nejčastěji využívaným detektorem kapalinové chromatografie pro analýzu auxinů je hmotnostní spektrometr (Porfírio et al., 2016). Ten nám dává jak kvantitativní tak kvalitativní informace o složení vzorku. Výstupem analýzy je podíl hmotnosti a náboje analytu ( $m/z$ ). Detekční schopnosti MS sahají do řádů pmol až amol (Svačinová et al., 2012).

Pro analýzu v hmotnostním spektrometru je nutné převést kapalný analyt do plynného skupenství. Při kombinaci LC-MS tento krok probíhá na jejich rozhraní. Prvně je odpařeno rozpouštědlo a poté analyt vstupuje do iontového zdroje, kde je ionizován buď nárazem elektronu nebo urychleným neutrálním atomem, chemicky, desorpcí laserem v přítomnosti matrice (MALDI) nebo termosprejem. Na podobném principu je založena ionizace elektrosprejem (ESI), kdy je ale analyt v kapalném stavu veden kovovou kapilárou do proudu

inertního plynu v iontovém zdroji, kde po vložení napětí na kapiláru dojde k vzniku aerosolu analytu a jeho desolvataci. Použití ESI dosahuje vysoké účinnosti pro kvantitativní stanovení fytohormonů (Svačinová et al., 2012).

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) umožňuje analýzu vzorku v různých časech a prostorech, a to díky zapojení více hmotnostních spektrometrů za sebou (Pan a Wang, 2009). Které umožňují vícenásobnou fragmentaci iontů v kolizní cele nebo změnou velikosti vkládaného napětí korigují propouštění jednotlivých fragmentů o stanovené hmotnosti. Existují dva základní typy MS/MS: trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr (QqQ) a kvadrupólový spektrometr doby letu (Q-TOF). Trojitý kvadrupól se skládá, jak název vypovídá, ze tří za sebou uspořádaných kvadrupólů. Z čehož první funguje jako separační filtr. Druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela, kde dochází k další fragmentaci iontu při kolizi s molekulami kolizního plynu. Třetí kvadrupól funguje jako selektivní filtr iontů pro detekci (Pan a Wang, 2009).

Pro kvantifikaci analytu je vhodné využít přídavku izotopicky značeného IS ke kompenzaci jeho ztráty během přípravy vzorku a ionizaci v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru (Pan a Wang, 2009). Jako IS se volí strukturní analog analytu, čímž se zajišťuje velmi podobné chování standardu během analýzy. Nejspolehlivějšími IS jsou izotopicky značené, které mají stejnou strukturu jako analyt ale odlišný podíl m/z. Značí se nejméně zastoupeným izotopem prvku v přírodě. Pro stanovení IAA byl nejvhodnějším izotopem pro IS IAA zvolen uhlík  $^{13}\text{C}_6$  (Porfírio et al., 2016).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Biologický materiál**

*Arabidopsis thaliana* L., huseníček rolní, ekotyp Columbia (Col-0)

*Pisum sativum* L. var. *arvense*, hrách setý - peluška, odrůda Arvika

### **3.2 Přístroje**

Analytické váhy Sartorius – Weighing Technology GmbH (Německo)

Autokláv Labo MLS-3781 – Sanyo (Japonsko)

Centrifuga Avanti™ 30 – Beckman (Brea, USA)

Centrifuga MIKRO 220R – Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Německo)

Laminární box Heraguard™ ECO – Thermo Fisher Scientific (USA)

Magnetická míchačka – Velp Scientifica (Usmate, Itálie)

Míchačka zkumavek rotační SB3 STUART® - Keison Products (Chelmsford, VB)

Mlýn kulový MM 400 Retsch® & Co. KG – Retsch GmbH (Haan, Německo)

Orbitální třepačka Standard 1000 – VWR® (Radnor, USA)

pH metr Eutech Instruments pH 700 MM 2a – Thermo Scientific™ (Vernon Hills, USA)

Systém HPLC-MS/MS - 1260 Infinity LC systém a 6495 Triple Quadrupole MS/MS– Agilent Technologies (CA, USA)

Ultrazvuková lázeň Transsonic 310 – Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. (Singen, Německo)

Vakuová komůrka pro SPE Visiprep™ – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

Vakuová rotační odparka Rotavapor® R-200 – Buchi Labortechnik AG (Postfach, Německo)

WIZARD IR Infrared Vortex Mixer – Velp Scientifica (Itálie)

Zařízení na úpravu vody Direct-Q® 3 UV – Millipore Corp. (Billerica, USA)

### 3.3 Pomůcky

Automatické pipety a špičky – Eppendorf (Hamburk, Německo)

Čtvercové Petriho misky – Greiner bio-one (Kremsmuenster, Rakousko)

Extrakční disky: C18 Empore™ – 3M™ a SDB-XC Empore™ – 3M™ (Minneapolis, USA)

Kónické zkumavky 50 ml – VWR International (USA)

Hydroponický systém – nekomerční, vyroben svépomocí v Laboratoři růstových regulátorů

Chromatografická kolona KINETEX 1,7 μm C18, 50 x 2,1 mm – Phenomenex (Torrance, USA)

Keramické homogenizační kuličky – Retsch (Haan, Německo)

Laboratorní sklo – Fisherbrand (USA)

Mikrozkumavky – Eppendorf (Německo)

Sorbenty pro SPE: Oasis® MCX a Oasis® HLB (μDSPE) – Waters (Milford, USA)

SPE kolonky Waters Oasis® HLB, 30 mg/1 l – Waters (Milford, USA)

Vakuová komůrka Visiprep™ – Supelco – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

### 3.4 Chemikálie

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

Agar – Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Nizozemsko)

Diethyldithiokarbamová kyselina (DEDTCA) – Merck (Darmstadt, Německo)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (99,6%) – Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR)

Ethanol – VWR International s.r.o. (Stříbrná Skalice, ČR)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (98,5%) – Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR)

Hydroxid amonný (25% vodný roztok) – Merck (Darmstadt, Německo)

Hydroxid sodný (> 98%) - Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR)

Kyselina chlorovodíková (37%) – Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR)

Kyselina mravenčí – Merck (Darmstadt, Německo)

Kyselina octová (> 99,9%) – Merck (Darmstadt, Německo)

Methanol (> 99,9%) – Merck (Darmstadt, Německo)

Murashige & Skoog médium – Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Nizozemsko)

Sacharóza – Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR)

Tween – Lach-Ner s. r. o. (Neratovice, ČR)

#### **Standardy:**

IAA, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]IAA – Merck (Darmstadt, Německo)

IAA-Asp, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]IAA-Asp – OlchemIm (Olomouc, ČR)

IAA-Glu, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]IAA-Glu – OlchemIm (Olomouc, ČR)

IAA-Glc, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]IAA-Glc – Laboratoř růstových regulátorů (Olomouc, ČR)

IAA-N-Glc – Laboratoř růstových regulátorů (Olomouc, ČR)

oxIAA, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]oxIAA – OlchemIm (Olomouc, ČR)

oxIAA-Glc, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]oxIAA-Glc – Laboratoř růstových regulátorů (Olomouc, ČR)

### **3.5 Příprava roztoků**

**0,1% kyselina octová** (100 ml): Roztok byl připraven z 99,9 ml deionizované vody a 0,1 ml kyseliny octové.

**0,1M kyselina chlorovodíková** (100 ml): Roztok byl připraven zředěním 10 ml 1M kyseliny chlorovodíkové 90 ml deionizované vody.

**0,35M hydroxid amonný** (250 ml): Roztok byl připraven z 243,75 ml deionizované vody a 6,25 ml 25% hydroxidu amonného.

**0,35M hydroxid amonný v 60% methanolu** (250 ml): Roztok byl připraven ze 150 ml methanolu, 93,75 ml deionizované vody a 6,25 ml 25% hydroxidu amonného.

**0,5M dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát** (100 ml): Roztok byl připraven rozpuštěním 7,8 g dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného v deionizované vodě a doplněním objemu na 100 ml.

**0,5M hydrogenufosforečnan disodný dodekahydrát (100 ml):** Roztok byl připraven rozpuštěním 17,9 g dodekahydrát hydrogenufosforečnanu disodného v deionizované vodě a doplněním objemu na 100 ml.

**10% methanol (100 ml):** Roztok byl připraven z 90 ml deionizované vody a 10 ml methanolu.

**1M kyselina chlorovodíková (100 ml):** Roztok byl připraven z 91,3 ml deionizované vody a 8,7 ml 37% kyseliny chlorovodíkové.

**1M kyselina mravenčí (250 ml):** Roztok byl připraven z 240,37 ml deionizované vody a 9,625 ml 100% kyseliny mravenčí.

**1M kyselina mravenčí v methanolu (250 ml):** Roztok byl připraven z 240,37 ml methanolu a 9,625 ml 100% kyseliny mravenčí.

**5% kyselina mravenčí v 10% methanolu (250 ml):** Roztok byl připraven z 212,5 ml deionizované vody, 25 ml methanolu a 12,5 ml 100% kyseliny mravenčí.

**5% methanol (100 ml):** Roztok byl připraven z 95 ml deionizované vody a 5 ml methanolu.

**50mM sodnofosfátový pufr s 0,1% DEDTCA (250 ml):** Roztok byl připraven z 15,25 ml 0,5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 9,75 ml 0,5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, které byly doplněny do 250 ml deionizovanou vodou. Do roztoku bylo přeneseno 250 mg DEDTCA.

**60% methanol (100 ml):** Roztok byl připraven ze 40 ml deionizované vody a 60 ml methanolu.

**80% methanol (100 ml):** Roztok byl připraven z 20 ml deionizované vody a 80 ml methanolu.

**Hoaglandův roztok (cca 1 l):** Roztok byl připraven z 1 l roztoku A, 1 ml roztoku B, 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 ml FeEDTA. Roztok A byl připraven rozpuštěním 0,94 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,52 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,66 g KNO<sub>3</sub> a 0,12 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 1 l deionizované vody. Roztok B byl připraven rozpuštěním 2,8 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3,4 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,1 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,22 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,1 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O v 1 ml deionizované vody.

**Médium Murashige & Skooga tekuté (1 l):** Do kádinky bylo naváženo 4,4 g MS média a 10 g sacharózy. Navážka byla doplněna 1 l deionizované vody a důkladně promíchána pomocí magnetické míchačky. pH bylo upraveno na 5,7 pomocí 0,1M hydroxidu sodného.

**Médium Murashige & Skooga tuhé (1 l):** Do kádinky bylo naváženo 4,4 g MS média a 10 g sacharózy. Navážka byla doplněna 1 l deionizované vody a důkladně promíchána pomocí magnetické míchačky. pH bylo upraveno na 5,7 pomocí 0,1M hydroxidu sodného. Do skleněné láhve bylo naváženo 10 g agaru. Médium bylo přeneseno z kádinky do skleněné láhve. Médium bylo vysterilizováno v autoklávu při teplotě 120 °C.

**Sterilizační roztok** (1 ml): Roztok byl připraven z 0,7 ml ethanolu, 1  $\mu$ l Tweenu a 0,299 ml deionizované vody.

## **3.6 Metody a pracovní postupy**

### **3.6.1 Příprava biologického materiálu**

#### **Kultivace huseníčku rolního**

Huseníček rolní byl pěstován na tuhém MS médiu ve čtvercových Petriho miskách. Semínka byla před výsevem umístěna do lednice na 48 hodin. Poté byla vysterilizována 1 ml sterilizačního roztoku po dobu 8 minut v mikrozkuhavce v rotační míchačce. Následně v laminárním boxu byl sterilizační roztok pomocí pipety odstraněn a semínka byla propláchnuta 96% ethanolom. Odstřiženou pipetovací špičkou byla semínka přenesena na filtrační papír k odpaření ethanolu. Do čtvercové Petriho misky s tuhým MS médiem bylo vyseto přibližně 20 semínek ve dvou řadách. Okraje misek byly utěsněny páskou. Misky byly umístěny ve vertikální poloze do fytotronu na dobu 7 dní při 22 °C v režimu dlouhého dne (16 hodin světlo a 8 hodin tma). Semenáčky byly naváženy po 10 mg do mikrozkuhovek. Následně byly zmrazeny v tekutém dusíku.

#### **Kultivace hrachu setého**

Hrách setý byl pěstován hydroponicky v Hoaglandově roztoku. Semena byla před výsevem sterilizována sterilizačním roztokem, opláchnuta deionizovanou vodou a přenesena na vlhkou buničitou vatou, kde byla přikryta vatou a ponechána 2 dny při laboratorní teplotě klíčit. Po naklíčení byla semena přenesena do hydroponického systému, který byl naplněn Hoaglandovým roztokem. Hrách byl pěstován po dobu 7 dní při 22 °C v režimu dlouhého dne (16 hodin světlo a 8 hodin tma). Pomocí skalpelu byly semenáčky rozděleny na prýt, kotyledon a kořen. Jednotlivé části byly zmrazeny v tekutém dusíku. Následně byly jednotlivé části přeneseny do třecí misky, převrstveny tekutým dusíkem, zhomogenizovány a naváženy po 10 mg do mikrozkuhovek.

#### **Inkubace semenáček huseníčku s exogenní IAA**

Experiment byl proveden se sedmidenními semenáčky huseníčku vypěstovanými způsobem uvedeným výše. Semenáčky byly inkubovány v Petriho miskách v tekutém MS médiu s přídavkem IAA v koncentraci 0,5  $\mu$ M nebo 5  $\mu$ M. Čisté MS médium bez IAA bylo použito jako kontrola. Po přenesení semenáček do jednotlivých misek pomocí pinzety byly misky zakryty alobalem a inkubovány za stálého míchání na orbitální třepačce po dobu 6 a 24 hodin. Následně v daných časových bodech byly pinzetou vyjmuty z média, opláchnuty



deionizovanou vodou, osušeny, naváženy po 10 mg do mikrozkušavek a zmrazeny v tekutém dusíku.

### **Inkubace semenáčků hrachu s exogenní IAA**

Experiment byl proveden se sedmidenními semenáčky hrachu vypěstovanými způsobem uvedeným výše. Semenáčky byly inkubovány ve 100ml Erlenmeyerových baňkách ve 40 ml Hoaglandova roztoku s přísávkem IAA v koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  nebo 5  $\mu\text{M}$ . Čistý Hoaglandův roztok bez IAA byl použit jako kontrola. Po přenesení semenáčků do jednotlivých baňek byly baňky obaleny alobalem a inkubovány za stálého míchání na orbitální třepače po dobu 6 a 24 hodin. Následně v daných časových bodech byly vyjmuty z roztoku, opláchnuty deionizovanou vodou a osušeny buničitou vatou. Pomocí skalpelu byly semenáčky rozdělány na prýt, kotyledon a kořen. Jednotlivé části byly zmrazeny v tekutém dusíku. Následně byly jednotlivé části přeneseny do třecí misky, převrstveny tekutým dusíkem, zhomogenizovány a naváženy po 10 mg do mikrozkušavek.

## **3.6.2 Extrakce a purifikace**

### **3.6.2.1 Extrakce a purifikace metodou $\mu\text{DSPE}$**

Extrakce a purifikace byla provedena dle  $\mu\text{DSPE}$  protokolu pro analýzu auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové (dle Petřík et al., nepublikováno).

Ke vzorkům obsahujícím 10 mg rostlinného materiálu bylo přidáno 0,5 ml vychlazené 5% kyseliny mravenčí v 10% ethanolu, směs interních standardů (2,5 pmol [ $^{13}\text{C}_6$ ]IAA/oxIAA/IAA-Asp/IAA-Glu, 5 pmol [ $^{13}\text{C}_6$ ]IAA-Glc/oxIAA-Glc) a 3 keramické homogenizační kuličky. Rostlinný materiál byl homogenizován na kulovém mlýnu při frekvenci 27 Hz po dobu 10 minut při 4 °C, poté v ultrazvukové lázni po dobu 3 minut při 4 °C. Následně byly vzorky přeneseny do rotační míchačky zkumavek o otáčkách 15 rpm, kde byly extrahovány po dobu 30 minut při 4 °C a poté byly centrifugovány (20 000 rpm, 15 minut, 4 °C). Supernatant o objemu 0,5 ml byl přenesen na aktivovaný sorbent na čistém microspin filtru (postup přípravy viz níže).

Purifikace byla provedena na disperzních částicích stacionární fáze Oasis® MCX a Oasis® HLB. Jednotlivé fáze byly připraveny odděleně stejným postupem ze 100 mg sorbentu ve 2ml mikrozkušavkách. Ke kondicionaci sorbentu byl použit 1 ml methanolu, který byl přidán k naváženému sorbentu. Směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu a poté byl supernatant oddělen od sorbentu centrifugací (14 000 rpm, 2 minuty, 4 °C). Po odstranění supernatantu byl tento krok opakován s 1 ml deionizované vody. Po následném

odstranění supernatantu byl k sorbentu přidán 1 ml 1M kyseliny mravenčí. Obě připravené suspenze byly přeneseny na microspin filtr v objemu 50  $\mu$ l.

Po přenesení vzorku na sorbent byl obsah promíchán na vortexu po dobu 30 sekund a filtrován pomocí centrifugace (8 000 rpm, 5 minut). Filtrát byl odstraněn. K promytí bylo na filtr přeneseno 0,4 ml 1M kyseliny mravenčí, obsah byl promíchán na vortexu a filtrován pomocí centrifugace (8 000 rpm, 5 minut). Filtrát byl odstraněn. Mikrospin filtr byl přenesen do čisté 2ml mikrozkušavky ke sběru eluátu, který byl sbírán ve dvou krocích. Nejprve bylo přidáno 0,4 ml 1M kyseliny mravenčí v methanolu a po promíchání na vortexu byly vzorky centrifugovány (8 000 rpm, 5 minut). Eluát byl následně odpařen ve vakuové odparce. Filtr byl přenesen do čisté mikrozkušavky a k sorbentu bylo přidáno 0,4 ml 0,35M hydroxidu amonného (vortex, centrifugace 8 000 rpm, 5 minut). K sorbentu bylo následně přidáno 0,4 ml 0,35M hydroxidu amonného v 60% methanolu (vortex, centrifugace 8 000 rpm, 5 minut). Eluát byl následně odpařen ve vakuové odparce. Odpařený vzorek byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l 10% methanolu a přenesen do vialek s inzerty.

### **3.6.2.2 Extrakce a purifikace metodou SPE v kolonkách**

Extrakce a purifikace byla provedena dle SPE protokolu pro analýzu auxinů (dle Novák et al., 2012).

Ke vzorkům obsahujícím 10 mg rostlinného materiálu byl přidán 1 ml vychlazeného 0,05M sodnofosfátového pufru, směs interních standardů (2,5 pmol [ $^{13}$ C<sub>6</sub>]IAA/oxIAA/IAA-Asp/IAA-Glu, 5 pmol [ $^{13}$ C<sub>6</sub>]IAA-Glc/oxIAA-Glc) a 3 keramické homogenizační kuličky. Rostlinný materiál byl homogenizován na kulovém mlýnu při frekvenci 27 Hz po dobu 10 minut při 4 °C. Poté byly vzorky přeneseny do rotační míchačky zkumavek o otáčkách 15 rpm, kde byly extrahovány po dobu 15 minut při 4 °C. Následně byly vzorky centrifugovány (14 000 rpm, 15 minut, 4 °C) a výsledný supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky, kde bylo upraveno jeho pH na 2,7 pomocí 1M HCl.

Purifikace byla provedena pomocí SPE kolonek Waters Oasis® HLB 30mg/1cc. Kolonky byly kondicionovány 1 ml 100% methanolu, 1 ml deionizované vody a 0,5 ml deionizované vody s 2,5  $\mu$ l 1M HCl. Na aktivovanou kolonku byl nanesen okyselený vzorek a následně byla kolonka promyta 2 ml 5% methanolu. Eluce byla provedena pomocí 2 ml 80% methanolu. Eluát byl sbírán do čistých skleněných zkumavek a následně byl odpařen ve vakuové odparce. Odpařený vzorek byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l 10% methanolu a přenesen do vialek s inzerty.

### 3.6.2.3 Extrakce a purifikace metodou in-tip $\mu$ SPE

Extrakce a purifikace byla provedena dle protokolu pro analýzu auxinů (dle Pěňčík et al., 2018).

Ke vzorkům obsahujícím 10 mg rostlinného materiálu byl přidán 1 ml vychlazeného 0,05M sodnofosfátového pufru, směs interních standardů (2,5 pmol [ $^{13}\text{C}_6$ ]IAA/oxIAA/IAA-Asp/IAA-Glu, 5 pmol [ $^{13}\text{C}_6$ ]IAA Glc/oxIAA Glc) a 3 keramické homogenizační kuličky. Rostlinný materiál byl homogenizován na kulovém mlýnu při frekvenci 27 Hz po dobu 10 minut při 4 °C. Poté byly vzorky přeneseny do rotační míchačky zkumavek o otáčkách 15 rpm, kde byly extrahovány po dobu 15 minut při 4 °C. Následně byly vzorky centrifugovány (14 000 rpm, 15 minut, 4 °C). Supernatant o objemu 200  $\mu$ l byl přenesen do čisté mikrozkušavky a bylo upraveno jeho pH na 2,7 přidáním 100  $\mu$ l 1M HCl.

Purifikace byla provedena pomocí kolonek v pipetovacích špičkách. Kolonky byly připraveny vyříznutím malého disku z komerčních extrakčních disků SDB-XC Empore<sup>TM</sup> a C18 Empore<sup>TM</sup> jehlou Hamiltonovy stříkačky, ze které byly následně vloženy do pipetovací špičky o objemu 200  $\mu$ l. Stacionární fáze byla složena z 3 disků sorbentu SDB-XC, na které byly navrstveny 3 disky sorbentu C18.

Kolonky byly kondicionovány nanesením 50  $\mu$ l acetonu (centrifugace 2 200 rpm, 10 min, 4 °C), 50  $\mu$ l methanolu (centrifugace 2 200 rpm, 10 min, 4 °C) a 50  $\mu$ l deionizované vody (centrifugace 2 200 rpm, 15 min, 4 °C). Na aktivovanou kolonku bylo nanášeno 300  $\mu$ l okyseleného supernatantu (centrifugace 4 000 rpm, 30 min, 4 °C). Kolonka byla promyta 50  $\mu$ l 0,1% kyseliny octové (centrifugace 3 600 rpm, 20 min, 4 °C). Eluce byla provedena pomocí 50  $\mu$ l 80% methanolu (centrifugace 3 600 rpm, 20 min, 4 °C). Eluát byl přenesen do vialky s inzerty a odpařen ve vakuové odparce. Odpařený vzorek byl rozpuštěn v 50  $\mu$ l 10% methanolu.

### 3.6.3 Nastavení HPLC-MS/MS metody

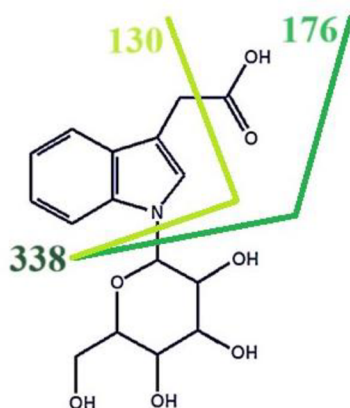
Analýza byla provedena s využitím HPLC-MS/MS metody popsané v Pěňčík et al. (2018) s drobnými modifikacemi. Pro separaci analytů byla použita chromatografická kolona KINETEX 1,7  $\mu$ m C18, 50 x 2,1 mm (Phenomenex, Torrance – USA). Mobilní fáze byla tvořena deionizovanou vodou (A) a methanolem (B) s přidáním 0,1% kyseliny octové. Čas analýzy činil 12 minut při průtoku 0,3 ml/min a s následujícím průběhem gradientové eluce: 0 min – 10% B, 6,5 min – 36% B, 6,75 min – 100% B, 7,75 min – 100% B, 8 min – 10% B). Vzorky byly uloženy v autosampleru při teplotě 4 °C a kolona temperována na 40 °C. Nástřik vzorku činil 10  $\mu$ l. Analyty byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru v pozitivním

módu ESI(+) za použití těchto optimalizovaných podmínek: tlak zmlžovacího plynu, 25 psi; průtok a teplota přehřátého pomocného plynu, 12 l/min a 400 °C; průtok a teplota protiproudého vyhřátého sušícího plynu, 14 l/min a 130 °C; napětí na výstupním šroubení plynu, 0 V; napětí na vstupní kapiláře, 2,8 kV. Analyty byly detekovány pomocí optimalizovaných MRM přechodů (kromě IAA-*N*-Glc dle Pěňčík et al., 2018).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizace MS/MS metody pro IAA-*N*-Glc

Analýzou standardu IAA-*N*-Glc v režimu full scan byly zaznamenány vznikající fragmenty IAA-*N*-Glc, ze kterých byly následně vybrány ty nejvíce zastoupené. Na jejich základě byly sestaveny MRM přechody  $m/z$  338  $\rightarrow$  176 a 338  $\rightarrow$  130 (Obr. 4). Dále byla optimalizována kolizní energie pro oba MRM přechody, přičemž  $m/z$  338  $\rightarrow$  130 poskytoval nejlepší odezvu při kolizní energii 38 eV, zatímco pro  $m/z$  338  $\rightarrow$  176 činilo optimum 16 eV. Jako výhodnější byl na základě lepší odezvy vybrán MRM přechod 338  $\rightarrow$  130, který byl využit pro následnou kvantifikaci IAA-*N*-Glc.



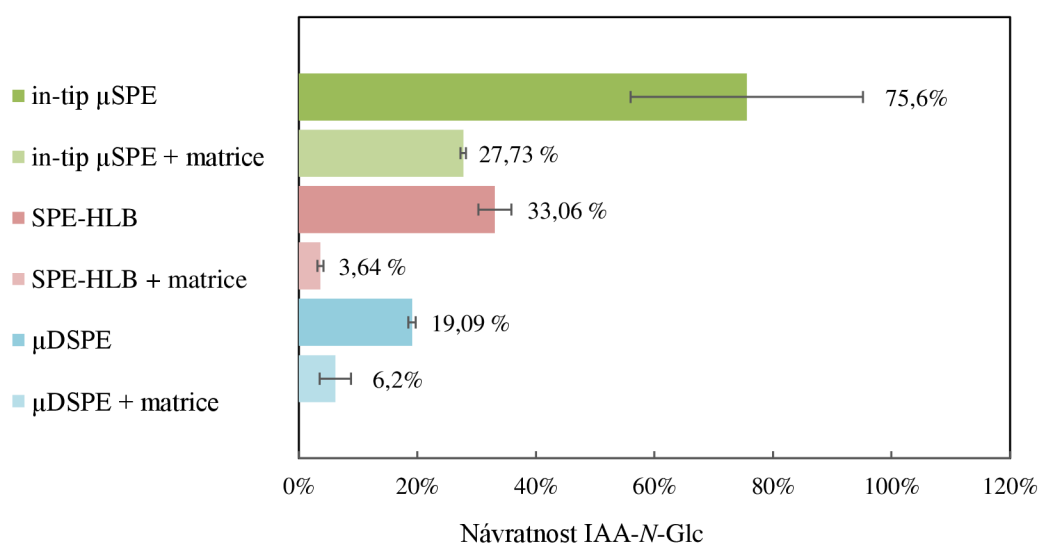
Obr. 4: Schéma fragmentace IAA-*N*-Glc. U jednotlivých fragmentů je uveden podíl jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ).

### 4.2 Test návratnosti IAA-*N*-Glc metodami extrakce na pevné fázi

Ke zvolení vhodné metody extrakce IAA-*N*-Glc z rostlinného materiálu byl proveden test návratnosti přidaného známého množství standardu IAA-*N*-Glc pomocí tří metod extrakce na pevné fázi (SPE). Jednotlivé metody byly vybrány na základě jejich ověřeného využití pro analýzu auxinů. Návratnost byla testována pomocí přídavku 5 pmol standardu IAA-*N*-Glc. Pro posouzení vlivu matrice na návratnost IAA-*N*-Glc byl standard přidáván k extraktu připraveného z 10 mg (FW) sedmidenních rostlin huseníčku rolního a také k samotnému extrakčnímu činidlu. Návratnost byla určena na základě porovnání plochy píků mezi purifikovanými vzorky a standardem, a následně byla vyjádřena v procentech.

První zvolenou metodou byla in-tip  $\mu$ SPE pro analýzu auxinů (dle Pěničik et al., 2018). Jako reverzní stacionární fáze byla využita kombinace SDB-XC Empore™ a C18 Empore™ sorbentů. Procentuální návratnost IAA-*N*-Glc extrahovaného spolu s rostlinným materiálem činila 27,73 % (Obr. 5). V provedení bez rostlinné matrice návratnost dosáhla 75,60 %. Druhou metodou byla konvenční SPE v kolonách dle protokolu pro analýzu IAA a jejích konjugátů, která využívá hydrofilně lipofilního sorbentu Waters Oasis® HLB (dle Novák et al., 2012). Návratnost přidaného IAA-*N*-Glc po extrakci s rostlinným materiálem činila pouhých 3,64 %. Bez matrice návratnost dosáhla 33,06 %. Poslední testovanou metodou byla disperzní  $\mu$ SPE dle protokolu pro izolaci auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové pomocí disperzního směsného sorbentu Oasis® MCX a Oasis® HLB (dle Petřík et al., nepublikováno). Návratnost extrakce s matricí dosahovala 6,20 %, bez matrice 19,09 %.

V experimentu se potvrdil silný matriční efekt rostlinného materiálu, který se projevil snížením návratnosti u všech testovaných protokolů. Jako nejvhodnější metoda pro izolaci IAA-*N*-Glc byla zvolena in-tip  $\mu$ SPE, jelikož její návratnost bez rostlinné matrice dvojnásobně převýšila návratnost SPE pomocí HLB kolonek a více než trojnásobně převýšila návratnost disperzní  $\mu$ SPE.



Obr. 5: Návratnost IAA-*N*-Glc (5 pmol) u různých metod purifikace (in-tip  $\mu$ SPE, kolonová SPE-HLB,  $\mu$ DSPE). Matrice představuje extrakt 10 mg FW huseničku rolního (Col-0). (Průměr  $\pm$  SD; n = 3)

### 4.3 Validace analytické metody pro stanovení IAA-*N*-Glc

Metoda pro stanovení IAA-*N*-Glc byla validována metodou standardního přidavku. K extraktům z 10 mg (FW) kotyledonu hrachu setého byl přidán standard IAA-*N*-Glc

v množství 5 a 20 pmol spolu se směsí izotopicky značených interních standardů ( $^{13}\text{C}_6$ ]IAA/IAA-Asp/IAA-Glc/IAA-Glu/oxIAA/oxIAA-Glc). Takto připravené vzorky byly purifikovány in-tip  $\mu\text{SPE}$  metodou vždy ve třech opakováních a následně byly analyzovány optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou. Pro kvantitativní stanovení IAA-*N*-Glc byla sestrojena pětibodová kalibrační řada v rozsahu 4,5 fmol – 45 pmol, kde každý kalibrační bod obsahoval IAA-*N*-Glc a směs výše zmíněných izotopicky značených IS v množství 0,5 pmol. Z důvodu nedostupnosti izotopicky značeného IAA-*N*-Glc bylo nutné zvolit jiný izotopicky značený IS, který je vhodný ke kvantifikaci IAA-*N*-Glc metodou izotopového zředování. Po odečtení endogenní hladiny IAA-*N*-Glc byla stanovena návratnost standardu a následně vypočítána systematická chyba (BIAS) a relativní směrodatná odchylka (RSD) s použitím různých izotopicky značených IS (Tab. 1).

Nejhorší analytické přesnosti bylo dosaženo při kvantifikaci IAA-*N*-Glc pomocí  $^{13}\text{C}_6$ ]IAA. Systematická chyba činila 329 % v případě přídatku 5 pmol a 214 % pro 20 pmol. Naopak výsledky stanovení pomocí  $^{13}\text{C}_6$ ]IAA-Glu byly zatíženy nejmenší chybou: BIAS i RSD při přídatku 5 i 20 pmol nepřesáhly 20 %.  $^{13}\text{C}_6$ ]IAA-Glu byl proto použit pro kvantitativní stanovení IAA-*N*-Glc v následujících analýzách.

Kvantifikace byla založena na logaritmicky transformované kalibrační křivce zkonstruované vynesemím odezvy kalibračních standardů (plocha analytu/plocha IS  $\times$  množství IS) proti známým koncentracím analytu. Z kalibrační křivky byl stanoven limit detekce IAA-*N*-Glc na 20 fmol (na nástřik) a lineární rozsah kalibrace, který se pohyboval v rozmezí 45 fmol až 45 pmol.

Tab. 1: Návratnost 5 a 20 pmol IAA-*N*-Glc, systematická chyba (BIAS) a relativní směrodatná odchylka (RSD) při použití různých izotopicky značených interních standardů. (Průměr  $\pm$  SD;  $n = 3$ )

Interní standard	5 pmol			20 pmol		
	pmol	BIAS (%)	RSD (%)	pmol	BIAS (%)	RSD (%)
$^{13}\text{C}_6$ ]IAA	21,4 $\pm$ 5,7	329	26	62,8 $\pm$ 13,4	214	21
$^{13}\text{C}_6$ ]IAA-Asp	6,4 $\pm$ 0,2	28	4	22,8 $\pm$ 2,8	14	12
$^{13}\text{C}_6$ ]IAA-Glu	5,3 $\pm$ 0,9	6	17	17,5 $\pm$ 2,3	-13	13
$^{13}\text{C}_6$ ]oxIAA	9,8 $\pm$ 2,5	96	25	36,2 $\pm$ 5,2	81	14
$^{13}\text{C}_6$ ]IAA-glc	5,3 $\pm$ 1,4	5	26	14,9 $\pm$ 3,1	-26	21
$^{13}\text{C}_6$ ]oxIAA-glc	3,9 $\pm$ 1,8	-22	47	16,5 $\pm$ 2,6	-17	16

## 4.4 Kvantitativní stanovení IAA-*N*-Glc v hrachu setém a huseníčku rolním

Optimalizovanou a validovanou metodou byl stanoven endogenní obsah IAA-*N*-Glc v hrachu setém a huseníčku rolním. Rostliny hrachu setého byly rozděleny na 3 části: kořen, kotyledon a prýt. V případě huseníčku rolního byly analyzovány celé rostliny. V hrachu byl *N*-glukosid IAA kvantifikován pouze v kotyledonu, kde jeho hladina dosáhla hodnoty  $650 \pm 67$  pmol/g FW (Tab. 2). Ve vegetativních orgánech hrachu a v sedmidenních rostlinách huseníčku byla jeho endogenní hladina pod limitem detekce.

Tab. 2: Množství IAA-*N*-Glc v orgánech hrachu setého a v huseníčku rolním [pmol/g FW]. *n. d.*, nedetekováno; *n. a.*, neanalyzováno.

	<i>Pisum sativum</i> L.	<i>A. thaliana</i> (Col-0)
<b>Prýt</b>	<i>n. d.</i>	<i>n. a.</i>
<b>Kotyledon</b>	$649,7 \pm 66,9$	<i>n. a.</i>
<b>Kořen</b>	<i>n. d.</i>	<i>n. a.</i>
<b>Prýt + kořen</b>	<i>n. a.</i>	<i>n. d.</i>

Pro potvrzení identity endogenního IAA-*N*-Glc byly porovnány chromatografické retenční časy v extraktu z kotyledonu hrachu setého, v extraktu s přidavkem standardu IAA-*N*-Glc a samotného standardu (Obr. Příloha 1).

## 4.5 Tvorba IAA-*N*-Glc po exogenní aplikaci IAA

Hladina IAA-*N*-Glc v hrachu byla stanovena pouze v kotyledonu, kde se předpokládá jeho zásobní funkce v době klíčení. Za účelem potvrdit jeho možnou roli v metabolické regulaci auxinové homeostázy během vegetativního vývoje rostliny byl analyzován obsah auxinových metabolitů v huseníčku a hrachu po exogenní aplikaci IAA. Rostliny byly inkubovány v tekutém médiu s  $0,5\mu\text{M}$  a  $5\mu\text{M}$  IAA po dobu 6 a 24 hodin.

U huseníčku rolního došlo již po 6-hodinové inkubaci semenáčků s  $0,5\mu\text{M}$  IAA k prudkému nárůstu hladin IAA-Asp a IAA-Glu (Tab. 3). Hladina aminokyselinových konjugátů při vyšší koncentraci IAA ( $5\mu\text{M}$ ) vzrostla o další řád. Stejnou měrou došlo ke dvojnásobnému nárůstu hladin těchto metabolitů i po 24-hodinové inkubaci. Po inkubaci ve vyšší koncentraci IAA byl detekován také IAA-Glc jak po 6, tak po 24 hodinách. Došlo



také k nárůstu hladiny oxIAA. Markantní nárůst hladiny byl zaznamenán také u konjugátu oxIAA-Glc. Ačkoliv IAA-N-Glc nebyl ani po 24-hodinové inkubaci v 5 $\mu$ M IAA detekován, nárůst hladin ostatních metabolitů značí funkčnost experimentu. Z výsledků vyplývá, že u huseníčku rolního pravděpodobně nehraje N-glukosylace významnou roli v metabolické regulaci fyziologické hladiny IAA.

Tab. 3: Hladiny IAA a jejich metabolitů v sedmidenních rostlinách huseníčku rolního po exogenní aplikaci IAA [pmol/g FW]. n. d., nedetekováno.

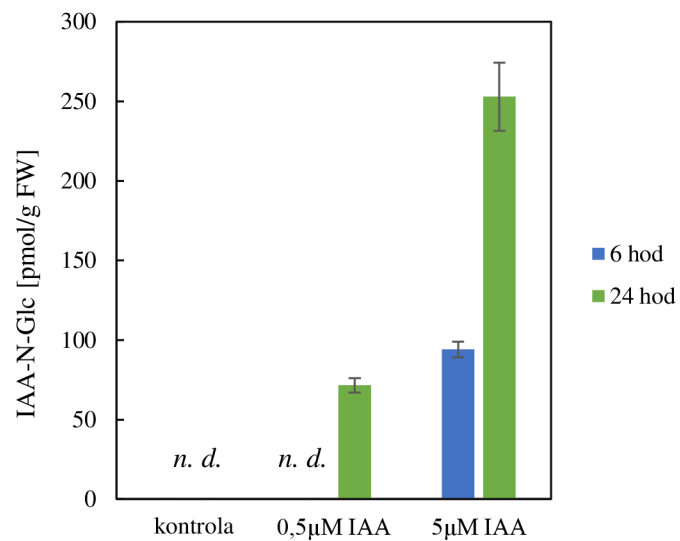
		<i>Arabidopsis thaliana</i> (Col-0)		
		Kontrola	0,5 $\mu$ M IAA	5 $\mu$ M IAA
6 hod	IAA	153,0 $\pm$ 17,1	581,2 $\pm$ 52,2	4 707,0 $\pm$ 659,3
	IAA-Asp	27,3 $\pm$ 3,3	14 140,1 $\pm$ 901,5	203 523,8 $\pm$ 23 632,0
	IAA-Glu	135,0 $\pm$ 12,9	3 710,6 $\pm$ 223,2	35 277,4 $\pm$ 3 912,1
	IAA-Glc	n. d.	n. d.	2 120,8 $\pm$ 348,4
	oxIAA	1 220,9 $\pm$ 62,9	2 887,8 $\pm$ 493,8	4 275,9 $\pm$ 464,9
	oxIAA-Glc	8 301,3 $\pm$ 554,7	18 613,7 $\pm$ 2 646,0	22 753,6 $\pm$ 3 014,3
	IAA-N-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
24 hod	IAA	114,7 $\pm$ 3,9	260,1 $\pm$ 20,0	1 355,0 $\pm$ 150,7
	IAA-Asp	31,8 $\pm$ 9,3	47 763,5 $\pm$ 5 134,9	415 621,7 $\pm$ 7 949,9
	IAA-Glu	116,8 $\pm$ 9,8	11 285,9 $\pm$ 563,4	73 368,2 $\pm$ 4 339,3
	IAA-Glc	n. d.	n. d.	1 294,6 $\pm$ 48,5
	oxIAA	814,3 $\pm$ 70,6	4 104,5 $\pm$ 464,1	5 826,4 $\pm$ 400,8
	oxIAA-Glc	6 222,9 $\pm$ 276,9	27 712,0 $\pm$ 1 146,4	43 197,9 $\pm$ 1 129,9
	IAA-N-Glc	n. d.	n. d.	n. d.

V případě hrachu byl obsah metabolitů po exogenní aplikaci IAA stanovován v kořenech a prýtech zvlášť. Zatímco v prýtech byl v rámci rozdílných experimentálních podmínek zaznamenán pouze minimální rozdíl v koncentracích metabolitů, v kořenech hrachu byl pozorován znatelný nárůst aminokonjugátů IAA-Asp a IAA-Glu po aplikaci IAA (Tab. 4). Nárůst koncentrace oxIAA byl zjištěn pouze u 5 $\mu$ M koncentrace IAA. Na rozdíl od huseníčku nebyl ani v jednom z vegetativních orgánů hrachu detekován oxIAA-Glc. V kořenech nebyla pozorována syntéza IAA-Glc v reakci na aplikaci exogenní IAA.

Tab. 4: Hladiny IAA a jejích metabolitů v sedmidenních rostlinách hrachu setého po exogenní aplikaci IAA [pmol/g FW]. n. d., nedetekováno.

		<i>Pisum sativum</i> L.		
		Kontrola	0,5μM IAA	5μM IAA
		<b>Prýt</b>		
6 hod	IAA	83,5 ± 15,9	106,4 ± 7,4	97,2 ± 4,6
	IAA-Asp	329,7 ± 13,2	573,0 ± 101,7	523,3 ± 5,3
	IAA-Glu	36,5 ± 4,4	46,0 ± 5,9	44,0 ± 2,8
	IAA-Glc	17,9 ± 1,5	23,4 ± 3,3	23,3 ± 0,9
	oxIAA	3,7 ± 0,8	6,1 ± 2,2	5,9 ± 1,5
	oxIAA-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
	IAA-N-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
24 hod	IAA	80,6 ± 12,7	105,6 ± 2,7	70,7 ± 16,7
	IAA-Asp	516,6 ± 65,4	410,3 ± 62,5	630,2 ± 152,7
	IAA-Glu	43,3 ± 1,4	39,5 ± 2,5	37,9 ± 6,3
	IAA-Glc	n. d.	14,4 ± 1,0	19,8 ± 1,5
	oxIAA	5,1 ± 0,6	4,4 ± 0,1	5,6 ± 0,3
	oxIAA-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
	IAA-N-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
		<b>Kořen</b>		
6 hod	IAA	23,5 ± 6,2	22,4 ± 6,0	65,5 ± 12,9
	IAA-Asp	59,4 ± 9,9	1 114,4 ± 213,3	31 220,7 ± 5 854,8
	IAA-Glu	128,3 ± 12,6	169,4 ± 15,8	972,3 ± 145,0
	IAA-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
	oxIAA	19,6 ± 1,9	19,3 ± 1,2	86,7 ± 7,6
	oxIAA-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
	IAA-N-Glc	n. d.	n. d.	94,1 ± 4,9
24 hod	IAA	49,0 ± 11,1	70,2 ± 20,1	119,3 ± 11,9
	IAA-Asp	91,6 ± 18,3	592,9 ± 102,0	37 510,4 ± 3 061,1
	IAA-Glu	132,5 ± 5,9	226,4 ± 46,6	1 697,6 ± 108,9
	IAA-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
	oxIAA	16,8 ± 3,2	18,4 ± 0,4	54,8 ± 5,1
	oxIAA-Glc	n. d.	n. d.	n. d.
	IAA-N-Glc	n. d.	71,6 ± 4,5	252,9 ± 21,3

V kořenech hrachu došlo v reakci na exogenní aplikaci IAA k nárůstu hladiny IAA-N-Glc nad limit detekce. Po 6 hodinách byl detekován pouze při 5μM IAA, kdy jeho hladina činila 94 pmol/g FW (Tab. 4). Po 24 hodinách inkubace byl N-glukosid detekován i při aplikaci 0,5μM IAA, a to v koncentraci 72 pmol/g FW. V případě 5μM IAA došlo k nárůstu koncentrace IAA-N-Glc po 24 hodinách na 253 pmol/g FW (Obr. 6). V prýtu nebyl N-glukosid detekován za žádných experimentálních podmínek.



Obr. 6: Hladiny IAA-N-Glc v kořeni hrachu setého po 6- a 24-hodinové inkubaci s IAA [pmol/g FW]. (Průměr ± SD; n =3). n. d., nedetekováno.

## 5 DISKUZE

Prvním cílem této práce byla optimalizace MS/MS metody pro stanovení IAA-*N*-Glc. Jelikož již dříve byl IAA-*N*-Glc stanoven u zástupců nahosemenných (jinanu dvoulaločného a borovice lesní) a jednoděložných rostlin (rýže seté a kukuřice seté), byla popsána jeho MS/MS fragmentace (Ljung et al., 2001, Kai et al., 2007b, Yin et al., 2021). Na základě poskytovaných fragmentů byly nastaveny MRM přechody, které byly dále optimalizovány. Pro kvantifikaci IAA-*N*-Glc byl zvolen MRM přechod 338 → 130 (m/z), který poskytoval nejvyšší odezvu (Obr. 4).

Druhým krokem experimentální části bylo vybrat vhodnou metodu extrakce a purifikace, která bude poskytovat co možná nejvyšší návratnost pro úspěšnou kvantifikaci IAA-*N*-Glc v rostlinných vzorcích. Byla testována návratnost 5 pmol IAA-*N*-Glc třemi metodami extrakce na pevné fázi (SPE). První z testovaných metod byla mikro-disperzní SPE ( $\mu$ DSPE) kombinující dva typy stacionárních fází (Oasis<sup>®</sup> MCX a Oasis<sup>®</sup> HLB), která byla vyvinutá pro analýzu auxinů a cytokininů (Petřík et al., nepublikováno). Přestože byla metoda optimalizována mimo jiné pro izolaci různých typů konjugátů IAA, v případě IAA-*N*-Glc byla dosažena návratnost metody v přítomnosti matrice pouze přibližně 6 % (Obr. 5). Další testovanou metodou byla konvenční SPE v kolonách se sorbentem Waters Oasis<sup>®</sup> HLB vyvinutá pro analýzu auxinů a jejich metabolitů (Novák et al., 2012). Návratnost s rostlinou matricí dosahovala ještě nižších hodnot ve srovnání s  $\mu$ DSPE, a to necelé 4 %. Třetí srovnávanou metodou byla in-tip  $\mu$ SPE umožňující rychlou analýzu IAA a jejich metabolitů z malého množství rostlinného materiálu pomocí stacionární fázi složené z C18 Empore<sup>™</sup> a SDB-XC Empore<sup>™</sup> (Pěncík et al., 2018). Její návratnost s matricí 28 % výrazně předčila zbylé dvě metody a byla zvolena jako nejvhodnější purifikační metoda pro izolaci IAA-*N*-Glc.

Analytická metoda pro stanovení IAA-*N*-Glc byla validována na vzorcích kotyledonu hrachu setého metodou standardního přídatku nezačteného standardu IAA-*N*-Glc v množství 5 a 20 pmol. Jelikož nebyl k dispozici izotopicky značený IAA-*N*-Glc, bylo jeho množství stanoveno metodou izotopového zředování s použitím [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]IAA-Glu, se kterým bylo dosaženo nejlepší analytické přesnosti ze všech testovaných IS. Systematická chyba (BIAS) a relativní směrodatná odchylka (RSD) na obou koncentračních hladinách nepřesahovala 20 % (Tab. 1).

Validovanou metodou byl IAA-*N*-Glc kvantifikován v sedmidenních rostlinách huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.; Col-0) a v kořenech, prýtech a kotyledonech stejně starých rostlin hrachu setého (*Pisum sativum* L. ssp. *arvense*). Přítomnost endogenního *N*-glukosidu IAA byla potvrzena pouze v kotyledonu hrachu, a to v množství 650 ± 67 pmol/g

FW (Tab. 2). Ve vegetativních orgánech hrachu a v huseníčku byly jeho hladiny pod limitem detekce.

Většina auxinového poolu v kotyledonech hrachu je přítomna ve formě aminokyselinových konjugátů, přičemž dominantně zastoupené jsou konjugáty oxIAA (Hladík et al, 2023). Překvapivě, glukosylestery IAA ani oxIAA nebyly v kotyledonech detekovány. Stanovené koncentrační zastoupení IAA-*N*-Glc v kotyledonu řádově odpovídá úrovni hladin amidokonjugátů IAA (Hladík et al, 2023). Přítomnost IAA-*N*-Glc v kotyledonech značí jeho zásobní funkci při klíčení semene. Využití IAA-*N*-Glc jako reverzibilního zásobního metabolitu v semeni bylo testováno a potvrzeno v borovici lesní (Ljung et al., 2001). V této studii byl zaznamenán postupný pokles hladiny IAA-*N*-Glc a nárůst hladiny volné IAA především během prvních dvou dnů klíčení. Pokles hladiny *N*-glukosidu IAA pokračoval do čtvrtého až šestého dne, kdy byly veškeré zásoby přeměněny na aktivní IAA. Právě spotřebováním zásobních forem IAA dochází k započetí *de novo* biosyntézy IAA a spuštění metabolismu kontrolujícího hladinu volné IAA. Přítomnost IAA-*N*-Glc v kotyledonech sedmidenních rostlin hrachu poukazuje na značnou různorodost metabolických drah napříč jednotlivými rostlinnými druhy a odlišnostmi v jejich vývoji. Zároveň je to poprvé, co byl IAA-*N*-Glc detekován a kvantifikován u zástupce dvouděložných rostlin.

Pro ověření, zda *N*-glukosid IAA může mít kromě zásobní funkce v semenech také inaktivační roli během vegetativního vývoje, byl proveden experiment, ve kterém byly rostliny huseníčku a hrachu inkubovány v médiu s přidanou IAA. Po 6 a 24 hodinách inkubace byla sledována změna koncentrací metabolitů IAA v reakci na exogenní suplementaci IAA. V huseníčku nebyl IAA-*N*-Glc detekován při žádné ze zvolených experimentálních podmínek (Tab. 3). Význam *N*-glukosylace jako nové inaktivační dráhy spoluutvářející homeostázu IAA tedy nebyl u huseníčku prokázán. K největšímu nárůstu hladiny při exogenní aplikaci IAA došlo v případě IAA-Asp, což bylo pozorováno u obou zvolených pokusných rostlin. Experiment potvrdil, že tvorba amidových konjugátů je majoritní inaktivační drahou u huseníčku rolního a většiny dvouděložných rostlin (Tam et al., 2000, Bajguz a Piotrowska, 2009). V huseníčku rolním bylo také potvrzeno významné zastoupení glukosylované oxIAA (Kai et al., 2007a, Hladík et al, 2023).

V hrachu byl nárůst hladin auxinových metabolitů po inkubaci v médiu s IAA pozorován pouze v kořenech, v prýtech k výraznějším změnám nedošlo (Tab. 4). Exogenní IAA byla nejspíše po jejím přijetí z média efektivně metabolizována přímo v kořenech, a tudíž nebyla do nadzemních částí vůbec transportována, nebo pouze v minimálním množství.

Na rozdíl od huseníčku, v hrachu byla po exogenní suplementaci IAA zjištěna tvorba IAA-*N*-Glc (Tab. 4). Byl také pozorován nárůst jeho hladiny v závislosti na rostoucí koncentraci IAA v médiu a také na čase inkubace (Obr. 6), což potvrzuje podíl *N*-glukosylace na inaktivaci exogenně aplikované IAA, a tedy zjevný význam této metabolické dráhy v utváření auxinové homeostáze v této modelové rostlině.

## 6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se věnovala studiu metabolismu IAA v huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana* L.; Col-0) a hrachu setém (*Pisum sativum* L. ssp. *arvense*). Mým cílem bylo optimalizovat analytickou metodu pro stanovení *N*-glukosidu IAA a s jejím použitím studovat výskyt a tvorbu IAA-*N*-Glc ve zmíněných modelových rostlinách.

Nejprve byl zvolen vhodný MRM přechod poskytující největší signál a následně optimalizovány parametry MS/MS metody. Dále byly testovány různé metody extrakce na pevné fázi a vybrána ta, která poskytovala nejvyšší návratnost IAA-*N*-Glc. Metoda byla validována metodou standardního přídatku.

Optimalizovanou a validovanou metodou HPLC-MS/MS byl kvantifikován IAA *N*-Glc v kotyledonu sedmidenních semenáčků hrachu, čímž byla potvrzena jeho zásobní funkce při klíčení. V huseníčku rolním nebyl *N*-glukosid IAA detekován. Pomocí exogenní aplikace IAA byla potvrzena inaktivační funkce IAA-*N*-Glc v kořeni hrachu setého. V huseníčku rolním po aplikaci IAA došlo k nárůstu hladin především amidových a oxidovaných metabolitů IAA, tvorba IAA-*N*-Glc však nebyla pozorována.

Získané výsledky poprvé potvrdily výskyt IAA-*N*-Glc u dvouděložných rostlin, tedy novou metabolickou dráhu IAA, která vede k hlubšímu porozumění složitěmu druhově závislému metabolismu IAA.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABBAS, Mohamad, Jorge HERNÁNDEZ-GARCÍA, Stephan POLLMANN, et al. Auxin methylation is required for differential growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2018, 2018-06-26, **115**(26), 6864-6869 [cit. 2023-12-02]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1806565115
- AOI, Yuki, Hayao HIRA, Yuya HAYAKAWA, et al. UDP-glucosyltransferase UGT84B1 regulates the levels of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2020a, **532**(2), 244-250 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.08.026
- AOI, Yuki, Keita TANAKA, Sam David COOK, Ken-Ichiro HAYASHI a Hiroyuki KASAHARA. GH3 Auxin-Amido Synthetases Alter the Ratio of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2020b, 2020-03-01, **61**(3), 596-605 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0032-0781. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcz223
- ARAGÓN, Isabel M., Isabel PÉREZ-MARTÍNEZ, Alba MORENO-PÉREZ, Miguel CERESO a Cayo RAMOS. New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2014, **356**(2), 184-192 [cit. 2023-11-27]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/1574-6968.12413
- BAJGUZ, Andrzej a Alicja PIOTROWSKA. Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* [online]. 2009, **70**(8), 957-969 [cit. 2023-11-28]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2009.05.006
- BANDURSKI, Robert S. a Aga SCHULZE. Concentration of Indole-3-acetic Acid and Its Derivatives in Plants. *Plant Physiology* [online]. 1977, 1977-08-01, **60**(2), 211-213 [cit. 2024-05-12]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.60.2.211
- BARBEZ, Elke, Kai DÜNSER, Angelika GAIDORA, Thomas LENDL a Wolfgang BUSCH. Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2017, 2017-06-13, **114**(24) [cit. 2023-11-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1613499114
- BASSUKAS, A.E. Lanassa, Yao XIAO a Claus SCHWECHHEIMER. Phosphorylation control of PIN auxin transporters. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 2022, **65** [cit. 2023-11-27]. ISSN 13695266. Dostupné z: doi:10.1016/j.pbi.2021.102146
- BIALEK, Krystyna a Jerry D. COHEN. Isolation and Partial Characterization of the Major Amide-Linked Conjugate of Indole-3-Acetic Acid from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* [online]. 1986, 1986-01-01, **80**(1), 99-104 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.80.1.99
- BIELESKI, R.L. The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* [online]. 1964, **9**(4), 431-442 [cit. 2024-05-05]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(64)90204-0
- BRAZIER-HICKS, Melissa, Wendy A. OFFEN, Markus C. GERSHATER, Timothy J. REVETT, Eng-Kiat LIM, Dianna J. BOWLES, Gideon J. DAVIES a Robert EDWARDS. Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-



- glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, 2007-12-18, **104**(51), 20238-20243 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0706421104
- BRUNONI, Federica, Aleš PĚNČÍK, Asta ŽUKAUSKAITĖ, Anita AMENT, Martina KOPEČNÁ, Silvio COLLANI, David KOPEČNÝ a Ondřej NOVÁK. Amino acid conjugation of oxIAA is a secondary metabolic regulation involved in auxin homeostasis. *New Phytologist* [online]. 2023, **238**(6), 2264-2270 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.18887
- BRUNONI, Federica, Silvio COLLANI, Rubén CASANOVA-SÁEZ, Jan ŠIMURA, Michal KARADY, Markus SCHMID, Karin LJUNG a Catherine BELLINI. Conifers exhibit a characteristic inactivation of auxin to maintain tissue homeostasis. *New Phytologist* [online]. 2020, **226**(6), 1753-1765 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.16463
- DU, Fuyou, Guihua RUAN a Huwei LIU. Analytical methods for tracing plant hormones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **403**(1), 55-74 [cit. 2024-05-06]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5623-x
- DWIVEDI, Somya, Radomira VANKOVÁ, Vaclav MOTYKA, Carmen HERRERA, Eva ZIZKOVA a Carol AUER. Characterization of *Arabidopsis thaliana* mutant ror-1 (roscovitine-resistant) and its utilization in understanding of the role of cytokinin N-glucosylation pathway in plants. *Plant Growth Regulation* [online]. 2010, **61**(3), 231-242 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0167-6903. Dostupné z: doi:10.1007/s10725-010-9467-8
- ENDERS, Tara A., Elizabeth M. FRICK a Lucia C. STRADER. An *Arabidopsis* kinase cascade influences auxin-responsive cell expansion. *The Plant Journal* [online]. 2017, **92**(1), 68-81 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.13635
- ERNSTEN, Arild, Göran SANDBERG a Alan CROZIER. Effects of sodium diethyldithiocarbamate, solvent, temperature and plant extracts on the stability of indoles. *Physiologia Plantarum* [online]. 1986, **68**(3) [cit. 2024-03-31]. ISSN 0031-9317. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3054.1986.tb03391.x
- FERARU, Elena, Mugurel I. FERARU, Jeanette MOULINIER-ANZOLA, et al. PILS proteins provide a homeostatic feedback on auxin signaling output. *Development* [online]. 2022, 2022-07-01, **149**(13) [cit. 2023-11-28]. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.200929
- FRIML, Jiří. Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. *European Journal of Cell Biology* [online]. 2010, **89**(2-3), 231-235 [cit. 2024-03-12]. ISSN 01719335. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejcb.2009.11.003
- FU, JiHong, XiaoHong SUN, JiDe WANG, JinFang CHU a CunYu YAN. Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* [online]. 2011, **56**(4-5), 355-366 [cit. 2024-03-31]. ISSN 1001-6538. Dostupné z: doi:10.1007/s11434-010-4243-8
- FUKUI, Kosuke, Kazushi ARAI, Yuka TANAKA, et al. Chemical inhibition of the auxin inactivation pathway uncovers the roles of metabolic turnover in auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2022, 2022-08-09, **119**(32) [cit. 2023-11-29]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2206869119

- HALL, J. Prudence. Indole-3-acetyl-myoinositol in kernels of *Oryza sativa*. *Phytochemistry* [online]. 1980, **19**(10), 2121-2123 [cit. 2023-11-28]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(00)82206-2
- HARRISON, S.T.L. Cell Disruption. *Comprehensive Biotechnology* [online]. Elsevier, 2011, 619-640 [cit. 2024-05-05]. ISBN 9780080885049. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00127-6
- HAYASHI, Ken-ichiro, Kazushi ARAI, Yuki AOI, et al. The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications* [online]. 2021, **12**(1) [cit. 2023-11-28]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-27020-1
- HLADÍK, Pavel, Ivan PETŘÍK, Asta ŽUKAUSKAITĖ, Ondřej NOVÁK a Aleš PĚNČÍK. Metabolic profiles of 2-oxindole-3-acetyl-amino acid conjugates differ in various plant species. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2023, 2023-7-18, **14** [cit. 2023-11-26]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2023.1217421
- HOU, Bingkai, Eng-Kiat LIM, Gillian S. HIGGINS a Dianna J. BOWLES. N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(46), 47822-47832 [cit. 2023-11-29]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M409569200
- CHEN, Lu, Xu-Xu HUANG, Yan-Jie LI a Bing-Kai HOU. Glycosyltransferase UGT76F1 is involved in the temperature-mediated petiole elongation and the BR-mediated hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* [online]. 2020, 2020-08-02, **15**(8), 1777377 [cit. 2024-03-29]. ISSN 1559-2324. Dostupné z: doi:10.1080/15592324.2020.1777377
- CHEN, Yi, Zhenpeng GUO, Xiaoyu WANG a Changgui QIU. Sample preparation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1184**(1-2), 191-219 [cit. 2024-05-06]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.10.026
- CHENG, Jin-Tang, Cong GUO, Wen-Jin CUI, et al. Isolation of two rare N-glycosides from *Ginkgo biloba* and their anti-inflammatory activities. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2023-11-29]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-62884-1
- CHUA, N.-H., A. M. HETHERINGTON, R. HOOLEY, R. F. IRVINE, Malcolm J. BENNETT, Alan MARCHANT, Sean T. MAY a Ranjan SWARUP. Going the distance with auxin: unravelling the molecular basis of auxin transport. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. 1998, 1998-09-29, **353**(1374), 1511-1515 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.1998.0306
- ISHIMARU, Ken, Naoki HIROTSU, Yuka MADOKA, et al. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nature Genetics* [online]. 2013, **45**(6), 707-711 [cit. 2023-11-29]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng.2612
- ISOBE, Takuya a Hisashi MIYAGAWA. Facilitation of auxin biosynthesis and metabolism by salt stress in rice plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2022, 2022-05-17 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1347-6947. Dostupné z: doi:10.1093/bbb/zbac070

- IZUMI, Yoshihiro, Atsushi OKAZAWA, Takeshi BAMBA, Akio KOBAYASHI a Eiichiro FUKUSAKI. Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **648**(2), 215-225 [cit. 2024-05-05]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.07.001
- JACKSON, Rosamond G., Eng-Kiat LIM, Yi LI, Mariusz KOWALCZYK, Göran SANDBERG, Jim HOGGETT, David A. ASHFORD a Dianna J. BOWLES. Identification and Biochemical Characterization of an Arabidopsis Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, **276**(6), 4350-4356 [cit. 2023-11-29]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M006185200
- JACKSON, Rosamond G., Mariusz KOWALCZYK, Yi LI, Gillian HIGGINS, Joe ROSS, Göran SANDBERG a Dianna J. BOWLES. Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *The Plant Journal* [online]. 2002, **32**(4), 573-583 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01445.x
- JAIN, Mukesh a Jitendra P. KHURANA. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *The FEBS Journal* [online]. 2009, **276**(11), 3148-3162 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1742-464X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07033.x
- JAKUBOWSKA, Anna a Stanisław KOWALCZYK. A specific enzyme hydrolyzing 6-O(4-O)-indole-3-ylacetyl- $\beta$ -d-glucose in immature kernels of *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2005, **162**(2), 207-213 [cit. 2023-11-28]. ISSN 01761617. Dostupné z: doi:10.1016/j.jplph.2004.05.015
- JIN, Shang-Hui, Xin-Mei MA, Ping HAN, et al. UGT74D1 Is a Novel Auxin Glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* [online]. 2013, 2013-4-16, **8**(4) [cit. 2023-11-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0061705
- JONES, Patrick a Thomas VOGT. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* [online]. 2001, **213**(2), 164-174 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/s004250000492
- KAI, Kenji, Junko HORITA, Kyo WAKASA a Hisashi MIYAGAWA. Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* [online]. 2007a, **68**(12), 1651-1663 [cit. 2023-11-28]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2007.04.030
- KAI, Kenji, Kyo WAKASA a Hisashi MIYAGAWA. Metabolism of indole-3-acetic acid in rice: Identification and characterization of N- $\beta$ -d-glucopyranosyl indole-3-acetic acid and its conjugates. *Phytochemistry* [online]. 2007b, **68**(20), 2512-2522 [cit. 2023-11-26]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2007.05.040
- KAMIMOTO, Yoshihisa, Kazuyoshi TERASAKA, Masafumi HAMAMOTO, et al. Arabidopsis ABCB21 is a Facultative Auxin Importer/Exporter Regulated by Cytoplasmic Auxin Concentration. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2012, 2012-12-01, **53**(12), 2090-2100 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1471-9053. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcs149

- KASAHARA, Hiroyuki. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2016, 2016-01-02, **80**(1), 34-42 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2015.1086259
- KINOSHITA, Natsuko, Huan WANG, Hiroyuki KASAHARA, et al. IAA-Ala Resistant3, an Evolutionarily Conserved Target of miR167, Mediates Arabidopsis Root Architecture Changes during High Osmotic Stress. *The Plant Cell* [online]. 2012, 2012-09-01, **24**(9), 3590-3602 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.112.097006
- KORASICK, David A., Tara A. ENDERS a Lucia C. STRADER. Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2013, 2013-6-01, **64**(9), 2541-2555 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/ert080
- KOWALCZYK, Mariusz a Göran SANDBERG. Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid Metabolites in Arabidopsis. *Plant Physiology* [online]. 2001, 2001-12-01, **127**(4), 1845-1853 [cit. 2024-04-02]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.010525
- KREPLAK, Jonathan, Mohammed-Amin MADOU, Petr CÁPAL, et al. A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nature Genetics* [online]. 2019, **51**(9), 1411-1422 [cit. 2024-03-29]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/s41588-019-0480-1
- KUBEŠ, Martin, Haibing YANG, Gregory L. RICHTER, et al. The Arabidopsis concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *The Plant Journal* [online]. 2012, **69**(4), 640-654 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04818.x
- LECLERE, Sherry, Rosie TELLEZ, Rebekah A. RAMPEY, Seiichi P.T. MATSUDA a Bonnie BARTEL. Characterization of a Family of IAA-Amino Acid Conjugate Hydrolases from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(23), 20446-20452 [cit. 2023-11-28]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111955200
- LEE, Minyoung, Jae-Hoon JUNG, Doo-Yeol HAN, Pil Joon SEO, Woong June PARK a Chung-Mo PARK. Activation of a flavin monooxygenase gene YUCCA7 enhances drought resistance in Arabidopsis. *Planta* [online]. 2012, **235**(5), 923-938 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/s00425-011-1552-3
- LEYSER, Ottoline. Dynamic Integration of Auxin Transport and Signalling. *Current Biology* [online]. 2006, **16**(11), R424-R433 [cit. 2023-11-27]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2006.05.014
- LI, Linchuan, Xianhui HOU, Tomohiko TSUGE, et al. The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* [online]. 2008, **27**(3), 575-584 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0721-7714. Dostupné z: doi:10.1007/s00299-007-0458-9
- LIM, Eng-Kiat, Charlotte J. DOUCET, Bingkai HOU, Rosamond G. JACKSON, Suzanne R. ABRAMS a Dianna J. BOWLES. Resolution of (+)-abscisic acid using an Arabidopsis glycosyltransferase. *Tetrahedron: Asymmetry* [online]. 2005, **16**(1), 143-147 [cit. 2023-11-29]. ISSN 09574166. Dostupné z: doi:10.1016/j.tetasy.2004.11.062
- LIU, Qian, Ting-Ting CHEN, Dong-Wang XIAO, Shu-Man ZHAO, Ji-Shan LIN, Ting WANG, Yan-Jie LI a Bing-Kai HOU. OsIAGT1 Is a Glucosyltransferase Gene

- Involved in the Glucose Conjugation of Auxins in Rice. *Rice* [online]. 2019, **12**(1) [cit. 2023-11-29]. ISSN 1939-8425. Dostupné z: doi:10.1186/s12284-019-0357-z
- LJUNG, Karin, Anders ÖSTIN, Laetitia LIOUSSANNE a Göran SANDBERG. Developmental Regulation of Indole-3-Acetic Acid Turnover in Scots Pine Seedlings. *Plant Physiology* [online]. 2001, 2001-01-01, **125**(1), 464-475 [cit. 2023-11-29]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.125.1.464
- LUDWIG-MÜLLER, Jutta. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2011, 2011-03-01, **62**(6), 1757-1773 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/erq412
- MAEDA, Hiroshi a Natalia DUDAREVA. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 2012, 2012-06-02, **63**(1), 73-105 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1543-5008. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105439
- MASHIGUCHI, Kiyoshi, Hiroshi HISANO, Noriko TAKEDA-KAMIYA, et al. *Agrobacterium tumefaciens* Enhances Biosynthesis of Two Distinct Auxins in the Formation of Crown Galls. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2019, 2019-01-01, **60**(1), 29-37 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0032-0781. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcy182
- MASHIGUCHI, Kiyoshi, Keita TANAKA, Tatsuya SAKAI, et al. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, 2011-11-08, **108**(45), 18512-18517 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1108434108
- MATSUDA, Fumio, Haruna MIYAZAWA, Kyo WAKASA a Hisashi MIYAGAWA. Quantification of Indole-3-Acetic Acid and Amino Acid Conjugates in Rice by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2005, **69**(4), 778-783 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1271/bbb.69.778
- MCDOUGALL, J. a J. R. HILLMAN. Purification of IAA from Shoot Tissues of *Phaseolus vulgaris* and its Analysis by GC-MS. *Journal of Experimental Botany* [online]. 1978, **29**(2), 375-386 [cit. 2024-05-05]. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/29.2.375
- MEECH, Robyn a Peter I. MACKENZIE. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *STRUCTURE AND FUNCTION OF URIDINE DIPHOSPHATE GLUCURONOSYLTRANSFERASES*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [online]. 1997, **24**(12), 907-915 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0305-1870. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1681.1997.tb02718.x
- MIDDLETON, Alistair M., Cristina DAL BOSCO, Phillip CHLAP, et al. Data-Driven Modeling of Intracellular Auxin Fluxes Indicates a Dominant Role of the ER in Controlling Nuclear Auxin Uptake. *Cell Reports* [online]. 2018, **22**(11), 3044-3057 [cit. 2023-11-28]. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2018.02.074
- MRAVEC, Jozef, Petr SKŮPA, Aurélien BAILLY, et al. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* [online]. 2009, **459**(7250), 1136-1140 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08066

- MÜLLER, Karel, Petre Ivanov DOBREV, Aleš PĚNČÍK, et al. DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 catalyzes the oxidation of IAA amino acid conjugates. *Plant Physiology* [online]. 2021, 2021-09-01, **187**(1), 103-115 [cit. 2023-11-26]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1093/plphys/kiab242
- NAEGELI, Andreas, Gaëlle MICHAUD, Mario SCHUBERT, Chia-Wei LIN, Christian LIZAK, Tamis DARBRE, Jean-Louis REYMOND a Markus AEBI. Substrate Specificity of Cytoplasmic N-Glycosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, **289**(35), 24521-24532 [cit. 2023-11-29]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.579326
- NORMANLY, J, J D COHEN a G R FINK. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1993, **90**(21), 10355-10359 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.90.21.10355
- NOVÁK, Ondřej, Eva HĚNYKOVÁ, Ilkka SAIRANEN, Mariusz KOWALCZYK, Tomáš POSPÍŠIL a Karin LJUNG. Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *The Plant Journal* [online]. 2012, **72**(3), 523-536 [cit. 2024-03-12]. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05085.x
- OKRENT, Rachel A. a Mary C. WILDERMUTH. Evolutionary history of the GH3 family of acyl adenylases in rosids. *Plant Molecular Biology* [online]. 2011, **76**(6), 489-505 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0167-4412. Dostupné z: doi:10.1007/s11103-011-9776-y
- OLATUNJI, Damilola, Danny GEELEN a Inge VERSTRAETEN. Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(12) [cit. 2023-11-29]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18122587
- ÖSTIN, Anders, Ana Maria MONTEIRO, Alan CROZIER, Einar JENSEN a Göran SANDBERG. Analysis of Indole-3-Acetic Acid Metabolites from *Dalbergia dolichopetala* by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Plant Physiology* [online]. 1992, 1992-09-01, **100**(1), 63-68 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.100.1.63
- ÖSTIN, Anders, Mariusz KOWALYCZK, Rishikesh P. BHALERAO a Göran SANDBERG. Metabolism of Indole-3-Acetic Acid in *Arabidopsis*1. *Plant Physiology* [online]. 1998, 1998-09-01, **118**(1), 285-296 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.118.1.285
- OSTROWSKI, Maciej a Anna JAKUBOWSKA. Udp-Glycosyltransferases of Plant Hormones. *Advances in Cell Biology* [online]. 2014, 2014-3-1, **4**(1), 43-60 [cit. 2023-11-29]. ISSN 2080-2218. Dostupné z: doi:10.2478/acb-2014-0003
- PAN, Xiangqing a Xuemin WANG. Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(26), 2806-2813 [cit. 2024-05-05]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.04.024
- PATTEN, Cheryl L., Andrew J. C. BLAKNEY a Thomas J. D. COULSON. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2012, 2012-09-14, **39**(4), 395-415 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.3109/1040841X.2012.716819

- PAVLOVÁ, Libuše a Lukáš FISCHER. Růst a vývoj rostlin. 1. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1913-2.
- PĚNČÍK, Aleš, Biljana SIMONOVIK, Sara V. PETERSSON, et al. Regulation of Auxin Homeostasis and Gradients in Arabidopsis Roots through the Formation of the Indole-3-Acetic Acid Catabolite 2-Oxindole-3-Acetic Acid. *The Plant Cell* [online]. 2013, 2013-11-27, **25**(10), 3858-3870 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1040-4651. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.113.114421
- PĚNČÍK, Aleš, Jakub ROLČÍK, Ondřej NOVÁK, Volker MAGNUS, Petr BARTÁK, Roman BUCHTIK, Branka SALOPEK-SONDI a Miroslav STRNAD. Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta* [online]. 2009, **80**(2), 651-655 [cit. 2023-11-28]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2009.07.043
- PĚNČÍK, Aleš, Rubén CASANOVA-SÁEZ, Veronika PILAŘOVÁ, Asta ŽUKAUSKAITĖ, Rui PINTO, José Luis MICOL, Karin LJUNG a Ondřej NOVÁK. Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2018, 2018-04-27, **69**(10), 2569-2579 [cit. 2024-03-12]. ISSN 0022-0957. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/ery084
- PETRÁŠEK, Jan a Jiří FRIML. Auxin transport routes in plant development. *Development* [online]. 2009, 2009-08-15, **136**(16), 2675-2688 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.030353
- PETRÁŠEK, Jan, Jozef MRAVEC, Rodolphe BOUCHARD, et al. PIN Proteins Perform a Rate-Limiting Function in Cellular Auxin Efflux. *Science* [online]. 2006, 2006-05-12, **312**(5775), 914-918 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1123542
- PORCO, Silvana, Aleš PĚNČÍK, Afaf RASHED, et al. Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, 2016-09-27, **113**(39), 11016-11021 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1604375113
- PORFÍRIO, Sara, Marco D.R. GOMES DA SILVA, Augusto PEIXE, Maria J. CABRITA a Parastoo AZADI. Current analytical methods for plant auxin quantification – A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **902**, 8-21 [cit. 2024-05-05]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.10.035
- PRIEST, David M., Stephen J. AMBROSE, Fabián E. VAISTIJ, Luisa ELIAS, Gillian S. HIGGINS, Andrew R. S. ROSS, Suzanne R. ABRAMS a Dianna J. BOWLES. Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* [online]. 2006, **46**(3), 492-502 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02701.x
- QIN, Genji, Hongya GU, Yunde ZHAO, et al. An Indole-3-Acetic Acid Carboxyl Methyltransferase Regulates Arabidopsis Leaf Development. *The Plant Cell* [online]. 2005, 2005-10-01, **17**(10), 2693-2704 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.105.034959
- RANOCHA, Philippe, Oana DIMA, Réka NAGY, et al. Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nature Communications* [online]. 2013, 2013-12-20, **4**(1) [cit. 2023-11-28]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms3625

- RAVEN, J. A. Transport of indolacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist* [online]. 1975, **74**(2), 163-172 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.1975.tb02602.x
- RUBERY, P. H. a A. R. SHELDRAKE. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* [online]. 1974, **118**(2), 101-121 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/BF00388387
- SANDBERG, Göran, Arild ERNSTSEN a Marianne HAMNEDE. Dynamics of indole-3-acetic acid and indole-3-ethanol during development and germination of *Pinus sylvestris* seeds. *Physiologia Plantarum* [online]. 1987, **71**(4), 411-418 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0031-9317. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3054.1987.tb02876.x
- SHIMIZU-MITAO, Yasushi a Tatsuo KAKIMOTO. Auxin Sensitivities of All Arabidopsis Aux/IAAs for Degradation in the Presence of Every TIR1/AFB. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2014, 2014-08-01, **55**(8), 1450-1459 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1471-9053. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcu077
- STASWICK, Paul E. The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *Plant Physiology* [online]. 2009, 2009-07-01, **150**(3), 1310-1321 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.109.138529
- STASWICK, Paul E., Bogdan SERBAN, Martha ROWE, Iskender TIRYAKI, Marién T. MALDONADO, Mitsa C. MALDONADO a Walter SUZA. Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *The Plant Cell* [online]. 2005, 2005-02-01, **17**(2), 616-627 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.104.026690
- STEPANOVA, Anna N., Jeonga YUN, Linda M. ROBLES, Ondrej NOVAK, Wenrong HE, Hongwei GUO, Karin LJUNG a Jose M. ALONSO. The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase Functions in the Indole-3-Pyruvic Acid Branch of Auxin Biosynthesis. *The Plant Cell* [online]. 2011, 2011-11-01, **23**(11), 3961-3973 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.111.088047
- SUGAWARA, Satoko, Kiyoshi MASHIGUCHI, Keita TANAKA, et al. Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2015, 2015-08-03, **56**(8), 1641-1654 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0032-0781. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcv088
- SUGAWARA, Satoko, Shojiro HISHIYAMA, Yusuke JIKUMARU, et al. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, 2009-03-31, **106**(13), 5430-5435 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0811226106
- SUNDBERG, Björn. Influence of extraction solvent (buffer, methanol, acetone) and time on the quantification of indole-3-acetic acid in plants. *Physiologia Plantarum* [online]. 1990, **78**(2), 293-297 [cit. 2024-03-31]. ISSN 0031-9317. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-3054.1990.tb02094.x
- SVACHINOVÁ, Jana, Ondřej NOVÁK, Lenka PLAČKOVÁ, René LENOBEL, Josef HOLÍK, Miroslav STRNAD a Karel DOLEŽAL. A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction.



Plant Methods [online]. 2012, **8**(1) [cit. 2024-05-05]. ISSN 1746-4811. Dostupné z: doi:10.1186/1746-4811-8-17

SZERSZEN, Jędrzej B., Krzysztof SZCZYGLÓWSKI a Robert S. BANDURSKI. Jaglu, a Gene from *Zea mays* Involved in Conjugation of Growth Hormone Indole-3-Acetic Acid. *Science* [online]. 1994, 1994-09-16, **265**(5179), 1699-1701 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.8085154

ŠIROKÁ, Jitka, Federica BRUNONI, Aleš PĚNČÍK, Václav MIK, Asta ŽUKAUSKAITĚ, Miroslav STRNAD, Ondřej NOVÁK a Kristýna FLOKOVÁ. High-throughput interspecies profiling of acidic plant hormones using miniaturised sample processing. *Plant Methods* [online]. 2022, **18**(1) [cit. 2024-05-13]. ISSN 1746-4811. Dostupné z: doi:10.1186/s13007-022-00954-3

ŠMEHILOVÁ, Mária, Jana DOBRŮŠKOVÁ, Ondřej NOVÁK, Tomáš TAKÁČ a Petr GALUSZKA. Cytokinin-Specific Glycosyltransferases Possess Different Roles in Cytokinin Homeostasis Maintenance. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, 2016-08-23, **7** [cit. 2023-11-29]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2016.01264

TAKUBO, Eiko, Makoto KOBAYASHI, Shoko HIRAI, et al. Role of Arabidopsis INDOLE-3-ACETIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE 1 in auxin metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2020, **527**(4), 1033-1038 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.05.031

TAM, Yuen Yee, Ephraim EPSTEIN a Jennifer NORMANLY. Characterization of Auxin Conjugates in Arabidopsis. Low Steady-State Levels of Indole-3-Acetyl-Aspartate, Indole-3-Acetyl-Glutamate, and Indole-3-Acetyl-Glucose. *Plant Physiology* [online]. 2000, 2000-06-01, **123**(2), 589-596 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.123.2.589

TANAKA, Keita, Ken-ichiro HAYASHI, Masahiro NATSUME, Yuji KAMIYA, Hitoshi SAKAKIBARA, Hiroshi KAWAIDE a Hiroyuki KASAHARA. UGT74D1 Catalyzes the Glucosylation of 2-Oxindole-3-Acetic Acid in the Auxin Metabolic Pathway in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2014, 2014-1-01, **55**(1), 218-228 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1471-9053. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pct173

TARKOWSKÁ, Danuše, Ondřej NOVÁK, Kristýna FLOKOVÁ, Petr TARKOWSKI, Veronika TUREČKOVÁ, Jiří GRŮZ, Jakub ROLČÍK a Miroslav STRNAD. Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* [online]. 2014, **240**(1), 55-76 [cit. 2024-05-05]. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/s00425-014-2063-9

TEICHERT, Axel, Jürgen SCHMIDT, Andrea PORZEL, Norbert ARNOLD a Ludger WESSJOHANN. N -Glucosyl-1 H -indole Derivatives from *Cortinarius brunneus* (Basidiomycetes). *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2008, **5**(4), 664-669 [cit. 2023-11-29]. ISSN 1612-1872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.200890062

TOGNETTI, Vanesa B., Oliver VAN AKEN, Kris MORREEL, et al. Perturbation of Indole-3-Butyric Acid Homeostasis by the UDP-Glucosyltransferase UGT74E2 Modulates Arabidopsis Architecture and Water Stress Tolerance. *The Plant Cell* [online]. 2010, 2010-08-01, **22**(8), 2660-2679 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1532-298X. Dostupné z: doi:10.1105/tpc.109.071316

- UNG, Kien Lam, Mikael WINKLER, Lukas SCHULZ, et al. Structures and mechanism of the plant PIN-FORMED auxin transporter. *Nature* [online]. 2022, 2022-09-15, **609**(7927), 605-610 [cit. 2024-04-02]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-022-04883-y
- VČELAŘOVÁ, Ludmila, Vladimír SKALICKÝ, Ivo CHAMRÁD, René LENOBEL, Martin F. KUBEŠ, Aleš PĚNČÍK a Ondřej NOVÁK. Auxin Metabolome Profiling in the Arabidopsis Endoplasmic Reticulum Using an Optimised Organelle Isolation Protocol. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(17) [cit. 2023-11-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22179370
- VEACH, Yeonjin K., Ruth C. MARTIN, David W.S. MOK, Jiri MALBECK, Radomira VANKOVA a Machteld C. MOK. O -Glucosylation of cis-Zeatin in Maize. Characterization of Genes, Enzymes, and Endogenous Cytokinins. *Plant Physiology* [online]. 2003, 2003-03-01, **131**(3), 1374-1380 [cit. 2023-11-29]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.017210
- WANG, Xiaoqiang. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Letters* [online]. 2009, 2009-10-20, **583**(20), 3303-3309 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2009.09.042
- WENT, F.W. and THIMANN, K.V. (1937) *Phytohormones*. The Macmillan Company, New York.
- WON, Christina, Xiangling SHEN, Kiyoshi MASHIGUCHI, et al. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, 2011-11-08, **108**(45), 18518-18523 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1108436108
- WRIGHT, Allen D., Michael B. SAMPSON, M. Gerald NEUFFER, Lech MICHALCZUK, Janet Pernise SLOVIN a Jerry D. COHEN. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in the Mutant Maize orange pericarp , a Tryptophan Auxotroph. *Science* [online]. 1991, 1991-11-15, **254**(5034), 998-1000 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.254.5034.998
- YAMAMOTO, Yuko, Noriko KAMIYA, Yoichi MORINAKA, Makoto MATSUOKA a Takashi SAZUKA. Auxin Biosynthesis by the YUCCA Genes in Rice. *Plant Physiology* [online]. 2007, 2007-03-01, **143**(3), 1362-1371 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.106.091561
- YANG, Yue, Richard XU, Choong-je MA, A. Corina VLOT, Daniel F. KLESSIG a Eran PICHERSKY. Inactive Methyl Indole-3-Acetic Acid Ester Can Be Hydrolyzed and Activated by Several Esterases Belonging to the At MES Esterase Family of Arabidopsis . *Plant Physiology* [online]. 2008, 2008-07-01, **147**(3), 1034-1045 [cit. 2023-11-28]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.108.118224
- YIN, Qinggang, Jing ZHANG, Shuhui WANG, et al. N-glycosyltransferase GbNGT1 from ginkgo complements the auxin metabolic pathway. *Horticulture Research* [online]. 2021, **8**(1), 229 [cit. 2023-11-27]. ISSN 2662-6810. Dostupné z: doi:10.1038/s41438-021-00658-0
- YU, Jingyin, Fan HU, Komivi DOSSA, Zhaokai WANG a Tao KE. Genome-wide analysis of UDP-glycosyltransferase super family in Brassica rapa and Brassica oleracea reveals its

evolutionary history and functional characterization. *BMC Genomics* [online]. 2017, **18**(1) [cit. 2023-11-29]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-017-3844-x

YU, Yongqiang, Wenxin TANG, Wenwei LIN, et al. ABLs and TMKs are co-receptors for extracellular auxin. *Cell* [online]. 2023, **186**(25), 5457-5471.e17 [cit. 2024-05-12]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2023.10.017

ZHANG, Yi, Yuanwen LI, Yuling HU, Gongke LI a Yueqin CHEN. Preparation of magnetic indole-3-acetic acid imprinted polymer beads with 4-vinylpyridine and  $\beta$ -cyclodextrin as binary monomer via microwave heating initiated polymerization and their application to trace analysis of auxins in plant tissues. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(47), 7337-7344 [cit. 2024-05-14]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2010.09.059

ZHAO, Yunde, Anna K. HULL, Neeru R. GUPTA, et al. Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development* [online]. 2002, 2002-12-01, **16**(23), 3100-3112 [cit. 2023-11-27]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1035402

ZHAO, Zhigang, Yunhui ZHANG, Xi LIU, et al. A Role for a Dioxygenase in Auxin Metabolism and Reproductive Development in Rice. *Developmental Cell* [online]. 2013, **27**(1), 113-122 [cit. 2023-11-28]. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2013.09.005

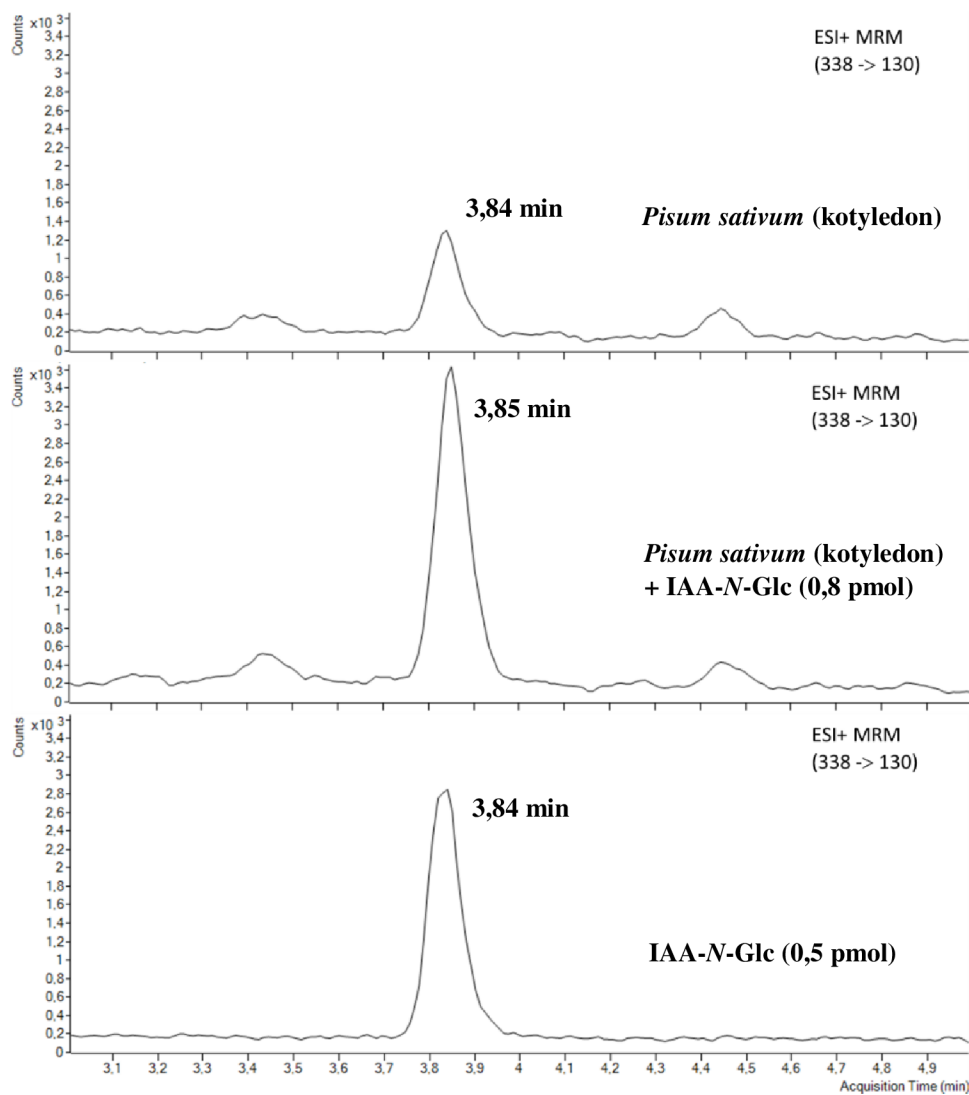
#### **Informace o modelových rostlinách převzaty z:**

Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* [online]. 2000, **408**(6814), 796-815 [cit. 2024-02-01]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35048692

*Arabidopsis thaliana* - huseníček rolní. PLADIAS [online]. 2024, 2014-2024 [cit. 2024-02-01]. Dostupné z: <https://www.pladias.cz/taxon/data/Arabidopsis%20thaliana>

*Pisum sativum* - hrách setý. PLADIAS [online]. 2024, 2014-2024 [cit. 2024-02-01]. Dostupné z: <https://pladias.cz/taxon/data/Pisum%20sativum>

# PŘÍLOHA



Obr. příloha 1: MRM chromatogramy IAA-N-Glc v extraktu z kotyledonu hrachu (nahore), z extraktu s přídavkem standardu IAA-N-Glc (uprostřed) a samotného standardu (dole).