

3. Fytohormony a růstové regulátory I.

auxiny, gibereliny a cytokininy



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Co to jsou hormony?

- termín **hormon** - poprvé použitý v medicíně před 100 lety, pochází z řečtiny $\eta\rho\rho\mu\omicron\nu\epsilon$ = stimulovat (ale nezahrnuje transport)
- látky přenášené z jednoho místa na druhé (Went a Thimann, 1937)

Co to jsou fytohormony?

rostlinný hormon = fytohormon

organická sloučenina **syntetizovaná** v jedné části rostliny, zpravidla **translokovaná** do jiné části, kde ve **velmi malé koncentraci** způsobuje fyziologickou odpověď (Salisbury a Ross 1985)

mohou mít účinky **stimulující**, ale i **inhibující**

Co to jsou růstové regulátory?

organické sloučeniny **syntetizované chemicky**,
které mohou být rostlinnými buňkami přijímány,
transportovány a způsobují podobnou
fyziologickou odpověď jako fytohormony.

5 skupin „klasických“ fytohormonů

- auxiny 4
- cytokininy několik
- gibereliny mnoho
- kyselina abscisová
- etylén

netradiční fytohormony

- kyselina jasmonová
- brassinosteroidy
- polyaminy
- oligosachariny
- oligopeptidy
- fenolické látky
- strigolaktony...

Vývoj poznání o fytohormonech

1987 - P.J.Davies: Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development

1995 - P.J. Davies: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology

2004 - P.J.Davies /ed./: Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!

Auxiny

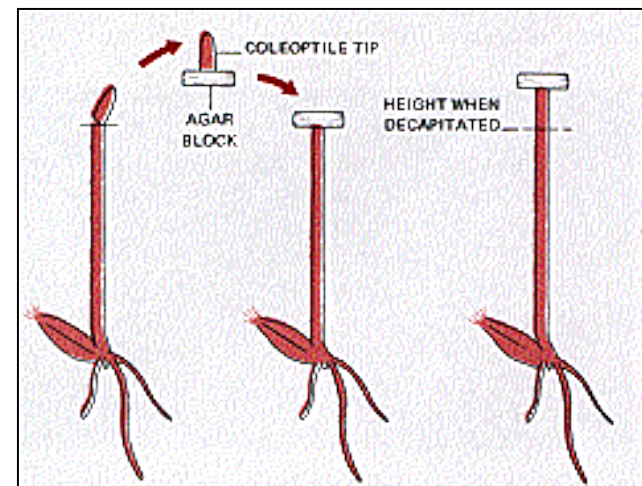
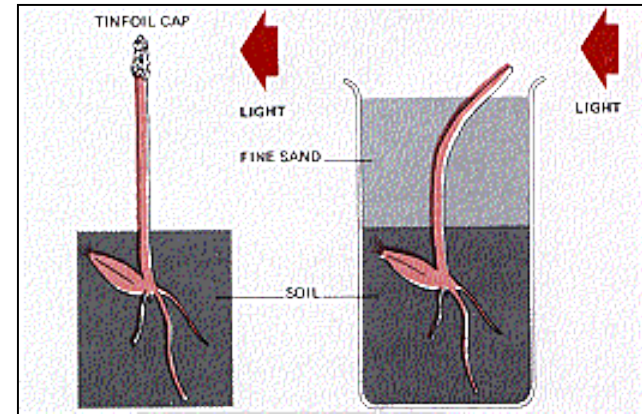
- název **auxin** pochází z řeckého slova *auxó*, což značí **zvětšovat se**.
- **1926 Frits Went** - první užití termínu **auxin** pro zatím neidentifikovanou sloučeninu (Wuchsstoff), která způsobuje ohyb koleoptilí trav
- **1936** identifikace **Köhlerem** v lidské moči a později prokázána **Thimannem** i v rostlinách
- dnes víme, že je to **kyselina indolyl-3-octová (IAA)**

Vliv auxinu

- podílí se na **fototropismu a geotropismu**
- způsobuje **apikální dominanci**
- udržuje **polaritu pletiv**
- stimuluje
 - **prodlužování buněk**
 - **vývoj plodů**
 - **vývoj cévních svazků a diferenciaci vodivých pletiv**
 - **růst kořene** (ale jen ve velmi nízké koncentraci = 10^{-7} až 10^{-13} M)
 - **zakládání adventivních kořenů**

Fototropismus

- **1880 - Ch. Darwin:** význam koleoptile pro fototropismus
- **1926 - F. Went:** objev auxinu
 - umístění apexů koleoptilí na agar
 - přenos agarových bločků na dekapitované rostlinky (bez bočního osvětlení)
 - zvětšení pahýlu - neznámá látka difundující do agaru = **Wuchsstoff = auxin**



Wentovy experimenty s koleoptylemi ovsa



F. Went: Rostliny, 1979

Mechanismus fototropismu

- směr světla je **detekován** apexem, modré světlo je nejúčinnější
- auxin je syntetizován v meristému a **translokován** bazipetálně (dolů)
- transportéry auxinu (PIN proteiny) jsou v plazmatické membráně na zastíněné straně prýtu
- auxiny jsou přenášeny a **stimulují prodlužování buněk** na zastíněné straně
- výsledkem je **zakřivení** stonku ke světlu

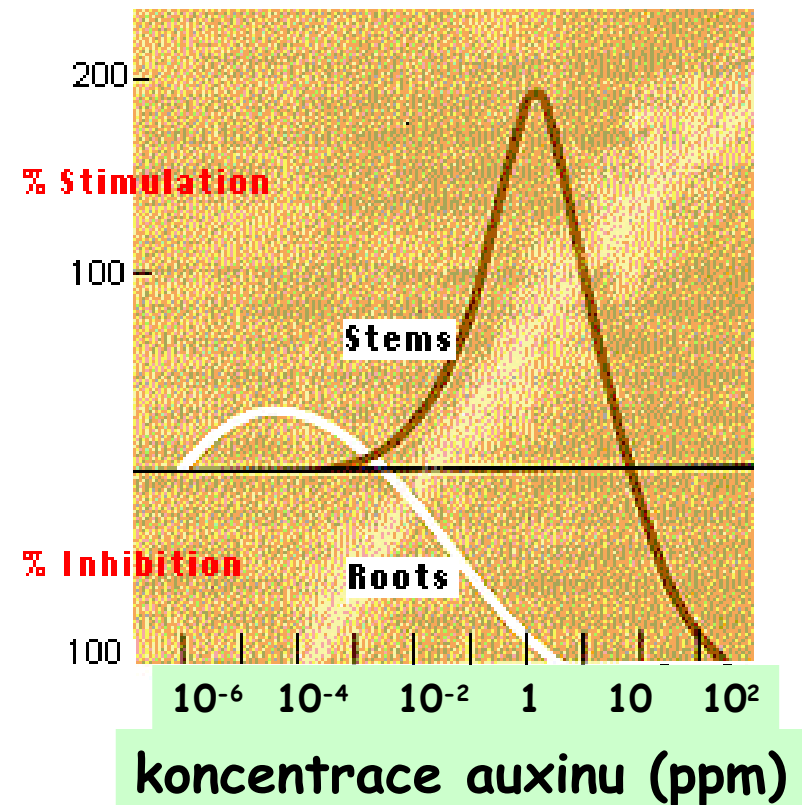
Mechanismus gravitropismu

- **sedimentace** amyloplastů v buňkách kolumely kořenové čepičky
- spojení aktinových filament s váčky obsahujícími **PIN proteiny**
- inserce PIN proteinů do plazmat. membrány umožní transport auxinu na spodní stranu kořene
- **inhibice** prodlužovacího růstu na spodní straně
- výsledkem je zakřivení kořene dolů

Mechanismus gravitropismu

Vliv auxinu na růst kořene a stonku (podle Thimana)

rozdílná reakce stonku a kořene je způsobena **rozdílnou citlivostí** jejich buněk na auxin

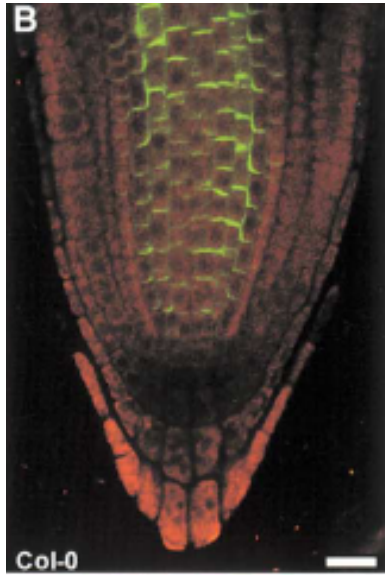


Translokace auxinu

- auxin je přenášen polárním transportem z do buňky buňky pomocí přenašečů: na jedné straně je vnesen do buňky pomocí „influx“ přenašečů v plasmatické membráně a transportován ke druhé straně buňky pomocí „efflux“ přenašečů tzv. **PIN proteinů**, kde mohou být transportovány do další buňky
- *PIN* geny (***PIN 1-8***), kódují složky systému auxinových přenašečů
- distribuce těchto přenašečů v buňce určuje, kterým směrem bude auxin transportován.

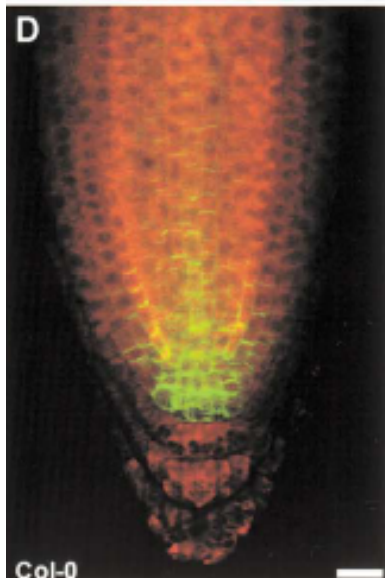
Exprese a lokalizace AtPIN1 a AtPIN4

J. Friml (Cell 2002)



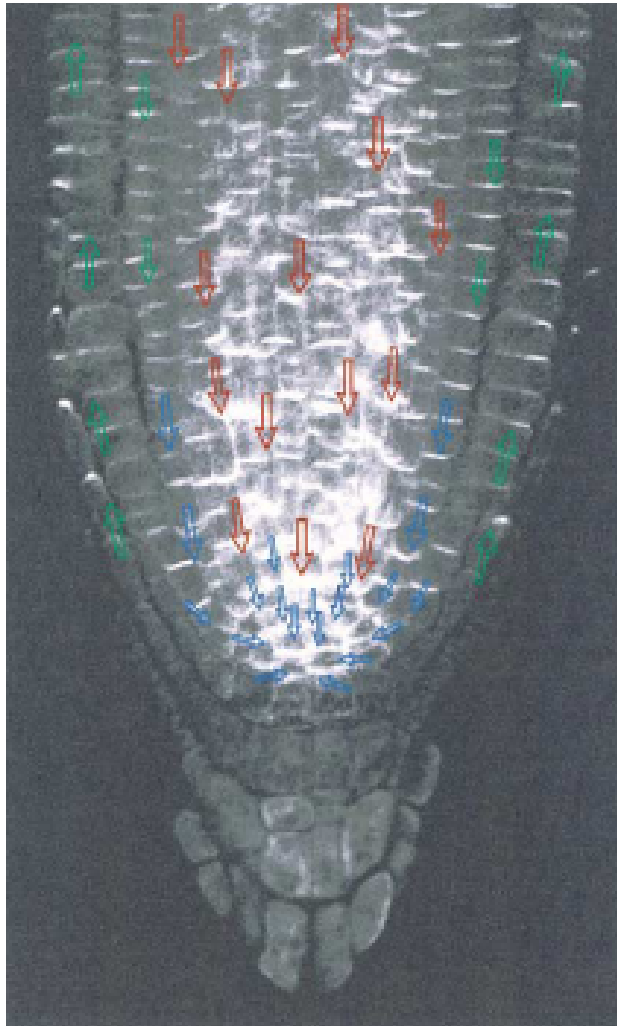
» signál AtPIN1 byl detekován v plasmatické membráně buněk centrálního válce a slabší signál v buňkách endodermis.

» AtPIN1 protein je lokalizován převážně na basální straně buněk.



» AtPIN4 protein byl prokázán v oblasti buněk klidového centra (QC cells) a blízkého okolí.

Exprese a lokalizace PIN proteinů ve špičce kořene *Arabidopsis*



imunolokalizace **AtPIN1** ukazuje na tok auxinu směrem k centru kořenového meristému (**červené šipky**)

AtPIN4 reguluje směřování toku auxinu do kolumely - vytváří auxinové maximum (**modré šipky**).

část auxinu je přesměrována vnějšími vrstvami zpět do elongační zóny a reguluje zakřivování kořene (**AtPIN2, zelené šipky**)

(Friml a Palme 2002)

Jak auxin způsobuje různé efekty v rostlině?

2 možnosti:

- okamžitá reakce, **přímý vliv** na buňku (prodlužování)
- pomalejší odezva - **změna exprese genů**

Přímé vlivy auxinu

přítomnost auxinu na povrchu buňky iniciuje okamžité reakce, jako jsou:

- **změny v pohybu iontů** přes plazmatickou membránu do buňky a z buňky
- **extenze buněčné stěny** - prodlužování buňky
- auxin iniciuje tyto změny po vazbě na **specifické receptory** na povrchu buňky, pravděpodobně transmembránové proteiny jako ABP1 („AUXIN-BINDING PROTEIN 1“).

Vliv auxinu na expresi genů

mnoho vlivů auxinu je zprostředkováno změnami
transkripce genů

auxin vstupuje do buňky **aktivním transportem**

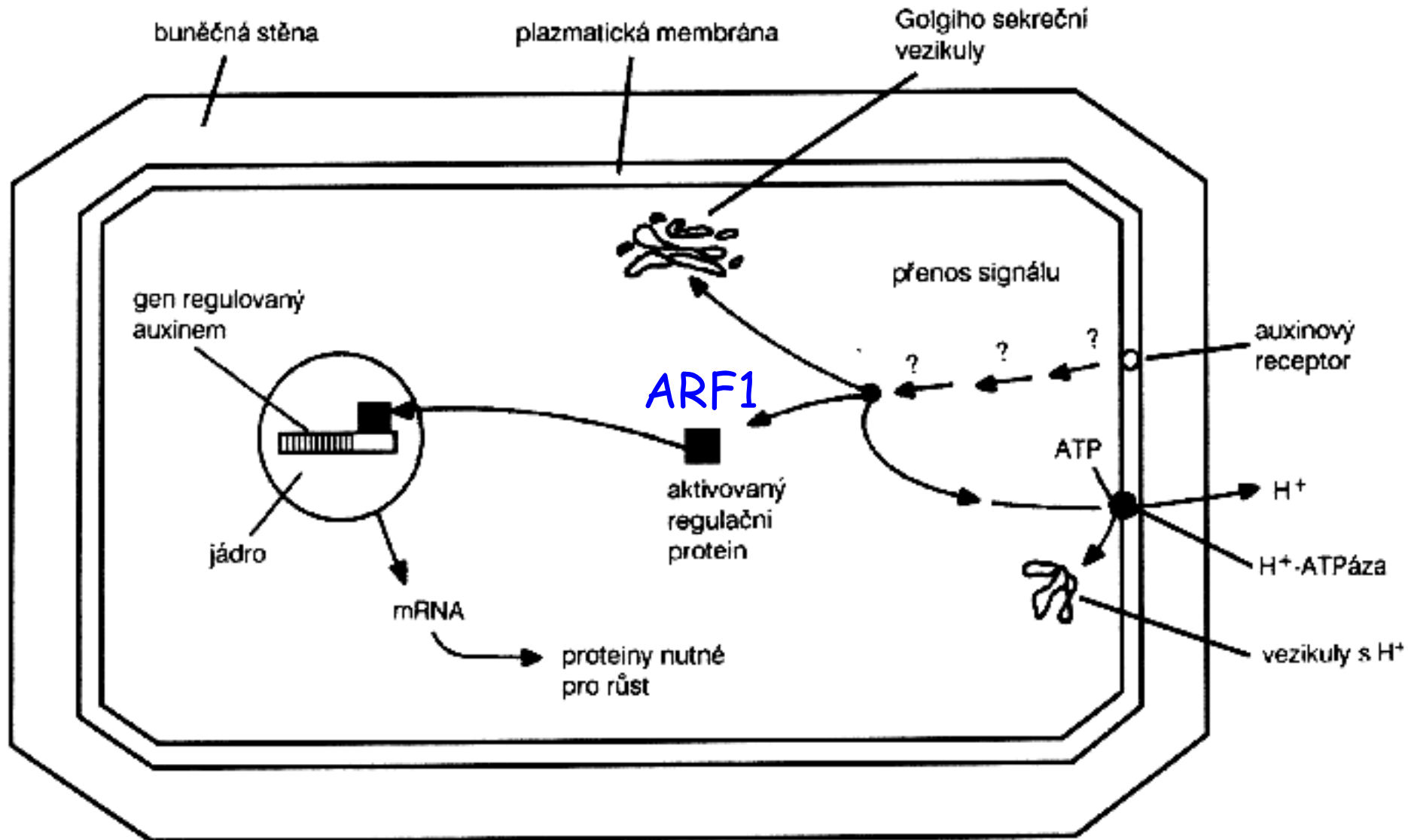
v cytosolu se váže na proteiny jako **ARF1** („AUXIN RESPONSE FACTOR1“).

ARF1 je **transkripční faktor**

transkripční faktor vstupuje **do jádra** a váže se na DNA sekvenci **TGTCTC ACAGAG** = promotory genů, které reagují na auxin (= auxin je tzv. **response element**)

působení auxinu na transkripci genů je podobné působení **steroidních hormonů u živočichů**

Schéma mechanismu účinku auxinů



Auxiny - doporučené stránky

Kimbalova učebnice - auxiny

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Auxin.html>

experimenty s vlivem auxinu na iniciaci laterálních orgánů

<http://home.cc.umanitoba.ca/~umrahm04/39.768/P2/P2.html>

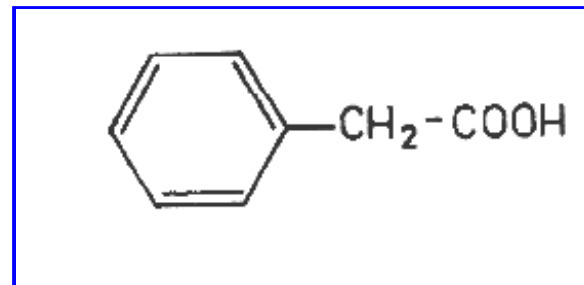
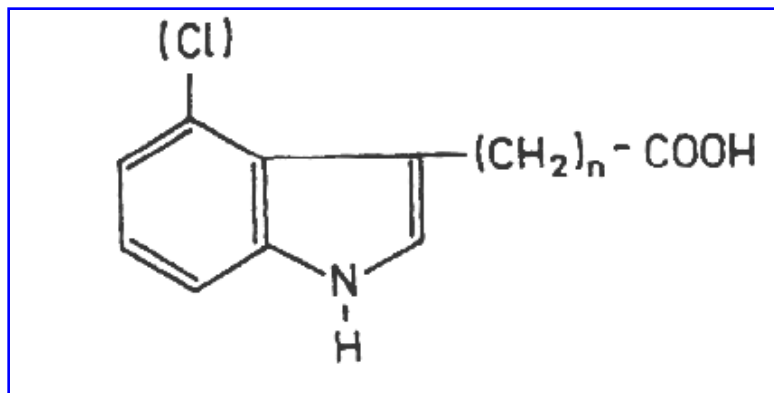
transport auxinu, přenos signálu

<http://www.public.iastate.edu/~bot.512/lectures/Auxin-action.htm>

vazebné proteiny pro auxin

http://www.bio.unc.edu/faculty/jones/lab/auxin_binding_protein.html

Přirozené auxiny



kyselina fenylactová

kyselina indolyl-3-octová ($n=1$) **IAA**

kyselina indolyl-3-másečná ($n=3$) **IBA**

kyselina 4 chlor- indolyl-3-octová (Cl) **4-Cl-IAA**

Krystalické látky, špatně rozpustné ve vodě v kyselé a neutrální oblasti. Dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a ve vodném alkalickém prostředí.

IAA dosti nestálá (světlo)

Biosyntéza auxinu

vychází od **tryptofanu**

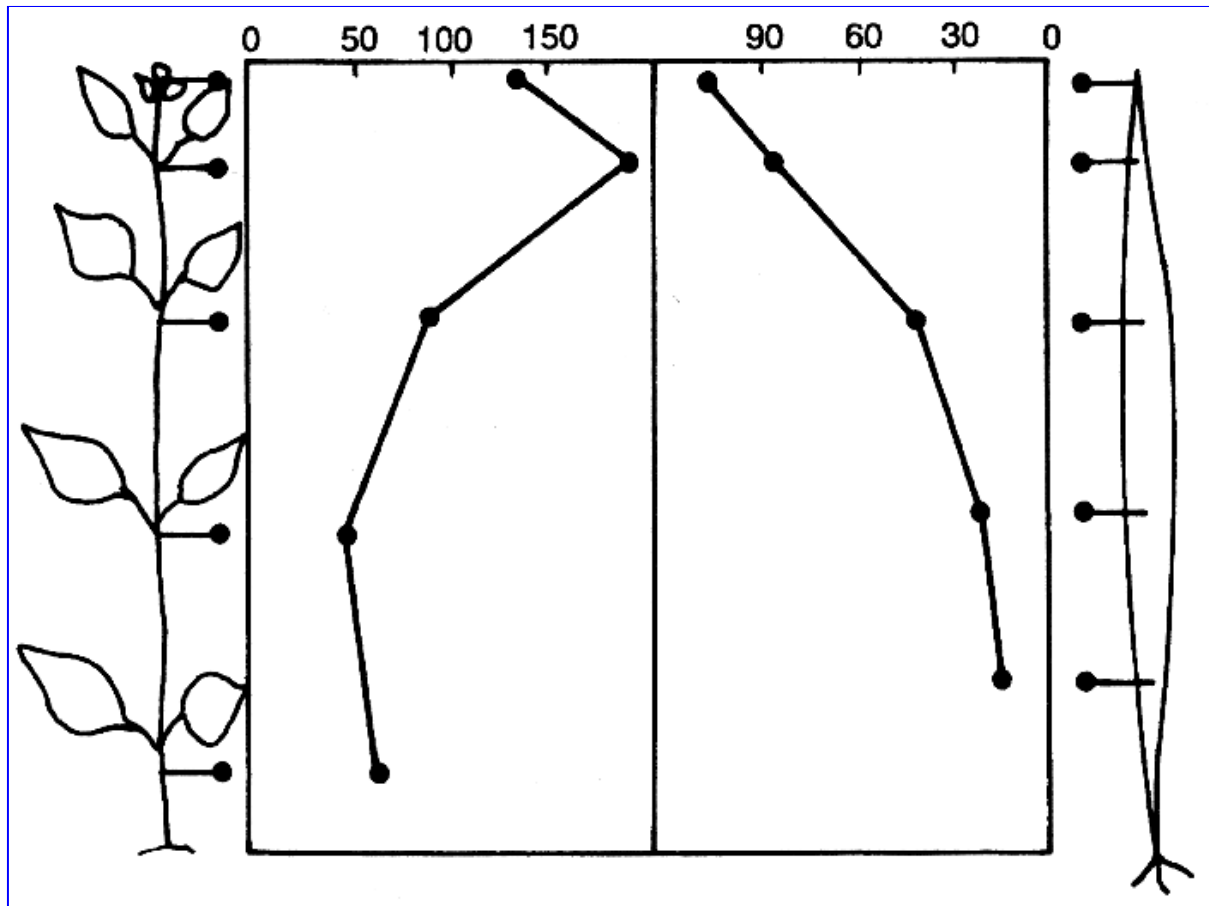
Jsou známé dvě cesty, ale více preferovaná je cesta, kdy v prvním kroku dochází k transaminaci na **indolpyruvát** - pak následuje dekarboxylace na **indolacetaldehyd** - a po enzymatické oxidaci vzniká **IAA**.

Enzymy nezbytné pro tuto syntézu jsou nejaktivnější v mladých nediferencovaných pletivech - **meristémech**, v **mladých listech** a plodech (**v embryích**)



IAA je syntetizována zde.

Obsah IAA (ng/g FW)



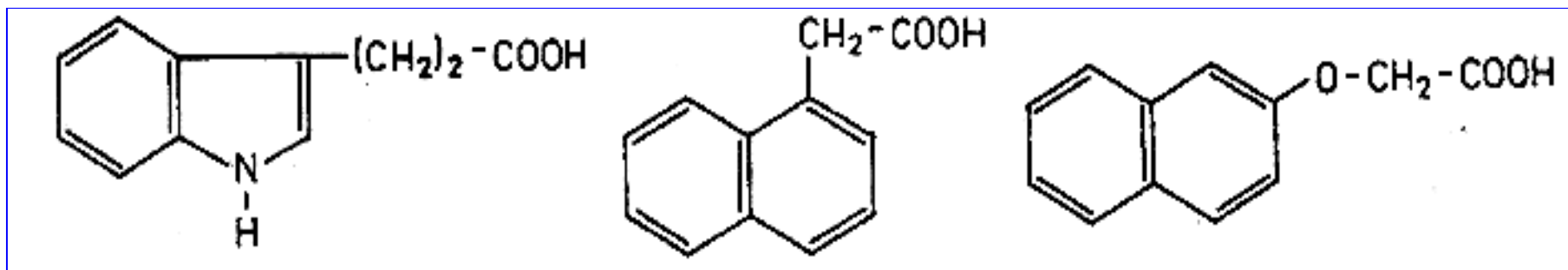
dvouděložné (*Heliopsis*) jednoděložné (*Triticum*)

Dörfling 1985

Syntetické látky (růstové regulátory) s účinkem auxinů

1. indolové kyseliny

2. naftalenové kyseliny



kyselina indolyl-3-propionová

IPA

α -naftyloctová

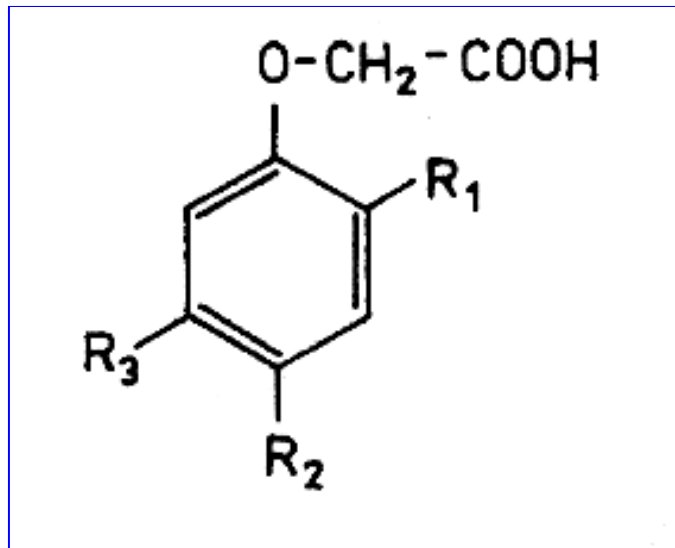
NAA

β -naftoxyoctová

NOA

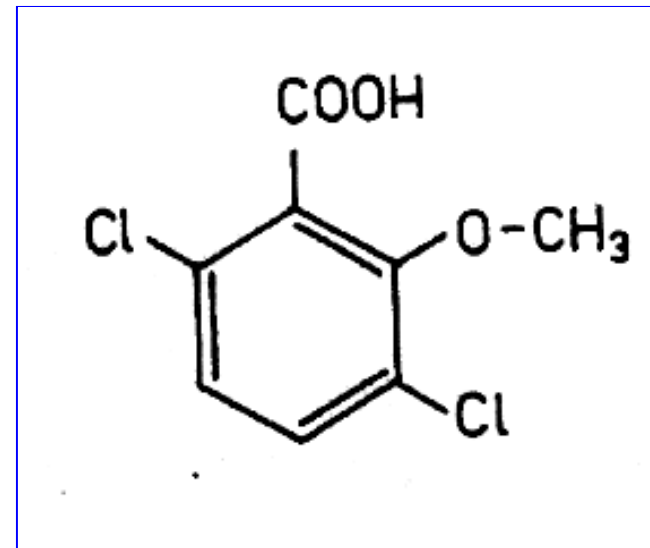
Syntetické látky s účinkem auxinů

3. chlorfenoxykyseliny



2,4-dichlorfenoxyoctová 2,4-D
2,4,5-trichlorfenoxyoctová 2,4,5-T
2-metyl-4-chlorfenoxyoctová MCPA

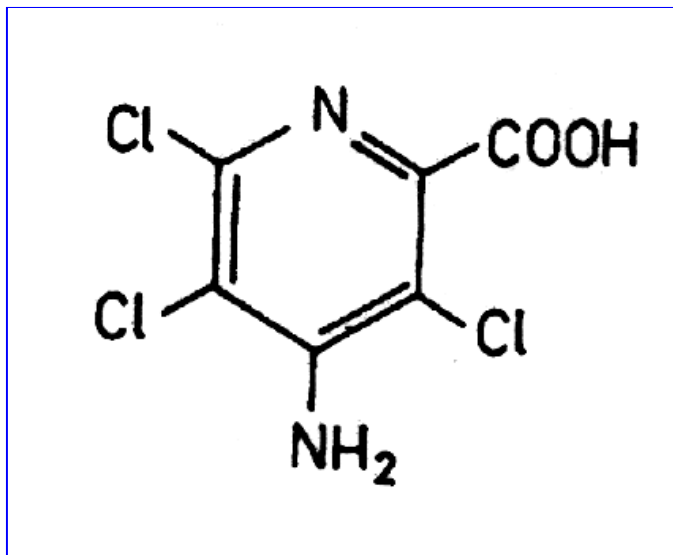
4. benzoové kyseliny



dicamba

Syntetické látky s účinkem auxinů

5. deriváty kyseliny pikolinové (izonikotinové)



picloram

4-amino-3,5,6-trichloro-
pikolinová kyselina

vlastnosti syntetických auxinů jsou podobné IAA,
ale jsou stálejší

Herbicity

2,4-D selektivně likviduje dvouděložní rostliny, ale ne trávy (podstatu selektivity ještě neznáme)

2,4-D se dostává do buněk usnadněnou difúzí, ale neexistuje její přenašeč z buňky ven (efflux carrier)

„Agent Orange“ používaný ve Vietnamu armádou USA k defoliaci pralesa byl směsí 2,4-D a 2-4-5-T

Mechanismy kontroly množství auxinů

- **konjugace** = kovalentní vazba na nízkomolekulární látky (aminokyseliny, cukry)

funkce konjugátů (Bandurski 1984)

1. zásobní forma (neaktivního) hormonu
 2. ochrana hormonu před oxidací
 3. konjugáty jsou stabilní transportní formou
 4. konjugace slouží jako prostředek regulace množství endogenního hormonu
- **degradace** = oxidace O_2 a ztráta $COOH - CO_2$ (dekarboxylace)

Gibereliny

- **Kurosawa** - při studiu houbové choroby rýže bakanae - způsobené houbou *Gibberella fujikuroi* (v imperfektním stadiu *Fusarium moliniforme*)
- ve vodě rozpustné látky produkované houbou
kyselina giberelová = giberelin A_3 (GA_3)
- terpeny - *ent*-giberelanový skelet
- dnes je již známo více než 80 giberelinů (GA_1 , GA_3 ...)

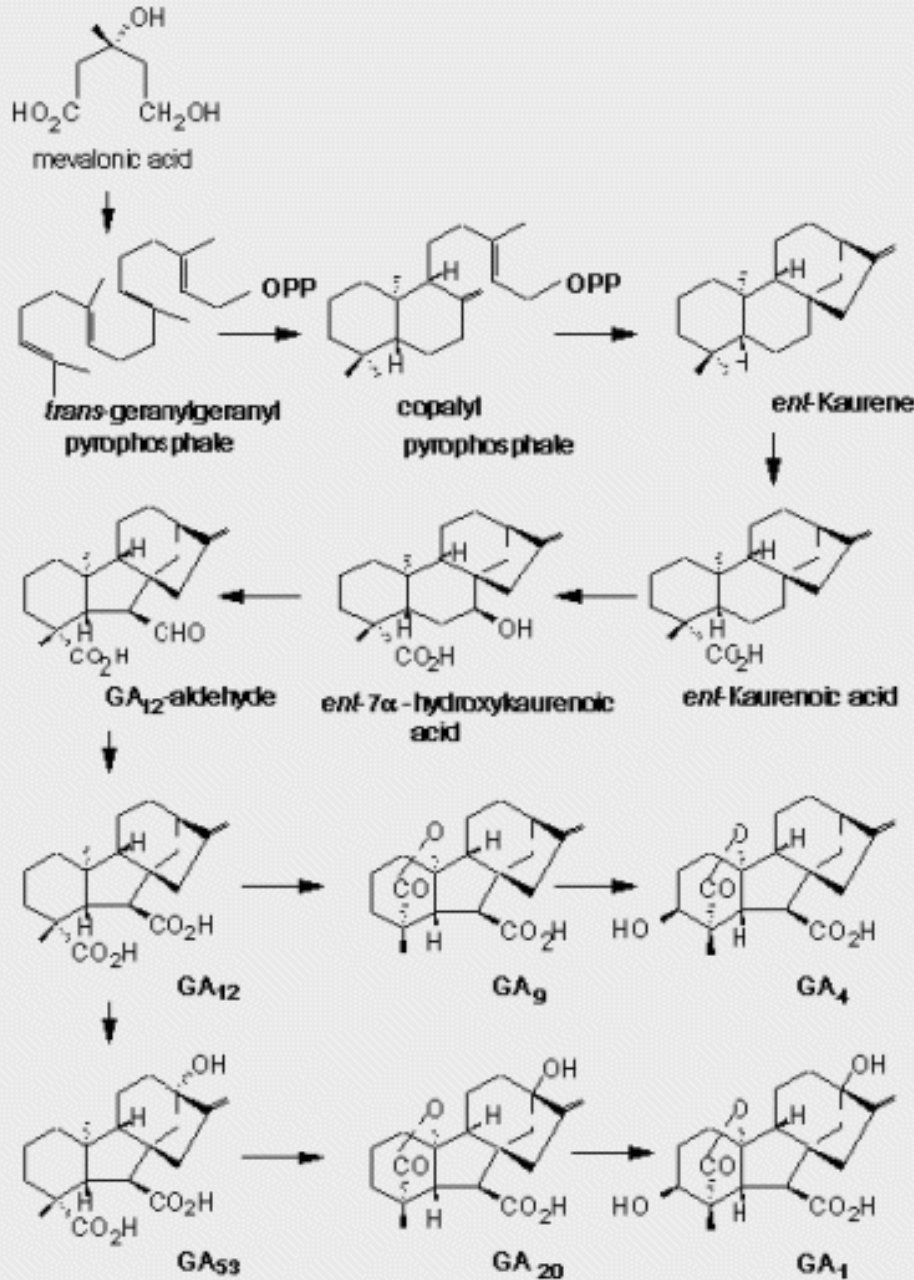
3x AcCoA



kyselina mevalonová



geranylgeranyl
pyrofosfát



ent-kauren



kyselina
ent-kaurenová

**Biosyntéza
giberelinů**

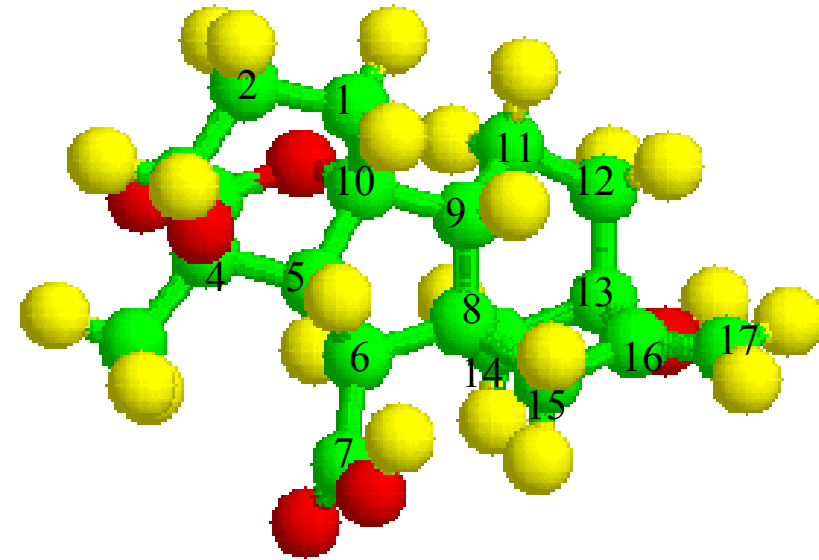
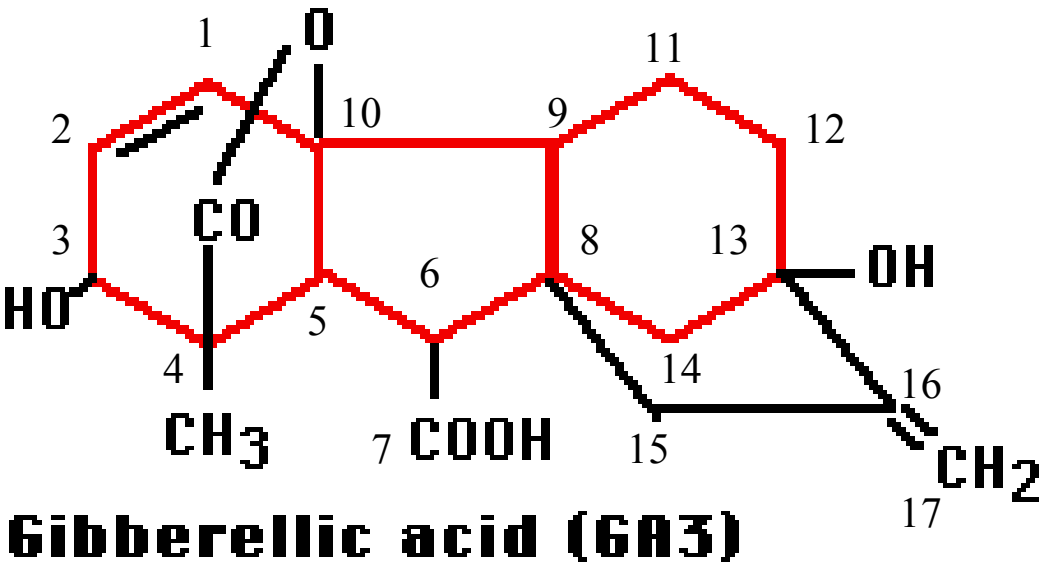
první giberelin

GA₁

neaktivní

aktivní

Gibereliny



strukturní vzorec GA₃

model struktury GA₁

<http://www.lars.bbsrc.ac.uk/plantsci/gas.html>

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/G/Gibberellins.html>

Funkce giberelinů

1. **prodlužování buněk** spojené se stimulací růstu
2. **dělení buněk** v kambiu (spolupůsobení s IAA)
3. vyvolání **partenokarpie**
4. **indukce kvetení** v neindukčních podmínkách
5. **porušení dormance** pupenů nebo semen, indukce
klíčení semen
6. **mobilizace** zásobních látek v semenech při klíčení
(transkripce α -amylázy)

Cytokininy

1913 **Gottlieb Haberlandt** - látky obsažené ve floému mají schopnost indukovat buněčné dělení

1941 **Johannes van Overbeek** - podobné vlastnosti má endosperm z kokosových ořechů

1955 **Miller et al.** izolace prvního cytokininu ze spermatu sled'ů - název **kinetin** = látka stimulující buněčné dělení (cytokinezi)

1956 **Folke Skoog** - výsledky pokusů s indukcí dělení buněk dřene tabáku (poměr auxinů a cytokininů)

1961 **Miller**, 1963 **Letham** - izolace prvního přirozeného cytokininu z obilek (nezralého endospermu) kukuřice (*Zea*) = **zeatin**



Cytokininy

fytohormony odvozené od adeninu
(pozor na záměnu s cytokiny)

nativní cytokininy

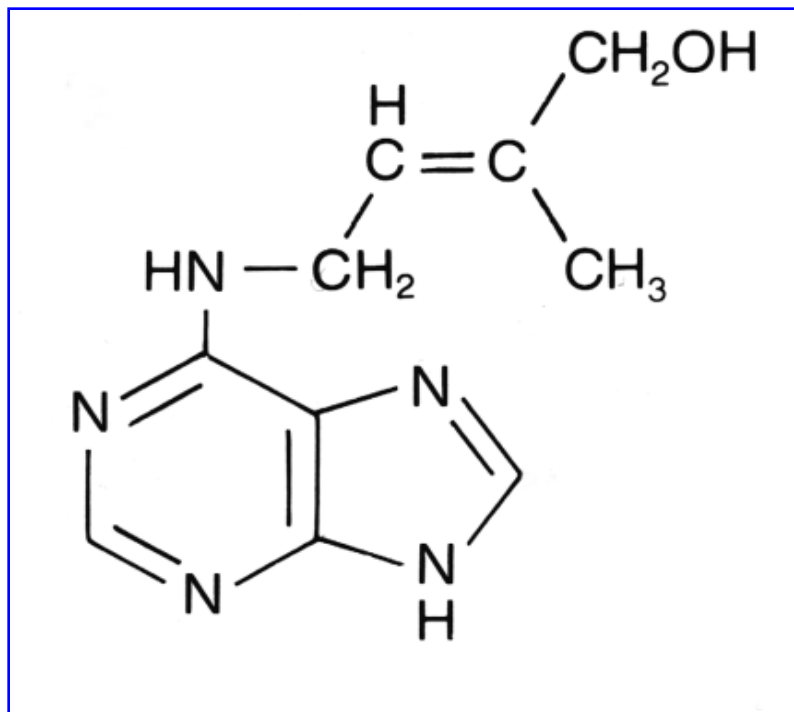
izoprenoidní

- zeatin (trans) (z nezralého endospermu *Zea*)
- dihydrozeatin
- izopentenyladenin

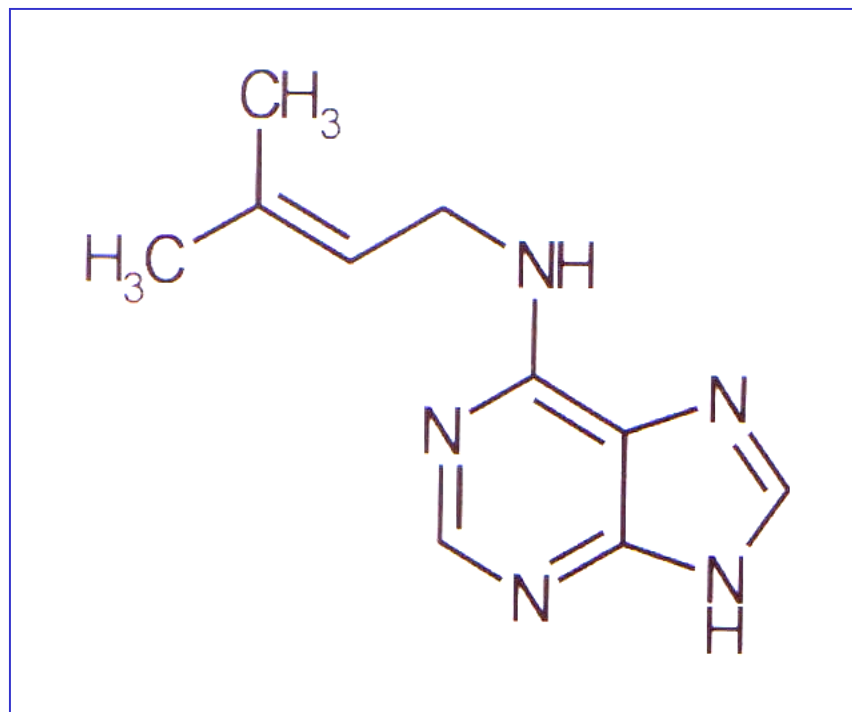
aromatické

- benzylaminopurin
- m-topolin (3-hydroxybenzylaminopurin)

Nativní cytokininy - izoprenoidní

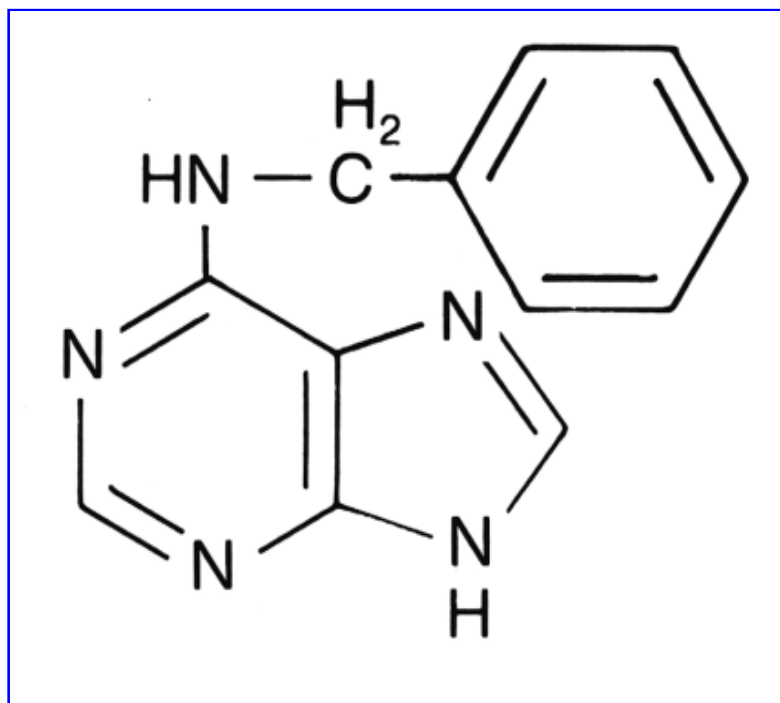


trans - zeatin **Z**
trans - zeatinribosid **ZR**

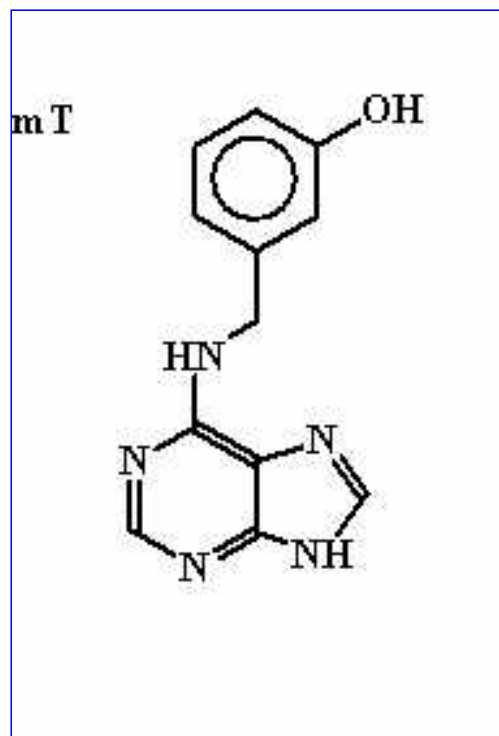


izopentenyl adenin **iP**

Nativní cytokininy- aromatické

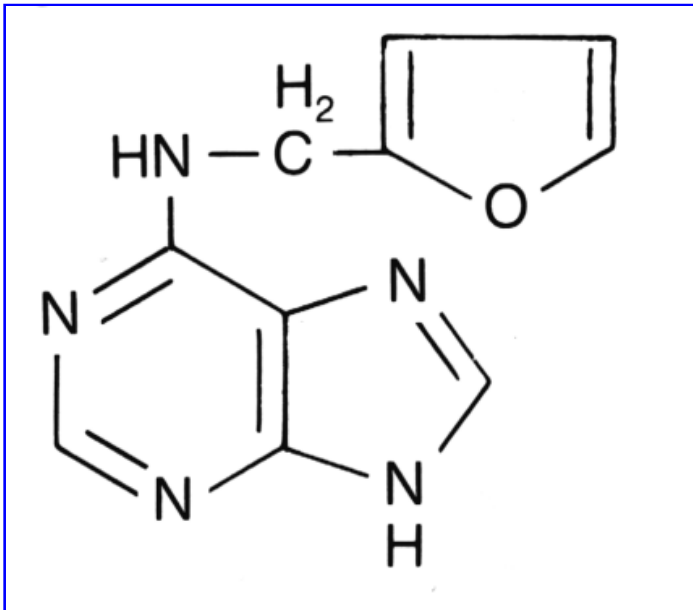


benzyladenin **BA**
(benzylaminopurin **BAP**)

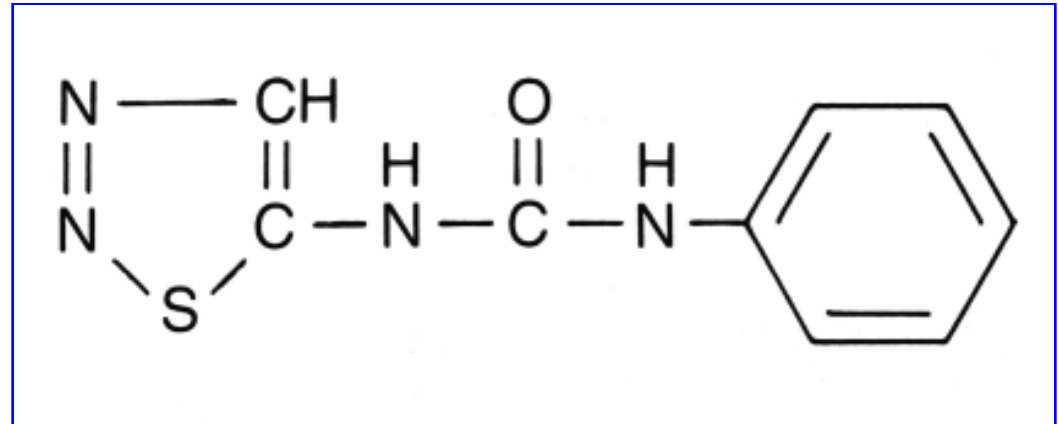


6-(3-hydroxybenzylamino)purin
meta-topolin **mT**
poprvé izolován z listů topolu

Syntetické cytokininy



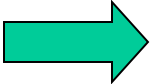


furfuryl aminopurin
kinetin **K**



derivát močoviny
thidiazuron **TDZ**

Vliv cytokininů

- stimulace buněčného dělení  název
- potlačení apikální dominance  podpora růstu axilárních meristémů, iniciace adventivních pupenů
- stimulace vývoje chloroplastů
- aktivace syntézy RNA a proteinů  oddálení senescence
- zvýšení odolnosti ke stresům (zasolení, sucho, vysoká teplota, vlhkost)

Metabolismus cytokininů:

Kamínek (1992)



- vzájemná přeměna bází, nukleotidů a nukleosidů
- N-glukosylace purinu a konjugace alaninu (N-9)
- O-glukosylace a acetylace postranního řetězce
- redukce dvojné vazby postranního řetězce
- odštěpení postranního řetězce



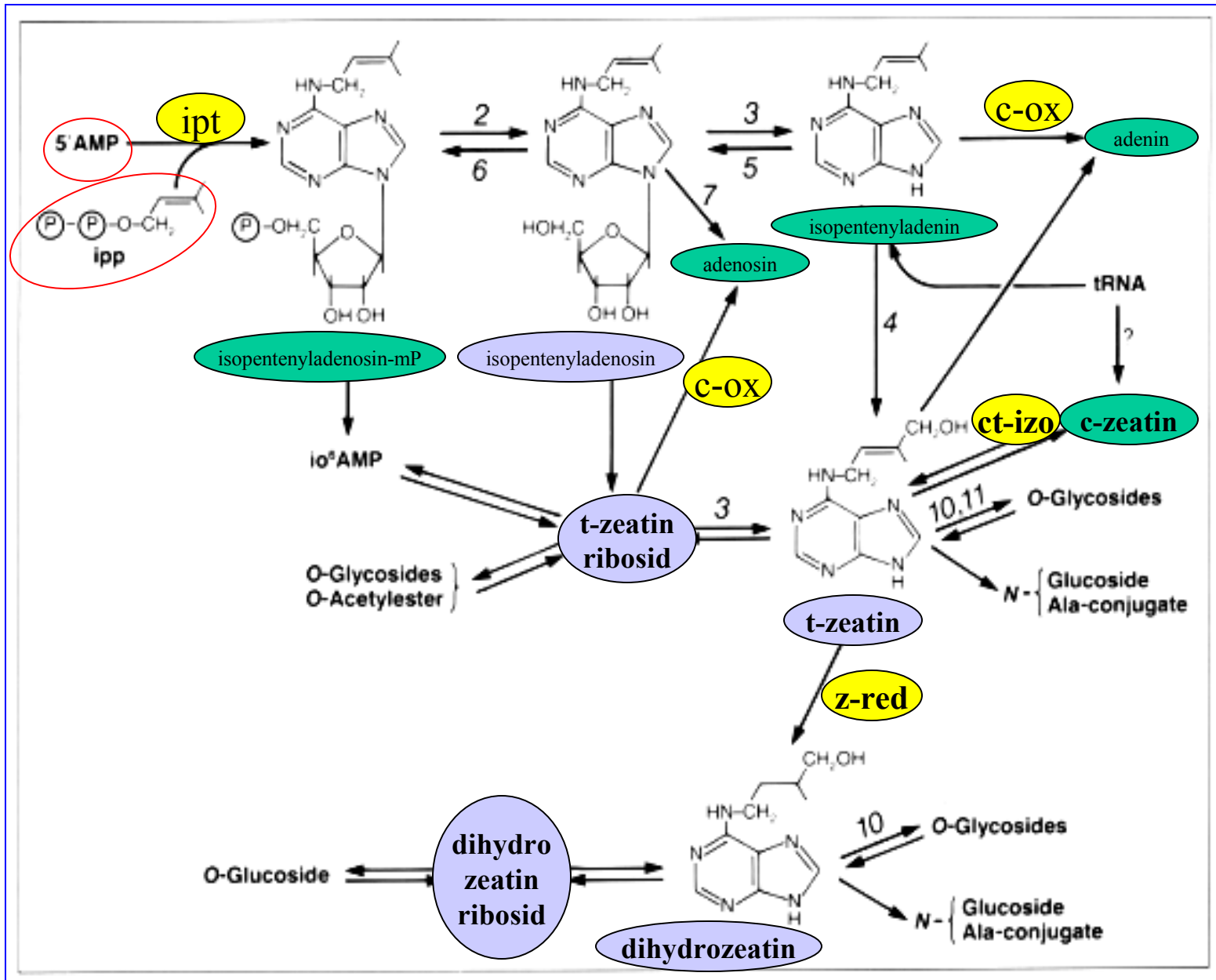
Johannes
van Staden

Praha ACPD 2005

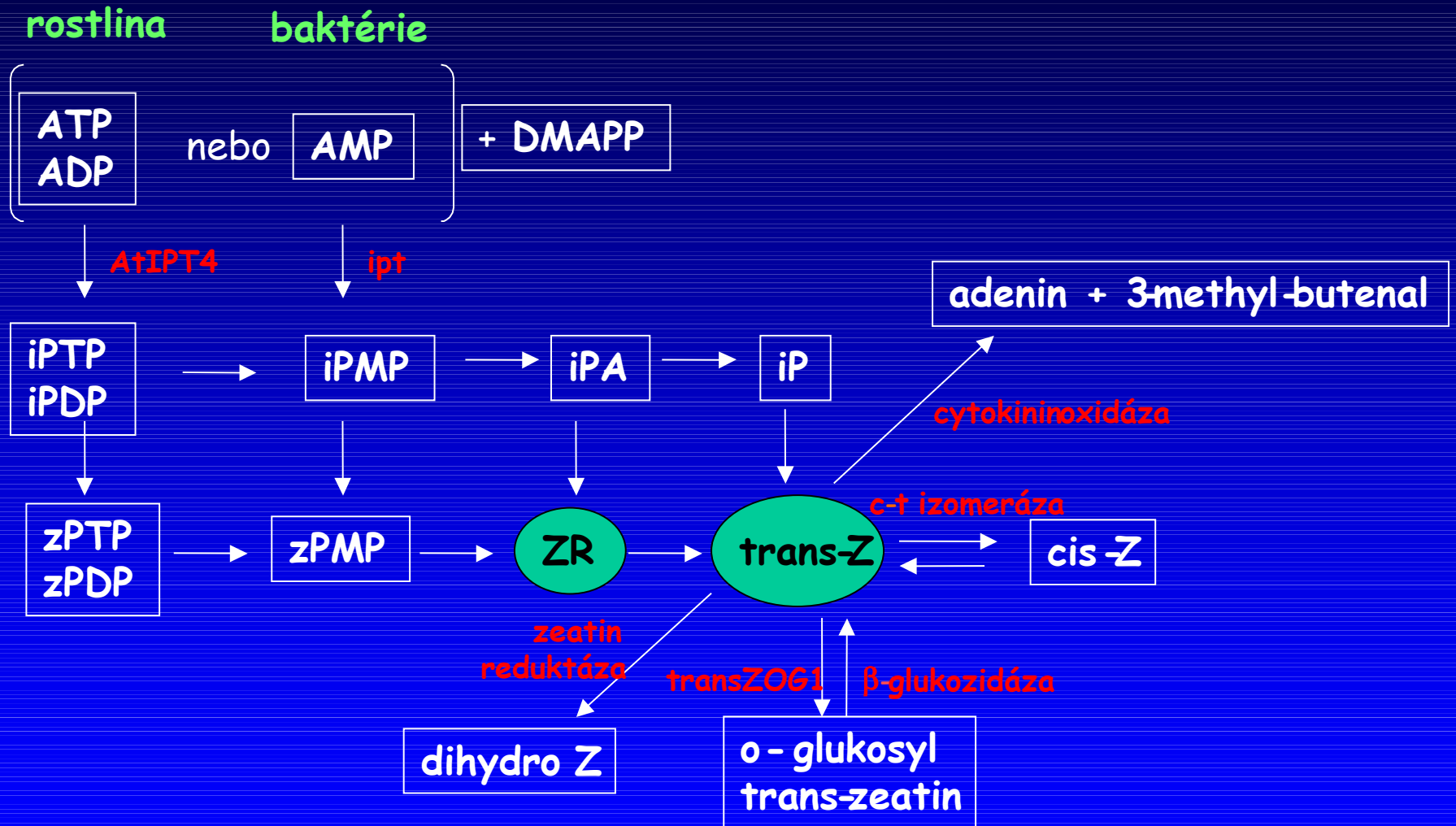


Praha ACPD 2009

Metabolismus cytokininů

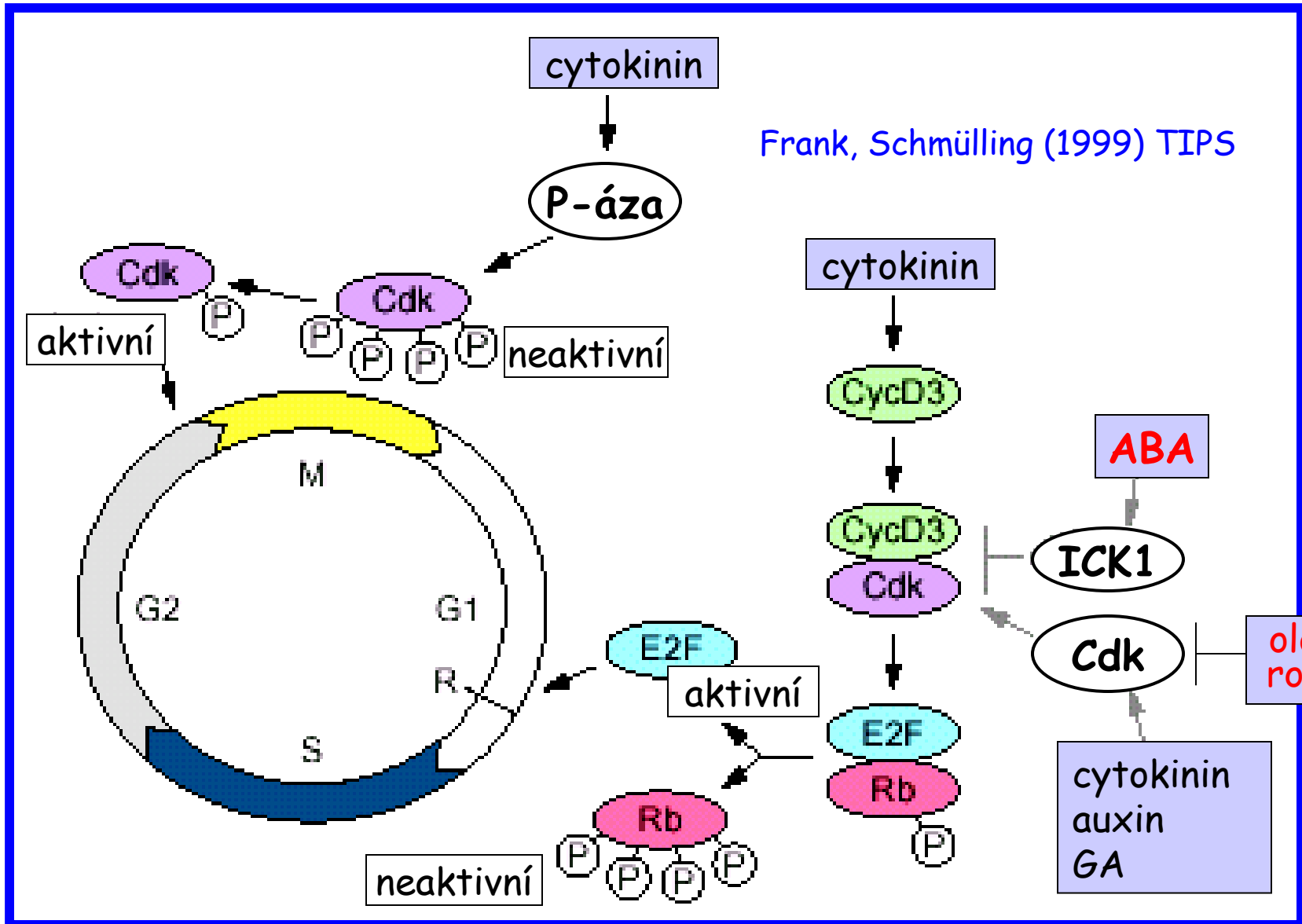


Biosyntéza a metabolismus cytokininů (MOK et MOK 2001)

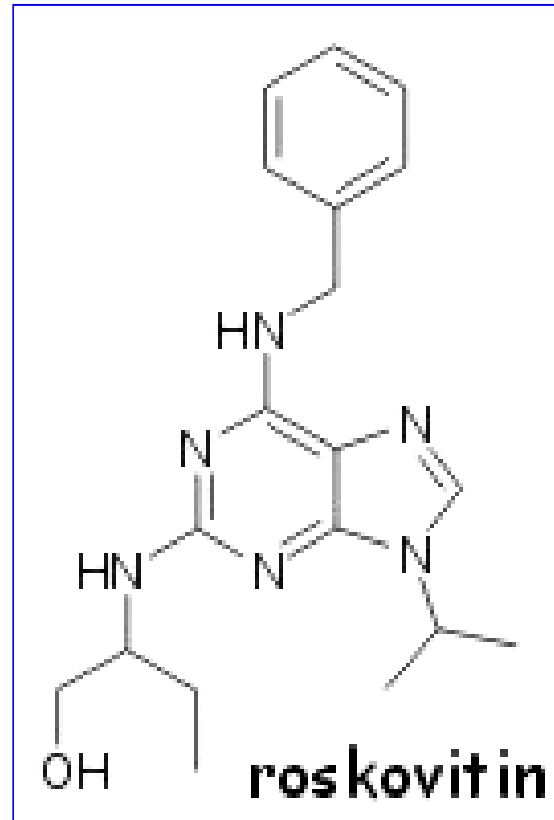
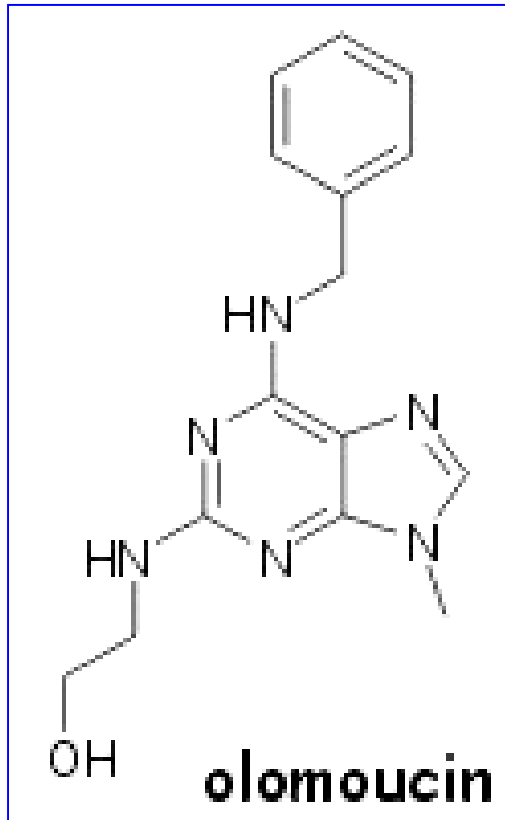




Regulace buněčného cyklu - ovlivnění fytohormony

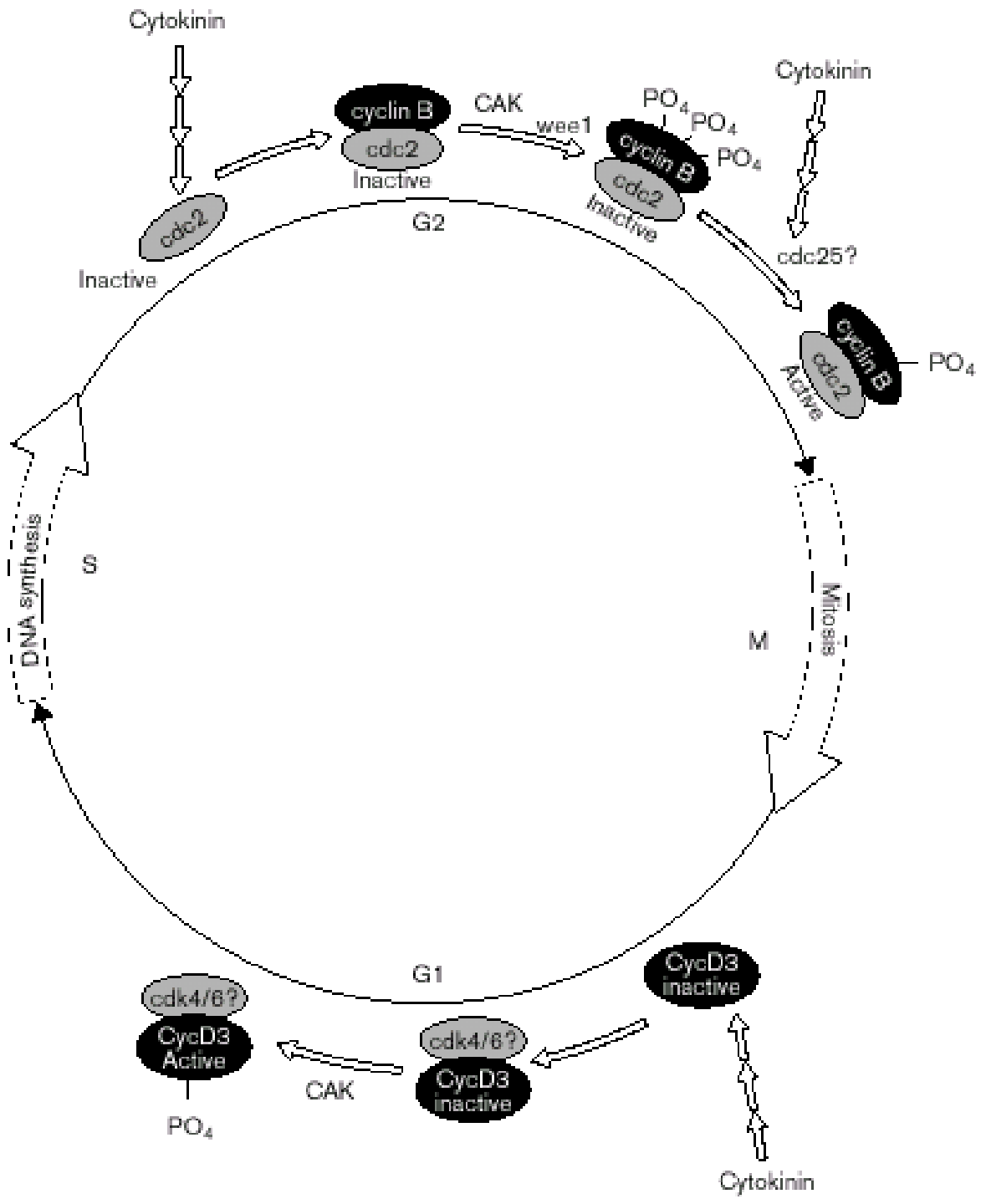


Inhibitory kináz (CDK) odvozeny od cytokininů



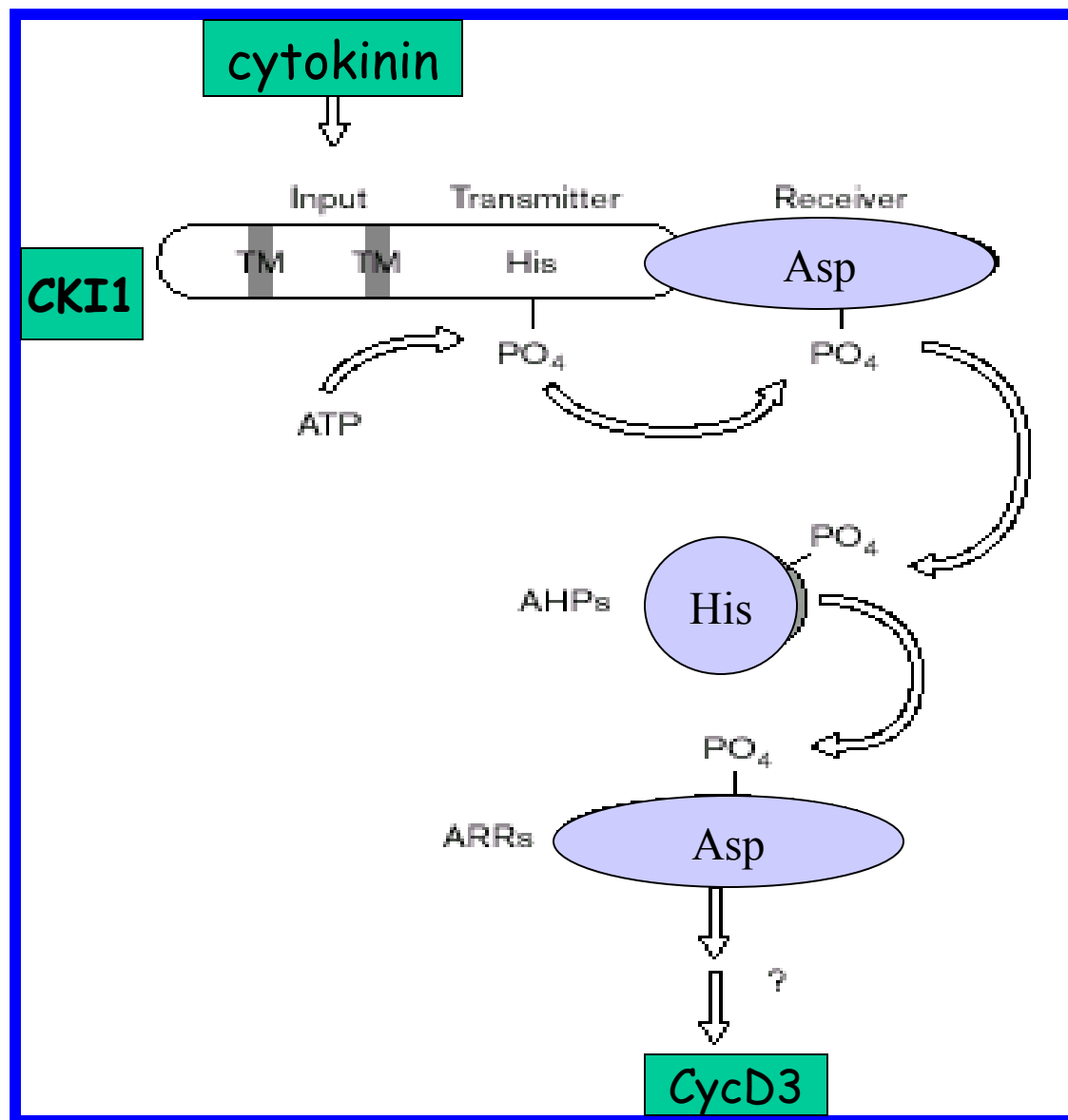
soutěží s ATP o vazebné místo v molekule kinázy

M. Strnad



Hypotéza příjmu a přenosu signálu cytokininu

předpokládaný
receptor
cytokininu



Metody stanovení cytokininů

A. Biotesty

- Υ. Proliferace buněk v kalusové kultuře - nepoužívá se již příliš často, protože trvá velmi dlouho
- Υ. Expanze děloh ředkviček
- Σ. Inhibice ztráty chlorofylu v segmentech listů ječmene během senescence

B. Chemické analýzy

- chromatografie HPLC
- hmotová spektroskopie LC/MS
- radio-imunoanalýza RIA, ELISA

Fytohormony a růstové regulátory II.

Kyselina abscisová

etylén

netradiční fytohormony

Kyselina abscisová

hledání faktorů regulujících tvorbu abscisové zóny opadu listů a plodů:

- **abscisin** - opad plodů bavlníku (1963 **Frederick Addicot** a kol., Kalifornie)
- **dormin** - dormance javoru (1964 **Phillip Wareing**, UK)
- **lupin** - opad květů *Lupinus* (1964 **van Steveninck**, UK)

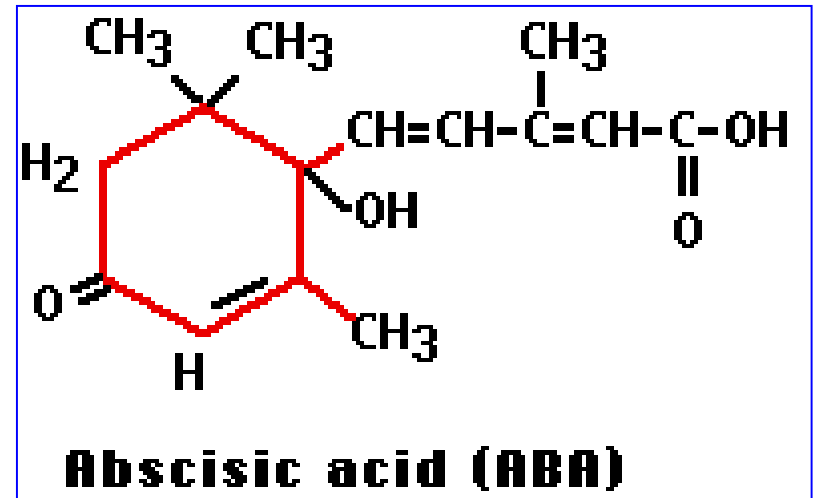
1967 = kyselina abscisová ABA

Kyselina abscisová

Na rozdíl od živočichů nemohou rostliny uniknout z nevhodných podmínek (sucho, příchod zimy) aktivně.

„Adapt or die.“

Kyselina abscisová (ABA) je hlavním činitelem při zprostředkování adaptací rostlin na stres.



seskviterpen

Vlivy kyseliny abscisové

- stimuluje:

- dormanci pupenů a semen
- zavírání průduchů při vodním stresu
- transkripci mRNA zásobních proteinů
- senescenci

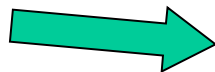
- inhibuje

- klíčení semen
- vegetativní růst
- dozrávání plodů
- antiport K^+H^+

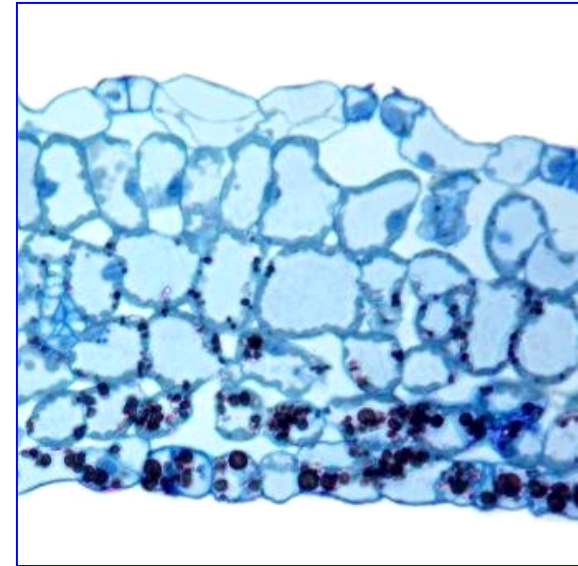
působí proti ostatním růst podporující fytohormonům

Mechanismus kontroly zavírání stomat

- vazba ABA na povrch plasmatické membrány svěřacích buněk
- růst pH v cytosolu
- přenos Ca^{2+} z vakuoly do cytosolu
- zvýšení Ca^{2+} v cytosolu blokuje příjem K^+ svěřacími buňkami a zvýšení pH vede ke ztrátě Cl^-
- výsledkem je redukce osmotického tlaku a turgoru



uzavření stomat



příčný řez
dělohou tabáku

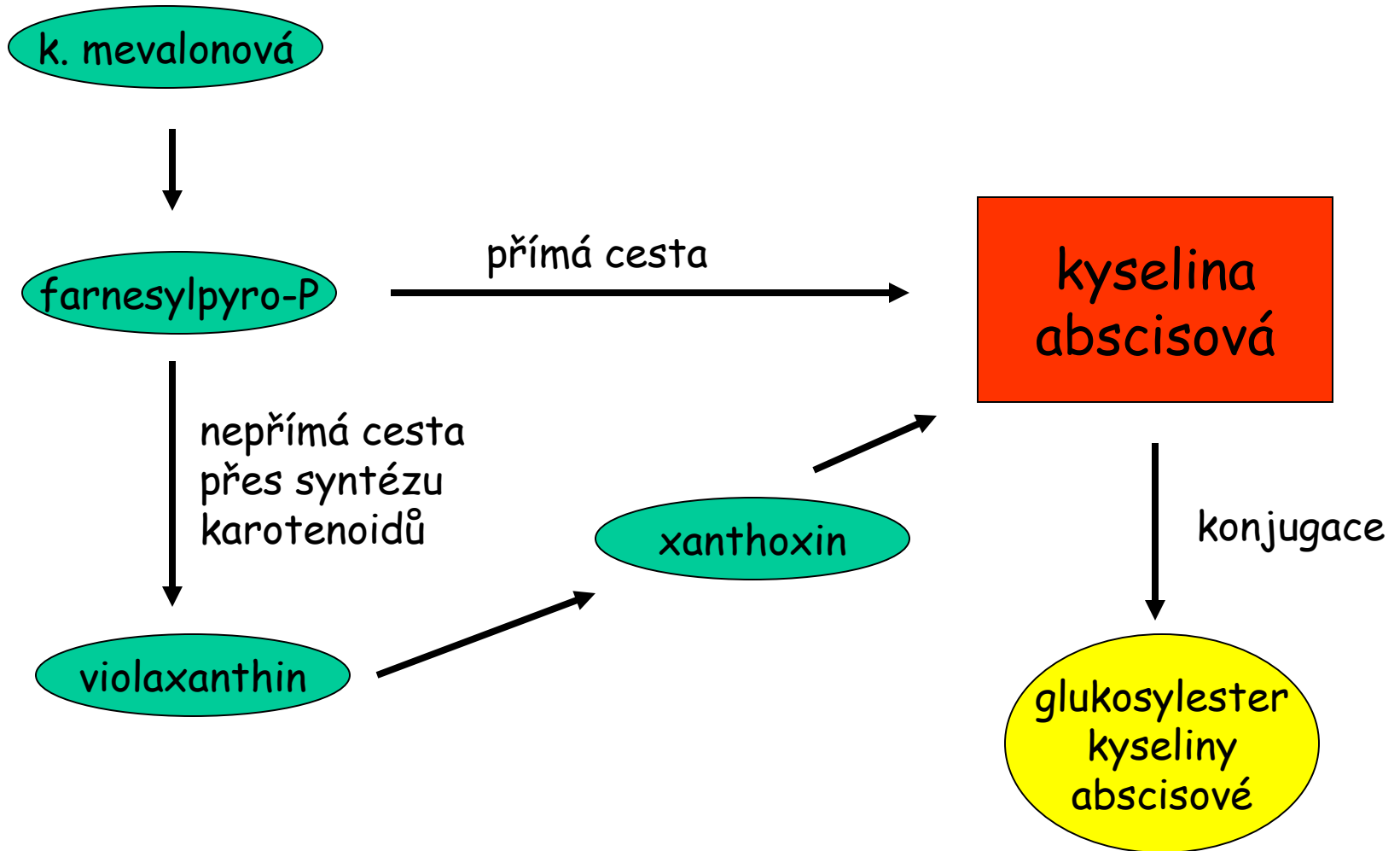
Dormance pupenů

- ABA zprostředkuje přeměnu apikálního meristému na dormantní pupen (nově vytvářené listy = krycí šupiny pupenu = ochrana proti poškození a vyschnutí)
- ABA zabraňuje předčasnému rašení pupene
- Přerušování dormance - prodloužené chladové období nebo prodlužování délky dne (fotoperiodismus)

Zrání a dormance semen

- v průběhu dozrávání semen se zvyšuje koncentrace ABA
- ABA způsobuje dormanci semen a zabraňuje jejich předčasnému klíčení před koncem zimy nebo období sucha
- dormance semen se překonává dostatečně dlouhým obdobím chladu a dostatečným přísunem vody

Biosyntéza ABA



Etylén



Salisbury a Ross (1982) Plant Physiology

Gloser (1995) Fyziologie rostlin

<http://www.plant-hormones.info/ethylene.htm>

Etylén

stará Čína - vliv pálení kadidla na urychlování
dozrávání plodů

Egypt - urychlování dozrávání fíků - poraněním

1864 - **Německo, Francie**: předčasný opad listů
stromů v blízkosti plynových lamp

1901 - **Neljubov** - prokázal přítomnost etylénu
ve svítiplynu + vliv etylénu na růst rostlin

Etylén

1910 - transport pomerančů a banánů (Jamajská obchodní společnost)

1934 - **Gane** (Anglie) prokázal, že etylén je produkován dozrívajícími jablky a způsobuje:

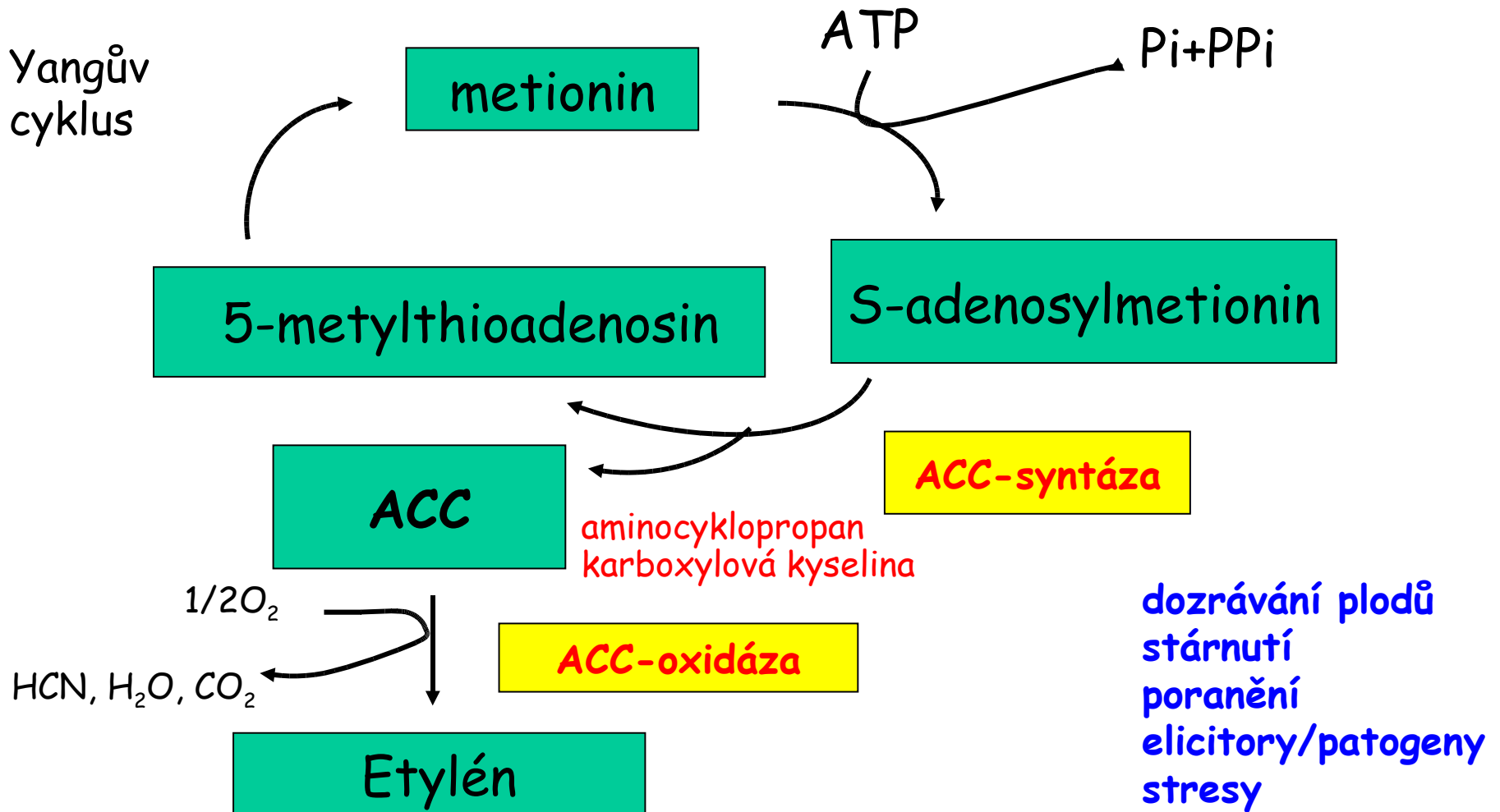
- měknutí dužiny
- změny barvy
- přeměna škrobu na cukr

Etylén

Dnes víme, že etylén je produkován všemi rostlinnými částmi, ale určité orgány jako jsou dozrávající plody, stárnoucí pletiva a meristém produkují mnohem větší množství etylénu.

Etylén je tvořen také jako odpověď na stres jako je poranění nebo invaze patogenních organismů.

Biosyntéza etylénu



Trojná odezva (triple response)

- kořeny nerostou pozitivně geotropicky
- tloustnutí stonků (hypokotylů)
- epinastické řapíky listů (zakřivují se směrem ke stonku)



trojná odezva klíčnicích rostlin rajčat
po působení ACC na semena

Účinky etylénu = rozmanité

inhibuje dlouhivý růst stonků a kořenů **změnou orientace mikrofibril celulózy**

stimuluje

dozrávání plodů

rezistenci vůči poranění a chorobám

tloustnutí stonku a kořenů, nestejná reakce vede k epinastii řapíků

senescenci květů a plodů, vyvolává tvorbu odlučovací vrstvy v řapících listů a plodů (**abscisi**)

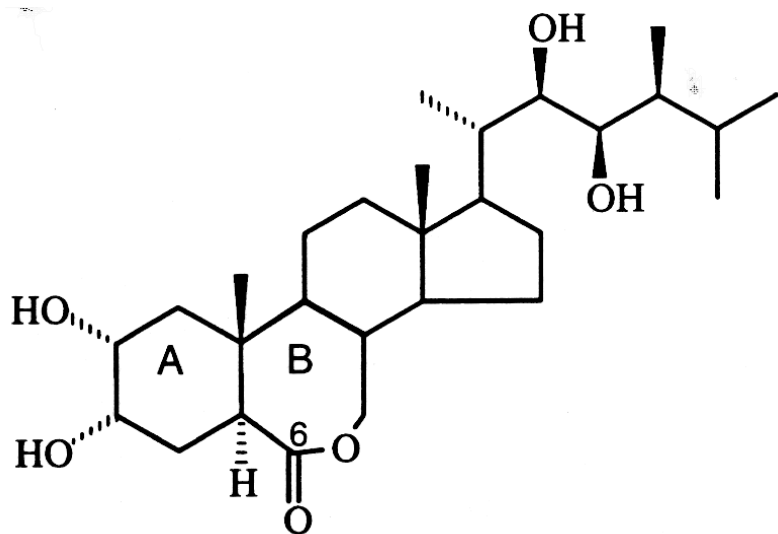
tvorbu adventivních kořenů

horizontální růst

Netradiční fytohormony

- brasinosteroidy (**brasinolid**)
- **kyselina jasmonová** a metyljasmonát
- polyaminy (**putrescin, spermin, spermidin**)
- oligopeptidy (**systemin**)
- oligosachariny
- fenolické látky (deriváty kyseliny skořicové, benzoové, kyselina salicylová)

Brasinosteroidy



1979 izolován z pylu
řepky

brassinolid

Fyziologické účinky brasinosteroidů

výrazně stimulují

- **dlouživý růst** a dělení buněk (jejich účinná koncentrace je nižší než u auxinů) - biotesty na zakrslém hrachu, fazolu, aj., výrazně interagují s IAA = mění citlivost pletiv vůči IAA
- **gravitropismus**
- **tvorbu dřevních elementů (xylogenezi)**

inhibují

- **zakládání a růst** adventivních kořenů
- **opad** listů a plodů

Oligosachariny

oligogalakturonidy - polymery odvozené od pektinu

stimulují: tvorbu květů
obranné reakce

inhibují: tvorbu kořenů

podstata působení: mění biosyntézu auxinu nebo
inhibují jeho vazbu

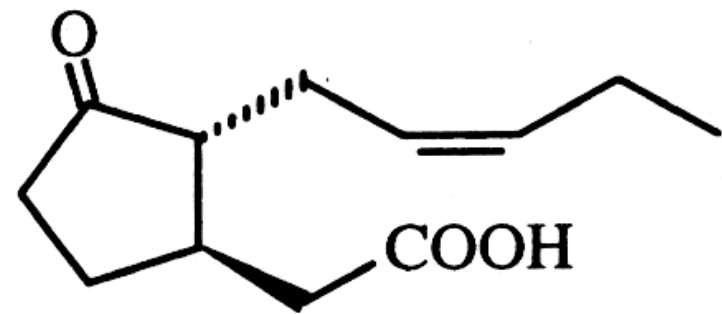
xyloglukany - např. polymery odvozené od hemicelulosy

stimulují: prodlužování buněk a růst
obranné reakce
morfogenezi (v kultuře)

Kyselina jasmonová

poprvé izolována z houby
Lasiodiplodia theobromae

izolace - jasmínový olej
Jasminum grandiflorum



kyselina jasmonová JA
- (aktivnější) a + forma

JA a její metylester MeJA - v mnoha rostlinách, téměř ve všech orgánech až 10ug/g FW

Hlavní metabolické účinky JA

stimuluje

- senescenci = urychlování stárnutí listů
- obranu vůči patogenům a hmyzu
- obranu při poranění (= signálem při reakci na dotyk, na patogeny)

inhibuje

- klíčení semen
- růst kořenů