

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Profilování rostlinných hormonů během vývojových stádií *Arabidopsis thaliana*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Zbyněk Barvívř
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok:	2019

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

V Olomouci dne

Poděkování:

Poděkování patří především vedoucímu mé práce doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D. za odborné vedení, mnohé rady, podnětné připomínky a čas mi věnovaný. Dále bych chtěl poděkovat Ivě Pavlovič, Ph.D., Mgr. Janu Šimurovi, Ph.D., Mgr. Ivanu Petříkovi a Mgr. Petře Jiroutové za pomoc a cenné rady při práci v laboratoři. Tato bakalářská práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2019_018).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zbyněk Barvůř
Název práce	Profilování rostlinných hormonů během vývojových stádií <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Fytohormony jsou významné regulační látky klíčové pro správný růst a vývoj rostlin. V rámci předložené bakalářské práce byla vyvinuta metoda pro souběžné stanovení cytokininů, auxinů, abscisátů, jasmonátů a kyseliny salicylové. Metoda využívá extrakci cílových látek z rostlinného materiálu pomocí 10% methanolu okyseleného 5 % kyseliny mravenčí. Toto extrakční činidlo dosahovalo dobré extrakční účinnosti analytů při současné nízké extrakci pigmentů. Pro izolaci fytohormonů z komplexní rostlinné matrice byla vybrána metoda extrakce na tuhé fázi. Testovány byly sorbenty se smíšeným mechanismem zadržování analytů v konvenčních kolonách anebo v miniaturizované uspořádání StageTip (STop And Go Extraction Tip). U obou purifikačních metod bylo dosaženo dobrých návratností pro většinu analytů z vybraných fytohormonálních skupin. Na závěr byla optimalizovaná metoda využívající jednokrokový izolační protokol založený na špičkách pipet plněných sorbenty použita při stanovení profilu rostlinných hormonů ve vybraných vývojových stádiích huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

Klíčová slova	fytohormony, <i>Arabidopsis thaliana</i> , extrakce na pevné fázi, kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran	60
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Zbyněk Barvíř
Title	Growth Stage–Based Plant Hormonomic Analysis of <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Assoc. Prof. Ondřej Novák, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Phytohormones are signal molecules, which play an important role in controlling growth and developmental processes in plants. In this bachelor thesis, a new method for simultaneous determination of endogenous levels of cytokinins, auxins, abscisates, jasmonates and salicylic acid has been developed. For sample extraction, 10 % methanol acidified with 5 % of formic acid was used with a high extraction efficiency and low yield of plant pigments. Solid-phase extraction was employed to isolate plant hormones from in the complex matrices of plant tissue samples. For sample purification, mixed mode conventional columns and StageTip (STop And Go Extraction Tip) technology were tested. Both isolation approaches showed sufficient recovery of all target compounds. Finally, optimized one-step purification protocol based on pipet tips filled with sorbents were used to profile selected plant hormones and their metabolites in 4-, 7-, 10- and 14-day-old *Arabidopsis thaliana* seedlings.

Keywords	phytohormones, <i>Arabidopsis thaliana</i> , solid-phase extraction, liquid chromatography, tandem mass spectrometry
Number of pages	60
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Rostlinné hormony	10
2.2 Auxiny	11
2.2.1 Biosyntéza	11
2.2.2 Metabolismus	13
2.3 Cytokininy	13
2.3.1 Biosyntéza	14
2.3.2 Metabolismus	14
2.4 Kyselina abscisová	17
2.4.1 Biosyntéza	17
2.4.2 Metabolismus	18
2.5 Kyselina salicylová	19
2.5.1 Biosyntéza	20
2.5.2 Metabolismus	20
2.6 Jasmonáty	21
2.6.1 Biosyntéza	22
2.6.2 Metabolismus	22
2.7 Transport fytohormonů a jejich signální dráhy	24
2.8 Metody analýzy fytohormonů	25
2.8.1 Extrakční postupy	25
2.8.2 Izolace fytohormonů	26
2.8.2.1 Extrakce kapalina-kapalina	26
2.8.2.2 Extrakce na pevné fázi	27
2.8.2.3 Imunoafinitní extrakce	28
2.8.3 Metody stanovení rostlinných hormonů	28
3 Experimentální část	31
3.1 Materiál a používané vybavení	31
3.1.1 Chemikálie a použitý materiál	31
3.1.2 Přístroje	32
3.1.3 Biologický materiál	32
3.2 Metody	34
3.2.1 Extrakce fytohormonů	34
3.2.1.1 Extrakční experiment I	34
3.2.1.2 Extrakční experiment II	35
3.2.2 Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů	35
3.2.3 Purifikace pomocí ISOLUTE® Multimode	35
3.2.4 Purifikace pomocí μ SPE-PT	36
3.2.4.1 Purifikační experiment StageTips I	36
3.2.4.2 Purifikační experiment StageTips II	38
3.2.5 Podmínky UHPLC-ESI-MS/MS	38
4 Výsledky a diskuze	40
4.1 Optimalizace extrakce	40
4.1.1 Extrakční experiment I	40
4.1.2 Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů	41

4.1.3 Extrakční experiment II	42
4.2 Optimalizace purifikace	43
4.2.1 Purifikace pomocí ISOLUTE® Multimode	43
4.2.2 Purifikace pomocí μ SPE-PT	45
4.3 Profilování rostlinných hormonů	47
5 Závěr	51
6 Literatura	52
7 Seznam použitých zkratk a symbolů	58
8 Přílohy	60

CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo stanovení profilů rostlinných hormonů během vývojových stádií rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) se zaměřením na optimalizaci dílčích kroků extrakce a purifikace v malém množství rostlinného pletiva (<10 mg čerstvé hmoty).

V rámci teoretické části byla vypracována rešerše zaměřená na problematiku:

- úvod do problematiky fytohormonů,
- biosyntéza a metabolismus vybraných skupin fytohormonů,
- metody izolace rostlinných hormonů,
- metody cíleného profilování rostlinných hormonů.

V experimentální části byly realizovány experimenty zaměřené na studium:

- pěstování a sběr rostlinného materiálu v různých vývojových stádiích,
- optimalizace extrakce a kroků izolace vybraných fytohormonálních skupin,
- stanovení celkového profilu rostlinných hormonů v *Arabidopsis thaliana* pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie,
- vyhodnocení naměřených dat a jejich diskuze se současnou literaturou.

1 ÚVOD

Fytohormony jsou nízkomolekulární látky s biologickou aktivitou vyskytující se u rostlin. S působením fytohormonů se setkáváme jak u dlouhodobé regulace růstu rostlin, tak u okamžité reakce na aktuální podněty z okolí. Působení fytohormonů je mnohdy provázané a výsledný efekt je tak odrazem účinku více než jednoho z nich. Jedná se tedy o velmi složitou síť rozličných hormonálních signálních drah, jejíž pochopení vyžaduje zapojení moderních vědeckých přístupů a metod.

Analytické stanovení těchto signálních látek značně komplikuje jejich výskyt v pletivech ve velmi nízkých koncentracích. Při souběžném stanovování více cílových látek se pak můžeme setkat také s výrazně rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi vybraných analytů. Z tohoto důvodu je nalezení ideálních podmínek extrakce kompromisem mezi výběrem vhodného extrakčního činidla pro získání co největšího množství analytů a snížením obsahu balastních látek. V izolačním kroku je pak nutné zvolit vhodný postup k oddělení cílových látek od látek rušících stanovení při dosažení maximální návratnosti analytů.

Pro izolaci fytohormonů může být použita například extrakce kapalina-kapalina, v této práci však byla použita metoda extrakce na tuhé fázi (SPE) a její miniaturizace do podoby špiček pipet plněných sorbentem (μ SPE-PT). Samotná kvantifikace pak bývá provedena nejčastěji pomocí chromatografických metod v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, v našem případě byla použita ultra rychlá kapalinová chromatografie propojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

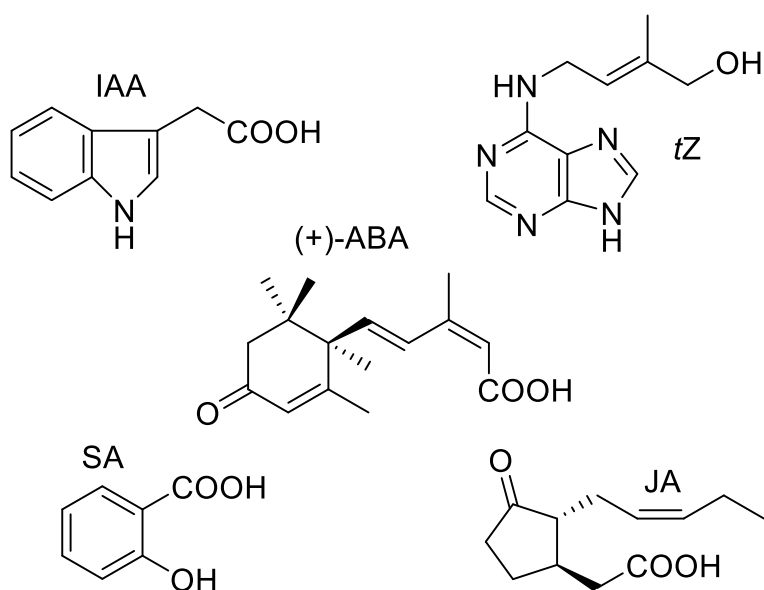
Jak je ukázáno na závěr této práce, díky nově vyvinutým a optimalizovaným metodikám jsme schopni monitorovat homeostázi fytohormonů v malém množství rostlinného pletiva (<10 mg č. h.) během vývojových stádií rostlin. Profilování rostlinných hormonů společně s dalšími molekulárně-biologickými a biochemickými výsledky nám pomáhá pochopit procesy řídící růst a vývoj rostlin.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou chemické látky vyskytující se v rostlinách, které zajišťují chemický přenos informace mezi buňkami. Jedná se o několik skupin látek vyznačujících se biologickou aktivitou, které ovlivňují fyziologické procesy v rostlině. Nejčastěji se setkáváme s rozdělením na skupinu rostlinných hormonů a látek, které jsou svými vlastnostmi rostlinným hormonům příbuzné: auxiny, cytokininy, gibbereliny, ethylen, kyselinu abscisovou, brasinosteroidy, jasmonáty, kyselinu salicylovou, polyaminy a signální peptidy (Davies, 2010). V jednotlivých skupinách pak můžeme nalézt látky s podobnou biologickou aktivitou i přes rozdílnou chemickou povahu jednotlivých zástupců.

K vyvolání fyziologické odezvy dochází již při velmi nízkých koncentracích fytohormonů. Citlivost na úrovni jednotlivých pletiv je dána množstvím receptorů citlivých na daný fytohormon. Např. membránové receptory zprostředkovávají přenos hormonální mimobuněčné informace do vnitřního prostředí buňky, kde je příslušná biologická odpověď vyvolána pomocí tzv. druhých posílů a dalších složek signální kaskády. Některé fytohormony mohou také pronikat do cytoplasmy, kde se váží na cytoplasmatické receptory, čímž mohou změnit například expresi některých genů (Procházka *et al.*, 1998).



Obr. 1 Strukturální vzorce vybraných zástupců fytohormonů (kys. indol-3-ylactová, IAA; *trans*-zeatin, tZ; kys. abscisová, ABA; kys. salicylová, SA; kys. jasmonová, JA).

2.2 Auxiny

Auxiny, pojmenované podle řeckého slova „auxein“ vyjadřujícího prodlužování, byly poprvé izolovány již v roce 1933 (Kögl, 1933). Ten pojmenoval tyto sloučeniny jako auxin *a* a auxin *b*. O rok později pak objevil také kyselinu indol-3-ylaceticovou (IAA, Obr. 1), když ji izoloval z lidské moči (Kögl *et al.*, 1934). Avšak až do roku 1941, kdy byla izolována z vyšších rostlin (Haagen-Smit *et al.*, 1941) nebyla IAA uznávána za přirozený rostlinný hormon. Dnes již známe množství látek řazených mezi auxiny zahrnující jak přirozené, tak synteticky připravené molekuly. Kromě již zmíněné IAA můžeme tedy v rostlině nalézt kyselinu indol-3-ylmásečnou (IBA), kyselinu 4-chlorindol-3-ylaceticovou nebo kyselinu fenylaceticovou (PAA). Ze syntetických auxinů bychom mohli jmenovat kyselinu 2,4-dichlorfenylaceticovou nebo kyselinu naftalen-2-ylaceticovou (Davies, 2010).

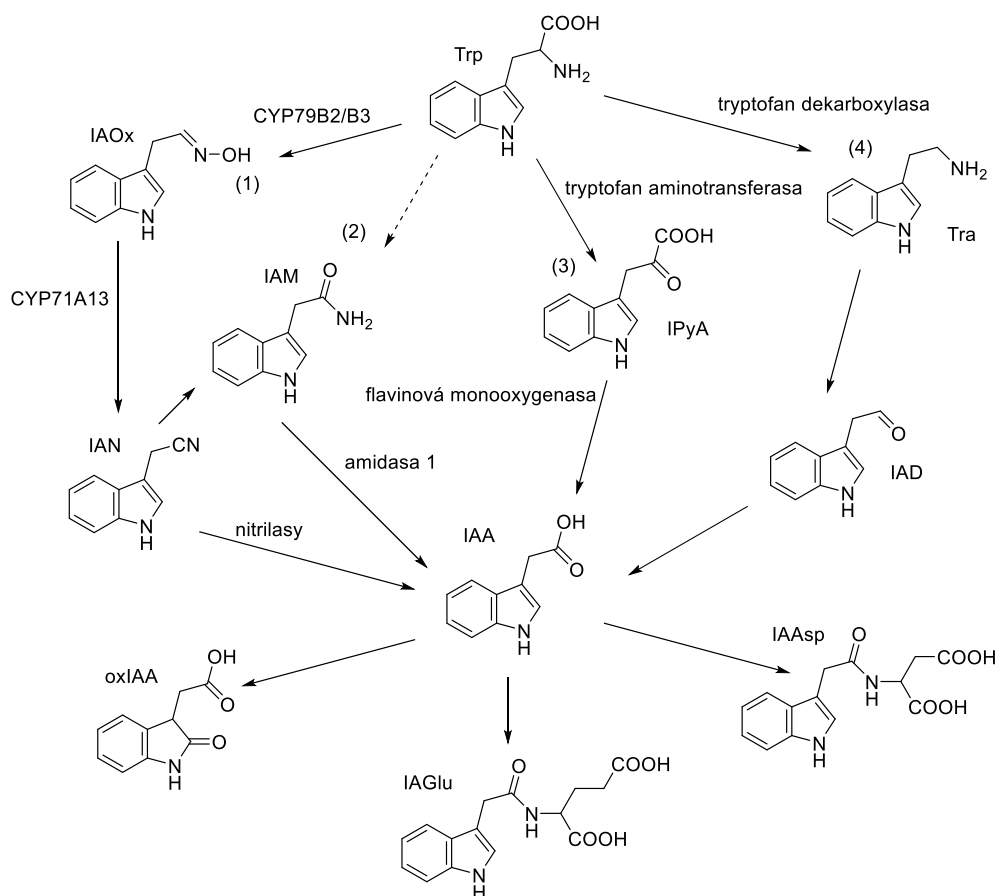
Nejvýznamnějším auxinem rostlin je IAA. Dále se v rostlinách vyskytuje mnoho dalších indolových sloučenin s auxinovou aktivitou, z nichž některé jsou metabolicky spojeny s IAA (Procházka *et al.*, 1998). Aktivita auxinů v rostlině je kontrolována jejich biosyntézou, konjugací, degradací a aktivním transportem (Korasick *et al.*, 2013). Svou roli nacházejí auxiny v regulaci mnoha fyziologických procesů. Vlivem auxinů například dochází ke stimulaci buněčného růstu a dělení, podporují také větvení kořenů. Nepostradatelný účinek mají při gravitropismu a fototropismu. Dále oddalují senescenci a potlačují růst laterálních pupenů (Davies, 2010).

2.2.1 Biosyntéza

Biosyntéza *de novo* probíhá v rostlinách dvěma základními způsoby. Dominantním je syntéza z tryptofanu, která může probíhat čtyřmi různými biosyntetickými drahami pojmenovanými podle jejich prvních meziproductů (Obr. 2, str. 12): (1) indol-3-ylacetaldoxim (IAOx), (2) indol-3-ylacetamid (IAM), (3) indol-3-ylpyrohroznová kyselina (IPyA) a (4) tryptamin (Tra) (Andrew a Bartel, 2005). Primární biosyntetickou dráhou je ta vedoucí přes IPyA (3), kdy dochází pomocí tryptofan aminotransferasy k přenosu aminoskupiny na pyruvát nebo α -ketoglutarát. Vzniklá IPyA podléhá reakci katalyzované flavinovou monooxygenasou za vzniku IAA (Zhao, 2018). V další biosyntetické dráze (4) dochází působením tryptofan dekarboxylasy na tryptofan ke vzniku tryptaminu. Ten je následně dále přeměněn na indol-3-ylacetaldehyd (IAD) a následně na IAA. Biosyntetická dráha vedoucí přes IAOx (1) začíná jeho tvorbou

z tryptofanu pomocí cytochrom P450 monooxygenasy 79B2/B3. Dále dochází za katalýzy cytochromem P450 monooxygenasou 71A13 ke vzniku indol-3-ylacetonitrilu (IAN), který je dále pomocí nitrilas přeměněn na IAA. IAOx může být také přeměněn na indol-3-ylacetamid (IAM) (Sugawara *et al.*, 2009; Malka a Cheng, 2017). IAM (2) je na IAA přeměňována pomocí amidasy 1 (Pollmann *et al.*, 2006). Enzym zajišťující přeměnu tryptofanu na IAM nebyl u rostlin nalezen (Malka a Cheng, 2017).

Byla také popsána biosyntéza IAA pomocí na tryptofanu nezávislé dráhy z indol-3-ylglycerol fosfátu (Normanly *et al.*, 1993). Přeměna indol-3-ylglycerol fosfátu na indol je katalyzována indol syntasou (Zhang *et al.*, 2008; Malka a Cheng, 2017). Další kroky této biosyntetické dráhy však dosud nejsou popsány. Nejvýznamnějšími místy syntézy jsou mladé listy, kde je nejvyšší biosyntetická kapacita (Ljung *et al.*, 2001), dále dochází k syntéze také ve vyvíjejících se semenech a vzrostných vrcholech stonku (Davies, 2010).



Obr. 2 Schéma biosyntézy a vybraných metabolických drah IAA (tryptofan, Trp; tryptamin, Tra; indol-3-ylacetaldehyd, IAD; kyselina indol-3-ylpyrohroznová, IPyA; indol-3-ylacetamid, IAM; indol-3-ylacetaldoxim, IAOx; indol-3-ylacetonitril, IAN; kyselina indol-3-yloctová, IAA; indol-3-ylacetylaspartát, IAAsp; indol-3-ylacetylglutamát, IAGlu; 2-oxindol-3-yloctová kyselina, oxIAA; cytochrom P450 monooxygenasa, CYP79B2/B3; cytochrom P450 monooxygenasa, CYP71A13) (dle Malka a Cheng, 2017).

2.2.2 Metabolismus

Pro udržení vnitřní fyziologické rovnováhy je nutné případné nadbytečné množství hormonu odstranit. Může se tak dít nevratnou degradací nebo konjugací, při které vznikají neaktivní formy daného hormonu.

U auxinů může ke konjugaci docházet tvorbou esterové vazby se sacharidy nebo amidové vazby s aminokyselinami, případně peptidy a proteiny (Ludwig-Müller, 2011). V rámci druhů se převažující konjugáty liší, například u kukuřičných zrn je IAA konjugována hlavně se sacharidy (Bandurski *et al.*, 1995), zatímco u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) dochází ke konjugaci převážně s aminokyselinami (Bajguz a Piotrowska, 2009). V případě potřeby mohou být některé konjugáty rozloženy hydrolytickými enzymy zpět na aktivní formu. Příkladem vzniku ireverzibilních konjugátů může být tvorba vazby IAA s kyselinou asparagovou (IAAsp) nebo glutamovou (IAGlu) (Obr. 2). Tyto konjugáty není možné rozložit zpět a vedou tak k degradaci stejně tak jako oxidace samotné molekuly IAA na kyselinu 2-oxindol-3-ylactovou (oxIAA) (Ljung *et al.*, 2002).

2.3 Cytokininy

Prvním izolovaným cytokininem (CK) se v roce 1955 stal kinetin (Miller *et al.*, 1955), který byl později identifikován v kokosové vodě (Ge *et al.*, 2005). O 8 let později byl pak izolován z kukuřice seté první přirozený cytokinin, trans-zeatin (tZ, Obr. 1) (Letham, 1963). V průběhu let bylo po objevení dalších cytokininů zjištěno, že se jedná o N6 substituované adeniny. Substituent může být povahy isoprenoidní, pak jde o isoprenoidní cytokininy, nebo aromatické, kdy mluvíme o aromatických cytokininech. V případě nemodifikovaného isoprenoidního postranního řetězce se jedná o isopentenylový typ, pokud je však postranní řetězec hydroxylován na koncovém uhlíku, jde o zeatinový typ (Takei *et al.*, 2004). Specifickou skupinu tvoří syntetické cytokininy, které mohou vykazovat cytokininovou aktivitu, ale přirozeně se v rostlinách nevyskytují (Mok a Mok, 2001).

Významnými zástupci isoprenoidních cytokininů jsou tZ se systematickým názvem 6-(4-hydroxy-3-methylbut-trans-2-enyl)aminopurin a N6-isopentenyladenin (iP), systematicky N-(3-Methylbut-2-enyl)-7H-purin-6-amin. Z aromatických cytokininů můžeme jmenovat například N6-benzyladenin nebo N6-furfurylidenin (kinetin). Další skupinou cytokininů jsou deriváty modifikované na pozici C2 methylthio skupinou (2MeSCKs). Příkladem syntetických derivátů jsou sloučeniny močoviny a thiomčoviny,

např. thidiazuron (systematicky N-fenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl močovina) (Feng et al., 2017).

V rostlinách dochází vlivem přítomnosti cytokininů k dělení buněk, zvětšování listů a oddálení senescence, iniciují také růst nadzemní části rostliny. Stimulují také růst laterálních kořenů, čímž působí antagonicky k auxinům. U některých druhů dochází vlivem cytokininů k otevírání průduchů (Davies, 2010).

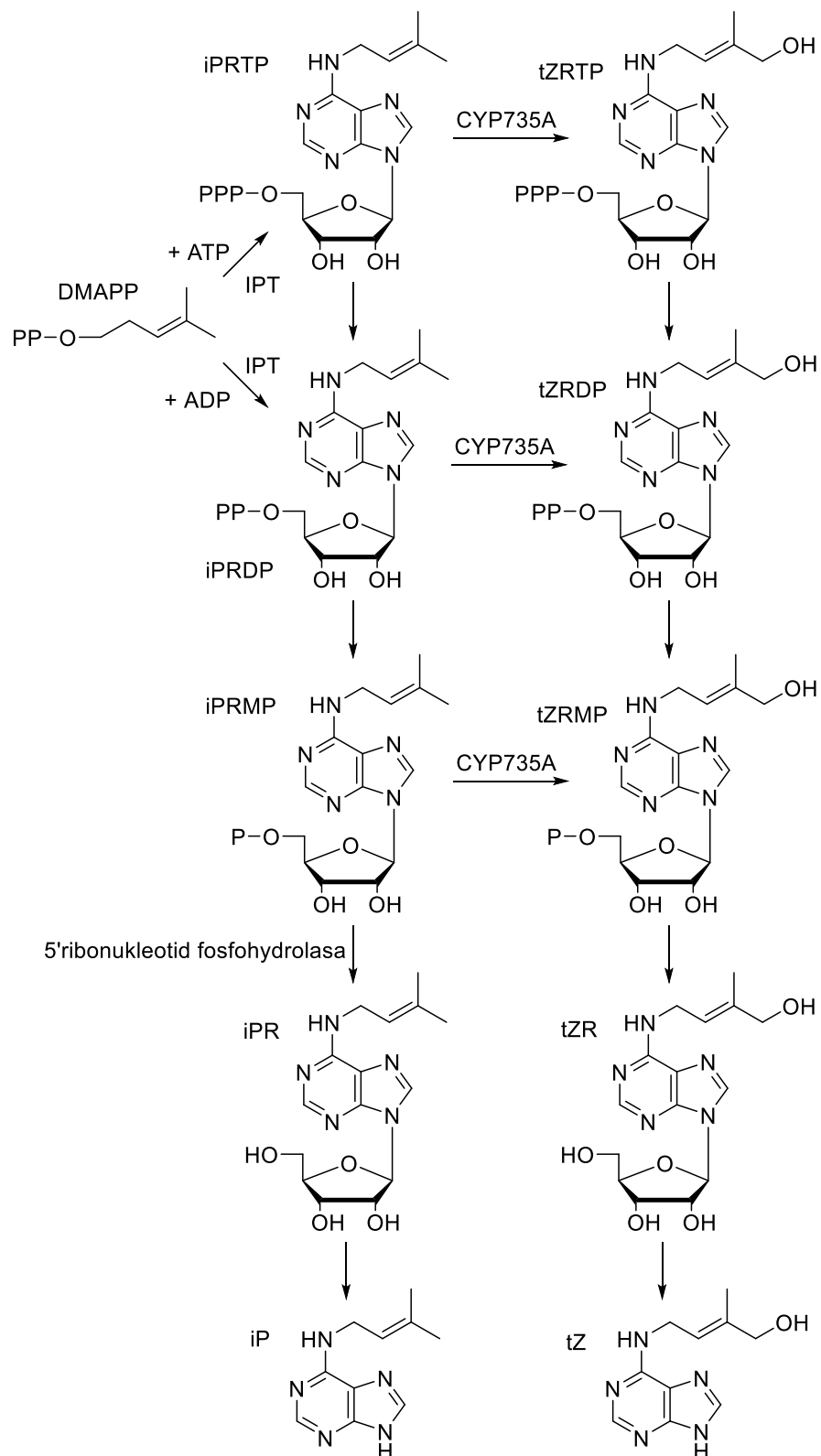
2.3.1 Biosyntéza

Pro syntézu isoprenoidních cytokininů jsou v rostlině využívány dvě biosyntetické dráhy. První dráha je založená na isopentenylaci adenosintrifosfátu nebo adenosindifosfátu pomocí dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) (Obr. 3, str. 15). Tato reakce katalyzovaná enzymem adenosin isopentenyltransferasou (IPT) vede k produkci isopentenyladenosin-5'-trifosfátu (iPRTP) nebo isopentenyladenosin-5'-difosfátu (iPRDP). Podobně probíhá reakce v přítomnosti 4-hydroxy-3-methyl-(*E*)-but-2-enyl difosfátu za vzniku ribonukleotidů (ribotidů) zeatinového typu (Davies, 2010). Defosforylace iPRTP/iPRDP vede k tvorbě isopentenyladenosin-5'-monofosfátu (iPRMP) a poté za účasti 5'-ribonukleotid fosfohydrolasy až k isopentenyladenosinu (iPR). Navíc příslušné *tZ*-ribotidy mohou být také z fosforylovaných isopentenyladenosinů vytvořeny monooxygenasovou reakcí katalizovanou cytochromem P450 monooxygenasou (CYP735A). Aktivní formy cytokininů (volné báze) jsou poté z příslušných CK nukleosidů uvolněny adenosin nukleosidasou. Celková CK biosyntéza může být urychlena zapojením enzymu fosforibohydrolasy vznikajícího expresí tzv. LONELY GUY genu. V jeho přítomnosti dochází k přímému vzniku aktivních forem cytokininů z jejich ribotidů (Takei *et al.*, 2004; Kieber a Schaller, 2014).

Druhá dráha je spojena s degradací tRNA, kdy dochází v prvním kroku k isopentenylaci adeninových residuí za katalýzy enzymem tRNA-IPT (Taller, 1994). V molekule tRNA mohou být však obsaženy i již derivované adeniny. Postupným rozkladem těchto molekul pak vznikají konjugáty cytokininů a následně hlavně volné formy *cis*-zeatinu (*cZ*) (Mok a Mok, 2001).

2.3.2 Metabolismus

K modifikaci cytokininových struktur může docházet dvěma základními způsoby. Modifikace může proběhnout na adeninové části molekuly, kdy dochází k reakcím obdobným purinové metabolické dráze. Enzymy této dráhy však preferují jako substrát



Obr. 3 Schéma biosyntézy cytokininů (dimethylallylpyrofosfát, DMAPP; isopentenyltransferasa, IPT; isopentenyladenosin-5'-trifosfát, iPRTP; isopentenyladenosin-5'-difosfát, iPRDP; isopentenyladenosin-5'-monofosfát, iPRMP; isopentenyladenosin, iPR; *trans*-zeatin ribosid 5'-trifosfát, tZRTP; *trans*-zeatin ribosid 5'-difosfát, tZRDP; *trans*-zeatin ribosid 5'-monofosfát, tZRMP; *trans*-zeatin ribosid, tZR; *trans*-zeatin, tZ) (dle Takei et al., 2004).

adenin před cytokininy (Davies, 2010). Přeměna volných cytokininů na nukleosidy probíhá pomocí enzymu adenosin fosforylasy (Chen a Petschow, 1978). Vzniklé nukleosidy mohou být následně fosforylovány na nukleotidy pomocí adenosin kinasy (Chen a Eckert, 1977). Alternativně může být změna volných cytokininů na jejich ribosidy katalyzována adenin fosforibosyltransferasou (Allen *et al.*, 2002). Dále se můžeme setkat s *N*-glukosylací na pozicích 3, 7 a 9 purinového cyklu. Pokud dojde ke glukosylaci na pozicích 7 nebo 9 pomocí glukosyltransferasy, dochází k inaktivaci cytokininu (Entsch *et al.*, 1979; Davies, 2010). Na pozici *N*9 může také docházet k reakci s alaninem katalyzované β -(9-cytokinin)-alanine synthasou (Entsch *et al.*, 1983).

Naopak specifické enzymy jsou známy u druhého způsobu modifikace cytokininů, kdy dochází ke změnám na postranním řetězci (Davies, 2010). U *tZ* může docházet k jeho redukci na dihydrozeatin (DHZ) (Martin *et al.*, 1989). DHZ totiž není substrátem pro cytokininoxidasu/dehydrogenasu (CKX) a nedochází tak k jeho degradaci (Davies, 2010). Tato reakce katalyzovaná zeatin reduktasou proto může mít výrazný vliv na udržení aktivity cytokininů. U cytokininů zeatinového typu může dále docházet díky přítomnosti hydroxyskupiny v postranním řetězci k její glukosylaci pomocí *O*-glukosyltransferasy. Vzniklý *O*-glukosid může být zpětně hydrolyzován β -glukosidasou za vzniku volného aktivního cytokininu, což vede k udržování rovnovážného stavu (tzv. cytokininové homeostázy). U některých rostlinných druhů je známa také xylosylace pomocí *O*-xylosyltransferasy (Mok a Mok, 2001).

Degradace cytokininů probíhá jejich oxidací pomocí CKX. Touto reakcí dochází ireverzibilně k inaktivaci cytokininu vlivem oxidace na exocyklickém dusíku za vzniku adeninu a aldehydu, který odpovídá idá postrannímu řetězci. Původně se předpokládalo, že jde o enzym ze skupiny oxidas, teprve před několika lety bylo dokázáno, že se jedná o dehydrogenační enzym s flavinovým kofaktorem (Galuszka *et al.*, 2001). Jako substrát mohou vystupovat jak samotné volné cytokininy, tak i jejich ribosidy. CK nukleotidové deriváty však této enzymatické reakci nepodléhají, stejně tak jako DHZ-typy (cytokininy s redukovanou dvojnou vazbou v postranním isoprenoidním řetězci) (Davies, 2010). Také aromatické cytokininy jsou ve srovnání s jejich isoprenoidními formami horšími substráty (Frébortová *et al.*, 2004).

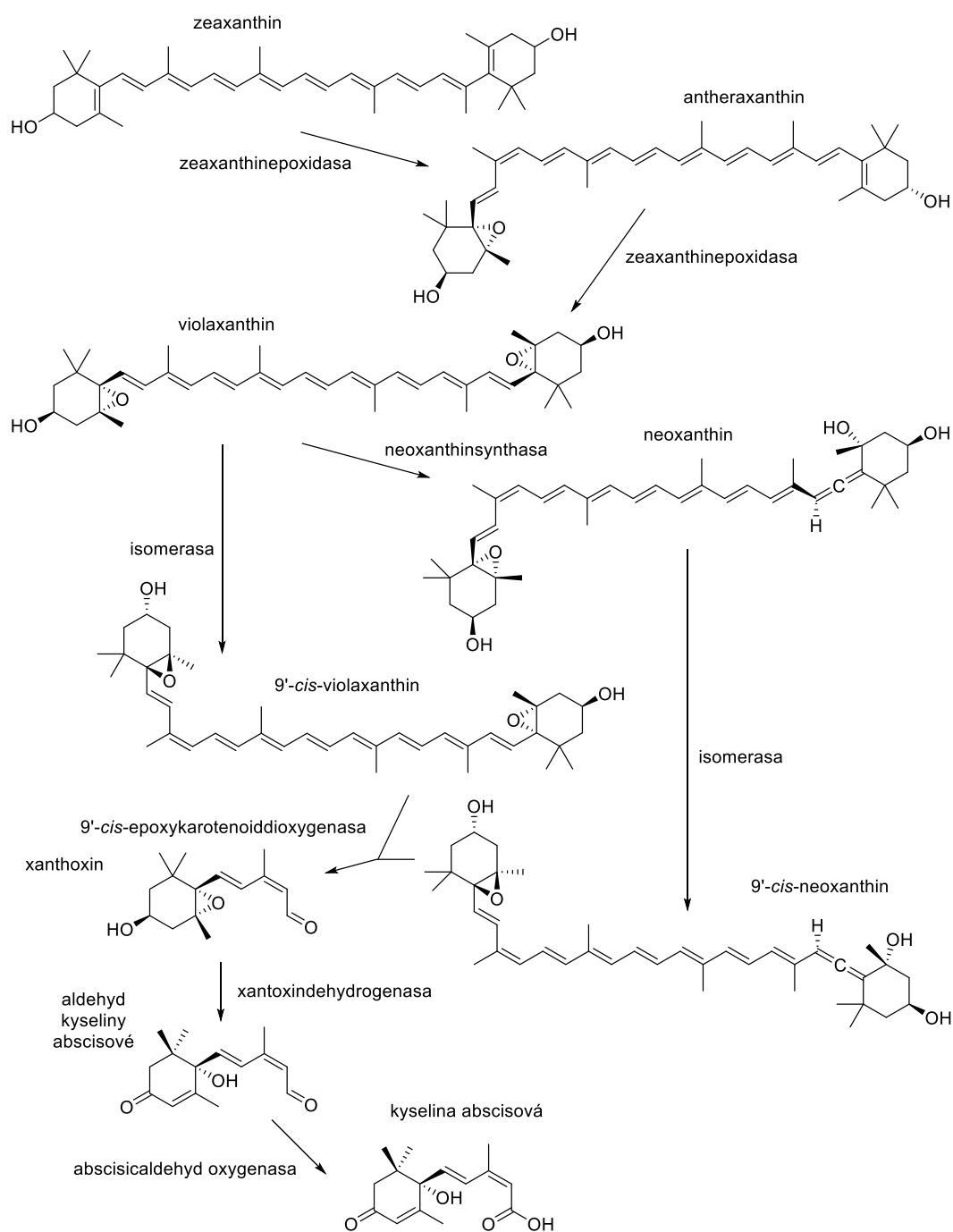
2.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) byla objevena nezávisle několika skupinami v 60. letech 20. století. Původně byla jednou ze skupin nazvána jako abscisin II, druhou skupinou jako dormin, podle jejich domnělého vlivu na abscisi a dormanci. Jako kompromis byl následně navržen název kyselina abscisová (Addicott *et al.*, 1968). Skelet molekuly je odvozen od seskviterpenu a díky dvojným vazbám a jednomu centru asymetrie se může vyskytovat v několika stereoisomerech, z nichž je však aktivní pouze jeden (Obr. 1) (Yu *et al.*, 2006).

Díky své významné roli v reakci na biotické i abiotické (nedostatek vody, nízká teplota, osmotický stres) stresové podmínky je ABA zařazována do skupiny stresových hormonů (Zhang *et al.*, 2014). Významně se podílí na zavírání průduchů při nedostatku vody, na útlumu růstu nadzemní části. Indukuje také syntézu zásobních proteinů v semenech a brání syntéze α -amylasy blokováním vlivu gibberelinů na tento děj v klíčících zrnech obilí. Ovlivňuje také navození a udržení dormance, zde se však nejedná o rozhodující efekt (Davies, 2010).

2.4.1 Biosyntéza

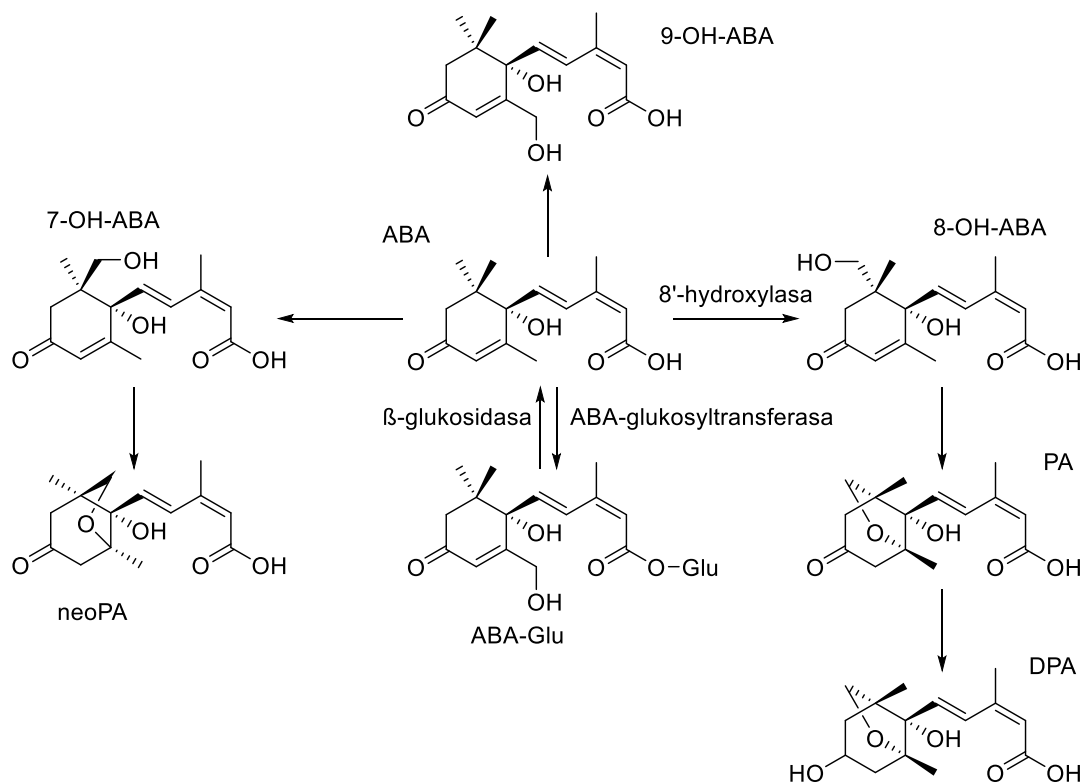
Biosyntéza ABA může probíhat z několika různých výchozích látek. Jakožto látka isoprenoidní povahy může být přes isopentenyl difosfát (IDP) syntetizována z mevalonátu (MVA). Byla již však objevena i alternativní dráha syntézy IDP z D-glyceraldehyd-3-fosfátu a pyruvátu skrze vznik 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfátu (Lichtenthaler, 1999). Syntéza molekuly ABA obsahující 15 atomů uhlíku probíhá tedy hlavně z β -karotenu pocházejícího z MVA dráhy (Obr. 4, str. 18). β -karoten je přeměněn na zeaxanthin, který je dále metabolizován na violaxanthin pomocí enzymu zeaxanthinepoxidasy. Ten může být následně neoxanthinsynthasou přeměněn na neoxanthin. Neoxanthin i violaxanthin jsou poté isomerovány na své 9'-*cis* formy pomocí isomeras. Ty jsou 9'-*cis*-epoxykarotenoid dioxxygenasou převedeny na xanthoxin, který je přeměněn xanthoxin dehydrogenasou na ABA aldehyd, který je následně oxidován abscisicaldehyd oxygenasou na samotnou kyselinu abscisovou (Vishwakarma *et al.*, 2017). Geny kódující tyto enzymy jsou exprimovány především při abiotickém stresu, čímž dochází ke zvýšené syntéze kyseliny abscisové (Tuteja, 2007).



Obr. 4 Schéma biosyntézy ABA (dle Vishwakarma et al., 2017).

2.4.2 Metabolismus

K útlumu účinku ABA je kromě potlačení její biosyntézy využívána rostlinou také její degradace, která může probíhat dvěma hlavními dráhami (Obr. 5, str. 19). Při degradaci na kyselinu fazeovou (PA) je počátečním krokem hydroxylace na pozici 8' pomocí 8'-hydroxylasy. Nestabilní 8'-hydroxy-ABA se následně může spontánně měnit na PA,



Obr. 5 Schéma metabolismu ABA (kyselina abscisová, ABA; kyselina 7-hydroxyabscisová, 7-OH-ABA; kyselina 8-hydroxyabscisová, 8-OH-ABA; kyselina 9-hydroxyabscisová, 9-OH-ABA; kyselina neofazeová, neoPA; kyselina fazeová, PA; kyselina dihydrofazeová, DPA; glukosylester kyseliny abscisové, ABA-Glu) (dle Schwartz a Zeevaart, 2010).

v rostlinách však tato reakce probíhá pravděpodobně enzymaticky. Kyselina fazeová může být redukována na kyselinu dihydrofazeovou (DPA), která může být na pozici 4' konjugována s glukosou. Druhou degradační drahou je hydroxylace na pozici 7' za vzniku 7'-hydroxy-ABA (7'-OH-ABA) nebo pozici 9', kdy vzniká kyselina neofazeová (neoPA) (Schwartz a Zeevaart, 2010).

Pro inaktivace kyseliny abscisové může být použita také konjugace s glukosou katalyzovaná ABA-glukosyltransferasou (Davies, 2010). Tento esterový konjugát může být skladován ve vakuolách a rychle rozkládán β-glukosidasami za účelem rychlého zisku volné ABA, která je klíčová při adaptaci na abiotické stresové podmínky (Xu *et al.*, 2014).

2.5 Kyselina salicylová

Účinky kyseliny salicylové (SA, Obr. 1) byly lidstvu známé již v pravěku, kdy byla kůra vrby používána k zmírnění bolesti a proti horečce. Teprve v 20. letech 19. století byla identifikována účinná látka, která byla podle zdroje pojmenovaná jako salicin,

později byla však přejmenována na kyselinu salicylovou. V roce 1852 došlo poprvé k umělé syntéze kyseliny salicylové a byl také odvozen její strukturní vzorec, systematicky se jedná o 2-hydroxybenzoovou kyselinu. V dnešní době je ve farmaceutickém průmyslu používán její derivát (kyselina acetylsalicylová).

V rostlinách se jedná o sloučeninu významně se podílející na ochraně před patogeny. Dále je znám též inhibiční vliv na biosyntézu ethylenu a klíčení semen, blokuje také účinek kyselina abscisové (Davies, 2010). Podílí se také na regulaci termogeneze a regulaci růstu rostliny (Dempsey a Klessig, 2017).

2.5.1 Biosyntéza

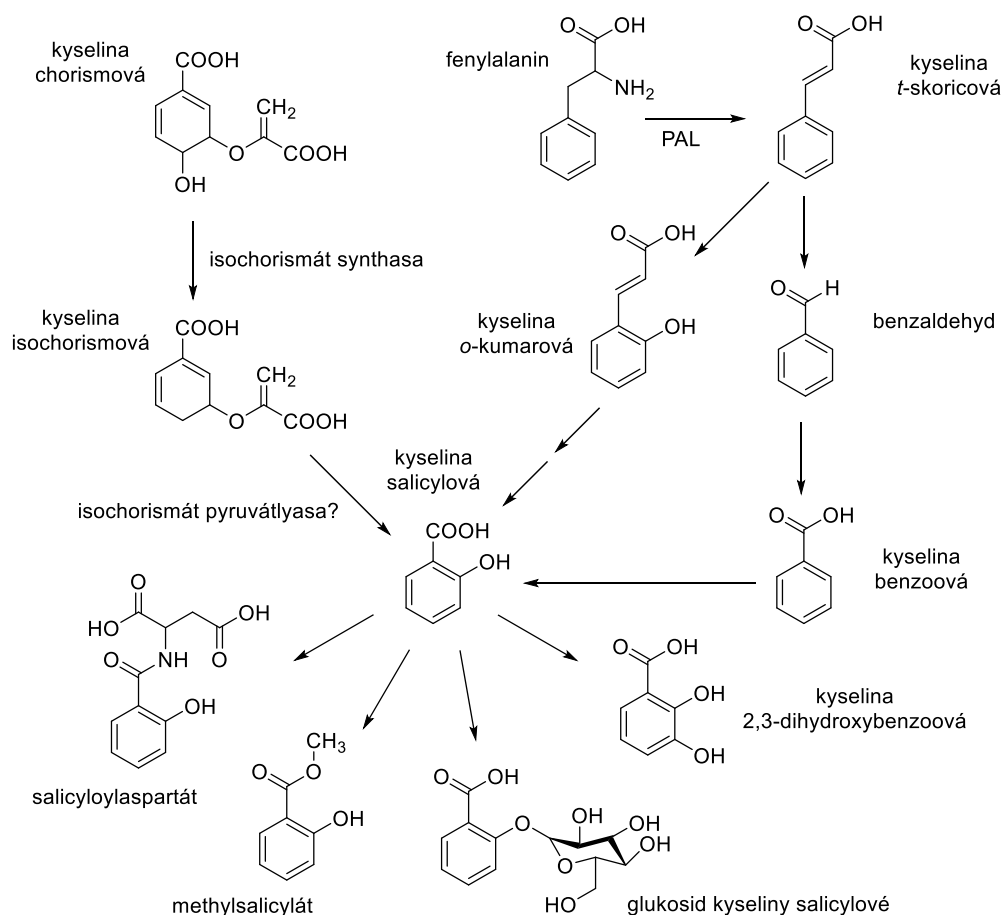
K syntéze SA dochází v rostlině dvěma metabolickými drahami, ani jedna z nich však není zcela objasněna (Obr. 6, str. 21). V první dráze dochází k přeměně fenylyalaninu na kyselinu *trans*-skořicovou pomocí fenylyalanin-amoniaklyasy (PAL). Ta je dále u různých rostlinných druhů metabolizována na kyselinu salicylovou přes *o*-kumarovou kyselinu nebo přes benzoovou kyselinu (Dempsey a Klessig, 2017).

Druhá dráha vychází z kyseliny chorismové, která je za katalýzy isochorismát syntasy přeměňována na isochorismát. Předpokládá se, že tato dráha je analogická jako u některých bakterií (Wildermuth *et al.*, 2001), u rostlin však nebyl zatím objeven odpovídající gen kódující isochorismát pyruvátlyasu, díky které dochází k přeměně isochorismátu na samotnou SA (Dempsey a Klessig, 2017).

2.5.2 Metabolismus

Glykosylací SA na hydroxylové skupině dochází ke vzniku 2-O- β -D-glukosidu (Obr. 6). Ten je následně transportován do vakuoly a v případě potřeby při obranné reakci vyvolané přítomností patogenu může docházet k hydrolýze na aktivní kyselinu salicylovou. Pokud je glukosa konjugována na karboxylovou skupinu, tvoří se glukosové estery.

Další možností konjugace je methylace za tvorby kyseliny methylsalicylové. Ta je floémem transportována do ostatních pletiv, kde zpětný rozklad na kyselinu salicylovou indukuje ochranu proti infekcím (Park *et al.*, 2007). Patogenem napadené rostliny také hydroxylací kyseliny salicylové syntetizují 2,3-dihydroxybenzoovou kyselinu, díky němuž zabráňují nadměrnému hromadění SA (Zhang *et al.*, 2013). Dále může docházet ke konjugaci SA např. s aspartátem, což vede k její degradaci (Dempsey *et al.*, 2011).



Obr. 6 Schéma biosyntézy a metabolismu SA (fenylalanin-amoniaklyasa, PAL) (dle Dempsey a Klessig, 2017).

2.6 Jasmonáty

Tato skupina hormonů dostala svůj název podle rostliny jasmínu velkokvětého (*Jasminum grandiflorum*), u něž je methylester kyseliny jasmonové (JA-Me) jednou z významných vonných složek. Z této rostliny byl také poprvé v roce 1962 izolován (Demole *et al.*, 1962). Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou kyselina jasmonová (JA, Obr.1.), systematickým názvem kyselina (1*R*,2*R*)-3-Oxo-2-(2*Z*)-pent-2-en-1-ylcyklopentenylactová. Jedná se o látku s dvěma chirálními centry na atomech uhlíku C3 a C7, z čehož vyplívá existence čtyř možných isomerů, přirozeně se však u rostlin vyskytují pouze isomery (–)-JA (3*R*, 7*R*) a (+)-7-*iso*-JA (3*R*, 7*S*) (Holbrook *et al.*, 1997). Jak bylo potvrzeno nedávno, nejvyšší biologickou aktivitu vykazuje konjugát isoleucinu s (+)-7-*iso*-JA (JA-Ile, (+)-7-*iso*-jasmonoyl-L-isoleucine), který hraje důležitou úlohu v signální dráze jasmonátů (Fonseca *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010).

Významnou rolí kyseliny jasmonové je ochrana rostliny před patogeny. Těkavý methylester zajišťuje navíc zprostředkování této informace k rostlinám v okolí (Farmer

a Ryan, 1990). Vliv jasmonátů můžeme nalézt také při inhibici růstu rostliny nebo také klíčení semen. Naopak pozitivní regulační účinek mají na senescenci, opad listů, zrání plodů, tvorbu pigmentů, stáčení výhonků a další (Davies, 2010).

2.6.1 Biosyntéza

Kyselina jasmonová je v rostlině syntetizována z α -linolenové kyseliny (Obr. 7, str. 23). Ta je v plastidech uvolněna pomocí fosfolipázy A1 z galaktolipidů. Za katalýzy 13-lipoxygenasy dochází k oxidaci za vzniku 13-hydroperoxylinolenové kyseliny. Následně dochází pomocí enzymů allendioxidsynthasy a allenoxidcyklyasy ke vzniku *cis*-(+)-12-oxofytodienové kyseliny (*cis*-OPDA), která je transportována do peroxisomů, kde je *cis*-OPDA reduktasou³ redukována. Vzniklý produkt následně podléhá třikrát β -oxidaci, čímž vzniká (+)-7-*iso*-jasmonová kyselina (Wasternack a Strnad, 2018).

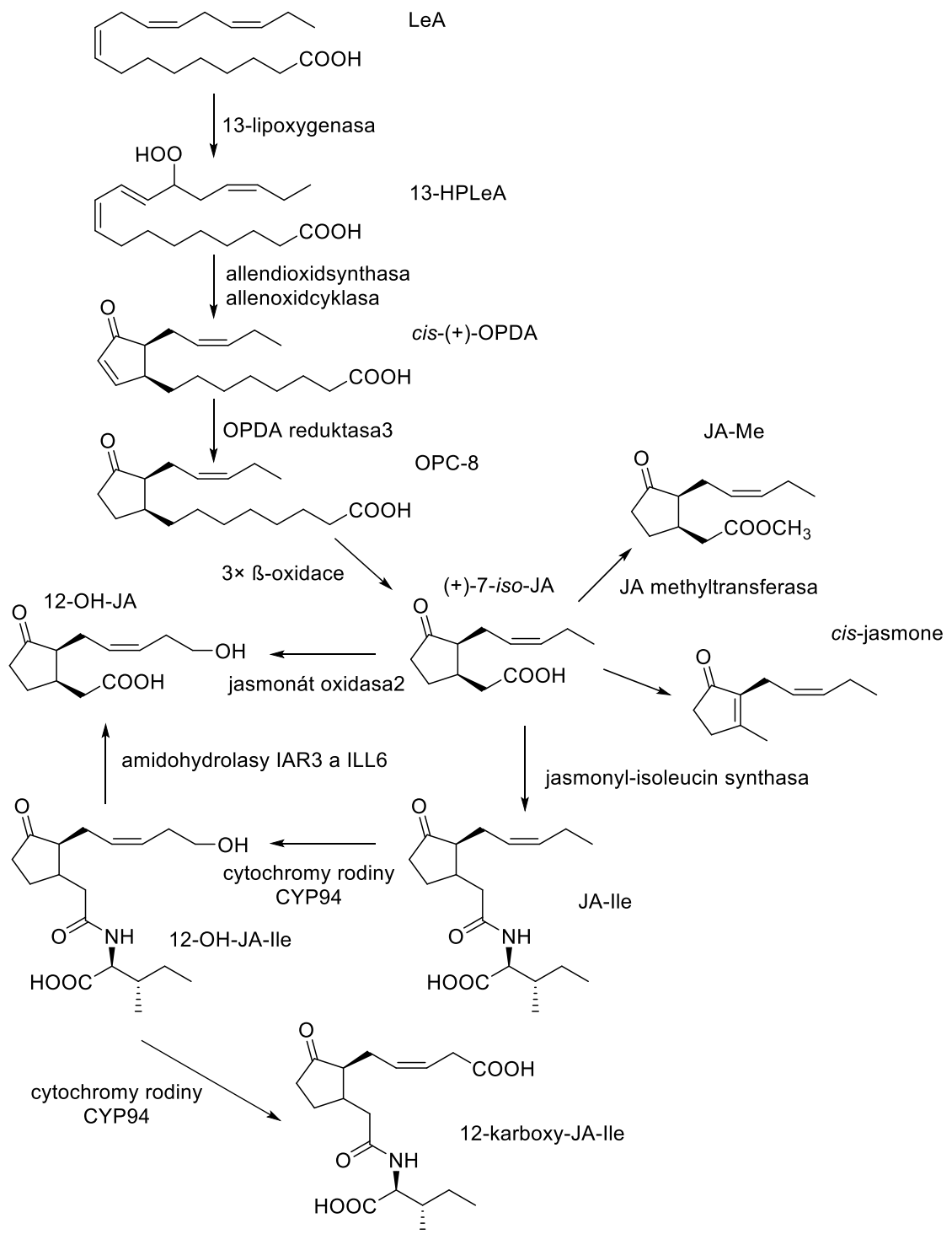
Kromě této majoritní dráhy byla u mutantů s absencí aktivity OPDA reduktasy³ objevena také vedlejší biosyntetická dráha. U této dráhy dochází v chloroplastech ke vzniku *dinor*-OPDA, která může vznikat také z *cis*-OPDA vytvořeného v majoritní dráze v peroxisomu. Tam také dochází k přeměně na tetranor-OPDA a nakonec na-4,5-didehydrojasmonovou kyselinu. Ta je transportována do cytosolu, kde dochází k její redukci na kyselinu jasmonovou. (Wasternack a Strnad, 2018).

2.6.2 Metabolismus

Je známo velké množství derivátů kyseliny jasmonové (Obr. 7), které vykazují různou míru biologické aktivity (Wasternack a Strnad, 2018).

Reakcí s aminokyselinami dochází ke vzniku konjugátů, z nichž nejvýznamnějším je JA-Ile vzniklý za katalýzy jasmonyl-*isoleucin* synthasou. Jedná se o látku s nejvyšší biologickou aktivitou z jasmonátů (Fonseca *et al.*, 2009). Další biologicky aktivní konjugáty jsou tvořeny například s alaninem, valinem, leucinem a methioninem (Yan *et al.*, 2016).

Další možností je hydroxylace, která může probíhat jak na samotné kyselině jasmonové (katalyzováno jasmonát oxidasou² nebo jasmonate induced oxidasou 1,2,3,4) za vzniku 12-hydroxy-JA (12-OH-JA), tak i na JA-Ile (katalyzováno cytochromy z rodiny CYP94) za vzniku 12-hydroxy-JA-Ile. V obou případech dochází touto reakcí ke ztrátě biologické aktivity. 12-hydroxy-JA může být získána i při amidohydrolasové reakci hydroxylovaného konjugátu JA-Ile. Tento produkt může být dále sulfatován nebo *O*-glykosylován. (Wasternack a Strnad, 2018).



Obr. 7 Přehled vybraných reakcí biosyntézy a metabolismu JA(α -linolenová kyselina, LeA; kyselina 13-hydroperoxylinolenová, 13-HPLeA; kyselina *cis*-(+)-12-oxofytodienová, *cis*-(+)-OPDA; kyselina 3-oxo-2-(2-pentenyl)-cyklopentan-1-oktanová, OPC-8; kyselina (+)-7-*iso*-jasmonová, (+)-7-*iso*-JA; methylester kyseliny jasmonové, JA-Me; kyselina 12-hydroxyjasmonová, 12-OH-JA; jasmonyl-isoleucin, Ja-Ile; 12-hydroxyjasmonyl-isoleucin, 12-OH-JA-Ile; 12-karboxyjasmonyl-isoleucin, 12-karboxy-JA-Ile) (dle Wasternack a Strnad, 2018).

Oxidace 12-hydroxy-JA-Ile cytochromy z rodiny CYP94 vede ke vzniku 12-karboxy-JA-Ile, čímž společně s ostatními reakcemi katalyzovanými touto rodinou cytochromů a již zmíněnou amidohydrolasou tlumí signál JA (Koo *et al.*, 2014).

Dekarboxylací JA vzniká těkavý *cis*-jasmon, který se u kvetoucích rostlin podílí na přilákání opylovačů. *Cis*-jasmon může také vznikat isomerací *cis*-(+)-OPDA na *iso*-OPDA, následnou trojnásobnou β -oxidací a dekarboxylací (Wasternack a Strnad, 2018).

JA-Me vzniklý působením enzymu JA methyl transferasy, důležitý pro šíření informace o napadení rostliny patogenem k ostatním rostlinám v okolí (Farmer a Ryan, 1990), je sám biologicky neaktivní. Pro vyvolání fyziologické odpovědi je nutný jeho zpětný rozklad esterasami a následná konverze na JA-Ile (Wasternack a Strnad, 2018).

2.7 Transport fytohormonů a jejich signální dráhy

Pro přežití nepříznivých podmínek je pro rostliny klíčová přítomnost efektivní koordinace růstu. Ta je zprostředkována právě rostlinnými hormony a jejich transportem mezi jednotlivými orgány rostlin. Přenášeny jsou jak samotné fytohormony, tak i jejich prekurzory nebo konjugáty. U většiny fytohormonů je nejvýznamnější transport cévními svazky. Pro přenos fytohormonů mezi buňkami a cévními svazky je využíván mezibuněčný radiální transportní systém. Ten je založen na dvou procesech dle koncentračního gradientu. Směrem do cévních svazků se jedná o aktivní transport proti koncentračnímu gradientu. Pomocí xylemu dochází k transportu především vody a živin z kořenů do prýtlů, floem pak zajišťuje převážně transport asimilátů ze zdrojových fotosyntetizujících pletiv (hlavně listy) do míst spotřeby v kořenech i prýtech (Lacombe a Achard, 2016). Například auxiny jsou však kromě rychlého floémového transportu přenášeny i tzv. „polárním auxinovým transportem“. Tento pomalý transport mezi jednotlivými buňkami je klíčový pro lokální hromadění auxinů ve vyvíjejících se pletivech (Adamowski a Friml, 2015).

Pro zajištění účinku fytohormonů je nutná jejich vazba na příslušný receptor, který zprostředkovává přenos informace do buňky. Dále je pak signál předáván různými signálními kaskádami. Signál auxinů, jasmonátů a giberelinů je v buňce zprostředkován ubikvitinací negativních regulátorů vázajících transkripční faktory. Dochází k uvolnění transkripčních faktorů, čímž dochází k expresi daných genů. Ubikvitinované regulátory jsou následně proteolyticky rozštěpeny pomocí proteasomu 26S (Rogg a Bartel, 2001;

Shan *et al.*, 2012). U cytokininů dochází po navázání hormonu na receptor k fosforylaci jeho intracelulárních domén. Tím je aktivována kinasová doména, která reverzibilně fosforyluje transkripční faktory v jádře, které opět umožní expresi příslušných genů (Hutchison a Kieber, 2002; Shan *et al.*, 2012). U ABA jsou známy tři signální dráhy. V první dráze dochází po navázání ABA k inhibici fosfatasy. Tím dochází ke hromadění aktivní formy kinasy, což vede k aktivaci transkripčních faktorů fosforylací a expresi genů. Další dráha je založená na regulaci genové exprese přes G protein. Mechanismus této signální dráhy však není zcela objasněn (Shan *et al.*, 2012). Třetí ABA signální dráha je založená na přenosu transkripčního represoru z jádra do cytoplazmy a na snížení jeho exprese, což vede k aktivaci exprese transkripčních faktorů (Shang *et al.*, 2010).

2.8 Metody analýzy fytohormonů

Stanovení fytohormonů je značně komplikováno jejich velmi nízkou koncentrací v rostlinném materiálu. Navíc se musíme při jejich stanovení potýkat také s interferujícími látkami, které se v rostlinách nacházejí ve výrazně vyšších koncentracích (např. chlorofyl). Proto je nutné před samotnou analýzou zvolit vhodné postupy k extrakci cílových látek ze zkoumaného materiálu a jejich následné izolace od interferujících látek (Tarkovská *et al.*, 2014). Během celého procesu je také nutno dbát na to, aby nedocházelo k nežádoucí degradaci stanovovaných látek. Rostlinný materiál pro analýzu musí být tedy skladován při nízké teplotě (-80 °C). (Bai *et al.*, 2010)

2.8.1 Extrakční postupy

Před zahájením extrakce je nutné homogenizací zajistit rozrušení buněčné stěny a tím i vylití intracelulárních látek do extracelulárního prostředí. Toho může být docíleno rozetřením rostlinného materiálu ve třecí misce s kapalným dusíkem (Tarkovská *et al.*, 2014). Následně je k vzorku přidáno vybrané extrakční činidlo. Další možností je použití vibračního kulového mlýnku, kde dochází vlivem kmitání o vysoké frekvenci k rozetření pomocí mlecích kuliček přidaných do vzorku s extrakčním činidlem (Novák *et al.*, 2014). Touto technikou je možno získat až mikrometrové částice. Extrakční účinnost je možné zvýšit použitím ultrazvuku. Pro důkladné promíchání vzorku je následně použit mechanický rotátor. Nakonec je nutné docílit oddělení zbytků rostlinných pletiv ze získané suspenze. To se provádí pomocí centrifugy s úhlovým rotorem a vnitřním prostorem klimatizovaným na teplotu 4 °C. I u ostatních kroků je z důvodů zamezení

degradace vzorku nutná práce při nižších teplotách (ultrazvuková lázeň vychlazená pomocí chladících bloků, vychlazené bloky kulového mlýnku, rotátor umístěný v lednici (Nováková a Vlčková, 2009).

Klíčovým parametrem extrakce je volba vhodného extrakčního činidla. Základním požadavkem je dobrá rozpustnost cílových látek a zároveň co nejnižší rozpustnost látek interferujících. Značnou výhodou je také případná inhibice degradačních reakcí fytohormonů, např. inhibice fosfatáz při užití činidla podle Bielekého (Laloue *et al.*, 1974). Pro omezení degradace některých hormonů (např. auxiny) je možno přidat do extrakčního činidla látky s antioxidační aktivitou, např. butylhydroxytolen nebo diethyldithiokarbamat (Fu *et al.*, 2011). Jako extrakční činidlo může být použit například methanol, voda, ethylacetát nebo také Bielekého činidlo (MeOH:CHCl₃:HCOOH:H₂O = 12:5:1:2, v/v/v/v), případně jeho modifikovaná podoba (MeOH:HCOOH:H₂O = 15:1:4, v/v/v) (Bielecki, 1964; Hoyerová *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2010).

2.8.2 Izolace fytohormonů

Cílem izolačních postupů je oddělení látek interferujících při analýze od látek stanovovaných. Kvůli nízkým hladinám fytohormonů oproti jiným rostlinným metabolitům se jedná o klíčový krok při jejich stanovení (Novák *et al.*, 2017). V ideálním případě by tento postup měl vést k zisku vzorku s obsahem pouze stanovovaných látek, případně látek neovlivňujících analýzu. Výběr vhodné metody purifikace závisí vedle co nejvyšší návratnosti pro studované látky také na potřebách zvolené analytické techniky, ale i na časové a materiální náročnosti postupu (Ljung *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2011).

2.8.2.1 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina je založená na rozdělení extrahovaných látek mezi dvě nemísitelné kapaliny dle Nernstova distribučního zákona. Aby došlo k rozdělení, musí se látky lišit distribuční konstantou. Pro jednoduchost extrakce je tedy žádoucí, aby všechny stanovované látky přecházely do jednoho rozpouštědla, zatímco interferující látky do rozpouštědla druhého. Často se můžeme setkat s kombinací vody a organického rozpouštědla, kterým může být například diethylether, ethylacetát nebo dichlormethan. Klasická extrakce kapalina-kapalina dosahuje pro purifikaci fytohormonů poměrně nízkých návratností. V případě opakované extrakce je tato metoda také náročná na čas i množství použitých rozpouštědel. Nevýhodou této metody je také možná tvorba emulzí

snižující návratnost ve vodě rozpustných fytohormonů. Klasická extrakce kapalina-kapalina je proto využívána stále méně (Fu *et al.*, 2011).

Modifikací této techniky byla vyvinuta metoda mikroextrakce založená na systému tří kapalin použitá pro současnou purifikaci IAA, ABA, SA a JA z kokosové šťávy (Wu a Hu, 2009). Analyt je v tomto uspořádání extrahován z vodné fáze, přes organickou fázi do vodné fáze o jiném pH. Pro správnou funkci by rozpustnost analytu v organické fázi měla být vyšší než v první vodné fázi, avšak nižší než ve druhé vodné fázi. Jedná se o rychlou metodu s malou spotřebou rozpouštědel, ani zde však není dosahována požadovaná efektivita (Fu *et al.*, 2011).

2.8.2.2 Extrakce na pevné fázi

Při izolaci za použití SPE dochází k zachycení látek v sorbentu kolony na základě fyzikálně-chemických vlastností. Následně je možné použitím vhodného činidla dosáhnout uvolnění těchto látek z pevné fáze (Ljung *et al.*, 2004). V závislosti na použitém sorbentu a povaze látek mohou být zachyceny analyty a interferující látky prochází v kapalné fázi, nebo obráceně. Klíčovým je pro tuto metodu výběr vhodného sorbentu na základě afinity jednotlivých látek k tomuto sorbentu.

V dnešní době je komerčně dostupné velké množství kolon různých velikostí i typů sorbentů. Setkat se můžeme s interakcemi na bázi Van der Waalsových sil, s iontovými interakcemi, ale také na základě adsorpce nebo vodíkových vazeb (Novák *et al.*, 2014). Nejpoužívanějšími jsou sorbenty s reverzní fází, iontoměničové, sorbenty s vyváženými hydrofilními a lipofilními vlastnostmi a také sorbenty kombinující reverzní fázi a iontoměniče. V praxi může být použito i více sorbentů k zajištění co nejdokonalejšího oddělení analytů.

SPE se stala ověřenou metodou pro purifikaci fytohormonálních vzorků (Tarkovská *et al.*, 2014). Oproti extrakci kapalina-kapalina se jedná o časově méně náročnou metodu s nižšími nároky na množství použitých rozpouštědel (Fu *et al.*, 2011). Izolace fytohormonů probíhá často pomocí různých typů sorbentů, které mohou být postupně kombinovány v několika krocích, např. pro izolaci CK nebo giberelinů (Dobrev a Kamínek, 2002; Svačinová *et al.*, 2012; Urbanová *et al.*, 2013; Šimura *et al.*, 2018). Základem mnoha purifikačních protokolů bývá sorbent C18, který je složen ze silikagelového nosiče s navázanými oktadecylovými uhlovodíkovými zbytky. Tento typ sorbentu poskytuje efekt reverzní fáze bez dalších interakcí a slouží tak k jednoduchému odstranění pigmentů z rostlinných extraktů (Novák *et al.*, 2014).

Modernějšími typy SPE fází jsou sorbenty využívající polymerní typy nosičů. Např. sorbent HLB je kopolymerem s vyváženými hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi. Skládá se z jednotek divinylbenzenu poskytující efekt reverzní fáze a *N*-vinylpyrrolidonu, který umožňuje zachycení polárních látek pomocí π - π interakcí. Tento typ sorbentu byl několikrát úspěšně použit pro izolaci fytohormonů (Novák *et al.*, 2012; Floková *et al.*, 2014; Šimura *et al.*, 2018). Podobnou interakci vykazuje také sorbent SDB-XC, který je kopolymerem skládajícím se z jednotek styrenu a divinylbenzenu. Tato fáze je vhodná pro současné zachycení nepolárních molekul i ve vodě rozpustných mírně polárních látek a v miniaturizovaném uspořádání byla použita pro izolaci auxinů (Pěňčík *et al.*, 2018).

2.8.2.3 Imunoafinitní extrakce

Imunoafinitní chromatografie je vysoce selektivní technikou, která je založenou na specifické vazbě mezi antigenem a protilátkou navázanou na nosiči (např. agarosový gel) (Porfírio *et al.*, 2016). Látka se specifickými vazebnými místy pro dané protilátky je zachycena na imunoafinitní gelu, zatímco ostatní jsou z něj vymyty. Následně dochází k uvolnění zadržené látky vhodným činidlem, např. methaholem (Fu *et al.*, 2011).

Fytohormony jsou hapteny a pro jejich správnou vazbu na protilátku je tedy nutná konjugace s makromolekulárními látkami za tvorby antigenu (např. konjugace s hovězím sérovým albuminem) (Ulvskov *et al.*, 1987). Tento metodický přístup se vyznačuje velmi vysokou selektivitou vedoucí k maximálnímu odstranění komplexní rostlinné matrice (Fu *et al.*, 2011). Dosud byly použity protilátky například pro izolaci auxinů (Pěňčík *et al.*, 2009), cytokininů (Novák *et al.*, 2003; Hauserová *et al.*, 2005), kyseliny abscisové (Hradecká *et al.*, 2007), ale i dalších rostlinných hormonů jako jsou například brassinosteroidy (Oklešťková *et al.*, 2017).

2.8.3 Metody stanovení rostlinných hormonů

Chromatografické metody s různými principy detekce jsou nejpoužívanějšími analytickými technikami pro stanovení fytohormonů. Tyto metody jsou založené na interakci látek rozpuštěných v mobilní fázi s fází stacionární. Podle míry této interakce dochází k zadržování látek s vysokou afinitou ke stacionární fázi. Mobilní fázi může být plyn (plynová chromatografie - GC) nebo kapalina (kapalinová chromatografie - LC), jako stacionární fáze pak může vystupovat velké množství různých pevných materiálů i imobilizovaných kapalin (Fu *et al.*, 2011). Použití GC je u fytohormonů vhodné

především při analýze těkavých látek (např. JA-Me), u netěkavých sloučenin je třeba jejich derivatizace pro zvýšení těkavosti a zlepšení teplotní stability, naproti tomu LC je vhodná pro použití u polárních fytohormonů bez nutnosti předúpravy (Pan a Wang, 2009).

Ve spojení s chromatografií je možné použít různé detektory. UV detektor pracuje na principu měření absorbance v UV oblasti spektra. Výraznou nevýhodou tohoto detektoru je nízká citlivost a také nedostatečná selektivita pro analýzu biologických vzorků (Fu *et al.*, 2011). Tento problém může řešit použití fluorescenčního detektoru, který dosahuje lepší citlivosti (Eshita, 2001). Tyto detektory pracují na principu měření sekundárního (emisního) záření vzniklého ve vzorku návratem z vyšších energetických stavů po absorpci primárního (excitačního) záření. UV detektor je možné použít například pro kvantifikaci auxinů a cytokininů (Diopan *et al.*, 2009), ale také ABA (Nováková *et al.*, 2005), fluorescenční detektor byl použit například při stanovování SA (Rozhon *et al.*, 2005) nebo IAA (Nováková *et al.*, 2005). Avšak u obou těchto detektorů je problémem přesná identifikace pouze podle retenčního času, proto nejsou v dnešní době pro stanovování fytohormonů často používány (Fu *et al.*, 2011).

V dnešní době je pro detekci fytohormonů nejpoužívanější spojení chromatografické metody s hmotnostním spektrometrem (MS). Ten měří poměr mezi hmotností a nábojem iontů. Pro tento účel musí být nejdříve látka ionizována. U GC–MS jsou nejčastějšími ionizačními technikami chemická a elektronová ionizace, u LC–MS je to ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (Fu *et al.*, 2011). U přístrojů s jedním kvadrupólem je analýza založena na sledování vybraných iontů prekursorů. U tandemových přístrojů (např. trojitý kvadrupól) dochází k fragmentaci iontů v kolizní cele a následnému sledování vybraných produktových iontů. Na analyzátor tak dopadají pouze ionty s definovaným hmotnostním přechodem a je tak dosaženo větší selektivity (Pan a Wang, 2009).

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je dnes často využívanou metodou pro stanovování fytohormonů (Novák *et al.*, 2014). Běžně je používána pro stanovování např. auxinů (Pěňčík *et al.*, 2009; Novák *et al.*, 2012), cytokininů (Novák *et al.*, 2008; Tarkowski *et al.*, 2010; Svačinová *et al.*, 2012), jasmonátů (Liu *et al.*, 2010), kyseliny abscisové (Xiong *et al.*, 2014), kyseliny salicylové (Zhang *et al.*, 2013), i pro souběžné stanovení více skupin fytohormonů (Kojima *et al.*, 2009; Šimura *et al.*, 2018).

Elektrochemické analytické techniky jsou charakteristické jednoduchostí a nízkou cenou. Stanovení je však silně ovlivněno pH a matricí, proto není tato technika pro stanovení běžně používána (Fu *et al.*, 2011). Byly vyvinuty přístupy pro stanovení např. pro IAA (Wu *et al.*, 2003; Toledo a Vaz, 2007). Elektrochemické metody však našly své uplatnění v biosenzorech podávajících aktuální informaci o hladinách fytohormonů. Elektrochemické biosenzory pracují na principu měření proudu elektronů z enzymatických redoxních reakcí. Častým meziproduktem mezi kofaktorem enzymu a elektrodou je peroxid vodíku (Novák *et al.*, 2017).

Mimo výše jmenované techniky lze provádět i imunologické stanovení. Stejně jako u imunoextrakce se i zde setkáváme s vysoce specifickou vazbou mezi protilátkou a antigenem, jedna z těchto složek je zde však značena. Rozlišujeme značení radioaktivní (radioimunoanalýza), nebo enzymové (ELISA) (Du *et al.*, 2012). Koncentrace fytohormonů ve vzorku je spočítána z naměřené radioaktivity, případně enzymové aktivity. Výhodou imunologických metod je nízký detekční limit a vysoká citlivost při stanovení fytohormonů (Porfírio *et al.*, 2016). Avšak specifita vazby může být snížena vlivem nutné konjugace s makromolekulárním nosičem. Navíc některé látky strukturně podobné fytohormonům mohou být také rozpoznány protilátkou, čímž dochází k nežádoucím křížovým reakcím (Fu *et al.*, 2011). Pomocí této metody byly stanoveny například koncentrace PAA, IAA, ABA a kyseliny giberelinové (Patel a Thaker, 2007), a nebo současně cytokininy, auxiny, jasmonáty, ABA i gibbereliny (Zhang *et al.*, 2009). Stejně jako elektrochemické metody i imunoanalytické metody našly své využití při konstrukci biosenzorů (Novák *et al.*, 2017).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a používané vybavení

3.1.1 Chemikálie a použitý materiál

Methanol (99,9%), acetonitril (99,9%) a amoniak (25%) pocházely od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) byla pořízena kyselina mravenčí (98%), kyselina octová (99,8%) a Tween[®] 20. Ethanol (96%) a aceton (99,9%) byly dodány firmou Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Rostlinný agar a Murashige & Skoog médium byly získány od firmy Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Nizozemsko). Sacharosa byla dodána firmou PENTA (Praha, Česká republika). Uhlíčan hořečnatý byl zakoupen od firmy Lachema (Brno, Česká republika). K přípravě deionizované vody byl použit přístroj Direct-Q[®] 3UV water purification system (Merck, Darmstadt, Německo). Používané chemikálie splňují kritéria čistoty p.a., chemikálie používané pro kapalinovou chromatografii splňují parametry „HPLC gradient grade“.

Kolony Oasis[®] HLB, 30 mg/1 ml byly dodány firmou Waters (Milford, Massachusetts, USA) a kolony ISOLUTE[®] Multimode, 100 mg/1 mL firmou Biotage (Uppsala, Švédsko). Sorbenty SDB-XC a C18 byly zakoupeny od firmy 3M (St. Paul, Minnesota, USA). Sorbent AttractSPE[™] Disks HLB byl dodán firmou Affinisep (Petit Couronne, Francie). Centrifugační filtry Nanosep (Pall Corporation) s póry o velikosti 0,2 µm dodala firma VWR International (Česká republika).

Použité interní standardy (IS) značené pomocí stabilních izotopů (²H, ¹³C a ¹⁵N) byly syntetizovány přímo v Laboratoři růstových regulátorů (Olomouc, Česká republika) nebo ve firmách OlchemIm, s.r.o. (Česká republika) a Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA). Pro jednotlivé skupiny fytohormonů byly připraveny směsi obsahující jednotlivé standardy v rozdílných koncentracích:

Mix I – Cytokininy: [²H₅]2MeStZ, [²H₅]2MeStZR, [²H₆]2MeSiP, [²H₆]2MeSiPR (1·10⁻⁸ mol·l⁻¹); [¹³C₅]tZ, [²H₅]tZR, [²H₅]tZ7G, [²H₅]tZ9G, [¹³C₅]cZ, [¹⁵N₄]cZ7G, [²H₃]DHZ, [²H₃]DHZR, [²H₃]DHZ9G, [²H₆]iP, [²H₆]iPR, [²H₆]iP7G, [²H₆]iP9G (2·10⁻⁸ mol·l⁻¹); [²H₅]tZOG, [²H₅]tZROG, [²H₅]tZRMP, [²H₆]iPRMP (5·10⁻⁸ mol·l⁻¹).

Mix II – Auxiny: [¹³C₆]IAA, [¹³C₆]oxIAA, [¹³C₆]IAA_{sp}, [¹³C₆]IAAGlu, [²H₅]IAM, [²H₄]ANT, [²H₅,¹⁵N]IAVal, [²H₅,¹⁵N]IALeu, [²H₅,¹⁵N]IAPhe, [²H₅,¹⁵N]IATrp (1·10⁻⁶ mol·l⁻¹).

Mix III – Abscisáty: [²H₆]ABA (1*10⁻⁶ mol·l⁻¹)

Mix IV – Jasmonáty: [²H₆]JA, *cis*-OPDA (1*10⁻⁶ mol·l⁻¹); [²H₂]JA-Ile (1*10⁻⁷ mol·l⁻¹)

Mix V – Kyselina salicylová: [²H₆]SA (1*10⁻⁶ mol·l⁻¹)

3.1.2 Přístroje

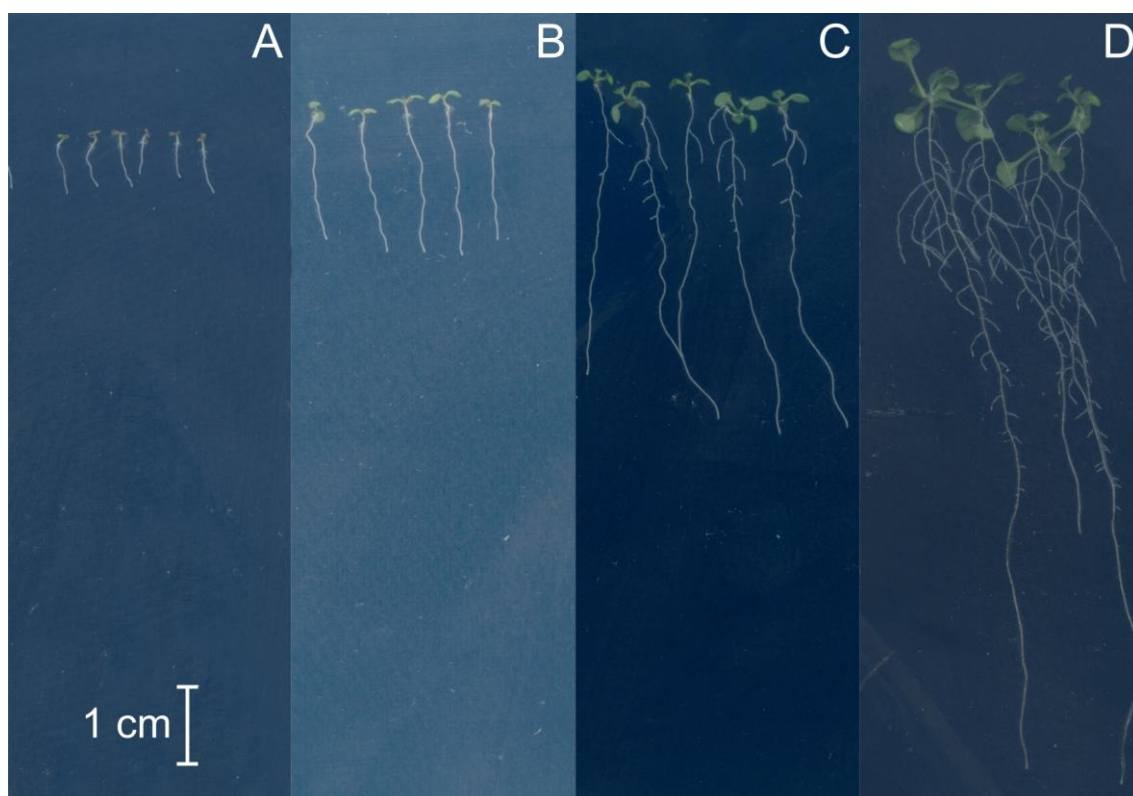
Pro navažování vzorků byly použity váhy Sartorius CPA225D-0CE (Sartorius, Goettingen, Německo). Při extrakci byl využíván kulový mlýnek Retsch® MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo), Vortex mixer ZXClassic (VELP Scientifica, Usmate, Itálie), ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 102 H (Bandelin, Berlín, Německo), laboratorní rotátor Stuart SB3 (Bibby Scientific Ltd./Cole-Parmer Ltd., Stone, Velká Británie), centrifuga Avanti™ 30 Centrifuge (Beckman, Chelmsford, Velká Británie) a výrobek ledu Scotsman AF 200 (Scotsman, Vernon Hills, Illinois, USA). Při purifikaci byla používána centrifuga Mikro 220R (Hettich, Tuttlingen, Německo), SPE manifold Visiprep™ (Supelco, Bellefonte, Pensylvánie, USA), membránová vývěva Mini Laboport Vacuum Pump (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Německo). Chlorofyl byl stanovován pomocí spektrofotometru UV mini-1240 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Složky kultivačního média byly navažovány pomocí vah Vibra AJ-420CE (Shinko Denshi Co. Ltd., Tokio, Japonsko). Sterilizace kultivačního média i ostatních potřeb byla prováděna pomocí autoklávu Labo Autoclave MLS-3781L (Sanyo, Ósaka, Japonsko). Výsev biologického materiálu za sterilních podmínek byl prováděn v laminárním boxu Heraguard™ ECO (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Obrázky rostlin byly pořizovány pomocí skeneru Perfection V550 Photo (Epson, Suwa, Japonsko). Dále byly využívány pipety Eppendorf Reference (200 µl), Eppendorf Research plus (1000 µl) (Eppendorf, Hamburg, Německo) a Nichipet EX (10 µl) (Nichyrio, Koshigaya, Japonsko). Analýza fytohormonů byla prováděna pomocí UHPLC_MS/MS systému složeného z Acquity UPLC® I-Class systému vybaveného kolonou Acquity UPLC® CSH™ C18 RP (150 x 2,1 mm, velikost částic: 1,7 µm) (Waters, Milford, MA, USA) a trojitého kvadrupólu Xevo® TQ-S MS (Waters, Manchester, Spojené království).

3.1.3 Biologický materiál

Pro experimenty byly jako biologický materiál používány mladé rostliny divokého typu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Semínka byla sterilizována 2 minuty 70% EtOH s 0,1 % detergentu Tween. Pomocí pipety nebo párátka byla semínka

za sterilních podmínek přenášena na desky se sterilním pevným médiem dle Murashigeho & Skooga (2,2 g média, 10 g sacharosu a 7 g agaru v 1 l H₂O; pH 5,7 upraveno pomocí 0,1% roztoku NaOH) (Murashige a Skoog, 1962). Desky byly uzavřeny a utěsněny pomocí pásky Softpore. Desky byly následně zabaleny do hliníkové fólie a ponechány v lednici 3 dny. Poté byly desky přeneseny do fytotronu, kde byly rostliny pěstovány za podmínek dlouhého dne (16 h světlo (100 μEm⁻²s⁻¹), 24 °C / 8 h tma, 18 °C).

Rostliny staré 21 dnů pěstované na jaře 2018 byly použity pro stanovení rostlinných pigmentů. Dvou týdenní rostliny byly použity pro optimalizaci izolačních metod. Pro finální experiment byly použity rostliny staré 4, 7, 10 a 14 dnů (Obr. 8) pěstované v průběhu prosince roku 2018. Rostliny byly vždy po sklizení okamžitě zmrazeny v kapalném dusíku, následně ve třecí misce s kapalným dusíkem pomocí tloučku homogenizovány, rozváženy po potřebných množstvích pro jednotlivé experimenty a uloženy při -70 °C.



Obr. 8 Srovnání rostlin huseníčku rolního o různém stáří (A – 4 denní, B -7 denní, C – 10 denní, D – 14 denní).

3.2 Metody

3.2.1 Extrakce fytohormonů

K 10 mg rostlinného materiálu bylo přidáno 500 μ l vychlazeného extrakčního činidla a 3 homogenizační keramické kuličky (Retsch, Haan, Německo). Po promíchání na vortexu byly vzorky umístěny na 5 minut do kulového mlýnku (27 Hz, 4 °C) a následně na 5 minut do vychlazené ultrazvukové lázně. Po 30 minutách promíchávání pomocí laboratorního rotátoru (4 °C) byly vzorky 15 minut centrifugovány (36 670 g, 4 °C). Supernatant byl poté odebrán do nových mikrozkušavek.

3.2.1.1 Extrakční experiment I

V tomto experimentu byla jako extrakční činidla použita H₂O, vodný roztok acetonitrilu (ACN) (10%, 30%, 50% a 70%), vodný roztok methanolu (MeOH) (10%, 30%, 50% a 70%) a modifikované Bieleeského činidlo (MeOH/H₂O/HCOOH – 15:4:1). Bylo přidáváno 10 μ l směsi interních standardů *Mix I-II* a 20 μ l směsi interních standardů *Mix III-V*. Po extrakci bylo k precipitátu přidáno 400 μ l extrakčního činidla a extrakce byla opakována ve stejných krocích, bylo však vynecháno promíchávání pomocí laboratorního rotátoru. Supernatanty z extrakce i opakované extrakce byly spojeny a odpařeny pomocí dusíkové odparky.

Pro purifikaci byla použita již optimalizovaná metoda využívající kolony Oasis[®] HLB (Šimura et al., 2018). Před nanesením vzorku byly kolony promyty a aktivovány 1 ml MeOH, 1 ml H₂O a 1 ml 60% ACN. Do mikrozkušavek s odpařenými vzorky byl přidán 1 ml 60% ACN a roztok byl nanesen na HLB kolonu. Následně byla kolona promyta 1 ml 30% ACN, jímž byla vypláchnuta mikrozkušavka po vzorku. Vytékající frakce po nanesení vzorku i promytí byly spojeny a vzorky byly odpařeny pomocí dusíkové odparky. Před LC-MS/MS analýzou byly odparky rozpuštěny ve 20 μ l 50% ACN. Promíchané vzorky byly ponechány 3 minuty v ultrazvukové lázni a doplněny dalšími 20 μ l H₂O. Po filtraci byly filtráty přeneseny do insertů (0,1 ml) ve vialkách a následně uloženy v -20 °C až do analýzy. Experiment byl proveden ve třech opakováních.

3.2.1.2 Extrakční experiment II

Extrakce byla v tomto případě prováděna z 20 mg rostlinného materiálu pomocí různých činidel: 10% MeOH, 10% MeOH + 5% HCOOH, MeOH + 5% CH₃COOH. Supernatant odebraný po centrifugaci byl rozdělen do dvou mikrozkušavek po 200 µl a odpařen pomocí dusíkové odparky. Vzorky byly poté rozpuštěny v 1 ml 60% ACN a na 5 minut vloženy do vychlazené ultrazvukové lázně. Následně bylo přidáno 10 µl směsi interních standardů *Mix I-V* a vzorky byly promíchány pomocí vortexu. Purifikace vzorků i příprava k analýze byla provedena stejně jako u předchozího experimentu. Tento experiment byl proveden ve čtyřech opakováních.

3.2.2 Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů

Do testovaných extrakčních činidel (50% ACN, H₂O, 10% MeOH, 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH a 80% aceton) bylo přidáno přibližně 5 mg MgCO₃ pro zabránění rozkladu chlorofylu. Experiment byl prováděn ve třech opakováních.

Extrakce probíhala ze 100 mg čerstvé materiálu z homogenizovaných rostlin o stáří 21 dnů pomocí 500 µl extrakčního činidla podle protokolu popsaného v kapitole 3.2.1. 450 µl supernatantu bylo odebráno do nových mikrozkušavek a odpařeno na dusíkové odparce. Po odpaření byly vzorky rozpuštěny v 500 µl 80% acetonu (5 minut ve vychlazené ultrazvukové lázni), poté centrifugovány (15 min, 36,670 g, 4 °C) a získaný supernatant byl zfiltrován přes Nanosep fitry.

Na spektrofotometru byly měřeny absorbance při vlnových délkách 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm. V případě, že absorbance vzorku byla při vlnové délce 663,2 nm vyšší než 0,85, byl vzorek vhodně naředěn pomocí 80% acetonu. Pro zjištění obsahu barviv byly použity následující vztahy (Lichtenthaler a Buschmann, 2001):

$$\text{Chlorofyl a:} \quad C_a = 12,25 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{646,8} - A_{750})$$

$$\text{Chlorofyl b:} \quad C_b = 21,5 \cdot (A_{646,8} - A_{750}) - 5,1 \cdot (A_{663,2} - A_{750})$$

$$\text{Chlorofyl a+b:} \quad C_{a+b} = 7,15 \cdot (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{646,8} - A_{750})$$

$$\text{Karotenoidy:} \quad C_{a+c} = [1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot C_a - 85,02 \cdot C_b] / 198$$

3.2.3 Purifikace pomocí ISOLUTE® Multimode

Do 0,5 ml 10% MeOH bylo přidáno 10 µl směsi neznačených standardů zastupujících všechny skupiny sledovaných fytohormonů obsahující 0,05 pmol *tZ*; 0,1 pmol *tZR*; 0,2 pmol *iP7G*; 0,8 pmol *JA-Ile*, *JA-Phe* a *JA-Trp*; 1 pmol *cZROG*; 5 pmol *oxIAA*;

10 pmol IAA, IAGlu, IAAsp, ABA, SA a *cis*-OPDA; 20 pmol JA a 9,10-dh-JA; 50 pmol Trp a Tra. Purifikace probíhala na kolonách ISOLUTE® Multimode, které byly před použitím promyty 1 ml 100% MeOH, 1 ml H₂O a aktivovány 10% MeOH obsahujícím CH₃COOH o koncentraci 1 mol·l⁻¹. Vzorky byly naneseny na kolonu, která byla poté promyta 1 ml H₂O. Obě frakce byly sbírány do stejných zkumavek. Následně byly pro eluci použity postupně roztoky NH₄OH o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹ v 30% ACN, H₂O a okyselený 60% ACN (0,1 mol·l⁻¹ CH₃COOH). Vždy byl použit 1 ml elučního činidla a frakce byly jímány do samostatných zkumavek. Vzorky byly odpařeny na dusíkové odparce, uloženy v -20 °C a před LC-MS/MS analýzou rozpuštěny ve 40 µl 25% ACN. Experiment byl prováděn v pěti opakováních.

3.2.4 Purifikace pomocí µSPE-PT

Příprava µSPE kolon v pipetovacích špičkách byla založena na technologii StageTips, která byla publikována pro izolaci proteinů (Rappsilber *et al.*, 2003) a později modifikována pro stanovení CK (Svačinová *et al.*, 2012). Byly připraveny kombinace multi-StageTips kolon složených z různého počtu vrstev sorbentů: C18 (3×)/SDB-XC (3×), C18 (6×)/SDB-XC (3×) a C18 (6×)/HLB (3×).

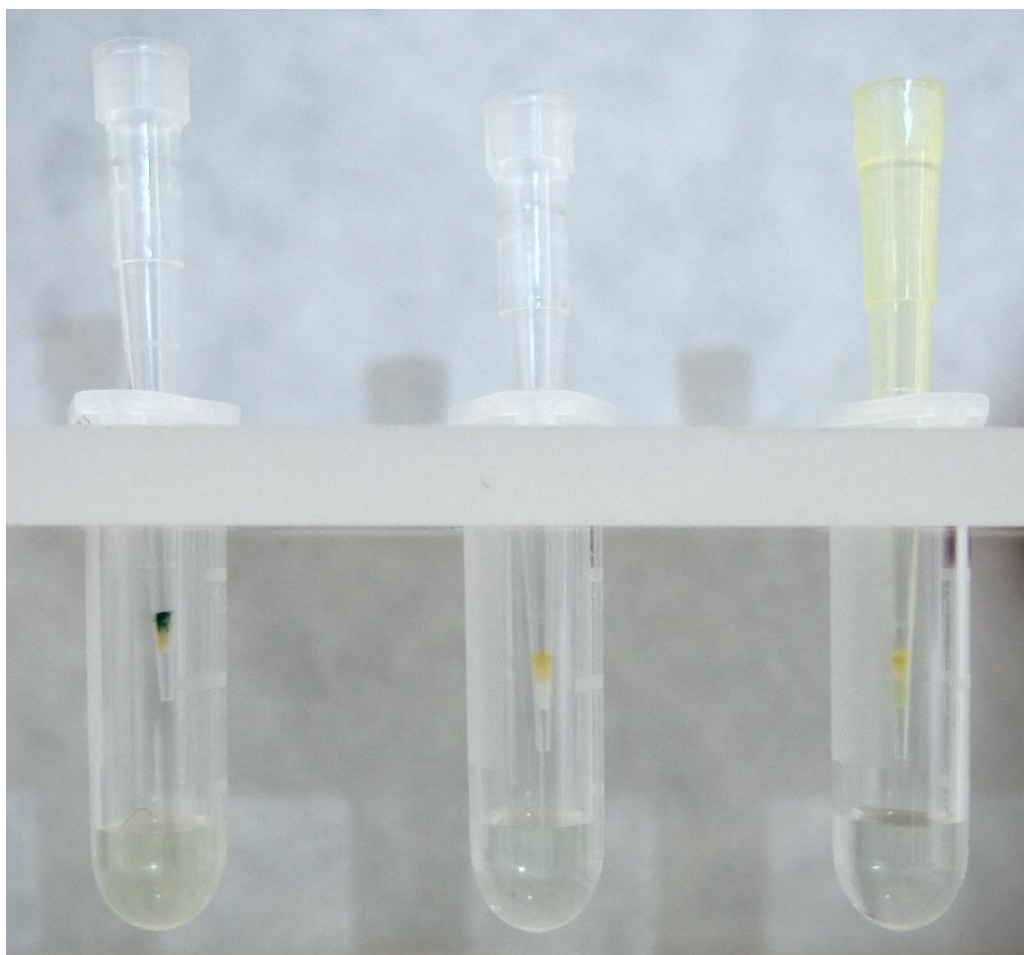
3.2.4.1 Purifikační experiment StageTips I

Připravené µSPE-PT kolony byly usazeny do víček mikrozkušavek a sorbenty byly postupně smočeny 50 µl acetonu a 50 µl MeOH pomocí centrifugace po dobu 10 minut při 380 g za chlazení na 4 °C. Následně byly sorbenty aktivovány 50 µl H₂O a poté 50 µl 10% MeOH + 5% HCOOH (15 min, 465 g, 4 °C).

Extrakce probíhala pomocí 1 ml 60% ACN z 10 mg homogenizovaných rostlin sesbíraných po 17 dnech růstu a ke každému vzorku bylo před extrakcí přidáno 10 µl směsi interních standardů *Mix I-V*. Celý experiment byl prováděn v šesti opakováních a extrakce byla prováděna dle postupu popsaného v kapitole 3.2.1. Každý extrakt byl poté rozdělen 3 × 300 µl a jednotlivě nanesen na multi-StageTips kolony obsahující tři vrstvy od sorbentů SDB-XC/C18. Vzorky byly centrifugovány 15 minut při 865 g za chlazení na 4 °C a prošlé eluáty byly sbírány do nových mikrozkušavek. U některých kolon nedošlo během této doby k průchodu veškerého vzorku přes pevnou fázi a centrifugace musela být v takovém případě opakována. Následně bylo na každou kolonu za účelem eluce naneseno 50 µl 30% ACN (15 min,

865 g, 4 °C). Získané eluáty pro každý extrakt byly poté opět spojeny ($3 \times 350 \mu\text{l}$) a dva replikáty byly okamžitě odpařeny pomocí dusíkové odparky.

Z důvodů malého stupně přečištění byly 4 ze 6 vzorků opakovaně purifikovány za použití multi-StageTips kolon obsahujících sorbenty C18 (6 \times)/SDB-XC (3 \times) a C18 (6 \times)/HLB (3 \times). Po opětovném rozdělení vzorků ($3 \times 350 \mu\text{l}$) byly provedeny jednotlivé kroky purifikace stejně jako v předcházejícím experimentu (Obr. 9). Získané eluáty pro každý extrakt byly poté spojeny a odpařeny pomocí dusíkové odparky. Po odpaření bylo přidáno 60 μl 10% ACN, vzorky byly promíchány pomocí vortexu, vloženy na 5 minut do ultrazvukové lázně a zfiltrány pomocí centrifugačních filtrů (3 min, 3460 g, 4 °C). Filtráty byl přeneseny do insertů a před analýzou uloženy v -20 °C.



Obr. 9 Porovnání stupně přečištění u rostlinných extraktů po zapojení jednokrokového $\mu\text{SPE-PT}$ experimentu využívajícího multi-StageTips C18 (3 \times)/SDB-XC (3 \times) (vlevo) a druhého kroku purifikace pomocí vyššího počtu vrstev sorbentů: C18 (6 \times)/SDB-XC (3 \times) (uprostřed) nebo C18 (6 \times)/HLB (3 \times) (vpravo).

3.2.4.2 Purifikační experiment Stagetips II

Extrakce byla provedena 1 ml 10% MeOH obsahujícím 5 % HCOOH. Před extrakcí bylo ke vzorkům přidáno 10 μ l směsi interních standardů *Mix I-V*. Extrakce dále probíhala dle postupu popsaného v kapitole 3.2.1. Promytí a aktivace purifikačních kolon probíhalo dle postupu popsaného v kapitole 3.2.4.1. Každý vzorek byl pro purifikaci rozdělen ($4 \times 250 \mu$ l) a nanesen na čtyři multi-StageTips kolony. Při eluci (865 g, 15 min, 4 °C) byla frakce jímána do nové mikrozkušavky. Následně byly kolony promyty 50 μ l extrakčního činidla (10% MeOH + 5% HCOOH) a centrifugovány taktéž 15 minut při 865 g a za chlazení na 4 °C. Eluce byla provedena přidáním 50 μ l 80% MeOH (865 g, 15 min, 4 °C). Frakce z promývání i eluce byly jímány do stejné mikrozkušavky jako frakce po nanesení vzorku. Alikvoty vzorků byly spojeny a odpařeny pomocí dusíkové odparky při 37 °C a tlaku do 5 psi. Po odpaření byly vzorky rozpuštěny ve 40 μ l 10% ACN, promíchány na vortexu a následně vloženy na 5 minut do vychlazené ultrazvukové lázně. Poté byly vzorky 1 minutu centrifugovány (865 g, 4 °C) a následně přefiltrovány přes centrifugační filtry umístěné v mikrozkušavkách (5 min, 2400 g, 4 °C). Filtrát byl přepipetován do insertů a vialky před analýzou uloženy v -20 °C.

3.2.5 Podmínky UHPLC-ESI-MS/MS

Vzorky byly analyzovány pomocí dříve publikované metody (Šimura *et al.*, 2018) za použití Acquity UPLC[®] I-Class systému vybaveného kolonou Acquity UPLC[®] CSH[™] C18 RP (150 x 2,1 mm, velikost částic: 1,7 μ m) spojenou s trojitým kvadrupólem Xevo[®] TQ-S MS. Mobilní fáze A byla tvořena ACN s 0,01% (v/v) HCOOH a mobilní fáze B byl 0,01% (v/v) vodný roztok HCOOH. Velikost nástřiku v průběhu všech analýz byla 10 μ l. Rychlost průtoku byla 0,5 ml·min⁻¹ a kolona byla termostatována na 50 °C. Přístroj byl ovládán pomocí programu MassLynx[™] (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA), stejný program byl také použit pro získání a zpracování dat z hmotnostního spektrometru. V kladném módu ionizace elektrosprejem (ESI(+)) byly analyty nejprve eluovány izokraticky pomocí 5% mobilní fáze A, poté byl podíl A lineárně zvýšen až na 80 % během 10 minut. Následně byla kolona promyta 100% A (1 min) a poté ekvilibrována v počátečních podmínkách separace (2 min). V záporném ionizačním módu (ESI(-)) byl použit stejný lineární gradient, který byl ukončen ve 13. minutě, kdy poměr A:B byl 65:35 (v/v). Následovalo promytí kolony 100% A a poté opětovná stabilizace počátečních podmínek (celkově 3 min).

Detekce analytů probíhala na tandemovém hmotnostním spektrometru ionizací látek v ESI(+) a ESI(−) za použití optimalizovaných MS podmínek. Kapilára byla během měření pod napětím 2,1 kV při kladném ionizačním módu a 1,5 kV při záporném ionizačním módu. Napětí na vstupní šterbině bylo 10–40 V, průtok kolizního plynu (argon) bylo 0,21 ml·min⁻¹. Teplota odpařovacího bloku byla 125 °C, teplota sušícího plynu 600 °C, průtok zmlžovacího plynu byl 150 l·h⁻¹ a sušícího plynu 1000 l·h⁻¹, kolizní energie byla 12–30 eV. Kvantifikace metabolitů byla prováděna pomocí MRM přechodů odpovídajícím endogenním, respektive značeným metabolitům (Šimura *et al.*, 2018) a výsledné koncentrace byly stanoveny pomocí izotopové zředovací metody.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace extrakce

Pro optimalizaci podmínek extrakce vybraných skupin fytohormonů (cytokininů, auxinů, abscisátů, jasmonátů a kys. salicylové) byly porovnávány profily jejich endogenních koncentračních hladin v huseníčku rolním, které byly stanoveny pomocí publikované hormonické metody využívající kolony Oasis[®] HLB v kombinaci s UHPLC-ESI-MS/MS detekcí (Šimura *et al.*, 2018).

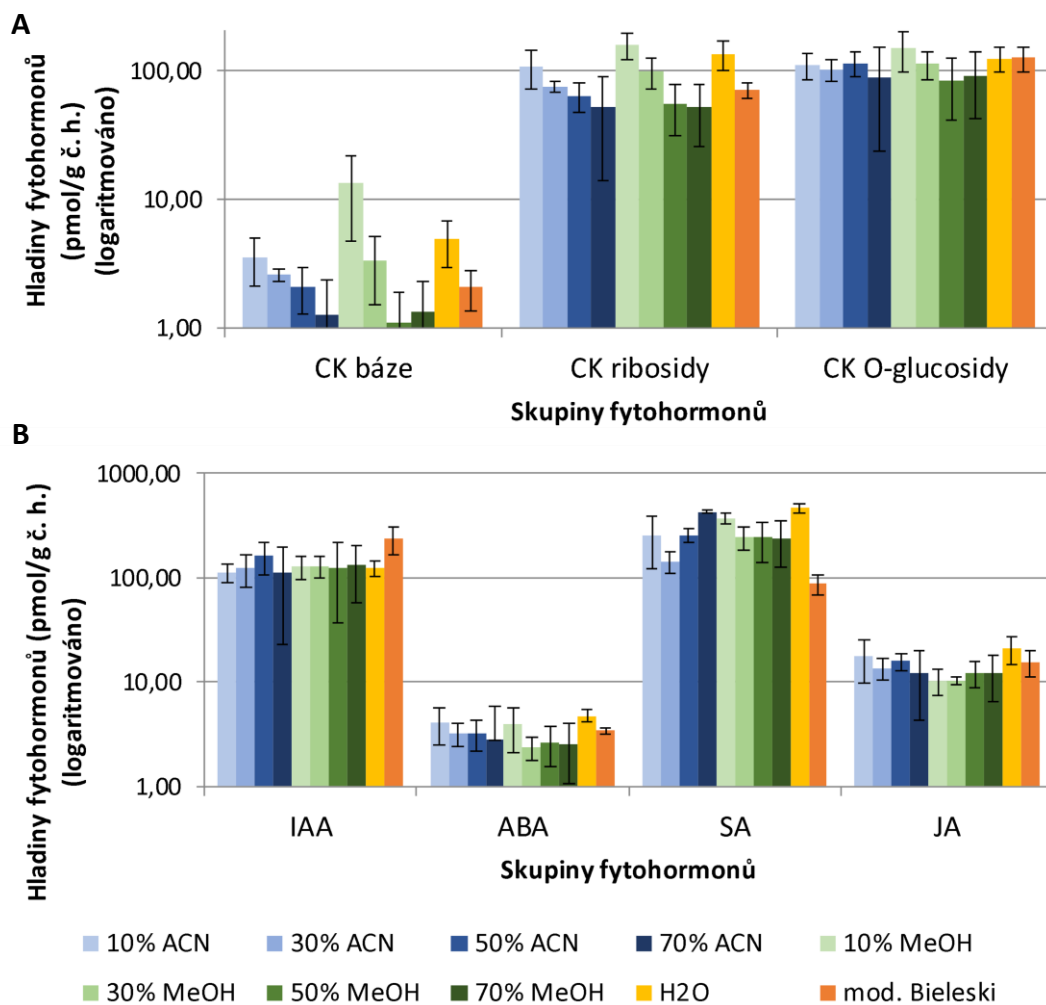
V prvním experimentu byly testovány methanolicke a acetonitrilové vodné roztoky o vzrůstajících koncentracích organické složky. V druhé fázi byl testován vliv okyselení u 10% MeOH vybraného na základě závěrů z experimentu stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů v rostlinných extraktech.

4.1.1 Extrakční experiment I

Výsledky experimentu pro stanovení extrakční účinnosti fytohormonů na základě složení použitého extrakčního činidla ukazují (Obr. 10, str. 41), že se vzrůstajícím podílem ACN i MeOH v extrakčním činidle dochází ke snížení stanovených koncentračních hladin cytokininů. Naměřené výsledky také ukazují vyšší endogenní hladiny CK *O*-glukosidů a CK ribosidů i jejich nekonjugovaných forem při aplikaci methanolicke extrakčních roztoků. Výsledné koncentrační hladiny IAA, ABA a JA byly v případě všech použitých činidel téměř konstantní. Extrahovatelnost SA se při extrakci různými methanolicke roztoky příliš nemění, ale při aplikaci činidel s vyšším obsahem ACN narůstá. Výjimkou je 30% ACN, kde bylo zjištěno nižší množství SA oproti všem ostatním vzorkům.

Srovnáním výsledků pro extrakci do deionizované vody byla zjištěna nejvyšší koncentrace pro SA (Obr. 10B) společně s CK bázemi i CK ribosidy (Obr. 10A). Při aplikaci modifikovaného extrakčního činidla podle Bielekého (Hoyerová *et al.*, 2006) byly naměřené endogenní hladiny CK metabolitů srovnatelné s výsledky extrakcí do roztoků obsahujících 50-70% organické složky. Koncentrace SA byla v modifikované Bielekého fixáži nejnižší ze všech činidel, naopak však byla po extrakci zjištěna nejvyšší endogenní hladina pro volnou IAA.

Výsledky toho extrakčního testu ukazují na srovnatelnou účinnost extrakce při použití činidel obsahujících podíl ACN nebo MeOH. Naznačují také vliv různých degradačních procesů, které mohou přispívat k celkovému zvýšení endogenních hladin fytohormonů.

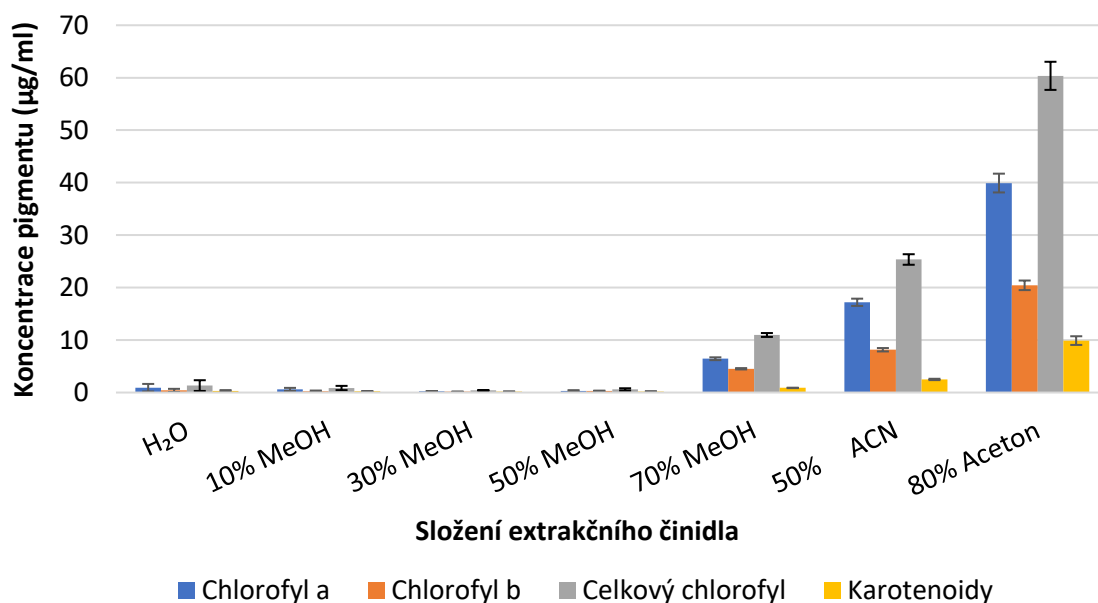


Obr. 10 Endogenní hladiny vybraných fytohormonálních skupin v *Arabidopsis thaliana* při použití různých extrakčních činidel – 10-70% acetonitrilu (ACN), 10-70% methanolu (MeOH), deionizované vody (H₂O) a modifikovaného činidla podle Bieleškiho. Sloupcové grafy zobrazují hodnoty průměru ± směr. odchylka (n = 3).

4.1.2 Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.8, stanovení fytohormonů negativně ovlivňují rozličné interferující látky (např. pigmenty). Již dříve bylo provedeno srovnání vlivu narůstající koncentrace ACN v extrakčním činidle na množství obsahu pigmentů v rostlinném extraktu (Šimura *et al.*, 2018). Součástí předkládané práce je optimalizace testování obsahu rostlinných pigmentů při použití různých extrakčních činidel se zvyšujícím se obsahem methanolicke složky. Testována byla rozpouštědla s různým podílem organické fáze (10% MeOH, 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH) v porovnání s deionizovanou vodou, 50% ACN a 80% aceton).

Z výsledků (Obr. 11) je patrné, že při nižších koncentracích MeOH do 50 % nedochází k nárůstu koncentrace u žádných zkoumaných pigmentů oproti H₂O. Při 70% podílu



Obr. 11 Koncentrace rostlinných pigmentů na základě použitých extrakčních činidel. Sloupcové grafy zobrazují hodnoty průměru ± směr. odchylka (n = 3).

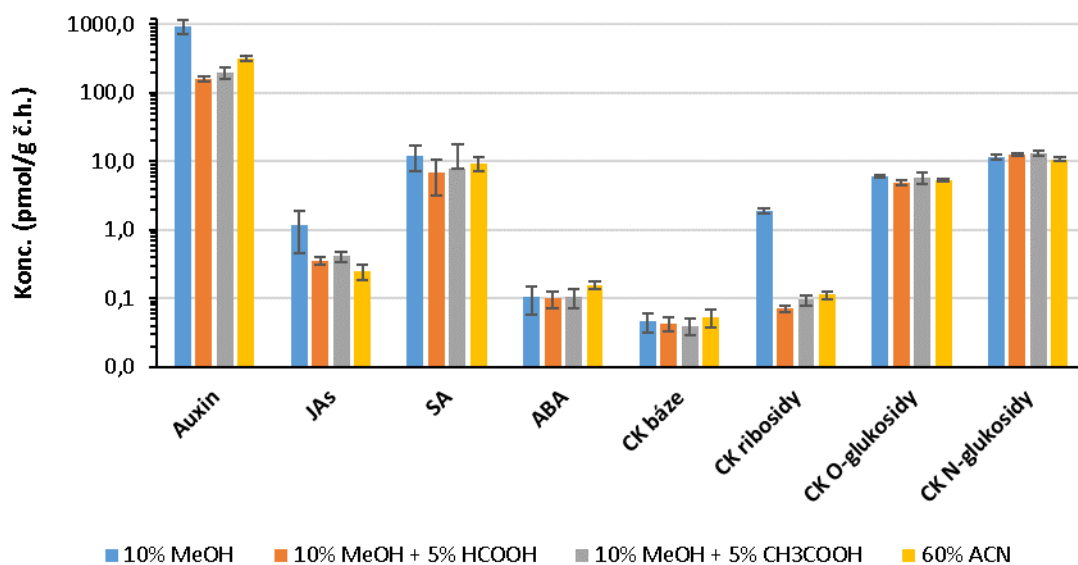
MeOH v extrakčním činidle dochází již k nárůstu koncentrace všech stanovovaných pigmentů. Ještě vyšší hodnoty byly naměřeny při 50% koncentraci ACN. Nejvyšší koncentrace chlorofylů i karotenoidů byly dle očekávání naměřeny u 80% acetonu.

Tento test ukázal zřejmý trend, kdy se vzrůstajícím podílem organického rozpouštědla roste extrakční účinnost u chlorofylů i karotenoidů (Urbanová *et al.*, 2013). Výsledky naznačují vhodnost použití nižšího obsahu organické složky v extrakčním činidle z důvodů snížení obsahu množství rušících látek (pigmentů). Mezi skupinou fytohormonů, které jsou studovány v této bakalářské práci, chybí nejvíce nepolární skupina brassinosteroidů. Tato skupina je limitujícím faktorem při souběžném stanovení fytohormonů (Šimura *et al.*, 2018). Proto mohlo být dále testováno extrakční činidlo obsahující pouhých 10% MeOH.

4.1.3 Extrakční experiment II

V předcházejícím extrakčním experimentu I byly naměřeny zvýšené koncentrační hladiny u cytokininů při extrakci do 10% a 30% MeOH (Obr. 10A). V porovnání s výsledky při použití modifikovaného Bieleeského činidla bylo toto zvýšení pravděpodobně způsobeno aktivitou CK metabolických enzymů, které nejsou při extrakci inhibovány (Hoyerová *et al.*, 2006).

Proto byl navržen extrakční test za použití 10% MeOH s přidavkem kyseliny mravenčí nebo octové (5%). Jak je patrné z Obr. 12, extrakce do neokyseleného 10% vodného



Obr. 12 Endogenní hladiny vybraných fytohormonálních skupin v *Arabidopsis thaliana* při použití různých extrakčních činidel. Sloupcové grafy zobrazují hodnoty průměru ± směr. odchylka (n = 4).

roztoku MeOH zvýšila endogenní hladiny CK ribosidů, IAA a jasmonátů. Tento trend byl minimalizován nejen použitím vyššího obsahu organické fáze (60% ACN), ale také snížením výsledného pH u extrakčního roztoku 10% MeOH. U ostatních vybraných fytohormonů (ABA, JA a SA) při použití všech testovaných extrakčních podmínek nebyly výraznější odlišnosti zjištěny.

Závěrem lze konstatovat, že výsledky optimalizace extrakčního postupu ukázaly na vhodnost práce s 10% MeOH obsahující 5% HCOOH. Navýšení obsahu vodné složky v extrakčním činidle snížilo obsah pigmentů v rostlinném extraktu a úprava pH < 2,5 minimalizovala možné degradační procesy během extrakčních kroků.

4.2 Optimalizace purifikace

V další části bakalářské práce byly srovnávány dva purifikační protokoly – jeden využívající komerční SPE kolony se smíšeným mechanismem zadržování analytů (ISOLUTE® Multimode) a druhý pracující se sorbenty plněnými do špiček pipet (Svačinová *et al.*, 2012; Pěňčík *et al.*, 2018).

4.2.1 Purifikace pomocí ISOLUTE® Multimode

Kolony ISOLUTE® Multimode jsou plněny polymerním sorbentem se smíšeným mechanismem retence, který v sobě kombinuje reverzní (C18) a silné iontoměničové

retenční mechanismy (kationtové i aniontové). Volbou vhodných SPE podmínek tak mělo být dosaženo zachycení fytohormonů kyselé i bazické povahy a jejich postupného uvolňování při aplikaci různých elučních činidel.

Na kolony obsahující 100 mg kondicionovaného sorbentu byla nanesena směs standardů obsahující různé fytohormonální zástupce (viz kapitola 3.2.3) a jednotlivé posbírané frakce byly proměřeny pomocí UHPLC-ESI-MS/MS. Poté byla spočítána návratnost každého fytohormonu jako podíl naměřených ploch píků daného analytu po izolaci pomocí SPE vztažených na plochy píků testované standardní směsi, která nebyla přečištěna přes SPE.

Z výsledků shrnutých v Tabulce 1 je patrné, že v průtokové frakci (spojeny nanášecí i promývací frakce) nebyla většina analytů detekována. Došlo tedy k zachycení vybraných fytohormonů na SPE sorbentu a k jejich eluci byly použity činidla bazické a kyselé povahy. Největší část analytů byla z kolony eluována v prvním kroku pomocí roztoku NH_4OH o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v 30% ACN. Významný podíl byl především

Tab. 1 Návratnosti vybraných analytů v jednotlivých elučních frakcích získaných během purifikace pomocí kolon ISOLUTE® Multimode 100 mg/1 mL (hodnoty uvedeny v %; průměr \pm směř. odchylka; $n = 5$).

Analyt	Průtoková frakce	30% ACN + NH_4OH ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	H_2O	60% ACN + CH_3COOH ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
<i>tZ</i>	$0,1 \pm 0,0$	$119,0 \pm 16,5$	$2,1 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,6$
<i>tZR</i>	n.d.	$111,1 \pm 10,0$	$2,6 \pm 0,6$	$2,4 \pm 1,0$
<i>iP7G</i>	n.d.	$113,9 \pm 10,1$	$1,3 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,4$
<i>cZROG</i>	n.d.	$115,5 \pm 16,0$	$2,7 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,9$
IAA	$0,3 \pm 0,1$	$119,4 \pm 9,4$	$2,2 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,8$
oxIAA	$0,3 \pm 0,1$	$114,3 \pm 10,9$	$1,9 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,3$
IAGlu	n.d.	$137,1 \pm 19,7$	$29,2 \pm 11,3$	$2,9 \pm 3,5$
IAAsp	n.d.	$99,0 \pm 15,6$	$30,5 \pm 12,6$	$3,1 \pm 3,7$
ABA	n.d.	$97,2 \pm 15,7$	$3,4 \pm 1,0$	$2,8 \pm 1,2$
JA	n.d.	$78,8 \pm 8,0$	$4,9 \pm 1,9$	$1,9 \pm 0,7$
9,10-dh-JA	n.d.	$96,0 \pm 12,0$	$7,8 \pm 1,0$	$3,1 \pm 1,1$
JA-Ile	n.d.	$10,3 \pm 15,1$	$4,1 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,6$
<i>cis</i> -OPDA	$0,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,2$
JA-Phe	n.d.	$16,2 \pm 21,4$	$4,7 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,6$
JA-Trp	n.d.	$16,5 \pm 15,3$	$2,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,6$
SA	n.d.	$97,1 \pm 25,9$	$3,1 \pm 0,7$	$1,7 \pm 1,3$

n.d. - nedetekováno

u CK metabolitů, auxinů, ABA a SA. Aminokyselinové konjugáty IAA byly detekovány také ve vodné frakci (cca 20 %). Při eluci 60% ACN okyseleným CH₃COOH o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹ byly zjištěny pouze velmi nízké návratnosti u všech analytů. I když JA byla vyeluována z SPE kolony v prvním elučním kroku, její prekurzor *cis*-OPDA a metabolity s aminokyselinami byly na sorbentu silně zachyceny a nebyly dodatečně vymyty žádným z aplikovaných činidel.

SPE sorbenty se smíšeným mechanismem retence jsou díky své multifunkčnosti velmi oblíbené a bylo několikrát ukázáno, že jejich použitelnost na poli fytohormonální analýzy je velmi široká (Tarkowská *et al.*, 2014). V tomto experimentu se při zvolených kondičních podmínkách vybrané skupiny fytohormonů zadržovaly podobně jako při práci s SPE kolonami plněnými sorbentem Oasis® MCX (Dobrev a Kamínek, 2002). Část analytů byla zachycena pomocí elektrostatických sil a druhá část využila reverzní vlastnosti sorbentu. Porovnání s použitím kolon Oasis® HLB, které byly použity při souběžném stanovení stejných skupin fytohormonů (Šimura *et al.*, 2018), ukázalo podobný rozptyl návratností pro všechny zastoupené skupiny kromě jasmonátů. Celkově lze konstatovat, že většina analytů byla z ISOLUTE® Multimode sorbentu úspěšně vymyta nepolárním bazickým rozpouštědlem, avšak u JA-Ile a *cis*-OPDA nebylo dosaženo uspokojivých výsledků.

4.2.2 Purifikace pomocí μ SPE-PT

Druhá fáze optimalizace purifikačních postupů byla zaměřena na testování technologie StageTips (Rappsilber *et al.*, 2003). Tento přístup umožňuje vlastní přípravu multi-StageTips kolon, které mohou kombinovat různé typy sorbentů. Byly publikovány kombinace C18/SDB-RPS/Cation-SR pro CK (Svačinová *et al.*, 2012) nebo C18/SDB-XC pro auxiny (Pěňčík *et al.*, 2018). Při použití μ SPE-PT purifikace lze dosáhnout velmi vysokých návratností, např. více než 80% návratností pro CK metabolity bez přítomnosti rostlinné matrice (Svačinová *et al.*, 2012). Kapacita StageTips kolon se dá také navýšit množstvím přidaných vrstev sorbentů (optimálně 3 vrstvy). Lze tak dosáhnout celkové návratností kolem 50% v přítomnosti 2,5 mg rostlinného pletiva (Pěňčík *et al.*, 2018).

Na základě výše uvedených znalostí byl navržen experimentální postup kombinující multi-StageTips kolony s různým počtem vrstev sorbentů: C18 (3×)/SDB-XC (3×), C18 (6×)/SDB-XC (3×) a C18 (6×)/HLB (3×). Bylo extrahováno 10 mg rostlinného materiálu v 1 ml okyseleného 10% MeOH a výsledný rozdělený extrakt (3 × 300 μ l) byl jednotlivě

Tab. 2 Návratnosti (%) interních standardů rostlinných hormonů přidávaných v průběhu extrakce 10 mg rostlinného materiálu *Arabidopsis* v 1 ml 10% MeOH okyseleného 5% HCOOH a izolovaných pomocí μ SPE-PT. Jednokroková purifikace - 3×C18/3×SDB-XC; dvoukroková purifikace 1 - 3×C18/ 3×SDB-XC + 6×C18/3×SDB-XC; dvoukroková purifikace 2 - 3×C18/3×SDB-XC + 6×C18/3×HLB (hodnoty uvedeny v %; průměr \pm směř. odchylka; n = 2).

Analyt	Jednokroková purifikace	Dvoukroková purifikace 1	Dvoukroková purifikace 2
<i>tZ</i>	46,9 \pm 1,0	43,3 \pm 3,6	44,0 \pm 0,7
<i>tZR</i>	49,7 \pm 3,7	46,8 \pm 0,6	47,4 \pm 0,9
<i>tZOG</i>	63,7 \pm 3,3	60,1 \pm 2,9	60,0 \pm 1,9
<i>tZROG</i>	63,4 \pm 6,0	60,1 \pm 1,0	57,9 \pm 0,3
<i>tZ7G</i>	63,9 \pm 2,1	59,2 \pm 0,6	61,0 \pm 1,0
<i>tZ9G</i>	54,8 \pm 2,4	49,5 \pm 0,9	50,1 \pm 1,4
<i>cZ</i>	45,4 \pm 1,0	39,0 \pm 2,4	42,2 \pm 0,2
DHZ	44,1 \pm 0,6	37,8 \pm 3,2	45,5 \pm 1,5
DHZ9G	59,3 \pm 3,2	52,8 \pm 1,1	56,0 \pm 0,2
iP	34,1 \pm 0,5	29,7 \pm 1,5	30,9 \pm 0,6
iPR	42,1 \pm 0,5	37,4 \pm 2,3	33,4 \pm 0,2
iP9G	50,4 \pm 1,6	46,3 \pm 0,2	46,1 \pm 0,2
iP7G	63,1 \pm 3,5	58,3 \pm 1,0	59,7 \pm 2,4
2MeStZ	21,9 \pm 0,4	21,0 \pm 5,5	24,1 \pm 0,8
2MeStZR	40,8 \pm 1,0	36,9 \pm 2,2	32,7 \pm 0,4
2MeSiP	6,6 \pm 1,8	4,7 \pm 0,2	5,7 \pm 1,8
2MeSiPR	22,8 \pm 0,2	20,0 \pm 0,6	19,1 \pm 3,1
IAA	52,9 \pm 3,8	45,4 \pm 5,1	39,8 \pm 0,8
oxIAA	61,0 \pm 1,4	54,9 \pm 0,8	55,6 \pm 1,2
IAGlu	23,1 \pm 0,7	21,2 \pm 2,7	23,4 \pm 0,2
IAAsp	17,5 \pm 3,5	15,1 \pm 3,3	17,1 \pm 0,5
Trp	57,9 \pm 6,2	46,9 \pm 5,6	38,8 \pm 1,2
Tra	28,3 \pm 2,2	19,7 \pm 1,9	13,7 \pm 1,3
IAN	10,0 \pm 0,2	7,1 \pm 1,3	12,9 \pm 3,0
ABA	53,4 \pm 2,7	48,3 \pm 2,7	50,9 \pm 0,2
7-OH-ABA	49,5 \pm 2,0	42,7 \pm 4,8	38,9 \pm 2,9
PA	53,4 \pm 3,0	49,0 \pm 2,8	50,7 \pm 0,2
DPA	53,9 \pm 3,3	47,2 \pm 2,5	49,3 \pm 0,2
neoPA	57,4 \pm 1,4	48,9 \pm 4,0	52,2 \pm 1,3
JA	46,9 \pm 8,1	41,9 \pm 3,3	49,4 \pm 1,6
JA-Ile	51,3 \pm 0,1	46,9 \pm 1,3	48,8 \pm 1,8
<i>cis</i> -OPDA	44,5 \pm 3,3	39,7 \pm 0,1	43,1 \pm 1,4
SA	50,1 \pm 5,6	45,2 \pm 3,7	50,7 \pm 1,2
Medián	49,7 \pm 15,6	45,2 \pm 14,7	45,5 \pm 14,9

nanesen na multi-StageTips kolony. Postupně byly extrakty přečištěny jedнокrokovou nebo dvoukrokovou purifikací (viz kapitola 3.2.4.1) a výsledné vzorky opět analyzovány pomocí UHPLC-ESI-MS/MS (Šimura *et al.*, 2018). Byla spočítána návratnost (Tabulka 2, str. 46) přidaných interních standardů značených pomocí stabilních izotopů, které byly přidány na začátku extrakce.

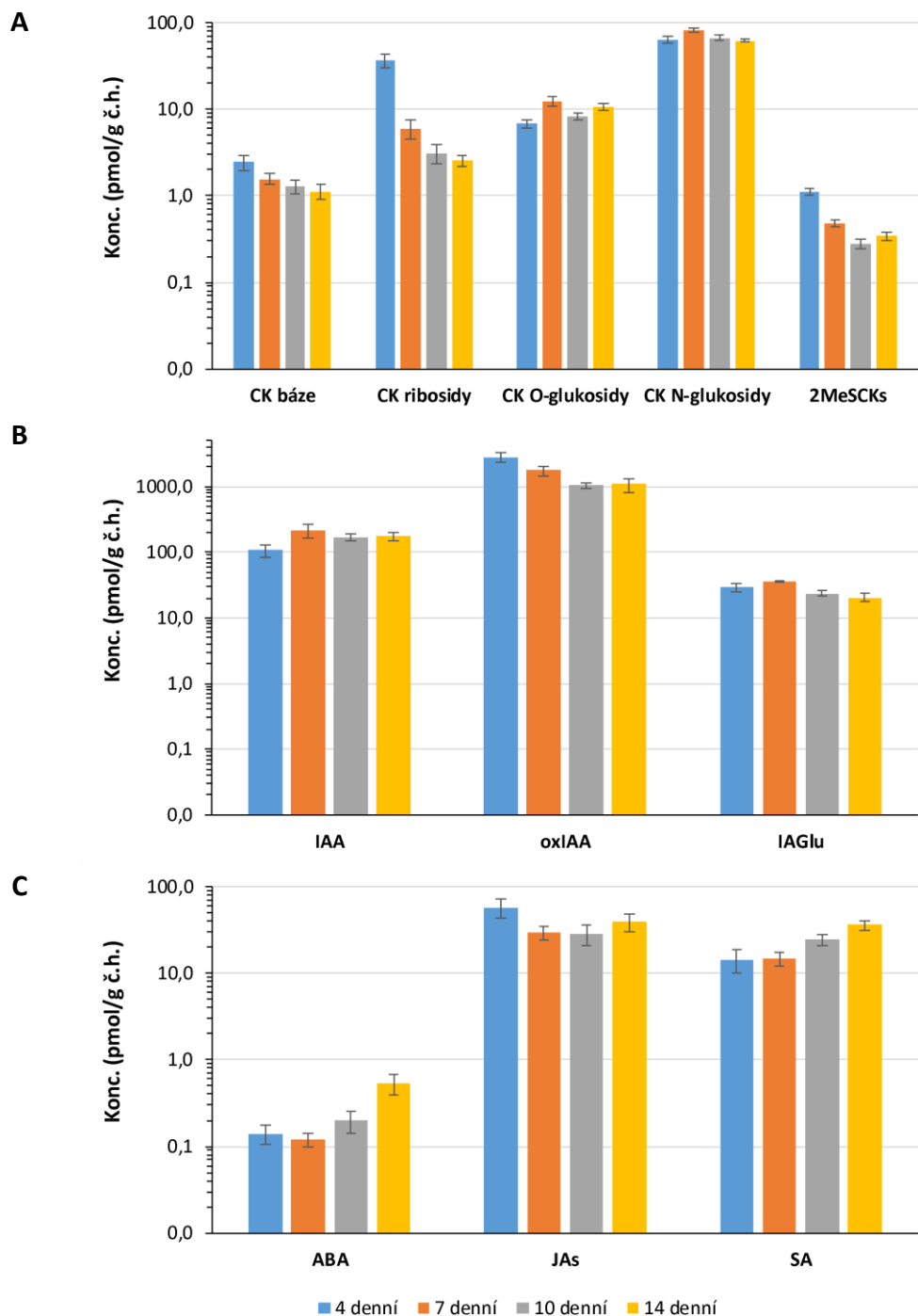
Celková návratnost jedнокrokové μ SPE-PT purifikace se pohybovala v rozmezí 25-65 % pro většinu analytů a pouze pro některé analyty nepřesáhla 20 %. Nejnižší návratnost byla pro 2-methylthio-isopentenyladenin (2MeSiP), pravděpodobně z důvodů nízké eluční síly použitého promývacího činidla (30% ACN). Z těchto důvodů bylo při stanovení fytohormonálních profilů během vývojových stádií rostliny huseničku rolního použit 80% MeOH (kapitola 3.2.4.2). Výsledky navíc ukazují, že při vícekové purifikaci za pomoci kombinace sorbentů C18/SDB-XC i C18/HLB dochází k mírnému snížení návratnosti (asi o 5%) u téměř všech studovaných látek. Překvapivě se tedy rozdílný stupeň přečištění (Obr. 9) neprojevil na výsledné návratnosti a u většiny analytů bylo dosaženo podobných výsledků nezávisle na počtu SPE kroků (Tabulka 2).

4.3 Profilování rostlinných hormonů

Jako závěrečný experiment předložené bakalářské práce bylo provedeno stanovení celkového profilu vybraných skupin rostlinných hormonů během vývojových stádií *Arabidopsis* pomocí UHPLC-ESI-MS/MS. Byly aplikovány optimalizované podmínky extrakce za použití okyseleného 10% MeOH v kombinaci s μ SPE-PT purifikací pomocí multi-StageTips kolon (C18/SDB-XC). Z celkového počtu 50 stanovovaných analytů bylo detekováno 30 fytohormonálních metabolitů. Výsledky jsou shrnuty v Příloze 1.

U vybraných vývojových stádií huseničku rolního (4, 7, 10 a 14 denní rostliny) byl pozorován mírný pokles hladin CK bází a 2MeSCKs (Obr. 13A). S vzrůstajícím stářím rostlin byl výraznější pokles sledován u CK ribosidů, což by mohlo naznačovat velmi dynamickou CK homeostázi v prvních dnech vývoje *Arabidopsis*. U produktů CK metabolismu, CK *O*-glukosidů i CK *N*-glukosidů, nebyla pozorována výraznější změna hladin. Podle literatury lze jejich akumulaci předpokládat v pozdějších stádiích vývoje rostliny (Šmehilová *et al.*, 2016).

Zatímco u IAA byl pozorován mírný vzestup endogenních hladin, tak u oxIAA i IAAGlu je možné pozorovat slabý klesající trend (Obr. 13B). I když je IAAsp dalším obvyklým aminokyselinovým konjugátem auxinu u *Arabidopsis* (Novák *et al.*, 2012),



Obr. 13 Endogenní hladiny vybraných skupin fytohormonů během vývojových stádií rostliny *Arabidopsis thaliana* (A - cytokininy, B - auxiny, C - ostatní rostlinné hormony). Sloupcové grafy zobrazují hodnoty průměru \pm směr. odchylka (pmol/g čerstvé hmoty; n = 5).

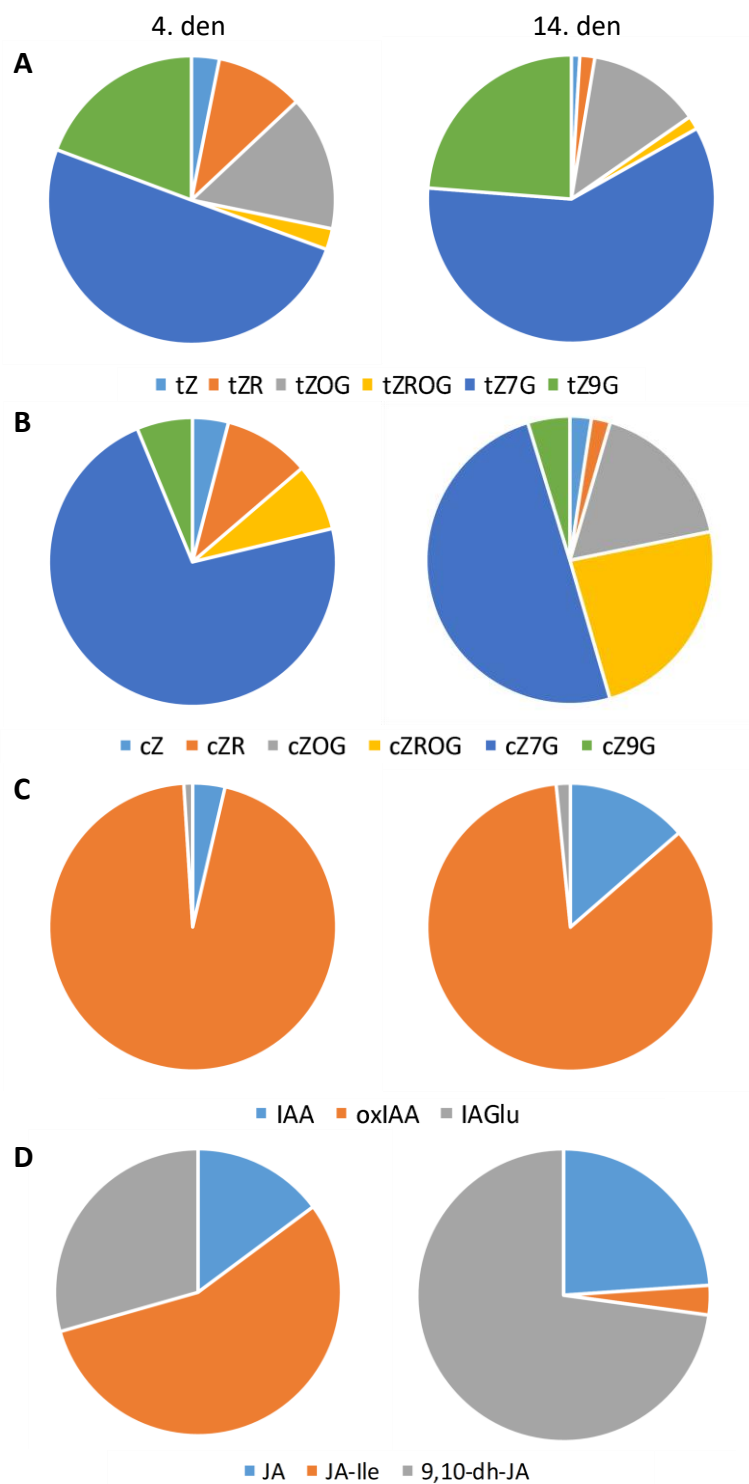
v našich podmínkách měření nebyl z důvodů vyššího matričního efektu detekován. U ABA i SA byl pozorován nárůst endogenních hladin u starších rostlin oproti rostlinám mladším. Naopak u jasmonátů, zastoupených JA, JA-Ile a 9,10-dh-JA, nebyla v hladinách u studovaných vývojových stádií pozorována téměř žádná změna (Obr. 13).

Výsledky naznačují akumulaci některých fytohormonálních metabolitů v průběhu růstu a vývoje rostliny (Obr. 14, str. 50; Příloha 1). U metabolitů *tZ* je tento trend vidět u příslušných *N*-glukosidů (*tZ7G* a také u *tZ9G*) při porovnání rostlin různého stáří – 4 dny a 2 týdny (Obr. 14A, str. 50). Naopak pokles endogenních hladin je patrný u samotného *tZ* i jeho ribosidu (*tZR*). Podobné trendy je možné nalézt i u CK *cZ*-typů (Obr. 14B), u kterých však dochází k nárůstu hladin zásobních *O*-glukosidových metabolitů *cZOG* a *cZROG*, naopak hladina *cZ7G* klesá. U hladiny *cZ* i *cZR* je možné pozorovat stejně jako u *tZ* klesající trend. Metabolity *iP* nevykazovaly téměř žádnou změnu v poměru metabolitů během zkoumaných vývojových stádií. Snižující se zastoupení *tZ*, *cZ* a *iP* by mohlo indikovat zpomalení růstu nadzemní části rostliny. Zvýšené hladiny zásobních forem cytokininů by mohly být důsledkem snahy o udržení homeostázy při snížené potřebě aktivních hormonů (Mok a Mok, 2001). V porovnání s dříve publikovanými hodnotami (Svačinová *et al.*, 2012) byly naměřené CK profily a endogenní hladiny u 10denních rostlin pro většinu CK analytů řádově stejné.

U auxinů dochází během zkoumaných počátečních vývojových stádií k nárůstu hladiny IAA (Obr. 14C), které by mohlo být způsobeno výraznějším rozvojem kořenů za současného útlumu růstu nadzemní části vlivem poklesu hladin aktivních cytokininů (Ljung *et al.*, 2001). Naopak se snižovaly endogenní hladina oxIAA, což by mohlo svědčit o útlumu degradace IAA. Podíl IAGlu vedoucího také k degradaci IAA nevykazoval výraznější změny. Stanovené endogenní hladiny u 7 denních rostlin *Arabidopsis* ekotyp Col-0 pro IAA i oxIAA odpovídají dříve publikovaným hodnotám, pro IAGlu byla zjištěná hodnota mírně vyšší (Pěňčík *et al.*, 2018).

Podíl JA ku jejím metabolitům byl ve studovaných vývojových stádiích obdobný (Obr. 14D). Při porovnání výsledků došlo však k dramatickému poklesu endogenní hladiny nejvíce biologicky aktivního aminokonjugátu JA-Ile, který byl kompenzován biosyntézou 9,10-dihydrojasmonové kyseliny (9,10-dh-JA). Snížení hladin JA-Ile a celková homeostáza JAs může souviset s nedávno popsáním vztahem mezi auxinem, jasmonáty a zakládáním adventivních kořenů (Guntierrez *et al.*, 2012). Bylo dokázáno, že isoleucinový konjugát JA je negativním regulátorem adventivního zakořeňování a snížení jeho endogenních hladin společně s nárůstem hladin IAA mohl vést k podpoře růstu a vývoje kořenového systému (Obr. 9).

Naměřené koncentrace ABA ve studovaných vývojových stádiích mírně rostly (Obr. 13; Příloha 1). Její metabolity však nebyly detekovány, což mohlo být způsobeno potlačenou biosyntézou ABA v průběhu raných vývojových stádií analyzovaných rostlin.



Obr. 14 Distribuce vybraných skupin fytohormonů během dvou vybraných vývojových stádií rostliny *Arabidopsis thaliana* (4 dny a 2 týdny). Výšečové grafy zobrazují hodnoty průměru naměřených endogenních hladin pro jednotlivé fytohormonální metabolity: cytokininy (A – *tZ*-typy, B – *cZ*-typy), auxiny (C) a jasmonáty (D). Koncentrační hladiny jednotlivých metabolitů v pmol/g č. h. jsou uvedeny v Příloze 1 (n = 5).

5 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se v teoretické části zabývá základní problematikou fytohormonů a látek jim vlastnostmi podobným. Shrnut byl jejich výskyt a funkce, ale i biosyntetické a metabolické dráhy. Dále jsou v teoretické části popsány metodické přístupy extrakce rostlinných hormonů z rostlinné matrice a principy nejpoužívanějších metod pro izolaci požadovaných látek z rostlinného extraktu a jejich následné stanovení pomocí spojených chromatografických a hmotnostně-spektrometrických technik.

V experimentální části byly nejprve realizovány testy zaměřené na vývoj dílčích kroků extrakce a purifikace pro souběžné stanovení vybraných skupin rostlinných hormonů v malém množství rostlinného pletiva. Optimalizace extrakčního postupu probíhala v několika experimentech, kdy bylo zjišťováno optimální složení extrakční směsi pro vybrané zástupce fytohormonů. Cílem bylo nalezení extrakčního činidla, které by dosahovalo dobré extrakční účinnosti analytů za současné nízké extrakce interferujících látek, především chlorofylů. Z porovnávaných acetonitrilových a methanolických roztoků byl vybrán 10% MeOH, který současně extrahoval velmi malé množství rostlinných pigmentů. Následně bylo testováno okyselení extrakčního činidla za účelem inhibice degradačních procesů v průběhu extrakce. Pro finální experiment profilování rostlinných hormonů byl vybrán 10% MeOH okyselený 5 % HCOOH, který dosahoval pro vybrané fytohormony obdobných extrahovatelností jako dříve publikovaný 60% ACN (Šimura *et al.*, 2018) při výrazně nižší extrakci pigmentů.

Pro souběžnou purifikaci vybraných skupin fytohormonů byly testovány 2 přístupy: kolony ISOLUTE® Multimode a multi-StageTips kolony. Kromě některých metabolitů ze skupiny jasmonátů, ukázaly výsledky vysokou návratnost analytů na polymerním sorbentu se smíšeným mechanismem retence. V testu purifikace pomocí μ SPE-PT byl optimalizován protokol pro použití multi-StageTips kolon kombinujících sorbent C18 se sorbenty SDB-XC a HLB. Při porovnání dvoukrokové a jednokrokové purifikace nebyly nalezeny výraznější rozdíly.

Optimalizované dílčí kroky extrakce a purifikace byly tedy začleněny do finálního stanovení profilů rostlinných hormonů během vývojových stádií huseníčku rolního. Výsledky celkového fytohormonálního profilování potvrdily dynamičnost rostlinného metabolismu a udržování hladin aktivních metabolitů pomocí hormonální homeostáze.

6 LITERATURA

- Adamowski M., Friml J. (2015): PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution. *Plant Cell* **27**, 20-32.
- Addicott F.T., Lyon J.L., Ohkuma K., Thiessen W.E., Carns H.R., Smith O.E., Cornforth J.W., Milborrow B.V., Ryback G., Wareing P.F. (1968): Abscisic Acid: A New Name for Abscisin II (Dormin). *Science* **159**, 1493.
- Allen M., Qin W., Moreau F., Moffatt B. (2002): Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum* **115**, 56-68.
- Andrew W.W., Bartel B. (2005): Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.
- Bai Y., Du F., Bai Y., Liu H. (2010): Determination strategies of phytohormones: recent advances. *Analytical Methods* **2**, 1867-1873.
- Bajguz A., Piotrowska A. (2009): Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**, 957-969.
- Bandurski R.S., Cohen J.D., Slovin J.P., Reinecke D.M. (1995): Auxin Biosynthesis and Metabolism. In: *Plant Hormones*. 2nd ed., (Davies P. J., ed.), Kluwer Academic Publishers, Norwell, USA, 39-65.
- Bielecki R.L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**, 431-442.
- Davies P.J. (ed.) (2010): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd ed., Springer, Berlin, Německo, 802 stran.
- Demole E., Lederer E., Mercier D. (1962): Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* **45**, 675-685.
- Dempsey D.A., Klessig D.F. (2017): How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology* **15**, 23.
- Dempsey D.A., Vlot A.C., Wildermuth M.C., Klessig D.F. (2011): Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* **9**, e0156.
- Diopan V., Adam V., Havel L., Kizek R. (2009): Phytohormones as Important Biologically Active Molecules – Their Simple Simultaneous Detection. *Molecules* **14**, 1825-1839.
- Dobrev P.I., Kamínek M. (2002): Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **950**, 21-29.
- Du F., Ruan G., Liu H. (2012): Analytical methods for tracing plant hormones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 55-74.
- Entsch B., Parker C.W., Letham D.S. (1983): An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375-381.
- Entsch B., Parker C.W., Letham D.S., Summons R.E. (1979): Preparation and characterization, using high-performance liquid chromatography, of an enzyme forming glucosides of cytokinins. *Biochimica et Biophysica Acta* **570**, 124-139.
- Eshita S.M. (2001): 3-Hydroxybenzoic Acid as an Internal Standard for the High-Pressure Liquid Chromatography Quantitation of Salicylic Acid in Plants. *Analytical Biochemistry* **289**, 99-102.
- Farmer E.E., Ryan C.A. (1990): Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7713-7716.
- Feng J., Shi Y., Yang S., Zuo J. (2017): Cytokinins. In: *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. 1st ed., (Li J., Li C., Smith S. M., eds.), Academia Press, Cambridge, USA, 77-106.
- Floková K., Tarkovská D., Miersch O., Strnad M., Wasternack C., Novák O. (2014): UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**, 147-157.

- Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A., Kramell R., Miersch O., Wasternack C., Solano R. (2009): (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-*L*-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**, 344-350.
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121-130.
- Fu J.H., Sun X.H., Wang J.D., Chu J.F., Yan C.Y. (2011): Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* **56**, 355-366.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461.
- Ge L., Yong J.W.H., Goh N.K., Chia L.S., Tan S.N., Ong E.S. (2005): Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **829**, 26-34.
- Guntierrez L., Mongelard G., Floková K., Pacurar D.I., Novák O., Staswick P., Kowalczyk M., Pacurar M., Demailly H., Geiss G., Bellini C. (2012): Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell* **24**, 2515-2527.
- Haagen-Smit A.J., Leech W.D., Bergen W.R. (1941): Estimation, isolation and identification of auxins in plant material. *Science* **93**, 624-625.
- Hauserová E., Swaczynová J., Doležal K., Lenobel R., Popa I., Hajdúch M., Vydra D., Fuksová K., Strnad M. (2005): Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *Journal of Chromatography A* **1100**, 116-125.
- Holbrook L., Tung P., Ward K., Reid D.M., Abrams S., Lamb N., Quail J.W., Moloney M.M. (1997): Importance of the Chiral Centers of Jasmonic Acid in the Responses of Plants. *Plant Physiology* **114**, 419-428.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev T.I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006): Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151-1159.
- Hradecká V., Novák O., Havlíček L., Strnad M. (2007): Immunoaffinity chromatography of abscisic acid combined with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **847**, 162-173.
- Hutchison C.E., Kieber J.J. (2002): Cytokinin Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, S47-S59.
- Chen C.M., Eckert R.L. (1977): Phosphorylation of cytokinin by adenosine kinase from wheat germ. *Plant Physiology* **59**, 443-447.
- Chen C.M., Petschow B. (1978): Metabolism of cytokinin: ribosylation of cytokinin bases by adenosine phosphorylase from wheat germ. *Plant Physiology* **62**, 871-874.
- Kieber J.J., Schaller G.E. (2014): Cytokinins. *Arabidopsis Book* **12**, e0186.
- Kögl F. (1933): Über Auxine. *Angewandte Chemie* **46**, 469-484.
- Kögl F., Haagen-Smith A.J., Erxleben H. (1934): Über ein neues Auxin („Hetero-auxin“) aus Harn. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 90-103.
- Kojima M., Kamada-Nobusada T., Komatsu H., Takei K., Kuroha T., Mizutani M., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Suzuki K., Sakakibara H. (2009): Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using ms-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: An application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant and Cell Physiology* **50**, 1201-1214.
- Koo A.J., Thireault C., Zemelis S., Poudel A.N., Zhang T., Kitaoka N., Brandizzi F., Matsuura H., Howe G.A. (2014): Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-*L*-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 29728-29738.
- Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C. (2013): Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2541-2555.
- Lacombe B., Achard P. (2016): Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Current Opinion in Plant Biology* **34**, 1-8.
- Laloue M., Terrine C., Gawer M. (1974): Cytokinins: Formation of the nucleoside-5'-triphosphate in tobacco and Acer cells. *FEBS Letters* **46**, 1-2.

- Letham D.S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Science* **2**, 569-573.
- Lichtenthaler H.K. (1999): The 1-deoxy-D-xylolose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 47-65.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. (2001): Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1-F4.3.8.
- Liu X., Lin W.H., Yang Y.L., Tong J.H. (2010): Determination of both jasmonic acid and methyl jasmonate in plant samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chinese Science Bulletin* **55**, 2231-2235.
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. (2001): Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* **28**, 465-474.
- Ljung K., Hull A.K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen J.D., Sandberg G. (2002): Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**, 249-272.
- Ljung K., Sandberg G., Moritz T. (2004): Methods of plant hormone analysis. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (Davies P. J., ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 671-694.
- Ludwig-Müller J. (2011): Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1757-1773.
- Malka S.K., Cheng Y. (2017): Possible Interactions between the Biosynthetic Pathways of Indole Glucosinolate and Auxin. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2131.
- Martin R.C., Mok M.C., Shaw G., Mok D.W. (1989): An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in phaseolus embryos. *Plant Physiology* **90**, 1630-1635.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392.
- Mok D.W., Mok M.C. (2001): Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Normanly J., Cohen J.D., Fink G.R. (1993): *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10355-10359.
- Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008): Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-2224.
- Novák O., Hényková E., Sairanen I., Kowalczyk M., Pospíšil T., Ljung K. (2012): Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant Journal* **72**, 523-536.
- Novák O., Napier R., Ljung K. (2017): Zooming In on Plant Hormone Analysis: Tissue- and Cell-Specific Approaches. *Annual Review of Plant Biology* **68**, 323-348.
- Novák O., Pěňčík A., Ljung K. (2014): Identification and Profiling of Auxin and Auxin Metabolites. In: *Auxin and Its Role in Plant Development*. (Zažímalová E., Petrášek J., Benková E., eds.), Springer, Vienna, Austria, 39-60.
- Novák O., Tarkowski P., Tarkowska D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M. (2003): Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography/single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **480**, 207-218.
- Nováková L., Vlčková H. (2009): A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **656**, 8-35.
- Nováková M., Motyka V., Dobrev P.I., Malbeck J., Gaudinová A., Vanková R. (2005): Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2877-2883.
- Oklešťková J., Tarkowská D., Eyer L., Elbert T., Marek A., Smržová Z., Novák O., Fránek M., Zhabinskii V.N., Strnad M. (2017): Immunoaffinity chromatography combined with tandem

- mass spectrometry: A new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroid plant hormones. *Talanta* **170**, 432-440.
- Pan X., Wang Y. (2009): Profiling of plant hormones by mass spectrometry. *Journal of chromatography B* **877**, 2806-2813.
- Park S.W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S., Klessig D.F. (2007): Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**, 113-116.
- Patel D., Thaker V.S. (2007): Estimation of endogenous contents of phytohormones during internode development in *Merremia emarginata*. *Biologia Plantarum* **51**, 75-79.
- Pěňčík A., Casanova-Sáez R., Pilařová V., Žukauskaitė A., Pinto R., Micol J.L., Ljung K., Novák O. (2018): Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **69**, 2569-2579.
- Pěňčík A., Rolčík J., Novák O., Magnus V., Barták P., Buchčík R., Salopek-Sondi B., Strnad M. (2009): Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta* **80**, 651-655.
- Pollmann S., Neu D., Lehmann T., Berkowitz O., Schäfer T., Weiler E.W. (2006): Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**, 1241-1253.
- Porfírio S., Silva M.D.R.G.d., Peixe A., Cabrita M.J., Azadi P. (2016): Current analytical methods for plant auxin quantification – A review. *Analytica Chimica Acta* **902**, 8-21.
- Procházková S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998): *Fyziologie rostlin*. 1st ed., Academia, Praha, Česká republika, 485 stran.
- Rappsilber J., Ishihama Y., Mann M. (2003): Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Analytical Chemistry* **75**, 663-670.
- Rogg L.E., Bartel B. (2001): Auxin Signaling: Derepression through Regulated Proteolysis. *Developmental Cell* **1**, 595-604.
- Rozhon W., Petutschnig E., Wrzaczek M., Jonak C. (2005): Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382**, 1620-1627.
- Shan X., Yan J., Xie D. (2012): Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 84-91.
- Shang Y., Yan L., Liu Z.Q., Cao Z., Mei C., Xin Q., Wu F.Q., Wang X.F., Du S.Y., Jiang T., Zhang X.F., Zhao R., Sun H.L., Liu R., Yu Y.T., Zhang D.P. (2010): The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell* **22**, 1909-1935.
- Sheard L.B., Tan X., Mao H., Withers J., Ben-Nissan G., Hinds T.R., Kobayashi Y., Hsu F.F., Sharon M., Browse J., He S.Y., Rizo J., Howe G.A., Zheng N. (2010): Jasmonate perception by inositol phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468**, 400-405.
- Schwartz S.H., Zeevaart J.A.D. (2010): Abscisic Acid Biosynthesis and Metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, 3rd ed., (Davies P. J., ed.), Springer, Berlin, Německo, 137-155.
- Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y., Kasahara H. (2009): Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5430-5435.
- Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012): A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**, 17.
- Šimura J., Antoniadi I., Široká J., Tarkovská D., Strnad M., Ljung K., Novák O. (2018): Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiology* **177**, 476-489.
- Šmečilová M., Dobrušková J., Novák O., Takáč T., Galuszka P. (2016): Cytokinin-Specific Glycosyltransferases Possess Different Roles in Cytokinin Homeostasis Maintenance. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1264.

- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of *trans*-Zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872.
- Taller B.J. (1994): Distribution, Biosynthesis, and Function of Cytokinins in tRNA. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. (Mok D. W. S., Mok M. C., eds.), CRC Press, Boca Raton, USA, 101-108.
- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014): Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55-76.
- Tarkowski P., Floková K., Václavíková K., Raus M., Njordström A., Novák O., Doležal K., Šebela M., Frébortová J. (2010): An improved in vivo deuterium labeling method for measuring the biosynthetic rate of cytokinins. *Molecules* **15**, 9614-9229.
- Toledo R.A.d., Vaz C.M.P. (2007): Use of a graphite-polyurethane composite electrode for electroanalytical determination of indole-3-acetic acid in soil samples. *Microchemical Journal* **86**, 161-165.
- Tuteja N. (2007): Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling *Plant Signaling & Behavior* **2**, 135-138.
- Ulvskov P., Marcussen J., Rajagopal R., Prinsen E., Rüdelsheim P., Onckelen H.V. (1987): Immunoaffinity Purification of Indole-3-acetamide Using Monoclonal Antibodies. *Plant and Cell Physiology* **18**, 937-945.
- Urbanová T., Tarkowská D., Novák O., Strnad M., Hedden P. (2013): Analysis of Gibberellins as Free Acids by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **112**, 85-94.
- Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., Yadav G., Singh J., Mishra R.K., Kumar V., Verma R., Upadhyay R.G., Pandey M., Sharma S. (2017): Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science* **8**, 161.
- Wasternack C., Strnad M. (2018): Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, E2539.
- Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M. (2001): Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Wu K., Sun Y., Hu S. (2003): Development of an amperometric indole-3-acetic acid sensor based on carbon nanotubes film coated glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **96**, 658-662.
- Wu Y., Hu B. (2009): Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7657-7663.
- Xiong D.M., Liu Z., Chen H., Xue J.T., Y Y., Chen C., Ye L.M. (2014): Profiling the dynamics of abscisic acid and ABA-glucose ester after using the glucosyltransferase UGT71C5 to mediate abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **4**, 190-196.
- Xu Z.Y., Yoo Y.J., Hwang I. (2014): ABA Conjugates and Their Physiological Roles in Plant Cells. In: *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*. (Zhang D. P., ed.), Springer, Berlin, Německo, 77-87.
- Yan J., Li S., Gu M., Yao R., Li Y., Chen J., Yang M., Tong J., Xiao L., Nan F., Xie D. (2016): Endogenous Bioactive Jasmonate Is Composed of a Set of (+)-7-iso-JA-Amino Acid Conjugates. *Plant Physiology* **172**, 2154-2164.
- Yu X.C., Li M.J., Gao G.F., Feng H.Z., Geng X.Q., Peng C.C., Zhu S.Y., Wang X.J., Shen Y.Y., Zhang D.P. (2006): Abscisic Acid Stimulates a Calcium-Dependent Protein Kinase in Grape Berry. *Plant Physiology* **140**, 558-579.
- Zhang H., Liu Y., Wen F., Yao D., Wang L., Guo J., Ni L., Zhang A., Tan M., Jiang M. (2014): A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany* **65**, 5795-5809.

- Zhang H., Tan G., Yang L., Yang J., Zhang J., Zhao B. (2009): Hormones in the grains and roots in relation to post-anthesis development of inferior and superior spikelets in japonica/indica hybrid rice. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 195-204.
- Zhang K., Halitschke R., Yin C., Liu C.J., Gan S.S. (2013): Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 14807-14817.
- Zhang R., Wang B., Ouyang J., Li J., Wnag Y. (2008): *Arabidopsis* indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1070-1077.
- Zhao Y. (2018): Essential Roles of Local Auxin Biosynthesis in Plant Development and in Adaptation to Environmental Changes. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 417-435.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

12-OH-JA	kyselina 12-hydroxyjasmonová
2MeSCKs	2-methylthiocytokininy
2MeStZ	2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin
2MeStZR	2-methylthio- <i>trans</i> -zeatin ribosid
2MeScZ	2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin
2MeScZR	2-methylthio- <i>cis</i> -zeatin ribosid
2MeSiP	2-methylthioisopentenyladenin
2MeSiPR	2-methylthioisopentenyladenosin
7'-OH-ABA	kyselina 7-hydroxyabscisová
9,10-dh-JA	9,10-dihydrojasmonová kyselina
μSPE-PT	extrakce na pevné fázi s použitím špiček pipet plněných sorbentem
ABA	kyselina abscisová
ANT	kyselina anthranilová
C18	SPE sorbent s oktadecylovými zbytky vázanými na silikagelový nosič
<i>cis</i> -OPDA	kyselina <i>cis</i> -(+)-12-oxofytodienová
CK	cytokininy
CKX	cytokininoxidasa/dehydrogenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
<i>cZROG</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
<i>cZ7G</i>	<i>cis</i> -zeatin-7-glukosid
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
č. h.	čerstvá hmota
DHZ	dihydrozeatin
DHZ7G	dihydrozeatin-7-glukosid
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid
DHZOG	dihydrozeatin- <i>O</i> -glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DHZROG	dihydrozeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DMAPP	dimethylallylpyrofosfátu
DPA	kyselina dihydrofazeová
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
HLB	typ SPE sorbentu (kopolymer divynylbenzenu s <i>N</i> -vinylpyrolidonem)
IAA	kyselina indol-3-ylacetylová
IAA _{la}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)alanin
IAA _{sp}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)aspartát
IAD	indol-3-ylacetaldehyd
IAG _{lu}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)glutamát
IAG _{ly}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)glycin
IAL _{eu}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)leucin
IAM	indol-3-ylacetamid
IAN	indol-3-ylacetonitril
IAO _x	indol-3-ylacetaldoxim
IAP _{he}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)fenylalanin
IAT _{rp}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)tryptofan
IAV _{al}	<i>N</i> -(indol-3-ylacetyl)valin
IBA	kyselina indol-3-ylmásečná
IDP	isopentenyl difosfát
iP	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin
iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid

iP7G	isopentenyladenin-7-glukosid
iPR	isopentenyladenosin
iPRDP	isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPRMP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát
iPRTP	isopentenyladenosin-5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IPyA	kyselina indol-3-ylpyrohroznová
JA	kyselina jasmonová
JA-Ile	jasmonoyl-isoleucin
JA-Me	methylester kyseliny jasmonové
JA-Phe	jasmonoyl-fenylalanin
JA-Trp	jasmonoyl-tryptofan
JA-Val	jasmonoyl-valin
LC	kapalinová chromatografie
MVA	mevalonát
MS	hmotnostní spektrometrie
NPA	kyselina neofazeová
oxIAA	kyselina 2-oxindol-3-ylactová
PA	kyselina fazeová
PAA	kyselina fenylactová
PAL	fenylalanin-amoniaklyasa
SA	kyselina salicylová
SDB-XC	kopolymerní SPE sorbent skládající se z jednotek styrenu a divinylbenzenu
SPE	extrakce na pevné fázi
StageTip	S Top And Go Extraction Tip
Tra	tryptamin
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
<i>tZROG</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid

8 PŘÍLOHY

Příloha 1 Endogenní hladiny rostlinných hormonů ve vybraných vývojových stádiích *Arabidopsis thaliana* (pmol/g č. h.; průměr ± směř. odchylka; n = 5).

Analyt	4 denní	7 denní	10 denní	14 denní
1 fZ	0,98 ± 0,07	0,64 ± 0,04	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,06
2 fZR	3,11 ± 0,42	1,10 ± 0,12	0,72 ± 0,05	0,67 ± 0,04
3 fZOG	4,76 ± 0,38	7,25 ± 1,20	4,91 ± 0,43	5,06 ± 0,63
4 fZROG	0,74 ± 0,07	1,77 ± 0,10	0,81 ± 0,11	0,60 ± 0,06
5 fZ7G	15,73 ± 1,15	27,53 ± 0,51	22,78 ± 0,98	23,63 ± 0,34
6 fZ9G	6,06 ± 0,27	11,07 ± 0,65	10,37 ± 0,50	9,46 ± 0,57
7 cZ	0,41 ± 0,07	0,17 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,27 ± 0,06
8 cZR	0,98 ± 0,14	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,01
9 cZOG	<i>n.d.</i>	1,35 ± 0,08	0,93 ± 0,10	1,92 ± 0,10
10 cZROG	0,76 ± 0,11	1,24 ± 0,20	1,23 ± 0,07	2,64 ± 0,17
11 cZ7G	7,32 ± 0,46	6,32 ± 0,75	4,79 ± 0,20	5,54 ± 0,12
12 cZ9G	0,63 ± 0,06	1,19 ± 0,18	0,69 ± 0,15	0,53 ± 0,06
13 DHZ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
14 DHZR	32,21 ± 5,71	3,94 ± 1,25	1,76 ± 0,63	1,28 ± 0,28
15 DHZOG	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
16 DHZROG	0,55 ± 0,15	0,75 ± 0,10	0,33 ± 0,08	0,37 ± 0,05
17 DHZ7G	4,28 ± 0,94	7,01 ± 1,25	7,31 ± 1,02	6,29 ± 0,41
18 DHZ9G	0,23 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02
19 iP	1,06 ± 0,33	0,75 ± 0,14	0,69 ± 0,17	0,47 ± 0,10
20 iPR	0,64 ± 0,11	0,67 ± 0,12	0,36 ± 0,04	0,37 ± 0,06
21 iP9G	1,17 ± 0,15	1,44 ± 0,10	1,43 ± 0,16	1,26 ± 0,09
22 iP7G	28,04 ± 1,71	27,97 ± 1,53	19,09 ± 2,07	14,88 ± 1,11
23 2MeScZ	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
24 2MeScZR	0,93 ± 0,06	0,36 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,29 ± 0,02
25 2MeSiP	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
26 2MeSiPR	0,20 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
27 IAA	106,48 ± 21,60	218,20 ± 51,41	169,36 ± 18,47	174,05 ± 24,20
28 oxIAA	2802,59 ± 492,80	1750,46 ± 288,90	1042,03 ± 88,10	1082,06 ± 258,23
29 IAAla	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
30 IAAsp	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
31 IAGlu	29,00 ± 4,46	35,84 ± 1,49	23,45 ± 2,10	20,35 ± 2,91
32 IAGly	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
33 IALeu	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
34 IAPhe	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
35 IAVal	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
36 IATrp	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
37 IBA	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
38 ABA	0,14 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,20 ± 0,05	0,53 ± 0,14
39 7'-OH-ABA	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
40 PA	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
41 DPA	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
42 neoPA	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
43 JA	8,57 ± 0,31	8,21 ± 0,73	4,12 ± 0,50	9,40 ± 2,49
44 JA-Ile	32,21 ± 5,71	3,94 ± 1,25	1,76 ± 0,63	1,28 ± 0,28
45 JA-Val	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
46 JA-Phe	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
47 JA-Trp	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
48 12-OH-JA	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
49 9,10-dh-JA	17,00 ± 8,58	17,05 ± 3,18	22,19 ± 6,40	28,62 ± 6,90
50 SA	14,33 ± 4,22	14,96 ± 2,73	24,44 ± 3,92	36,18 ± 4,69

n.d. - nedetekováno