

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



**Optimalizace extrakčního a purifikačního protokolu vybraných rostlinných
hormonů**

Bakalářská práce

Autor:	Anna Valníčková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Valníčková
Název práce	Optimalizace extrakčního a purifikačního protokolu vybraných rostlinných hormonů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Bakalářská práce je zaměřena na optimalizaci protokolů extrakce a izolace u vybraných fytohormonálních skupin, konkrétně cytokininů, auxinů a kyseliny abscisové. Extrakční a purifikační protokoly byly studovány z hlediska vybraných parametrů, které mohou ovlivňovat výsledek stanovení rostlinných hormonů (např. extrakční objem, složení extrakčních činidel). Dále byla porovnávána konvenční metoda extrakce na pevné fázi s inovativním disperzivním uspořádáním. Pro stanovení fytohormonů byla použita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) a získané výsledky byly hodnoceny z hlediska celkového profilu výše uvedených fytohormonálních skupin. Na základě získaných výsledků byl vyhotoven optimalizovaný protokol extrakce a izolace vybraných rostlinných hormonů pro rutinní práce v laboratoři.</p>
Klíčová slova	Extrakce, purifikace, extrakce na tuhé fázi (SPE), rostlinné hormony, kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS)
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Anna Valníčková
Title of thesis	Optimization of extraction and purification protocol of selected plant hormones
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Assoc. Prof. Ondřej Novák, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>The bachelor thesis is focused on optimization of extraction and isolation of selected phytohormonal groups, namely cytokinins, auxins, and abscisic acid. Extraction and purification protocols have been studied for selected parameters (e.g., extraction volume, extraction solvent composition) that may influence the results of plant hormone determination. Furthermore, conventional solid-phase extraction was compared with an innovative dispersive approach. For the determination of phytohormones, ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was used and the results were evaluated for the overall phytohormone profiles. Based on the results, an optimized protocol for extraction and isolation of selected plant hormones was prepared for routine work in the laboratory.</p>
Keywords	Extraction, purification, solid-phase extraction (SPE), plant hormones, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

podpis.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za jeho čas, cenné rady a hlavně za ochotný přístup. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Ivanu Petříkovi za jeho ochotu a nedocenitelnou pomoc při praktické části. Mé poděkování také patří všem pracovníkům z Laboratoře růstových regulátorů, kteří mi neváhali pomoci při práci v laboratoři. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu a trpělivost.

Tato diplomová práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2019_018).

OBSAH

Seznam zkratk	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Cytokininů	12
2.1.1 Historie cytokininů	12
2.1.2 Fyziologické účinky cytokininů	14
2.1.2.1 Regulace buněčného dělení	14
2.1.2.2 Regenerace orgánů	15
2.1.2.3 Apikální dominance a růst laterálních pupenů	15
2.1.2.4 Oddálení senescence	15
2.1.3 Biosyntéza cytokininů	15
2.1.4 Metabolismus cytokininů	17
2.1.4.1 Modifikace adeninového skeletu	17
2.1.4.2 Glukosylace	18
2.1.4.3 Modifikace postranního řetězce	18
2.1.4.4 Degradace	18
2.2 Auxiny	19
2.2.1 Fyziologické účinky auxinů	20
2.2.2 Biosyntéza indol-3-ylactové kyseliny	20
2.2.2.1 I _{Py} A dráha	21
2.2.2.2 TAM dráha	22
2.2.2.3 IAM dráha	22
2.2.2.4 IAOx dráha	22
2.2.3 Metabolismus indol-3-ylactové kyseliny	23
2.3 Kyselina abscisová	23
2.3.1 Fyziologické účinky kyseliny abscisové	24
2.3.2 Biosyntéza kyseliny abscisové	24
2.3.3 Metabolismus kyseliny abscisové	25
2.4 Stanovení rostlinných hormonů	26
2.4.1 Metody extrakce a izolace vybraných fytohormonálních skupin	26
2.4.2 Analýza fytohormonů pomocí hmotnostní spektrometrie	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Použité chemikálie	30

3.2	Použitý materiál	31
3.3	Použité přístrojové vybavení	31
3.4	Metody.....	32
3.4.1	Příprava kultivačního média	32
3.4.2	Optimalizace extrakčního činidla.....	32
3.4.3	Optimalizace extrakční kapacity	34
3.4.4	Optimalizace množství nanášeného vzorku	34
3.4.5	Disperzivní SPE ve mikrozkušavce.....	35
3.4.6	Disperzivní SPE na mikrospin filtru	36
3.4.7	LC-MS/MS analýza	37
3.4.7.1	UHPLC-MS/MS analýza cytokininů	37
3.4.7.2	UHPLC-MS/MS analýza auxinů a kyseliny abscisové	37
4	VÝSLEDKY.....	39
4.1	Optimalizace extrakčního činidla.....	39
4.2	Optimalizace extrakční kapacity	40
4.3	Optimalizace množství nanášeného vzorku.....	41
4.4	Disperzivní SPE ve zkumavce	43
4.5	Disperzivní SPE na mikrospin filtru	45
5	DISKUZE.....	46
6	ZÁVĚR.....	48
7	SEZNAM LITERATURY	49

Seznam zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
4-Cl-IAA	kyselina 4-chloridol-3-yloctová
ABA	kyselina abscisová
ABA-GE	glukosylester kyseliny abscisové
ADK	adenosinkinasa
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APT	adeninfosforibosyltransferasa
AtDAO	<i>Arabidopsis</i> dioxygenasa pro oxidaci auxinu
ATP	adenosintrifosfát
B	cytokininové báze
BA	benzyladenin
BB	Bielecki pufr
Cdc2	cell division cycle 2
Cdc25-fosfatasa	enzym, odstraňující inhibiční fosfátovou skupinu z Cdc2 kinasy
CDK	cyklin-dependentní kinázy
CKs	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa/oxidasa
Col-0	ekotyp Columbia
CycD3	gen kódující cykliny typu D
CYP735A	cytochrom P450 monooxygenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
č. h.	čerstvá hmota
DMAPP	dimethylallyl difosfát
DPA	kyselina dihydrofaseová
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FAB	ionizace bombardováním urychlenými atomy
FDP	farnesyl difosfát
GC	plynová chromatografie
GH3	GRETCHEN HAGEN 3

HMBDP	hydroxymethylbutenyl difosfát
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií
IAA	kyselina indol-3-ylactová
IAM	indol-3-ylacetamid
IAN	indol-3-ylacetonitril
IAOx	indol-3-ylacetaldoxim
IBA	kyselina indol-3-ylmásečná
IGP	indol-3-ylglycerol fosfát
ILR1	IAA-LEUCIN RESISTANT
iP	isopentenyladenin
IPA	indol-3-ylpyrohroznová kyselina
IPP	isopentenyl difosfát
iPR	isopentenyladenosin
iPRDP	isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPRMP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát
iPRTP	isopentenyladenosin-5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IPyA	kyselina indol-3-ylpyrohroznová
IS	izotopicky značené standardy
K	kinetin
LC	kapalinová chromatografie
LLE	kapalina-kapalina extrakce
LOG	“LONELY GUY”, fosforibohydrolasa
MCX	multimodální sorbent, kombinace reverzní fáze a kationtového iontoměniče
MeOH	methanol
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS médium	médium podle Murashigeho & Skooga
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mT	<i>meta-topolin</i>
MVA	kyselina mevalonová
NAA	kyselina α -naftyloctová
NCED	9- <i>cis</i> -epoxykarotenoid-dioxygenasa

NT	cytokininové nukleotidy (ribotidy)
OG	cytokininové <i>O</i> -glykosidy
oxIAA	2-oxoindol-3-ylactová kyselina
PA	kyselina fasetová
PAA	kyselina fenylactová
Q-IT	kvadrupólová iontová past
QqQ	trojitý kvadrupól
RISR	relativní odezva vnitřního standardu
SPE	extrakce na pevné fázi
TAA1	tryptofan aminotransferasa
TAM	tryptaminová dráha
TAR1, TAR2	homology tryptofan aminotransferasy
TD	tryptofan-dependentní dráha
TDC	tryptofan dekarboxylasa
TDPG	uridintrifosfátglukosa
TI	tryptofan-nezávislá dráha
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
Trp	L-tryptofan
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
UDPG	uridindifosfátglukosa
UDPX	uridindifosfátxylosa
UGT	uridin 5'-difosfo-glukosyltransferasa
UHPLC-MS/MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
YUCCA	enzym monooxydasa
ZEP	zeaxanthinová epoxidasa
ZOG	<i>O</i> -glukosyltransferasa

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Látky, které regulují růstové a vývojové procesy prostřednictvím specifických signálních drah, nazýváme růstové regulátory. Tento název je však obecný a neodlišuje přirozené látky a synteticky připravené. Přirozené regulátory se dělí do dvou skupin: rostlinné hormony (fytohormony) a další látky s regulační aktivitou (Procházka et al., 1998).

Rostlinné hormony se vyskytují obvykle ve velmi nízkých koncentracích v rostlinných tkáních na rozdíl od interferujících látek, které se vyskytují ve vyšších koncentracích (Tarkowská et al., 2014).

Fytohormony ovlivňují fyziologické procesy v rostlinách, zejména jejich růst a vývoj. Jedná se např. o ovlivňování růstu jednotlivých částí rostlin, senescence, reakce na environmentální podněty, dělení buněk a pletiv, klíčení semen atd. Tyto procesy může ovlivňovat více skupin fytohormonů dohromady nebo jednotlivé skupiny individuálně. (Procházka et al., 1998; Tarkowská et al., 2014). Do nedávna bylo známo pět skupin rostlinných hormonů: cytokininy, auxiny, gibereliny, etylen a kyselina abscisová. Následně byly objeveny další čtyři skupiny, které vykazují regulující růstovou aktivitu: brassinosteroidy, kyselina jasmonová, kyselina salicylová a strigolaktony (Tarkowská et al., 2014).

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena zejména na cytokininy, auxiny a kyselinu abscisovou. Praktická část bakalářské práce je věnována především extrakci a purifikaci vybraných fytohormonů pomocí moderních izolačních technik. Experimenty byly provedeny dle dříve publikovaných návodů a následně optimalizovány z hlediska extrakčního objemu a složení extrakčního činidla. Dále byly porovnávány dvě metody purifikace rostlinných hormonů pomocí extrakce na pevné fázi za účasti multimodálního sorbentu v disperzivním a konvenčním kolonkovém uspořádání. Cílem bylo srovnat efektivitu metod, časové a cenové provedení daných postupů a následné usnadnění práce v laboratoři.

Stanovené cíle této práce byly:

- Vypracovat odbornou rešerši týkající se problematiky rostlinných hormonů, jejich biosyntézy, metabolismu, metod izolace a purifikace vybraných fytohormonů z rostlinné matrice a využití hmotnostní spektrometrie při studiu rostlinných hormonů.
- Experimentální ověření účinnosti a funkčnosti metod používaných pro extrakci a izolaci vybraných rostlinných hormonů ze skupiny cytokininů, auxinů a kyseliny abscisové. Na základě získaných výsledků vytvořit optimalizovaný protokol extrakce a izolace vybraných rostlinných hormonů pro rutinní práce v laboratoři.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cytokininy

Cytokininy (CKs) jsou významnou třídou rostlinných hormonů, které v interakci s jinými hormony, zejména auxiny, kontrolují dělení buněk, a podílí se na mnoha dalších základních biologických procesech, včetně senescence listů (Kamínek 2015). Jedná se o evolučně staré a vysoce konzervované molekuly s nízkou hmotností, identifikované v mnoha organismech (Spíchal 2012). Interakci cytokinin-receptor může ovlivňovat mnoho strukturálních změn, přítomnost hydroxylové skupiny, dvojných vazeb (Spíchal et al., 2004; Werner a Schmölling 2009).

Přírozně vyskytující se cytokininy jsou deriváty adeninu (Mok a Mok 2001), které se liší substituentem v poloze N⁶ (Obr. 1). V rostlinách se vyskytují jako volné báze, nukleosidy, glykosidy (*O*- a *N*-glykosidy) a nukleotidy (Mok a Mok 2001; Sakakibara 2006). Isoprenoidní cytokininy mohou mít v poloze N⁶ nasycené i nenasycené postranní řetězce a hydroxylovou skupinu. Druhou skupinou jsou cytokininy nesoucí aromatický postranní řetězec, substituovaný v různých polohách aromatického kruhu adeninu (Spíchal 2012). Do skupiny aromatických cytokininů řadíme například kinetin (K), N⁶-benzyladenin (BA) a jeho hydroxylové deriváty (topoliny) a methoxyderiváty (Strnad, 1997; Tarkowská et al., 2003). Přírodní aromatické cytokininy byly objeveny pouze u některých druhů rostlin jako je topol (*Populus × canadensis*) (Tarkowská et al., 2003).

Kromě přírozně se vyskytujících CKs je známa i skupina jejich syntetických derivátů odvozených od močoviny a thiomčoviny (Lomin et al., 2012). Např. u derivátu fenyльмоčoviny thidiazuronu bylo prokázáno, že také vykazuje cytokininovou aktivitu. I přes rozdílnou strukturu, vykazují jak cytokininy adeninového typu, tak i cytokininy fenyльмоčoviny, cytokininovou aktivitu v různých testech a jsou rozpoznávány cytokininovými receptory (Mok 2005; Spíchal et al., 2004; Yamada et al., 2001).

2.1.1 Historie cytokininů

První experimentální důkazy pro chemickou kontrolu dělení rostlinných buněk poskytl Haberlandt v roce 1913, který prokázal, že floémová míza může způsobit u buněk diferencovaného bramborového parenchymu indukci dělení, jako je tomu v meristému. Jak víme dnes, příčinou indukce byla látka obsažená ve floému (Haberlandt, 1913). Na práci Haberlandta navázal Philip White, který zjistil, že kokosové mléko indukuje na kultivačním médiu tvorbu kalusu, čímž dokázal přítomnost biologicky aktivní látky (Caplin a Steward, 1948).

Základní struktura	R ₁	R ₂	R ₃	Název	Zkratka
	H	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin	iP
	<i>N</i> 9-R	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin	iPR
	<i>N</i> 7-G	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-7-glukosid	iP7G
	<i>N</i> 9-G	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-9-glukosid	iP9G
	<i>N</i> 9-RP	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin-5-monofosfát	iPMP
	H	H	H	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	<i>N</i> 9-R	H	H	<i>trans</i> -zeatin ribosid	tZR
	<i>N</i> 7-G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid	tZ7G
	<i>N</i> 9-G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid	tZ9G
	H	G	G	<i>trans</i> -zeatin O-glukosid	tZOG
	<i>N</i> 9-R	G	G	<i>trans</i> -zeatin ribosid O-glukosid	tZROG
	<i>N</i> 9-RP	H	H	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5-monofosfát	tZMP
	H	H	H	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	R	H	H	<i>cis</i> -zeatin ribosid	cZR
	<i>N</i> 9-G	H	H	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid	cZ9G
	H	G	G	<i>cis</i> -zeatin O-glukosid	cZOG
	<i>N</i> 9-R	G	G	<i>cis</i> -zeatin ribosid O-glukosid	cZROG
	<i>N</i> 9-RP	H	H	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5-monofosfát	cZMP
	H	H	H	dihydrozeatin	DHZ
	<i>N</i> 9-R	H	H	dihydrozeatin ribosid	DHZR
	<i>N</i> 9-G	H	H	dihydrozeatin-9-glukosid	DHZ9G
	H	G	G	dihydrozeatin O-glukosid	DHZOG
	<i>N</i> 9-R	G	G	dihydrozeatin ribosid-O-glukosid	DHZROG
	<i>N</i> 9-RP	H	H	dihydrozeatin ribosid-5-monofosfát	DHZMP
	H	-	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin	BA
	<i>N</i> 9-R	-	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenosin	BAR
	<i>N</i> 7-G	-	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin-7-glukosid	BA7G
	<i>N</i> 9-G	-	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin-9-glukosid	BA9G
	<i>N</i> 9-RP	-	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenosin-5-monofosfát	BAMP
	H	-	-	<i>ortho</i> -topolin	oT
	<i>N</i> 9-R	-	-	<i>ortho</i> -topolin ribosid	oTR
	<i>N</i> 9-G	-	-	<i>ortho</i> -topolin-9-glukosid	oT9G
	H	-	-	<i>meta</i> -topolin	mT
	<i>N</i> 9-R	-	-	<i>meta</i> -topolin ribosid	mTR
	<i>N</i> 9-G	-	-	<i>meta</i> -topolin-9-glukosid	mT9G
	H	-	-	<i>para</i> -topolin	pT
	<i>N</i> 9-R	-	-	<i>para</i> -topolin ribosid	pTR
	<i>N</i> 9-G	-	-	<i>para</i> -topolin-9-glukosid	pT9G
	H	-	-	kinetin	K
	<i>N</i> 9-R	-	-	kinetin ribosid	KR
	<i>N</i> 9-G	-	-	kinetin-9-glukosid	K9G

Obr. 1. Názvy, struktury a zkratky isoprenoidních a aromatických cytokininů (upraveno podle Svačinová et al., 2012; vzorce vytvořeny v programu ChemDraw). H = vodík, R = β -ribofuranosyl, G = β -D-glukopyranosyl, RP = β -D-ribofuranosyl-5'-monofosfát.

V 50. letech 20. století se problematikou indukce dělení buněk zabýval tým profesora Skooga z Wiskonsinu. V roce 1956 byly vyizolovány z autoklávované DNA sledího spermatu krystaly vysoce účinné látky z hlediska regulace buněčného dělení, které byly identifikovány jako adeninový derivát N⁶-furfurylaminopurin (Miller et al., 1955). Vzhledem k tomu, že sloučenina vyvolala buněčné dělení, označil Miller a Skoog látku jako kinetin (odvozeno od slova *kinesis* = dělit se). V roce 1965 byl pro označení látek indukujících dělení zaveden termín cytokinin.

Objev kinetinu a jeho účinek na buněčné dělení motivoval rostlinné fyziology, aby se zaměřily na přirozeně se vyskytující cytokininy. V roce 1963 uvedl Letham izolaci purinu s vlastnostmi kinetinu z mladých, rozvíjejících se kukuřičných plodů a semen. Tato látka byla charakterizována jako 6-(4-hydroxy-3-methyl-*trans*-2-butenylamino)purin, který dostal triviální název *trans*-zeatin (*tZ*) (Letham, 1963, 1973). Od objevu zeatinu byla izolována a identifikována řada dalších přirozeně se vyskytujících cytokininů (Hopkins a Huner 2008; Obr. 1).

2.1.2 Fyziologické účinky cytokininů

Cytokininy stimulují nebo inhibují řadu metabolických, biochemických, fyziologických a vývojových procesů. Původně byly objeveny pouze jako faktor buněčného dělení. Kromě buněčného dělení ovlivňují cytokininy např. apikální dominanci, senescenci, buněčnou diferenciaci a další důležité procesy (Davies 2004; Taiz a Zeiger 2002).

Velký přínos pro studium cytokininů byl objev genu *isopentenyltransferasy (ipt)* v Ti- plazmidech rostlinné patogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, díky kterému mohli vědci studovat úlohu cytokininů ve vývoji rostlin (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984). Rostlinný *ipt* gen byl poprvé objeven v genomu *Arabidopsis thaliana*, kde je kódováno devět genů *AtIPT1* až *AtIPT9*. Navíc byla ukázána podobnost s bakteriálními *ipt* geny (Kakimoto 2001; Takei 2001).

2.1.2.1 Regulace buněčného dělení

Spolu s auxiny představují cytokininy nejvýraznější skupinu rostlinných hormonů regulujících buněčné dělení (Davies 2004). Vysoké koncentrace cytokininů nacházíme ve všech intenzivně se dělících pletivech (Procházka et al., 1998). Hladiny *tZ* bývají nejvyšší v přechodu z G2 fáze na M fázi (Laureys et al., 1998).

Obě skupiny hormonů, auxiny i cytokininy, řídí aktivitu enzymů cyklin-dependentních kináz (CDK). Exprese genu *Cdc2 (cell division cykle 2)* kódující hlavní CDK je regulována auxinem. CDK indukovaná auxinem je však neaktivní a neumožňuje dělení buněk.

K aktivaci je nutná přítomnost cytokininu, který aktivuje Cdc25-fosfatasy, která odstraní inhibiční fosfátovou skupinu z Cdc2 kinázy (Zhang et al., 1996). Cytokininy zvyšují expresi genu *CYCD3*, který kóduje cykliny typu D, ty regulují průchod restričním bodem buněčného cyklu v G1 (Taiz a Zeiger 2002).

2.1.2.2 Regenerace orgánů

Spojení cytokininů a auxinů je základem regeneračních procesů *in vitro* a *in vivo* po poranění rostliny. Důležité je, v jakém poměru se skupiny hormonů vyskytují. Pokud jsou koncentrace hormonů vyrovnané a obě koncentrace dosahují vysokých hladin, dochází ke vzniku kalusu. Pokud jsou v nadbytku cytokininy, dochází k regeneraci prýtu a zvýšená koncentrace auxinů podporuje růst kořenů (Skoog a Miller, 1957).

2.1.2.3 Apikální dominance a růst laterálních pupenů

Apikální dominance je určena především přítomností auxinů. Na rozdíl od auxinů, cytokininy potlačují apikální dominanci. Cytokininy stimulují růst a zakládání pupenů (Procházka et al., 1998). Přímá aplikace cytokininů do axilárních pupenů stimuluje aktivitu buněčného dělení a růst pupenů (Skoog a Thimann, 1934).

2.1.2.4 Oddálení senescence

Programovaný proces stárnutí je nazýván senescence. Senescentní listy ztrácejí chlorofyl, RNA, lipidy, bílkoviny. Stárnutí listů probíhá rychleji ve tmě než ve světle.

Cytokininy mohou senescenci oddalovat (Mok a Mok, 2001). Po nanesení cytokininů přímo na intaktní rostlinu zůstane ošetřená část zelená, na rozdíl od ostatních neošetřených částí. Cytokininy ale nezabrání senescenci dlouhodobě. Vyšší koncentrace cytokininů je přítomna v mladých listech, zralé listy neprodukují tolik cytokininů a jsou tedy závislé na cytokininech produkovaných kořeny (Taiz a Zeiger, 2002).

2.1.3 Biosyntéza cytokininů

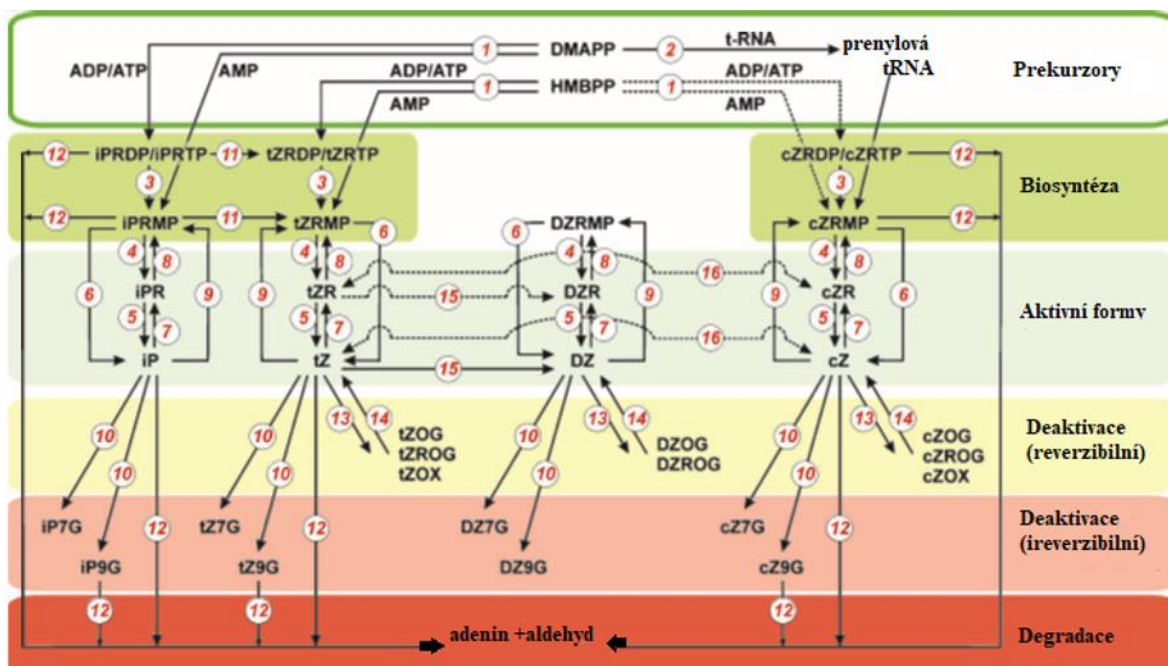
Existují dvě cesty biosyntézy isoprenoidních cytokininů (Obr. 2): první nepřímá cesta je odvozena od degradace transferové ribonukleové kyseliny (tRNA) a druhá přímá cesta odvozena od isopentenylace volných adeninových nukleotidů (Davies, 2004).

Prvním krokem biosyntézy je přidání prenylové skupiny dimethylallyl difosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyl difosfátu (HMBDP) na adenosinmonofosfát (AMP), adenosindifosfát (ADP) nebo adenosintrifosfát (ATP) za katalýzy isopentenyltransferasy (IPT) (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001). Následně dochází ke vzniku primárních produktů

isopentenyladenosin-5-(mono, di, tri)fosfátu (iPRMP, iPRDP, iPRTP) (Taiz a Zeiger, 2010). Ty jsou následně konvertovány hydroxylací isoprenoidního postranního řetězce pomocí cytochromu P450 monooxygenázy CYP735A na *tZ* (Takei et al., 2004).

Druhá cesta je založena na tom, že některé molekuly tRNA obsahují v místě sousedícím s antikodonem isopentenyladenosin (iPR) nebo derivátový zbytek. Prvním krokem je isopentenylace zbytku adeninu tRNA katalyzovaná IPT. Bylo zjištěno, že při degradaci tRNA dochází k produkci aktivních cytokininů. V rostlinných tRNA bylo nalezeno mnoho sloučenin, mezi nimi *cis*-zeatin ribosid (*cZR*) a *trans*-zeatin ribosid (*tZR*), přičemž *cZR* se vyskytuje častěji. Vyšší výskyt *cZR* naznačuje, že cytokininy *cis*-zeatinového-typu pravděpodobně pocházejí z degradace tRNA (Davies, 2004). Tato cesta není hlavním zdrojem cytokininů, dochází ke konverzi *cZ* a *tZ*, reakce je katalyzována údajně zeatin isomerasou. Existence enzymu však nebyla potvrzena (Hluska et al., 2017).

U aromatických cytokininů není biosyntéza úplně objasněna. Z aromatických cytokininů má *meta*-topolin (*mT*) nejvyšší aktivitu, avšak u rostlin se nejčastěji vyskytuje



Obr. 2. Schéma biosyntézy, metabolismu a degradace cytokininů v rostlinách (upraveno podle Spíchal, 2012). Přerušované čáry ukazují dráhy, které ještě nebyly dostatečně prozkoumány. Červeným číslem jsou označeny enzymy katalyzující reakce. (1) adenylát isopentenyltransferasa; (2) tRNA-isopentenyltransferasa; (3) fosfatasa; (4) 5'-ribonukleotid fosfohydrolasa; (5) adenosin nukleosidasa; (6) cytokinin fosforibohydrolasa 'Lonely guy'; (7) purin nukleosidfosforylaza; (8) adenosinkinasa; (9) adenin fosforybosyl-transferasa; (10) *N*-glukosyltransferasa; (11) cytochrom P450 monooxygenasa; (12) cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKX); (13) zeatin-*O*-glukosyltransferasa/zeatin-*O*-xylosyltransferasa; (14) β -glukosidasa; (15) zeatin reduktasa; (16) zeatin izomerasa; DMAPP: dimethylallylpyrofosfát; HMBPP: 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl difosfát; iPRDP: *N*⁶-isopentenyladenosin-5-difosfát; iPRTP: *N*⁶-isopentenyladenosin-5-trifosfát; iPRMP: *N*⁶-isopentenyladenosin-5-monofosfát; iPR: *N*⁶-isopentenyladenosin; iP7G: *N*⁶-isopentenyladenosin-7-glukosid; iP9G: *N*⁶-isopentenyladenosin-9-glukosid; iP: *N*⁶-isopentenyladenin, podobně pro *trans/cis*-zeatin (*tZ/cZ*), dihydrozeatin (DZ), *tZOG*: *trans*-zeatin-*O*-glukosid; *tZROG*: *trans*-zeatin-*O*-glukosid-ribosid a podobně pro DZ a *cZ*; *tZOX*: *trans*-zeatin-*O*-xylosid; *cZOX*: *cis*-zeatin-*O*-xylosid.

ortho-topolin (*oT*) (Strnad, 1997). Biosyntéza aromatických cytokininů je alespoň částečně shodná s částí biosyntézy isoprenoidních cytokininů (Davies, 2004). Další zkoumanou drahou biosyntézy aromatických cytokininů je metabolismus fenolů. Vzhledem k tomu, že aromatické cytokininy mají benzylový postranní řetězec, je možné, že jsou syntetizovány touto cestou (Strnad, 1997).

2.1.4 Metabolismus cytokininů

Kromě biosyntézy jsou hladiny bioaktivních cytokininů v rostlinných buňkách regulovány metabolickými přeměnami. Jedná se o přeměny CK na inaktivní produkty degradace, skladovací formy cytokininů a sloučeniny vykazující modifikovanou cytokininovou aktivitu. Tyto změny mohou vést k reverzibilní nebo naopak nevratné ztrátě cytokininové aktivity. To přispívá ke snížení hladin aktivních cytokininů, volných bází. Ribosidy a ribotidy slouží jako skladovací nebo transportní formy (Lomin et al., 2015).

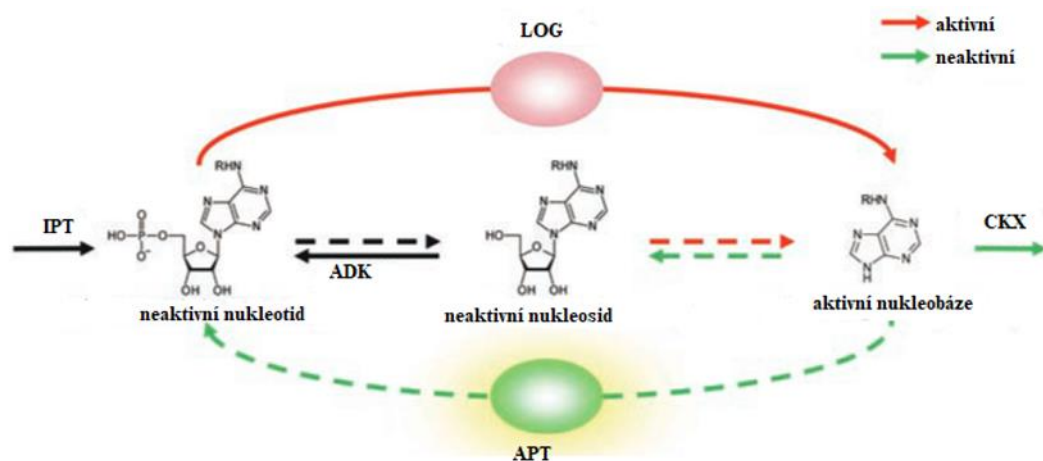
Existují dvě cesty metabolismu, první cesta je založena na modifikaci adeninového skeletu a druhá obsahuje enzymy ovlivňující postranní řetězec (shrnutí v Davies, 2004; Spíchal, 2012; Kamínek, 2015; Zürcher a Müller, 2016).

2.1.4.1 Modifikace adeninového skeletu

U různých druhů rostlin byly nalezeny enzymy rozpoznávající adenosin, které uskutečňují vzájemné přeměny volných bází, ribosidů a ribotidů (Obr. 3). Mezi tyto enzymy patří: 5'-nukleotidasa, adenosinnukleotidasa, adeninfosforibosyltransferasa (APT), adenosinkinasa (ADK) a nukleosidfosforylase (Spíchal, 2012).

Prvním krokem cytokinové aktivace je defosforylace katalyzovaná 5'-ribonukleotidfosfohydrolasou (5'-nukleotidasa), při které dochází k přeměně nukleotidů na nukleosidy. Následuje přeměna nukleosidů na volné báze za přítomnosti adenosinnukleasy. Zpětně mohou být volné báze přeměny na nukleosidy za katalýzy nukleosidfosforylasy, a poté na nukleotidy pomocí ADK (Sakakibara, 2004).

V roce 2007 byl objeven další specifický enzym, fosforibohydrolasa, pojmenován „LONELY GUY“ (LOG), který přímo přeměňuje neaktivní cytokininové nukleotidy na volné báze (Kurakawa et al., 2007). Role enzymu byla objasněna v *Arabidopsis* (Kuroha et al., 2009; Tokunaga et al., 2012). Opakem je APT, která převádí aktivní volné báze na neaktivní nukleotidy (Davies, 2004).



Obr. 3. Schéma metabolismu cytokininů, přeměny z aktivních forem na neaktivní a opačně (upraveno podle Zhang et al., 2013). Log enzymy převádí neaktivní nukleotidy rovnou na aktivní nukleobáze, APT enzymy naopak inaktivují aktivní nukleobáze na neaktivní nukleotidy. IPT: isopentenyltransferasa; ADK: adenosinkinasa; CKX: cytokinindehydrogenasa/oxidasa; LOG: fosforibohydrolasa; APT: adeninofosforibosyltransferasa.

2.1.4.2 Glukosylace

Cytokinininy podléhají *N*-glykosylaci v *N*-3, *N*-7 a *N*-9 polohách. Dochází k nevratnému převedení cytokininů do jejich neaktivní formy (Mok a Mok, 2001). Výjimku tvoří *N*-3 glukosidy, které mohou být přeměněny zpátky na volné báze za přítomnosti β -glukosidázy (Brzobohatý et al., 1993). Enzym podílející se na těchto změnách je glukosyltransferasa a využívá jako donory uridindifosfátglukózu (UDPG) a uridintrifosfátglukózu (UTPG) (Spíchal, 2012).

Dalším typem glykosylace, který ovlivňuje cytokininovou aktivitu, je *O*-glukosylace a *O*-xylosylace (Davies, 2004; Spíchal, 2012). Podílejí se na tom geny kódující *O*-glukosyltransferaszu (ZOG) a *O*-xylosyltransferasu. ZOG využívá jako donory UDPG a uridindifosfátxylózu (UDPX), kdežto *O*-xylosyltransferasa využívá jenom UDPX (Spíchal, 2012). Za přítomnosti enzymu β -glukosydázy mohou být *O*-glykosylované cytokinininy převedeny na aktivní formy (Brzobohatý et al., 1993).

2.1.4.3 Modifikace postranního řetězce

Mezi další důležitou modifikaci je hydroxylace postranního řetězce isopentenyladeninu (iP). Jedná se o důležitý krok biosyntézy *tZ*, který je katalyzován pomocí cytochromu P450 monooxygenázou CYP735A1 a CYP735A2 (Takei et al., 2004). K redukci dvojné vazby zeatinu dochází za katalýzy zeatinreduktasy, vzniká dihydrozeatin s nenasyceným *trans*-zeatinovým postranním řetězcem (Spíchal, 2012).

2.1.4.4 Degradace

Degradace cytokininů hraje důležitou roli v udržení homeostázy při akumulaci metabolitů cytokininů a jejich distribuci v rostlinách (Davies, 2004). Hladiny cytokininů

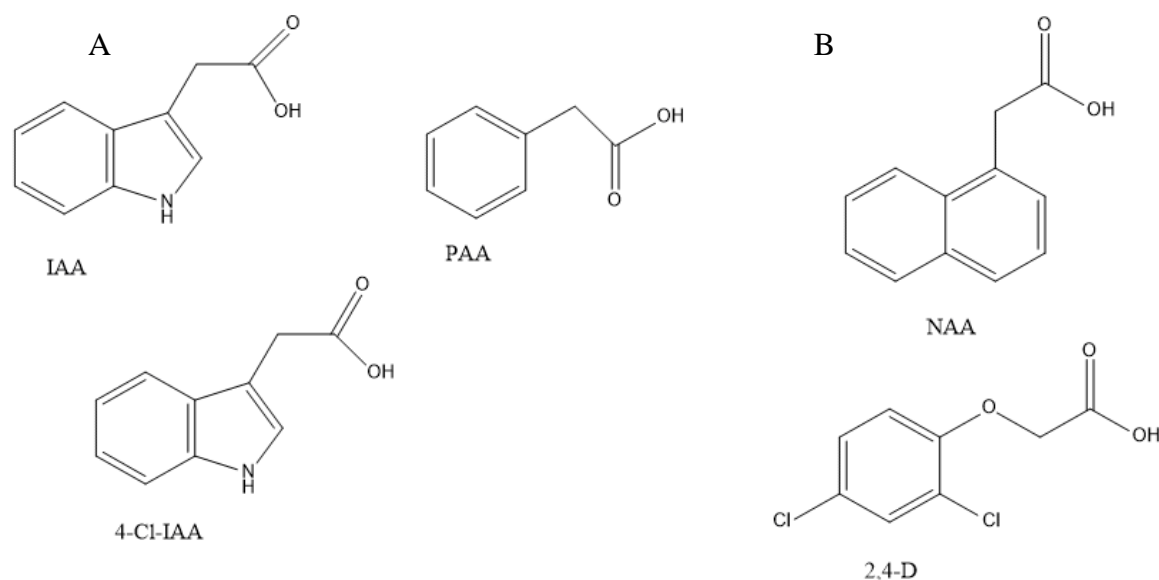
s nenasyceným řetězcem jako jsou *tZ*, *cis*-zeatin (*cZ*), *iP*, jejich ribosidy a ribotidy, *N7*- a *N9*- glykosidy jsou regulovány nevratným oxidačním štěpením N⁶ postranního řetězce. Nevratná degradační reakce je kontrolována pomocí cytokinindehydrogenasy/oxidasy (CKX) (Galuszka et al., 2007; Schmölling et al., 2003) za vzniku adeninu a příslušného aldehydu (Popelková et al., 2006). Bylo prokázáno, že i aromatické cytokininy jsou degradovány CKX, ale s nižší reakční rychlostí (Frébortová et al., 2004; Galuszka et al., 2007).

2.2 Auxiny

Prvním známým rostlinným hormonem je auxin (indol-3-ylctová kyselina, IAA). Existence auxinu byla prokázána ve dvacátých letech 20. století. V letech 1926-1928 F.W. Went prokázal, že špičky koleoptilí ovsa produkují látku difundující do agaru a stimulující prodlužovací růst (odtud odvozen název auxin, z řeckého *auxein* = růst, zvětšovat se).

Dlouho jediným známým přirozeným auxinem byla kyselina indolyl-3-octová (IAA). Dalším přirozeným auxinem je např. kyselina fenyloctová (PAA). Vyskytuje se v řádově vyšších koncentracích, ale její účinnost je nižší než účinnost IAA (Procházka et al., 1998). Mezi přirozené auxiny patří také kyselina 4-chlorindolyl-3-octová (4-Cl-IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA) a mnoho dalších (Korasick et al., 2013).

Kromě přirozených auxinů známe také skupinu syntetických auxinů (Obr. 4). Mají podobné vlastnosti jako přirozené auxiny. Mezi syntetické auxiny patří např. 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), kyselina α -naftyloctová (NAA) (Campanoni, 2005).



Obr. 4. Strukturální vzorce přirozených auxinů (A) a syntetických auxinů (B) (vytvořeno v programu ChemDraw).

2.2.1 Fyziologické účinky auxinů

Působení auxinů na rostlinný organismus je velmi dobře prostudováno. Auxiny, společně s cytokininy, jsou základní složkou pro tkáňové kultury (Procházka et al., 1998). Auxiny stimulují prodlužovací růst, apikální dominanci, tvorbu adventivních kořenů, dělení buněk, ovlivňují fototropismus a gravitropismus rostliny, dozrávání a růst plodů a mnoho dalších. Ve vysokých koncentracích mohou auxiny působit inhibičně na formování kořenů (Davies, 2004).

Jedním z výrazných účinků auxinů je stimulace tvorby kořenů. Jedná se o tvorbu adventivních kořenů (Procházka et al., 1998), způsobenou vysokou koncentrací auxinů. Laterální kořeny pocházejí z pericyklových buněk, které auxiny stimulují k dělení. Dělicí se buňky se postupně tvoří a usazují v kořenovém vrcholu. Laterální kořen poté roste přes kořenovou kůru a epidermis (Taiz a Zeiger, 2002).

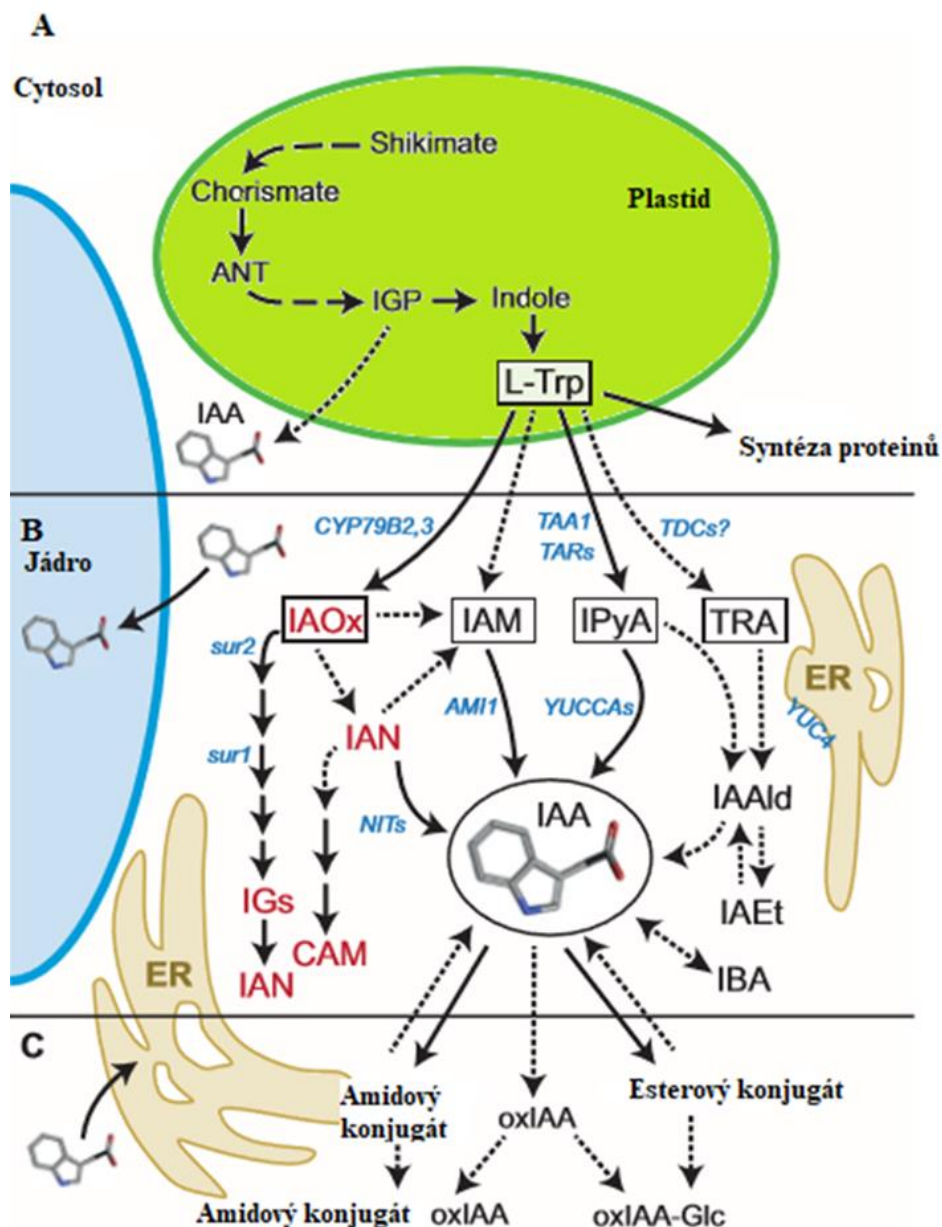
Existuje mnoho důkazů, že se auxin podílí na regulaci vývoje ovoce. Po oplodnění může růst ovoce být závislý na auxinu produkovaném ve vyvíjejícím se semeni. Endosperm zde přispívá auxinem pouze během počátečního stádia růstu (Taiz a Zeiger, 2002).

Ve druhé polovině 19. století Charles Darwin a jeho syn Francis provedli experiment zabývající se ohybem kořene způsobeném fototropismem. Dokázali, že místa vnímání a diferenciálního růstu jsou oddělené. Světelný signál, který způsobuje ohyb, byl přijímán na špičce, ale k ohybu docházelo pod špičkou na neosvětlené straně (Taiz a Zeiger, 2002).

2.2.2 Biosyntéza indol-3-yloctové kyseliny

Auxin je strukturou velmi blízké podobný tryptofanu, mnoho studií tedy vychází z předpokladu, že právě L-tryptofan (Trp) je prekurzorem biosyntézy IAA (Taiz a Zeiger, 2002). Pro syntézu auxinu v rostlinách existují dvě hlavní cesty (Obr. 5): na tryptofanu závislá dráha (TD, Trp-dependentní) a na tryptofanu nezávislá dráha (TI, Trp-independentní) (Di et al., 2015). Další možností biosyntézy auxinu je přeměna kyseliny indol-3-máselné (IBA) na IAA peroxizomální β -oxidací (Strader a Bartel, 2011). Avšak endogenní výskyt IBA je stále otázkou vědeckých diskuzí (Novák et al., 2012; Frick a Strader, 2018).

Předpokládá se, že TD dráhy jsou hlavní cesty biosyntézy IAA u rostlin. Je známa však i existence TI dráhy, jejímž prekurzorem je pravděpodobně indol-3-glycerol fosfát (IGP) (Ouyang et al., 2000). Avšak geny a enzymy podílející se na TI dráze jsou pořád málo prozkoumané, tudíž existence této dráhy jsou založeny především na studiích s použitím stabilních prekurzorů IAA (Normanly, Cohent a Fink, 1993; Wright et al., 1991). TD dráha byla rozlišena na čtyři různé dráhy podle zapojených prekurzorů: indol-3-ylacetamid (IAM),



Obr. 5. Metabolismus indol-3-yloctové kyseliny (IAA) v rostlinách (upraveno podle Ljung, 2013). (A) Biosyntéza prekurzorů IAA probíhající v plastidech, (B) dráhy biosyntézy IAA závislé na tryptofanu a (C) degradace a konjugace IAA. ANT: anthranilát; CAM: camalexin; Glc: glukóza; IAAld: indol-3-ylacetaldehyd; IAEt: indol-3-ylethanol; IAM: indole-3-ylacetamid; IAN: indol-3-ylacetonitril; IAOx: indol-3-ylacetaldoxim; IBA: indol-3-ylmásečná kyselina; IGP: indol-3-ylglycerolfosfát; IGs: indol glukosinolát; IPyA: indol-3-ylpyrohroznová kyselina; L-Trp: L-tryptofan; oxIAA: 2-oxoindol-3-yloctová kyselina; TRA: tryptamin. Enzymy a geny zapojené v biosyntéze IAA: AMI: amidasa; CYP79B: cytochrom P450 monooxygenasa; NIT: nitrilasa; SUR: superroot; TAA: tryptofan aminotransferasa u Arabidopsis; TAR: tryptofan aminotransferase related; TDC: tryptofan dekarboxylasa; YUCCA: flavin monooxygenasa.

kyselina indol-3-ylpyrohroznová dráha (IPyA), tryptamin (TAM) a indol-3-ylacetaldoxim (IAOx) (Di et al. 2015).

2.2.2.1 IPyA dráha

Prvním krokem IPyA dráhy je deaminační reakce, katalyzována tryptofan aminotransferasou (TAA1) nebo jejími homology TAR1/TAR2, při které dochází k přeměně tryptofanu

na IPyA (Stepanova et al., 2008; Taiz a Zeiger, 2002). Následuje dekarboxylační reakce při které vzniká IAA, za přítomnosti enzymu flavinové monooxygenasy YUCCA (Stepanova et al., 2008; Taiz a Zeiger, 2002; Mashiguchi et al., 2011). Původně bylo myšleno, že TAA1/TAR a YUCCA se nepodílejí na stejné biosyntetické dráze. Dnes jsou však už k dispozici biochemické a genetické důkazy, že se v jedné dráze nacházejí a tato dráha je hlavní dráhou pro biosyntézu IAA ve spoustě druhů rostlin (Zhao, 2012).

2.2.2.2 TAM dráha

Dříve se předpokládalo, že tryptamin je součástí YUCCA dráhy, nedávno však došlo ke zpochybnění této hypotézy (Mano a Nemoto, 2012; Tivendale et al., 2010). V porovnání s IAA se TAM vyskytuje v *Arabidopsis* ve velmi nízké koncentraci (Novák et al., 2012). Pravděpodobně se jedná o produkt tryptofan dekarboxylasy (TDC) (Mano a Nemoto, 2012). Je možné, že TAM existuje jen v některých rostlinách nebo některých orgánech, ne však ve všech druzích nebo ve všech orgánech stejného druhu (Tivendale et al., 2014).

2.2.2.3 IAM dráha

IAM dráha je velmi dobře prostudovaná u bakterií (Ljung, 2013), využívají ji např. *Pseudomonas savastanoi* a *Agrobacterium tumefaciens* (Taiz a Zeiger, 2002). V bakteriích dochází k přeměně tryptofanu na IAM pomocí tryptofanmonooxygenasy. Následně přeměna na IAA probíhá za přítomnosti enzymu amidasy 1 (AMI1) (Casanova et al., 2005; Gaudin a Jouanin, 1995).

Původně bylo myšleno, že tato cesta je jen u bakterií. Nyní je již potvrzeno, že probíhá i u některých druhů rostlin včetně *Arabidopsis*, avšak od cesty v bakteriích se liší (Pollmann et al., 2002). Není však zcela jasné, jak u rostlin probíhá. Pravděpodobně vzniká z indol-3-ylacetonitrilu (IAN), často se tedy uvádí jako meziproduct IAox dráhy (Tivendale et al., 2014).

2.2.2.4 IAox dráha

U čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) dochází k přeměně tryptofanu na IAox pomocí dvou homologních enzymů cytochromu P450 CYP79B2 a CYP79B3 (Zhao et al., 2002). Mnoho studií ukazuje, že IAN i IAM jsou meziprodukty IAox (Sugawara et al., 2009). Na přeměně IAox na IAN se podílí enzym CYP71A13 (Nafisi et al., 2007). Přeměna IAN na IAA pořád není detailně objasněna, předpokládá se, že v tomto procesu jsou zapojeny nitrilasy (NITs) (Bartel a Fink, 1994; Bartling et al., 1992).

2.2.3 Metabolismus indol-3-yloctové kyseliny

Podobně jako u cytokininů i u auxinů může být jeho homeostáze kontrolována vratnými i nevratnými metabolickými přeměnami. Regulovat hladinu IAA v rostlině (Obr. 5) mohou dva mechanismy: konjugace (primárně s aminokyselinami a cukry) a oxidační degradace (Normanly, 2010; Rosquete et al., 2012).

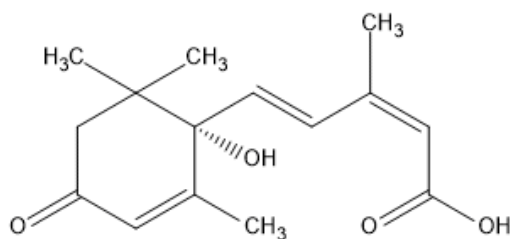
Nejčastějšími konjugáty jsou esterové a amidové (Sauer et al., 2013). Konjugáty mohou být reverzibilní nebo i ireverzibilní. Jejich hlavními funkcemi je transport a deaktivace, čímž zajišťují funkční auxinovou homeostázi (Ludwig-Müller, 2011). Předpokládá se, že glukosylestery tvořené s IAA jsou vratnými zásobními formami auxinu a jejich tvorba je katalyzována uridin 5'-difosfo-glukosyltransferasami (UGTs) (Korasick et al., 2013). Konjugaci IAA s aminokyselinami usnadňují geny GH3 (GRETCHEN HAGEN 3), zatímco amidohydrolasy (IAA-LEUCIN RESISTANT 1, ILR1) zpětně degradují konjugáty na volnou IAA (Sauer et al., 2013). Avšak u *Arabidopsis* nejvíce abundantní aminokyselinové konjugáty IAA-aspartát a IAA- glutamát (IAAsp a IAGlu) nepodléhají hydrolyze a jsou tedy součástí katabolických procesů (Ljung, 2013).

Odbourávání IAA může probíhat dvěma oxidačními způsoby: dekarboxylačně a nedekarboxylačně (Procházka et al., 1998). Oxidační katabolismus je považován za chemickou modifikaci indolového jádra nebo postranního řetězce a jedná se o nevratný krok degradace regulující hladinu IAA (Davies, 2004). Hlavním krokem katabolismu je přeměna IAA na oxoindol-3-octovou kyselinu (oxIAA), reakce je katalyzována specifickou dioxygenázou (AtDAO) (Porco et al., 2016). Jedná se o nejdůležitější mechanismus deaktivace IAA (Pěnčík et al., 2013).

2.3 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je opticky aktivní C₁₅ terpenoid karboxylové kyseliny. Její objev se datuje na začátek roku 1960, kdy bylo zjištěno, že se podílí na klíčení semene (Cornforth et al., 1966; Liu a Carns, 1961; Ohkuma et al., 1963). Podle orientace karboxylové skupiny na druhém uhlíku můžeme rozlišovat *cis* a *trans* izomery ABA. Vzhledem k tomu, že ABA je opticky aktivní může se tedy vyskytovat jako R nebo S izomer. S forma je aktivní přirozeně se vyskytující, zatímco R forma je inaktivní a vyskytuje se ve stomatech rostlin (Taiz a Zeiger, 2010).

Původní název kyseliny abscisové byl abscisin II, a byla poprvé izolována z bavlny (Ohkuma et al., 1963). Poté v roce 1964 byla izolována sloučenina indukující klíčení, z listů sycaromoru druhu *Avena* a byla nazvána dormin (Cornforth et al., 1966). Po provedení strukturální krystalové analýzy byl dormin identifikován jako abscisin. Následně v roce 1967



Obr. 6. Strukturní vzorec kyseliny abscisové (vytvořeno v programu ChemDraw).

byl přijat jednotný název – kyselina abscisová (Addicott et al., 1968). Základní struktura uvedená na Obr. 6 byla určena v roce 1965 (Ohkuma et al., 1965).

ABA hraje zásadní roli v mnoha fyziologických procesech během růstu rostlin (Dong, Park a Hwang, 2015). Mezi její důležité úlohy patří vývoj ovoce, reakce na biotické a abiotické stresy (Chernys a Zeevaart, 2000; Dong et al., 2015).

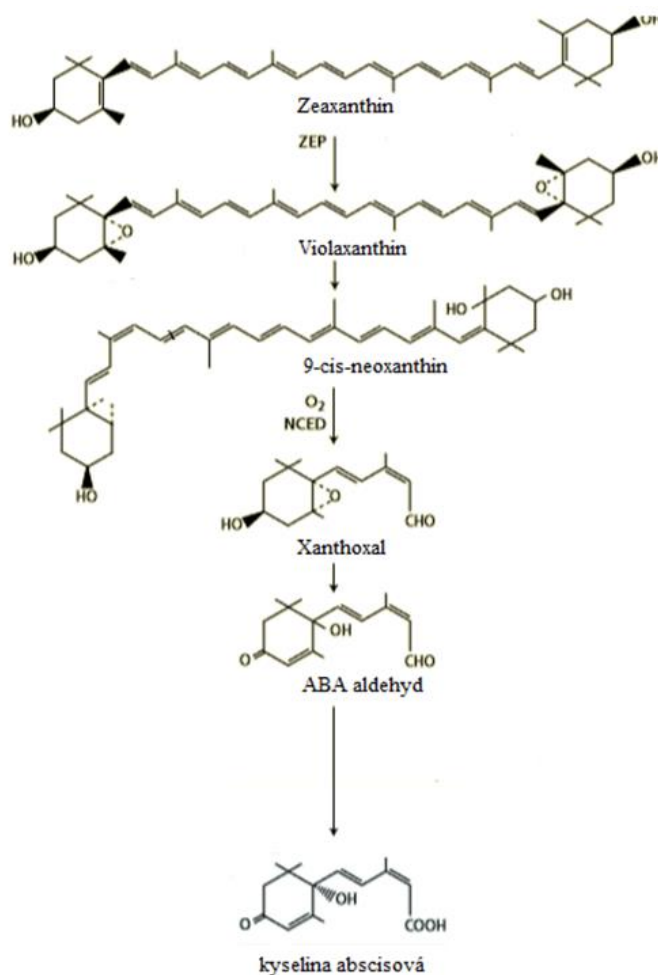
2.3.1 Fyziologické účinky kyseliny abscisové

ABA může působit jako promotor, ale také jako inhibitor. K jejím hlavním účinkům a funkcím patří regulace vodního režimu rostlin, uzavírání a otevírání průduchů, inhibice prodlužovacího růstu, regulace dormance (Davies, 2004). ABA snižuje růstovou rychlost rostoucích pletiv a orgánů, v tomto účinku je tedy antagonistou auxinů. Tento účinek je provázen reorientací mikrotubulů podélně ve směru růstu. Pokud je však koncentrace ABA nízká, prodlužovací růst nebude ovlivňovat (Procházka et al., 1998).

Nejdůležitější funkcí ABA je regulace vodního režimu rostliny. Pokud má rostlina nedostatek vody, vyvolá ABA uzavření průduchů. Při nedostatku vody dojde k rychlému vzrůstu ABA v kořenech i listech. Při dehydrataci, pokud jsou hladiny ABA vysoké, dojde k pozitivní stimulaci růstu kořenů a naopak k inhibici růstu výhonků (Taiz a Zeiger, 2002). Pokud je nedostatek vody v listech, dochází k přemístění ABA z mezofylu do epidermis, kde vyvolá uzavření průduchů a omezí transpiraci. Kyselina abscisová je tedy považována za obranný mechanismus rostliny vůči stresu, redukuje negativní vliv nejen při nedostatečné hydrataci rostliny, ale i při nízké teplotě nebo zasolení a dokáže rostlinu na tyto podmínky adaptovat (Procházka et al., 1998).

2.3.2 Biosyntéza kyseliny abscisové

Byly navrženy dvě cesty biosyntézy ABA. V přímé dráze (sesquiterpenoidní dráha) je ABA odvozena z farnesyl difosfátu (FDP) (Hirai et al., 2000). V nepřímé dráze (Obr. 7) (karotenoidní dráha) ABA vzniká štěpením karotenoidů (Taylor a Smith, 1967). Tato cesta byla navržena kvůli strukturální podobnosti mezi ABA a xanthoxinem (karotenoidní produkt



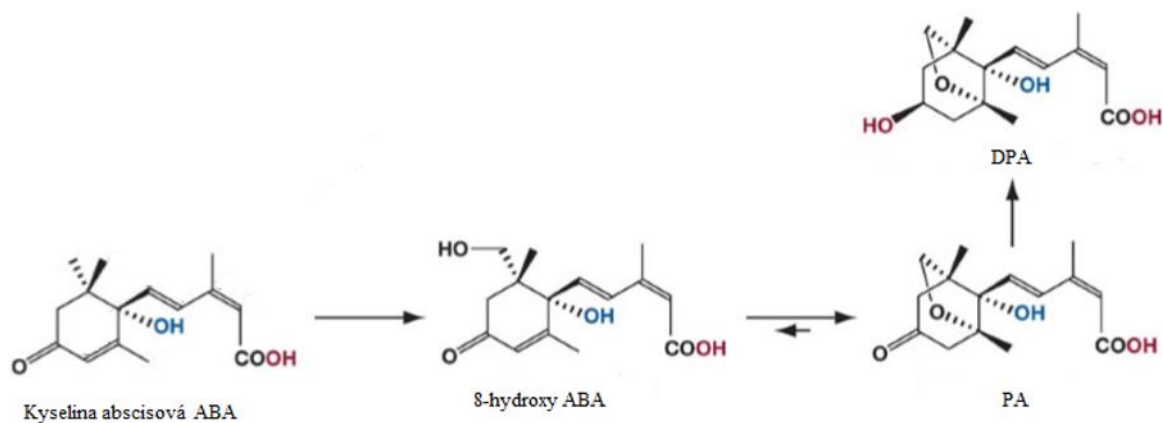
Obr. 7. Biosyntetická dráha kyseliny abscisové (upraveno podle Taiz a Zeiger, 2002). ZEP: zeaxanthin epoxidasa; NCED: 9-cis-epoxykarotenoid-dioxygenasa; ABA: kyselina abscisová.

degradace). Byla potvrzena několika biochemickými studii a předpokládá se tedy, že karotenoidovou dráhou je syntetizována ABA ve vyšších rostlinách (Ruiz-Sola a Rodríguez-Concepción, 2012; Schwartz, 2003).

Tato dráha začíná z prekurzoru isopentenyldifosfátu (IPP), který je syntetizován v plastidech z glyceralddehyd-3-fosfátu a pyruvátu cestou methylerythritol fosfátu (Nambara a Marion-Poll, 2005). Následuje syntéza violaxanthinu katalyzována zeaxanthinovou epoxidázou (ZEP). Violaxanthin je konvertován na 9-cis-neoxanthin, který je následně štěpen na xanthoxal (dříve xanthoxil) pomocí enzymu 9-cis-epoxykarotenoid-dioxygenázou (NCED). Finálními kroky biosyntézy jsou oxidace xanthoxalu na ABA-aldehyd a poté na ABA za katalýzy aldehydoxidas (Taiz a Zeiger, 2002).

2.3.3 Metabolismus kyseliny abscisové

Hladinu ABA reguluje kromě biosyntézy také její katabolismus. Katabolismus se dělí na dvě hlavní cesty: hydroxylace zprostředkovaná monooxygenasami P450 a konjugace (Nambara a Marion-Poll, 2005).



Obr. 8. Katabolismus kyseliny abscisové (upraveno podle Nambara a Marion-Poll, 2005). Červené hydroxylové skupiny jsou aktivnější místa pro konjugaci než modré. ABA: kyselina abscisová; PA: kyselina faseová; DPA: kyselina dihydrophaseová

Hlavním krokem hydroxylace je 8-hydroxylace (Obr. 8) katalyzovaná cytochromem P450 monooxygenázou (Nambara a Marion-Poll, 2005). Primárním katabolitem je kyselina faseová (PA), která je biologicky neaktivní (Davies, 2004). PA se dále katabolizuje na kyselinu dihydrophaseovou (DPA) reduktázou. PA a DPA jsou nejrozšířenější katabolity metabolismu ABA (Nambara a Marion-Poll, 2005).

Další možnou cestou inaktivace ABA je konjugace, nejčastěji s glukózou. Glukosylester kyseliny abscisové (ABA-GE) je nejrozšířenější konjugát, uložený ve vakuolách. Konjugáty ABA bývají fyziologicky neaktivní a jejich úloha není zcela objasněna kromě regulace obsahu volné ABA (Nambara a Marion-Poll, 2005; Davies, 2004; Procházka et al., 1998).

2.4 Stanovení rostlinných hormonů

Hlavním problémem analýzy rostlinných hormonů je, že se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích na rozdíl od látek s nimi interferujícími. Pro přesné určení rostlinných hormonů je podstatná znalost analytických a chemických principů týkajících se jejich extrakce, purifikace, identifikace a kvantifikace (Tarkovská et al., 2014). Rostlinné extrakty lze zařadit do skupiny komplexních vícesložkových směsí. Z toho důvodu je nutné pro správnou identifikaci a kvantifikaci fytohormonů kombinovat potřebné množství rostlinného materiálu s vhodnými extrakčními a purifikačními protokoly a vše propojit s ideálními analytickými metodami.

2.4.1 Metody extrakce a izolace vybraných fytohormonálních skupin

Předtím, než proběhne extrakce, je nutné provést homogenizaci rostlinného materiálu tak, aby došlo k rozrušení buněčné stěny (Harrison, 2011) a hormonům bylo umožněno difundovat do použitého extrakčního rozpouštědla. Toho lze dosáhnout drcením sušené nebo

čerstvé rostlinné hmoty v kapalném dusíku (-196 °C), aby nedocházelo k chemické nebo enzymatické degradaci, a následným přidáním vhodného rozpouštědla ke zhomogenizovanému materiálu (Hillman, 1978; Ljung et al., 2004).

K extrakci je nutné zvolit takové rozpouštědlo, které účinně extrahuje cílové hormony a minimalizuje extrakci interferujících látek (Tarkowská et al., 2014). Pro extrakci rostlinných hormonů se využívají pufrы s neutrálním pH, methanol nebo směs methanolu a vody. Pro monitorování možných ztrát během extrakce je nutné přidat interní standardy (obvykle značené stabilními izotopy) (Ljung et al., 2004).

Purifikační metody se volí podle typu finální analýzy, chemické povahy cílových hormonů a výběru analytického přístroje. Dříve se v kvantitativní i kvalitativní analýze fytohormonů pohybovala navážka řádově v gramech. V současnosti s rozvojem hmotnostní spektrometrie se pracuje s jednotkami miligramů. Při stanovení rostlinných hormonů je nutné zvolit vhodné izolační postupy, aby došlo ke snížení množství interferujících látek a maximální výtěžnosti cílových hormonů (Ljung et al., 2004). Z těchto důvodů se často pracuje s malými navážkami, které díky potlačení vlivu komplexní rostlinné matrice poskytují lepší odezvu analytického signálu u cílových analytů.

Mezi nejčastější metody purifikace se řadí extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce na pevné fázi (SPE). SPE kolony obsahují pevný sorbent, který může být na bázi reverzní fáze nebo jako iontoměnič (anex, katex) (Tarkowská et al., 2014). Podle typu zvoleného sorbentu je pak analyt vázán buď iontovou vazbou nebo slabými vazebnými interakcemi. U SPE se jedná především o Van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, kation-anion interakce nebo polární interakce. Po nanesení vzorku na kondicionovaný sorbent jsou interferující látky vymyty vhodným rozpouštědlem. K eluci cílových hormonů se následně využívá rozpouštědlo, které zruší vazby mezi hormony a sorbentem.

V dnešní době se často využívá polymerních sorbentů se smíšeným mechanismem retence (např. Oasis[®] MCX, MAX), který je kombinací reverzní fáze a některého z typů iontoměniče. Zapojením více možných interakcí dochází ke snížení množství kroků, které musejí být během purifikace provedeny (Ljung et al., 2004; Nordström et al., 2004; Novák et al., 2008; Tarkowská et al., 2014). Dobrev a Kamínek (2002) jako první ukázali využití fáze Oasis[®] MCX pro izolaci cytokininů, IAA a ABA z komplexní rostlinné matrice. Při kombinaci reverzní a kationtově-výměnných mechanismů retence dochází k současnému zachycení kationtových CK bází, ribosidů a glukosidů i k záchytnu aniontových auxinů a ABA. Jednotlivé analyty jsou poté postupně eluovány v zásaditém prostředí (pH > 8) rozpouštědly o různých koncentracích methanolu a hydroxidu amonného (Dobrev a Kamínek, 2002).

Další možností izolace rostlinných hormonů z rostlinné matrice je imunoafinitní extrakce, která založená na specifické interakci protilátky s antigenem. Jejich použitím v kombinaci s SPE lze dosáhnout vysokého stupně přečištění a zakoncentrování vzorku (shrnuto v Tarkovská et al., 2014).

Účinnost purifikace může být také ovlivněna experimentálním uspořádáním. Kromě výše popsaného konvenčního uspořádání, kdy je sorbent uzavřen v komerčně dostupných kolonách, zaznamenalo v posledních dvou desetiletích hojně využití také disperzivní uspořádání. Disperzivní SPE je založena na přidání sorbentu přímo do extrakčního roztoku, po kterém následuje disperze (záchyt analytů na povrchu sorbentu). Jakmile je analyt na sorbentu ukotven, je nutné provést jeho eluci. Např. odstředěním nebo filtrací sorbentu společně s elučním činidlem. Výhodou disperzivní SPE na rozdíl od klasického uspořádání v kolonkách je kratší doba zpracování vzorku a menší množství použitého sorbentu (Anumol et al., 2017; Islas et al., 2017; Lehotay, 2011).

2.4.2 Analýza fytohormonů pomocí hmotnostní spektrometrie

Nejvhodnější analytickou metodou pro identifikaci a kvantifikaci rostlinných hormonů je hmotnostní spektrometrie (MS). Molekuly, které jsou obvykle separovány pomocí plynové (GC) nebo kapalinové chromatografie (LC), jsou zaváděny do iontového zdroje a následně ionizovány různými ionizačními technikami, např. ionizace elektrosprejem (ESI) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Vzniklé ionty poté vstupují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou dále separovány. Konstrukce MS analyzátorů poté určuje jeho analytické možnosti, např. iontové pasti, kvadrupóly, analyzátoru doby letu atd.

Pro zlepšení selektivity se využívá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), kde první MS analyzátor odstraní většinu interferujících látek a druhý analyzátor následně vybírá ionty vytvořené fragmentací základního iontu (Ljung et al., 2004). Tandemová hmotnostní spektrometrie je většinou kombinována právě s GC nebo LC. Tato kombinace přístrojů umožňuje ultra vysokou citlivost a selektivitu v hmotnostní analýze a zároveň i dostatečnou separaci organických molekul z kompletní biologické matrice (Novák et al., 2017).

GC-MS byla často používanou instrumentální technikou pro identifikaci a kvantifikaci rostlinných hormonů při vysoké citlivosti. Nevýhodou GC-MS však bylo množství nezbytných kroků před analýzou (extrakce, čištění a chemická deprivatizace), což vedlo k hledání a vyvíjení vhodnějších a snadnějších technik (Engelberth et al., 2003; Schmelz et al., 2003, 2004).

Upřednostňovanou technikou pro analýzu fytohormonů se tedy stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrickou detekcí (HPLC-MS) (Novák et al., 2003). Následně byla vyvinuta ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) s sub-2 μm částicemi stacionární fáze. V porovnání s HPLC dosáhla tato technika větší účinnosti separace, rozlišení, citlivosti, rychlosti a průchodnosti vzorku (Nguyen et al., 2006; Nováková a Vlčková, 2009; Wu a Clausen, 2007). Pro analýzu cytokininů a auxinů našlo UHPLC ve spojení s MS analyzátory široké uplatnění (např. Novák et al., 2008; Novák et al., 2012; Svačinová et al., 2012).

Při analýze složitých biologických matric se využívají MS analyzátory typu trojitých kvadrupólů (QqQ), kvadrupólové iontové pasti (Q-IT) nebo různé hybridní analyzátory (Busetti a Swann, 2013). U přístrojů QqQ dochází v prvním kvadrupólu k vybrání iontů. V prostřední části sloužící jako kolizní cela vyplněná inertním plynem (argonu, helia) probíhá fragmentace (kolizní indukovaná disociace). Vzniklé fragmenty jsou poté analyzovány ve třetím kvadrupólu (Busetti a Swann, 2013). Jestliže jsou skenovány všechny fragmenty, mluvíme o záznamu produktových iontů (MS/MS sken). V případě kvantifikačních analýz je nejčastěji na třetím kvadrupólu vybrán produktový ion poskytující nejintenzivnější signál. Tento typ analýzy se nazývá MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) mód je dnes standardně využíván při stanovení fytohormonů (Kowalczyk a Sandberg, 2001; Svačinová et al., 2012). Předpokládá se, že metody založené na MS/MS se budou dále vyvíjet a umožní tak specifickou analýzu organel, popř. většího spektra rostlinných hormonů a jejich metabolitů v jednom rostlinném extraktu (Novák et al., 2017).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Agar – Duchefa Biochemie B.V. (Nizozemsko)

Deionizovaná voda

Ethanol – VWR Chemicals (Francie)

Hydroxid amonný p.a. (25%) – Merck KGaA (Německo)

Hydroxid sodný p.a. – Lach Ner s.r.o (Česká republika)

Chloroform p.a. – Lach Ner s.r.o (Česká republika)

Kyselina dusičná (65%) – VWR Chemicals (Francie)

Kyselina mravenčí p.a. (>98%) – Sigma Aldrich (Německo)

Methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® – Merck KGaA (Německo)

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

Sacharóza – Penta (Česká republika)

Tween-20 – Sigma Aldrich (Německo)

Extrakční roztoky:

Modifikovaný Bielecki pufr – 75% methanol, 5% kyselina mravenčí

Bielecki pufr – 60% methanol, 25% chloroform, 5% kyselina mravenčí

Interní izotopicky značené standardy cytokininů (báze, ribosidy, N7-glukosidy, N9-glukosidy $2 \cdot 10^{-8}$ mol/l): [$^{13}\text{C}_5$]tZ, [$^2\text{H}_5$]tZR, [$^2\text{H}_5$]tZ7G, [$^2\text{H}_5$]tZ9G, [$^{13}\text{C}_5$]cZ, [$^{15}\text{N}_4$]cZ7G, [$^2\text{H}_3$]DHZ, [$^2\text{H}_3$]DHZR, [$^2\text{H}_3$]DHZ9G, [$^2\text{H}_6$]iP, [$^2\text{H}_6$]iPR, [$^2\text{H}_6$]iP7G, [$^2\text{H}_6$]iP9G; O-glukosidy a monofosfáty $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l: [$^2\text{H}_5$]tZOG, [$^2\text{H}_5$]tZROG, [$^2\text{H}_5$]tZRMP, [$^2\text{H}_6$]iPRMP – OlchemIm, s.r.o. (Česká republika)

Interní izotopicky značené standardy auxinů ($1 \cdot 10^{-6}$ mol/l): [$^{13}\text{C}_6$]IAA, [$^{13}\text{C}_6$]oxIAA, [$^{13}\text{C}_6$]IAA_{sp}, [$^{13}\text{C}_6$]IAGlu – OlchemIm, s.r.o. (Česká republika)

Interní izotopicky značené standardy kyseliny abscisové ($1 \cdot 10^{-6}$ mol/l): [$^2\text{H}_6$]ABA – Cambridge Isotope Laboratories (Kanada)

Mobilní fáze pro stanovení cytokininů:

(A) Methanol hypergrade for LC-MS LiChrosolv® – Merck KGaA (Německo)

(B) Mravenčan amonný (15 mM, pH 3,95) – 566 μl kyseliny mravenčí (98-100% roztok HCOOH pro LC-MS; Merck KGaA, Německo) bylo v odměrné baňce doplněno

deionizovanou vodou do 1 l a výsledné pH bylo upraveno 25% roztokem NH₄OH pro LC-MS (Merck KGaA, Německo).

Mobilní fáze pro stanovení auxinů:

(A) 0,1% methanolický roztok kyseliny octové

(B) 0,1% vodný roztok kyseliny octové

500 µl CH₃COOH (98-100% roztok; Merck KGaA, Německo) bylo v odměrné baňce doplněno deionizovanou vodou nebo methanolem pro LC-MS do celkového objemu 0,5 l.

3.2 Použitý materiál

Laboratorní materiál

Čtvercové Petriho misky pro výsev *Arabidopsis thaliana* – Greiner bio-one (Kremsmuenster, Rakousko)

Chromatografická kolona Acquity™ UPLC BEH Shield RP18, 130Å, 1,7 µm; 2.1 x 150 mm (Waters, USA)

Chromatografická kolona Kinetex C18 100 Å, délka 50 mm, průřez 2,1 mm, velikost částic 1,7 µm (Phenomenex, USA)

Keramické homogenizační kuličky – Retsch (Haan, Německo)

Oasis® MCX (sorbernt a kolony) – Waters (USA)

Laboratorní sklo – jednorázové zkumavky, kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, plastové mikrozukavky

Biologický materiál

7-denní rostliny *A. thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0) – semínka vysterilizována pomocí roztoku 0,01% Tweenu v 70% ethanolu byla vyseta na agarové plotny s Murashige & Skoog médiem (4,4 g/l MS soli; 10,0 g/l sacharosy; pH 5,7 upraveno 0,1% roztokem NaOH) a dále byla umístěna ve vertikální poloze do fytotronu při teplotě 23°C a fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Rostlinný materiál byl po sedmi dnech posbírán do mikrozukavek (20 a 50 mg č. h.), okamžitě zamražen v tekutém dusíku a skladován v hlubokomrazícím boxu při -70°C.

3.3 Použité přístrojové vybavení

Analytické váhy – Satorius Weighing Technology (Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Česká republika)

Autokláv – Sanyo Schoeller Instruments (Česká republika)

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge – ThermoScientific (Německo)

Direct-Q® 3UV water purification system – Merck (Německo)
Elektromagnetická míchačka – Velp Scientifica (Itálie)
Flowbox Heraguard™ ECO – ThermoScientific (Německo)
Hlubokomrazicí box –70 °C – Sanyo Schoeller Instruments (Česká republika)
Kulový mlýnek MM400 Retsch® & Co. KG – Retsch GmbH (Německo)
Mechanický rotátor Stuart® (Keison Product, Spojené království)
Minitřepačka Vortex Mixer (Velp Scientifica, Itálie)
pH metr Eutech instruments pH 700MM 2a – ThermoScientific (Německo)
Rotační vauková odparka – CentriVap Benchtop, VWR (Francie)
Rotátor – Stuart rotator SB3 BioCote (Velká Británie)
Systém UHPLC-MS/MS: Acquity UPLC I-Class – Waters (USA) s hmotnostním
detektorem Xevo TQ-S – Waters MS technologies (Velká Británie)
Třepačka – TS-100C Biosan (Lotyšsko)
Ultrazvuková lázeň – Bandelin Sonorex Super RK 102 H (Německo)
Vakuová komůrka Visiprep™ Supelco (Sigma Aldrich, Německo)

3.4 Metody

3.4.1 Příprava kultivačního média

Bylo použito kultivační MS médium pro pěstování rostlin popsáno podle Murashigeho a Skooga (1962). Na analytických vahách bylo naváženo 10 g sacharózy, 4,4 g MS média. Navážené chemikálie byly kvantitativně přeneseny a rozpuštěny v připravené 1 l kádince s destilovanou vodou (0,8 l). Následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 5,7 roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l.

Roztok kultivačního média byl v odměrném válci doplněn destilovanou vodou na 1 l, poté byl rozdělen na poloviny a přelit do dvou litrových lahví s naváženými 5 g agarů. Víčko bylo překryto alobalem a přelepeno autoklávovací páskou. Láhve s kultivačním médiem byly vysterilizovány v autoklávu. Poté se médium nechalo zchladnout a bylo rozlito do Petriho desek. Médium v deskách se nechalo zatuhnout a pro snížení rizika vysušení agarů byly desky otočeny dnem vzhůru.

3.4.2 Optimalizace extrakčního činidla

K 20 mg čerstvé hmoty (č. h.) homogenizovaného vzorku 7-denních semenáčků *A. thaliana* Col-0 bylo přidáno 0,50 ml vychlazeného extrakčního roztoku. Použité varianty extrakčních roztoků byly následující:

A. Bielecki pufr

1. 60% methanol, 25% chloroform, 5% kyselina mravenčí

B. Modifikovaný Bielecki pufr

1. 10% methanol, 5% kyselina mravenčí
2. 25% methanol, 5% kyselina mravenčí
3. 50% methanol, 5% kyselina mravenčí
4. 75% methanol, 5% kyselina mravenčí

C. Methanol

1. 10% methanol
2. 25% methanol
3. 50% methanol
4. 75% methanol

Každá varianta byla provedena ve 4 technických replikátech a ke každé variantě byl následně připraven i kontrolní vzorek. Poté byla přidána směs interních standardů (14 μ l směsi cytokininů, 5 μ l auxinů, 10 μ l ABA), 3 keramické homogenizační kuličky. Všechny vzorky poté prošly následnými procesy homogenizace, extrakce a inkubace na přístrojích o daném nastavení:

- Kulový mlýnek – 5 minut, 27 Hz, 4 °C
- Ultrazvuk – 3 minuty, 4 °C
- Rotátor – 30 minut, 15 rpm, 4 °C
- Centrifuga – 15 minut, 15 200 rpm, 4 °C

Supernatanty extrahované stejným extrakčním roztokem byly přepipetovány do jedné zkumavky a promíchány na vortexu. Spojený extrakt byl rozpipetován po 0,5 ml do skleněných zkumavek a do každé zkumavky bylo přidáno 2,5 ml 1M kyseliny mravenčí. Poté byla provedena purifikace vzorku na pevné fázi s použitím kolonek Oasis[®] MCX 30 mg/1 ml:

1. Kondicionace: 1x 1 ml 100% methanol
1x 1 ml deionizovaná voda
1x 1 ml 50% kyselina dušičná
1x 1 ml deionizovaná voda
1x 1 ml 1M kyselina mravenčí
2. Nanesení: vzorek (3 ml)
3. Promytí: 1x 1 ml 1M kyselina mravenčí
4. Eluce IAA/ABA: 2x 1 ml 80% methanol
5. Eluce CK NT: 1x 1 ml 0,35M amoniak
6. Eluce CK B/OG: 2x 1 ml 0,35M amoniak v 60% methanolu

Vzorky byly následně odpařeny v rotační vakuové odparce do sucha a uloženy před LC-MS/MS analýzou v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.3 Optimalizace extrakční kapacity

Z mikrozkušavek s rostlinným materiálem bylo odebráno 300 mg č. h. 7-denních semenáčků *A. thaliana* ekotyp Col-0 a zhomogenizováno ve třecí misce pod tekutým dusíkem. Do patnácti 2ml mikrozkušavek bylo rozváženo 20 mg č. h. homogenizovaného materiálu. K rozváženému materiálu byl následně přidán vychlazený extrakční roztok dle přiloženého pracovního protokolu:

- A. 0,25 ml modifikovaný Bielecki pufr
- B. 0,5 ml modifikovaný Bielecki pufr
- C. 0,75 ml modifikovaný Bielecki pufr
- D. 1 ml modifikovaný Bielecki pufr
- E. 0,5 ml modifikovaný Bielecki pufr

Každá varianta vzorku byla připravena ve třech technických replikátech – a ke každému vzorku byla následně přidána směs interních standardů (IS) – 14 μl směsi cytokininů, 5 μl auxinů a 10 μl ABA. K takto připraveným vzorkům byly přidány 3 keramické homogenizační kuličky. Dále byly připraveny tři kontrolní vzorky:

- 1. Kontrola – 0,5 ml modifikovaný Bielecki pufr + IS
- 2. Kontrola – 1 ml modifikovaný Bielecki pufr + IS
- 3. Kontrola – 0,5 ml modifikovaný Bielecki pufr

Všechny vzorky byly opět homogenizovány, extrahovány a inkubovány podle postupu uvedeného výše. Supernatant jednotlivých variant byl spojen, promíchán a poté rozdělen do zkumavek na jednotlivé vzorky. Ve zkumavkách byly vzorky zředěny 6x 1M kyselinou mravenčí. Do ventilů vakuové komůrky byly upevněny kolony typu Oasis[®] MCX (30 mg/1 ml). K ventilu ve skleněné nádobě byla připojena stolní vývěva a byla opět provedena purifikace vzorku na pevné fázi. Vzorky byly odpařeny v rotační vakuové odparce do sucha a uloženy do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.4 Optimalizace množství nanášeného vzorku

Bylo naváženo 300 mg č. h. homogenizovaného vzorku 7-denních semenáčků *A. thaliana* Col-0. Rostlinný materiál byl postupně extrahován v 9 ml modifikovaného Bieleckého pufru. Poté byly vytvořeny jednotlivé varianty, jako v předešlém experimentu 3.4.3. K variantám byly přidány směsi interních standardů (14 μl směsi cytokininů, 5 μl auxinů, 10 μl ABA)

a 3 keramické homogenizační kuličky. Dále byly připraveny tři kontrolní vzorky o stejném složení, jako v předchozím experimentu 3.4.3.

Vzorky i kontroly byly následně homogenizovány, extrahovány a inkubovány podle postupu uvedeného výše. Supernatant byl odpipetován do skleněných zkumavek a vzorky byly zředěny 6x 1M kyselinou mravenčí, kromě varianty E. Následovala purifikace vzorku na pevné fázi s použitím kolonek Oasis[®] MCX (30 mg/1 ml) a před uložením v -20 °C byly vzorky odpařeny do sucha.

3.4.5 Disperzivní SPE ve mikrozkušavce

Do 2ml plastových mikrozkušavek bylo rozváženo po 10 mg č. h. zhomogenizovaného materiálu. K rostlinnému materiálu byl přidán vychlazený extrakční roztok modifikovaného Bieleškiho pufru, směsi interních standardů (14 µl směsi cytokininů, 5 µl auxinů, 10 µl ABA) a 3 keramické homogenizační kuličky. Stejně byly připraveny i kontrolní vzorky, kdy dva obsahovaly interní standardy a jeden byl připraven bez nich. Vzorky následně byly homogenizovány, extrahovány a inkubovány podle výše uvedeného postupu. Supernatanty byly spojeny, promíchány a zředěny 6x 1M kyselinou mravenčí.

Byla rozebrána kolonka 150 mg Oasis MCX a sorbent byl následně rozvážen do 2ml plastových mikrozkušavek:

- 6x 10 mg MCX
- 3x 7 mg MCX
- 3x 5 mg MCX
- 3x 2 mg MCX

Za stále stejných podmínek (vortex: 10 s; rotátor: 5 minut, 4 °C; centrifuga: 2 min, 15 000 rpm, 4 °C) byl sorbentu v mikrozkušavkách postupně kondicionován a promýván:

1. Kondicionace: 1x 0,5 ml 100% methanol
1x 0,5 ml deionizovaná voda
1x 0,5 ml 50% kyselina dušičná
1x 0,5 ml deionizovaná voda
1x 0,5 ml 1M kyselina mravenčí
2. Nanesení: vzorek (2x 1,5 ml)
3. Promytí: 1x 0,5 ml 1M kyselina mravenčí
4. Eluce IAA/ABA: 1x 1 ml 80% methanol
5. Eluce CK NT: 1x 1 ml 0,35M amoniak
6. Eluce CK B/OG: 1x 1 ml 0,35M amoniak v 60% methanolu

Supernatant byl opatrně odpipetován do skleněných zkumavek, aby nedošlo k odebrání sorbentu, následně byly vzorky odpařeny v rotační vakuové odparce do sucha a poté uloženy před LC-MS/MS analýzou v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.6 Disperzivní SPE na mikrospin filtru

Bylo naváženo do 2ml plastové mikrozkušavky 20 mg č. h. zhomogenizovaného rostlinného materiálu 7-denních semenáčků *A. thaliana* Col-0. K navážce bylo napipetováno 0,5 ml 10% methanolu, 5% kyseliny mravenčí. Následně byly přidány směsi interních standardů - 14 μl cytokininů, 5 μl auxinů, 10 μl ABA a 3 homogenizační kuličky. Vzorky byly opět homogenizovány, extrahovány a inkubovány podle postupu vedeného výše.

Do 2ml plastové mikrozkušavky bylo naváženo 100 mg MCX sorbentu, který byl s jednotlivými činidly inkubován (vortex 10 s; centrifuga: 2 min, 15 200 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a supernatant byl vždy odpipetován do odpadu. K navážce bylo postupně napipetován:

- 1 ml methanolu
- 1 ml redestilované vody
- 1 ml 30% kyseliny dusičné
- 1 ml redestilované vody
- 1 ml 1M kyseliny mravenčí

Suspenze byla rozaliquotována po 100 μl , 50 μl a 20 μl na nylonové 0,2 μm microspin filtry. Na filtr bylo následně napipetováno 0,5 ml vzorku. Poté byl filtr se vzorkem na 15 minut umístěn na třepačku při 1 300 rpm a následně na centrifugu na 15 minut při 1000 rpm. Supernatant byl odpipetován do odpadu.

Po odpipetování supernatantu byl na filtr promyt 0,5 ml 1M kyseliny mravenčí. Plastová mikrozkušavka s filtrem byla umístěna na třepačku na 15 minut při 1300 rpm a poté na centrifugu na 15 minut při 1200 rpm. Filtrát byl odpipetován do odpadu.

Z plastové mikrozkušavky bylo odstříhnuto víčko, které bylo následně umístěno na filtr. Filtr i s víčkem byl přemístěn do nové 1,5ml plastové mikrozkušavky, z které bylo taktéž odstraněno víčko. Na filtr bylo napipetováno 0,5 ml 80% methanolu (eluce IAA/ABA). Plastová mikrozkušavka s filtrem byla umístěna na třepačku na 15 minut při 1000 rpm a poté na centrifugu na 15 minut při 1200 rpm. Filtrát byl před uložením v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ odpařen ve vakuové lihové odparce.

Filtr byl přesunut do nové 1,5ml plastové mikrozkušavky s odstraněným víčkem. Na filtr bylo napipetováno 0,5 ml 0,35M amoniaku (eluce CK NT) a následně byla mikrozkušavka s filtrem umístěna na třepačku na 15 minut při 1000 rpm a poté na centrifugu na 15 minut při 1200 rpm. Filtrát byl přepipetován do nové mikrozkušavky.

Nakonec bylo na filtr napipetováno 0,5 ml 0,35M amoniaku v 60% methanolu (eluce CK B/OG). Mikrozkumavka byla umístěna na třepačku na 15 minut při 1000 rpm a centrifugu na 20 minut při 1200 rpm. Filtráty eluce CK NT a CK B/OG byly spojeny, odpařeny ve vakuové lihové odparce uloženy v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.7 LC-MS/MS analýza

K dosucha odpařeným vzorkům bylo přidáno 40 μl 10% methanolu. Následně byly vzorky umístěny na 5 minut na ultrazvuk a poté na vortex. Vzorky byly přepipetovány na 0,2 μm Micro Spin Filtr. Poté byly vzorky stočeny na centrifuze při 7500 rpm po dobu 5 minut. Posledním krokem bylo přepipetování vzorků do Micro inzertu (0,1 ml 28 x 6 mm), uzavření do vialky a poté byla provedena LC-MS/MS analýza.

Kvantifikace cytokininů byla provedena metodou izotopového zředování proti 6 bodové kalibrační přímce. Ke kvantifikaci byl použit specializovaný software MassLynx (verze 4.1; Waters MS technologies (Velká Británie).

3.4.7.1 UHPLC-MS/MS analýza cytokininů

Analýza vzorků cytokininů byla provedena pomocí systému ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí typu trojitého kvadrupólu vybaveného ESI ionizací podle Svačinová et al., (2012).

Na UHPLC systém bylo nastříknuto 10 μl vzorku rozpuštěného v 5% MeOH. Vzorek byl zachycen na koloně Acquity UPLC BEH Shield RP18 o délce 150 mm, s vnitřním průřezem 2,1 mm a velikostí částic 1,7 μm . Cytokininy byly z kolony eluovány 15 minutovou gradientovou elucí 15 mM mravenčanem amonným pH 3,95 a methanolem v poměru od 95:5 do 0:100 při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min.

Eluované cytokininy byly ionizovány pomocí ESI(+) technologie a analyzovány trojitým kvadrupólem v MRM módu s následujícími parametry: kapilární napětí 0,35 kV, teplota iontového zdroje $120\text{ }^{\circ}\text{C}$; teplota desolvatačního plynu (dusík) $575\text{ }^{\circ}\text{C}$, průtok 1000 l/h; tlak kolizního plynu (argon) 0,005 mbar, průtok 0,2 ml/min. Doba prodlevy pro každý MRM kanál byla nastavena na 16 skenovacích bodů na pík. Pro každý MRM přechod bylo použito takové napětí na kónusu (21-35 V) a taková kolizní energie (15-24 eV), aby byla maximalizována citlivost (Svačinová et al. 2012).

3.4.7.2 UHPLC-MS/MS analýza auxinů a kyseliny abscisové

Pro analýzu auxinů bylo použito stejné systémové vybavení jako při analýze cytokininů. Na UHPLC systém bylo nastříknuto 10 μl vzorku rozpuštěného v 10% MeOH. Vzorek byl

zachycen na koloně Kinetex C18 100 Å, délka 50 mm, průřez 2,1 mm, velikost částic 1,7 µm, která byla vytemperovaná na 30 °C. Auxiny a ABA byly eluovány 8 minutovou gradientovou elucí s poměrem mobilních fází od 10:90 do 60:40 A:B, kde jako mobilní fáze A byla použita 0,1% kyselina octové v methanolu a jako B 0,1% kyselina octové ve vodě (Novák et al, 2012). Celkový čas každé analýzy byl 15 minut při průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min.

Eluované analyty byly ionizovány pomocí ESI technologie v pozitivním módu (auxiny) a v negativním módu (ABA). Vzorky byly analyzovány trojitým kvadrupólem v MRM módu opět s dobou prodlevy 16 skenovacích bodů na pík a optimalizovanými MS parametry: kapilární napětí 1 kV; teplota iontového zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu (dusík) 600 °C, průtok 1000 l/h; tlak kolizního plynu (argon) 0,005 mbar, průtok 0,15 ml/min. Během hmotnostního skenování pomocí MRM přechodů bylo aplikováno napětí na kónusu v rozmezí 12-30 V a kolizní energie 12-24 eV.

4 VÝSLEDKY

Praktická část bakalářské práce byla zaměřena na optimalizaci extrakčního a purifikačního protokolu pro izolaci vybraných rostlinných hormonů ze skupiny cytokininů, auxinů a kyseliny abscisové. Bylo testováno složení extrakčního činidla, extrakční kapacita a nanášení vzorku. Dále bylo porovnáváno klasické kolonové uspořádání s disperzivní SPE, která byla testována ve více variantách.

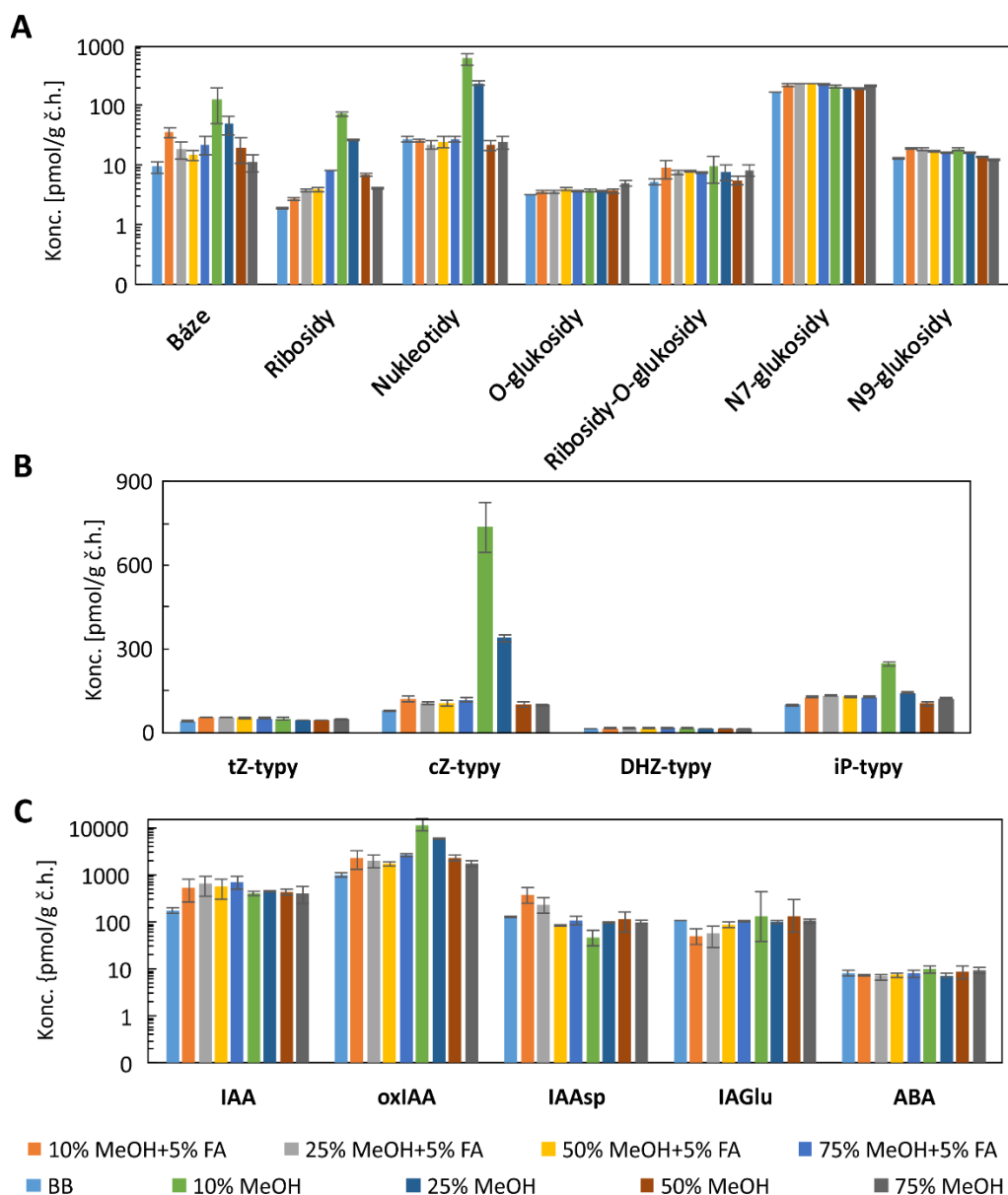
4.1 Optimalizace extrakčního činidla

Extrakční protokol byl testován z hlediska složení extrakčního činidla a vlivu komplexní rostlinné matrice na výsledné zastoupení hormonů v rostlinném pletivu. Byly připraveny vzorky obsahující 20 mg č. h., ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml extrakčních roztoků obsahujících jinou koncentraci methanolu v rozmezí 10% až 75% s přídavkem a nebo bez přídavku kyseliny mravenčí (podrobněji uvedeno v kapitole 3.4.2). Každý roztok byl testován ve třech technických replikátech a endogenní koncentrační hladiny jednotlivých fytohormonálních metabolitů byly stanoveny pomocí LC-MS/MS.

Výsledky naznačují, že neokyselené varianty methanolických roztoků obsahují stoupající endogenní hladiny CK bazí, ribosidů a nukleotidů ve srovnání s okyselenými variantami (Obr. 9A). U CK *O*-glukosidů a *N*-glukosidů tento narůstající koncentrační trend není patrný a výsledné CK hladiny byly srovnatelné s kontrolní extrakcí do pufru připraveného podle Bieleškiho (Bieleški, 1964). Nejpodobnější distribuce CK metabolitů ve srovnání s výše uvedenou kontrolou byla naměřena u modifikovaného Bieleškiho pufru, který se liší pouze nepřítomností chloroformu v extrakčním činidle (75% MeOH a 5% FA; Hoyerová et al., 2006). Z pohledu celkových CK hladin byly nejvyšší celkové koncentrace stanoveny v extraktech obsahujících 10% methanolu (1052 pmol/g č. h.) a 25% methanolu (541 pmol/g č. h.). U okyselených variant extrakčních činidel se celkové hladiny CKs pohybovaly v rozmezí 302–318 pmol/g č. h., což byl 1,3 násobek referenční CK hladiny z Bieleškiho pufru (229 pmol/g č. h.).

Rozdělíme-li CK metabolity podle jednotlivých isoprenoidních typů (Obr. 9B), tak je patrný nárůst endogenních hladin u cytokininových *cZ*-typů a *iP*-typů v neokyselených roztocích obsahujících 10% a 25% methanolu. U metabolické skupiny odvozené od *tZ* a *DHZ* nebyly podobné změny zaznamenány.

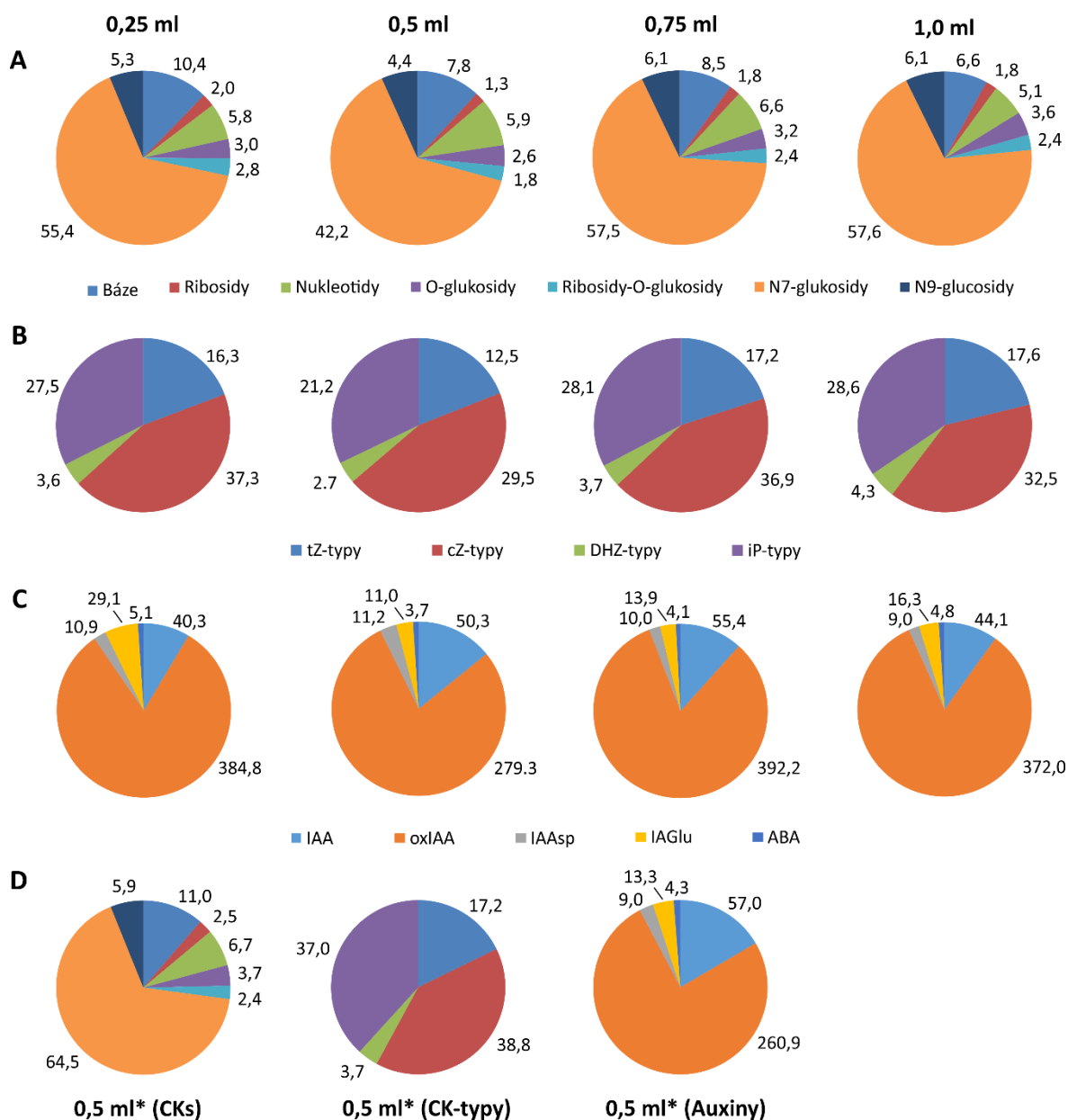
Stanovení ABA a auxinů (IAA a jejích aminokyselinových konjugátů společně s katabolitem oxIAA) neukázalo výrazné rozdíly v endogenních hladinách (Obr. 9C), kromě oxIAA, která vykázala podobný trend v neokyseleném prostředí jako CK metabolity. Koncentrace IAA a IAAsp byly však v kyselém pH extrakčního činidla mírně zvýšeny.



Obr. 9. Endogenní hladiny fytohormonů (v pmol/g č. h.) v *Arabidopsis thaliana* v 0,5 ml okyselených a neokyselených methanolicích činidel. (A) Koncentrace metabolitů cytokininů v jednotlivých extrakčních činidlech v logaritmickém měřítku, (B) koncentrace cytokininových typů v jednotlivých extrakčních činidlech, (C) koncentrace auxinů v jednotlivých extrakčních činidlech v logaritmickém měřítku. BB: Bieleški pufr; MeOH: methanol; FA: kyselina mravenčí. Sloupcové grafy zobrazují hodnoty průměru ± směr. odchylka (n = 4).

4.2 Optimalizace extrakční kapacity

Ve druhém kroku optimalizace byla testována extrakční kapacita přidáváním různého objemu modifikovaného Bieleškiho pufru (0,25 až 1,0 ml) k 20 mg rostlinného pletiva. Jednotlivé extrakty byly před nanesením na MCX kolony naředěny 6x roztokem 1M kyseliny mravenčí a po přečištění pomocí SPE protokolu proměřeny LC-MS/MS metodou. Byly porovnány distribuce fytohormonů v jednotlivých variantách extraktů s modifikovaným Bieleškiho pufrům (Obr. 10A-C). Jako kontrola byla zvolena varianta neředěného rostlinného extraktu, který byl nanesen přímo na MCX sorbent a poté analyzován (Obr. 10D).

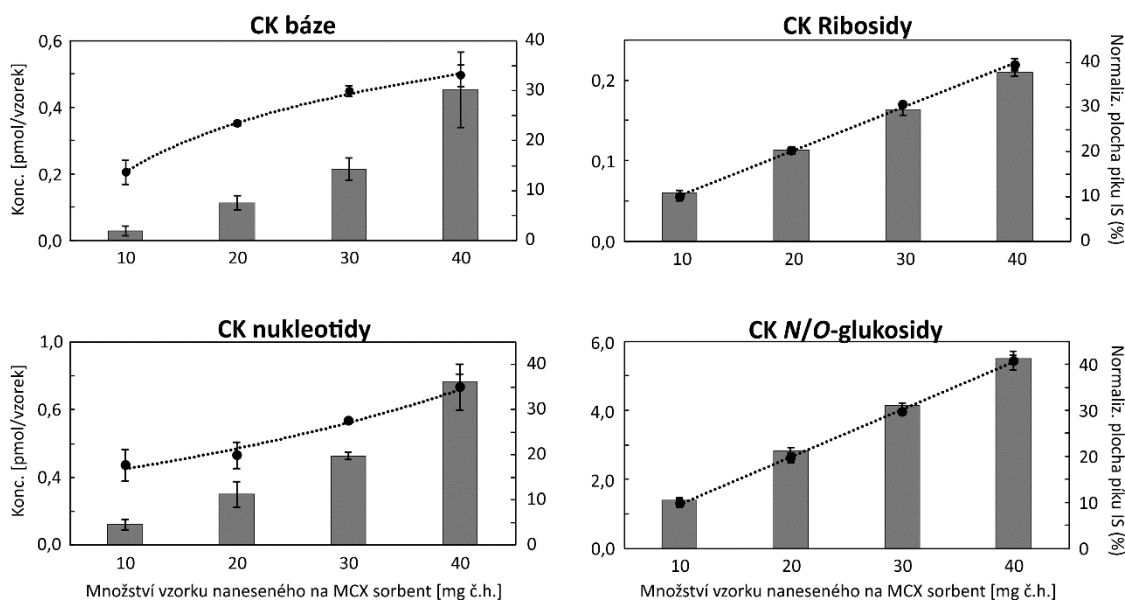


Obr. 10. Distribuce fytohormonů (v pmol/g č. h.) v rostlinném pletivu *Arabidopsis thaliana* extrahovaném v různých objemech modifikovaného Bieleškiho pufru (0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml a 1,0 ml). (A) Distribuce metabolitů cytokininů v jednotlivých extrakčních objemech, (B) distribuce cytokininových typů v jednotlivých extrakčních objemech, (C) distribuce auxinů v jednotlivých extrakčních objemech, (D) distribuce fytohormonů v nezřaděných objemech extrakčního činidla (ozn. *). Experiment byl proveden ve třech opakováních.

Při porovnání jednotlivých variant u měření cytokininů (Obr. 10A a B) nejsou patrné viditelné rozdíly. U auxinů jsou rozdíly poněkud větší, což však mohlo být způsobeno odchylkou při měření. Kapacita extrakce 20 mg č h. v 0,25 ml extrakčního činidla je tedy stejně dostačující jako při použití 1,0 ml.

4.3 Optimalizace množství nanášeného vzorku

V tomto experimentu byl vytvořen jednotný extrakt (popsáno v kapitole 3.4.4), který byl následně rozdělen na jednotlivé objemové varianty (0,25, 0,5, 0,75 a 1,0 ml), které

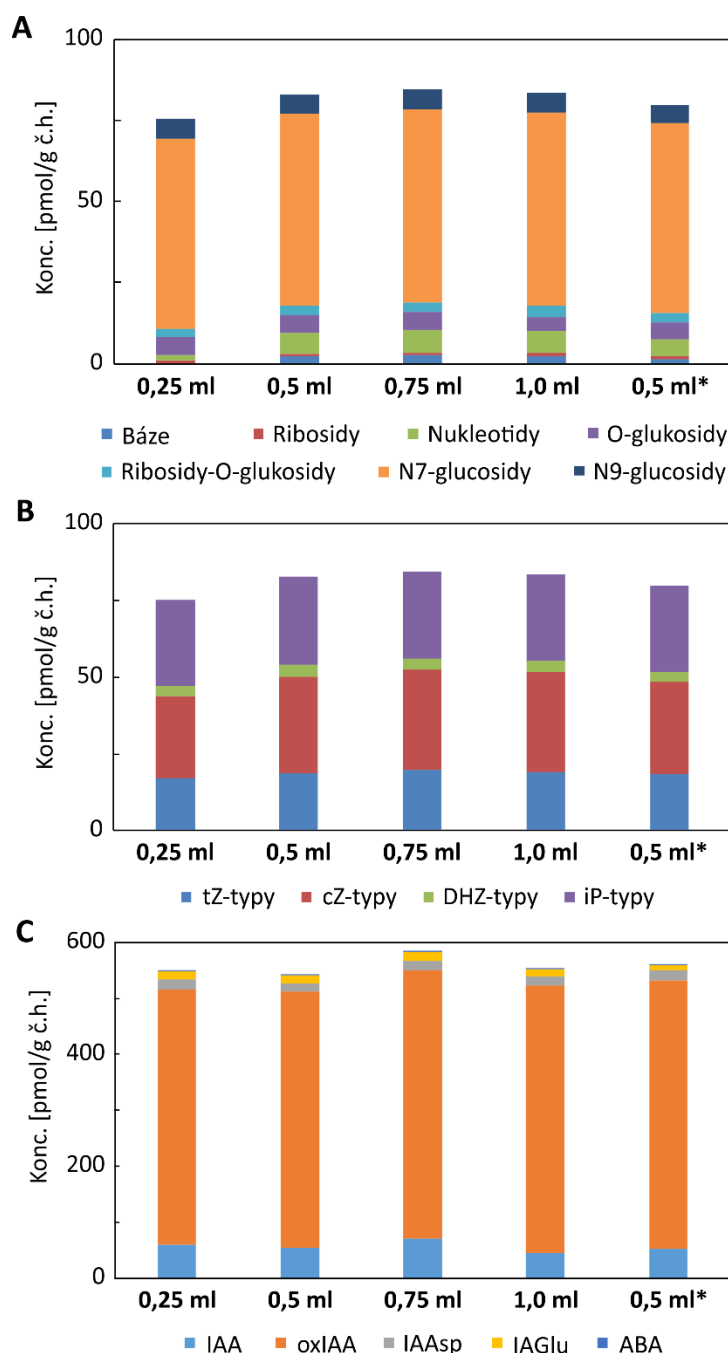


Obr. 11. Porovnání vlivu matrice při nanesení různého množství rostlinného materiálu (10, 20, 30 a 40 mg č. h.) na SPE kolonu plněnou 30 mg MCX sorbentu. Sloupcové grafy zobrazují hodnoty endogenních hladin CK metabolitů v pmol/vzorek (průměru ± směr. odchylka; n = 3). Křivky vyjadřují nárůst MS signálu přidávaných interních standardů (IS) vyjádřených jako plochy píků normalizované na celkovou odezvu každého IS (v %).

obsahovaly 10, 20, 30 a 40 mg rostlinného pletiva. Vzorky byly zředěny 6x 1M kyselinou mravenčí a následně nanášeny na MCX kolony. Jako kontrolní experiment byl opět nanesen nezředěný extrakt modifikovaného Bieleškiho pufru (Hoyerová et al., 2006) obsahující 20 mg č. h. v 0,5 ml 75% MeOH a 5% FA.

Jak je patrné z Obr. 11, aplikace narůstajícího množství biologického materiálu na MCX sorbent vyvolává slabý matriční efekt, který by mohl ovlivnit LC-MS/MS stanovení cytokininových metabolitů. Porovnáním naměřených ploch přidávaných interních standardů vidíme klesající MS odezvu, která byla úspěšně redukována pomocí metody izotopového zředování. Což dokazuje lineárně vzrůstající signál koncentrací CK metabolitů bez normalizace na množství použitého rostlinného materiálu (vyjádřeno jako množství CK metabolitů ve fmol na vzorek). Tyto výsledky ukazují dostatečnou kapacitu MCX sorbentu (30 mg) při práci s rostlinnou matricí (Obr. 11).

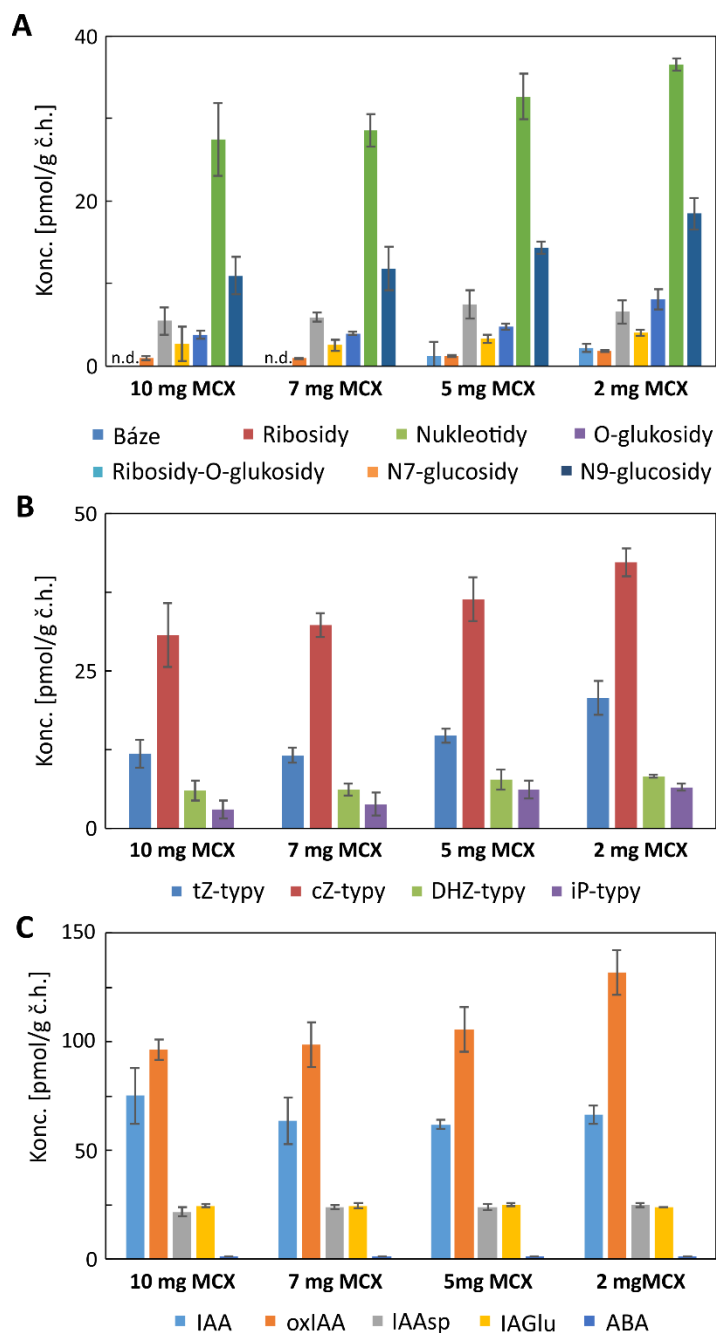
Ve výsledcích profilů cytokininových metabolitů (Obr. 12A) lze vidět vyšší koncentrace CK metabolitů u vyšších aplikovaných objemů, což odpovídá vyššímu množství nanesené rostlinné matrice na SPE kolonu. Rozdíl ve výsledných CK profilech jsou hlavně z důvodů nízkého počtu detekovaných CK bazí a nukleotidů v 0,25 ml extrakčního činidla naneseného na MCX sorbent. Celkové profily isoprenoidních CK typů se neměnily (Obr. 12B). U auxinů (Obr. 11C) nevykazovaly metabolické profily větší rozdíly. Drobná variabilita výsledků mohla být způsobena aplikováním stejného protokolu na různé druhy fytohormonů a tedy různou návratností SPE postupu pro různé analyty.



Obr. 12. Endogenní hladiny fytohormonů (v pmol/g č. h.) v *Arabidopsis thaliana* extrahované v modifikovaném Bieleškiho pufru, který byl nanesen na MCX sorbent v různých objemových variantách (0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml a 1,0 ml). (A) Koncentrace metabolitů cytokininů v jednotlivých extrakčních objemech, (B) koncentrace cytokininových typů v jednotlivých extrakčních objemech, (C) koncentrace auxinů v jednotlivých extrakčních objemech. Sloupcové grafy zobrazují sumy průměru endogenních hladin vybraných skupin fytohormonů (n = 3); ozn. *: rostlinný extrakt nezředěný 6x 1M kyselinou mravenčí.

4.4 Disperzivní SPE ve zkumavce

Byla rozebrána MCX kolona, sorbent byl rozvážen po různých množstvích do plastových mikrozkušavek a podle postupu v kapitole 3.4.5 bylo připraveno disperzivní uspořádání SPE protokolu. Zároveň byl rozvážen rostlinný materiál po 10 mg č. h. a extrahován v 0,5 ml modifikovaného Bieleškiho pufru. Výsledný supernatant byl opět 6x zředěn 1M kyselinou mravenčí, přidán k rozváženému sorbentu a přečištěn (kapitola 3.4.5).



Obr. 13. Endogenní koncentrace fytohormonů (v pmol/g č. h.) stanovené v 10 mg rostlinného pletiva *Arabidopsis thaliana* extrahovaných v 0,5 ml modifikovaného Bieleškiho pufru a aplikovaných k různým navážkám MCX sorbentu (2, 5, 7 a 10 mg) v disperzivním uspořádání SPE. (A) Suma koncentrací metabolitů cytokininů, (B) suma koncentrací jednotlivých cytokininových typů a (C) koncentrace auxinových metabolitů v různých navážkách sorbentu. Sloupcové grafy zobrazují hodnoty průměru \pm směr. odchylka ($n = 3$); n.d.: pod limitou detekce.

Z výsledných naměřených endogenních koncentrací (Obr. 13) vychází nejlépe použití 2 mg sorbentu MCX. Avšak rozdíl není velký a podle experimentálních zkušeností byl spíše dán ztrátami sorbentu během SPE protokolu (např. odpipetování sorbentu společně s promývacími činidly). Důležité je také zjištění, že při práci s různými navážkami MCX sorbentu se nemění samotná distribuce fytohormonů. Z důvodů minimalizování vlivu

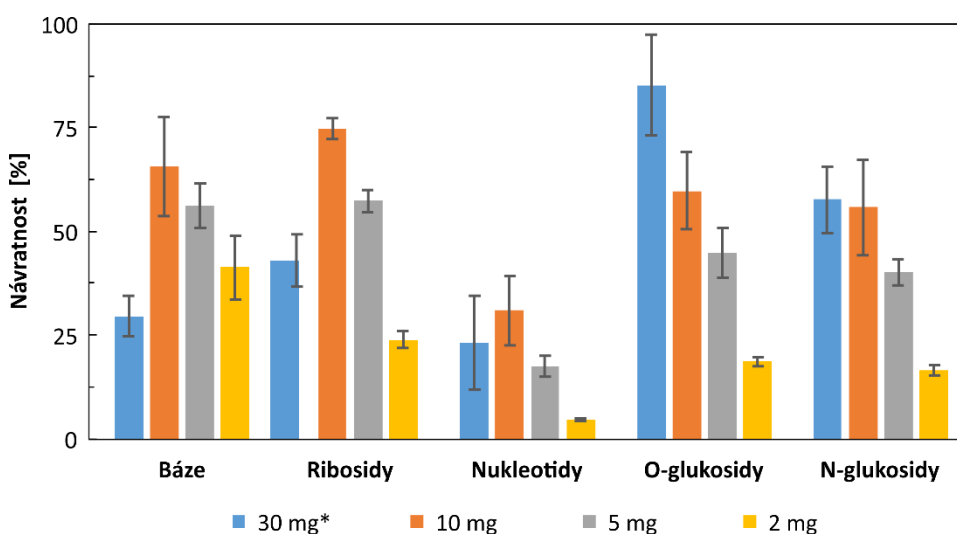
pipetování a ztrát sorbentu během SPE purifikace byl navržen inovativní postup využívající práci v uspořádání disperzivní SPE na mikrospin filtru.

4.5 Disperzivní SPE na mikrospin filtru

Do plastové mikrozkušavky bylo rozváženo 100 mg sorbentu MCX, který byl dále zpracován podle postupu v kapitole 3.4.6. Suspenze obsahující sorbent byla poté rozdělena po 100 μ l, 50 μ l a 20 μ l do mikrozkušavek obsahující mikrospin filtry. Dále bylo rozváženo 20 mg č. h. do plastových mikrozkušavek a extrahováno v 0,5 ml 10% methanolu a 5% kyseliny mravenčí (viz kapitola 3.4.2). Jednotlivé supernatanty byly nakonec přidány k suspenzím s nakondicionovaným MCX sorbentem a metodou LC-MS/MS byly změřeny cytokininové profily.

Byly porovnány návratnosti interních standardů CK metabolitů (Obr. 14) pro konvenční SPE metodu využívající MCX sorbenty plněné v kolonách (30mg/1ml) s návratnostmi disperzivní SPE pracující s 2, 5 a 10 mg MCX sorbentu. Jak je patrné z výsledků, aplikace 10 mg sorbentu v disperzivním SPE uspořádání umožnila až dvakrát účinnější izolaci cytokininových bazí a ribosidů. Srovnatelné návratnosti byly získány pro CK nukleotidy a *N*-glukosidy, zatímco u CK *O*-glukosidů bylo kolonové SPE uspořádání během izolace analytů z rostlinné matrice účinnější.

Také nižší variabilita LC-MS/MS výsledků disperzivního SPE na mikrospin filtru ve srovnání s optimalizací ve zkumavce (kapitola 4.4) potvrzuje praktickou využitelnost nového přístupu při izolaci rostlinných hormonů.



Obr. 14. Návratnosti (%) interních standardů cytokininových metabolitů přidávaných v průběhu extrakce 20 mg č. h. *Arabidopsis thaliana* v 0,5 ml 10% methanolu okyseleného 5% kyselinou mravenčí a izolovaných pomocí konvenční SPE (* kolona 30 mg/1 ml) a disperzivní SPE s různými navážkami MCX sorbentu (2, 5 a 10 mg). Sloupcové grafy zobrazují hodnoty průměru \pm směrnou odchylku ($n = 3$).

5 DISKUZE

V předložené bakalářské práci byla ověřována účinnost a funkčnost metod používaných pro extrakci a izolaci vybraných rostlinných hormonů ze skupiny cytokininů, auxinů a kyseliny abscisové. Byly optimalizovány podmínky extrakce (volby vhodného činidla, jeho extrakční kapacita a množství nanášeného vzorku) a zkoušeny různé podmínky disperzivní SPE (hlavně mikrozkumavkové nebo mikrofiltrační uspořádání).

Při optimalizaci extrakčního činidla byly testovány různé varianty methanolických roztoků. Roztoky obsahovaly vzrůstající koncentraci methanolu (25% – 75%) a některé byly okyselené kyselinou mravenčí (výsledná koncentrace 5%) (Hoyerová et al., 2006). Současně byl jako reference použit Bieleškiho pufr obsahující chloroform (Bieleški, 1964). Byly porovnávány endogenní CK profily u jednotlivých variant extrakčních pufrů. Okyselené methanolické roztoky ukázaly podobné výsledky jako extrakce do Bieleškiho pufru (Obr. 9A), avšak neokyselené extrakty obsahovaly vyšší koncentrace CK bazí, ribosidů a nukleotidů. Jak bylo již dříve ukázáno, k hydrolyze CK nukleotidů dochází více v neokyselených methanolických činidlech než v modifikovaném Bieleškiho pufru (75% MeOH a 5% FA) a v Bieleškiho pufru s chloroformem (Hoyerová et al., 2006). Horgan a Scott (1987) prokázali, že adenosinmonofosfát byl rychleji hydrolyzován na adenosin v 80% methanolu než v modifikovaném Bieleškim pufru. Navíc při použití Bieleškiho pufru bez chloroformu dochází ke snížení extrakce kontaminujících látek, je usnadněna manipulace a následná likvidace extraktů obsahujících chloroform (Wang et al., 1995; Jones et al., 1996; Lighfoot et al., 1997).

Extrakce v kyselé oblasti pH potlačuje defosforylaci cytokininových nukleotidů. Z těchto důvodů je modifikovaný Bielešského pufr vhodnější pro extrakci cytokininů (Hoyerová et al., 2006). Proto byla dále testována jeho extrakční kapacita a porovnávány hormonální profily u 20 mg rostlinného pletiva extrahovaného v různých objemech okyseleného methanolického činidla. Výsledné distribuce všech vybraných skupin fytohormonů byly velmi podobné (Obr. 10). Výsledky ukázaly na dostatečnou kapacitu extrakčního pufru v celém testovaném rozmezí (0,25 až 1,0 ml;), avšak absolutní množství nanášeného vzorku je také kritický parametr (Svačinová et al., 2012). Byl tedy testován vliv množství rostlinné matrice nanášené na 30 mg MCX sorbentu a získané profily byly mezi sebou porovnány. Porovnání výsledných profilů ukázalo snížení počtu detekovaných CK metabolitů (CK bazí a CK nukleotidů; Obr. 12). To potvrzuje nutnost zavádění nových metodických a inovativních analytických přístupů při analýze fytohormonů (Novák et al., 2017). Výsledky však ukázaly minimální vliv rostlinné matrice na detekovaný MS signál

a dokázaly tak dříve publikovanou kapacitu Oasis sorbentů při práci s rostlinným pletivem (Novák et al, 2012).

V poslední fázi bakalářské práce byly tedy optimalizovány podmínky purifikačního protokolu při použití disperzivní SPE. Bylo testováno množství sorbentu potřebného k přečištění rostlinného materiálu a také možná technická provedení SPE protokolu. První experiment ověřil využitelnost disperzivního uspořádání při profilování cytokininů, auxinů a ABA z rostlinné matrice (Obr. 13). Práce ve zkumavce se ale ukázala být nevhodnou a proto byl navržen nový protokol pracující s mikrospin filtry vloženými do mikrozukavky. Ve srovnání s klasickým MCX protokolem (Dobrev a Kamínek, 2002) poskytuje toto technické uspořádání v prostředí rostlinné matrice srovnatelné výsledky (Obr. 14). Pro CK báze a ribosidy bylo dokonce dosaženo lepších výsledků.

Disperzivní SPE je založena na disperzivním procesu a využívá pevné sorbenty. Je považována za účinnou metodu pro extrakci, purifikaci, čištění a analýzu konkrétních látek v komplexních maticích (Nováková a Vlčková, 2009). Na rozdíl od klasického kolonového přístupu minimalizuje kroky odstředování a filtrace. Při využití pevných sorbentů dochází k přímějšímu kontaktu mezi analytem a absorpcí, což zlepšuje retenci analytu. Dochází k minimalizaci spotřeby rozpouštědla a množství sorbentu. Disperzivní SPE je tedy považována za levnější a účinnější metodu než klasická SPE (Islas et al., 2017).

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se ve své teoretické části zabývala odbornou rešerší na téma rostlinných hormonů, jejich biosyntézy a metabolismu. Také byly shrnuty metody izolace a purifikace vybraných skupin fytohormonů z rostlinné matrice a využití hmotnostní spektrometrie při jejich stanovení.

V rámci experimentální části byl optimalizován extrakční a purifikační protokol z hlediska složení extrakčního činidla, extrakční kapacity a nanášení vzorku na SPE kolony obsahující polymerní sorbent se smíšeným mechanismem retence (Oasis[®] MCX). Dále bylo srovnáno klasické kolonkové uspořádání s disperzivní SPE, která byla provedena jak ve zkumavce tak na microspin filtru.

Při optimalizaci složení extrakčního činidla byly změřeny nejvyšší výsledné koncentrace fytohormonů v modifikovaném Bieleskiho pufru, který byl doteď používán nejčastěji pro extrakci fytohormonů. Výsledky práce s neokyseleným methanolickým roztokem naznačují možnost hydrolýzy CK nukleotidů na příslušné báze a ribosidy, popř. možnou enzymatickou aktivitu přítomných fosfatas, která by měla být dále studována.

U optimalizace extrakční kapacity nebyly patrné žádné viditelné rozdíly v naměřených koncentracích u žádných ze sledovaných analytů. Objem extrakčního činidla tedy nehraje zásadní roli při izolaci fytohormonů z rostlinné matrice. Experiment nanášení vzorků ukázal nižší počet detekovaných CK metabolitů, což naznačuje nevhodnost použití standardních SPE protokolů v klasickém kolonovém uspořádání při práci s nízkými navažkami.

Disperzivní SPE se ukázala jako vhodnější varianta při extrakci a purifikaci vybraných fytohormonálních skupin. Metoda byla časově méně náročná, obsahovala méně kroků nutných k přečištění extraktů a stačilo pouhých 10 mg MCX sorbentu místo celé SPE kolonky obsahující 30 mg MCX. V případě používání nového protokolu by mělo být dosaženo celkového zrychlení metodiky izolace rostlinných hormonů a snížených finančních nákladů za laboratorní materiál potřebných k práci.

7 SEZNAM LITERATURY

- 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.
- Akiyoshi D.E., Klee H., Amasino R.M., Nester E.W., Gordon M.P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 5994–5998.
- Anumol T., Lehotay S.J., Stevens J., Zweigenbaum J. (2017) Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole–time-of-flight tandemmass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. *Anal Bioanal Chem* **409**, 2639–2653.
- Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 4776–4780.
- Bartel B., Fink G.R. (1994) Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6649–6653.
- Bartling D., Seedorf M., Mithofer A., Weiler E.W. (1992) Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem* **205**, 417–424.
- Bielecki R.L. (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal Biochem* **9**, 431–442.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051–1054.
- Busetti F., Swann L. (2013) Liquid chromatography-Mass Spectrometry. In: Houck M., editor. *Forensic chemistry (Advanced forensic science series)*, Elsevier, Amsterdam pp. 590–595.
- Campanoni P., Nick P. (2005) Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol* **137**, 939–948.
- Caplin S.M., Steward F.C. (1948) Effect of coconut milk on the growth of the explants from carrot root. *Science* **108**, 655–657.
- Casanova E., Trillas M.I., Moysset L., Vainstein A. (2005) Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnol Adv* **23**, 3–39.

- Cornforth J.W., Milborow B.V., Ryback G., Wareing P.F. (1966) Isolation of Sycamore Dormin and Its Identity with Abscisin II. *Tetrahedron* **22**, 603–610.
- Davies P.J. (2004) *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL. pp. 1–155
- Di D.W., Zhang C., Luo P., An Ch.W., Guo G.Q. (2015) The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant Growth Regul* **78**, 275–285.
- Dobrev P.I, Kaminek M. (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxins and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J Chromatogr A* **950**, 21–29.
- Dong T., Park Y., Hwang I. (2015) Abscisic acid: biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling. *Essays Biochem* **58**, 29–48.
- Engelberth J., Schmelz E.A., Alborn H.T., Cardoza Y.J., Huang J., Tumlinson J.H. (2003) Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Biochem* **312**, 242–250.
- 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. *Biochem J* **380**, 121–130.
- Frick E.M., Strader L.C. (2018) Roles for IBA-derived auxin in plant development. *J Exp Bot* **69**, 169–177.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidase/dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J Plant Growth Reg* **26**, 255–267.
- Gaudin V., Jouanin L. (1995) Expression of *Agrobacterium rhizogenes* auxin biosynthesis genes in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* **28**, 123–136.
- Haberlandt G. (1913) Zur physiologie der zellteilung. *Sitzungsber Akad Wiss Berlin Phys Math CI*, 318–345.
- Harrison S.T.L. (2011) Cell disruption. In: Moo-Young M ed *Comprehensive biotechnology*, 2nd edn. Elsevier, Oxford, pp 619–640.
- Hilman J.R. (1978) *Isolation of plant growth substances*. Cambridge University Press, London.
- Hirai N., Yoshida R., Todoroki Y., Ohigashi H. (2000) Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 1448–1458.

- Hluska T., Šebela M., Lenobel R., Frébort I., Galuszka P. (2017) Purification of maize nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase casts doubt on the existence of zeatin *cis*–*trans* isomerase in plants. *Front Plant Sci* **8**, 1473.
- Hopkins G.W., Hüner P.A.N. (2008) *Introduction to plant physiology*, 4th ed. Hoboken NJ:JohnWiley.
- Horgan R., Scott I.M. (1987) Cytokinins. In: Rivier L., Crozier A. (Eds.), *The Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. Academic Press, London, pp. 304–365.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P.I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006) Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**, 1151–1159.
- Chernys J.T., Zeevaart J.A. (2000) Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiol* **124**, 343–353.
- Islas G., Ibarra I.S., Hernandez P., Miranda J.M., Cepeda A. (2017) Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: a review. *Int J Anal Chem* **8215271**, 1–16.
- Jones L.H., Martínková H., Strnad M., Hanke D.E. (1996) Occurrence of aromatic cytokinins in oil palm. *J Plant Growth Regul* **15**, 39–49.
- Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**, 677–685.
- Kamínek M. (2015) Tracking the Story of Cytokinin Research. *J Plant Growth Reg* **34**, 723–739.
- Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C. (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* **64**, 2541–2555.
- Kowalczyk M., Sandberg G. (2001) Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid Metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 1845–1853.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyozuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152–3169.

- Laureys F., Dewitte W., Witters E., Van Montagu M., Inzé D., Van Onckelen H. (1998) Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett.* **426**, 29–32.
- Lehotay S.J. (2011) QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. *Methods Mol Biol* **747**, 65–91.
- Letham D.S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci* **8**, 569–573.
- Letham D.S. (1973) Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry* **12**, 2445–2455.
- Lighfoot D.A., McDaniel K.L., Ellis J.K., Hammerton H., Nicander B. (1997) Methods of analysis of cytokinin content, metabolism, and response. In: Dashek, W.V. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 133–152.
- Liu W.C., Carns H.R. (1961) Isolation of abscisic acid, an abscission accelerating substance. *Science* **134**, 384–385.
- Ljung K., Sandberg G., Moritz T. (2004) Methods of plant hormone analysis. In: Davies P.J., editor. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL. pp. 671–694.
- Ljung, K. (2013) Auxin Metabolism and Homeostasis during Plant Development. *Development* **140**, 943–50.
- Lomin S., Krivosheev D., Steklov M., Arkhipov D., Osolodkin D., Schmülling T., Romanov G. (2015) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J Exp Bot* **66**, 1851–1863.
- Lomin, S. N., Krivosheev D.M., Steklov M. Y., Osolodkin D.I., Romanov G.A. (2012) Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae* **4**, 31–45.
- Ludwig-Müller J. (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* **62**, 1757–1773.
- Mano Y., Nemoto K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot* **63**, 2853–2872.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K., Kamiya Y., Kasahara H. (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 18512–18517.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong F.M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* **77**, 1392.

- Mok D.W., Mok M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 89–118.
- Mok M.C., Martin R.C., Dobrev P.I., Vanková R., Ho P.S., Yonekura-Sakakibara K., Sakakibara H., Mok D.W. (2005) Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiol* **137**, 1057–1066.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473–497.
- Nafisi M., Goregaoker S., Botanga C.J., Glawischnig E., Olsen C.E., Halkier B.A., Glazebrook J. (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* **19**, 2039–2052.
- Nambara E., Marion-Poll A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 165–185.
- Nguyen D.T.T., Guillarme D., Rudaz S., Veuthey J.L. (2006) Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J Sep Sci* **29**, 1836–1848.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Doležal K., Åstot C., Sandberg G., Moritz T. (2004) Derivatization for LC-electrospray ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Anal Chem* **76**, 2869–2877.
- Normanly J. (2010) Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001594.
- Normanly J., Cohen J.D., Fink G.R. (1993) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **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 J* **72**, 523–536.
- Novák O., Napier R., Ljung K. (2017) Zooming in on plant hormone analysis: tissue- and cell-specific approaches. *Annu Rev Plant Biol* **68**, 323–348.
- Novák O., Tarkowski P., Doleža, K., Lenobel R., Strnad M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Anal Chim 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. *Anal Chim Acta* **656**, 8–35.
- Ohkuma K., Addicott F.T., Smith O.E., Thiessen W.E. (1965) The structure of abscisin II. *Tetrahedron Letters* **6**, 2529–2535.
- Ohkuma K., Lyon J.L., Addicott F.T., Smith O.E. (1963) Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science* **142**, 1592–1593.
- Ouyang J., Shao X., Li J. (2000) Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **24**, 327–333.
- Pěňčík A., Simonovik B., Petersson S.V., Henyková E., Simon S., Greenham K., Zhang Y., Kowalczyk M., Estelle M., Zažímalová E., Novák O., Sandberg G., Ljung K. (2013) Regulation of auxin homeostasis and gradients in *Arabidopsis* roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *Plant Cell* **25**, 3858–3870.
- Pollmann S., Müller A., Piotrowski M., Weiler E.W. (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 155–161.
- Popelková H., Fraaije M.W., Novák O., Frébortová J., Bilyeu K.D., Frébort I. (2006) Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *Biochem J* **398**, 113–124.
- Porco S., Pěňčík A., Rashed A., Voß U., Casanova-Sáez R., Bishopp A., Golebiowska A., Bhosale R., Swarup R., Swarup K., Peňáková P., Novák O., Staswick P., Hedden P., Phillips A.L., Vissenberg K., Bennett M.J., Ljung K. (2016) Dioxygenase-encoding *AtDAO1* gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 11016–11021.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kolektiv (1998) *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 240–269.
- Rosquete M.R., Barbez E., Kleine-Vehn J. (2012) Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Mol Plant* **5**, 772–786.
- Ruiz-Sola M.Á., Rodríguez-Concepción M. (2012) Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* **10**, e0158.
- Sakakibara H. (2004) Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. In: Davies P.J., editor. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL. pp. 95–114.

- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 431–449.
- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013) Auxin: Simply complicated. *J Exp Bot* **64**, 2565–2577.
- Schmelz E. A., Engelberth J., Alborn H.T., O'Donnell P., Sammons M., Toshima H., Tumlinson J.H. (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 10552–10557.
- Schmelz E.A., Engelberth J., Tumlinson J.H., Block A., Alborn H.T. (2004) The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *Plant J* **39**, 790–808.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina Y Manns I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J Plant Res* **116**, 241–252.
- Schwartz S.H., Qin X., Zeevaart J.A. (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* **131**, 1591–1601.
- Skoog F., Miller C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* **11**, 118–131.
- Skoog F., Thimann K.V. (1934) Further experiments on the inhibition of the development of lateral buds by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* **20**, 480–485.
- Spíchal L. (2012) Cytokinins - recent news and views of evolutionally old molecules. *Func Plant Biol* **39**, 267–284.
- Spíchal L., Raková N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmülling T., (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* **45**, 1299–1305.
- Stepanova A.N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L.M., Xie D.Y., Doležal K., Schlereth A., Jürgens G., Alonso J.M. (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177–191.
- Strader L., Bartel B. (2011) Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Mol Plant* **4**, 477–486.
- Strnad M. (1997) The Aromatic Cytokinins. *Physiol Plant* **101**, 674–88.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci USA* **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.
- Taiz L, Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*. 3rd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Taiz L, Zeiger E. (2010) *Plant Physiology*. 5th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isontenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 26405–26410.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *J Biol Chem* **279**, 41866–41872.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Āstot C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M. (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol Plant* **117**, 579–590.
- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčik J., Strnad M. (2014) Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55–76.
- Taylor H. F, Smith T.A. (1967) Production of plant growth inhibitors from Xanthophylls: a possible Source of Dormin. *Nature* **215**, 1513–1514.
- Tivendale N.D., Davies N.W., Molesworth P.P., Davidson S.E., Smith J.A., Lowe E.K., Reid J.B., Ross J.J. (2010) Reassessing the role of N-hydroxytryptamine in auxin biosynthesis. *Plant Physiol* **154**, 1957–1965.
- Tivendale N.D., Ross J.J., Cohen J.D. (2014) The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* **19**, 44–51.
- Tokunaga H., Kojima M., Kuroha T., Ishida T., Sugimoto K., Kiba T., Sakakibara H. (2012) *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J* **69**, 355–365.
- Wang J., Letham D.S., Taverner E., Badenoch-Jones J., Hocart C.H. (1995) A procedure for quantification of cytokinins as free bases involving scintillation proximity immunoassay. *Physiol Plant* **95**, 91–98.
- Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Plant Biol* **12**, 527–538.

- Wright A.D., Sampson M.B., Neuffer M.G., Michalczuk L., Slovin J.P., Cohen J.D. (1991) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize *orange pericarp*, a tryptophan auxotroph. *Science* **254**, 998–1000.
- Wu N., Clausen A.M. (2007) Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *J Sep Sci* **30**, 1167–1182.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K. (2001) The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* **42**, 1017–1023.
- Zhang K., Letham D.S., John P.C.L. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histidine kinase. *Planta* **200**, 2–12.
- Zhang X., Chen Y., Lin X., Hong X., Zhu Y., Li W., He W., An F., Guo, H. (2013) Adenine phosphoribosyl transferase 1 is a key enzyme catalyzing cytokinin conversion from nucleobases to nucleotides in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **6**, 1661–1672.
- Zhao Y. (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol Plant* **5**, 334–338.
- Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R., Goss K.A., Alonso J., Ecker J.R., Normanly J., Chory J., Celenza J.L. (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* **16**, 3100–3112.
- Zürcher E., Müller B. (2016) Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function—Advances and New Insights. *Int Rev Cell Mol Biol* **324**, 1–38.