Chem. Listy *106*, 373−379 (2012) Referát

NOVÉ TRENDY V ANALÝZE FYTOHORMONŮ

KATEŘINA PODLEŠÁKOVÁ[a], DANUŠE TARKOWSKÁ[b], ALEŠ PĚNČÍK[b], JANA OKLEŠŤKOVÁ[b], VERONIKA TUREČKOVÁ[b], KRISTÝNA FLOKOVÁ[b] a PETR TARKOWSKI[a]

[a] Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, [b] Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
katka.podlesak@seznam.cz

Došlo 24.2.12, přijato 29.3.12.
Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, brassinosteroidy, kyselina jasmonová, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

Obsah

1. Úvod
2. Auxiny
3. Cytokininy
4. Gibereliny
5. Kyselina abscisová
6. Brassinosteroidy
7. Kyselina jasmonová
8. Hormonomická analýza
9. Závěr

1. Úvod

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou nízkomolekulární látky, které se zásadním způsobem podílejí na regulaci růstu a vývoje rostlin. Hrají nezastupitelnou roli v komunikaci mezi buňkami, pletivy a orgány v průběhu celého životního cyklu rostlin. Je možné je označit za integrátory vnějších a vnitřních signálů. Jednotlivé hormony neregulují vývojové procesy samostatně, ale velmi často společně s dalšími hormony, přičemž účinky bývají jak synergické, tak antagonické. Vedle fytohormonů se v rostlinách vyskytují látky s růstově regulační aktivitou. Od fytohormonů se liší zejména vyššími koncentracemi a méně obecnými účinky. V této práci jsou stručně shrnuty nové trendy v analýze fytohormonů auxinů, cytokininů, giberelinů, brassinosteroidů, kyseliny abscisové a jasmonátů. Jasmonáty řadíme do skupiny látek s růstově regulační aktivitou.

Analýza fytohormonů je pro analytika výzvou hned z několika důvodů. Fytohormony se v rostlinných pletivech vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (pg–ng/g čerstvé hmoty) společně s molekulami podobných fyzikálně-chemických vlastností. V jedné skupině fytohormonů se přitom nachází i několik desítek derivátů, jež se mezi sebou v mnoha ohledech liší. Jedná se o různé konjugáty se sacharidy či aminokyselinami, často o isomery s významně odlišnou biologickou aktivitou. Z těchto důvodů se k analýze fytohormonů nejčastěji používají spojené techniky, které vynikají separační účinností chromatografických či elektromigračních metod a současně selektivitou a citlivostí hmotnostně spektrometrické detekce. Dříve hojně používanou GC-MS postupně nahrazuje LC-MS; v posledních letech zejména ultraúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS). Nevýhodou GC je nutnost derivatizovat netěkavé analyty, což zvyšuje časovou náročnost metody. V posledních letech se stále častěji i v analýze fytohormonů uplatňuje spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS).

2. Auxiny

Mezi fyziologické procesy, které auxiny ovlivňují, patří například stimulace buněčného dělení, dlouživý růst stonků, větvení kořenů, apikální dominance, fototropismus, geotropismus nebo zrání plodů. Stejně jako cytokininy inhibují senescenci.

Pro strukturu všech auxinů je společný aromatický skelet s karboxylovou skupinou v postranním řetězci. Nejdůležitějším zástupcem přirozených auxinů je kyselina indolyl-3-octová (IAA). Další látky auxinové povahy, jako kyseliny 4-chlor-indolyloctová (4-Cl-IAA), indolyl-3-máselná (IBA) nebo fenyloctová (PAA), se vyskytují v rostlinách v daleko menších množstvích a jejich význam je spíše okrajový. Ve většině případů, kdy je řeč o analýze auxinů, je míněna právě kyselina indolyl-3-octová (tzv. „volná IAA“), případně její deriváty a konjugáty s aminokyselinami nebo cukry, které hrají důležitou úlohu v biosyntéze a regulaci hladiny volné kyseliny v rostlině.

Pro extrakci se nejhojněji používá methanol[1,3], případně pufr o neutrálním pH (cit.[3,4]). Předností organických rozpouštědel je výborná rozpustnost analytu, výhodou pufru zase nižší kontaminace extraktu pigmenty a dalšími nepolárními balastními látkami.

Nejčastěji, zvláště pokud jde o zvládnutí většího počtu analýz v relativně krátkém čase (tzv. „high throughput analysis“), je užívána HPLC-MS. Vysoké citlivosti a selektivity je dosahováno zejména spojením HPLC s tande-

movou hmotnostní detekcí (MS/MS)[5,6]. Pomocí HPLC-ESI-MS/MS byly například analyzovány konjugáty IAA s některými aminokyselinami v rýži[7]. Derivatizace v případě kapalinové chromatografie sice není nutná, s jejím použitím je však možné získat metodu s velmi vysokou citlivostí a selektivitou pro analýzu metabolitů IAA. To pak umožňuje v rostlinném materiálu kvantifikovat i konjugáty IAA s aminokyselinami alaninem (IA-Ala) nebo leucinem (IA-Leu) na úrovni jednotek pg na gram čerstvé hmoty[8]. Další pokrok byl zaznamenán v roce 2009, kdy byly metodou HPLC-ESI-MS/MS identifikovány nové konjugáty IAA s glycinem, valinem a fenylalaninem[4].

3. Cytokininy

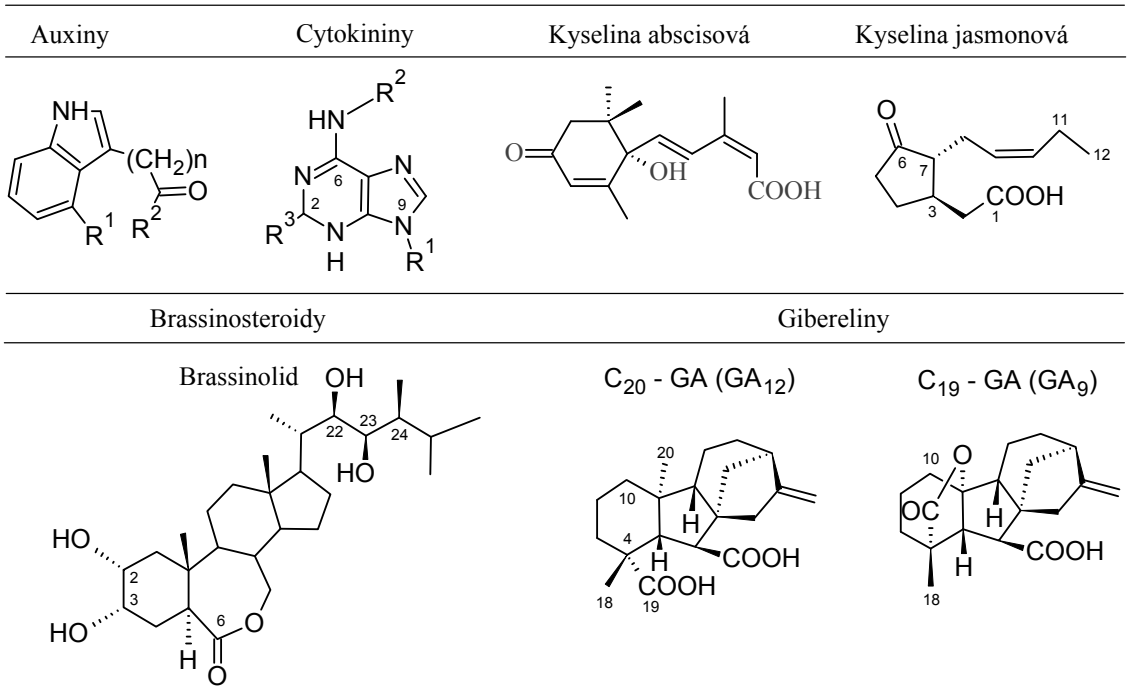
Cytokininy se podílejí na regulaci buněčného dělení, klíčení semen, tvorby laterálních pupenů, stárnutí rostlinných pletiv a v neposlední řadě regulují apikální dominanci. Některé cytokininové deriváty navíc vykazují protinádorovou aktivitu[9].

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou N^6 substituované deriváty adeninu (viz obr. 1). Substituent R^2 může být buď aromatický, jako je tomu u benzyladeninu (R^2 = benzyl), popř. *ortho*- či *meta*- topolinu (R^2 = *o*-/*m*-hydroxybenzyl), nebo izoprenoidní a potom se jedná o isopentenyladenin (iP), který může být hydroxylovaný na vedlejším řetězci (zeatin; Z), a to v pozici *cis* (*c*Z) nebo *trans* (*t*Z). Celá sloučenina se může vyskytovat ve formě bazí (R^1-H), nukleotidů (R^1-ribosa-fosfát) popř. *N*- a *O*-glukosidů. Pozice C2 adeninového skeletu může být dále modifikovaná methylthioskupinou (R^3-methylthio). Nejvyšší biologickou aktivitu vykazují volné báze.

Při extrakci cytokininů z rostlinných pletiv se nejčastěji užívá methanol či vícesložková extrakční směs podle Bieleského (methanol-chloroform-kyselina mravenčí-voda; 12:5:1:2)[10]. Nevýhodou tohoto rozpouštědla je, že chloroform zvyšuje extrakci lipofilních molekul, které mohou komplikovat následné čištění. Z tohoto důvodu se v posledních letech používá extrakční směs obsahující pouze methanol, kyselinu mravenčí a vodu (15:1:4)[11].

Čistící proces dnes zahrnuje výhradně extrakci tuhou fází (SPE). Používají se nepolární sorbenty (C18), iontoměniče, případně směsné sorbenty nesoucí vlastnosti obou[12,13]. Novinkou v uspořádání SPE je nahrazení náplňových kolonek křemennými kapilárami obsahujícími polymerní monolyty (PMME, polymer monolyth microextraction)[14]. Nejselektivnějším čistícím krokem je imunoafinitní extrakce[15,16].

Dříve hojně používanou techniku koncové analýzy, GC-MS[17], postupně nahradila LC-MS[13,18]. Použití analytických kolon s částicemi menšími než 2 μm (UHPLC) výrazně zkrátilo dobu analýzy[19]. Cytokininy tvoří, z hlediska polarity, velmi rozmanitou skupinu fytohormonů. Cytokininové nukleotidy (di- a trifosfáty) a 2-methylthio-deriváty se významně liší od klasických cytokininů svou polaritou, a proto jsou analyzovány pomocí LC-MS samostatně, zejména proto, aby bylo dosaženo dokonalé



Obr. 1. **Základní strukturní vzorce jednotlivých skupin fytohormonů**

separace všech isomerů[20,21]. Derivatizace esterifikací umožňuje analyzovat polární cytokininové monofosfáty, společně s hydrofobními volnými bázemi, ribosidy, *N*-glukosidy a *O*-glukosidy v jediné chromatografické analýze[22]. Vedle kapalinové chromatografie se stále více prosazuje i kapilární elektroforéza. Slouží nejen ke stanovování fyzikálně-chemických konstant cytokininů, ale i ke stanovení jejich endogenních koncentrací v relevantním biologickém materiálu[15].

4. Gibereliny

Gibereliny (GA) regulují indukci klíčení semen přerušením jejich dormance (období vegetačního klidu), indukci kvetení a taktéž indukci dlouživého růstu stonku zvýšením intenzity buněčného dělení. Nicméně z velkého počtu již identifikovaných giberelinů (v současnosti přes 130) je jen malá část biologicky aktivní (GA_3, GA_1 a GA_4), zbývající vznikají degradací biologicky aktivních GA, popř. reprezentují meziprodukty biosyntézy[23]. Po strukturní stránce jsou GA tetracyklické diterpenoidní karboxylové kyseliny (pKa ≈ 4,0) obsahující *ent*-giberelanový (obsahuje 20 atomů uhlíku, viz obr. 1) nebo 20-nor-*ent*-giberelanový skelet (obsahuje jen 19 uhlíkových atomů), tj. ve smyslu počtu uhlíků mohou být GA rozděleny do dvou skupin, a to na C_{19}-GA (např. GA_9) a C_{20}-GA (např. GA_{12}). Předpona *ent* se vztahuje ke skutečnosti, že skelet GA je odvozen od *ent*-kaurenu, tetracyklického uhlovodíku, který je enantiomerní k přirozeně se vyskytující sloučenině kaurenu.

Účinnost extrakce GA z rostlinných pletiv závisí na jejich subcelulární lokalizaci a současně se také mění s polaritou molekuly giberelinu samotného, která je v rámci této skupiny rostlinných hormonů velmi rozdílná. Dříve používaná extrakce kapalina-kapalina byla nahrazena SPE využívající sorbentů na polymerní bázi. Gibereliny jsou, co se týče koncové analytické techniky, asi nejproblematičtější skupinou fytohormonů. Nachází se jednak ve velmi malých množstvích (obecně ng g^{-1} čerstvé hmoty) a situaci dále komplikuje fakt, že při jejich počtu větším než 130, se jejich molekuly liší strukturně jen velmi nepatrně. Ve valné většině případů se využívá kombinace hmotnostní spektrometrie s účinným chromatografickým systémem, jako je kapilární GC nebo UHPLC. Gibereliny jsou analyzovány GC-MS většinou jako methyl ester trimethylsilyl etherové deriváty[24,25]. LC-MS se pro kvatitativní analýzu GA používá až v posledních letech[26,27]. Teprve nedávno byla pro analýzu GA použita CE-MS[28]. Nedávno byl publikován přehledný referát pojednávající o biologickém významu a chemické analýze této obrovské skupiny fytohormonů[29].

5. Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je fytohormon regulující vývojové a metabolické procesy abscise a dormance v rostlinách. Důležitou regulační funkci má ABA za stresových podmínek, tj. sucha, chladu, nevhodných osmotických podmínek a imisí, což se projevuje několikatinásobným zvýšením její endogenní hladiny[30].

Kyselina abscisová (ABA) je seskviterpen s 15 uhlíkovými atomy a cyklickou částí v molekule. Podle orientace karboxylové skupiny na C2 uhlíku rozlišujeme *cis*- a *trans*-isomery. Většina molekul ABA v rostlinách tvoří 2-*cis*-4-*trans*-isomer, který se na světle snadno přeměňuje na 2-*trans*-4-*trans*-formu. Fyziologicky aktivní je výhradně její (+)-*S*-isomer. Kromě geometrické isomerie vykazuje molekula ABA také isomerii optickou, danou přítomností asymetrického uhlíku v pozici 1' šestičlenného cyklu molekuly. Pro izolaci ABA z rostlinného materiálu se nejčastěji používá okyselený methanol (obsah 0,5-2 % kyseliny octové, v/v) nebo 70-100% aceton[31,32]. Negativní stránkou užití methanolu je ovšem možná methanolýza a methylace vedoucí ke tvorbě methylesterů analytu. Rovněž 40% ethanol, voda[33] či okyselený isopropanol (1% kys. octová, v/v)[34] se uplatnily jako velmi účinná extrakční činidla. Typickým krokem následujícím po extrakci vzorku a odstranění pevného podílu centrifugací, je v současnosti nejvíce používaná SPE a to s nepolárními sorbenty[32,34] nebo směsnými sorbenty nesoucími charakter nepolárního sorbentu a anexu[35]. Další purifikační technikou je imunoafinitní extrakce IAE[33]. Před tou je však nutné používat částečně přečištěné extrakty (např. pomocí SPE), neboť použití hrubých extraktů by mohlo vést k rychlé degradaci IAE sorbentu. U některých derivátů ABA je možné dosáhnout vyššího výtěžku methylací[33] před IAE krokem, u některých naopak derivatizace výtěžek výrazně sníží[32]. Jednou z možností, jak kvantifikovat ABA, je využití imunoanalytických metod. V úvahu přichází zejména radioimunoanalýza (RIA)[36] a enzymová imunoanalýza (ELISA), která se překvapivě v současnosti stále používá[37] a nebyla zcela vytlačena instrumentálními metodami, jak je tomu u jiných skupin fytohormonů. Dále se k analýze ABA a jejich derivátů používají separační metody zahrnující GC a LC, a to v kombinaci s UV detekcí[38] nebo ELISA[33,39]. Jednoznačnou identifikaci ABA a jejich metabolitů umožnila až tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)[40]. Nevýhodou GC ve srovnání s LC je nutnost derivatizace analytů. Navíc vysoká teplota na GC koloně způsobuje rozklad některých termolabilních derivátů ABA (ABAGE)[41]. HPLC-MS/MS se uplatnila jak při stanovení endogenní hladiny ABA v housenčku[42], tak při studiu metabolismu ABA[43,34]; UHPLC-MS/MS pak byla použita ke kvantifikaci metabolitů ABA izolovaných ze stresovaných listů tabáku[32]. Mezi nejnovější trendy kvantitativní analýzy ABA pak patří kapilární elektroforéza (CE) s laserem indukovanou fluorescenční (LIF)[43] či UV detekcí[45].

6. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BR) představují poměrně novou skupinu rostlinných hormonů, podílejí se zejména na stimulaci růstu rostlin i dělení buněk, růstu mladých vegetativních pletiv, indukují kvetení, zrání plodů, klíčení semen,

tvorbu a růst kořenů, zvyšují rezistenci rostlin proti abiotickému i biotickému stresu. Struktura BR je podobná živočišným steroidním hormonům. Prvním izolovaným BR z pylu řepky (*Brassica napus* L.) byl v roce 1979 brassinolid [(22*R*, 23*R*, 24*S*)-2α,3α,22,23-tetrahydroxy-24-methyl--7a-homo-7-oxa-5α-cholestan-6-on] (obr. 1)[46] a do dnešní doby bylo nalezeno více než 70 přirozených BR a jejich metabolitů v různých druzích rostlin[47]. Purifikace BR je poměrně komplikovaná, což je způsobeno jednak vysokou hydrofobicitou brassinosteroidů a současně jejich nízkým obsahem ve vzorku. Pro izolace prvních přirozených BR z rostlinných vzorků byly použity vysoce citlivé biotesty, zejména biotest na druhém internodu fazole, který byl použit pro izolaci brassinolidu z pylu řepky[46], a rýžový ohybový test, díky němuž byl identifikován kastasteron v hálkách kaštanu[48].

Stanovení BR v rostlinných vzorcích je poměrně obtížné vzhledem k faktu, že jejich koncentrace je velmi nízká (pg g^{-1} čerstvé hmoty). Mezi nejpoužívanější metody pro stanovení jejich endogenních hladin patří kombinace chromatografických a imunoanalytických metod. Kvantifikace BR pomocí imunotestů je založena na kompetici BR přítomného ve vzorku se známým množstvím značeného nebo imobilizovaného BR a jejich vazbě k anti-BR protilátkám. Pro stanovení 24-epikastasteronu a příbuzných BR v koncentračním rozsahu od 0,005 do 50 pmol byla popsána enzymová imunoanalýza. Úspěšnost této metody byla v kombinaci s HPLC demonstrována při kvantitativní analýze endogenních BRs ve vzorcích fazole, mrkve, huseníčku a řepkového pylu[49].

HPLC je jedna z nejčastěji používaných metod pro separaci a analýzu BR[50]. Brassinosteroidy neobsahují žádný chromofor a tudíž není možná jejich UV detekce. Proto jsou často derivatizovány. To jednak umožní zavedení chromoforu do jejich molekuly a jednak zvýší citlivost jejich detekce ultrafialovými, fluorometrickými nebo elektrochemickými detektory. K derivatizaci se využívají nejčastěji deriváty kyseliny borité, které ovšem reagují pouze s brassinosteroidy obsahujícími vicinální dioly. Limit detekce se pak pohybuje v rozmezí 25-100 pg v závislosti na použitém derivatizačním činidle. Z reagencií používaných pro přípravu boronátů BR se zdá být nejvhodnější kyselina dansylaminofenylboritá, která umožňuje měření v nejširším spektru vlnových délek (345-515 nm) a podléhá tak v nejmenší míře interferenci s kontaminujícími látkami[51]. Pro efektivní HPLC separaci derivatizovaných BR se používají C_{18} kolony a směs acetonitril-voda jako mobilní fáze. Také byla vyvinuta HPLC metoda založená na kombinaci předkolonového značení a postkolonové fluorescenční detekce, díky níž se podařilo rozdělit 24-epimery brassinolidu a kastasteronu[52].

Vysoce citlivá a selektivní LC-(ESI)-MS metoda byla použita pro stanovení BR v rostlinných extraktech za použití C_{18} kolony o průměru 1,0 mm a chemické derivatizace volných BR jako dansyl-3-aminofenylboronátů. Limit detekce v SIM modu (sledování vybraného iontu) pro derivatizované BR byl 125 attomolů, což je nejnižší detekční limit dosažený pro BR vůbec. Praktické využití této metody pak bylo demonstrováno při transformaci deuteriem značených prekurzorů kastasteronu na brassinolid v semenáčcích huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*)[53].

7. Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová (JA) a její deriváty, souhrnně nazývány jasmonáty, se významně podílí na regulaci růstu rostlin při změně stávajících vnějších nebo vnitřních podmínek. Vznikají oxidací lipidů a stimulují obranný a adaptační mechanismus rostlinného organismu.

Po chemické stránce jsou jasmonáty sloučeniny s cyklopentanovým kruhem, nesoucím keto- či hydroxyskupinu v pozici C6. Poloha C7 na cyklopentanovém kruhu je substituována *cis*-pent-2'-enylovým řetězcem, který může být za účelem změny biologické aktivity modifikován enzymatickou redukcí dvojné vazby a hydroxylací v pozici C11 a C12. 12-OH-JA bývá zpravidla dále glykosylován či sulfonylován[54,55]. Methylace karboxylové skupiny a tvorba konjugátů s isoleucinem patří mezi nejčastější reakce metabolismu JA (cit.[56,57]).

Jasmonáty jsou snadno extrahovány do organických rozpouštědel mísitelných s vodou (methanol, ethanol, aceton). Součástí přípravy vzorku pro analýzu GC-MS je extrakce kapalina-kapalina. Karboxylové kyseliny (salicylová, jasmonová, abscisová a indol-3-octová), obsažené v organické složce rozpouštědla, mohou být dále podrobeny methylaci a po zahřátí zachyceny na polymerním nosiči. Ke studiu těkavých frakcí (MeJA) pomocí GC-MS je také hojně používána adsorpčně/desorpční technika – mikroextrakce na pevné fázi, která nevyžaduje rozpouštědla[58]. Náročnou přípravu těkavých analytů pro GC-MS nahrazuje několikastupňová purifikace rostlinného extraktu pomocí SPE kombinující nepolární (C_{18}) a iontověměnné (QAE-Sephadex, DEAE-Sephadex) fáze nebo polymerní a směsné sorbenty (Oasis® HLB; Oasis® MAX), následovaná HPLC-MS/MS.

Tradiční radioimunoanalýza (RIA) a enzymová imunoanalýza (ELISA) jsou nahrazovány HPLC-MS/MS. Tato technika umožnila mimo jiné *cis*/*trans*-stereochemickou analýzu významného jasmonoyl-isoleucinu (JA-Ile)[59]. Při nedávném studiu kinetického profilu hladin JA a od ní odvozených metabolitů v odezvě na mechanický stres, byla aplikována metoda UHPLC-TOF-MS, která vyniká chromatografickým rozlišením a nově umožňuje separovat některé isomery[60,61].

8. Hormonomická analýza

Mechanismus působení hormonů je založen na jejich interakci s odpovídajícím receptorem a následné aktivaci signální dráhy, která vede ke stimulaci cílových genů. Na základě současných poznatků se předpokládá, že signální dráhy jednotlivých fytohormonů nejsou nezávislé, ale že tvoří složitou síť vzájemně se regulujících drah. Například apikální dominance je kontrolována auxiny regulovanou

biosyntézou cytokininů[62], účinek rostlinného hormonu ethylenu na růst kořene je zprostředkován auxiny[63], cytokininy regulují distribuci auxinů v kořeni, čímž ovlivňují růst kořenových pletiv[64] a brassinosteroidy mohou stimulovat biosyntézu jasmonátů, a tím ovlivňovat reakci na stresové faktory[65].

Nedávná analýza transkriptomu za pomocí microarray techniky vnesla světlo do regulačních sítí mezi fytohormony[66] a následná analýza proteomu objasnila hormonální regulační procesy na úrovni proteinů[67,68]. Pro důkladnější pochopení regulací uvnitř složité hormonální sítě je ale zapotřebí kvantifikačních metod umožňujících stanovení koncentrací všech hormonů současně a charakterizovat tak celkový „hormonom“ rostliny[26].

Analytické metody umožňující simultální stanovení vybraných zástupců všech skupin fytohormonů (tzv. hormonomický přístup; phytohormone profiling) jsou ve srovnání s paralelním stanovením fytohormonů po skupinách (tzv. phytohormone targeting) časově úspornější a dochází k menší spotřebě vzorku. Deriváty různých skupin hormonů jsou totiž extrahovány, izolovány a kvantifikovány současně. Nevýhodou jsou potom často vyšší limity detekce a omezený počet stanovovaných derivátů v rámci dané skupiny hormonů. Tato omezení jsou způsobena výraznými rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých analytů. Pro „hormonomickou“ extrakci se používají methanol, jeho vodné roztoky, dichlorether či dichloromethan, přičemž pH roztoků je většinou neutrální nebo kyselé[69].

Stejně jako u jednotlivých skupin fytohormonů i zde se v současnosti nejvíce používá HPLC-MS/MS popř. UHPLC-MS/MS, která nahradila jak HPLC-UV-VIS[70], tak GC-MS, kdy bylo nutné fytohormony derivatizovat za použití etherického diazomethanu, popř. fluoridu boritého. S jediným purifikačním krokem byly pomocí GC-MS kvantifikovány JA a SA[71]. Taktéž s využitím GC-MS/MS byly po SPE přečištění stanoveny hladiny IAA, ABA, JA, SA v huseníčku, a to s navážkou pouhých 20-200 mg (cit.[72]). Změny hladin většího množství derivátů fytohormonů (ABA a její čtyři deriváty, IAA a IA-Asp, tZ, tZR, iP, iPR a GA_1, GA_3, GA_4 a GA_7) byly sledovány pomocí HPLC-MS/MS v průběhu termodormance u semen salátu. Tato metoda je s navážkami od 50 do 100 mg suchých semen sice citlivá, ale umožňuje stanovení pouze biologicky aktivních derivátů fytohormonů, nikoli jejich biologicky neaktivních metabolitů, popř. biosyntetických prekurzorů[6]. Pro pochopení komplexního metabolismu a jeho regulací je však nutné znát i koncentrace těchto látek. Tyto nedostatky byly částečně odstraněny zavedením jiné HPLC-MS/MS metody umožňující stanovení CK, ABA, a GA i kyseliny salicylové, JA a jejich methyl esterů během biotického a abiotického stresu v extraktech huseníčku bez jakéhokoliv přečištění[73]. Později vyvinutá UHPLC-MS/MS metoda navýšila počet stanovovaných derivátů na 43 (cit.[26]). Jedná se ovšem pouze o deriváty auxinů, CK, ABA a GA. Vlastní UHPLC-MS/MS analýze předcházela SPE. Pro zvýšení detekčního limitu byly sloučeniny se schopností poskytovat při ionizaci elektrosprejem (ESI) negativně nabité ionty (auxiny, ABA, gibereliny) derivatizovány bromcholinem za vzniku kvartérních amoniových solí, čímž získaly náboj kladný a mohly tak být stanoveny za použití mnohem citlivějšího pozitivního módu ESI-MS.

9. Závěr

Chemická analýza fytohormonů je nedílnou součástí mnoha experimentů v oblasti vývojové biologie, biochemie a fyziologie rostlin. Kvalitativní a zejména kvantitativní analýza napomáhá objasnit význam těchto nízkomolekulárních látek při regulaci vývojových procesů v rostlinách a představuje tak významný doplněk k informacím o expresi genů či proteinovém profilu. Vzhledem k tomu, že už analýza fytohormonů na úrovni celé rostliny je obtížná, je analýza na buněčné úrovni považována za nemožnou. Budoucnost spočívá v zavedení rychlých (vysoká prostupnost vzorků) a extrémně citlivých analytických metod, poskytujících informace o profilu, pokud možno, všech skupin fytohormonů nejen na orgánové[74] ale i buněčné úrovni.

Tato práce vznikla za podpory grantů KAN200380801 a *IGA PrF/2011/031*.

LITERATURA

1. Östin A., Kowalyczk M., Bhalerao R. P., Sandberg G.: Plant Physiol. *118*, 285 (1998).
2. Peters W., Ritter J., Tiller H., Valdes O., Renner U., Fountain M., Beck E.: Planta *210*, 478 (2000).
3. Nordström A. C., Eliasson L.: Physiol. Plant. *82*, 599 (1991).
4. Pěnčík A., Rolčík J., Novák O., Magnus V., Barták P., Buchtík R., Salopek-Sondi B., Strnad M.: Talanta *80*, 651 (2009).
5. Ma Z., Ge L., Lee A. S. Y., Yong J. W. H., Tan S. N., Ong E. S.: Anal. Chim. Acta *610*, 274 (2008).
6. Chiwocha S. D. S., Abrams S. R., Ambrose S. J., Cutler A. J., Loewen M., Ross A. R. S., Kermode A. R.: Plant J. *35*, 405 (2003).
7. Matsuda F., Miyazawa H., Wakasa K., Miyagawa H.: Biosci. Biotechnol. Biochem. *69*, 778 (2005).
8. Kowalczyk M., Sandberg G.: Plant Physiol. 127, 1845 (2001).
9. Voller J., Zatloukal M., Lenobel R., Doležal K., Béres T., Kryštof V., Spíchal L., Niemann P., Džubák P., Hajduch M., Strnad M.: Phytochemistry *71*, 1350 (2010).
10. Bieleski R. L.: Anal. Biochem. *9*, 431 (1964).
11. Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M.: Phytochemistry *67*, 1151 (2006).
12. Dobrev P.I., Kaminek M.: J. Chromatogr., A: *950*, 21 (2002).
13. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: Anal. Chim. Acta *480*, 207 (2003).

14. Liu Z., Wei F., Feng Y. Q.: Anal. Methods *2*, 1676 (2010).
15. Tarkowski P., Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N.: TrAC, Trends Anal. Chem. *28*, 323 (2009).
16. Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: Chem. Listy *98*, 834 (2004).
17. Moritz, T., v knize: *Mass spectrometry of plant hormones*. (Newton R. P., Watson T. J., ed.), Clarendon Press, Oxford 1996.
18. Van Rhijn J. A., Heskamp H. H., Davelaar E., Jordi W., Leloux M. S., Brinkman U. A. T.: J. Chromatogr., A *929,* 31 (2001).
19. Novák O., Hauserová E., Amaraková P., Doležal K., Strnad M.: Phytochemistry *69*, 2214 (2008).
20. Béres T., Zatloukal M., Voller J., Niemann P., Gahsche M. C., Tarkowski P., Novák O., Hanuš J., Strnad M., Doležal K.: Anal. Bioanal. Chem. *398*, 2071 (2010).
21. Tarkowski P., Václavíková K., Novák O., Pertry I., Hanuš J.,Whenham R., Vereecke D., Šebela M., Strnad M.: Anal. Chim. Acta *680*, 86 (2010).
22. Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Dolezal K., Åstot C., Sandberg G., Moritz T.: Anal. Chem. *76*, 2869 (2004).
23. Yamaguchi S.: Annu. Rev. Plant Biol. *59*, 225 (2008).
24. Moritz T., Olsen J. E.: Anal. Chem. *67*, 1711 (1995).
25. King R. W., Moritz T., Evans L. T., Junttila O., Herlt A. J.: Plant Physiol. *127*, 624 (2001).
26. Kojima M., Kamada-Nobusada T., Komatsu H., Takei K., Kuroha T., Mizutani M., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Suzuki K., Sakakibara H.: Plant Cell Physiol. *50*, 1201 (2009).
27. Varbanova M., Yamaguchi S., Yang Y., McKelvey K., Hanada A., Borochov R., Yu F., Jikumaru Y., Ross J., Cortes D., Ma C. J., Noel J. P., Mander L.,Shulaev V., Kamiya Y., Rodermel S., Weiss D., Pichersky E.: Plant Cell *19*, 32 (2007).
28. Ge L. Y., Peh C. Y. C., Yong J. W. H., Tan S. N., Hua L., Ong E. S.: J. Chromatogr., A *1159*, 242 (2007).
29. Urbanová T., Tarkowská D., Strnad M., Hedden P.: Collect. Czech. Chem. Commun. *76*, 1669 (2011).
30. Outlaw W. H.: Crit. Rev. Plant Sci. *22*, 503 (2003).
31. Ross A. R. S., Ambrose S. J., Cutler A. J., Feurtado J. A., Kermode A. R., Nelson K., Zhou R., Abrams S. R.: Anal. Biochem. *329*, 324 (2004).
32. Turečková V., Novák O., Strnad M.: Talanta *80*, 390 (2009).
33. Hradecká V., Novák O., Havlíček L., Strnad M.: J. Chromatogr., B *847*, 162 (2007).
34. Jadhav A. S., Tailor D. C., Giblin M., Ferrie A. M. R., Ambrose S. J., Ross A. R. S., Nelson K. N., Zaharia L. I., Sharma N., Anderson M., Forbert P. R., Abrams S. R.: Phytochemistry *69*, 2678 (2008).
35. Dobrev P. I., Havlíček L., Vágner M., Malbeck J., Kamínek M.: J. Chromatogr., A *1075*, 159 (2005).
36. Voisin A. S., Reidy M., Parent B., Rolland G., Redondo E., Gerentes D., Tardieu F., Muller B.: Plant Cell Environ. *29*, 1829 (2006).
37. Schmidt K., Pflugmacher M., Klages S., Maser A., Mock A., Stahl D. J.: Mol. Plant Pathol. *9*, 661 (2008).
38. Izanloo A., Condon A. G., Langridge P., Tester M., Schnurbusch T.: J. Exp. Bot. *59*, 3327 (2008).
39. Jirásková D., Poulíčková A., Novák O., Sedláková K., Hradecká V., Strnad M.: J. Phycol. *45*, 108 (2009).
40. Christmann A., Hoffmann T., Teplova I., Grill E., Muller A.: Plant Physiol. *137*, 209 (2005).
41. Schneider G., Ziethe F., Schmidt J.: Chromatographia *45*, 78 (1997).
42. López-Carbonell M., Jáuregui O.: Plant Physiol. Biochem. *43*, 407 (2005).
43. Chiwocha S. D. S., Rouault G., Abrams S. R., von Aderkas P.: Sex. Plant Reprod. *20*, 19 (2007).
44. Liu X., Ma L., Lin Y. W., Lu Y. T.:. J. Chromatogr., A *1021*, 209 (2003).
45. Assuncao N. A., Arruda S. C. C., Martinelli A. P., Carrilho E.: J. Braz. Chem. Soc. *20*, 183 (2009).
46. Grove M. D., Spencer F. G., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen J. T., Steffens G. L., Flippenanderson J. L., Cook J. C.: Nature *281*, 216 (1979).
47. Bajguz A., Tretyn A.: Phytochemistry *62*, 1027 (2003).
48. Yokota T., Adam G. (ed.): *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity, and Applications*. ACS Symp Ser 474. Amer. Chem. Soc., Washington 1991.
49. Swaczynová J., Novák O., Hauserová E., Fuksová K., Šíša M., Strnad M.: J. Plant Growth Regul. *26*, 1 (2007).
50. Gamoh K., Takatsuto S.: J. Chromatogr., A *658*, 17 (1994).
51. Gamoh K., Okamoto N., Takatsuto S., Tejima I.: Anal. Chim. Acta *228*,101 (1990).
52. Gamoh K., Takatsuto S., Ikekawa N.: Anal. Chim. Acta *256*, 319 (1992).
53. Svatoš A., Antonchick A., Schneider B.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *18*, 816 (2004).
54. Miersch O., Neumerkel J., Dippe M., Stenzel I., Wasternack C.: New Phytol. *117*, 114. (2008).
55. Gidda S. K., Miersch O., Levitin A., Schmidt J., Wasternack C., Varin L.: J. Biol. Chem. *278*, 17895 (2003).
56. Seo H. S., Song J. T., Cheong J. J., Lee Y. H., Lee Y. W., Hwang I., Lee J. S., Choi Y. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 4788 (2001).
57. Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A., Kramell R., Miersch O., Wasternack C., Solano R.: Nat. Chem. Biol. *5*, 344 (2009).
58. Lord H., Pawliszyn J.: J. Chromatogr., A *885*, 153 (2000).
59. Tamogami S., Agrawal G. K., Rakwal R.: Plant Physiol. *167*, 933 (2010).
60. Grata E., Boccard J., Guillarme D., Glauser G., Carrupt P. A., Farmer E. E., Wolfender J. L., Rudaz S.: J. Chromatogr., B *871*, 261 (2008).

61. Glauser G., Grata E., Dubugnon L., Rudaz S., Farmer E. E., Wolfender J. L.: J. Biol. Chem. *283*, 16400 (2008).
62. Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H.: Plant J. *45*, 1028 (2006).
63. Růžička K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beeckman T., Friml J., Benkova E.: Plant Cell *19*, 2197 (2007).
64. Růžička K., Šimášková M., Duclercq J., Petrášek J., Zažímalová E., Simon S., Friml J., Van Montagu M. C. E., Benková E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 4284 (2009).
65. Mussig C., Biesgen C., Lisso J., Uwer U., Weiler E. W., Altmann T.: J. Plant Physiol. *157*, 143 (2000).
66. Nemhauser J. L., Hong F. X., Chory J.: Cell *126*, 467 (2006).
67. Pawlowski T. A.: Proteomics *7*, 2246 (2007).
68. Segarra G., Casanova E., Bellido D., Odema M. A. Oliveira E.,Trillas I.: Proteomics *7*, 3943 (2007).
69. Pan X. Q., Wang X. M.: J. Chromatogr., B *877*, 2806 (2009).
70. Diopan V., Adam V., Havel L., Kizek R.: Molecules *14*, 1825 (2009).
71. Engelberth J., Schmelz E. A., Alborn H. T., Cardoza Y. J., Huang J., Tumlinson J. H.: Anal. Biochem. *312*, 242 (2003).
72. Muller A., Duchting P., Weiler E. W.: Planta *216*, 44 (2002).
73. Pan X. Q., Welti R., Wang X. M.: Phytochemistry *69*, 1773 (2008).
74. Petersson S. V., Johansson A. I., Kowalczyk M., Makoveychuk A., Wang J. Y, Moritz T., Grebe M., Benfey P. N., Sandberg G., Ljung K.: Plant Cell *21*, 1659 (2009).

K. Podlešáková[a], D. Tarkowská, A. Pěnčík[b], J. Oklešťková[b], V. Turečková[b], K. Floková[b], and P. Tarkowski[a] *([a] Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc; [b] Laboratory of Growth Regulators, Palacky University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc):* **New Trends in Phytohormone Analysis**

Phytohormones are key regulators in various physiological processes of plant growth and development. Their chemical analyses, together with their genomics and proteomics, are an integral part of plant development studies. The information on hormone levels is often valuable for biologists dealing with any hormone-regulated processes. Plant tissue is a complex multicomponent mixture containing phytohormones in minute quantities (pg or ng/g fresh weight) along with many other related compounds with similar structures and/or physicochemical properties. Therefore, their analysis requires rapid, sensitive and sufficiently selective analytical methods. The significance of solid-phase extraction for purification and hyphenated techniques such as GC-MS, LC-MS and CE-MS for routine analyses of phytohormones is discussed.