

Stanovení biologicky aktivních látek (fytohormonů) v ječmeni

Certifikovaná metodika

**RNDr. Ing. Marek Klemš, Ph.D.
Dr. Ing. Helena Fišerová
Ing. Kamila Lónová**

© Mendelova univerzita v Brně, Brno 2017

ISBN:

Dedikace:

Předložená metodika byla vypracována na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně v rámci řešení projektu TAČR TE02000177 „**Centre for innovative use and strengthening of competitiveness of Czech brewery raw materials and products**“.

Autoři**Podíl**

RNDr. Ing. Klemš Marek, Ph.D.	(50 %)
Dr. Ing. Fišerová Helena	(20 %)
Ing. Lónová Kamila	(30 %)

Oponenti:

Ing. Miloš Faltus, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6

Abstrakt:

Kvantifikace přirozených růstových regulátorů rostlin konkrétně jednotlivých bioaktivních cytokininů, ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina, prekursor ethylenu) a ABA (kyselina abscisová) v obilkách ječmene byla optimalizována použitím extrakčních a purifikačních postupů (iontoměničová chromatografie a chromatografie na reverzní fázi) a kombinovaných instrumentálních (GC a / nebo HPLC) a imunoanalytických technik (ELISA, RIA) s vysokou detekční citlivostí (pg / 50 µl). Uvedená metodika umožňuje analýzu velkého počtu vzorků. Metodika je určena k analýze obsahu bioaktivních fytohormonálních látek v produktech určených k výrobě potravin z obilovin a ve vzorcích rostlin potenciálně vhodných pro další šlechtění.

Klíčová slova: obilky ječmene, cytokininy, kyselina abscisová, chromatografie, imunoanalytické metody

Abstract:

Quantification of native plant growth regulators as individual bioactive cytokinins, ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, the precursor of ethylene) and ABA (abscisic acid) in barley kernels was optimized using of extraction and purification procedures (ion exchange chromatography and reverse phase chromatography) and combined instrumental (GC and/or HPLC) and immunoassay techniques (ELISA, RIA) with high detection sensitivity (pg / 50 µl). The described methodology enables a reliable, repeatable quantification of numerous samples with a quick and financially more accessible analysis than the latest instrumental methods. The methodology is designed to determine the content of bioactive phytohormonal substances in products for the production of food from cereals and for cereal breeders.

Key words: barley kernels, cytokinins, abscisic acid, chromatography, immunoassays

OBSAH

1. Cíl metodiky

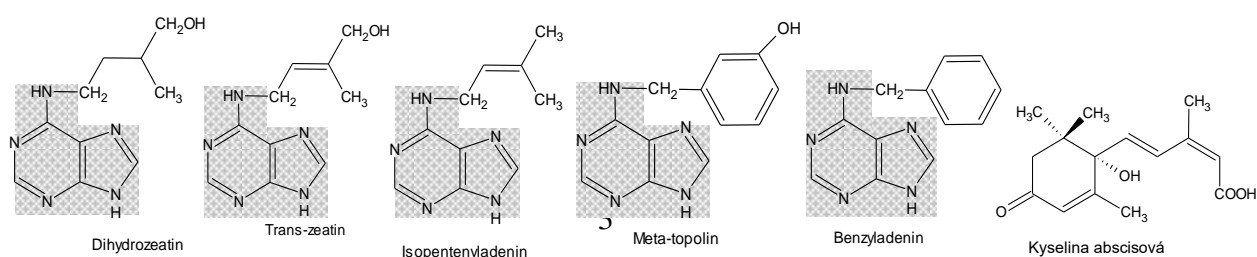
Cílem metodiky je popsat postup stanovení obsahu bioaktivních cytokininů (CK), kyseliny abscisové (ABA) a prekursoru etylénu 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC) v obilkách ječmene. Možné způsoby stanovení jsou vždy náročné a pracné (extrakce a purifikace, v případě cytokininů i separace jednotlivých CK), a proto zahrnuje popis jednotlivých kroků stanovení včetně časové náročnosti. Metodika se opírá o v současné době dostupné vybavení a chemikálie v laboratorní praxi základního i aplikovaného výzkumu. Citlivost uvedených metod je vysoká - umožňuje stanovení obsahu látek v pg až ng v 50 – 100 µl analytu získaného z navážek 100 mg – 1g čerstvé hmotnosti vzorku

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Úvod

Obilky ječmene obsahují kromě nejdůležitějších zásobních látek (škrob a bílkoviny) také hodnotné biologicky aktivní látky různé povahy, z nichž některé zvyšují bioprotektivní potenciál potravin i pochutin vůči stresovým faktorům. K těmto látkám mohou být nově přiřazovány i některé fytohormony. Ty jsou v rostlinách také regulátory procesu embryogeneze a tvorby semen. Na počátku tvorby semen se uplatňují téměř všechny skupiny hormonů – auxiny a cytokininy, kyselina abscisová a gibereliny i etylén. Bylo však např. prokázáno, že ribosidy cytokininů potlačují i neoplastickou transformaci lidských buněk (CASATI *et al.* 2011). Za významné bioaktivní fytohormony obilky lze považovat volné báze CK a ABA (obr. 1). Poměr giberelinů a kyseliny abscisové je důležitý pro navození dormance embrya, v případě embryí (respektive obilky) ječmene také v procesu tzv. posklizňového dozrávání obilky (WANG *et al.* 1994). Produkce etylénu je charakteristická v období klíčení obilky (FIŠEROVÁ *et al.* 1996). Cytokininy v embryogenezi působí zesílením síly sinku (RIJAVEC *et al.* 2009). Ošetření klíčících semen ukázalo také, že cytokinin negativně ovlivňuje syntézu giberelinu (BRENNER *et al.* 2005). U obilky je velmi důležitým procesem posledních fází jejich růstu a vývoje akumulace vazebných proteinů pro cytokininy (BRINEGAR *et al.* 1985). Během klíčení obilky jsou pak z těchto proteinů uvolňovány především bioaktivní cytokininoxidázy/dehydrogenázy odolné aromatické cytokininy (DITRICH *et al.* 1995). Obsahy fytohormonů v procesech tvorby obilky a jejich klíčení se však dynamicky mění. Tyto změny nemusejí být univerzálně platné pro všechny odrůdy a ani ročníky sklizně (FIŠEROVÁ *et al.* 2015). Bioaktivní látky na bázi rostlinných hormonů jsou významným markerem kvality odrůdy tak i suroviny pro výrobu vlastních potravin.

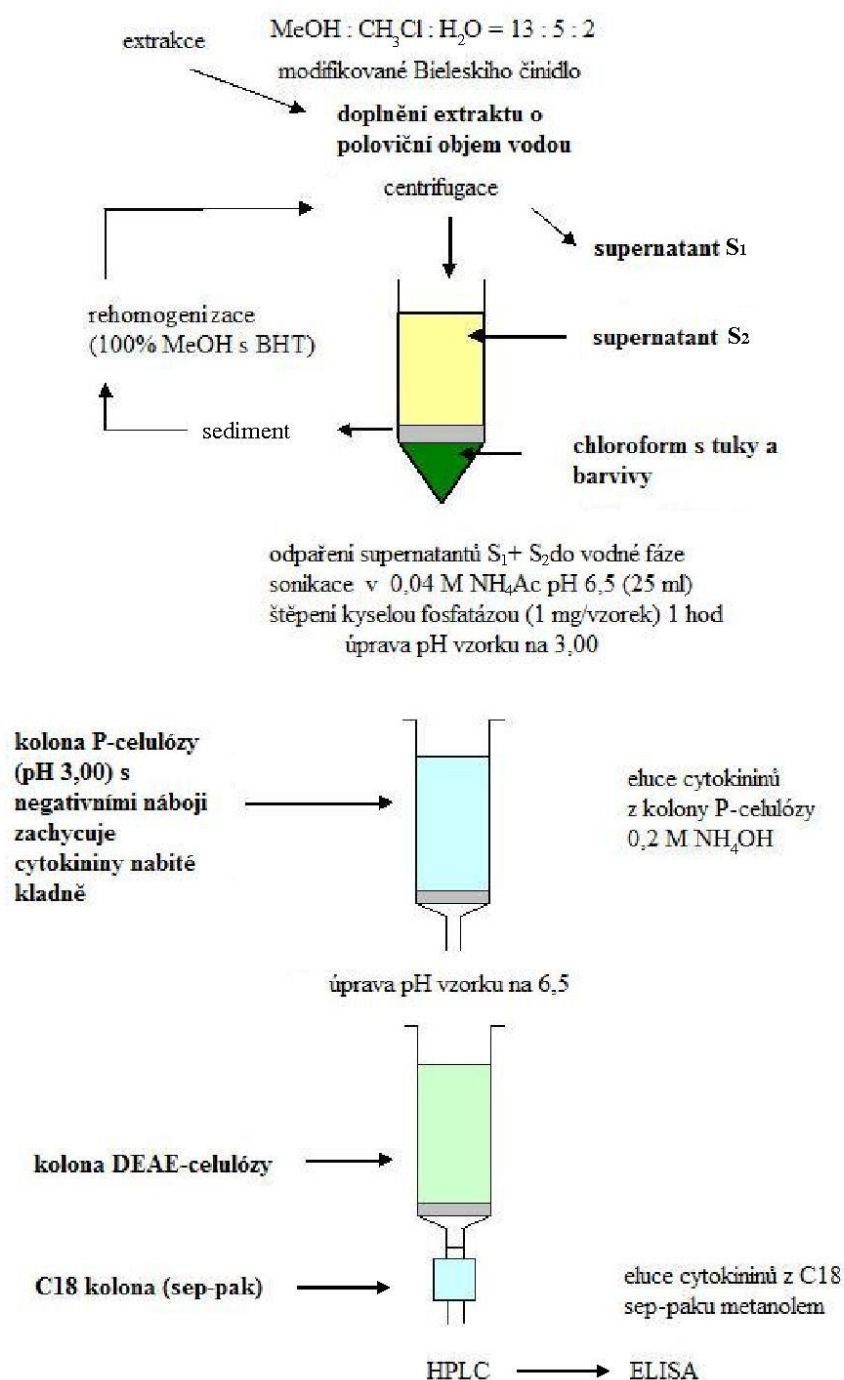
Obr. 1. Strukturní vzorce cytokininů (šrafovaní – adeninový skelet) a ABA



2.2. Principy stanovení obsahu cytokininů, kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové a kyseliny abscisové

Kvantitativní stanovení fytohormonů musí respektovat skutečnost, že jde o relativně nestabilní látky - citlivé na světlo (ABA a IAA podléhají fotooxidaci), teplo, mikrobiální kontaminaci, silně reaktivní chemikálie apod., a proto jsou přístupy ke stanovení jejich obsahu pracné a náročné na vybavení, čas a finance. K extrakci se používá materiál čerstvý, zmražený při nízké teplotě, nebo lyofilizovaný (eliminace enzymatické činnosti). Homogenizace se provádí v třecích miskách v kapalném dusíku do organických rozpouštědel. Ke zvýšení výtěžnosti extrakce se používá vytřepání homogenátu při teplotě +4°C. Následuje většinou centrifugace pro odstranění vysokomolekulárních látek. Purifikační postup (čištění) se volí s ohledem na chemické vlastnosti stanoveného fytohormonu a požadavky na čistotu vzorku pro finální detekci. Náročné purifikační postupy sestávají z více kroků, v nichž jsou odstraňovány např. látky interferující při instrumentální detekci (barviva, fenolické látky aj.). Často se využívá kombinací odpařování organického rozpouštědla (zakoncentrování), iontoměničové chromatografie ve vodných roztocích, chromatografie na reverzní fázi (obr. 2), vytřepávání fytohormonů kyselé povahy z okyselené vodné fáze do organického rozpouštědla aj. Nevýhodou purifikace je snížení výtěžku fytohormonu a proto se pro optimalizaci metody využívá tzv. interních standardů značených radioaktivně či deuteriem pro zjištění ztrát resp. výtěžnosti purifikačního postupu. Kvantitativní stanovení se opírá o dvě skupiny metod - instrumentální a imunochemické. Instrumentální metody jsou fyzikálně chemické přístrojové metody: GC (plynová chromatografie - etylen), HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), HPTLC (přístrojová tenkovrstevná chromatografie), GC/MS a LC/MS (hmotnostní spektrometrie v kombinaci s plynovou nebo kapalinovou chromatografií), CE (kapilární elektroforéza). Imunochemické metody využívají ke stanovení protilátky (imunoglobuliny). Jsou vysoce citlivé a často vyžadují kvalitně vyčištěné fytohormony z extraktu. Princip těchto metod spočívá v kompetici nativního či standardního fytohormonu (hapten) a radioaktivně (RIA) či enzymaticky (ELISA, obr. 3) značeného fytohormonu (ligand) ve vazbě na molekulu specifické protilátky. RIA - radioimunoanalýza pak měří aktivitu vázanou na protilátku volně v reakčním roztoku (čím vyšší radioaktivita tím méně stanoveného fytohormonu a naopak). ELISA je enzymový imunosorbentní test v němž jsou komplexy protilátek s haptinem či ligandem vázány na destičku, v níž se po přidání substrátu sleduje tvorba barevného produktu, měří se pak absorbance (nepřímá úměra v kalibraci, čím je vyšší absorbance tím méně je hledané látky).

Obr. 2. Schéma čištění cytokininů



2.3. Stanovení cytokininů

Optimalizované stanovení cytokininů dosahující výtěžnosti 60 % volných cytokininovýchází i ribosidů probíhá ve čtyřech krocích (obr. 2 – znázorňuje především extrakci a purifikační krok pomocí iontoměničové chromatografie a chromatografie na reverzní fázi): extrakce, purifikace, HPLC separace a stanovení metodou ELISA.

2.3.1. Extrakce cytokininů

Homogenizace obilí (čerstvých nebo suchých) se provede do modifikované Bieleškiho fixáže (metanol : chloroform : voda = 13 : 5 : 2), extrakce po dobu 12 hod, následně se odstraní lipidická frakce centrifugací homogenátu po doplnění extraktu o polovinu objemu vodou (BIELESKI 1964). Tím se dosáhne oddělení supernatantu obsahujícího cytokininy (vodný metanol) od chloroformu (obsahuje lipofilní látky aj.). Pro zvýšení výtěžku CK je možné sediment rehomogenizovat v metanolu a ještě jednou centrifugovat.

2.3.2. Purifikace cytokininů

Vzorek obsahující CK v metanolu se odpaří na rotační vakuové odparce do vodného zbytku a následuje štěpení ribotidů cytokininů kyselou fosfatázou v 0,04 M acetátamonném pufru o pH 6,5 (na ribosidy stanovitelné ELISA testem), iontoměničová chromatografie a chromatografie na reverzní fázi (MACHÁČKOVÁ *et al.* 1993). Iontoměničová chromatografie za použití P-celulózy při pH 3 oddělí cytokininový extrakt (CK mají při pH 3 kladný náboj) od látek s negativním nábojem. Cytokininy a jejich ribosidy s parciálním nábojem kladným se zachytí na P-celulóze a poté jsou z kolony P-celulózy eluovány 0,2 M amoniakem. Po úpravě pH na 6,5 pokračuje purifikace jako chromatografie na reverzní fázi na DEAE-celulóze spojené s C18 kolonkou (Sep-Pak). Cytokininy se v tomto kroku čištění zachytí na C18 sorbentu a po eluci přečištěné cytokininové frakce metanolem se provádí zkoncentrování vzorků odpařením metanolu. Poté jsou vzorky rozpuštěny a před nástřikem na HPLC filtrovány. Purifikační kroky pro 8 současně čištěných vzorků reprezentují čas 8 hodin.

2.3.3. HPLC separace cytokininů

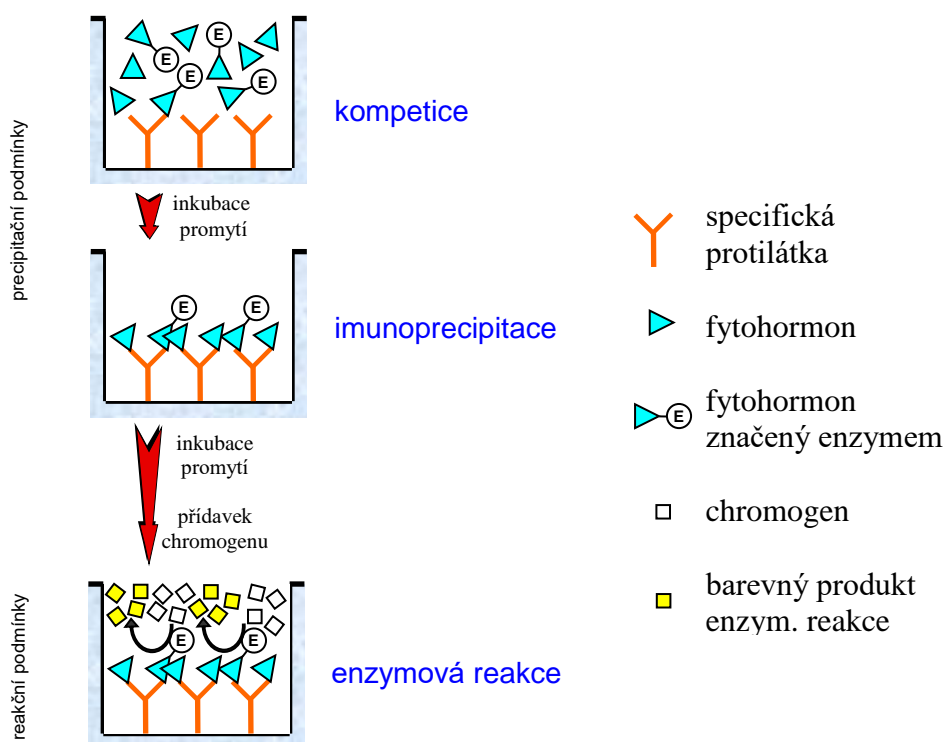
HPLC separace cytokininovýchází a jejich ribosidů probíhá na koloně Nucloeosil 5 s C18 sorbentem s 250 x 4,6 µm I. D. s velikostí pórů 5 µm a průtokem mobilní fáze 1000 µl/min, se složením mobilní fáze A: metanol, B: 0,05 % TFA (gradient: 0 – 3 min 15 % A, 3 – 11 min 40 % A, 11 – 16 min 60 % A). UV signál je detekován při 272 nm a jednotlivé frakce po sobě následujících cytokininů se sbírají dle příslušných retenčních časů. Frakce jsou následně odpařovány do sucha (40 °C) a pro ELISA kvantifikaci se rozpouští v TBS pufru (900 µl). Časová náročnost HPLC separace cytokininů jednoho vzorku je 30 minut.

2.3.4. ELISA stanovení cytokininů

Ke kvantifikaci cytokininů pomocí ELISA se používají specifické protilátky (Ab) vůči jednotlivým frakcím cytokininů (STRNAD *et al.* 1990, STRNAD 1996). Do jamek mikrotitrační destičky se pipetuje protilátka (150 µl) v roztoku uhličitánového pufru (5 µl Ab v 15 ml uhličitánového pufru na 1 desku) a nechá se inkubovat přes noc. Po promytí destičky destilovanou vodou se stěny potáhnou roztokem BSA v TBS pufru na jednu hodinu inkubace

při laboratorní teplotě. Následuje promytí destilovanou vodou a pipetování TBS pufru (50 μ l), standardů a vzorků (50 μ l), dále je do všech jamek s výjimkou blanku pipetován konjugát alkalické fosfatázy a stanovovaného cytokininu v BSA. Na závěr se pipetuje substrát (*para*-nitrofenylfosfát rozpuštěný v uhličitanovém pufru: 1 mg/ml). Po hodinové inkubaci se barevná reakce zastaví 5M KOH. ELISA se vyhodnocuje fotometricky při vlnové délce 405 nm: obsah cytokininů je nepřímo úměrný absorbanci naměřené v roztocích jednotlivých jamek mikrotitrační destičky v porovnání s řadou standardů, minimální a maximální vazbou protilátky, příslušné absorbance vzorků se odečtou z kalibrační křivky (výsledky jsou přepočteny na obsah CK v ng pro analys 50 μ l). Vlastní ELISA test umožňující kvantifikaci jednotlivých CK zabere 5 hodin.

Obr. 3. Princip imunanalytické metody ELISA



2.4. Stanovení kyseliny abscisové

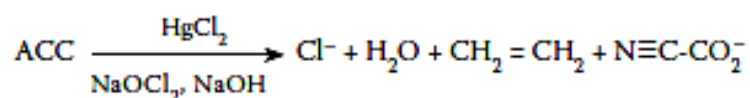
Pro analytické stanovení je ABA extrahována z rostlinného materiálu vytřepáním homogenátu do vodné frakce (homogenizace ve vychlazené třecí misce pomocí mořského písku, 1:10, čerstvá hmotnost : destilovaná voda) po dobu 12 hodin při +4 ° C. Výtěžnost obsahu ABA v extraktu je 95 – 100 %. Volná ABA se po té oddělí centrifugací - zůstává v supernatantu. Pro vlastní stanovení metodou RIA se ze vzorku odebírá 50 μ l. Radioimunoanalytické stanovení (RIA) kyseliny abscisové je vysoce citlivá kvantitativní (detekční limit v pg) imunochemická metoda stanovení ABA, využívající schopnosti rozpoznání molekuly ABA monoklonální protilátkou MAC 252 (QUARRIE *et al.* 1988) s velmi vysokou specifitou bez křížových reakcí (BARRIEU and SIMONNEAU 2000). Kompetitivní uspořádání metody využívá standardní ABA (hapten) a radioaktivně značenou ^3H -ABA (radioligand) ve vazbě na

protilátku MAC 252. Za předpokladu konstantního množství protilátky MAC 252 a ^3H -ABA a přebytku nativní ABA dochází k vytěšňování radioligandu z vazby s protilátkou a k vazbě haptenu s protilátkou. Tvorby komplexů haptenu-protilátka a radioligand-protilátka je dosaženo po inkubaci za nízké teploty (+ 4°C). Separace volných haptenu a radioligandů od komplexů protilátek s haptenu či radioligandem je provedena vysrážením v síranu amonném a oddělením následnou centrifugací. ^3H -aktivita sedimentu je pak měřena technikou kapalně scintilace na scintilačním spektrofotometru PACKARD 2000 CA, výsledky jsou přepočteny na obsah ABA v pg pro analyt 50 μl pomocí programu Securia PACKARD. Kalibrační křivka je sestavena za použití standardní ABA (+/- *cis*, *trans*-ABA, Sigma). Vlastní RIA test umožňující kvantifikaci ABA zabere 5 hodin, měření jednoho vzorku na scintilačním spektrofotometru reprezentuje 5 minut.

2.5. Stanovení kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové

Kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC) je možno stanovit po extrakci a purifikaci nepřímo oxidací na etylén (obr. 4) pomocí plynové chromatografie (FIŠEROVÁ *et al.* 2008). Účinnost oxidativního štěpení se uvádí 80 %. Rostlinný materiál se zhomogenizuje v 70% ethanolu (5 ml na g čerstvé hmotnosti) a nechá se 12 hod v mrazicím boxu (extrakce), po rozmražení následuje centrifugace při 10 000 g 10 min. V supernatantu se zakoncentruje ACC na rotační vakuové odparce po rehomogenizaci a centrifugaci. Spojené supernatanty se odpaří při 40 °C na vodnou fázi. Vodná fáze se nechá zamrazit (vymražení zbytku polymerů), následuje rozmražení a centrifugace. Supernatant se převede do 10 ml tuby s vhodným těsněním umožňujícím odběr plynů. Přidá se 0,5 ml 10 μmol HgCl_2 na 1 ml (vzorky je nutné uchovávat ve vložkovém ledu), poté se do uzavřené tuby injektuje 250 μl vychlazeného 5% NaOCl_2 saturovaného NaOH (2 : 1). Obsah tuby se krátce protřepe a chladí ve vložkovém ledu 10 minut. Po té se z tuby injekční stříkačkou odebere 1 ml plynů a změří se na GC s kapilární 24 m dlouhou kolonou HP-PLOT/ Al_2O_3 . Nosný plyn je helium, teplota FID detektoru 200 °C, nástřiku 230 °C a kolony 40 °C. Výsledky jsou přepočteny na standard etylénu v 1 ml ovzduší z prostoru, z kterého byl nástřik odebrán. Pro produkci plynů rostlinným pletivem je koncentrace plynů přepočtena na hmotnost rostlinného materiálu a objem nádoby. Purifikace ACC pro 16 vzorků zabere 3 hodiny včetně konverze ACC na etylén, stanovení etylénu jednoho vzorku na GC reprezentuje 3 minuty.

Obr. 4. Oxidativní štěpení ACC na etylén



2.6. Postup stanovení jednotlivých fytohormonů

Praktické provedení stanovení jednotlivých fytohormonů zahrnuje pro ABA a ACC dva dny práce. První den zahrnuje vždy přípravu extraktů, následující den vlastní stanovení. V případě

cytokininů je časová náročnost čtyři dny práce, vlastní separační postup u cytokininů představuje jeden den purifikace a další den HPLC separace a odpaření frakcí.

2.6.1. Postup stanovení cytokininů

I. a II den (extrakce purifikace)

1. homogenizace rostlinného materiálu (1 g) kapalným dusíkem v třecí misce, převedení do modifikovaného Bieleskiho činidla (8 ml)
2. extrakce přes noc při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. vytřepání při 350 rpm na třepačce po dobu 1 hod při $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. doplnění extraktu o poloviční objem vodou s nízkou vodivostí (4 ml)
5. centrifugace 20 minut při $+4^{\circ}\text{C}$ 3500 g
6. separace supernatantu S_1 a rehomogenizace sedimentu ve 100% metanolu, vytřepání 1 hod při 350 rpm
7. centrifugace 20 minut při $+4^{\circ}\text{C}$ 3500 g
8. odpaření spojených supernatantů (S_1 a S_2) po druhé centrifugaci do vodné fáze
9. rozpuštění cytokininů ve vzorcích v 0,04 M acetátamonném pufru (pH 6,5) a štěpení ribotidů cytokininů kyselou fosfatázou (1 mg/vzorek) 1 hodinu při 300 rpm
10. úprava pH vzorků na 3
11. iontoměničová chromatografie na koloně P – celulózy (cytokininy zachyceny na P – celulóze)
12. eluce cytokininů z P – celulózy 30 ml 0,2 M amoniaku
13. úprava pH vzorků na 6,5
14. chromatografie na reverzní fázi v 0,04 M acetátamonném pufru 30 ml (DEAE – celulóza + kolony sep-pak) – cytokininy zachyceny na sep-paku
15. eluce cytokininů ze sep-paku 8 ml metanolu
16. odpaření do sucha na rotační vakuové odparce (následuje HPLC separace cytokininů)

III. den (HPLC separace)

1. kalibrace HPLC separace jednotlivých cytokininů
2. sběr HPLC frakcí cytokininů jednotlivých vzorků
3. odpaření frakcí cytokininů při $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$

4. příprava ELISA - nanesení 150 μ l protilátky (5 μ l MAb v 15 ml uhličitanového pufru na 1 desku) do jamek mikrotitrační destičky a inkubace uzavřené destičky při laboratorní teplotě přes noc

IV. den (ELISA kvantifikace)

1. promytí destičky redestilovanou vodou (3x, 4 °C)
2. potažení 200 μ l BSA na 1 jamku (20 ml / desku), inkubace 1 hod při 25 °C
3. promytí destičky redestilovanou vodou (2x)
4. nanesení 50 μ l TBS do každé jamky, 50 μ l vzorku, 50 μ l standardů (v TBS)
5. pipetování 50 μ l traceru (konjugát alkalické fosfatázy a cytokininu, ředěním 2,5 μ l / 5 ml BSA na 1 desku) do všech jamek s výjimkou jamek ponechaných pro blank
6. 1 min míchání, inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě
7. 4x promytí TBS
8. pipetování do všech jamek 150 μ l substrátu (PNPP v uhličitanovém pufru - 1 mg/ml)
9. inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě
10. zastavení barevné reakce 50 μ l 5 M KOH (popř. NaOH)
11. změření absorbance při 405 nm

2.6.2. Postup stanovení ABA

1. homogenizace obilí v destilované vodě (0,5 g / 5 ml, přes noc -20°C)
2. centrifugace 10 000 g 10 min
3. příprava standardů pro kalibrační křivku a vzorků v mikrozkušnicích
4. přidavek 100 μ l ^3H -ABA
5. přidavek 100 μ l protilátky
6. přidavek 200 μ l 50% PBS
7. inkubace 45 minut v ledničce při teplotě 4°C (imunoprecipitace)
8. přidavek 500 μ l 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
9. inkubace 30 minut při laboratorní teplotě.
10. centrifugace 10 minut při 5000 ot/min a 4°C
11. odstranění supernatantu odsávací pipetou
12. přidavek 1 ml 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uzavření mikrozkušnice
13. roztřepání sraženiny na vortexu

14. centrifugace 5 minut při 5000 ot/min a 4°C
15. odstranění supernatantu odsávacíčkou
16. přidavek 100 µl destilované H₂O, uzavření mikrozkuřavky
17. roztřepání sraženiny
18. přidavek 1 ml dioxanového scintilátoru, uzavření mikrozkuřavek a vložení do měřících ampulí
19. měření na scintilačním spektrofotometru PACKARD 2900 TR

2.6.3. Jednotlivé kroky postupu stanovení ACC

1. homogenizace obilek v 70% ethanolu (přes noc -20°C)
2. centrifugace 10 000 g 10 min
3. rehomogenizace a znovu centrifugace
4. spojené supernatanty odpařit při 40 °C na vodnou fázi (do cca objemu 1 ml), eventuelně odparek rozpustit do 1 ml
5. sonikace na ultrazvuku
6. převedení do mikrozkuřavky, vymražení chlorofylu, centrifugace - eventuelně i opakovat
7. vzorek převést do 10 ml tuby s vhodným těsněním
8. přidat 5 µM HgCl₂ , uchovávat při +4°C
9. do tuby injektovat 250 µl vychlazeného 5% NaOCl : saturovaný NaOH (2 : 1)
10. krátce zamíchat (vortex), uložit při +4°C na 10 min
11. opět promíchat
12. odběr 1 ml na GC

2.7. Nezbytné chemikálie a přístrojové vybavení

nezbytné chemikálie (ve smyslu specifické):

- iontoměnič (celulózy či sephadex typu P- a DEAE-)
- kyselá fosfatáza
- sorbenty C18 separace (nebo kolonky sep-pak)
- standardy jednotlivých cytokininů (pro HPLC a ELISA)
- standardy ABA a ACC a etylénu (pro RIA a GC)
- tritiem značená ³H-ABA (radioligand)
- specifické protilátky vůči cytokininům a ABA (pro ELISA a RIA)

- specifické traceury pro ELISA (konjugáty ribosidů cytokininů a alkalické fosfatázy)
- dioxanový scintilátor

nezbytné přístroje (představující vysoké pořizovací náklady):

- chlazená centrifuga (rotor pro mikrozkušavky i velké zkumavky)
- rotační vakuová odparka
- peristaltická pumpa
- HPLC sestava s UV detekcí
- ELISA čtečka
- scintilační spektrofotometr
- plynový chromatograf s FID detekcí

3. Srovnání „novosti postupů“

Snahy o kvantifikaci obsahu různých fytohormonů pomocí biologických testů využívané především v minulosti nevedly k verifikovatelným výsledkům. Biotesty mají spíše kvalitativní význam, jelikož ověřují biologickou aktivitu daných látek a v tomto ohledu jsou instrumentální technikou nenahraditelné. Rozvoj možných metodik kvantifikace se odehrál v minulých desetiletích (90. léta a přelom století) a byl obvykle dán výzkumným zaměřením laboratorí. Finančně a pracovně přijatelné metodiky se opírají o snadnou a rychlou analytiku, kterou umožňují právě imunochemické metody. Komplikovanějším přístupem je v tomto ohledu použití radioindikátorů (např. RIA) z důvodů radiačně hygienických (likvidace radioaktivního odpadu). I tyto přístupy jsou však rychlé a finančně přístupnější než nejnovější instrumentální metody. Popsané metodiky umožňují spolehlivou, opakovatelnou kvantifikaci i početného množství vzorků. Citlivost metod pro kvantifikaci je pro interpretaci fyziologických procesů i aplikace dostačující.

Nejnovější, zatím méně dostupné, metody kvantifikace fytohormonů se snaží postihnout metabolomické – širokospektrální stanovení pokud možno všech možných metabolitů dané látky. Navíc v případě nedostatku rostlinného materiálu jsou vyvíjeny i metody analyzující všechny skupiny fytohormonů z jediného materiálu (vzorku, navážky) za použití ještě náročnějších purifikačních postupů (materiálová i časová náročnost) s vyšší citlivostí. Použití velmi drahých instrumentálních metod především LC-MS/MS pak předpokládá vysokou pořizovací cenu investice a servisní náklady, dále adekvátní personální zabezpečení obsluhy přístroje (dlouhé zaškolení a následná školení) a efektivitu jeho využití.

Aplikovaný způsob kvantifikace fytohormonů ABA, ACC a CK z jednoho materiálu byť třemi různými (modifikovanými) metodami zkracuje délku časové i finanční náročnosti jejich stanovení. Tato metodika zahrnuje modifikace některých kroků purifikace, které zkracují celou proceduru stanovení fytohormonů ve srovnání s dřívějšími postupy. Hlavní výhodou nové metodiky ve srovnání s ostatními postupy je rychlé zpracování velkého počtu vzorků v podstatě z nečištěného extraktu při stanovení ABA a ACC a v případě CK společné stanovení deseti základních cytokininů (volných bází a ribosidů) z jednoho čištěného vzorku.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Dlouhodobý zájem společnosti na zvyšování kvality produktů z obilovin (výroba pečiva) a produktů sladovnického a pivovarského průmyslu vede k upřesnění nutriční hodnoty, včetně ohledu na zastoupení biologicky významných látek (vitamíny, antioxidanty aj.). Fytohormony tak reprezentují další potenciálně hodnotnou složku potravin, i když se jejich podíl technologií zpracování zcela určitě snižuje. Metodika je tak určena nejen pro „technologický článek“ řetězu využití bioaktivních látek v produktech pro výrobu potravin, ale také pro šlechtitele obilnin. V případě šlechtění ječmene využije potřebné postupy certifikované metodiky Agrotest Fyto Kroměříž a případně další šlechtitelské společnosti při selekci odrůd vhodných k výrobě funkčních potravin a verifikaci jejich bioprotektivního potenciálu.

5. Ekonomické aspekty

Stanovení obsahu fytohormonů je obecně finančně velmi náročné, a to i za předpokladu kvantifikace malého počtu vzorků. Vzhledem k tomu, že nebyla analytika kvantifikace běžnou komerční aktivitou, vycházela cena za stanovení obvykle z kompromisu mezi laboratorii provádějící analýzu a zadavatelem za sérii vzorků. Kalkulace ceny proto není obvyklá a ani srovnatelná mezi případnými různými pracovišti s možnostmi kvantifikace fytohormonů. Zavedení možnosti kvantifikace však představuje plně vybavenou laboratoř. Pořízení nezbytných přístrojů – chromatografy a spektrofotometry představuje statisícové investice s možností přesahu přes milion(y) Kč. Kvalifikovaný odhad nákladů pro pořízení kompletního přístrojového vybavení dosahuje 2,5 mil. a ostatní vybavení včetně nezbytných chemikálií 250 tis. Kč. Přijatelnou možností pro již zavedené laboratoře jsou pak kalkulace ceny zahrnující režijní i mzdové náklady v rozmezí 300 – 800 Kč /vzorek dle náročnosti postupu. Vzhledem k tomu, že některé kroky stanovení (např. purifikace jedné sady vzorků a současná HPLC separace již purifikovaných vzorků) lze provádět souběžně jediným pracovníkem, nedochází ke zvýšení mzdových nákladů ani při analýze většího počtu vzorků. Za předpokladu plného využití vlastního pořízeného vybavení lze tedy dosáhnout úspory v řádu desítek Kč na vzorek (dle náročnosti analýzy).

6. Seznam použité související literatury

- BARRIEU, Ph., and SIMONNEAU, Th. (2000): The monoclonal antibody MAC 252 does not react with the (-) enantiomer of abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 51 (343): 305-307.
- BIELESKI, R.L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissue. *Anal. Biochem.*, (9): 431-442.
- BRENNER, W.G., ROMANOV, G.A., KOLLMER, I., BURKLE, L. and SCHMULLING, T. (2005): Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J.*(44): 314–333.
- BRINEGAR, A.Ch., STEVENS, A. and FOX, J.E. (1985): Biosynthesis and degradation of a wheat embryo cytokinin-binding protein during embryogenesis and germination. *Plant Physiol.* 79 (3):706-710.

- CASATI, S., OTTRIA, R., BALDOLI, E., LOPEZ, E., MAIER, J.A.M. and CIUFFREDA, P. (2011): Effects of cytokinins, cytokinin ribosides and their analogs on the viability of normal and neoplastic human cells. *Anticancer Res.*(31):3401-3406.
- DIETRICH, J.T., KAMÍNEK, M., BLEVINS, D.G., REINBOTT, T.M. and MORRI, R.O. (1995): Changes in cytokinins and cytokinin oxidase activity in developing maize kernels and the effects of exogenous cytokinin on kernel development. *Plant Physiol. Biochem.* 33:327-36.
- FIŠEROVÁ, H., HRADILÍK, J., PROCHÁZKA, S., KLEMŠ, M. and RÁČILOVÁ, A. (1996): Formation of ethylene, ethane and abscisic acid content in relation to dormancy of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) kernels. *Rost. výr.* 42(6): 245-248.
- FIŠEROVÁ, H., MIKUŠOVÁ, Z. and KLEMŠ, M. (2008): Estimation of ethylene production and 1-aminocyklopropane-1-carboxylic acid content in plants by means of gas chromatography. *Plant Soil Environ.*, 54, 2008 (2): 55-60.
- FIŠEROVÁ, H., HARTMAN, I. and PROKEŠ, J. (2015): The effect of weather and the term of malting on malt quality. *Plant Soil Environ.* 61 (9): s. 393-398.
- MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., EDER, J., SEIDLOVÁ, F. and STRNAD, M. (1993): Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. *Physiol. Plant.* (87): 160-166.
- QUARRIE, S.A., WHITFORD, P.N., APPLEFORD, N.E.J., WANG, T.L., COOK, S.K., HENSON, L.E. and LOVEYS, B.R. (1988): A monoclonal antibody to (s)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* (183): 330-339.
- RIJAVEC, T., KOVAČ, M., KLADNIK, A., CHOUREY, P.S. and DERMASTIA, M.(2009): Comparative study on the role of cytokinins in caryopsis development in the maize *miniature1* seed mutant and its wild type. *J. Int.. Plant Biol.* 51 (9): 840–849.
- STRNAD, M., VANĚK, T., BINAROVÁ, P., KAMÍNEK, M., and HANUŠ, J. (1990): Enzyme immunoassays for cytokinins in alfalfa cell culture, in: Kutáček, M., Elliott, M. C., Macháčková, J. (Eds.), *Molecular aspects of hormonal regulation of plant development*, SPB Academic Publ., The Hague, 1990, pp. 41 – 54.
- STRNAD, M. (1996): Enzyme immunoassays of N⁶ -benzyladenine and N⁶ -(meta-hydroxybenzyl)adenine cytokinins. *J. Plant Growth Regul.* (15):179-188.
- WANG, M., BAKHUIZEN, R., HEIMOVAARA-DIJKSTRA, S., VAN ZEIJL, M.J., DE VRIES, M.A., VAN BECKUM, J.M. and SINJORGIO, K.M.C. (1994): The role of ABA and GA in barley grain dormancy: A comparative study between embryo and aleurone dormancy. *Russian J. Plant Physiol.* (41): 577-584.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

- FIŠEROVÁ, H., HRADILÍK, J., PROCHÁZKA, S., KLEMŠ, M. and RÁČILOVÁ, A. (1996): Formation of ethylene, ethane and abscisic acid content in relation to dormancy of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) kernels. *Rost. výr.* 42(6): 245-248.

- FIŠEROVÁ, H., MIKUŠOVÁ, Z. and KLEMŠ, M.** (2008) : Estimation of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in plants by means of gas chromatography. *Plant Soil Environ.*, 54, 2008 (2): 55-60.
- FIŠEROVÁ, H., HARTMAN, I. and PROKEŠ, J.** (2015): The effect of weather and the term of malting on malt quality. *Plant Soil Environ.* 61 (9): s. 393-398.
- HRADILÍK, J., PSOTA, V., FIŠEROVÁ, H., HUDEOVÁ, M., KLEMŠ, M., REINÖHL, V.** (2000), Dormancy and post-harvest maturation of malt barley (*Hordeum vulgare* L.) caryopses. *Rost. výr.* 46(6): 261-268.
- KUMMEROVÁ, M., VÁŇOVÁ, L., FIŠEROVÁ, H., KLEMŠ, M., ZEŽULKA Š, KRULOVÁ J.** (2010): Understanding the effect of organic pollutant fluoranthene on pea *in vitro* using cytokinins, ethylene, ethane and carbon dioxide as indicators. *Plant Growth Regul.* 61(2):161-174.
- MELIŠOVÁ, L., HRONKOVÁ, M., HOLKOVÁ, L., KLEMŠ, M., SMUTNÁ, P.** (2015): Use of ABA treatment for the activation of drought protective mechanisms in barley under non-stress conditions. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* 63(1): 87-93.
- MIKULKOVÁ, P., HOLKOVÁ, L., HRONKOVÁ, M., KLEMŠ, M., BRADÁČOVÁ, M.** (2009): Efficiency of different laboratory methods for selection of drought tolerant barley genotypes. *Cereal Res. Commun.* 37 (S): 277-280.
- VÁŇOVÁ, L., KUMMEROVÁ, M., KLEMŠ, M., ZEŽULKA, Š.** (2009): Fluoranthene influences endogenous abscisic acid level and primary photosynthetic processes in pea (*Pisum sativum* L.) plants *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 57(1): 39-47.
- VLAŠÁNKOVÁ, E., KOHOUT, L., KLEMŠ, M., EDER, J., REINÖHL, V., HRADILÍK, J.** (2009): Evaluation of biological activity of new synthetic brassinolide analogs. *Acta Physiol. Plant.* 31(5): 987-993.