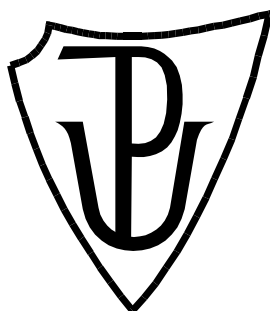


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Chemické metody studia strigolaktonů**

## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

|                   |                                         |
|-------------------|-----------------------------------------|
| Autor:            | <b>Mgr. Rostislav Halouzka</b>          |
| Studijní program: | P1416 Biochemie                         |
| Studijní obor:    | Biochemie                               |
| Forma studia:     | Prezenční                               |
| Vedoucí práce:    | <b>doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.</b> |
| Rok:              | 2020                                    |

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

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Tato disertační práce byla podpořena grantovým projektem IGA\_PrF\_2017\_016.

Rád bych na tomto místě poděkoval mému školiteli doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. a Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D. za odborné vedení disertační práce, jejich cenné rady a připomínky. Dále bych rád poděkoval Ing. Miroslavu Hýblovi, Ph.D. a zejména technickým pracovníkům z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v. v. i. (pracoviště Olomouc) za pomoc při pěstování biologického materiálu. Děkuji také Mgr. Tereze Tiché, Ph.D., a Mgr. Pavlovi Jaworkovi, Ph.D. z katedry Biochemie v Olomouci za pomoc a cenné připomínky při interpretaci naměřených dat. Velké díky patří také všem mým kolegům z laboratoře za ochotu pomoci a za příjemnou atmosféru na pracovišti. V neposlední řadě děkuji rodině (otec, matka a moje sestra Klára) za její lásku, trpělivost a podporu v každodenním životě. Speciální poděkování bych věnoval mému nejlepšímu příteli Jakubu Hajnému, který byl pro mě vždy jako bratr a cenný rádce, nejen v životě, ale především v otázce vědy a výzkumu.

## Bibliografická identifikace

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Jméno a příjmení autora | Rostislav Halouzka                   |
| Název práce             | Chemické metody studia strigolaktonů |
| Typ práce               | Disertační                           |
| Pracoviště              | Katedra biochemie                    |
| Vedoucí práce           | doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.     |
| Rok obhajoby práce      | 2020                                 |

Strigolaktomy patří mezi rostlinné hormony, které hrají velmi důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Byly řešeny různé způsoby izolace a purifikace strigolaktonů z rostlinného materiálu (kořenů). Jako vhodný model byl vybrán zástupce z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), bob setý (*Vicia faba* L.). Vybraný izolační protokol byl použit společně s optimalizovanými podmínkami separace UHPLC-MS/MS k úspěšné identifikaci SL. Dále jsou představeny ambientní techniky jako budoucí nástroj pro analýzu SL. Obě diskutované metody (DART a DESI) významně zjednodušují přípravu vzorků. Přístup DESI navíc umožňuje zaznamenat prostorovou distribuci analytů v řezu pletiva. Strigolaktomy jsou poměrně nestabilní látky, které jsou snadno hydrolyzovány i za mírných podmínek. Jedním z dalších cílů práce bylo otestování jejich chemické stability SL. Testován byl vliv rozpouštědla, kultivačních médií o definovaném složení a několik vybraných pufrů (pH 6,0 a 7,0). Výsledkem byl seznam doporučení a základních pravidel pro použití GR24 a přirozeně se vyskytujících SL. Výsledky získané z kinetických, termodynamických a spektrálních dat reakce GR24 se sedmi různými nukleofily prokázaly, že reakce probíhá prostřednictvím adičně-eliminčního mechanismu (Michaelova reakce).

|               |                                                                 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| Klíčová slova | strigolakton, izolace, UPLC-MS/MS, rostlinné hormony, stabilita |
| Počet stran   | 92                                                              |
| Počet příloh  | 4                                                               |
| Jazyk         | Český                                                           |

## Bibliographical identification

|                                 |                                     |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Author's first name and surname | Rostislav Halouzka                  |
| Title                           | Chemical analysis of strigolactones |
| Type of thesis                  | Dissertation                        |
| Department                      | Department of biochemistry          |
| Supervisor                      | doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.    |
| The year of presentation        | 2020                                |

Strigolactones are phytohormones which play a key role in plant growth and development. Various methods of isolation and purification from the plant material (roots) have been studied. Sown bean (*Vicia faba* L.) from the family *Fabaceae* was chosen as a representative model plant. To successfully identify SL in various plant materials, the selected isolation protocol was used together with optimized separation conditions of UHPLC-MS/MS. In addition, ambient techniques were introduced as future tools for the SL analysis. Both methods (DART and DESI) significantly simplified sample preparation. Moreover, the DESI approach made it possible to record the spatial distribution of the analytes in a tissue section. Strigolactones are unstable substances that are easily hydrolysed even under mild conditions. The study aimed to examine the chemical stability of SL. The effect of the solvent, plant growing media with defined composition and several selected buffers (pH 6.0 and 7.0) were tested. The outcome was a list of recommendations and basic rules on how to use and apply GR24 and naturally occurring SL. Furthermore, the reaction mechanism of hydrolysis was studied. Results obtained from kinetic, thermodynamic, and mass spectral data of the reaction between widely used synthetic strigolactone analogue GR24 and seven different nucleophiles, demonstrated that the reaction proceeded via Michael addition-elimination mechanism.

|                      |                                                                  |
|----------------------|------------------------------------------------------------------|
| Keywords             | strigolactones, isolation, UPLC-MS/MS, plant hormones, stability |
| Number of pages      | 92                                                               |
| Number of appendices | 4                                                                |
| Language             | Czech                                                            |

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CÍLE PRÁCE</b>                                                            | <b>1</b>  |
| <b>1 ÚVOD</b>                                                                | <b>2</b>  |
| <b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b>                                                     | <b>3</b>  |
| 2.1 Rostlinné hormony strigolaktony                                          | 3         |
| 2.1.1 Kanonické strigolaktony                                                | 4         |
| 2.1.2 Nekanonické strigolaktony                                              | 8         |
| 2.2 Stereochemie strigolaktonů                                               | 10        |
| 2.3 Mechanismus hydrolýzy                                                    | 11        |
| 2.4 Stabilita strigolaktonů                                                  | 12        |
| 2.5 Syntetické deriváty strigolaktonů                                        | 14        |
| 2.6 Biosyntéza strigolaktonů                                                 | 18        |
| 2.7 Biologické funkce strigolaktonů                                          | 24        |
| 2.7.1 Arbuskulární mykorhiza                                                 | 24        |
| 2.7.2 Interakce s parazitickými rostlinami                                   | 24        |
| 2.7.3 Vliv na růst postranních kořenů a interakce s auxiny                   | 26        |
| 2.8 Izolace a purifikace strigolaktonů                                       | 27        |
| 2.8.1 Kořenové exudáty                                                       | 30        |
| 2.8.2 Rostlinné pletivo                                                      | 31        |
| 2.9 Chemické metody studia strigolaktonů                                     | 33        |
| 2.10 Ambientní techniky                                                      | 36        |
| 2.10.1 DART                                                                  | 36        |
| 2.10.2 DESI                                                                  | 38        |
| <b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>                                                 | <b>41</b> |
| 3.1 Materiál a metody                                                        | 41        |
| 3.1.1 Biologický materiál                                                    | 41        |
| 3.1.2 Hydroponické pěstování a kultivace                                     | 41        |
| 3.1.2.1 Příprava kultivačního roztoku ½ Hoaglandova média                    | 41        |
| 3.1.3 Metody homogenizace a extrakce                                         | 42        |
| 3.1.3.1 Izolační protokol A                                                  | 42        |
| 3.1.3.2 Izolační protokol B                                                  | 42        |
| 3.1.4 Purifikace pomocí extrakce na pevné fázi (SPE)                         | 43        |
| 3.1.4.1 Výběr sorbentů a nastavení SPE                                       | 43        |
| 3.1.5 Chromatografické metody (UHPLC-MS/MS)                                  | 44        |
| 3.1.6 Optimalizace detekce MS                                                | 45        |
| 3.1.7 Optimalizace identifikace pomocí HR-DART-Orbitrap                      | 45        |
| 3.1.8 Příprava řezů pro DESI                                                 | 46        |
| 3.1.8.1 Optimalizace identifikace pomocí HR-DESI-Orbitrap-MS                 | 47        |
| 3.1.9 Určení stability GR24 v kultivačních médiích a pufrech                 | 48        |
| 3.1.10 Syntéza reakčních produktů GR24 a vybraných nukleofilů                | 48        |
| 3.1.11 Stanovení kinetických parametrů                                       | 49        |
| 3.2 Výsledky                                                                 | 51        |
| 3.2.1 Selektce a kultivace biologického materiálu                            | 51        |
| 3.2.2 Metody izolace a purifikace                                            | 52        |
| 3.2.2.1 Stanovení návratnosti purifikace pro extrakci na pevné fázi          | 52        |
| 3.2.2.2 Srovnání izolačních protokolů                                        | 53        |
| 3.2.3 Optimalizace metody detekce UHPLC-MS/MS                                | 54        |
| 3.2.4.1 Interpretace charakteristických fragmentů                            | 56        |
| 3.2.4.2 Identifikace strigolaktonů v rostlinných pletivech pomocí UPLC-MS/MS | 57        |
| 3.2.5 Ambientní techniky pro studium strigolaktonů                           | 62        |

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.5.1 Identifikace strigolaktonů pomocí HR-DART                           | 62        |
| 3.2.5.2 Identifikace a prostorová lokalizace strigolaktonů pomocí HR-DESI   | 63        |
| 3.2.6 Stabilita strigolaktonů                                               | 66        |
| 3.2.6.1 Stabilita strigolaktonů v kultivačních médiích                      | 66        |
| 3.2.7 Stabilita strigolaktonů ve vybraných pufrech                          | 67        |
| 3.2.7.1 Krátkodobé monitorování stability GR24                              | 67        |
| 3.2.7.2 Dlouhodobé monitorování stability GR24 a 5-deoxystrigol             | 68        |
| 3.2.8 Stabilita GR24 ve vybraných rozpouštědlech                            | 69        |
| 3.2.9 Nukleofilní reakce GR24                                               | 70        |
| 3.2.10 Monitorování nukleofilní reakce GR24 pomocí UHPLC/MS-MS              | 72        |
| 3.2.11 Regulace auxinové dráhy vlivem SLs efektu na endocytosu PIN proteinů | 74        |
| 3.3 Diskuze                                                                 | 76        |
| <b>4 ZÁVĚR</b>                                                              | <b>81</b> |
| <b>5 LITERATURA</b>                                                         | <b>82</b> |
| <b>6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>                                           | <b>91</b> |
| <b>7 PŘÍLOHY</b>                                                            | <b>92</b> |

## **CÍLE PRÁCE**

Cílem disertační práce byla aplikace chemických metod ve studiu strigolaktonů.

Konkrétně byly naplánovány tyto cíle:

- Selektce vhodných biologických modelů pro studium strigolaktonů.
- Vývoj metod izolace a purifikace strigolaktonů z rostlinného pletiva.
- Vývoj UHPLC-MS/MS metodiky pro profilování strigolaktonů.
- Využití ambientních technik – DART a DESI ve studiu strigolaktonů.
- Studium stability strigolaktonů a mechanismus hydrolýzy GR24.

## 1 ÚVOD

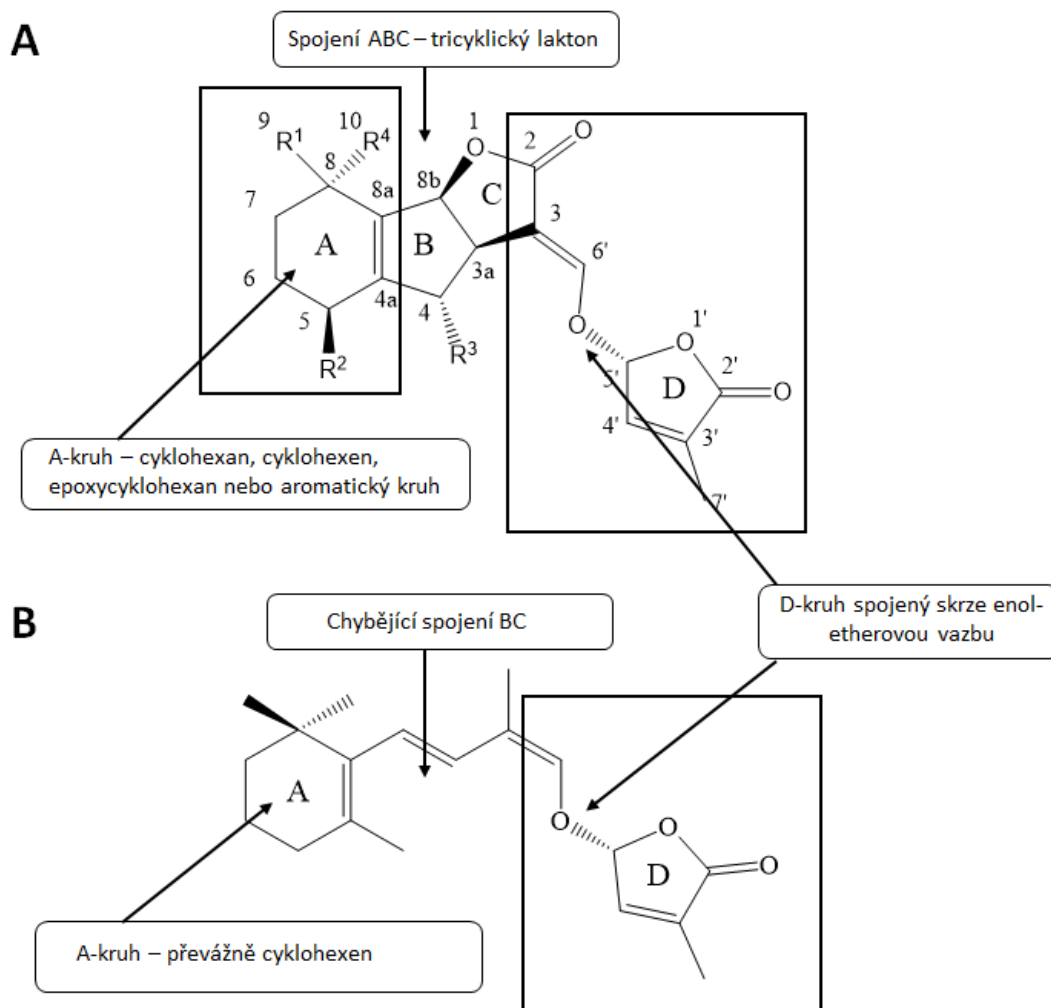
Rostlinné hormony (fytohormony) jsou přirozeně se vyskytující nízkomolekulární látky, které ovlivňují řadu fyziologických procesů v rostlinách. Jsou aktivní při velmi nízkých koncentracích (Davies, 2004). Jinými slovy, fytohormony jsou chemickými posly, resp. signálními molekulami, které koordinují buněčnou aktivitu rostlin (Fleet a Williams, 2011). Existuje devět kategorií fytohormonů, které byly doposud identifikovány, tj. auxinů, cytokininů, giberelinů, kyseliny abscisové, ethylen, brassinosteroidy, salicyláty, jasmonáty a strigolaktony (SL) (Su *et al.*, 2017). SL byly původně objeveny jako rhizosférní signální molekuly vylučované rostlinami do půdy, které stimulují klíčení semen parazitních rostlin rodu *Striga* a *Orobanche* (Cook *et al.*, 1966). Později byla prokázána jejich aktivní účast na interakci mezi hostitelskou rostlinou a arbuskulárními mykorhizními houbami v symbiotickém vztahu označovaném jako arbuskulární mykorhiza (AM). Poměrně nedávno byly identifikovány další fyziologické funkce strigolaktonů. Jedná se o regulaci stavby a růstu rostlin, včetně větvení výhonků a několika dalších aspektů vývoje kořenového systému: inhibice náhodného růstu kořenových buněk a prodlužování kořenových vlásků (Akiyama *et al.*, 2005; Gomez Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; Kapulnik *et al.*, 2011; Koltai *et al.*, 2014).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rostlinné hormony strigolaktony

Strigolaktony (SL), dříve označované jako seskviterpenoidní laktony, jsou biogeneticky příbuzné karotenoidům a jejich prekurzorům. Regulují řadu vývojových procesů rostlin prostřednictvím vzájemné interakce a komunikace („*cross-talk*“) signálních drah s jinými hormony (Xie *et al.*, 2010; Al-Babili a Bouwmeester, 2015). Vyskytují se napříč celou rostlinnou říší, od nižších rostlin, jako jsou mechorosty (*Physcomitrella patens* L.), až po nahosemenné a krytosemenné rostliny (Proust *et al.*, 2011). Doposud byly detekovány v kořenových exudátech a pletivech jednoděložných a dvouděložných rostlin. Je známo, že jednotlivé druhy rostlin mohou produkovat řadu různých SL ve variabilním poměru a množství. Uvádí se, že průměrná denní produkce se pohybuje mezi 15-30 pg/rostlina (Sato *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2013). Mimo jiné je chemická struktura SL velmi podobná jiné skupině rostlinným hormonům giberelinům, z nichž bylo dosud identifikováno více než 100 struktur. Na rozdíl od SL pouze několik giberelinů vykazuje biologickou aktivitu (Tsuchiya a McCourt, 2012). Navíc SL interagují s jinými fytohormony, zejména cytokininy a auxiny. V případě auxinů jsou schopny modulovat jejich transport a s tím související procesy, dělení buněk a distribuce živin (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Foo *et al.*, 2013).

SL mohou být rozděleny do dvou skupin dle struktury, a to kanonické a nekanonické. Kanonické jsou tvořeny D-kruhem (hydroxymethylbutenolid), který je připojený skrze enol-etherovou vazbu k tricyklickému ABC-laktonovému kruhu (Obr. 1). Druhá skupina, nekanonické SL, postrádá jedno nebo více spojení mezi jednotlivými částmi základního tricyklického laktonu za stálého zachování enol-etherové vazby a D kruhu. Toto spojení, jak již bylo uvedeno, je esenciální pro vyjádření biologické aktivity všech doposud známých SL (Yoneyama *et al.*, 2018a).



**Obr. 1** Strukturní vzorec SL, A) základní tricyklický skelet kanonických SL, B) modelová struktura karlaktonu – zástupce nekanonických SL.

### 2.1.1 Kanonické strigolaktony

Mezi doposud charakterizované kanonické zástupce patří sloučeniny obsahující ve své struktuře 19 atomů uhlíku (C19 – např. orobanchol, fabakol apod.) společně se svými acetylovými deriváty (C21 – např. orobanchyl acetát, fabacyl acetát). Výjimku tvoří pouze sorgolakton (C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>). Všechny kanonické SL jsou uvedeny v Tab. 1 a jejich strukturní vzorce na Obr. 2. Kanonické strigolaktony rozděleny do dvou podskupin: odvozené od strigolu (1-8) a orobancholu (9-22) (Yoneyama *et al.*, 2018a). Konfigurace na C-2 'D-kruhu je stejná pro všechny endogenní SL, jmenovitě *R* formy. Odpovídající sloučeniny s konfigurací *S* na C-2' jsou výrazně méně aktivní. Rozdíl mezi oběma skupinami se nachází v konfiguraci na spojení kruhů BC: '3a*R*, 8b*S*' ('3aα, 8bα') v (+)-strigolu a ('3a*R*, 8b*R*')(-)-orobanchol (Xie *et al.*, 2013; Zwanenburg a Pospíšil, 2013; Al-

Babili a Bouwmeester, 2015). Další informace týkající se stereochemie a chiralidy budou detailněji rozebrány v podkapitole 2.2 Stereochemie strigolaktonů.

**Tab. 1** Seznam doposud charakterizovaných kanonických SL.

| Číslo | Typ                     | Název                                |
|-------|-------------------------|--------------------------------------|
| 1     | odvozené od strigolu    | Strigol                              |
| 2     |                         | strigyl acetát                       |
| 3     |                         | 5-deoxystrigol                       |
| 4     |                         | Sorgolakton                          |
| 5     |                         | Sorgomol                             |
| 6     |                         | Strigon                              |
| 7     |                         | 4-hydroxy-5-deoxystrigol             |
| 8     |                         | 4-acetoxy-5-deoxystrigol             |
| 9     | odvozené od orobancholu | Orobanchol                           |
| 10    |                         | orobanchyl acetát                    |
| 11    |                         | 4-deoxyorobanchol                    |
| 12    |                         | Solonakol                            |
| 13    |                         | solonacyl acetát                     |
| 14    |                         | Fabakol                              |
| 15    |                         | fabacyl acetát                       |
| 16    |                         | 7-oxoorobanchol                      |
| 17    |                         | 7-oxoorobanchyl acetát               |
| 18    |                         | 7 $\alpha$ -hydroxyorobanchol        |
| 19    |                         | 7 $\alpha$ -hydroxyorobanchyl acetát |
| 20    |                         | 7 $\beta$ -hydroxyorobanchol         |
| 21    |                         | 7 $\beta$ -hydroxyorobanchyl acetát  |
| 22    |                         | Medikaol                             |

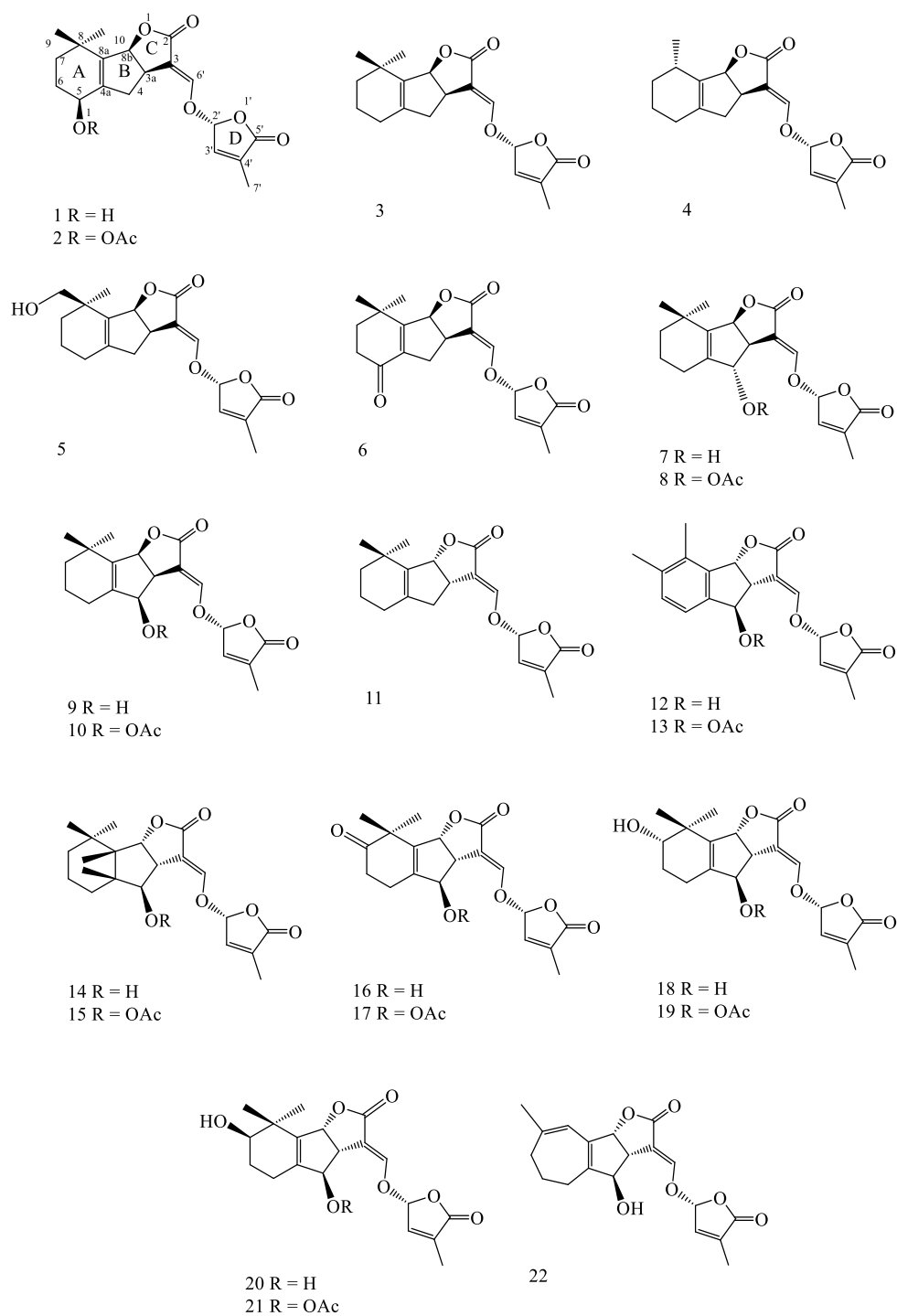
Napříč rostlinnou říší byla analyzována řada různých druhů rostlin (krytosemenných, nahosemenných rostlin) na výskyt a produkci SL. Mezi nejhojněji zastoupené zástupce v rostlinné říši patří SL strigolového nebo orobancholového typu (kanonické SL), ale obecně platí, že jednotlivé rostlinné druhy produkují pouze SL odvozené od jedné skupiny. Avšak i zde existuje výjimka v podobě tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), který je schopen syntetizovat látky odvozené od obou uvedených zástupců kanonických SL (Xie *et al.*, 2013). Nahosemené rostliny (*Gymnospermae*), japonská borovice černá (*Pinus thunbergii* L.), cedr (*Cryptomeria japonica* L.) a jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba* L.), produkují pouze orobancholové SL (Xie *et al.*, 2016; Yoneyama *et al.*, 2018a, 2018b). Obdobně, v případě krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*), mimo bavlník (*Gossypium hirsutum* L.) a jahodník (*Fragaria vesca* L.), byly pozorovány pouze látky orobancholového typu (Cook *et al.*, 1969; Yoneyama *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*,

2018a). Kozinec blanitý (*Astragalus membranaceus* L.) je unikátem mezi rostlinami z rodu *Fabaceae*, neboť produkuje pouze strigolové SL na rozdíl od všech ostatních bobovitých rostlin. Rod *Fabaceae* patří mezi nejlépe prozkoumanou a popsanou skupinu rostlin, co se týká jejich výskytu, která majoritně syntetizuje SL orobancholového typu (Yoneyama *et al.*, 2008; 2018a).

**Tab. 2** Seznam doposud charakterizovaných nekanonických SL.

| Číslo | Název                           |
|-------|---------------------------------|
| 1     | Zealakton                       |
| 2     | Avenaol                         |
| 3     | Heliolakton                     |
| 4     | methoxy-5-deoxystrigol (izomer) |
| 5     | *nepotvrzená struktura          |
| 6     | Karlakton                       |
| 7     | karlaktonová kyselina           |
| 8     | Methylkarlaktonát               |

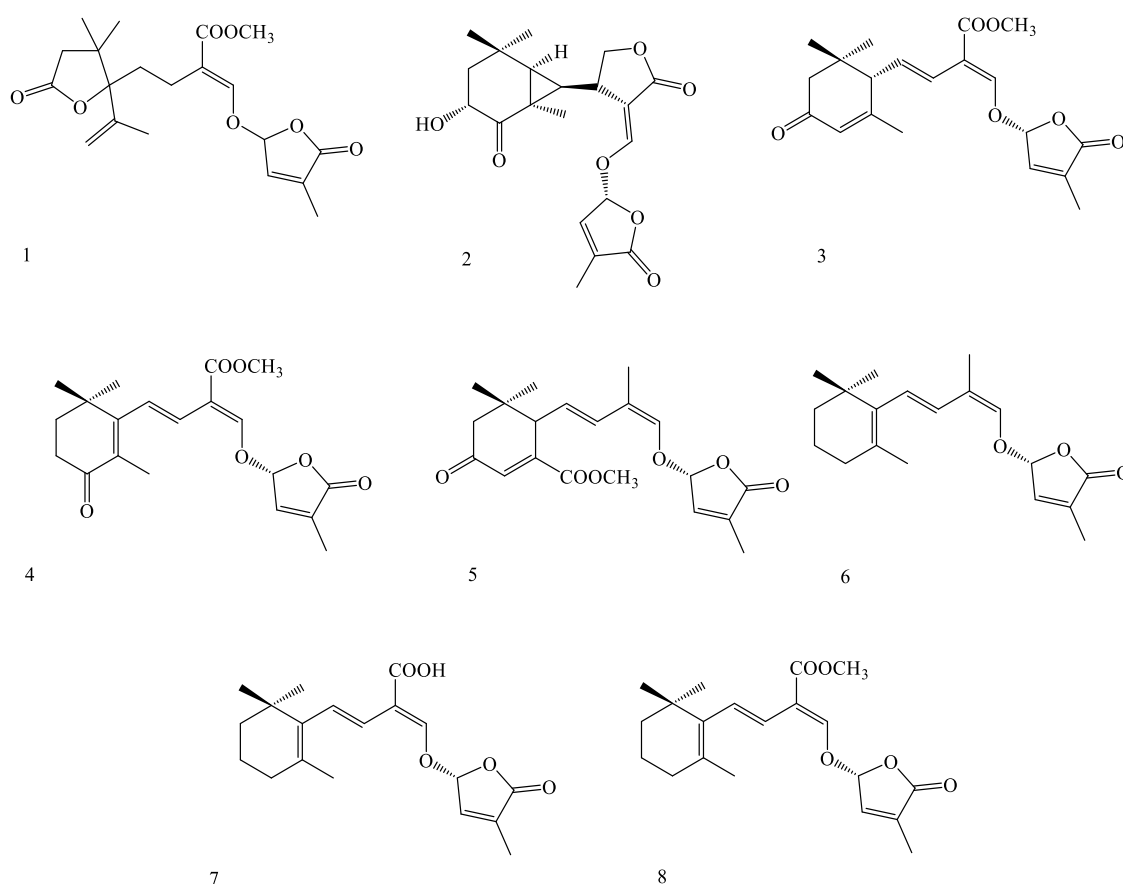
\*(5) Nekanonický strigolakton nedávno izolovaný z kořenových exudátů ovesa černého.



**Obr. 2** Přehled struktur charakterizovaných kanonických SL k roku 2018 (převzato z Yoneyama *et al.*, 2018a).

### 2.1.2 Nekanonické strigolaktony

Základní struktura nekanonických SL nedisponuje typickým tricyklickým spojením (ABC kruh), ale stále si zachovává vazbu enol etherové skupiny na D kruh. Na rozdíl od kanonických zástupců obsahují navíc další atom uhlíku (C20) původem z methylesterové skupiny. Na Obr. 3 jsou zobrazeny různé strukturní variace již charakterizovaných nekanonických SL. Všechny nekanonické SL jsou odvozeny od methylkarlaktonové kyseliny (MeCLA) nebo jejích izomerů a hydroxylových derivátů. Stejně jako v případě kanonických SL jsou zde i výjimky, mezi které patří karlakton a jeho derivát karlaktonová kyselina (C19). Nekanonické sloučeniny s methoxykarbonylovou by měly být správně označovány jako methylestery, jako je tomu v případě MeCLA, než doposud používaný termín lakton (Yoneyama *et al.*, 2018a, 2018b).



**Obr. 3** Přehled nekanonických struktur SL charakterizovaných k roku 2018 (Převzato z Yoneyama *et al.*, 2018a).

Mezi typické zástupce rostlin produkující nekanonické SL (např. zealakton, zeapyranolakton) patří kukuřice (*Zea mays* L.), která je známa jako jeden z hlavních hostitelů parazitických travin z rodu *Striga* (Charnikhova *et al.*, 2017, 2018). Další nekanonický SL, heliolakton, byl poprvé izolován a charakterizován z kořenových exudátů slunečnice (*Helianthus annuus* L.). Pomocí LC-MS/MS analýzy bylo potvrzeno, že kukuřice i slunečnice neprodukují žádné známé kanonické formy (Ueno *et al.*, 2014). Obdobné pozorování jako při chemické analýze slunečnice bylo učiněno při analýze exudátů černého ovsa (*Avena strigosa* L.), u kterých byla pozorována silná odpověď na stimulaci klíčení semen parazitických rostlin z rodu *Striga* a *Orobancha* (Kim *et al.*, 2014). Nekanonické sloučeniny jsou méně stabilní než kanonické a taktéž byl pozorován postupný rozklad během procesu izolace, purifikace a skladování (Akiyama *et al.*, 2010; Boyer *et al.*, 2012; Yoneyama *et al.*, 2018a).

Dosud bylo charakterizováno méně než deset nekanonických zástupců viz Tab. 2. Je však velmi pravděpodobné, že budou identifikovány i další nové nekanonické SL, neboť se jedná o velmi rozmanitou skupinu látek dle jejich chemické struktury (Bertin *et al.*, 2003; Yoneyama *et al.*, 2018b). Kanonické i nekanonické SL jsou biologicky aktivní signální látky, které mají vliv na vývoj a celou jinou řadu fyziologických aspektů a funkcí rostlin. Naproti tomu omezená distribuce kanonických SL a jejich stereospecifický transport z míst biosyntézy do orgánů v nadzemní části naznačuje, že obě skupiny disponují odlišnými biologickými funkcemi. Dle nových poznatků jsou za inhibici větvení výhonků zodpovědné pouze SL nekanonické povahy (Yoneyama *et al.*, 2018a).

### 2.1.2.1 Karlakton

Prvním známým nekanonickým SL je zmíněný karlakton označovaný jako biosyntetický prekurzor všech doposud známých a charakterizovaných strigolaktonů (Alder *et al.*, 2012). Zajímavostí je, že jeho koncentrace v prýtu je ve srovnání s kanonickými SL několikanásobně vyšší a není ovlivněna obsahem fosforu v půdě, resp. obsaženého ve formě fosfátu (Seto *et al.*, 2014). V případě nedostatku uvedeného elementárního prvku byla pozorována až 100× vyšší stimulace klíčení semen parazitických rostlin ve srovnání s kontrolou (Yoneyama *et al.*, 2007b). Všeobecně se uvádí, že produkce SL může vzrůst až 100 000×. Navíc dle nových poznatků lze usuzovat, že odpověď rostliny na jeho nedostatek v půdě je striktně regulována až v biosyntetických

krocích po syntéze karlaktonu a jeho prekurzorů (Yoneyama *et al.*, 2012; Seto *et al.*, 2014; Yoneama *et al.*, 2018b).

## 2.2 Stereochemie strigolaktonů

Základní konvencí stereochemie SL je, že jejich struktury jsou vždy kresleny s A-kruhem na levé straně a D-kruhem na pravé straně. Mimo jiné disponují řadou chirálních center, například strigol má tři centra a existuje osm možných stereoisomerů. Z chemického hlediska správným a jednoznačným způsobem pro určení chiralit v příslušných stereogenních centrech je použití stereodeskriptorů *R* a *S* podle sekvenčních pravidel (Cahn-Ingold-Prelog model). Použití předpon *ent* a *epi* je v praxi mnohem jednodušší, přičemž se pod označením enantiomer (*ent*) rozumí zrcadlový obraz a *epi* označuje epimer tj. opačné uspořádání na uvedeném atomu. Pro označení *ent* nebo *epi* byla zvolena referenční sloučenina, nicméně v posledních 30 letech došlo k řadě změn v nomenklatuře SL (Zwanenburg a Pospíšil, 2013).

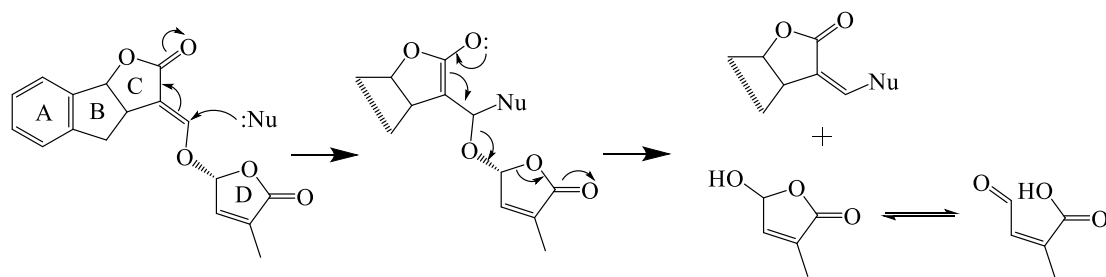
V době před strukturální korekcí orobancholu (5-deoxy-4-hydroxy-strigolu) bylo pojmenování SL jednoduché a přímočaré: (+)-strigol byl zvolen jako referenční sloučenina pro určení stereochemie všech ostatních látek (Brooks *et al.*, 1985; Ueno *et al.*, 2011). Při současném pojmenování nastává problém v okamžiku, kdy místo referenční molekuly strigolu ((+)-(3aR,5S,8bS,2'R)-strigol) je použita molekula orobancholu ((-)-(3aR,4R,8bR,2'R)-orobanchol). Správné označení struktury orobancholu zní „přírodní stereoizomer orobancholu“. Dle Zwanenburg a Pospíšil (2013) má zvolené označení zabránit špatné interpretaci a záměně se strukturou původně navrhovaného orobancholu (Yokota *et al.*, 1998), který byl špatně charakterizován a jeho správná struktura byla objasněna až po téměř 13 letech v roce 2011 (Ueno *et al.*, 2011). Absolutní konfigurace BCD části kanonických strigolaktonů má za následek dělení do dvou skupin viz předchozí kapitola 2.1.1 Kanonické strigolaktony.

Scaffidi (2014) navrhl alternativní pojmenování a změnu ve strukturní korelaci stereoizomerů GR24 za použití známých referenčních molekul (+)-strigolu a (-)-orobancholu. To vedlo k zavedení dvou názvů pro některé stereoizomery např. *ent*-2'-*epi*-5-deoxystrigol je také označován jako 4-deoxyorobanchol (Scaffidi *et al.*, 2012). Při dodržování uvedených pravidel se předejde pochybení v nomenklatuře. Je však doporučeno uvádět správný název dle IUPAC (Zwanenburg a Pospíšil, 2013).

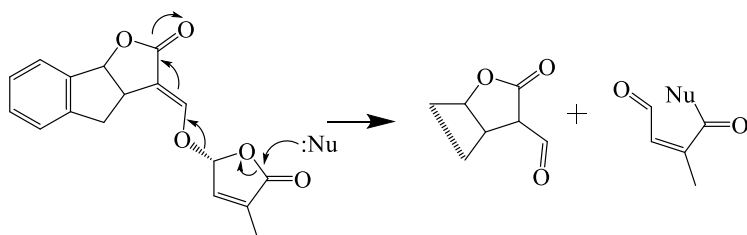
## 2.3 Mechanismus hydrolýzy

SL jsou poměrně nestabilní a snadno podléhají hydrolýze nebo nukleofilnímu ataku, při kterém dochází k porušení stability enol-etherové vazby a oddělení hydroxybutenolidu (D-kruhu) od základního ABC skeletu. První mechanismus nukleofilního ataku na molekulu SL byl navržen v roce 1992 (Mangnus a Zwanenburg, 1992). Reakční mechanismus je charakterizován sledem několika kroků a byl potvrzen na základě reaktivity syntetického analoga GR24 vůči vybraným nukleofilním látkám (viz podkapitola 1.5 Syntetické deriváty strigolaktonů). Model předpokládá v prvním kroku tzv. Michaelovu reakci, při níž dochází k nukleofilní adici karbanionu nebo jiného nukleofilu k  $\alpha/\beta$ -nenasycené karbonylové sloučenině. Mechanismus reakce spočívá v ataku nukleofilního činidla na enol etherovou vazbu SL, za současného odštěpení D-kruhu a tvorby komplexu ABC-nukleofil (Obr. 4A). Vzniklý produkt je možné izolovat (Mangnus a Zwanenburg, 1992, Zwanenburg a Pospíšil, 2013). Avšak tento model byl kritizován Scaffidim (2012) ve snaze sjednotit molekulární mechanismy karrikininů a SL. Namísto adičního-eliminačního mechanismu byl navržen alternativní model (Obr. 4B), který předpokládá adici nukleofilu na nenasycený furanon v pozici C5'. Tento postulovaný model je založen na podobnosti reakce mezi nukleofilními činidly s karrikiny, ačkoliv substituční schéma butenolidového kruhu karrikinů se výrazně liší od SL (Obr. 4C) (Scaffidi *et al.*, 2012).

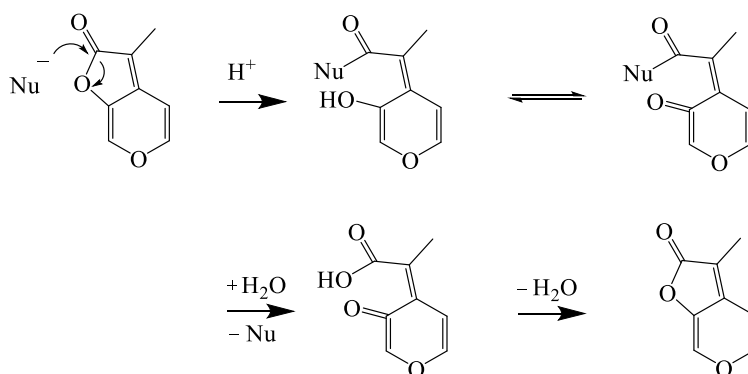
A



B



C

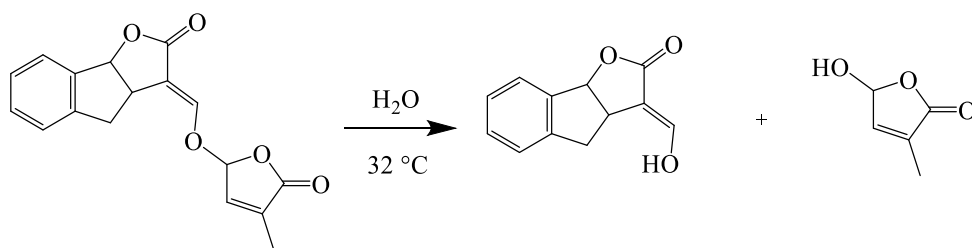


**Obr. 4** Navrhované mechanismy účinku SL. A) Mechanismus založený na adici nukleofilu na enol-etherovou vazbu; B) adice na furanon v pozici C5'; C) analogie adice na C5' furan u karrikininů.

## 2.4 Stabilita strigolaktonů

Chemická stabilita SL závisí především na zvolených experimentálních podmínkách: pH, použitím rozpouštědla a přítomnosti nukleofilních látek. SL jsou stabilní zejména v kořenových exudátech, které jsou charakterizované jako olejovité směsi tvořené řadou nízko a vysokomolekulárních látek. Naproti tomu, ve vodných roztocích byla pozorována omezená stabilita, díky enol-etherové vazbě, která je poměrně nestabilní a snadno se štěpí nebo hydrolyzuje i za mírných podmínek: změna pH, přítomnost nukleofilních činidel, vysoká teplota a světlo (Halouzka *et al.*, 2018). Na Obr. 5 je demonstrována stabilita syntetického analoga GR24 (Zwanenburg a Pospíšil, 2013). Stabilita syntetických analogů, zejména GR-série (GR24, GR7 a GR5), poukazuje na skutečnost, že jejich poločas rozpadu je výrazně vyšší než v případě přirozeně se vyskytujících SL.

Hydrolytická stabilita GR5 byla měřena v celém rozsahu pH a výsledky ukázaly, že rychlost hydrolýzy se úměrně zvyšuje s rostoucím pH (Johnson *et al.*, 1976, 1981). Babiker *et al.* (1988) potvrdil tuto hypotézu za použití GR24, které rovněž vykazovalo nestabilní chování, pro které byla charakteristická velmi rychlá hydrolýza v alkalické oblasti pH. Navíc rychlost hydrolýzy výrazně vzroste po přidavku látky, která má nukleofilní povahu. Poločas rozpadu GR24 je přibližně 10 dnů v 3% roztoku methanolu ve srovnání s 12-15 dny v 20% roztoku ethanolu. Důvodem rozdílu stability v prezentovaných roztocích je skutečnost, že methanol je silnější nukleofilní činidlo než ethanol, a proto v jeho případě je rychlost hydrolýzy provázena signifikantnějším úbytkem GR24. Všeobecně SL vykazují nejvyšší stabilitu v neutrální oblasti pH 6-8, kdy byl pozorován zanedbatelný podíl hydrolýzy (Akiyama *et al.*, 2010; Boyer *et al.*, 2012; Kannan a Zwanenburg, 2014).



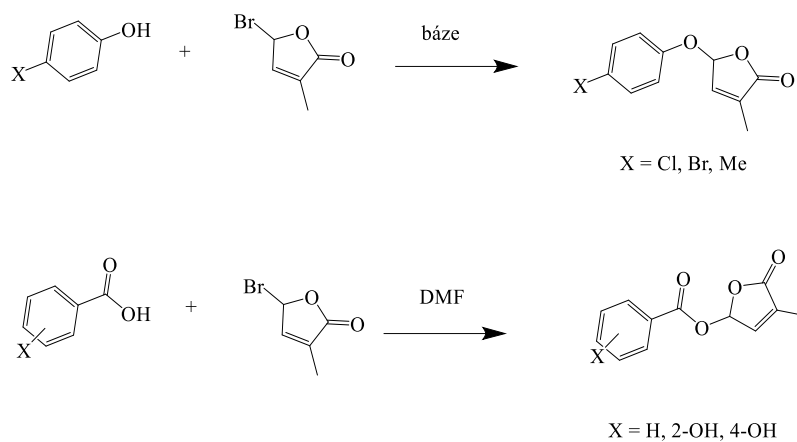
**Obr. 5** Hydrolýza GR24 ve vodném roztoku vedoucího k tvorbě tricyklického laktonu ABC-OH a D-kruhu (hydroxymethylbutenolidu). (Převzato Zwanenburg a Pospíšil, 2013).

## 2.5 Syntetické deriváty strigolaktonů

Syntetické deriváty SL jsou strukturně podobné sloučeniny, které si rostlina nedokáže sama syntetizovat. Slouží pro pochopení řady biologických procesů (biosyntéza, mechanismus účinku, degradace apod.), přičemž disponují podobnou biologickou aktivitou a výrazně vyšší stabilitou (Besserer *et al.*, 2006; Ruyter-Spira *et al.*, 2011). Rozlišujeme syntetická analoga, u kterých zůstalo zachováno spojení přes enol-etherovou vazbu s ABC kruhem a analoga, která postrádají základní tricyklickou strukturu. Jejich příprava není obtížná, jediný požadavek je zachování spojení CD části základní struktury tricyklického laktonu, které je zodpovědné za biologickou aktivitu. D-kruh je spojen pomocí enol-etherové vazby s C-kruhem. Přidáním libovolné části nebo celé molekuly dle uvedeného modelu (Obr. 6) lze imitovat ABC část, přičemž volba nahrazené části značně ovlivňuje biologickou aktivitu nově vzniklého derivátu (pokles nebo nárůst aktivity). Na základě uvedeného modelu byla připravena a popsána řada různých analog strigolaktonů. První série syntetických sloučenin byla popsána ve studii Johnson *et al.*, (1981) a nesla označení GR (GR24, 7 a 5), kde zkratka GR označuje iniciály Gerryho Roseberry, který sloučeninu poprvé připravil (Johnson *et al.*, 1981).

GR24 je velmi aktivní syntetický derivát, který je široce používán pro indukci klíčení semen parazitických rostlin. Dále slouží jako referenční sloučenina pro studium fyziologického účinku strigolaktonů a jejich vlivu na jiné rostlinné hormony, se kterými interagují v řadě biochemických a fyziologických procesů. GR24 je biologicky aktivní i při velice nízkých koncentracích. Řádově se jedná o hodnoty nižší než  $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Besserer *et al.*, 2006). Struktura GR7 a GR5 je odvozena od GR24 (Obr. 6). Molekula GR7 nedisponuje A kruhem a GR5 postrádá zároveň i B-kruh. Obě uvedené látky vykazují stále biologickou aktivitu i přes ztrátu jednoho či více laktonových kruhů. Avšak hodnoty jejich aktivity jsou výrazně nižší než v případě GR24. Tento model znázorňuje závislost požadované biologické aktivity na strukturních variacích (Johnson *et al.*, 1981; Nefkens *et al.*, 1997; Zwanenburg a Pospíšil, 2013; Zwanenburg *et al.*, 2016). Uvedené deriváty vykazují různou účinnost stimulace klíčení. Mimo jiné je jejich účinnost do značné míry závislá na druhu testované parazitické rostliny. Příkladem může být GR24 a jeho slabý účinek vůči *Striga gesneriodes* (nejrozšířenější parazitická rostlina v subsaharské Africe napadající luštěniny) (Ueno *et al.*, 2011; Nomura *et al.*, 2013; Zwanenburg a Pospíšil, 2013; Zwanenburg *et al.*, 2016). Srovnání aktivity GR24, GR7, (-)-orobancholu a (+)-strigolu naznačuje, že část ABC je nutná pro navrhovaný analog,

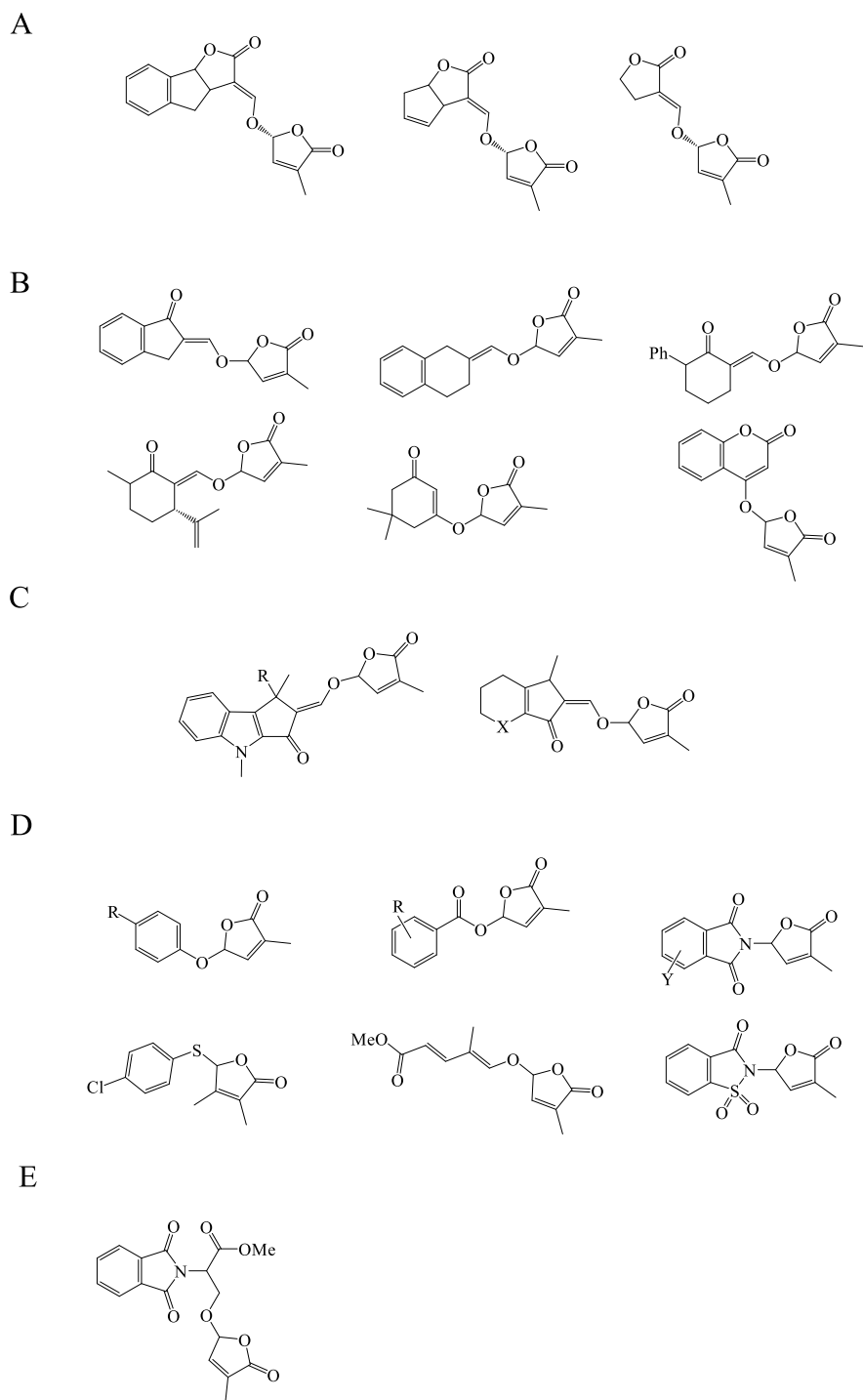
aby byl aktivní i pro stimulaci růstu hyf AM hub. Pro kontrolu růstu rostlin pomocí syntetických analog a mimik je obecně požadován minimální strukturální požadavek. Postačí, aby bylo zachováno spojení přes enol-etherovou vazbu s D-kruhem (*R*-konfigurace) (Zwanenburg *et al.*, 2016).



**Obr. 6** Ukázkové modely navrhované syntézy strigolaktonových analogů.

Kromě GR série existuje i řada jiných široce testovaných analogů. Nijmegen-1 je velmi úspěšným příkladem (Obr. 7). Disponuje vysokou stimulací klíčivosti semen parazitických rostlin ( $\geq 62\%$  při koncentraci  $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a chemickou stabilitou (Nefkens *et al.*, 1997).

Syntéza strukturních analogů je mnohem jednodušší. Samotný proces zahrnuje jen několik reakčních kroků, které nejsou na rozdíl od syntézy endogenních SL (více jak 20 reakčních kroků) časově a finančně náročné. Obecně zde nejsou žádná omezení v přípravě syntetických derivátů, kromě již zmíněné nezbytné přítomnosti butenolidového kruhu a enol-etherové vazby (Kannan a Zwanenburg, 2014). Výchozí látkou mohou být i jednoduché ketony, například 1-tetralon a 1-indanon, jenž jsou převedeny na vysoce aktivní analoga v několika jednoduchých syntetických krocích. Keto-enoly, jako je hydroxykumarin a dimedon, vyžadují pouze jediný krok k získání aktivního analoga (Mwakaboko a Zwanenburg, 2011a, 2011b). Tento poměrně jednoduchý model slouží k přípravě neomezeného množství strukturních variací SL s různorodou biologickou aktivitou. Především se jedná o snahu připravit levný a komerčně dostupný analog, který bude vysoce efektivní v boji proti parazitickým rostlinám (Zwanenburg *et al.*, 2016).



**Obr. 7** Strukturní variace SL analog, A) systematické zjednodušení struktury pomocí analog ze série GR (zleva: GR24, GR7 a GR5), B) analoga odvozená od ketonů a cyklických ketenolů, C) analoga s heterocyklickou skupinou, D) příklady typických SL analog, E) struktura Nijmegen-1 (převzato Zwanenburg *et al.*, 2016).

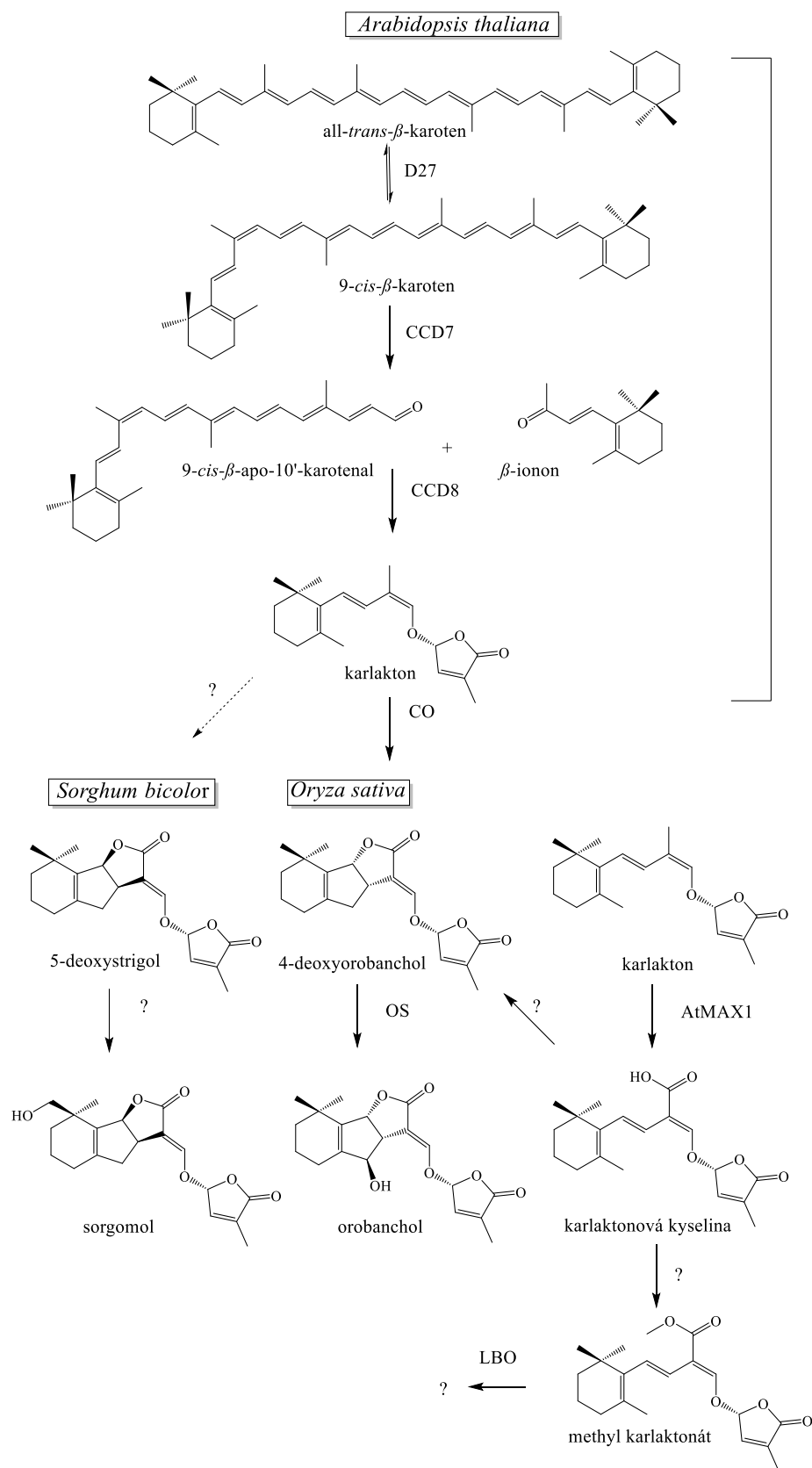
## 2.6 Biosyntéza strigolaktonů

O rostlinných hormonech obecně platí, že působí lokálně v místě jejich biosyntézy nebo jsou transportovány pletivy a distribuovány do různých orgánů. Mechanismy vzájemné interakce hormonů mohou být různé. Je známo, že hormonální signální dráhy interagují na úrovni genové exprese. Jednotlivé fytohormony jsou schopny regulovat syntézu (hormonální hladinu), citlivost (hormonální odpověď) a transport do míst účinku (distribuce hormonů) (Santner *et al.*, 2009; Santner a Estelle, 2009).

Hlavním místem biosyntézy SL jsou kořeny, ze kterých jsou SL vylučovány do rhizosféry nebo distribuovány do prýtu, kde ovlivňují růst stonku a inhibují vývoj nových výhonků (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2010; 2016). Za použití inhibitoru biosyntézy karotenoidů fluridonu byl objasněn biosyntetický původ SL, který potvrdil skutečnost, že jsou stejně jako kyselina abscisová odvozeny od karotenoidů a jejich společné biosyntetické dráhy se rozcházejí u  $\beta$ -karotenu (Matušová *et al.*, 2005; López-Ráez *et al.*, 2010; Rani *et al.*, 2008).

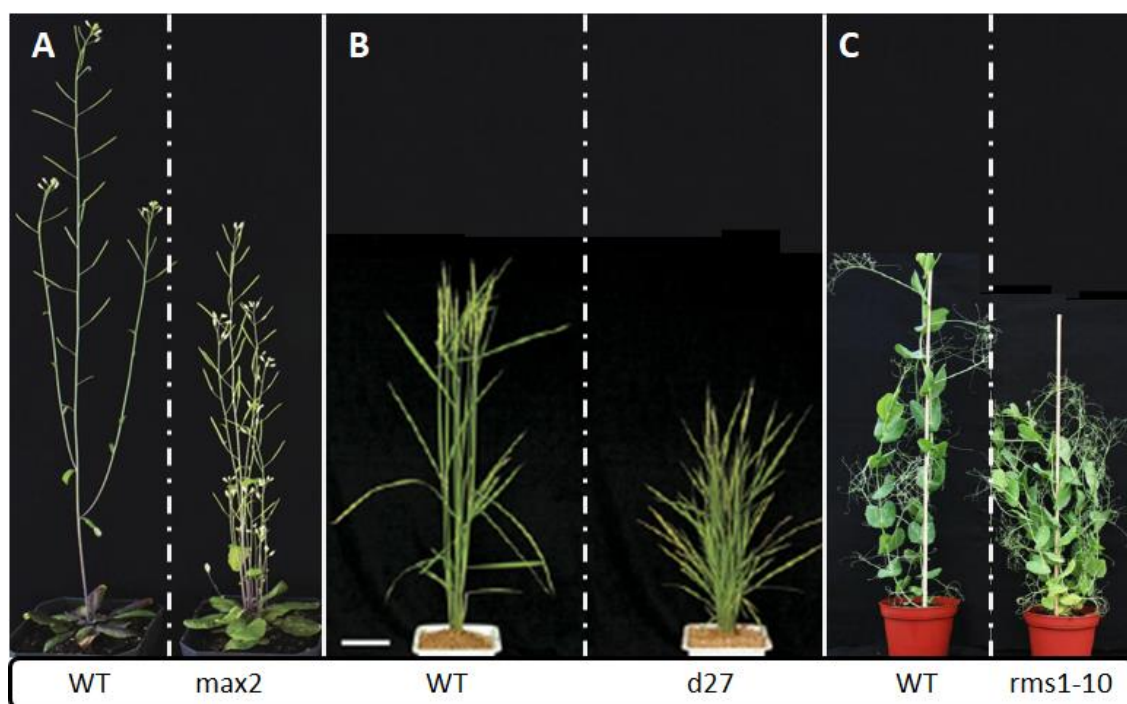
Proces přeměny karotenoidů vyžaduje řadu enzymatických reakcí, které způsobují změny základní struktury molekuly karotenoidu (C40) za vzniku tricyklického laktonu (hydroxylace, methylace a epoxidace) (Matušová *et al.*, 2005). Na Obr. 8 je uvedena biosyntetická dráha SL popisující vznik karlaktonu, prekursoru SL, až po vzájemné přeměny jeho derivátů. Jedná se o sled reakcí, které začínají reverzibilní konverzí všech trans- $\beta$ -karotenů na 9-cis-karoten, katalyzovanou karotenisomerasou (EC 5.2.1.14). Vzniklý 9-cis-karoten je štěpen stereospecifickou monooxygenasou (CCD7) na dvojné vazbě C9'-C10', čímž vzniká 9-cis-apo-10'-karotenal (C27) a  $\beta$ -ionon (C13). Ve třetím kroku jiná stereospecifická monooxygenasa (CCD8) katalyzuje přeměnu 9-cis- $\beta$ -apo-10'-karotenalu na karlakton a sloučeninu C8  $\omega$ -OH-(4-CH<sub>3</sub>)heptanal. Primárním produktem biosyntetické dráhy je molekula karlaktonu (C19), která je považována za prekursor pro kanonické a nekanonické SL. Jeho další přeměna je katalyzována pomocí enzymů z rodiny hemových proteinů cytochromů P450 na další bioaktivní strigolaktony (Booker *et al.*, 2005). U huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) bylo popsána přeměna karlaktonu na kyselinu karlaktonovou (CLA) pomocí proteinu MAX1/CYP711A, která je následována methylací karlaktonu za vzniku MeCLA doposud neznámým enzymem (Abe *et al.*, 2014). Enzym 2-oxoglutarát-dependentní dioxygenasa následně přeměňuje MeCLA na prozatím nepopsaný a zatím necharakterizovaný metabolit (Brewer *et al.*, 2016). Bylo popsáno, že jeden z pěti charakterizovaných homologů MAX1 u rýže

(Os900/CYP711A2) je zodpovědný za oxidaci karlaktonu na 4-deoxyorobanchol (4DO). Jeho další homolog *Os1400/CYP711A3* má funkci orobancholsynthasy (OS), která katalyzuje přeměnu 4DO na orobanchol (Zhang *et al.*, 2014). Do biosyntetické dráhy SL patří i poměrně nově charakterizovaný gen *LOW GERMINATION STIMULANT1*, který kóduje sulfotransferasu zodpovědnou za přeměnu 5-deoxystrigolu na orobanchol v kořenových exudátech široku dvoubarevného prostřednictvím zatím neznámého mechanismu schopného regulovat rezistenci vůči *Striga* infekci (Gobena *et al.*, 2017).



**Obr. 8** Biosyntetická dráha strigolaktonů a vzájemné přeměny SL. (CO – karlakton oxidasa, OS – orobancholsyntasa, LBO – „Lateral Branching Oxidoreductase“. (Převzato a upraveno dle Brewer *et al.*, 2016; Flematti *et al.*, 2016).

SL byly identifikovány jako látky, jejichž syntéza a transport je kontrolován pomocí skupiny genů označovaných jako *MORE AXILLARY GROWTH* (*MAX1-4*). Genová rodina *MAX*, která byla charakterizována u huseníčku, má řadu homologních genů např. u hrachu (*Pisum sativum* L.) gen *RAMOSUS* (*RMS*), u petunie (*Petunia hybrida* L.) gen *DECREASED APICAL DOMINANCE* (*DAD*) a u rýže (*Oryza sativa* L.) gen *HIGHTILLERING DWARF* (*HTD*) (Lin *et al.*, 2009; de Saint Germain *et al.*, 2013; Mach, 2015). U mutantů (*max/rms/dwarf*) se projevuje fenotyp zvýšeného větvení stonku (Obr. 9). Navíc uvedené rostliny jsou necitlivé nebo deficientní na produkci SL dle regulovaného genu. Umehara (2008) a Gomez-Roldan (2008) jako první popsali účinky SL jako rostlinného hormonu, do té doby byly pokládány za sekundární metabolity (Umehara *et al.*, 2008; Gomez-Roldan *et al.*, 2008).



**Obr. 9** Fenotyp rostlin s mutací v biosyntéze SL. Převzato: A) huseníček (WT – Col-0), B) rýže (WT – Shiokari), C) hrách (WT – Térése) (převzato Lin *et al.*, 2009; de Saint Germain *et al.*, 2013; Mach, 2015).

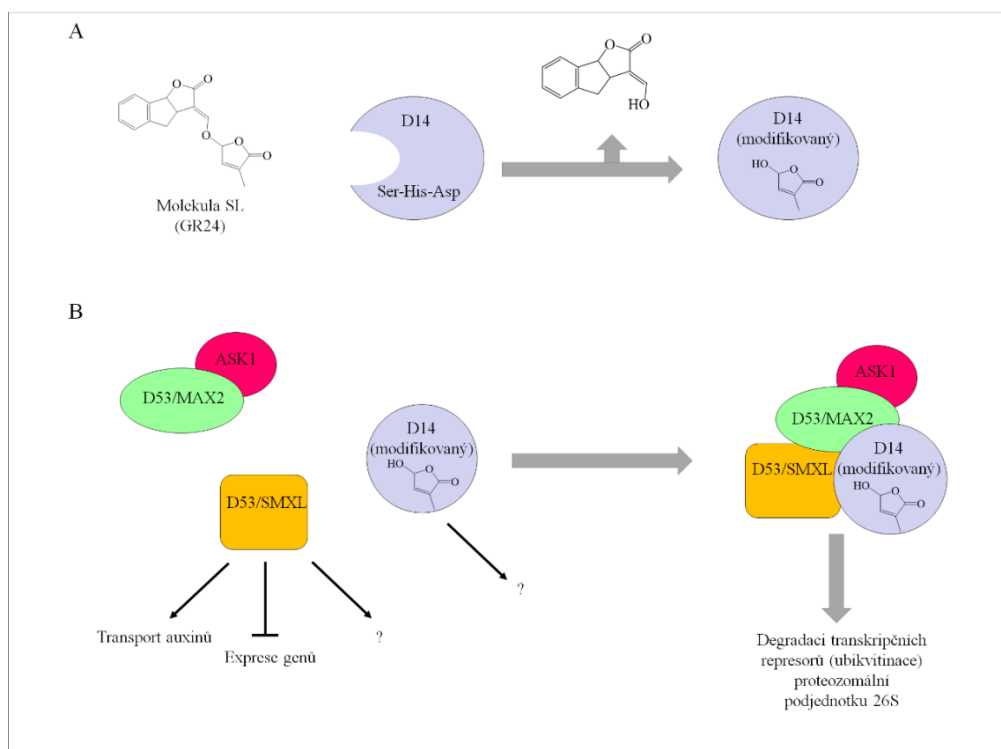
Klíčové enzymy v biosyntéze SL zahrnují karotenisomerasu, označovanou jako DWARF27 (D27) a karotenoid-štěpící dioxygenasy označované jako CCD7 a CCD8 (Obr. 8). Gen *D27* byl poprvé charakterizován v kořenech rýže a huseníčku (Matusova *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2012a). Existuje řada různých orthologních genů, které kódují CCD (Alder *et al.*, 2012). Tyto geny jsou uvedeny v Tab. 3 a jsou specificky označeny podle druhu rostliny, ve které byly charakterizovány.

**Tab. 3** Geny zodpovědné za biosyntézu a signalizaci SL (Převzato a upraveno dle Wang a Bouwemeester, 2018)

| Huseníček                                 | Hrách       | Petúnie                          | Rýže                            | Kódovaný protein                            |
|-------------------------------------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>AtD27</i>                              |             | <i>D27</i>                       |                                 | $\beta$ -karoten isomerasa                  |
| <i>MAX3</i>                               | <i>RMS5</i> | <i>DAD3</i>                      | <i>D17</i>                      | CCD7                                        |
| <i>MAX4</i>                               | <i>RMS1</i> | <i>DAD1</i>                      | <i>D10</i>                      | CCD8                                        |
| <i>MAX1</i>                               |             | <i>PbMAX1</i>                    | <i>Os900</i> ,<br><i>Os1400</i> | Cytochrom P450                              |
| <i>LBO</i><br><i>AtD14</i>                | <i>RMS3</i> | <i>DAD2</i>                      | <i>D14</i>                      | Oxidoreduktasa<br>$\alpha/\beta$ -hydrolasa |
| <i>MAX2</i>                               | <i>RMS4</i> | <i>PbMAX2a</i><br><i>PbMAX2b</i> | <i>D3</i>                       | F-box                                       |
| <i>SMXL6</i> <i>SMXL7</i><br><i>SMXL8</i> |             |                                  | <i>D53</i>                      | Třída I Clp ATPasa                          |

Esenciální složky signální dráhy SL byly identifikovány pomocí screeningu mutantních rostlin necitlivých na aplikované exogenní deriváty SL a byly studovány u rýže, huseníčku, hrachu a petúnie. Jedná se o 3 esenciální proteiny (Tab. 3):  $\alpha/\beta$  hydrolasy (*D14/AtD14/RMS3/DAD2*), F-box protein (*D3/MAX2/RMS4/PhMAX2A*) a proteiny represoru *D53/D53* podobně jako SMXLs u huseníčku (Ishikawa *et al.*, 2005; Arite *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Hamiaux *et al.*, 2012; Waters *et al.*, 2012a; Jiang *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013; Wang a Bouwemeester, 2018). Percepce signálu je závislá na mechanismu, který zahrnuje tvorbu kovalentně vázaného meziprojektu vzniklého při vazbě SL na receptor *D14*, přičemž ve stejný okamžik dochází k jeho hydrolýze (Obr. 10). Při tvorbě přechodného komplexu SL-*D14* je

iniciován přenos signálu na F-box protein, který je tvořen repeticemi bohatými na aminokyselinu leucin. F-box slouží jako rozpoznávací podjednotka komplexu ubiquitin ligasy SKP1-CUL1-F-box (SCF) a iniciuje proteozomální podjednotku 26S pro degradaci transkripčních represorů, jako jsou SMXL v husevníčku a D53 v rýži (Jiang *et al.*, 2013; Soundappan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2013; Wang a Bouwemeester, 2018). D14 obsahuje navíc konzervovanou katalytickou třídu aminokyselin serin-histidin-asparagová kyselina, která je esenciální pro hydrolytickou aktivitu D14 proteinu. Ukázalo se, že u petúnie D14, resp. DAD2, je SL analog GR24 vázán a hydrolyzován a mimo jiné jeho hydrolytická aktivita je nezbytná pro interakci protein-DAD2 s PhMAX2 (Hamiaux *et al.*, 2012). Krystalová struktura SL-D-indukovaného komplexu AtD14-D3-ASK1 u huseníčku odhalila, že při hydrolýze SL se protein AtD14 kovalentně váže na komplex SL-D kruh a podléhá konformační změně pro usnadnění interakce s D3 (Yao *et al.*, 2016). Kovalentní vazba D-kruhu prostřednictvím D14 a jeho ortologů byla také prokázána u hrachu, D14 resp. RMS3 (de Saint Germain *et al.*, 2016) a *Striga* u ShHTL7 (Yao *et al.*, 2017).



**Obr. 10** Kovalentní modifikace a funkce SL receptoru D14, A) SL analog GR24 tvoří vazbu s D14, který fixuje část D-kruhu v aktivním místě (třída aminokyselin: serin, histidin a kyselina asparagová). B) Modifikovaný D14 interaguje s D3/MAX2 a D53/SMXL. D14 prochází konformační změnou, která vede k degradaci jak D53/SMXL, tak samotného D14. Degradace D53/SMXL iniciuje změny funkce buněk včetně transportu auxinu, genové exprese a spekuluje se o další řadě jiných funkcí (převzato a upraveno Wang a Smith, 2016)

## 2.7 Biologické funkce strigolaktonů

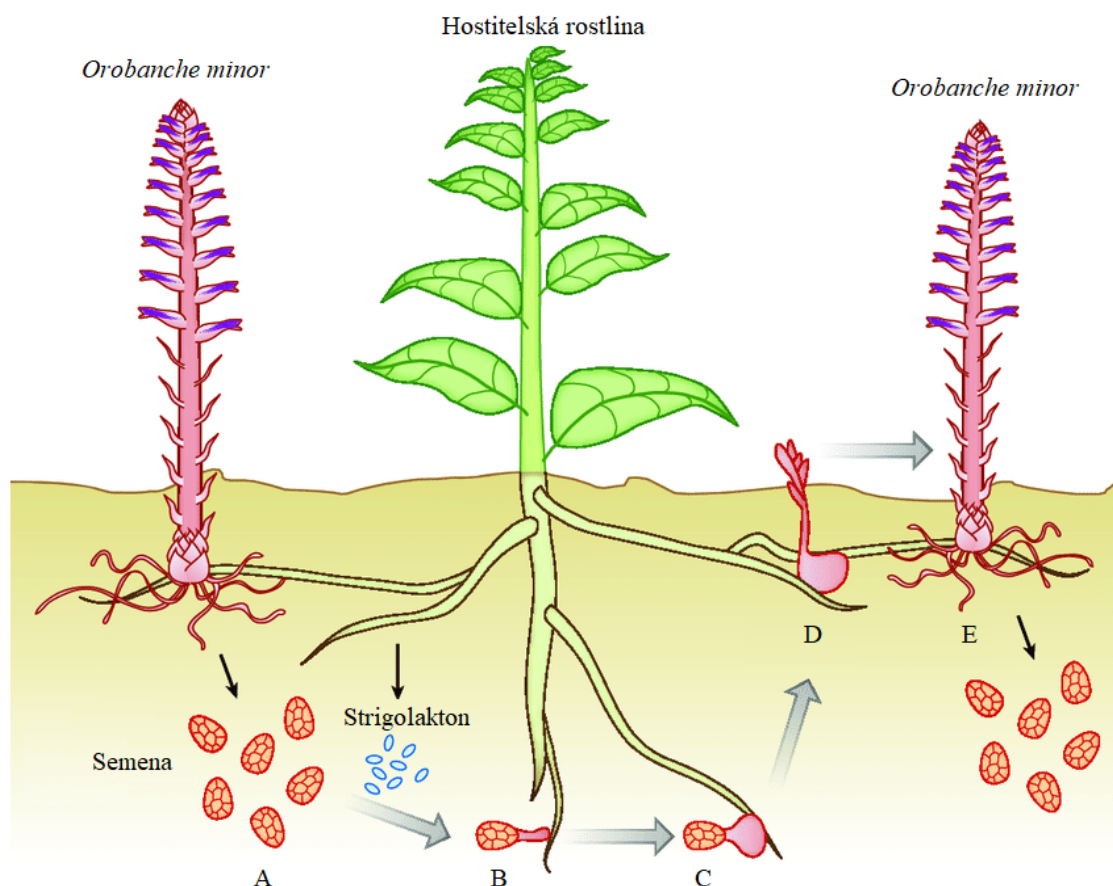
### 2.7.1 Arbuskulární mykorhiza

Další významná biologická funkce SL souvisí se zapojením v symbiotickém vztahu mezi vyššími rostlinami a houbami, jedná se o tzv. arbuskulární mykorhizu (AM). Zvýšená produkce SL představuje vyšší pravděpodobnost vytvoření symbiózy s mykorhizními houbami, z oddělení *Glomeromycota*; třída *Glomeromycetes* (Harrison *et al.*, 2005). Např. 5-deoxystrigol, který byl izolován z kořenových exudátů *Lotus japonicus*, je zodpovědný za indukci větvení houbových hyf v AM a hraje významnou úlohu v rozpoznání správného hostitele (Akiyama *et al.*, 2005). Symbiotický vztah je závislý na dostupnosti živin a minerálů. V případě jejich nedostatku základních elementárních prvků, zejména fosforu nebo dusíku, dochází k zvýšení koncentrace SL, které jsou uvolňovány ve formě exudátů do rhizosféry. AM symbióza je nejrozšířenějším vztahem v rostlinné říši (80 % rostlin), díky kterému mohou rostliny zvyšovat příjem fosforu. AM houby chrání rostliny před útokem různých patogenů a nadměrným množstvím vody, neboť jsou schopny regulovat její příjem a výdej (López-Ráez *et al.*, 2008a). Úspěch symbiotického vztahu závisí na tom, jak efektivně jsou AM houby schopny kolonizovat hostitelskou rostlinu. AM houby tvoří rozsáhlou síť, která spojuje kořeny hostitelské rostliny s houbovými hyfami a vzniká při kolonizaci kořenového systému rostliny. Navíc je charakterizována tvorbou rozsáhlých větvených hyf (arbuskul), jejichž růst je indukován signálními molekulami SL, produkovány hostitelskými rostlinami. Arbuskuly jsou efemerní struktury, které se mění po určitém časovém úseku (v rámci několika dní) ve funkčně neaktivní amorfni hmotu. Jsou hlavním místem zodpovědným za přenos anorganického Pi a jednoduchých sacharidů mezi hostitelem a symbiontem (Akiyama *et al.*, 2005, 2010).

### 2.7.2 Interakce s parazitickými rostlinami

SL byly původně identifikovány jako signální látky, které indukují klíčení parazitických rostlin rodu *Striga* a *Orobanch*e (Cook *et al.*, 1966). K stimulaci růstu a nastartování životního cyklu parazita dochází jen tehdy, pokud je zachycen signál ve formě molekuly SL. Koncentrace, která je nutná pro jeho vyklíčení, odpovídá hodnotě  $10^{-12}$  M, přičemž pro hormonální funkci v rostlině je dostačující koncentrace  $10^{-8}$  M. *Striga* a *Orobanch*e parazitují na zcela rozdílném hostiteli a vyskytují se v různých částech světa, ale i přesto je jejich životní cyklus do značné míry podobný (Bouwmeester *et al.*, 2003; Humphrey *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2012).

Signalizace mezi hostitelskou rostlinou a parazitem probíhá v několika etapách. Nejdůležitějším krokem životního cyklu parazitické rostliny je zachycení signálu ve formě molekuly SL, které jsou uvolněny z kořenů hostitelské rostliny do rhizosféry, kde indukují klíčení parazitických semen (Obr. 11). Avšak indukce signálu a úspěšné klíčení nezaručují přežití parazita. Průběh infekce je charakterizován tvorbou tzv. apresorií (slouží pro mechanické narušení buněčné stěny), ze kterých se diferencují tenká vlákna – haustoria. Haustorium je specifický orgán, který usnadňuje průnik parazitické rostliny přes kořenový systém hostitele (Butler, 1995; Bouwmeester *et al.*, 2003). Zástupci rodu *Striga* jsou charakterizováni jako jednoleté hemiparazitické rostliny. Způsobují masivní ekonomické ztráty v rámci milionů až miliard dolarů ročně. Mezi hospodářsky nejvýznamnější škůdce rodu *Striga* patří *S. hermonthica*, *S. asiatica* a *S. gesnerioides*. Dalším významným rodem je *Orobanche*, jehož zástupci se na rozdíl od rodu *Striga* řadí mezi obligátní holoparazity, kteří jsou životně závislí na svém hostiteli. Oba rody se liší svým geografickým výskytem. Zástupci rodu *Orobanche* jsou více rozšířeny v mírném a subtropickém podnebí severní polokoule (severní Amerika, západní Asie, Blízký východ, Středozemní moře a jižní Evropa), zatímco výskyt *Striga* převažuje v tropickém podnebí subsaharské Afriky, Austrálie, Číny a Indie. Parazitické rostliny jsou schopny produkovat téměř statisíce semen, která přežívají v půdě až desítky let. To přináší velký problém pro zemědělství (Grenz a Sauerborn, 2007; Parker, 2009, 2012; Rubiales *et al.*, 2009). Byla navržena řada strategií pro boj s těmito parazity. Nejznámější metoda pro jejich regulaci je označována jako „sebevraždné klíčení“. Spočívá v aplikaci roztoku syntetického SL analoga o určité koncentraci před výsevem hospodářských rostlin v polních podmínkách. Po indukci semen parazitických rostlin dochází k jejich vyklíčení bez přítomnosti hostitele. Pokud není navázaný kontakt s hostitelskou rostlinou dochází k vyčerpání zásob a úhynu parazita (Johnson *et al.*, 1976; Zwanenburg *et al.*, 2009).



**Obr. 11** Životní cyklus *Orobanchae minor* L. (Převzato z Xie *et al.*, 2010; Kořistka, 2016). A) Klíčení semen je vyvoláno stimulanty uvolněné hostitelem, včetně molekul SL. B) Tenká vlákna nově diferencované parazitické rostliny pronikají skrze buněčnou stěnu kořene hostitelské rostliny za současného vzniku haustoria. (C-D) Parazitické rostliny rostou pod zemí několik týdnů nebo měsíců před vyrašením dospělé kvetoucí rostliny schopné dalšího rozmnožování. (E) Parazit produkuje velké množství semen, které zůstávají životaschopné po mnoho let v půdě.

### 2.7.3 Vliv na růst postranních kořenů a interakce s auxiny

SL ovlivňují nejen růst prýtu rostlin, kde potlačují růst auxilárních pupenů a větvení stonku, ale také hrají důležitou roli ve vývoji kořene (Kapulnik *et al.*, 2011; Koltai *et al.*, 2010). Při nedostatku fosforu dochází ke změnám kořenového systému (López-Bucio *et al.*, 2002) a zároveň k ovlivnění produkce SL. Změny tvaru a struktury kořenového systému jsou nutné pro adaptaci, přičemž pokles jeho koncentrace v půdě vede ke zvýšenému větvení, které rostlině umožní se lépe vypořádat s limitujícími podmínkami prostředí. Pro rostliny potýkající se s nedostatkem fosforu je charakteristický zvýšený růst a prodlužování postranních kořenů a tyto projevy jsou zprostředkovány endogenními signálními molekulami SL (Ruyter-Spira *et al.*, 2011; Bonser *et al.*, 1996). Je známo, že po exogenní aplikaci syntetického analoga SL (GR24) dochází k poklesu hustoty a délky kořenového vlášení (pozn. hustota kořenového vlášení

se obvykle vyhodnocuje jako počet vlásků na 1 mm délky kořene) a poukázala na schopnost stimulovat růst primárního kořene u semenáčků *Arabidopsis* (Kapulnik *et al.*, 2011; Ruyter-Spira *et al.*, 2011). Nedávné studie potvrdily významnou roli v řadě biologických procesů, kde jsou zapojeny do rozsáhlé a komplikované sítě reakcí, známé pod pojmem „crosstalk“, ve které interagují s celou řadou jiných rostlinných hormonů, zejména auxinů. Auxin je fytohormon, který je nezbytný pro správný růst a větvení stonku neboli apikální dominanci. Auxiny společně se SL mají významný vliv na morfologii a tvorbu kořene. Bylo dokázáno, že SL inhibují polární transport auxinů v huseníčku, rajčatech a rýži (Koltai *et al.*, 2010; Ruyter-Spira *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2014, 2015). Předchozí studie potvrdily, že auxin může upregulovat expresi genů (*MAX3* a *MAX4*) související se biosyntézou SL, které pak fungují jako tzv. auxinem indukovaní druží neboli sekundární poslové (Hayward *et al.*, 2009; Crawford *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015). Závěrem lze konstatovat, že oba uvedené fytohormony se významně podílejí na formování růstu a vývoje kořene, kde regulují během uvedených procesů endogenní hladiny a distribuci jiných fytohormonů, které jsou deaktivovány nebo aktivovány pomocí zpětnovazebné smyčky (Hayward *et al.*, 2009).

Rostlinou regulovaná produkce SL nabízí řadu evolučních výhod, např. když je rostlina vystavena limitujícím podmínkám, které souvisí zejména s nedostatkem fosforu, reagují na něj hned několika různými způsoby. Změny jsou zaměřeny na především na zvýšený příjem živin za současného snížení růstu postranních kořenů. Význam SL především spočívá v navázání symbiotického vztahu s AM houbami, pro jeho stimulaci stačí velmi nízké koncentrace v řádově  $10^{-13}$  M (Umehara *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2012; Yoneyama *et al.*, 2012).

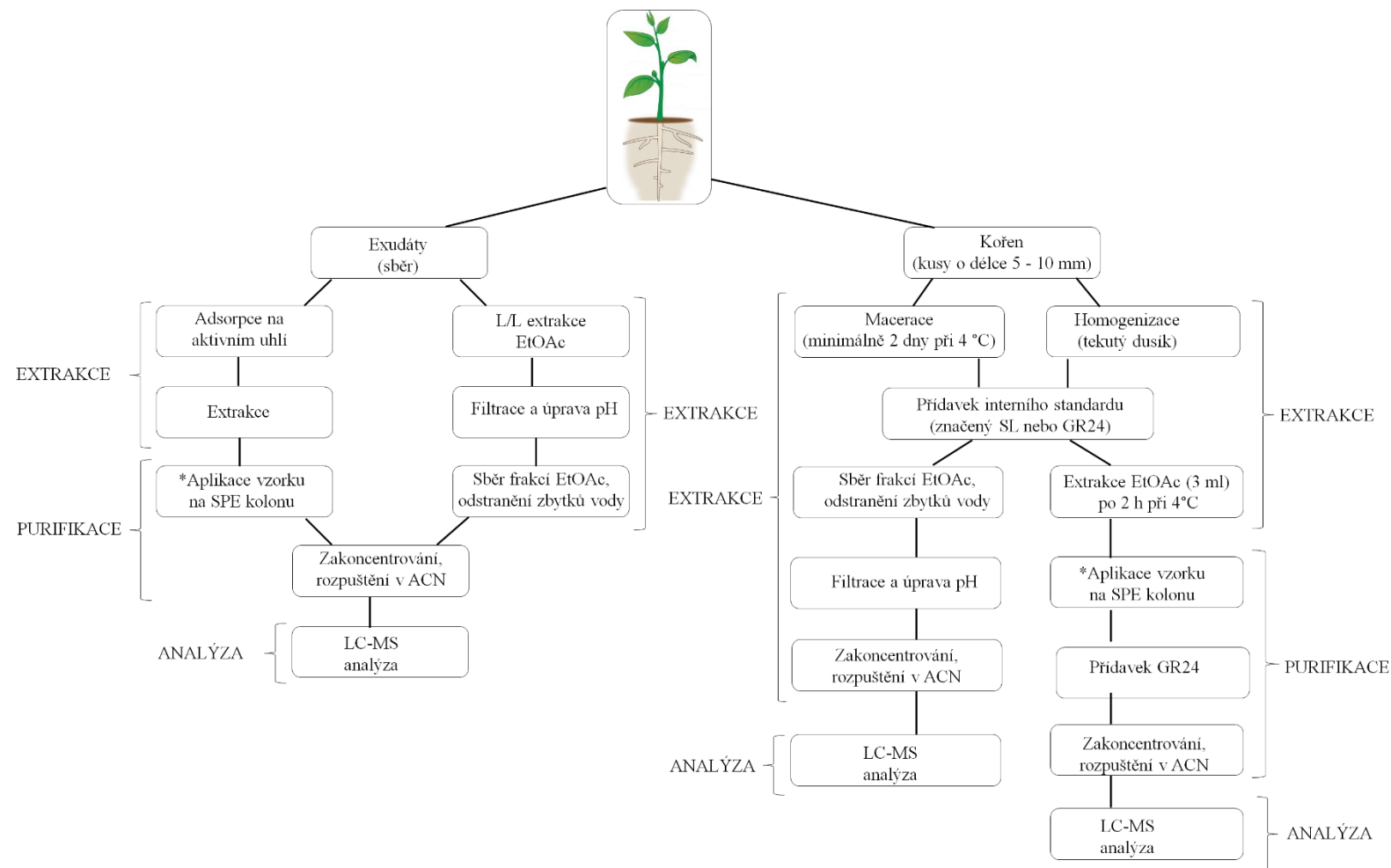
## 2.8 Izolace a purifikace strigolaktonů

Příprava vzorku je nezbytným a zároveň kritickým krokem pro chemickou analýzu rostlinných metabolitů, zejména fytohormonů. SL, jak již bylo uvedeno, se vyskytují převážně rostlinou uvolněných exudátech nebo kořenovém systému, odkud jsou pak dále transportovány do dalších orgánů (Kohlen *et al.*, 2011; Delaux *et al.*, 2012).

Jejich izolace z kořenových exudátů je limitována přítomností anorganických solí v používaných kultivačních médiích. Chromatografické metody zvolené pro konečnou analýzu nejsou kompatibilní s tak vysokými koncentracemi solí, a proto je nutné jejich opětovné přečištění. Extrakce navíc vyžaduje zpracování relativně velkých objemů

média, řádově se jedná o desítky litrů. Dále je nutné brát v úvahu dostatečnou selektivitu a kapacitu použitého rozpouštědla nebo sorbentu.

Na druhou stranu při izolaci a purifikaci SL z rostlinného pletiva je důležité nejen zakoncentrování cílových sloučenin a odsolení vzorků, ale také odstranění interferujících látek. V tomto případě většinu nechtěných kontaminantů představují organické molekuly s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi nebo chemickou strukturou. SL svojí chemickou strukturou a nestabilitou představují značnou výzvu pro široké spektrum vědních oborů. Na rozdíl od jiných rostlinných hormonů je jejich izolace časově náročná a mnohdy nezajišťuje uspokojivé výsledky. Prioritou je zabránit jakýmkoliv ztrátám během izolačních a čistících kroků, aby se návratnost celého procesu udržela co nejvyšší. Historicky první izolační postupy zahrnovaly více než 25 000 rostlin. Avšak v současnosti při použití moderních chromatografických a technik hmotnostní spektrometrie se významně snižuje jejich počet pro analýzu (Mori 1998; Yokota *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2015). Navíc během posledních dvou desetiletí se požadované množství výchozího rostlinného materiálu pro profilování SL snížilo z desítek kilogramů (např. Yokota *et al.*, 1998) až na stovky miligramů (Rial *et al.*, 2018). O tento signifikantní pokles se zasloužily zejména modifikace, resp. odstranění některých nedostatků a chyb vzniklých při izolaci a přečištění SL (Yoneyama *et al.*, 2016; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Dnes běžně používané protokoly vychází zejména z publikovaných prací výzkumné skupiny vedené prof. Yoneyamou (Obr. 12) (Yoneyama *et al.*, 2007a, 2007b, 2013, 2016; Kisugi *et al.*, 2013; Boutet-Mercey *et al.*, 2018).



**Obr. 12** Zjednodušené schéma pracovního postupu izolace pro stanovení SL; A) Z rostlinných exudátů, B) Kořenové pletivo.  
 \*SPE postup zahrnuje jednotlivé kroky: kondicionace, aplikace vzorku, promytí, eluce (frakcionace jednotlivých eluovaných složek).

### 2.8.1 Kořenové exudáty

Rostlinné exudáty tvoří komplexní směs bioaktivních látek zahrnujících nízkomolekulární i vysokomolekulární sloučeniny. Jsou důležité pro adaptaci rostlin v jejich přirozeném prostředí a ochranu (Walker *et al.*, 2003; Merbach *et al.*, 1999). Exudáty jsou vylučovány prostřednictvím kořenových vlásků, kalusu nebo suspenzních buněk (Walker *et al.*, 2003).

Kolekce bioaktivních látek obsažených v kořenových exudátech je nedestruktivní proces, který lze provádět opakovaně, aby se dosáhlo získání co nejvyššího množství požadovaných molekul (Bagger *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2012). Semenáčky se obvykle pěstují v hydroponickém kultivačním systému. Semena jsou nejprve sterilizována, ponechána klíčit a několikadenní semenáčky jsou přeneseny do hydroponického systému s libovolným množstvím zvoleného kultivačního média (Yoneyama *et al.*, 2007a; Xie *et al.*, 2015). Voda z vodovodního řádu nebo demineralizovaná voda neobsahující fosfor ve formě fosfátu (Pi) a bez definovaného složení nutrientů může být použita jako prvotní médium obvykle po dobu prvních 3-5 dnů. Její aplikace umožňuje rychlejší adaptaci rostlin, kdy je později nahrazena plnohodnotným médiem s definovaným množstvím minerálů a vitamínů. Produkce a proces uvolnění SL do média jsou striktně řízeny dostupností živin (Yoneyama *et al.*, 2007a; Xie *et al.*, 2010; Yoneyama *et al.*, 2015), a proto je možné modifikovat časový rámec kultivace a následný sběr uvolněných SL ve formě kořenových exudátů prostřednictvím nutričního složení média (Yoneyama *et al.*, 2007a, 2013; Jamil *et al.*, 2011).

V současnosti se běžně používají různá kultivační média. Většina vědeckých skupin v rámci studie SL využívá Hoaglandovo živné médium (jeho ½ variantu) (Ueno *et al.*, 2014; Charnikhova *et al.*, 2017 nebo médium s označením „Tadano a Tanaka“ (Yoneyama *et al.*, 2013). Tato kultivační média obsahují různé zastoupení anorganických solí, které mohou vázat cílové sloučeniny na svůj povrch během procesu redukce objemu média a tím ovlivnit návratnost izolovaných SL. I přes definované množství prvků je pro produkci SL nejdůležitější obsah biogenních prvků: dusíku a fosforu. Úroveň jejich produkce může být kontrolována nebo zvýšena pomocí regulace obsahu Pi, a to především účelovým snížením jejich obsahu v médiu (Yoneyama *et al.*, 2007a). Naopak příliš vysoká koncentrace Pi v médiu ( $\geq 5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) vede ke snížení stability všech SL (Halouzka *et al.*, 2018).

Nejčastějším způsobem izolace SL z kořenových exudátů je extrakce kapalina/kapalina (Yoneyama *et al.*, 2013). Kolekce a extrakce jsou opakovatelné procesy, které lze aplikovat po několik dní, což zajišťuje získání dostatečného množství cílových analytů (Yoneyama *et al.*, 2007a). Ethylacetát (EtOAc) je preferované rozpouštědlo pro extrakci SL. Doporučuje se jeho opětovná redestilace před každým použitím, protože snadno hydrolyzuje za vzniku kyseliny octové a ethanol případně může obsahovat residua vody. Všechny uvedené faktory mají vliv na stabilitu SL (Halouzka *et al.*, 2018).

Kolekce exudátů může být zajištěna také pomocí adsorpce na aktivní uhlí (Awad *et al.*, 2006; Yoneyama *et al.*, 2013). Bohužel tato metoda není dostatečně selektivní a hodnoty návratnosti po eluci acetonem jsou extrémně nízké (Kořístka, 2016). Aby bylo dosaženo lepších výsledků, někteří autoři používají pro přečištění extrakci na pevné fázi (SPE). Silikagel je preferovaným sorbentem (Delaux *et al.*, 2012; Yoneyama *et al.*, 2012; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Všechny doposud identifikované SL byly charakterizovány z izolovaných kořenových exudátů (např. zealakton) dle postupu, ve kterém jednotlivé složky byly frakcionovány dle polarity pomocí SPE, testovány na klíčivost vůči parazitickým rostlinám (*Striga* nebo *Orobancha*) a jejich strukturní identifikace byla potvrzena pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) (Charnikhova *et al.*, 2017).

### 2.8.2 Rostlinné pletivo

Pro izolaci SL z rostlinného pletiva obecně platí, že množství výchozího materiálu se řádově pohybuje v jednotkách gramů. Preferovaným způsob zpracování je homogenizace v plastových zkumavkách s vhodným typem kuliček (karbid wolframu, oxid zirkoničitý) s různými organickými rozpouštědly, které nemají vliv na jejich stabilitu. Během izolačního procesu je nutné vyhnout se enzymatické nebo chemické degradaci, a to pomocí chlazení rostlinného materiálu (-20 až 4 °C). Účinnost extrakce závisí na polaritě analyzovaných látek a jejich buněčné lokalizaci (Hillman, 1978; Harrison, 2011; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Rostlinné hormony jsou většinou asociovány s jinými sloučeninami: fenoly, lipidy a proteiny. Použité extrakční rozpouštědlo musí být tedy schopno minimalizovat v extrakčním kroku interferující povahu těchto látek a zachovat maximální návratnosti analytů (Harrison, 2011).

Mezi tradiční a běžně používanou metodu pro izolaci SL patří macerace, která je založena na ponoření malých kusů nastříhaných kořenů o průměru 2 mm do čerstvě redestilovaného EtOAc po dobu nejméně 24-48 hodin. Cílové sloučeniny se uvolňují

do rozpouštědla a jsou dále zpracovávány (Yoneyama *et al.*, 2016). V současnosti byl navržen a optimalizován alternativní způsob, který kombinuje homogenizaci rostlinného pletiva pomocí tekutého dusíku a jeho následnou extrakci do zvoleného rozpouštědla (Boutet-Mercey *et al.*, 2018).

Yoneyama (2016) zavedl standardní izolační protokol (Obr. 12), který byl úspěšně testován na kořenovém pletivu čiroku. Zahrnuje maceraci malých kousků kořene o stáří rostlin 2-4 týdnů. Je zajímavé, že macerace by neměla trvat déle než týden, vzhledem k tomu, že může docházet k postupné degradaci SL. Z tohoto hlediska je v procesu izolace rozhodující stabilita. Na druhou stranu jsou známy některé kroky zabráňující potenciálním ztrátám např. neutralizace pH, odstranění vody, vyloučení použití nukleofilních látek nebo rozpouštědel (methanolu). SL navíc vykazují omezenou stabilitu ve vodných roztocích na rozdíl od běžně používaných rozpouštědel EtOAc nebo acetonu (Johnson *et al.*, 1976; Boyer *et al.*, 2012; Kannan a Zwanenburg, 2014; Halouzka *et al.*, 2018).

Po extrakčním procesu je doporučeno přechistit jednotlivé extrakty pomocí SPE. Pro přečištění se používají různé sorbenty, jako je silikagel, C18 nebo polymerní Strata-X. Nastavení SPE a použití různých poměrů rozpouštědel (EtOAc s hexanem nebo heptanem) poskytuje řádově deset a více frakcí. SL jsou frakcionovány podle jejich polarity (Xie *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014). Obecně se frakcionace používá pro zjištění biologické aktivity, které poskytují předběžné informace o jejich přítomnosti pomocí stimulace klíčení parazitických rostlin nebo jsou využity pro hmotnostní a spektrální charakterizaci analyzovaných SL (Charnikhova *et al.*, 2017). Hlavním problémem pro zavedení pevně daného protokolu izolace a purifikace je nedostatek značených standardů, které jsou nezbytné pro kvantifikaci všech přirozeně se vyskytujících SL. Jako vhodné řešení se jeví použití relativně levné a komerčně dostupné sloučeniny GR24, která může zastoupit roli interního standardu. GR24 disponuje podobnou chemickou strukturou (Halouzka *et al.*, 2018) i biologickou aktivitou (Akiyama *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2012).

Uvedené postupy mají řadu výhod a nevýhod. Izolace strigolaktonů z exudátů se zdá být vhodnější metodou, a to díky: opětovnému použití rostlin k jejich produkci, možnosti ovlivnění výtěžku pomocí řízeného snížení hladin Pi v kultivačním médiu, jednoduchý sběr v různých časových intervalech a vyšší stabilitě. Tyto aspekty zajišťují, že je preferovaným způsobem izolace doposud neznámých a necharakterizovaných struktur SL. Nevýhodou tohoto přístupu je, že složení kultivačního média ovlivňuje

do značné míry stabilitu a také zahrnuje časově náročnou výměnu média (Halouzka *et al.*, 2018). Naproti tomu izolace z rostlinných pletiv je jednodušší a kratší proces, nicméně se jedná o destruktivní proces s nemožností znovu použít rostlinný materiál. Navíc izolovaná množství nejsou dostačující pro úspěšnou identifikaci. Koncentrace SL v nadzemní části rostliny je 1000× násobně nižší než v kořenovém systému, což znesnadňuje detekci, protože izolovaná množství jsou pod limitem detekce dle použité instrumentace (Yoneyama *et al.*, 2007a; Umehara *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2015). Existují dvě možná vysvětlení. Produkce SL je ovlivněna expresí genů odpovědných za jejich biosyntézu. Jejich exprese je mnohem vyšší v kořenovém systému než u buněk nadzemních orgánů (Booker *et al.*, 2005; Snowden *et al.*, 2005; Foo *et al.*, 2005). Druhá hypotéza souvisí se skutečností, že jsou biotransformovány na doposud neidentifikované SL. Všechny známé endogenní SL byly identifikovány jako molekuly produkované kořenovým systémem, které vykazují biologickou aktivitu proti parazitickým rostlinám a AM houbám (Kameoka a Kyojuka, 2017).

## 2.9 Chemické metody studia strigolaktonů

Nejčastěji používanou separační technikou pro analýzu SL je ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Na počátku výzkumu SL byla ale nejprve využívána metoda HPLC vybavená spektrofotometrickými detektory (UV nebo DAD). Tato technika byla omezena nedostatečnou citlivostí a nepřesnou interpretací UV profilů analyzovaných látek, např. strigol a orobanchol mají stejný chromofor (Yokota *et al.*, 1998) a tudíž jejich rozlišení bylo možné pouze na základě retenčních časů.

Další separační chromatografickou technikou, která v dnešní době už nemá dostatečné využití ve studii SL, je plynová chromatografie (GC). Yokota (1998) ji představil jako budoucí nástroj pro studium SL ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Hlavním požadavkem pro analýzu GC je těkavost analytu. Vzhledem k tomu, že SL jsou netěkavé a termolabilní sloučeniny, byla tato nevýhoda řešena pomocí derivatizace za použití tetramethylsilylu (TMSi). Princip derivatizace byl založen na tvorbě TMSi derivátů, kdy došlo k navázání TMSi na hydroxyskupinu na základním A/B tricyklickém skeletu, což usnadnilo identifikaci a rozlišení strigolu od orobancholu (Yokota *et al.*, 1998).

Inovaci a velký pokrok v chemické analýze SL přineslo zavedení U(H)PLC metod spojených s MS s trojitým kvadrupólem (Sato *et al.*, 2003). GC byla nahrazena spojením LC-MS a dnes slouží pouze jako podpůrná metoda pro potvrzení spektrálních

charakteristik SL (Erickson *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2008). Pro kvantifikaci a identifikaci SL pomocí kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) se zpravidla používá režim sledování produktu rozpadu iontu (MRM), přičemž kapilární a kuželové napětí se standartně přizpůsobuje režimu pozitivní ionizace s kolizní energií okolo 19 eV (Sato *et al.*, 2003, 2005; Xie *et al.*, 2010).

Při vývoji LC-MS/MS metody je důležité zajistit efektivní separaci a vysokou citlivost. Separace látek je dána podmínkami LC, resp. použitím vhodné chromatografické kolony a složením mobilní fáze. Standartně se používají C18 kolony a směs mobilních fází (voda/voda okyselená kyselinou mravenčí s rostoucím gradientem methanolu nebo acetonitrilu). Na druhou stranu MS podmínky ovlivňují citlivost analýzy, přičemž je preferována ionizace elektrosprejem (ESI). Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) vykazuje ve srovnání s ESI výrazný pokles citlivosti, o 40 % (Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Je třeba poznamenat, že téměř všechny SL jsou analyzovány v pozitivním iontovém módu. Pouze CLA je měřena v negativním ionizačním módu elektrospreje (Iseki *et al.*, 2018). Výběr MRM přechodů je závislý na volbě mobilní fáze. Tvorba sodných aduktů  $[M+Na]^+$  je potlačena při volbě okyselené mobilní fáze. Na druhou stranu je podpořena tvorba a nárůst intenzity iontů de/protonovaných molekul, což se projeví zvýšením citlivosti metody. Většina autorů používá MRM přechody sodných aduktů  $[M+Na]^+$  s charakteristickým fragmentem odpovídající ztrátě  $[M+Na-97]^+$  (Sato *et al.*, 2005; López-Ráez *et al.*, 2008a; Xie *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2011). Uvedený přechod je sledován, protože všechny přirozeně vyskytující SL obsahují stejnou část, D-kruh, který při odtržení dává vždy stejnou hmotu (Xie *et al.*, 2010). Tab. 4 prezentuje přehled téměř všech kanonických a nekanonických SL (dosud charakterizovaných 30) s definovanými MRM přechody analyzovaných pomocí LC-MS/MS. Pokud to bylo možné, pro jednu sloučeninu jsou zaznamenány oba způsoby monitorování MRM:  $[M+H]^+$ ;  $[M+Na]^+$ . Je důležité zdůraznit, že historie SL je od počátku provázena velkým počtem chyb a jejich následnou korekcí: alektor/orobanchyl acetát (Ueno *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 2015a) orobancholový příběh (Ueno *et al.*, 2011), nekanonické SL v kukuřici (Charnikhova *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2017) nebo nepřesně stanovené parametry pro MS (zejména selekce správných MRM přechodů).

**Tab. 4** Přehled významných přechodů  $m/z$  pro známé kanonické a nekanonické SL.

| Strigolakton                          | [M + H] <sup>+</sup> | MRM1      | MRM2      | Reference                          | [M + Na] <sup>+</sup> | MRM1      | MRM2      | Reference                          |
|---------------------------------------|----------------------|-----------|-----------|------------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|------------------------------------|
| orobanchol                            | 347                  | 347 > 205 | 347 > 97  | (Kohlen <i>et al.</i> , 2011)      | 369                   | 369 > 272 |           | (Xie <i>et al.</i> , 2009)         |
| orobanchyl acetát                     | 389                  | 389 > 347 | 389 > 233 | (Kohlen <i>et al.</i> , 2011)      | 411                   | 411 > 254 | 411 > 239 | (Xie <i>et al.</i> , 2008)         |
| 4-deoxyorobanchol                     | 331                  | 331 > 216 |           | (Iseki <i>et al.</i> , 2018)       |                       |           |           |                                    |
| 7-oxoorobanchol                       |                      |           |           |                                    | 383                   | 383 > 286 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| 7-oxoorobanchyl acetát                |                      |           |           |                                    | 425                   | 425 > 268 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| 7 $\alpha$ -hydroxyorobanchol         |                      |           |           |                                    | 385                   | 385 > 288 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| 7 $\alpha$ -hydroxyorobanchyl acetate |                      |           |           |                                    | 427                   | 427 > 270 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| 7 $\beta$ -hydroxyorobanchol          |                      |           |           |                                    | 385                   | 385 > 288 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| 7 $\beta$ -hydroxyorobanchyl acetát   |                      |           |           |                                    | 427                   | 427 > 270 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| solonakol                             | 343                  | 343 > 97  | 343 > 183 | (López-Ráez <i>et al.</i> , 2008b) | 365                   | 365 > 268 |           | (López-Ráez <i>et al.</i> , 2008a) |
| solonakyl acetát                      |                      |           |           |                                    | 407                   | 407 > 250 |           | (Xie <i>et al.</i> , 2013)         |
| strigol                               |                      |           |           |                                    | 369                   | 369 > 272 |           | (Sato <i>et al.</i> , 2003)        |
| strigyl acetát                        |                      |           |           |                                    | 411                   | 411 > 254 |           | (Sato <i>et al.</i> , 2005)        |
| strigon                               |                      |           |           |                                    | 367                   | 367 > 270 |           | (Kisugi <i>et al.</i> , 2013)      |
| 5-deoxystrigol                        | 331                  | 331 > 216 | 331 > 97  | (Umehara <i>et al.</i> , 2008)     | 353                   | 353 > 256 |           | (Xie <i>et al.</i> , 2007)         |
| sorgolakton                           | 317                  | 317 > 97  |           | (Delaux <i>et al.</i> , 2012)      | 339                   | 339 > 242 |           | (Sato <i>et al.</i> , 2005)        |
| sorgomol                              |                      |           |           |                                    | 369                   | 369 > 272 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2010)    |
| fabacyl acetát                        | 405                  | 405 > 231 | 405 > 97  | (Rial <i>et al.</i> , 2018)        | 427                   | 427 > 219 | 427 > 242 | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| fabakol                               |                      |           |           |                                    | 385                   | 385 > 288 |           | (Yoneyama <i>et al.</i> , 2011)    |
| heliolakton                           | 361                  | 361 > 233 | 361 > 97  | (Ueno <i>et al.</i> , 2014)        |                       |           |           |                                    |
| zealakton                             | 377                  | 377 > 345 | 377 > 97  | (Chamikhova <i>et al.</i> , 2017)  |                       |           |           |                                    |
| avenaol                               | 377                  | 377 > 263 | 377 > 97  | (Kim <i>et al.</i> , 2014)         |                       |           |           |                                    |
| karlakton                             | 303                  | 303 > 97  |           | (Iseki <i>et al.</i> , 2018)       |                       |           |           |                                    |
| karlaktonová kyselina*                | 331                  | 331 > 113 |           | (Iseki <i>et al.</i> , 2018)       |                       |           |           |                                    |
| methyl karlaktonát                    | 347                  | 347 > 97  |           | (Abe <i>et al.</i> , 2014)         |                       |           |           |                                    |
| methoxy-5-orobanchol                  |                      |           |           |                                    | 383                   | 383 > 286 |           | (Xie <i>et al.</i> , 2013)         |

\*Karlaktonová kyselina prekurzor [M-H]<sup>+</sup>.

## 2.10 Ambientní techniky

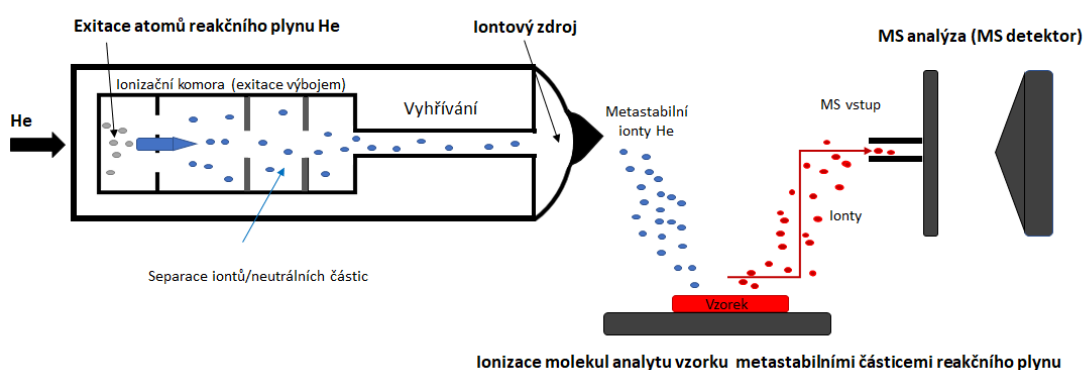
Pro tyto poměrně mladé MS techniky je charakteristickým znakem umístění nebo fixace analytu na vhodném povrchu, který se nachází mimo hmotnostní spektrometr (Ifa *et al.*, 2011; Weston, 2010). V současnosti je známo okolo 30 různých aplikací ambientních ionizačních technik, přičemž mezi nejčastěji používané patří DART (Direct analysis in real time) a DESI (Desorption electrospray ionization) (Venter *et al.*, 2008; Weston, 2010). Značná výhoda ambientních technik je absence přípravy a rychlé provedení analýzy. Na druhou stranu, v důsledku vnější ionizace čelí ambientní techniky problému s reprodukovatelností výsledků a složitostí získaných spekter. I přesto mají velký potenciál jako metody pro rychlou identifikaci široké škály nízkomolekulárních rostlinných metabolitů v různých pletivech jako jsou např. stonek, kořen, list (Cha *et al.*, 2008; Nemes *et al.*, 2009; Navare *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2016).

V předložené disertační práci bylo testováno potencionální využití techniky DART, jako rychlé metody pro identifikaci doposud známých endogenních SL. Dále pak využití zobrazovací techniky DESI pro zjištění jejich prostorové distribuce v řezu stonku a kořene vybraných rostlin.

### 2.10.1 DART

Technika DART byla poprvé popsána v roce 2005 (Cody *et al.*, 2005). Jedná se o velmi rychlou a snadnou metodu sloužící pro identifikaci širokého spektra nízkomolekulárních látek. DART umožňuje analýzu látek nezávisle na jejich skupenství. Lze provádět analýzu plynů, kapalin či pevných látek za atmosférického tlaku. Technika není omezena ani polaritou látky, resp. lze analyzovat od nepolárních až po velmi polární látky. Další výhodou této metody je, že analyzovaný vzorek může být neplanárního tvaru a povrchu, aniž by byl ovlivněn výsledek a kvalita analýzy. Manipulace se vzorkem je jednoduchá. Pomocí pinzety či skleněné tyčinky je vzorek umístěn do prostoru před vstupem do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k ionizaci. Princip ionizace je založen na tvorbě excitovaných molekul reakčního plynu pomocí doutnavého výboje, který je generován elektrodou s vloženým vysokým napětím (3-5 kV). Mechanismus je založen na termální desorpci, jejímž činitelem je průtok ohřátého plynu. Nejčastěji se volí jako reakční plyn helium, dusík nebo neon. Avšak preferovaným plynem je helium, neboť disponuje vysokou vnitřní energií, a proto snadno ionizuje molekuly vody za vzniku klastrů  $[(\text{H}_2\text{O})_n + \text{H}]^+$ . Vzniklé klastry posléze protonizují molekuly analytu  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . Princip ionizace lze popsat následovně. Dochází ke vzniku nenabitých metastabilních

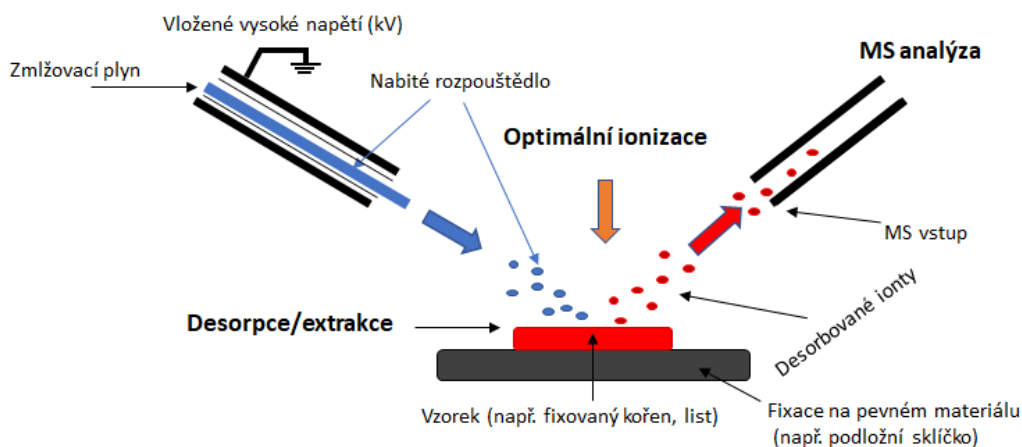
iontů, které desorbují a ionizují molekuly z povrchu analyzovaného vzorku. Opačně nabitě částice jsou odchýleny pomocí série elektrod, což umožní zamezení interakce s analyzovanou látkou. Ionizace analytu předpokládá přímou Penningovu ionizaci nebo ion-molekulární reakce, které vedou ke vzniku molekulárních iontů se sudým počtem elektronů, jako je tomu obdobně u jiných ionizačních technik za atmosférického tlaku. Desorbované molekuly analytu, které podlely úspěšné ionizaci, jsou nakonec transportovány do vstupu MS analyzátoru (Obr. 13), kde dochází k jejich separaci dle nastavených parametrů a zvoleného typu MS detektoru (Cody *et al.*, 2005, 2009).



**Obr. 13** Schéma DART-MS.

### 2.10.2 DESI

DESI, podobně jako MALDI, patří mezi zobrazovací hmotnostní techniky (mass spectrometry imaging), které zprostředkují informaci o prostorové distribuci molekul cílových analytů (Thunig *et al.*, 2011). Princip metody spočívá v kombinaci ESI a desorpční ionizační techniky. Metoda je vhodná především pro nízkomolekulární látky. Analyzovaný vzorek je fixován na pevný povrch destičky (TLC, sklo, plast apod.) (Venter *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2013). Prostor, ve kterém dochází k ionizaci, se nachází mezi sprejovací kapilárou a vstupem hmotnostního analyzátoru. Kapilára přivádí rozpouštědlo, které je posléze zmlžováno a ionizováno. Sprejované rozpouštědlo vytvoří na povrchu analyzovaného vzorku mikrovrstvu, do které jsou vyextrahovány molekuly. Princip je založen na extrakci pevná fáze a kapalina (S/L extrakce) a její efektivitu lze ovlivnit složením rozpouštědla společně s polaritou extrahovaných analytů. Molekuly extrahované v mikrovrstvě jsou pak opakovaným převrstvením rozpouštědla uvolněny ve formě sekundárních kapiček (Obr. 14). Tyto drobné kapičky jsou v procesu podobném ESI ionizovány a fokusovány do MS analyzátoru (Venter *et al.*, 2006; Costa a Cooks 2007, 2008).



**Obr. 14** Schéma principu ionizace na vybrané matrici (rostlinný orgán: kořen, stonek nebo list).

Všeobecně se při analýze biologické matrice pomocí hmotnostní zobrazovací spektrometrie (MSI) nevyhneme aplikaci některé z metod přípravy či předpřípravy vzorku, přičemž příprava vzorků z rostlinného pletiva přináší mnohem pracnější a náročnější postupy oproti živočišné tkáni (Boughton *et al.*, 2016; Heyman a Dubery, 2015). U vyšších rostlin představuje značný problém kutikula, která představuje bariéru bránící úspěšnému zobrazení interních metabolitů pomocí MSI aplikací (Thunig *et al.*, 2011). Dalším omezením je vysoký obsah vody, který je značnou komplikací pro metodu kryosekce, neboli řezání při celkovém zmrazení vzorku. Navíc rostlinné pletivo je po zamrazení křehčí a je komplikované získat tenké a neporušené řezy. Často pozorovaným jevem je scvrkávání nebo částečné odlupování vzorku při dehydrataci. Je třeba poznamenat, že tyto faktory vedou k ovlivnění kvality MSI analýzy a špatné interpretaci lokalizace detekovaných látek (Cha *et al.*, 2008).

Prvním prvkem určujícím ionizační účinnost DESI je složení rozprašovacího rozpouštědla, které je vždy optimalizováno s ohledem na polaritu analyzovaného metabolitu a specifických charakteristik vzorku (Badu-Tawiah *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2010). Obecně platí, že s nárůstem podílu vody roste doba trvání signálu, zatímco vyšší podíl organického solventu (methanolu) má pozitivní efekt na prostorové rozlišení (Manicke *et al.*, 2008). Je-li nezbytné, může být k rozprašovacímu rozpouštědлу přidáno reaktivní činidlo, které selektivně zlepší ionizační účinnost obtížně se ionizujících analytů za normálních podmínek (Zhang a Chen, 2010; Muller *et al.*, 2011; Lostun *et al.*, 2015).

Chemicky nemodifikované a neošetřené rostlinné pletivo je ideální pro DESI analýzu. Za těchto podmínek je zachováno prostorové uspořádání molekul a riziko chemické kontaminace je minimalizováno. Při použití ambientních technik lze pracovat jak s vysušenými preparáty, tak i s čerstvým pletivem, resp. i s jeho řezy. Většina vzorků rostlin je před MSI analýzou vysušena pod vakuem nebo lyofilizována. Vakuová desikace může být aplikována na tenké rostlinné orgány, jako jsou listy a květy, ale i přesto stále dochází k dehydrataci a scvrkávání řezu (Cha *et al.*, 2008, 2009, Li *et al.*, 2011; Korte *et al.*, 2012). Slibný způsob řešení uvedených limitací představuje tzv. otisk (imprinting), kde se rostlinné pletivo, resp. celý orgán lisuje pomocí aplikace mírného tlaku na porézní teflon při současném zachování jejich prostorového rozložení (Li *et al.*, 2011, Thunig *et al.*, 2011). Chemické složení matrice vzorku může ve většině případů negativně ovlivňovat ionizační efektivitu cílových analytů. Ačkoliv minimální úprava vzorku a absence separačních kroků jsou hlavní výhody MSI. Na druhou stranu MSI jsou velmi

náchylné k matricovým efektům, které mají značný vliv na pozorovanou prostorovou distribuci analytů. Ukázalo se, že jak chemické (tj. vazebná síla a polarita), tak i fyzikální vlastnosti (tj. vodivost a nerovnosti na povrchu analyzovaného vzorku) výrazně ovlivňují úspěch analýzy a relevanci dat získaných prostřednictvím DESI techniky (Takats *et al.*, 2005; Ifa *et al.*, 2008, Manicke *et al.*, 2008; Volny *et al.*, 2008; Benassi *et al.*, 2009). Zejména mají vliv na spodní limity detekce a kvantifikace (LOD, LOQ) analytů, stabilitu signálu, ale také na reprodukovatelnost a lineární dynamický rozsah. I přesto je uváděn limit detekce pro malé molekuly mezi 1 až 10 fmol a reprodukovatelnost kvantitativních dat v rozmezí 5-10 % (Ifa *et al.*, 2008).

..

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a metody

#### 3.1.1 Biologický materiál

Osivo bobu obecného (*Vicia faba*, odrůda Merkur) a hrachu setého (*Pisum sativum*, odrůda Terno) bylo získáno prostřednictvím šlechtitelské stanice Selgen a.s. v Chlumci nad Cidlinou. Osivo vikve seté (*Vicia sativa*, odrůda – Ebena ECN: 05L0300426) a čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*, odrůda – Ruzrok ECN: 01Z1500041) bylo získáno z kolekce genetických zdrojů genové banky VÚRV v. v. i. Praha-Ruzyně. Osivo rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill, odrůda Moravský granát ECN: 09H6400073) bylo získáno ve spolupráci s VÚRV (Výzkumný ústav rostlinné výroby), v. v. i. v Olomouci-Holici.

#### 3.1.2 Hydroponické pěstování a kultivace

Pro růst rostlin byla využita hydroponická kultivace v Hoaglandově médiu s definovaným obsahem Pi. Všechny experimenty s rostlinným materiálem byly provedeny dle následujícího postupu. Sazenice (*Vicia faba* L. cv. Merkur, *Vicia sativa* L. cv. Ebena, *Pisum sativum* L. cv. Terno, *Sorghum bicolor* L. cv. Ruzrok) byly pěstovány ve skleníku v květináčích s perlitem. Teplotní rozsah byl noc/den 15/24 °C, denní/noční perioda 16/8 hod. Harmonogram výměny kontrolního a testovacího média je uveden v Tab. 5. Médium bylo měněno za čerstvě připravené každý 2-3 den. Poslední den kultivace byly pěstované rostliny převedeny do vody, aby se kořeny zbavily usazených solí z ½ Hoaglandova média.

**Tab. 5** Časový harmonogram kultivace (kontrolní vs testovací médium).

| Den | Kontrolní médium | Testovací médium |
|-----|------------------|------------------|
| 1   | Destilovaná voda | Užitková voda    |
| 5   | ½ Hoagland (+Pi) | ½ Hoagland (+Pi) |
| 14  | ½ Hoagland (+Pi) | ½ Hoagland (-Pi) |
| 21  | Destilovaná voda | Užitková voda    |

##### 3.1.2.1 Příprava kultivačního roztoku ½ Hoaglandova média

Pro přípravu 10 litrů kultivačního roztoku ½ Hoaglandova média byly postupně pipetovány zásobní roztoky dle pořadí (Tab. 6), přidalo se 5,0 g MES a výsledné pH bylo

upraveno na hodnotu 6,0 pomocí roztoku 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH (Waters *et al.*, 2012b). Obsah fosforu v médiu byl regulován přidavkem roztoku č. V (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ve kterém byl obsažen.

**Tab. 6** Příprava kultivačních roztoků Hoaglandova média (v ml na 10 litrů média).

| Roztok  | A<br>(ml) | B<br>(ml) | C<br>(ml) | D<br>(ml) |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| I       | 20        | 20        | 10        | 10        |
| II      | 20        | 20        | 10        | 10        |
| III     | 10        | 10        | 5         | 5         |
| IV      | 20        | 20        | 10        | 10        |
| V       | 10        | 2         | 1         | ---       |
| VI      | 2         | 2         | 1         | 1         |
| VII     | 5         | 5         | 2,5       | 2,5       |
| Fe-EDTA | 4         | 4         | 2         | 2         |

A – ½ Hoagland (250 µmol·l<sup>-1</sup> fosfát); B – ½ Hoagland (50 µmol·l<sup>-1</sup> fosfát); C – ¼ Hoagland (25 µmol·l<sup>-1</sup> fosfát); D – ¼ Hoagland bez fosfátu (Převzato Kořistka, 2016).

### 3.1.3 Metody homogenizace a extrakce

#### 3.1.3.1 Izolační protokol A

Extrakční protokol byl založený na maceraci (Yoneyama *et al.*, 2016) a vyžadoval 3 týdny staré rostliny bobu obecného (*Vicia faba* L.), které byly pěstovány hydroponicky v perlitu. Do 50-100 ml Erlenmeyerovy baňky bylo odváženo adekvátní množství materiálu (nastříhané kusy kořene) a byl přidán redestilovaný EtOAc (na 1 g rostlinné hmoty 10 ml EtOAc) a syntetický analog GR24, případně přirozeně se vyskytující sorgolakton (10 µl; 2·10<sup>-5</sup> mol·l<sup>-1</sup>). Kořeny byly nastříhány na kousky o velikosti cca 2-5 mm a poté ponechány macerovat po dobu 24-48 hodin při teplotě 4 °C ve tmě. Supernatant byl následně přefiltrován přes nylonovou síťku (20 × 15 cm, délka 40 cm) a zakoncentrován pod dusíkem. Vzniklý odparek se posléze purifikoval pomocí SPE.

#### 3.1.3.2 Izolační protokol B

Pro optimalizaci extrakčního protokolu dle Boutet-Mercey (2018) byly použity kořeny bobu obecného (*Vicia faba* L.). Rostlinný materiál byl nejprve homogenizován v tekutém dusíku. Poté bylo odváženo 0,5-2,0 g homogenizovaného materiálu, který byl smíchán s redestilovaným EtOAc (1 g rostlinné hmoty na 3 ml extrakčního rozpouštědla) a interními standardy (GR24 a sorgolakton, 2·10<sup>-5</sup> mol·l<sup>-1</sup>). Vzorek byl sonifikován po dobu 1 min (f = 25 Hz) a ponechán 2 h extrahovat za stálého míchání při teplotě 4 °C. Extrakt byl centrifugován při 1000× g (10 min, 4 °C) a poté byl supernatant (2,5 ml)

přenesen do borosilikátové zkumavky. Sediment byl znovu re-extrahován EtOAc (3 ml), ponechán v ultrazvuku (1 min, 25 Hz) a poté extrahován po dobu 12 h při 4 °C. Po centrifugaci byly oba získané supernatanty smíchány a vysušeny. Suchý extrakt byl rozpuštěn ve směsi rozpouštědel heptan/EtOAc (9:1 V/V; 5 ml) a dále purifikován přes SPE kolonu (viz Tab. 7) (Boutet-Mercey *et al.*, 2018).

### 3.1.4 Purifikace pomocí extrakce na pevné fázi (SPE)

Byla testována široká škála SPE sorbentů s cílem určení efektivity a účinnosti v rámci purifikace SL. Mezi vybrané sorbenty patřily: silikagel (Supelclean LC-Si; 500 mg/3 ml), C18 (Strata C18-U; 1000 mg/6 ml) a polymerní sorbent (Strata-X; 500 mg/6 ml). Jednotlivé purifikační protokoly jsou uvedeny v Tab. 7-10 a jsou převzaty, případně modifikovány dle Kořistka (2016).

#### 3.1.4.1 Výběr sorbentů a nastavení SPE

SPE frakcionace je využívána po maceraci (Yoneyma *et al.*, 2016) nebo homogenizaci s následnou extrakcí (Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Vzorek je frakcionován pomocí SPE kolonek plněných silikagelem (Supelclean LC-Si; 500 mg/3 ml). Výsledkem je 11 frakcí (Tab. 8), přičemž každý izolovaný a následně purifikovaný SL je eluován vždy ve frakci, která odpovídá jeho chemickým vlastnostem (polarita) (Kisugi *et al.*, 2013).

**Tab. 7** SPE kolona obsahující silikagel (Supelclean LC-Si; 500 mg/3 ml) - dle Boutet-Mercey (2018).

| Krok – rozpouštědlo                          | Objem [ml] |
|----------------------------------------------|------------|
| Aktivace – ethylacetát                       | 3          |
| Ekvilibrace – heptan/ethylacetát (90:10)     | 3          |
| Nanesení vzorku - heptan/ethylacetát (90:10) | 3          |
| Eluce – 1. heptan/ethylacetát (75:25)        | 3          |
| 2. heptan/ethylacetát (50:50)                |            |
| 3. ethylacetát (100)                         |            |

**Tab. 8** SPE kolona obsahující silikagel (Supelclean LC-Si; 500 mg/3 ml).

| Krok – rozpouštědlo                                       | Objem [ml] |
|-----------------------------------------------------------|------------|
| Aktivace – ethylacetát                                    | 3          |
| Ekvilibrace – hexan                                       | 3          |
| Nanesení vzorku – hexan                                   | 3          |
| Promytí – hexan                                           | 3          |
| Eluce (frakcionace)* – hexan/ethylacetát<br>(100:0–0:100) | 3          |

\*Frakcionace s rostoucím procentovým zastoupením ethylacetátu – 0-100 % (11 frakcí).

**Tab. 9** SPE kolona s polymerním sorbentem (Strata C18-U; 1000 mg/6 ml).

| Krok – rozpouštědlo              | Objem [ml] |
|----------------------------------|------------|
| Aktivace – acetonitril           | 5          |
| Ekvilibrace – 5% acetonitril     | 5          |
| Nanesení vzorku - 5% acetonitril | 5          |
| Promytí – deionizovaná voda      | 5          |
| Eluce – acetonitril              | 5          |

**Tab. 10** SPE kolona s polymerním sorbentem (Strata-X; 500 mg/6 ml) - jednotlivé kroky a objemy rozpouštědel použité při SPE purifikaci (Kořistka, 2016).

| Krok – rozpouštědlo                               | Objem [ml] |
|---------------------------------------------------|------------|
| Aktivace – acetonitril                            | 5          |
| Ekvilibrace – 5% acetonitril (5% ethylacetát)     | 5          |
| Nanesení vzorku - 5% acetonitril (5% ethylacetát) | 5          |
| Promytí – deionizovaná voda                       | 5          |
| Eluce – acetonitril                               | 5          |

### 3.1.5 Chromatografické metody (UHPLC-MS/MS)

Pro separaci přirozeně se vyskytujících SL a syntetického analoga GR24 byla použita chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C18 (50 × 2,1 mm; 1,7 μm) s předkolonou Acquity UPLC BEH C18 VanGuard. Jako mobilní fáze byly použity voda (A) a methanol (B). Průtok mobilní fáze byl po celou dobu analýzy 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Kolonový termostát byl nastaven na teplotu 40 °C. Pro separaci bylo využito gradientové eluce (Tab. 11). Detekce probíhala na trojitým kvadrupólovém hmotnostním analyzátoru za nastavených parametrů dle předchozí podkapitoly stanovení kinetických parametrů.

**Tab. 11** Podmínky UHPLC analýzy pro separaci SL.

| t [min] | Průtok [ml·min <sup>-1</sup> ] | Voda [%] | Methanol [%] |
|---------|--------------------------------|----------|--------------|
| 0       | 0,50                           | 60       | 40           |
| 5       |                                | 60       | 40           |
| 6       |                                | 40       | 60           |
| 6,5     |                                | 0        | 100          |
| 10      |                                | 60       | 40           |
| 10      |                                | STOP     |              |

### 3.1.6 Optimalizace detekce MS

Optimalizace detekce na hmotnostním analyzátoru (UHPLC-MS) byla provedena pomocí průtokové analýzy FIA (Flow Injection Analysis), analýza bez kolony s retenčním oknem do 1 min. Potvrzení optimalizovaných MRM přechodů (Tab. 12) bylo docíleno použitím krátké chromatografické kolony za izokratických podmínek (50/50 V/V; voda/acetonitril) při průtoku 0,4 ml·min<sup>-1</sup> a teplotě kolonového termostatu 40 °C. Připravené standardy měly koncentraci 5·10<sup>-6</sup> mol·l<sup>-1</sup> a byly rozpuštěny ve 100 % acetonitrilu.

**Tab. 12** Identifikace přirozeně se vyskytujících strigolaktonů – prekurzorové ionty a jejich charakteristické fragmenty (kvantifikační a konfirmační přechody).

| Analyt                | Monitorovací okno (min) | Dwell time (ms) | MRM             | CE (V) |
|-----------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| <b>GR 24</b>          | 2,5 – 3,5               | 83              | 299,00 > 97,00  | -22,0  |
|                       |                         |                 | 299,00 > 185,10 | -9,0   |
|                       |                         |                 | 299,00 > 281,10 | -7,0   |
| <b>Orobanchol</b>     | 2,5 – 3,5               | 83              | 368,80 > 325,20 | -13,0  |
|                       |                         |                 | 368,80 > 272,10 | -16,0  |
|                       |                         |                 | 368,80 > 239,00 | -24,0  |
| <b>Strigol</b>        | 3,3 – 4,0               | 83              | 369,20 > 271,75 | -20,0  |
|                       |                         |                 | 369,20 > 257,15 | -24,0  |
|                       |                         |                 | 369,20 > 351,00 | -13,0  |
| <b>Sorgolakton</b>    | 4,5 – 5,3               | 126             | 339,20 > 242,20 | -30,0  |
|                       |                         |                 | 339,20 > 227,05 | -25,0  |
| <b>5-Deoxystrigol</b> | 5,0 – 5,5               | 126             | 352,80 > 256,15 | -18,0  |
|                       |                         |                 | 352,80 > 241,15 | -23,0  |

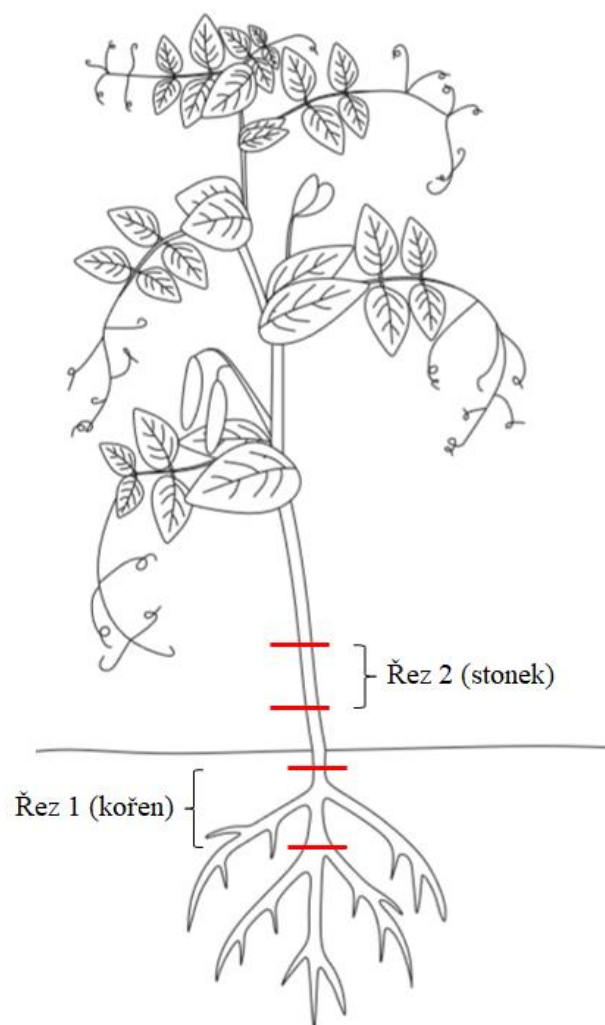
### 3.1.7 Optimalizace identifikace pomocí HR-DART-Orbitrap

Identifikace SL byla provedena pomocí HR-DART (IonSense, Saugus, USA) spojeného s MS detektorem Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific, Brémy, Německo). Základní parametry pro ionizaci byly následující: ionizační plyn helium (tlak = 0,65 MPa),

pozitivní mód ionizace, teplota ionizačního plynu (300-350 °C). MS podmínky: napětí na elektrodě (300-350 V), teplota a napětí na vyhřívané kapiláře (300-350 °C; 50 V), napětí offsetu prstencové elektrody (100 V), rozsah  $m/z$  (50-500). Software Xcalibur (Thermo Fischer Scientific, Německo) byl použit pro zpracování získaných dat. DART analýza byla provedena v pozitivním módu ionizace, kde teoretické monoizotopové hmotnosti protonovaných molekulových iontů byly následující hmoty ( $m/z$ ) -  $[M+H]^+$  pro orobanchol (347,1489), 5-deoxystrigol (331,1540), fabacyl acetát (405,1543), orobanchyl acetát (389,1594) a sorgolakton (317,1383).

### 3.1.8 Příprava řezů pro DESI

Pomocí skalpelu byly připraveny segmenty stonku a kořene bobu obecného a hrachu setého (Obr. 15) o velikosti asi 5 mm. Následně byly ukotveny do 4% agarosy o teplotě 38 °C. Do ztuhnutí agarosy byly segmenty udržovány v kolmé poloze. Poté byly vyřezány krychličky o velikosti asi 1 cm<sup>3</sup> a byly přilepeny vteřinovým lepidlem na podložku pro umístění vzorku, která se upevnila do vibratomu. Příčné řezy byly připraveny na vibratomu (Leica VT1000S, Leica Biosystems, Německo). Tloušťka řezů se pohybovala v rozmezí 50-400 μm. Neporušenost řezů byla kontrolována pod světelným mikroskopem při zvětšení 10× (mikroskop BX50, Olympus, Japonsko). Připravené řezy byly připevněny k DESI destičce pomocí oboustranné lepicí pásky. Řezy byly vždy připraveny 24 h před samotnou DESI analýzou. Po uvedené dobu byly uchovány v eksikátoru. Příprava řezů byla provedena na Katedře Biochemie PřF UP ve spolupráci s Mgr. Terezou Tichou, Ph.D.



**Obr. 15** Nákras modelové rostliny (bob setý) a místa řezu použitých pro DESI-MS.

### 3.1.8.1 Optimalizace identifikace pomocí HR-DESI-Orbitrap-MS

Zobrazovací analýza (DESI) byla provedena pomocí přístroje Orbitrap Elite Thermo Fisher Scientific s iontovým zdrojem DESI-2D (Prosolia, Indianapolis, IN). Vzorky byly fixovány ke skleněným sklíčkům (Prosolia, Indianapolis, IN) pomocí oboustranné lepicí pásky. Zobrazovací experimenty byly provedeny pomocí kontinuálního snímání povrchu ve směru osy x a y (pohybující se proti směru rozprašování). Souřadnice snímané plochy byly vždy předem definovány. Pro experiment byla zvolena rozprašovací kapalina (80% methanol/0,2% kyselina octová, V/V) o průtokové rychlosti  $2 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ , rychlost skenování  $65 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  a geometrie sprejování (úhel)  $65^\circ$ . Měření probíhalo v hmotnostním rozsahu 300-450  $m/z$ . Získané údaje byly zpracovány pomocí softwaru BioMap a byly vytvořeny 2D mapy prostorového zastoupení vybraných iontů analyzovaných SL. DESI-MSI analýza byla provedena v pozitivním módu a látky byly stanoveny ve formě sodných

aduktů  $m/z$  -  $[M+Na]^+$ : orobanchol (369,1308), 5-deoxystrigol (353,1359), fabacyl atetát (427,1363), orobanchyl acetát (411,1414) a sorgolakton (339,1202).

### 3.1.9 Určení stability GR24 v kultivačních médiích a pufrch

Všechna měření chemické stability GR24 a jiných SL (5-deoxystrigol) byla provedena na spektrofotometru Agilent Cary 8454 (Santa Clara, California, USA). Měřený roztok byl připraven smísením 5  $\mu$ l GR24 ( $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  v DMF) s 2995  $\mu$ l média nebo pufru. Všechna měření byla monitorována při 239 nm po dobu 24 hodin při 25 °C za stálého intenzivního míchání, přičemž hodnoty absorbance byly zaznamenány každých 60 minut.

Hoaglandovo, Murashige a Skoog (MS) média byla připraveny podle protokolů popsanych v literatuře (Waters *et al.*, 2012b; Roycewicz a Malamy, 2012). V případě Hoaglandova roztoku byl testován vliv koncentrace fosfátových iontů ( $0,025 - 0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) na stabilitu GR24.

Testované pufrы byly připraveny dle jejich optimalní pufrací kapacity, aby odpovídaly vybraným hodnotám pH (6 a 7). HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazethansulfonová), MES (kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová), fosfátový, fosfát-citrátový a Tris-HCl pufr byly shledány jako vhodné roztoky (pH 6,0;  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a uchovány ve tmě při teplotě 4 °C. Obdobným způsobem byl připraven citrátový, fosfátový, mravenčanový a acetátový pufr (pH 6,0;  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Na závěr byl stanoven vliv koncentrace fosfátových iontů ( $0,1-1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) ve fosfátovém pufru (pH 6,0) na stabilitu GR24. GR24 byl syntetizován v laboratoři (Radboud University Nijmegen, Nizozemsko). Deionizovaná voda ( $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ , Direct-Q, Millipore, Molsheim, Francie) byla použita jako slepý vzorek pro všechny uvedené roztoky, stejně jako pro jejich přípravu.

### 3.1.10 Syntéza reakčních produktů GR24 a vybraných nukleofilů

Reakční produkty byly syntetizovány v souladu s publikovaným protokolem dle disertační práce Mangnuse (Mangnus a Zwanenburg, 1992). Během syntézy bylo smícháno 0,015 molů GR24 s 0,023 moly 4-methoxybenzylaminu ve 400 ml ethanolu. Obdobným způsobem byly připraveny reakční produkty zbylých nukleofilních látek obsahující dusík (N) případně síru (S) jako centrální atom (N: benzylamin, *p*-anisidine, anilin, imidazol; S: benzyl merkaptan, thiofenol). Všechny uvedené látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Německo). Reakční směs byla vždy míchána při laboratorní teplotě a pod inertní atmosférou po dobu 24 hodin. Reakční

produkty byly extrahovány ethylacetátem, který byl následně po extrakci odpařen. Pro izolaci a identifikaci jednotlivých komponentů reakční směs posloužila chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Struktura každého produktu byla stanovena za pomoci interpretace kolizních spekter získaných pomocí LC-MS-8050 (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japonsko) a analýzou  $^1\text{H}$ -NMR spekter zaznamenaných na 500 MHz Jeol ECA-500.

### 3.1.11 Stanovení kinetických parametrů

Reakce GR24 ( $33 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s nukleofilem ( $330 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (benzylamin, imidazol, methanol) byla sledována spektrofotometricky (Agilent Cary 8454, Santa Clara, Kalifornie, USA) v různých rozpouštědlech (aceton, acetonitril, methanol a ethanol). Měření bylo provedeno při 240 nm po dobu 24 hodin při 30 °C za stálého míchání a hodnoty absorbance byly zaznamenávány v 30 min intervalech. Všechny experimenty byly provedeny ve třech technických opakování.

Pro stanovení aktivačních parametrů reakce, obdobně jako při testování stability v organických rozpouštědlech, se GR24 ( $33 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) smísí s nukleofilem ( $330 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; benzylamin, 4-methoxybenzylamin, *p*-anisidin, anilin, benzyl merkaptan, thiofenol, imidazol a hydroxid amonný). Průběh reakce byl monitorován spektrofotometricky (Shimadzu UV-2450 PC (SHIMADZU Handels GmbH, Kyoto, Japonsko) při 240 až 244 nm po dobu 3 hodin při 25, 30, 35 a 40 °C v 5-15 min intervalech. Methanol byl použit jako rozpouštědlo. Absorpční spektra reakčních směsí byla zaznamenána v rozmezí vlnové délky 200 až 450 nm. Termodynamické parametry, jako byla aktivační energie ( $E_a$ ), aktivační entalpie ( $\Delta H^\ddagger$ ), aktivační entropie ( $\Delta S^\ddagger$ ) a aktivační Gibbsova energie ( $\Delta G^\ddagger$ ), byly vypočteny na základě Arrheinovy rovnice a základních principech chemické kinetiky:

$$\text{a) } k_r = A e^{-E_a/RT} \text{ nebo } \ln k = -E_a/RT + \ln A \quad (1)$$

$$\text{b) } \Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (2)$$

$$\text{c) } \Delta S^\ddagger = R[\ln(h/k_b T) + \ln A - 1] \quad (3)$$

$$\text{d) } \Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\text{e) } \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

Průběh reakce byl sledován na kapalinovém chromatografu Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japonsko) vybaveným hmotnostním detektorem MS-8050 (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japonsko). Chromatografická separace byla provedena pomocí analytické kolony AQUILITY BEH C8 ( $150 \times 2,1 \text{ mm}$ ;  $1,7 \mu\text{m}$ ;

Waters, Milford, MA, USA) za následujících podmínek: teplotě 40 °C kolonového termostatu a průtoku 0,25 ml·min<sup>-1</sup> (viz gradient Tab. 13). MS/MS kolizní spektra protonovaných molekulových iontů byla zaznamenána v pozitivním režimu ionizace (ESI) s následujícími provozními parametry: napětí kapiláry -3 kV; napětí na rozhraní 4 kV; skenovací rozsah 50-500 *m/z*; teplota zdroje 250 °C, desolvatační teplota 300 °C, průtok vyhřívacího a sušícího plynu 10 l·min<sup>-1</sup>; desolvatační plyn dusík s průtokem 3 l·min<sup>-1</sup>.

**Tab. 13** Podmínky UHPLC analýzy pro separaci reakčních produktů po reakci GR24 a nukleofilu.

| t [min] | Průtok<br>[ml.min <sup>-1</sup> ] | Voda [%] | Acetonitril [%] |
|---------|-----------------------------------|----------|-----------------|
| 0       | 0,25                              | 80       | 20              |
| 1,0     |                                   | 80       | 20              |
| 5,5     |                                   | 40       | 60              |
| 11,8    |                                   | 20       | 80              |
| 12,8    |                                   | 20       | 80              |
| 13,2    |                                   | 80       | 20              |
| 14,0    |                                   | 80       | 20              |
| 16,0    |                                   | STOP     |                 |

## 3.2 Výsledky

### 3.2.1 Selektce a kultivace biologického materiálu

Primární selektce vhodných modelových organismů proběhla na základě literární rešerše a dostupnosti biologického materiálu. Byly vybrány následující organismy: bob setý (*Vicia faba* L.), víkev setá (*Vicia sativa* L.), čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor* L.), rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.), hrách setý (*Pisum sativum* L.) a kukuřice setá (*Zea mays* L.). Důležitou roli při výběru hrála i skutečnost, jestli u daného organismu byla přítomnost SL, resp. jejich biologická aktivita, zjištěna již v minulosti. Z literatury je známo, že rostliny produkují široké spektrum SL v extrémně nízkých kvantitách odpovídající rozmezí 5-30 pg/den/rostlina (Sato *et al.*, 2005). Cílem bylo optimalizovat doposud popsané metody izolace a purifikace SL z rostlinných pletiv a podmínky jejich koncové analýzy pomocí UHPLC-MS/MS. S výjimkou *Vicia sativa* byla u uvedených modelových organismů identifikována a charakterizována řada SL. *Vicia sativa* byla vybrána s předpokladem, že bude produkovat SL typické pro čeleď bobovitých (*Fabaceae*), do které patří také *V. faba* a *P. sativum*.

Vybrané rostliny byly kultivovány za definovaných podmínek růstu a přísunu živin ve formě živného roztoku (modifikované Hoaglandovo živné médium) s klesající koncentrací Pi. Pro získání relevantních výsledků bylo důležité optimalizovat množství výchozího materiálu (pletiva), které závisí na rychlosti růstu a délce kultivace. Množství rostlinného pletiva potřebné pro úspěšnou izolaci a purifikaci SL se pohybuje v jednotkách gramů (1-5 g) (López-Ráez *et al.*, 2008a; Rial *et al.*, 2018; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Optimální doba kultivace se uvádí přibližně 2-4 týdny, přičemž je závislá na druhu experimentu a jeho designu (López-Ráez *et al.*, 2008a; Ueno *et al.*, 2015b; Yoneyama *et al.*, 2015).

Původní počet šesti testovaných modelů byl zredukován na čtyři. Rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.) nebylo vhodné pro další experimenty kvůli pomalému růstu, a proto nedostatečnou tvorbou biomasy, resp. kořenů. Další testovaná plodina, kukuřice setá (*Zea mays* L.), byla i přes poměrně rychlý růst nevyhovující kvůli absenci kanonických SL, jejichž standardy byly na pracovišti dostupné. Pro následnou optimalizaci izolačních a purifikačních metod, které jsou podrobněji popsány níže, byl tedy nakonec použit bob setý, hrách setý, víkev setá a čirok dvoubarevný.

### 3.2.2 Metody izolace a purifikace

Metody izolace a purifikace SL jsou základním stavebním kamenem, od kterého se odvíjí úspěšná koncová analýza. V rámci disertační práce byla řešena řada způsobů izolace SL z kořenových pletiv. Nejjednodušším přístupem zůstává macerace nastříhaných kousků (2-5 mm) kořenů rostlin v EtOAc nebo homogenizace kořenů v tekutém dusíku s následnou extrakcí EtOAc. Samotná extrakce nezajišťuje dostatečné přečištění vzorku, a proto je vhodné použít ve formě extrakce na pevné fázi (SPE).

#### 3.2.2.1 Stanovení návratnosti purifikace pro extrakci na pevné fázi

Záměrem testování bylo vybrat vhodný SPE sorbent pro přečištění extrahovaných SL. V návaznosti na práci Kořistka (2016) byly testovány uvedené sorbenty: organický polymerní sorbent styren divinilbenzen (Strata-X), silikagel (Supelclean LC-Si) a C18 (Strata C18-U). Pro všechny sorbenty byla určena návratnost GR24 ( $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) jak z čistého rozpouštědla, tak z rostlinného extraktu. V druhém případě se navíc projevuje matricový efekt, proto bylo nutné stanovit i návratnost extrahovaných analytů z biologického materiálu. Při použití polymerního sorbentu Strata-X byl mimo jiné testován i vliv použitého rozpouštědla, ve kterém byl nanesen vzorek na SPE kolonu (5% ACN a 5% EtOA ve vodě) (Tab. 14). Volba solventů vycházela ze znalosti stability SL.

Kritériem při výběru vhodného SPE sorbentu pro purifikaci SL byla délka samotné procedury a doba potřebná pro odpaření vzorku. Pro silikagel byly charakteristické vysoké hodnoty návratnosti (Tab. 14) s relativně krátkou dobou odpaření v rámci několika málo minut. Avšak pokud byla prováděna frakcionace, jednalo se v porovnání s ostatními testovanými sorbenty o časově poměrně náročný krok. Pro sorbenty Strata C18U a Strata-X byla typická časově nenáročná SPE procedura s dlouhou dobou odpaření vzorku. Doba odpaření byla ovlivněna především množstvím vody zachycené v sorbentu kolony, která následně koeluovala s analytem a bránila tak rychlému a efektivnímu zakoncentrování vzorku. Navíc je známo, že stabilita SL je ve vodných roztocích značně omezená, proto je nutné rychlé zakoncentrování vzorku bez sebemenšího množství vody (Akiyama *et al.*, 2010; Boyer *et al.*, 2012; Kannan a Zwanenburg, 2014; Halouzka *et al.*, 2018). Uvedené faktory významně ovlivňují výslednou návratnost procesu. Nejvyšších hodnot návratnosti bylo dosaženo při použití silikagelu. Hodnoty návratnosti po interní přídavku GR24 do čistém rozpouštědla, tak do rostlinného extraktu (cca 70 %) jsou uvedeny v Tab 14. Porovnání solventů

na kolonách Strata-X ukázalo, že vzorky nanášené v 5% EtOAc dosahovaly vyšších hodnot návratnosti než v případě druhého testovaného rozpouštědla (5% ACN). Sorbent Strata-C18U poskytoval nejnižší hodnoty návratnosti, byl tedy pro purifikaci SL nejméně vhodný.

**Tab. 14** Návratnost vybraných sorbentů pro stanovení návratnosti GR24.

| Sorbent               | GR24         |              |
|-----------------------|--------------|--------------|
|                       | A            | B            |
| Strata-X <sup>a</sup> | 87,01 ± 2,82 | 58,90 ± 4,41 |
| Strata-X <sup>b</sup> | 74,09 ± 6,09 | 62,90 ± 6,39 |
| Silikagel             | 92,36 ± 5,10 | 70,09 ± 5,88 |
| C18                   | 69,68 ± 3,12 | 42,71 ± 3,17 |

A – v čistém rozpouštědle; B – v rostlinném extraktu

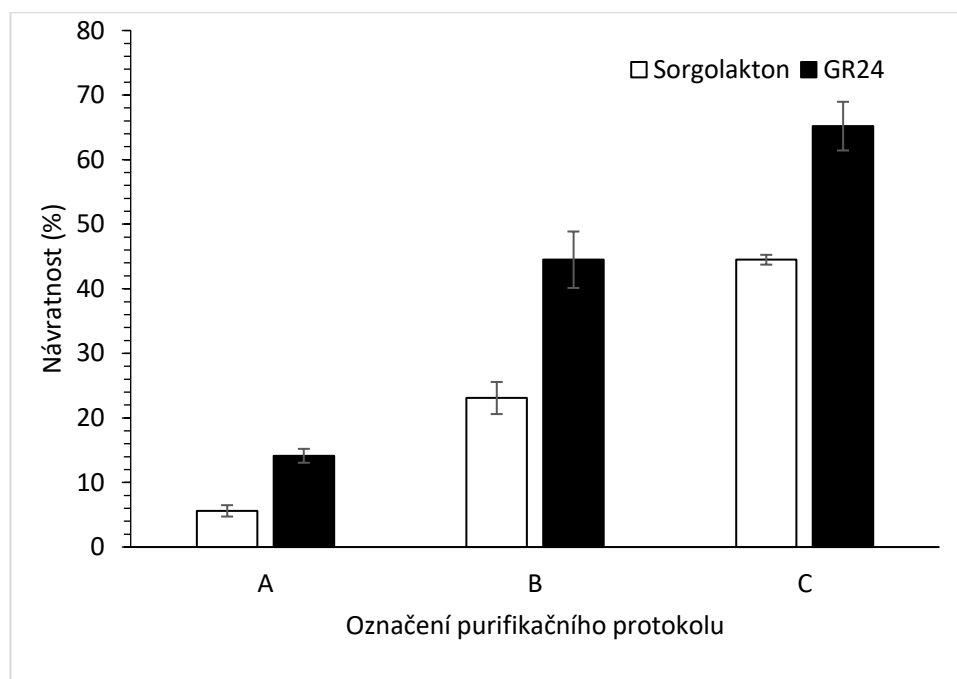
<sup>a</sup> vzorek nanášen v 5 % EtOAc; <sup>b</sup> vzorek nanášen v 5 % ACN

### 3.2.2.2 Srovnání izolačních protokolů

Pro další část práce byla na základě dílčích experimentů vyselektována modelová rostlina. Jednalo se o 3 týdny staré sazenice *V. faba*. Jako vhodný SPE sorbent pro purifikaci SL byl vybrán silikagel. Cílem této kapitoly pak bylo otestovat z řady existujících purifikačních metod tři v praxi nejčastěji využívané protokoly: A) Yoneyama *et al.* (2016), B) Kisugi *et al.* (2013) a C) Boutet-Mercey *et al.* (2018). Výsledky hodnot návratnosti jednotlivých postupů jsou shrnuty na Obr. 16. Jako externí standard pro stanovení návratnosti byl použit GR24, syntetický analog SL, a přirozeně se vyskytující sorgolakton, oba o koncentraci  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Yoneyama *et al.* (2016) optimalizoval protokol pro izolaci a kvantifikaci sorgomolu a 5-deoxystrigol, dvou hlavních SL produkovaných širokým dvoubarevným. Izolace byla založena na několika hodinové (24-48 h) maceraci nařezaných kořenů (průměr 2 mm) v EtOAc a finální analýze pomocí LC-MS/MS. Kisugi *et al.* (2013) a Boutet-Mercey *et al.* (2018) do svých protokolů navíc přidali purifikační krok založený na SPE. Účelem tohoto kroku bylo důkladnější přečištění extraktu před samotnou LC-MS/MS analýzou.

Nejnižších hodnot návratnosti ( $14,13 \pm 1,08 \%$  pro GR24 a  $5,60 \pm 0,88 \%$  pro sorgolakton) bylo dosaženo za použití protokolu A (Yoneyama *et al.*, 2016). Při zavedení SPE frakcionace (Kisugi *et al.*, 2013) byly výtěžky přibližně čtyřnásobně vyšší, tj.  $44,50 \pm 4,37 \%$  u GR24 a  $23,08 \pm 2,49 \%$  u sorgolaktonu. Nicméně frakcionace dle protokolu B (Kisugi *et al.*, 2013) byla poměrně namáhavá, časově náročná, a výsledná

návratnost celého procesu byla stále pod 50 %. Nejvyšší návratnost ( $65,19 \pm 3,77$  % pro GR24 a  $42,50 \pm 0,76$  % pro sorgolakton) byla dosažena za použití protokolu C (Boutet-Mercey *et al.*, 2018), kde byl hlavní rozdíl vedle počtu izolovaných frakcí dán především homogenitou vzorku.

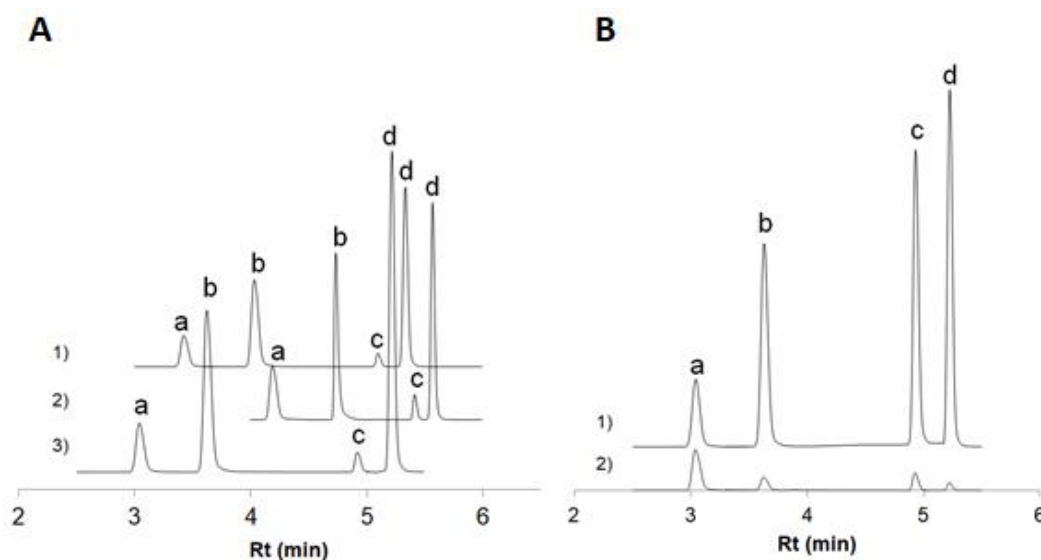


**Obr. 16** Testování návratnosti GR24 (■) a sorgolaktonu (□) pomocí vybraných izolačních a purifikačních postupů z rostlinného pletiva (A – Yoneyama *et al.* (2016); B – Kisugi *et al.* (2013); C – Boutet-Mercey *et al.* (2018)).

### 3.2.3 Optimalizace metody detekce UHPLC-MS/MS

Tato podkapitola se věnuje optimalizaci metody UHPLC s MS/MS detekcí za pomoci režimu automatické optimalizace MRM. Ve snaze docílit co největší citlivosti a účinné separace byly testovány různé LC a MS podmínky, tj. složení mobilní fáze, podmínky ionizace a výběr optimalizovaných MRM přechodů. Vzhledem k chemické povaze SL byla pro jejich separaci zvolena RP-C18 kolona (Acquity UPLC BEH). Optimalizace podmínek byla provedena pro analýzu o délce 10 minut s měnícím se poměrem (gradientem) vodné a organické složky mobilní fáze. Výběr vhodné mobilní fáze zahrnoval testování různých poměrů vody (neutrální nebo okyselená) a methanolu. Bylo testováno následující složení mobilní fáze: A) 20 mmol·l<sup>-1</sup> octan amonný/methanol, B) 20 mmol·l<sup>-1</sup> mravenčan amonný/methanol, C) voda/methanol. Nejvyšší citlivost společně s optimální separací analyzovaných složek poskytovala mobilní fáze C (Obr. 17A).

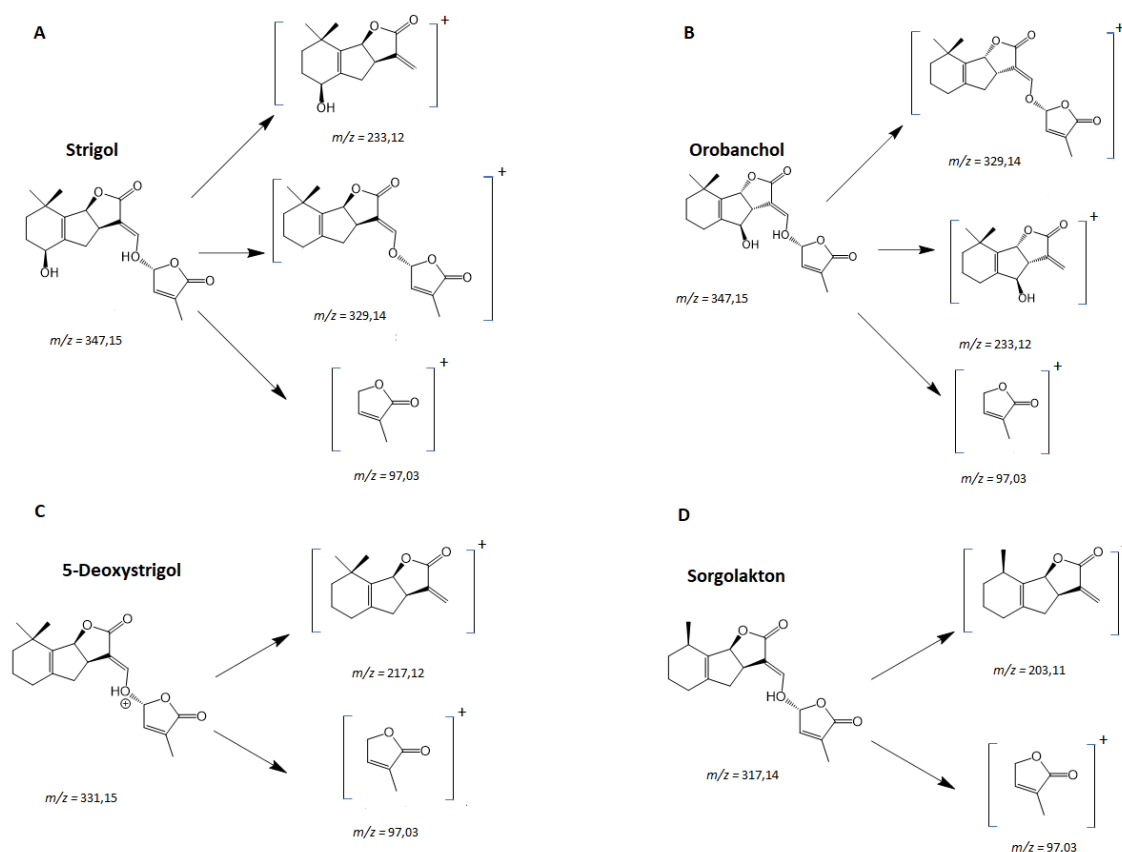
Dále byl sledován vliv vybraných mobilních fází na absolutní intenzitu mateřských ionů. Monitorování proběhlo v režimu načítání plných hmotnostních spekter (Full Mass Scan). Získaná data pomohla s výběrem a optimalizací MRM přechodů. Je důležité zmínit, že podmínky byly optimalizovány pro orobanchol, strigol, sorgolakton a 5-deoxystrigol. Později byly do metody zahrnuty i další SL (GR24, fabacyl acetát a orobanchyl acetát). Vyjma protonizovaných molekulárních iontů GR24 a fabacylu acetátu  $[M+H]^+$  (nejsou uvedeny na Obr. 17B) byla pozorována nejvyšší intenzita signálu ve formě sodných aduktů  $[M+Na]^+$  SL.



**Obr. 17** MRM chromatogram směsi vybraných endogenních strigolaktonů (a – orobanchol, b – strigol, c – sorgolactone, d – 5DS). A) vliv složení mobilní fáze na separaci (1 – 20 mM octan amonný/methanol; 2 – 20 mM mravenčan amonný/methanol; 3 – voda/methanol, B) vliv výběru MRM přechodů na citlivost (1 – sodné adukty; 2 – protonované molekulární ionty).

### 3.2.4.1 Interpretace charakteristických fragmentů

V prvním kroku bylo potřeba vybrat vhodné dceřiné ionty (fragmenty). Automatická MRM optimalizace byla provedena dvojím způsobem: a) pomocí FIA pro pozitivní/negativní mód ionizace, b) za použití kolony a krátkého retenčního okna (do 3 min) v pozitivním módu ionizace pro sodné adukty  $[M+Na]^+$  a protonované molekulární ionty  $[M+H]^+$ . Obě uvedené metody byly použity pro testování ionizace jak v negativním  $[M-H]^-$ , tak pro pozitivní mód  $[M+H]^+$ . V případě negativního módu k ionizaci nedocházelo, nebo byla intenzita vzniklých fragmentů příliš nízká (např. GR24), a proto je nebylo možné interpretovat. Výsledkem optimalizace byl výběr kvantifikačního (MRM 1) a minimálně jednoho až dvou konfirmačních přechodů (MRM 2 a 3) pro každý studovaný analyt. Dále bylo nutné charakterizovat vzniklé fragmenty. Podařilo se identifikovat všechny intenzivní fragmenty, jejich interpretace je znázorněna na modelových příkladech pro protonovanou molekulu daného SL (orobanchol, strigol, 5-deoxystrigol a sorgolakton; Obr. 18A-D)



**Obr. 18** Příklad interpretace charakteristických molekulárních fragmentů získaných pomocí ESI-MS/MS prekurzorového iontu  $[M+H]^+$  vybraných SL (A – orobanchol, B – strigol, C – 5-deoxystrigol a D – sorgolakton).

### 3.2.4.2 Identifikace strigolaktonů v rostlinných pletivech pomocí UPLC-MS/MS

Finální metoda UHPLC-MS/MS analýzy zahrnovala optimalizované parametry separace a detekce vybraných SL: gradientová eluce (H<sub>2</sub>O/MeOH), pozitivní mód ionizace a především výběr správných MRM sodných aduktů [M+Na]<sup>+</sup>, případně [M+H]<sup>+</sup>. Na základě intenzity signálu MRM přechodů byly zvoleny kvantifikační přechody společně s minimálně jedním konfirmačním přechodem, aby bylo zajištěno dostačující potvrzení identity analyzovaných látek (konfirmační přechody mají nastavenou shodu 30 %). Optimalizované kvantifikační a konfirmační přechody jsou shrnuty v Tab. 15, a to včetně charakteristických fragmentů, prekurzorových iontů a hodnot použité kolizní energie analyzovaných přirozeně se vyskytujících SL (orobanchol, strigol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát, sorgolakton a 5-deoxystrigolu) a GR24.

**Tab. 15** Přehled charakteristických fragmentů a kolizních energií (CE) – pozitivní mód ve formě [M+Na]<sup>+</sup>.

| Analyt            | Protonované molekulové nebo sodné ionty / kolizní energie |                           |                           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                   | MRM (1)                                                   | MRM (2)                   | MRM (3)                   |
| Orobanchol        | 368,80 > 325,20<br>-13 eV                                 | 368,80 > 272,10<br>-16 eV | 368,80 > 239,00<br>-24 eV |
| 5DS               | 352,80 > 256,15<br>-18 eV                                 | 352,80 > 241,15<br>-23 eV | -<br>-                    |
| Sorgolakton       | 339,20 > 242,20<br>-17 eV                                 | 339,20 > 227,05<br>-21 eV | -<br>-                    |
| Strigol           | 369,20 > 271,75<br>-20 eV                                 | 369,20 > 257,15<br>-24 eV | 369,20 > 351,00<br>-13 eV |
| GR24*             | 299,00 > 97,00<br>-22 eV                                  | 299,00 > 281,10<br>-7 eV  | 299,00 > 185,05<br>-9 eV  |
| Fabacyl acetát*   | 405,10 > 97,00<br>-30 eV                                  | 405,10 > 231,00<br>-20 eV | 405,10 > 345,20<br>-15 eV |
| Orobanchyl acetát | 411,00 > 254,00<br>-15 eV                                 | 411,00 > 239,00<br>-20 eV | -<br>-                    |

\*Pro GR24 a fabacyl acetát byly stanovené MRM přechody ve formě iontů [M+H]<sup>+</sup>.

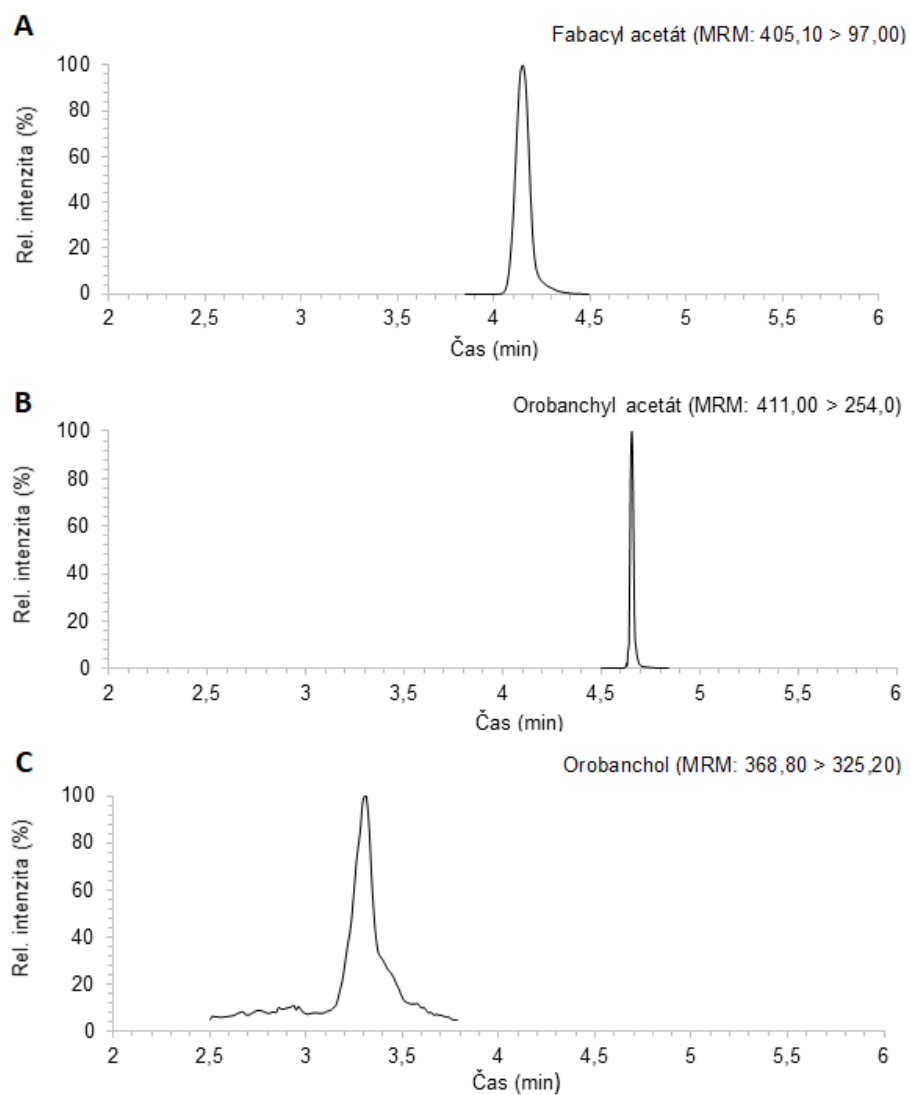
Optimalizovaná metoda UHPLC-MS/MS byla použita pro identifikaci SL v přečištěných kořenových extraktech vybraných rostlin: *V. faba*, *V. sativa*, *P. sativum* a *S. bicolor*. K izolaci byl použit modifikovaný protokol dle Boutet-Mercey *et al.*, (2018). Přečištěné extrakty rostlinného pletiva (kořenů) byly rozpuštěny ve 100% ACN, aby se zabránilo případné degradaci SL před samotným dávkováním na kolonu. Výsledky identifikace

jsou prezentovány v Tab. 16. Je důležité zdůraznit, že se jedná o první práci pojednávající o analýze SL ve *V. sativa*, ve které byl identifikován fabacyl acetát (405,1 > 97,0), orobanchyl acetát (411,0 > 254,0) a ve stopovém množství byl detekován i orobanchol (368,8 > 325,2,0). Přítomnost uvedených SL potvrdila očekávání, že kompozice identifikovaných SL bude podobná jako u *V. faba* a *P. sativum*. Mezi běžně vyskytující se SL u čeledi bobovitých patří také 5-deoxystrigol (352,8 > 256,1), který však nebyl v extraktu *V. Sativa* detekován, narozdíl od extraktů *V. faba* (Yoneyama *et al.*, 2008; Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Trabelsi *et al.*, 2017) a *P. sativum* (Yoneyama *et al.*, 2008, Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Pavan *et al.* 2016; Boutet-Mercey *et al.*, 2018).

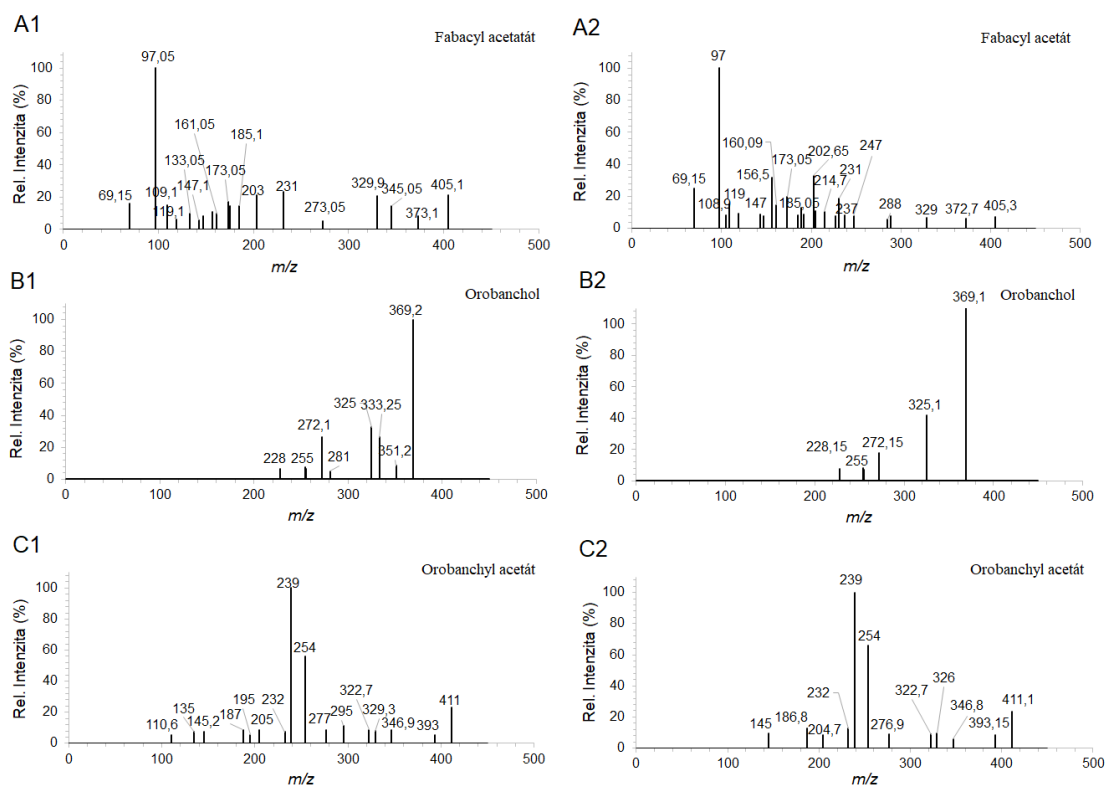
Další testovanou rostlinou byl *S. bicolor*, který patří mezi nejčastěji analyzovaný model v rámci SL problematiky. V minulosti sloužil jako modelová rostlina pro optimalizaci metody izolace a purifikace SL z rostlinných pletiv (Yoneyama *et al.*, 2016), navíc je znám produkcí několika důkladně prostudovaných SL: sogolaktonu, sorgomolu a 5-deoxystrigolu (Sato *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2010; Delaux *et al.*, 2012). V kořenovém extraktu *S. bicolor* se podařilo detekovat 5-deoxystrigol a sorgolakton (339,20 > 242,20). Oba uvedené SL byly identifikovány na základně interpretace shody hmotnostního spektra, MRM přechodů a retenčních časů s příslušnými standardy (Obr. 19-21).

**Tab. 16** Analýza zastoupení SL v kořenových extraktech z vybraných rostlinných druhů pomocí UHPLC-MS/MS. Pozitivní identifikaci +, negativní -.

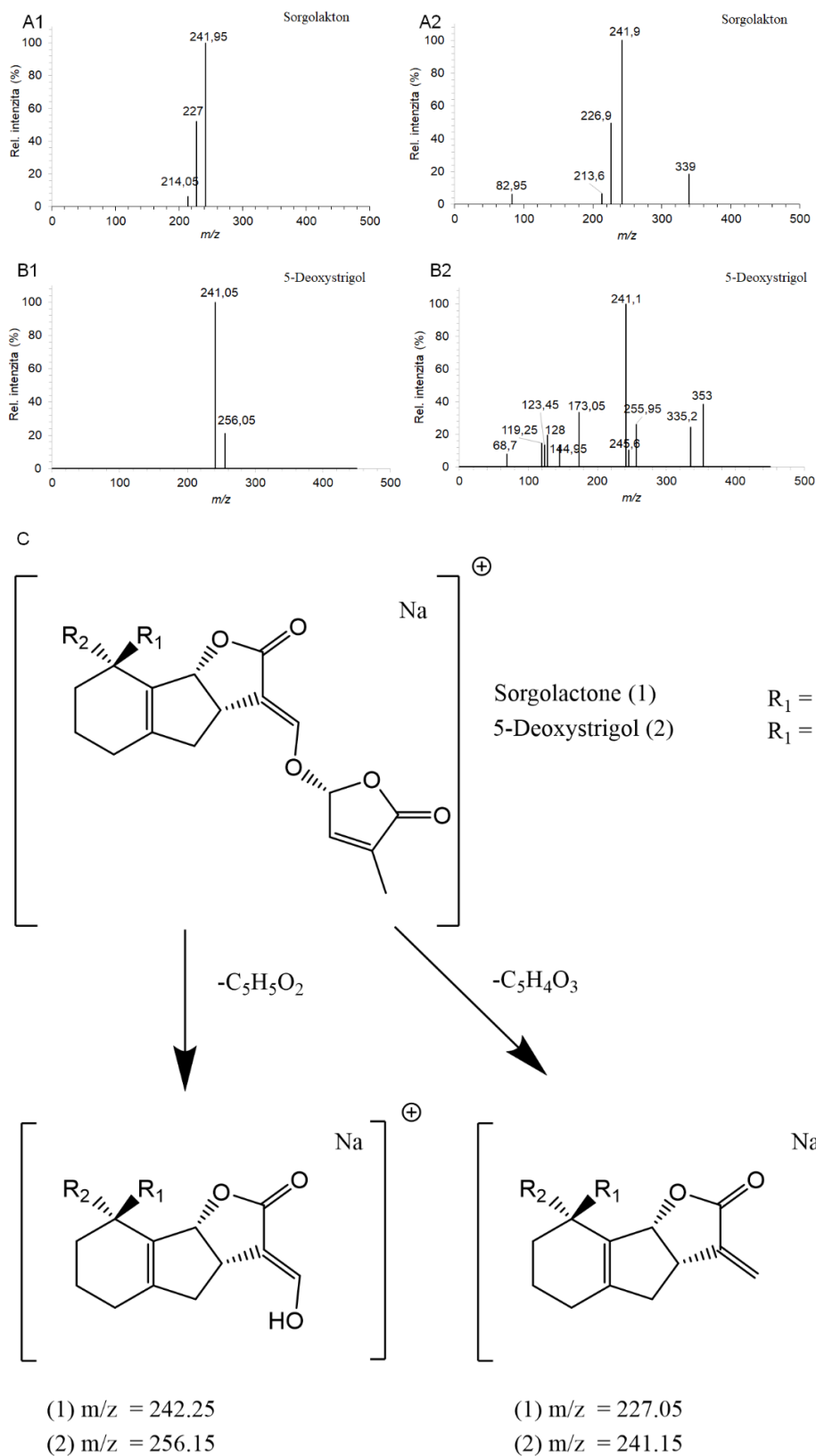
| Analyt            | <i>V. faba</i> | <i>P. sativum</i> | <i>S. bicolor</i> | <i>V. sativa</i> |
|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Orobanchol        | +              | +                 | -                 | +                |
| Strigol           | -              | -                 | -                 | -                |
| 5-Deoxystrigol    | +              | +                 | +                 | -                |
| Sorgolakton       | -              | -                 | +                 | -                |
| Fabacyl acetát    | +              | +                 | -                 | +                |
| Orobanchyl acetát | +              | +                 | -                 | +                |



**Obr. 19** Příklady kvantifikačních MRM přechodů pro fabacyl acetát (405 > 97) detekovaný v extraktu kořene *P. Sativum* (A), orobanchyl acetát (411 > 254) a orobanchol (369 > 325) ve *V. faba* (B a C).



**Obr. 20** Příklad MS/MS spekter identifikovaných SL: fabacyl acetátu, orobancholu a orobachyl acetátu. Porovnání spekter příslušných standardů (A1, B1 a C1) s MS/MS spektry SL detekovaných v extraktu *P. sativum* (A2, B2) a *V. faba*. (C2)



**Obr. 21** Příklad ESI-MS/MS sodného aduktu  $[M+Na]^+$  sorgolaktone a 5-deoxystrigolu (A1, B1 - standard, kořenový extrakt - *S. bicolor* A2, B2) doplněný o charakterizované hlavní fragmenty hmotnostního spektra (C).

### 3.2.5 Ambientní techniky pro studium strigolaktonů

#### 3.2.5.1 Identifikace strigolaktonů pomocí HR-DART

Rozhodnutí použít ambientní techniky pro identifikaci SL bylo učiněno s ohledem na jejich úspěšnou identifikaci pomocí UHPLC-MS/MS. Záměrem bylo najít techniku, kterou by bylo možné získat předběžné informace o případném zastoupení SL v rostlinném pletivu bez nutnosti komplikované přípravy vzorku před instrumentální analýzou. Předpokladem bylo, že výsledky měření za pomoci ambientních technik budou v souladu s naměřenými daty pomocí spojení UHPLC-MS/MS. Byly vybrány dvě ambientní techniky – DART a DESI.

Prvotní optimalizace identifikace SL pomocí spojení HR-DART-OrbiTrap-MS probíhala s využitím rostlinných extraktů (čiroku, bobu setého, hrachu setého a vikve) obohacených o standardy SL. Před analýzou byl rostlinný extrakt přečištěn pomocí SPE a rozpuštěn ve 100% ACN. Následně byl přenesen na vzorkovací tyčinku a umístěn do iontového zdroje MS. Výsledky potvrdily očekávání, bylo detekováno několik SL. Po optimalizaci podmínek byla věnována pozornost hlavnímu účelu použití DART, a to přímé analýze rostlinného pletiva bez náročné přípravy vzorku. Příčný řez stonku nebo kořene ( $1 \times 0,5$  cm) byl pomocí pinzety umístěn do iontového zdroje. Výsledkem měření bylo hmotnostní spektrum, ze kterého byla extrahována hmota ( $m/z$ ) hledaných látek a porovnána s teoretickou  $m/z$  (Tab. 17). Ve všech případech byly sledovány pouze protonované molekulové ionty. Výstupem bylo určení hodnot správnosti měření (mass accuracy), které jsou uvedeny v Tab. 17. Správnost měření je definována jako relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou a teoreticky vypočtenou hodnotou  $m/z$  sledovaného iontu, vztažený k teoretické hodnotě. Je to bezrozměrná veličina a je vyjádřena v ppm. Pro určení správného elementárního složení se uvádí jako dostatečné hodnoty menší než 5 ppm, kterých bylo dosaženo u všech identifikovaných SL. Spojení HR-DART-OrbiTrap-MS se jeví jako vhodný nástroj pro studium fytohormonů. Předběžné výsledky ukazují, že tato technika disponuje vysokou citlivostí, přičemž její hlavní výhodou jsou nízké nároky na přípravu vzorků.

**Tab. 17** Hodnoty  $m/z$  látek detekovaných pomocí HR-DART-OrbiTrap-MS v různých druzích rostlin, které odpovídají jednotlivým SL (orobanchol, 5-deoxystrigol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát a sorgolakton), a pro ně stanovené hodnoty správnosti měření.

| Rostlina               | Látka             | Kořen              |                           | Stonek             |                           |
|------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|
|                        |                   | Hmota<br>( $m/z$ ) | Správnost měření<br>(ppm) | Hmota<br>( $m/z$ ) | Správnost měření<br>(ppm) |
| <i>Vicia faba</i>      | Orobanchol        | 347,14975          | 2,41                      | 347,15048          | 4,51                      |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 331,15482          | 2,48                      | 331,15488          | 2,66                      |
|                        | Fabacyl acetát    | 405,15483          | 1,08                      | -                  | -                         |
|                        | Orobanchyl acetát | 389,15986          | 0,97646                   | -                  | -                         |
|                        | Sorgolakton       | -                  | -                         | -                  | -                         |
| <i>Vicia sativa</i>    | Orobanchol        | 347,14929          | 1,08                      | -                  | -                         |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 331,15462          | 1,87                      | 331,15485          | 2,57                      |
|                        | Fabacyl acetát    | 405,15521          | 2,01                      | -                  | -                         |
|                        | Orobanchyl acetát | 389,15998          | 1,28                      | -                  | -                         |
|                        | Sorgolakton       | -                  | -                         | -                  | -                         |
| <i>Pisum sativum</i>   | Orobanchol        | 347,14957          | 1,89                      | 347,15044          | 4,39                      |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 331,15463          | 1,90                      | 331,15497          | 2,93                      |
|                        | Fabacyl acetát    | 405,15469          | 0,73                      | -                  | -                         |
|                        | Orobanchyl acetát | 389,16012          | 1,64                      | -                  | -                         |
|                        | Sorgolakton       | -                  | -                         | -                  | -                         |
| <i>Sorghum bicolor</i> | Orobanchol*       | 347,14978          | 2,49                      | 347,15024          | 3,82                      |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 331,15497          | 2,93                      | 331,15509          | 3,29                      |
|                        | Fabacyl acetát    | -                  | -                         | -                  | -                         |
|                        | Orobanchyl acetát | -                  | -                         | -                  | -                         |
|                        | Sorgolakton       | 317,13901          | 2,08                      | 317,13966          | 4,13                      |

\*V případě *S. bicolor* nelze pomocí techniky DART rozlišit orobanchol od sorgomolu. Oba uvedené SL mají stejnou  $m/z$ .

### 3.2.5.2 Identifikace a prostorová lokalizace strigolaktonů pomocí HR-DESI

Druhou použitou ambientní technikou bylo spojení HR-DESI-Orbitrap. Charakteristikou DESI je schopnost pomocí elektrospreje desorbovat analyt z povrchu a zároveň ho při tom ionizovat. Záměrem bylo kromě detekce i vytvoření 2D mapy prostorové distribuce SL v řezu stonku a kořene. Předpokladem bylo, že nejvyšší intenzita signálu bude pozorována ve středu řezu segmentu v místě, kde se nachází cévní svazky (xylém). Výsledky jsou prezentovány stejným způsobem jako v případě podkapitoly věnující se technice DART, a to pomocí tabulky hmot ( $m/z$ ) látek detekovaných HR-DART-OrbiTrap-MS v různých druzích rostlin společně se stanovenými hodnotami správnosti měření (Tab. 18). Hodnota správnosti měření nesměla přesahovat 5 ppm. Důležité je zmínit, že na rozdíl od DART bylo hmotnostní spektrum analyzovaných SL tvořeno převážně sodnými adukty  $[M+Na]^+$ , přičemž protonizované molekulové ionty se nacházely v minoritním zastoupení. Opět byly pozorovány rozdílné hodnoty správnosti měření pro jednotlivých SL detekovaných v řezu stonku a kořene. V případě DESI-MS

byla navíc správnost měření výrazně vyšší v porovnání s HR-DART (< 1 ppm). Pouze v jediném případě (*P. sativum*; orobanchyl acetát) byla správnost měření nad 1 ppm (1,25 ppm).

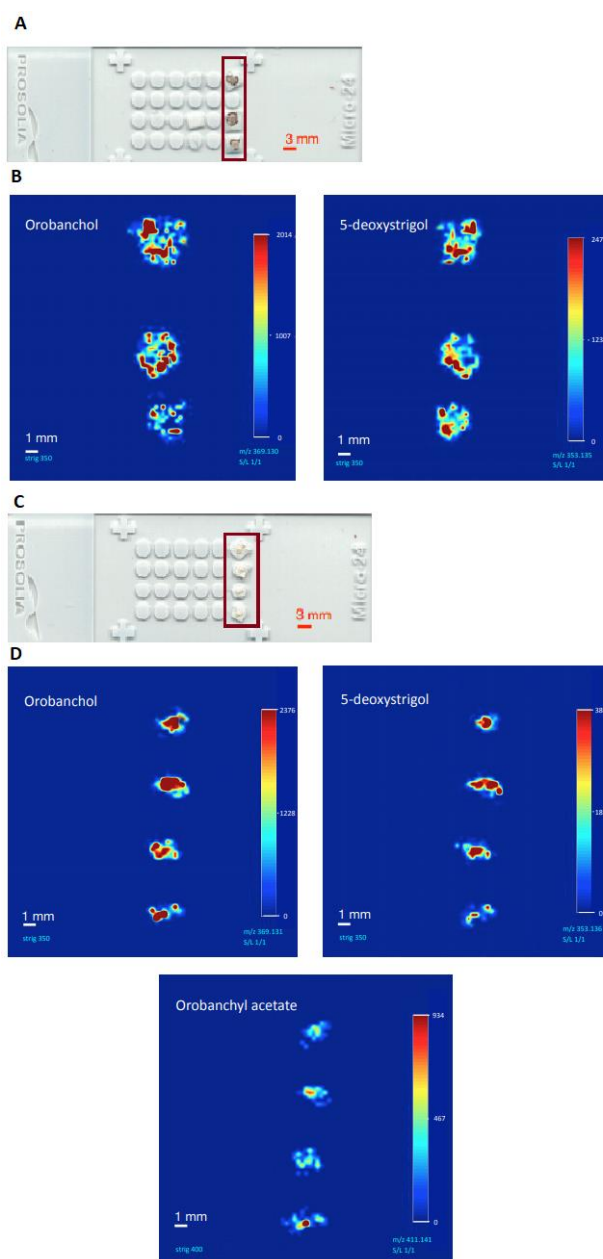
**Tab. 18** Hodnoty hmoty *m/z* látek detekovaných pomocí HR-DESI-OrbiTrap v různých druzích rostlin, které odpovídají jednotlivým SL (orobanchol, 5-deoxystrigol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát a sorgolakton) a pro ně stanovené hodnoty správnosti měření.

| Rostlina               | Látka             | Kořen                   |                           | Stonek                  |                           |
|------------------------|-------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                        |                   | Hmota<br>( <i>m/z</i> ) | Správnost měření<br>(ppm) | Hmota<br>( <i>m/z</i> ) | Správnost měření<br>(ppm) |
| <i>Vicia faba</i>      | Orobanchol        | 369,13089               | 0,08                      | 369,13068               | 0,57                      |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 353,13629               | 0,98                      | 353,13746               | 4,29                      |
|                        | Fabacyl acetát    | 427,13644               | 0,24                      | 427,13607               | 0,63                      |
|                        | Orobanchyl acetát | 411,14127               | 0,37                      | 411,14088               | 1,32                      |
|                        | Sorgolakton       | -                       | -                         | -                       | -                         |
| <i>Vicia sativa</i>    | Orobanchol        | 369,13089               | 0,73                      | 369,13097               | 0,95                      |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 353,13620               | 0,72                      | 353,13493               | 2,87                      |
|                        | Fabacyl acetát    | 427,13647               | 0,31                      | 427,13625               | 0,21                      |
|                        | Orobanchyl acetát | 411,14146               | 0,09                      | 411,14190               | 1,16                      |
|                        | Sorgolakton       | -                       | -                         | -                       | -                         |
| <i>Pisum sativum</i>   | Orobanchol        | 369,13062               | 0,73                      | 369,13083               | 0,57                      |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 353,13586               | 0,24                      | 353,13461               | 3,78                      |
|                        | Fabacyl acetát    | 427,13637               | 0,07                      | 427,13632               | 0,04                      |
|                        | Orobanchyl acetát | 411,14091               | 1,25                      | 411,13988               | 3,76                      |
|                        | Sorgolakton       | -                       | -                         | -                       | -                         |
| <i>Sorghum bicolor</i> | Orobanchol        | 369,13074               | 0,33                      | 369,13092               | 0,81                      |
|                        | 5-Deoxystrigol    | 353,13599               | 0,13                      | 353,13529               | 1,85                      |
|                        | Fabacyl acetát    | -                       | -                         | -                       | -                         |
|                        | Orobanchyl acetát | -                       | -                         | -                       | -                         |
|                        | Sorgolakton       | 339,12061               | 0,93                      | 339,12113               | 2,46                      |

\*V případě *S. bicolor* nelze pomocí techniky DESI rozlišit orobanchol od sorgomolu. Oba uvedené SL mají stejnou *m/z*.

Jedná o první záznam prostorové distribuce SL pomocí HR-DESI. Dle našich předpokladů byla nejvyšší intenzita signálu soustředěna v centrální oblasti řezu kořene. Pro ilustraci je zobrazena destička s upevněným biologickým materiálem (Obr. 22A – *V. faba*, C – *P. sativum*), který byl posléze skenován a výsledkem byl 2D záznam intenzit analyzovaných látek (Obr. 22B – orobanchol a 5-deoxystrigol; D – orobanchol, 5-deoxystrigol a orobanchyl acetát). Skeny řezů stonku nejsou prezentovány. Důvodem, proč byly vybrány jen dvě modelové rostliny, byl problém již při samotné přípravě řezů. Bylo nutné zajistit, aby byl vzorek řezu dostatečně reprezentativní a nebyl žádným způsobem deformovaný, což se u ostatních modelů nepodařilo. Přes poměrně velký potenciál pro studium SL však metoda HR-DESI trpí řadou nedostatků, které se týkají nejen samotné analýzy, ale i přípravy vzorků. SL

jsou velmi labilní sloučeniny, které snadno podléhají rozkladu. Nevíme s jistotou, co se přesně děje po provedení řezu. Dochází například k vylití jiných biologicky aktivních látek a hydrolytických enzymů z buněčných organel, což může výrazně ovlivnit nejen intenzitu signálu, ale také stabilitu SL. Preparáty navíc nebyly nijak chemicky ošetřeny a vlivem dehydratace docházelo k jejich smrsknutí a tím zkreslení přesné lokalizace analyzovaných látek. V některých případech byl pozorován pokles intenzity signálu v průběhu času. Řezy, které byly skenovány v později, se lišily intenzitou signálu stanovené látky v porovnání s dříve analyzovanými vzorky.



**Obr. 22** Preparáty příčného řezu kořene *V. faba* (A) a *P. sativum* (C) upevněných na podložním skle. Záznam 2D mapy prostorové distribuce vybraných SL, B) *V. faba*, - orobanchol, 5-deoxystrigol, D) *P. sativum* – orobanchol, 5-deoxystrigol a orobanchyl acetát. Měření proběhlo na přístroji HR-DESI-Orbitrap.

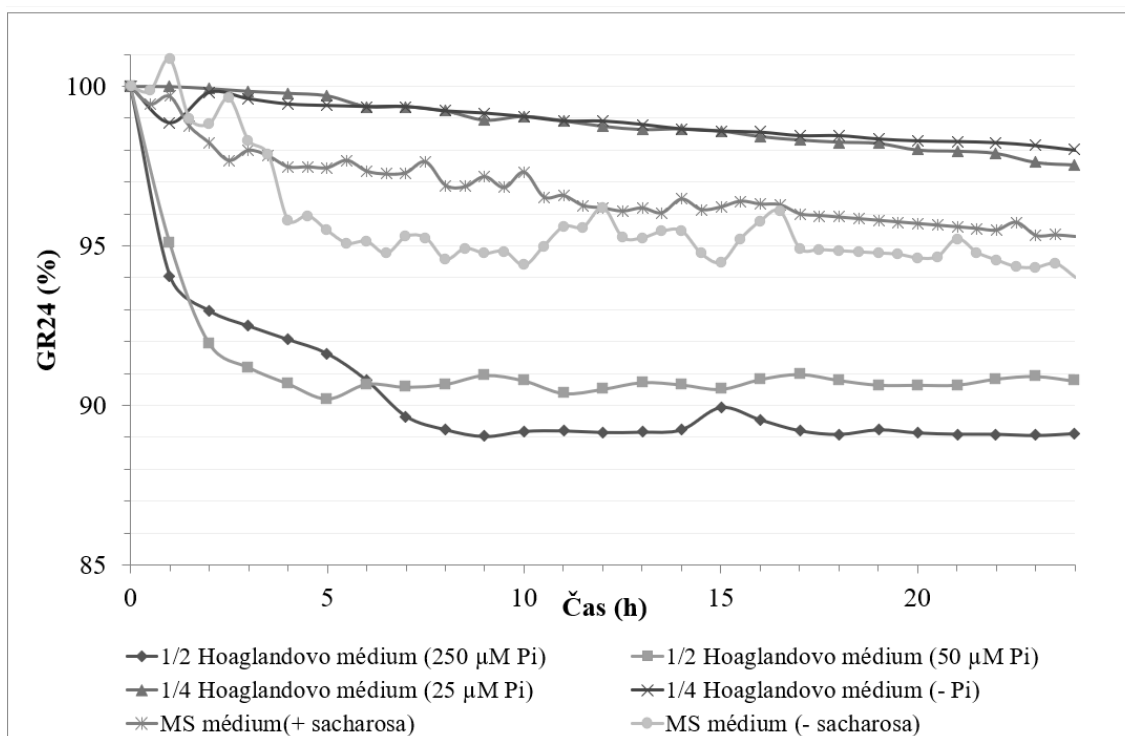
Experimenty byly provedeny na pracovišti Ústav chemie a biochemie, Mendlova Univerzita v Brně, ve spolupráci a pod odborným vedením pana prof. RNDr Bořivoje Klejduse, Ph.D.

### **3.2.6 Stabilita strigolaktonů**

Další kapitola výsledkové části se věnuje stabilitě a mechanismu hydrolýzy syntetického analogu SL GR24. Tento analog vykazuje vyšší hydrolytickou stabilitou než přirozeně se vyskytující zástupci SL (Johnson *et al.*, 1976, 1981; Nefkens *et al.*, 1997; Kannan a Zwanenburg, 2014). Z tohoto důvodu byl pro srovnání v některých experimentech zahrnut i 5-deoxystrigol.

#### **3.2.6.1 Stabilita strigolaktonů v kultivačních médiích**

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit stabilitu SL v různých kultivačních médiích a pufrch. Koncentrace analytů byla stanovena spektrofotometricky. Měření probíhalo v 1 hod intervalech (30 min interval v případě MS média) po celkovou dobu 24 h při vlnové délce 239 nm. V uvedených výsledcích lze pozorovat nejvýraznější pokles koncentrace GR24 o 10 % v ½ Hoaglandově médiu se zvýšenými koncentracemi Pi, a to 50 a 250  $\mu\text{M}$  (Obr. 23). Největší úbytek GR 24 byl pozorován okamžitě po zahájení experiment (0,5 - 2,5 h). Navíc v některých případech byl zaznamenán dočasný neočekávaný nárůst koncentrace, který byl následován opět jejím poklesem. Důvodem byla nedostačující rozlišovací schopnost metody. Během první hodiny byl pozorován úbytek 5 %. V sedmé hodině došlo k ustálení. Nicméně v ¼ Hoaglandově mediu obsahujícím 25  $\mu\text{M}$  Pi GR24 vykazovalo nejvyšší stabilitu, identickou s Hoaglandovým médiem bez přídavku Pi. V obou MS médiích byl pozorován pokles koncentrace do 5 % během 24 h.

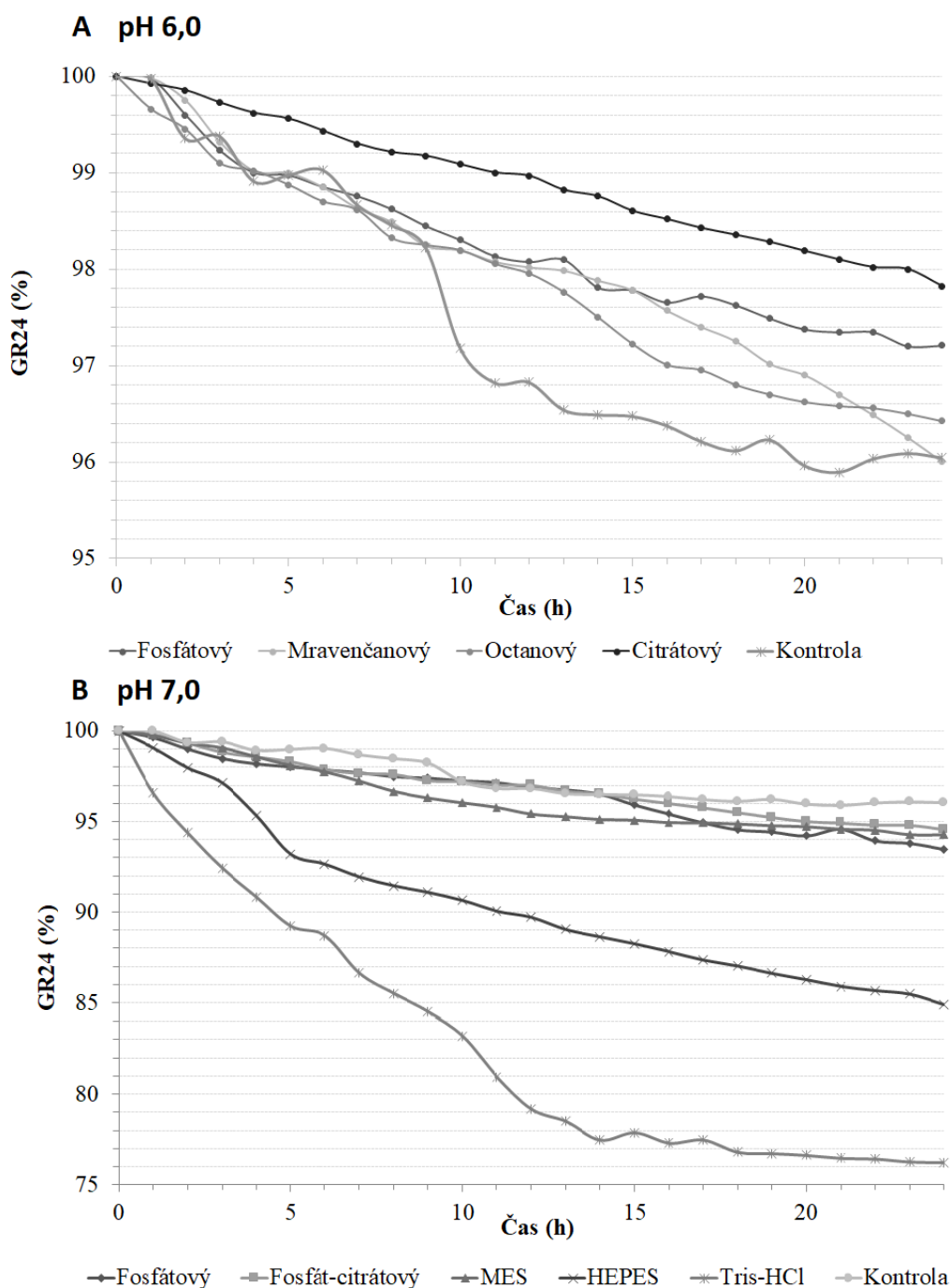


**Obr. 23** Srovnání stability GR24 v různých kultivačních médiích: Hoaglandovo médium testován vliv koncentraci Pi (0 – 250 μM) a MS médium (± sacharosa).

### 3.2.7 Stabilita strigolaktonů ve vybraných pufrích

#### 3.2.7.1 Krátkodobé monitorování stability GR24

Stabilita GR 24 byla mimo kultivační média stanovena ve vybraných pufrích. Pro pH 6,0 byly zvoleny: fosfátový, mravenčanový, octanový, citrátový, a pro pH 7,0: fosfátový, fosfo-citrátový, MES, HEPES, Tris-HCl (Obr. 24A, B). V této oblasti pH vykazují SL nejvyšší stabilitu. Jako kontrola byla zvolena Milli-Q voda. Téměř u všech testovaných pufrů byl pozorován pokles koncentrace o pouhých 5 % za dobu 24 hodin. Lze konstatovat, že jsou vhodnými roztoky nejen pro experimenty s GR24. Naproti tomu koncentrace GR24 se v pufrích HEPES a Tris-HCl (pH 7,0) po 24 hodinách snížila o 15-25 %. Oba testované pufrы, HEPES a Tris-HCl obsahují látky, jež jsou schopny poskytnout elektronový pár a vystupují jako nukleofily. Jejich přítomnost v roztoku může vést k hydrolyze GR24 a SL. Použití těchto pufrů proto není vhodné.

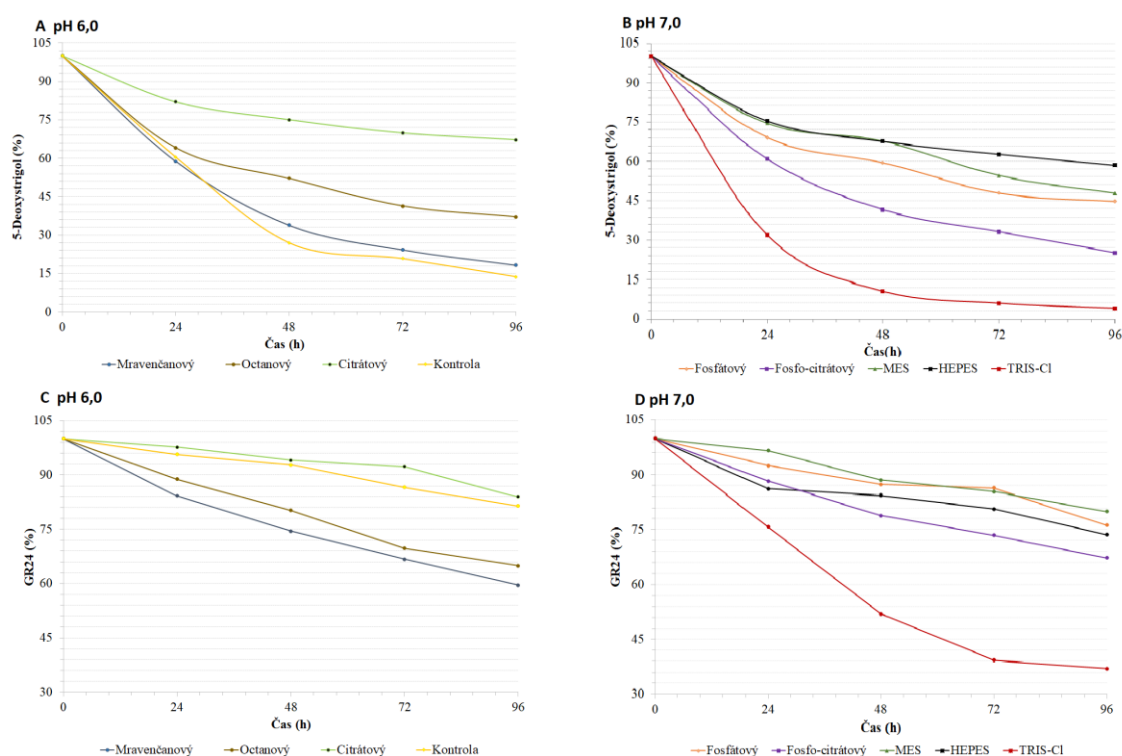


**Obr. 24** Krátkodobé monitorování stability GR24 v pufrch o pH 6,0 (A) a pH 7,0 (B).

### 3.2.7.2 Dlouhodobé monitorování stability GR24 a 5-deoxystrigol

Záměrem experimentu bylo srovnat stabilitu GR24 a 5-deoxystrigolu. Testování probíhalo po dobu 4 dnů ve 24 h intervalech. Byla pozorována výrazně nižší stabilita 5-deoxystrigolu než v případě GR24 (Obr. 25A-D). Ztráty se pohybovaly

v rozmezí od 20 až 95 %. Nejvyšší úbytek koncentrace byl pro oba analyty pozorován v Tris-HCl pufru (pH 7,0). Po 96 h došlo k více jak 95% ztrátě 5-deoxystrigolu a 63% GR24 (Obr. 25). Stabilita 5-deoxystrigolu ve vybraných pufrech (pH 6,0) je uvedena na Obr. 25A. Největší úbytek pozorován ve mravenčanovém pufru. Oba analyty vykazovaly nejnižší úbytek koncentrace v citrátovém pufru (pH 6,0). V případě 5-deoxystrigolu došlo k poklesu koncentrace přibližně o 33 % za 96 hodin. Tento pokles je výrazně nižší ve srovnání s dalšími testovanými pufrů (pH 6,0 a pH 7,0). Pozorováno byl i výrazný úbytek 5-deoxystrigolu v kontrole (Milli-Q voda), a to přibližně 86 % za 96 hodin. Ve srovnání s GR24 v kontrole byl pokles koncentrace okolo 20 %.



**Obr. 25** Monitorování dlouhodobé stability (4 dny) 5-deoxystrigolu (A, B) a GR24 (C, D) v pufrech o pH 6,0 (A) a pH 7,0 (B).

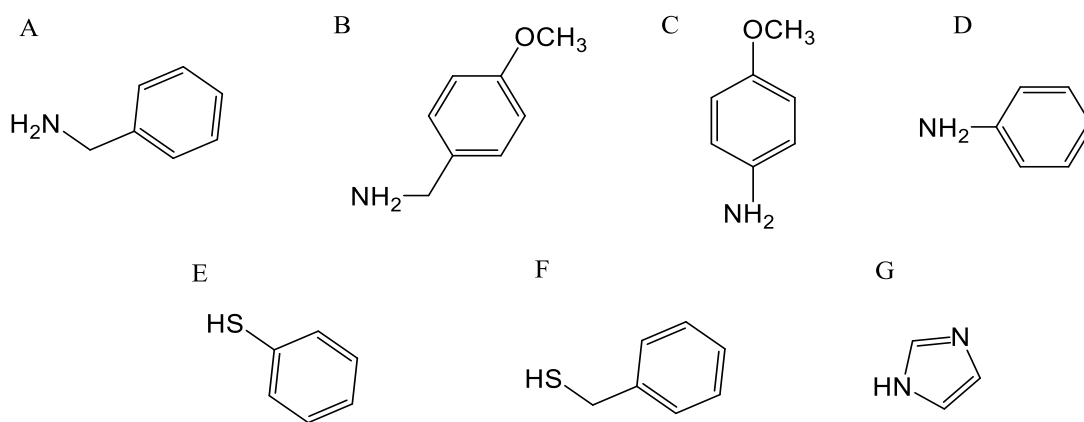
### 3.2.8 Stabilita GR24 ve vybraných rozpouštědlech

Záměrem experimentu bylo najít vhodné rozpouštědlo, které by bylo v dalším experimentu využito pro stanovení kinetických a termodynamických parametrů pro reakci s GR24. Bylo provedeno ověření stability SL v acetonitrilu, acetonu, ethanolu a methanolu. GR24 vykazovalo vysokou stabilitu v acetonitrilu, acetonu a ethanolu (úbytek GR24  $\leq 5$  %). V roztoku methanolu bylo pozorováno ztelně nestabilní chování GR24. Tento výsledek byl očekávaný a potvrdil naši domněnku, že nukleofilní povaha

metanolu dostatečně urychluje průběh reakce GR24. Aceton a acetonitril byly taktéž testovány, nicméně stabilita GR24 v těchto rozpouštědlech byla příliš vysoká a rychlost příliš nízká, tudíž nevhodná pro tento experiment.

### 3.2.9 Nukleofilní reakce GR24

Doposud byly publikovány dva reakční mechanismy nukleofilního ataku molekuly GR24. Naším záměrem bylo potvrdit, že se jedná o adičně-eliminační mechanismus (Mangnus a Zwanenburg, 1992), kdy se nukleofil váže na molekulu GR24 za současného oddělení D-kruhu. Pro potvrzení mechanismu reakce bylo potřeba stanovit kinetické a termodynamické parametry reakce. Bylo vybráno několik nukleofilů. Jednalo se o látky, které obsahovaly atom dusíku nebo síry (Obr. 26): benzylamin, 4-methoxybenzylamin, *p*-anisidin, anilin, thiofenol, benzyl merkaptan a imidazol. Průběh reakce byl monitorován pomocí spektrofotometru při různé teplotě (25-40 °C). Teplota 30 °C byla zvolena jako optimální pro reakci GR24 s vybranými nukleofilními látkami v metanolu. Výstupem bylo stanovení rychlostní konstanty ( $k$ ) a poločasu rozkladu ( $t_{1/2}$ ). Hodnoty obou jmenovaných parametrů jsou uvedeny v Tab. 19 pro každou testovanou látku.



**Obr. 26** Vzorce vybraných potencionálně nukleofilních látek, které byly testovány jako substráty pro Michaelovu adici: A) benzylamin, B) 4-methoxybenzylamin, C) *p*-anisidin, D) anilin, E) thiofenol, F) benzyl merkaptan G) imidazol.

**Tab. 19** Hodnoty reakční rychlosti a poločasy rozkladu pro vybrané testované látky s GR24 při teplotě 30 °C.

| Nukleofil           | $k \times 10^{-5} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ | $t_{1/2} (\text{h})$ |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Kontrola (Metanol)  | 0,50                                                                    | 38,51                |
| Thiofenol           | 0,67                                                                    | 28,88                |
| Anilin              | 0,67                                                                    | 28,88                |
| Imidazol            | 0,83                                                                    | 23,10                |
| Benzyl merkaptan    | 1,00                                                                    | 19,25                |
| <i>p</i> -Anisidin  | 1,67                                                                    | 11,55                |
| Benzylamin          | 9,33                                                                    | 2,06                 |
| 4-Methoxybenzylamin | 11,17                                                                   | 1,72                 |

Na základě stanovených parametrů rychlostní konstanty a poločasu rozkladu bylo prokázáno, že nukleofilní reakce GR24 je reakcí druhého řádu. Rychlostní konstanty druhého řádu získané ze spektrofotometrických měření v podmínkách pseudo-prvního pořadí jsou uvedeny chronologicky. Nejrychlejší průběh reakce byl pozorován pro benzylamin a 4-methoxybenzylamin s poločasem rozpadu GR24  $\leq 3$  h, zatímco nejpomalejší reakce zahrnovala nukleofily obsahující atom síry (thiofenol, benzyl merkaptan; poločas rozpadu  $\geq 19$  hodin). Zjištěné parametry pro reakce benzylamin a 4-methoxybenzylamin byly použity pro výpočet termodynamických parametrů reakce (Tab. 20). Kinetická a termodynamická data, jakož i reakční produkty určené pomocí NMR a HRMS potvrzují, že reakce GR24 s nukleofily probíhá bimolekulárním mechanismem. V daném případě se uplatňuje mechanismus Michaelovy reakce, která je následovaná eliminací. Záporné hodnoty pro  $\Delta S$  indikují asociativní reakční mechanismus, kde SL a nukleofil tvoří jediný aktivovaný komplex přes adičně-eliminální mechanismus. Testování zahrnovalo vlastní syntézu potencionálních produktů reakce a jejich následnou charakterizaci pomocí  $^1\text{H}$ -NMR.

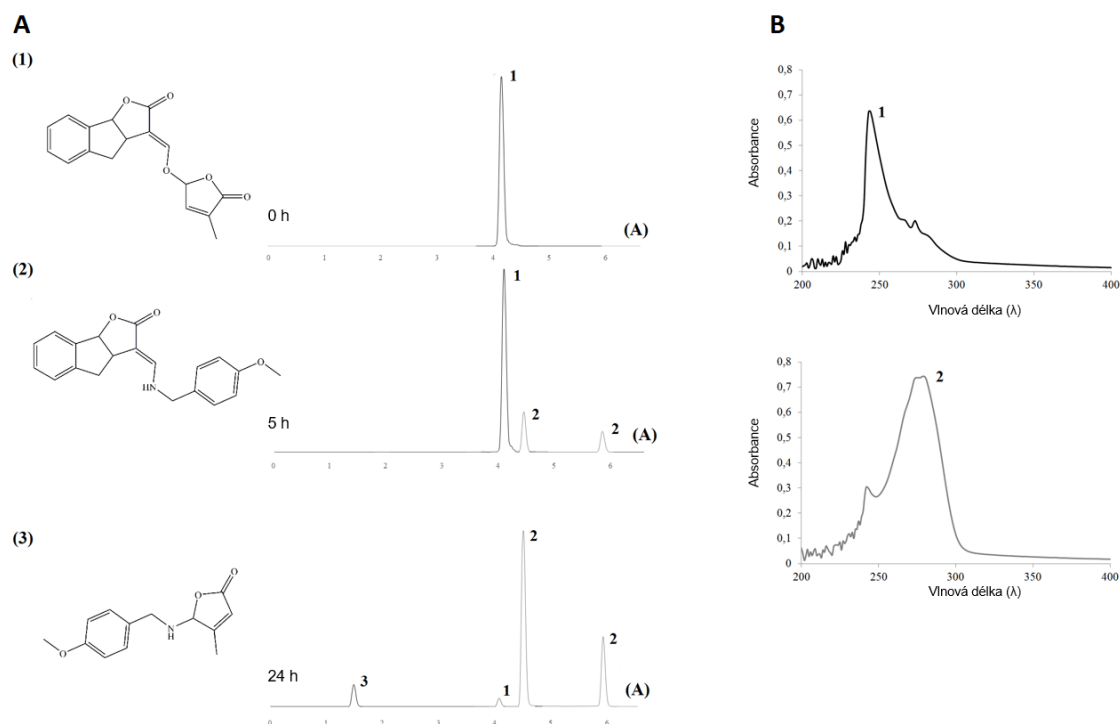
**Tab. 20** Termodynamické vybraných nukleofilů při nukleofilní substituci na molekulu GR24 při 40 °C.

| Nukleofil           | $E_a$<br>$\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ | $\Delta H^\ddagger$<br>$\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ | $\Delta S^\ddagger$<br>$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ | $\Delta G^\ddagger$<br>$\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ | logA  |
|---------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------|
| Benzylamin          | 31,62                                                      | 29,01                                                                    | -230,86                                               | 101,31                                                                   | 15,46 |
| 4-Methoxybenzylamin | 27,96                                                      | 25,36                                                                    | -232,16                                               | 98,06                                                                    | 14,16 |

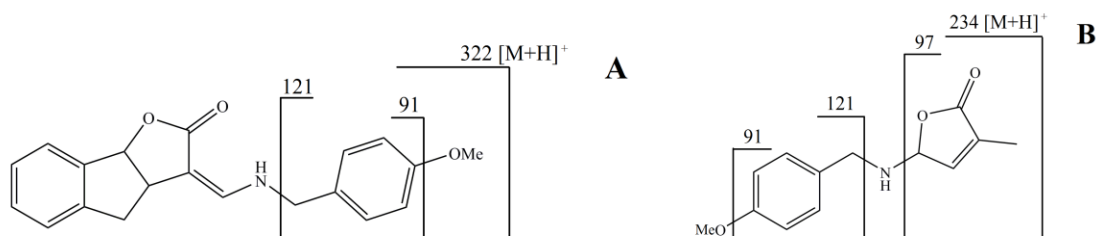
### 3.2.10 Monitorování nukleofilní reakce GR24 pomocí UHPLC/MS-MS

Cílem tohoto experimentu bylo najít vhodnou metodu, která by byla schopná jednoznačně identifikovat vznikající produkty reakce GR24 s vybranými nukleofily. Pro monitorování byla zvolena UHPLC-MS/MS metoda. V daném uspořádání byl experiment navržen tak, aby bylo dosaženo úspěšné separace všech složek reakční směsi. Mezi testované látky patřily: benzylamin, 4-methoxybenzylamin, *p*-anisidin, imidazol, tiofenol a benzylmerkaptan.

Průběh reakce je znázorněn a prezentován na reakci s 4-methoxybenzylaminem na Obr. 27. Z počátku byl pozorován pouze úbytek GR24 (1) a nárůst intenzity signálu nově vznikajícího komplexu ABC-Nu (2). Po vyčerpání reaktantu (GR24) reagoval přebytek Nu s hydroxybutenolidem (hydroxy-D-kruh) za vzniku D-Nu (3). Je důležité zmínit, že byl pozorován další pík se shodným hmotnostním a kolizním spektrem jako ABC-Nu. Jednalo se o epimer ABC-Nu. Pro porovnání je uveden záznam spektrofotometrického měření, kde nelze jednoznačně rozlišit produkty reakce na základě UV profilu. Lze pouze identifikovat nejvíce zastoupenou látku. Dle získaných výsledků D-kruh nereagoval s anilinem, tiofenolem a benzylmerkaptanem ani po 24 h. Identifikace fragmentů reakce s GR24 a 4-methoxybenzylaminu byla provedena dle Obr. 28.



**Obr. 27** A) MS záznam reakční směsi (A) GR24 a 4-methoxybenzylaminu v čase 0, 5 a 24 h. B) UV profil GR24 (1) a vzniklého produktu (2). (1) GR24; (2) ABC-Nu; (3) D-Nu.



**Obr. 28** Identifikace fragmentů reakce GR24 a 4-methoxybenzylamin: (A) ABC-Nu, (B) D-Nu.

Uvedené fragmenty byly součástí monitorování vybraných reakcí (MRM). Vždy byl zvolen jeden kvantifikační a minimálně jeden až dva konfirmační přechody. Tab. 21 ilustruje seznam charakterizovaných nejintenzivnějších fragmentů kolizního spektra. V případě D-Nu byl ve všech případech pozorován fragment o hmotě  $m/z$  97, který odpovídá D-kruhu. Výsledek experimentu je v souladu s postulovaným mechanismem (Mangnus a Zwanenburg, 1992), kde reakce nastává až po uvolnění hydroxybutenolidu.

**Tab. 21** Charakterizované hmoty ( $m/z$ ) vybraných fragmentů reakčních produktů ABC-Nu a D-Nu.

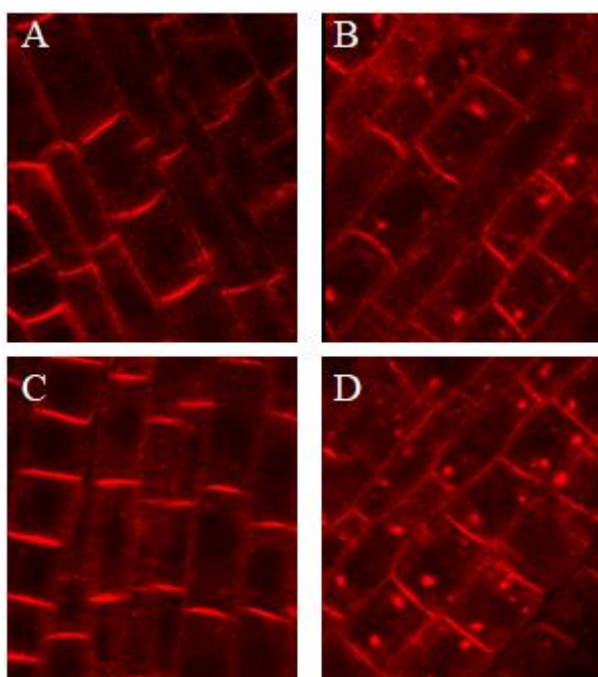
| Nukleofil           | ABC-Nu                                                                                 | D-Nu                                                                     |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Imidazol            | 253,05 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 166,07 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                     | 185,05 [M+H-C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                | 97,05 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>   |
|                     | 69,05 [M+H-C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> | 69,05 [M+H-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>   |
| <i>p</i> -Anisidin  | 308,05 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 220,05 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                     | 290,00 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                             | 108,10 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> NO] <sup>+</sup>               |
|                     | 162,05 [M+H-C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                | 97,05 [M+H-C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NO] <sup>+</sup>                |
| 4-Methoxybenzylamin | 321,14 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 234,11 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                     | 121,10 [M+H-C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>             | 121,10 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> |
|                     | 91,10 [M+H-C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>              | 97,05 [M+H-C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO] <sup>+</sup>               |
|                     |                                                                                        | 91,10 [M+H-C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>  |
| Benzylamin          | 292,05 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 204,10 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                     | 274,10 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                             | 97,05 [M+H-C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N] <sup>+</sup>                 |
|                     | 183,05 [M+H-C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO] <sup>+</sup>                             | 91,10 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>  |
|                     | 91,10 [M+H-C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>              |                                                                          |

### 3.2.11 Regulace auxinové dráhy vlivem SLs efektu na endocytosu PIN proteinů

Mezi další řešenou problematiku patřila role SL na konstitutivní recyklaci auxinových transportérů. Jednalo se o imunolokalizaci PIN1 v kořenových buňkách, kde byl sledován vliv GR24 na internalizaci BFA těles. BFA (brefeldin A) je po chemické látce lakton, který je produkovaný *Eupenicillium brefeldianum*. Jeho charakteristickou vlastností je schopnost inhibovat transport proteinů (Rothman, 1994).

Mechanismus experimentu je založený na inhibici PIN proteinů, které zůstanou lokalizovány i mimo plazmatickou membránu v tkz. ve formě BFA tělísek. Příklad auxinu (NAA) vede k jejich relokalizaci. SL působí na auxinem zprostředkovanou inhibici PIN endocytové recyklace (Paciorek *et al.*, 2005). Jak již bylo dokázáno dříve, tak PIN proteiny se hromadily intracelulárně po ošetření BFA (brefeldin A) a tyto BFA-indukované internalizace PIN byly inhibovány syntetickým auxin (NAA). Samotné ošetření GR24 nevykázalo žádný účinek na BFA-indukovanou PIN intracelulární akumulaci, ale jasně interferovalo s NAA, přičemž vedlo k inhibici tohoto procesu. Podobný účinek vykazoval i přirozeně vyskytující se SL, 5-deoxystrigol, který vedl ke zrušení auxinového efektu na inhibici PIN internalizaci po ošetření BFA viz Obr. 29. Pro experiment musela být použita vyšší koncentrace GR24/5-deoxystrigol. Nicméně je

nutné zdůraznit, že uvedený experiment vyžadoval poměrně vysokou koncentraci GR24. Důvodem je, že Col-0 je do jisté míry rezistentní vůči GR24 ( $>5 \mu\text{M}$  GR24 pro vyjádření biologické aktivity) (Shinohara *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014; Bennett *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017). Navíc jeho vyšší koncentrace mohou mít vliv na signální dráhu fotoreceptoru, jelikož se jedná o racemickou směs (*rac*-GR24), kdy jeho stereoizomery mohou svou vazbou na receptor spustit signální kaskádu, která není součástí SL signalizační dráhy (Tsuchiya *et al.*, 2010; Scaffidi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020).



**Obr. 29** Výřez několika buněk kořene *A. thaliana* (Col-0). A) DMSO (kontrola), B) BFA, C) BFA+NAA, D) BFA+NAA+SL (GR24/5-deoxystrigol).

### 3.3 Diskuze

Prezentovaná disertační práce je členěna do několika okruhů: 1) Selektce vhodných biologických modelů pro studium strigolaktonů. 2) Vývoj metod izolace a purifikace strigolaktonů z rostlinného pletiva. 3) Vývoj UHPLC-MS/MS metodiky pro profilování strigolaktonů. 4) Využití ambientních technik – DART a DESI ve studiu strigolaktonů. 5) Studium stability strigolaktonů a mechanismus hydrolýzy GR24.

Jedním z prvotních cílů byla selektce vhodného biologického modelu a kultivaru, který by díky rychlému růstu a relativně vysoké koncentraci produkovaných SL umožnil vývoj analytické metody pro profilování SL. Nejlepším modelem se ukázaly být bob setý, hrách setý, a čirok dvoubarevný. Mezi modelové rostliny jsem zařadil i vikev setou, u níž nebyla přítomnost SLs doposud publikována. Všechny uvedené plodiny jsou schopny během kultivace o délce 3 týdnů vytvořit bohatý kořenový systém s dostatečným množstvím kořenové biomasy. Jako nevhodné pro další práci byly vyřazeny rajče jedlé a kukuřice setá. V minulosti byl čirok dvoubarevný použit jako modelová rostlina pro optimalizaci protokolu izolace a purifikace SL (Yoneyama *et al.*, 2016). Bob setý a hrách setý byly vybrány, protože patří do dobře prostudované čeledi bobovitých (Yoneyama *et al.*, 2008; Foo a Davies, 2011 Pavan *et al.*, 2016; Boutet-Mercey *et al.*, 2018).

Dalším krokem bylo vybrat vhodnou izolační metodu pro izolaci SL. Hlavním omezujícím faktorem je nízká chemická stability SL, která v kombinaci s nízkou koncentrací snižuje konečný výtěžek a velmi nízkou koncentrací (Kohlen *et al.*, 2011; Ueno *et al.*, 2015b; Boutet-Mercey *et al.*, 2018; Rial *et al.*, 2018). Testováno bylo několik potencionálně vhodných sorbentů – silikagel, polymerní sorbent Strata-X a Strata C18-U. Výhodou byla silná retence analytu bez potřeby použití promývacích kroků, snadná manipulace, a navíc polymerní sorbent disponuje i vyšší kapacitou pro množství naneseného vzorku, a to až 10×. Celková návratnost testovaného analytu (GR24) po izolaci na polymerním sorbentu byla mezi 74-87 % z čistého rozpouštědla a 59-63 % z rostlinném extraktu po přidavku analytu. Další testovaný sorbent, silikagel, zastává dominantní pozici při výběru sorbent v rámci SL problematiky. Výhoda silikagelu je možnost frakcionace vzorku, kde je rozdělen na několik frakcí za použití těkavých rozpouštědel hexanu/heptanu a EtOAc. Frakcionace pomocí silikagelu má především uplatnění pro germinační testy, kdy jednotlivé frakce jsou testovány na SL indukované klíčení parazitických rostlin (Kisugi *et al.*, 2013). Testovali jsme několik izolačních

a purifikačních protokolů, které se současně využívají ve vědecké praxi: A) Yoneyama *et al.* (2016), B) Kisugi *et al.* (2013) a C) Boutet-Mercey *et al.* (2018). Nejvyšší hodnota návratnosti byla stanovena pro protokol C:  $65,19 \pm 3,77$  % pro GR24 a  $42,50 \pm 0,76$  % pro sorgolakton. Oba analyty byly interně přidány na začátku extrakce. Ze získaných poznatků jsme optimalizovali protokol, který kombinuje výhody dvou předchozích publikovaných izolačních metod (Kisugi *et al.*, 2013; Boutet-Mercey *et al.*, 2018) a ve výsledku jsme dostali 3 frakce (heptan/EtOAc 75:25, 50:50, 0:100), a to bez promývacího kroku, aby bylo možné zajistit izolaci i jiných SL (např. 5-deoxystrigol a sorgolakton) v různých organismech (např. *S. bicolor*).

Metoda UHPLC nabízí, ve srovnání s klasickou HPLC, kratší doby analýzy a větší účinnost separace. Ve spojení s MS/MS tvoří nejúčinnější metodu analýzy SL, stejně jako v případě ostatních skupin fytohormonů (Tarkowská *et al.*, 2014). Pro detekci a kvantifikaci se využívá režim MRM (monitorování charakteristických fragmentů). Takto je zajištěna vysoká citlivost a selektivita měření (Sato *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2010; Iseki *et al.*, 2018). MRM záznam je velice důležitý pro jednoznačnou identifikaci SL, jak bylo prokázáno v nedávno publikovaném článku Rial *et al.* (2018). V jejich případě nedokázali chromatograficky oddělit stereoizomerní sloučeniny strigol a orobanchol, ale byli schopni je rozlišit pomocí příslušných přechodů MRM. Je třeba poznamenat, že většina SL je analyzována v pozitivní módu ionizace. Jedinou výjimkou je kyselina karlaktonová, která je detekovaná v negativním módu (Iseki *et al.*, 2018). Volba přechodů MRM závisí na složení mobilní fáze a pH. Nízké pH mobilní fáze potlačuje tvorbu sodných nebo draselných aduktů ve prospěch protonovaných molekulárních iontů  $[M+H]^+$  (Sato *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2008, 2009, 2005; Yoneyama *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2016; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Námi zvolené přechody vycházely z automatické MRM optimalizace. Jediný fabacyl acetát poskytoval vyšší intenzitu signálu ve formě protonizovaných molekulových iontů  $[M+H]^+$  ( $405 > 231$  a  $405 > 97$ ), což korespondovalo s prací Rial *et al.*, (2018). V našem případě byla provedena pouze identifikace SL pro stanovení přesné koncentrace jsme nedisponovali potřebnými interními standardy. Doposud byla popsána příprava jen několika značených přirozeně se vyskytujících SL. Obvykle se používají stabilní izotopy  $^{13}\text{C}$  nebo  $^2\text{H}$ , které splňují požadavky kladené na spolehlivost analýzy (Zwanenburg *et al.*, 2016; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Boutet-Mercey částečně vyřešil přípravu značených SL obsahujících na A-kruhu acetylovou funkční skupinu ( $^2\text{H}_3$ -fabacyl a orobanchyl acetát). Alternativou k interním standardům značeným stabilními izotopy může být použití syntetického

analogu SL, GR24 – externí standardizace. Jedná se o sloučeninu strukturně i chemicky blízkou přirozeně se vyskytujícímu SL. Preciznost takového stanovení však ovlivňuje výrazně vyšší stabilita tohoto analogu. V nedávné době byly publikovány pouze dvě studie, které tento přístup popisují (Boutet-Mercey *et al.*, 2018; Rial *et al.*, 2018). Všechny námi identifikované SL korespondují s doposud publikovanou literaturou.

Identifikace pomocí techniky DART-MS nevyžaduje přípravu vzorku. Technika DART-MS je vhodná pro analýzu nízkomolekulárních látek s hmotou  $m/z < 1500$  (Yew, 2019). V minulosti byla úspěšně použita pro studium řady látek např. alkaloidů (Lesiak *et al.*, 2016), silic (Giffen *et al.*, 2017), lipidů (Antal *et al.*, 2016), a mastných kyselin (Cody *et al.*, 2012). Důvodem, proč doposud nenašla širší využití při studiu fytohormonů je jejich nízká koncentrace. Takovéto experimenty vyžadují použití méně dostupných, velmi citlivých hmotnostních spektrometrů. DART-MS je navíc méně vhodný k analýze termolabilních látek, při použití příliš vysoké teploty může dojít k neočekávané fragmentaci, což znemožňuje interpretaci spektra a přesné stanovení hmotnosti intaktních molekul (Cody *et al.*, 2009). V daném uspořádání HR-DART-Orbitrap-MS byla zjištěna přítomnost SL, data byla ověřena pomocí UHPLC-MS/MS. Ve výsledku lze konstatovat, že DART-MS je unikátní metoda, která je schopná velmi rychle (bez zdlouhavé předúpravy vzorku) a efektivně podat informaci o chemickém složení testovaného biologického materiálu.

Další použitou ambientní technikou byla HR-DESI-Orbitrap-MS, která byla použita pro detekci SL, ale hlavním záměrem použití bylo vytvoření 2D mapy prostorové distribuce SL v řezu stonku a kořene. Kritickou částí je zde příprava vzorku. Pro přípravu řezů byl použit vibratom. Úspěšně jsem připravil reprezentativní řezy *V. faba* a *P. sativum*. V ostatních případech jsem nebyl schopen připravit řezy o definované tloušťce, docházelo k deformaci povrchu segmentů pletiva. Dalším pozorovaným problémem bylo smršťování řezů rostlinných pletiv, které bylo způsobeno jeho dehydratací. Jako možné řešení se nabízí otisk segmentu rostlinného pletiva nebo celého orgánu (např. listu). Biologický materiál je lisován pomocí mírného tlaku na porézní teflon při současném zachování prostorového rozložení analyzovaných analytů (Li *et al.*, 2011, 2013, Thunig *et al.*, 2011). V práci Rejšek *et al.*, (2017) byl problém analýzy neplanárních povrchů vyřešen pomocí iontového zdroje s laserovou triangulací. Pohyb iontového zdroje po souřadnicích os xyz umožňuje udržovat konstantní vzdálenost mezi povrchem fixovaného vzorku a sprejovací kapiláry. Pohyb je důkladně snímán pomocí laserového senzoru a následně vyhodnocen tak, aby nedošlo k přímému kontaktu s povrchem vzorku.

Uspořádání HR-DESI-Orbitrap-MS se jeví jako slibný nástroj pro studium fytohormonů. Budoucí výzvou a úkolem je optimalizovat předpřípravu vzorků před samotnou analýzou. Zajištění 2-D prostorové distribuce fytohormonů přináší velice hodnotnou informaci pro biology. Může zodpovědět řadu otázek ohledně transportu látek, jejich regulace a lokalizaci nejen za normálních podmínek.

Dalším z cílů bylo ověřit stabilitu GR24 v různých kultivačních médiích a pufrch, které doposud nebyly testovány. Záměrem bylo zjistit, jak správně skladovat vzorky a časově rozvrhnout experiment, než dojde k významnému poklesu koncentrace či úplnému rozkladu SL. Mezi testovaná kultivační média patřilo Hoaglandovo médium a MS médium, která se často používají pro hydroponickou kultivaci rostlin. V rámci testování byl pozorován maximální úbytek 10 % GR24 v ½ Hoaglandově médiu (250  $\mu\text{M}$  Pi). V případě MS média byl úbytek mezi 3–5 %. Získané výsledky jsou navíc podpořeny další studií, ve které byl testován vliv 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátového pufru s methanolem (3:1; v/v) s poločasem rozkladu 9 h (Rasmussen *et al.*, 2013). Předpokládáme-li, že fosfátové ionty působí jako nukleofilní činidlo stejným způsobem jako ostatní nukleofily, tak jejich přítomnost bude mít značný vliv na chemickou stabilitu přirozeně se vyskytujících SL. Lze tedy konstatovat, že celková koncentrace SL v kořenových exudátech je do značné míry ovlivněna složením média. Hydroponická kultivace rostlin bez Pi je běžně využívána pro zvýšení produkce SL (López-Ráez *et al.*, 2008a; Jamil *et al.*, 2011; Yoneyama *et al.*, 2012). Významný rozdíl v koncentraci produkovaných SL lze pozorovat nejdříve po 24 h od odstranění Pi z média. Avšak stále zůstává nezodpovězená otázka, jestli je zvýšená koncentrace SL důsledkem nedostatku Pi (termín – phosphate starvation) nebo se jedná pouze o eliminaci interferující složky ovlivňující jejich hydrolytickou stabilitu. Další experimenty byly věnovány testování stability SLs ve vybraných pufrch o pH 6,0 a 7,0. Kromě GR24 byl do testování zahrnut i přirozeně se vyskytující 5-deoxystrigol. Záměrem bylo kromě zjištění vhodnosti použití některých pufrů především demonstrovat rozdíl stability mezi syntetickým analogem a přirozeně se vyskytujícím SL. Sledovaný pokles koncentrace GR24 za 24 hodin v pufrch s pH 6,0 (octanový, fosfátový, mravenčanový a citrátový) a pH 7,0 (fosfátový, fosfát-citrátový a MES) byl do 5 %. Výsledky naznačují, že uvedené pufrы jsou vhodné pro krátkodobé skladování a experimenty s GR24. Naopak koncentrace GR24 v pufrch HEPES a Tris-HCl (pH 7,0) poklesla o 15–25 % po 24 hodinách měření. Obě molekuly, HEPES a Tris-HCl, obsahují volný elektronový pár, díky kterému mohou působit jako nukleofily, čímž hydrolyzují SL molekulu, a proto nejsou vhodné pro experimenty se SL.

Výsledky jasně demonstrují nevhodnost použití vybraných pufrů pro studium 5-deoxystrigolu. Jediný vhodný pufr pro experimenty s ním se jeví citrátový pufr, kde byl pozorován pokles koncentrace o 33 % za 96 hodin. Naše data podporují dřívější publikace, kde Akiyama et al., (2010) stanovil pro 5-deoxystrigol poločas rozkladu ( $t_{1/2}$ ) 36 hodin. Dále se stabilitě přirozeně se vyskytujících SL věnovali autoři práce Boyer et al. (2012), kde byly stanoveny  $t_{1/2}$  pro solanakol (48 hodin), respektive solanakylní acetát (96 hodin), ve směsi ethanolu a vody (1: 4; v/v). V další části byl studován mechanismus reakce GR24 s vybranými nukleofily. Nejprve jsem vybral vhodné rozpouštědlo. V něm reakce probíhala dostatečně rychle. GR24 vykazoval vysokou stabilitu v acetonitrilu, acetonu a ethanolu. V roztoku methanolu vykazoval GR24 znatelně nestabilní chování. Během 24 hodin došlo k 24% poklesu koncentrace GR24. Tyto výsledky korespondují s prací Akiyama et al., (2005) a Rasmussen et al., (2013). Poločas rozpadu GR24 byl v přítomnosti benzylaminu a 4-methoxybenzylaminu menší než 3 hodiny. Obě uvedené látky ochotně reagovaly s GR24, zatímco nejpomalejší reakce zahrnovala nukleofily obsahující atom síry (thiofenol, benzyl merkaptan; poločas rozpadu  $\geq 19$  hodin). Příčinou pomalého průběhu reakce byla jejich slabá nukleofilita. Na základě výsledků bylo potvrzeno, že se jedná o adičně-eliminační mechanismus, který byl již v minulosti diskutován a popsán Mangnus a Zwanenburg, 1992. Tento model předpokládá vznik komplexu ABC-Nu. Nukleofil atakuje enol-etherovou vazbu molekuly GR24, přičemž dochází navázání na základní skelet tricyklického laktonu (ABC kruhu) a to za současného oddělení D-kruhu. Stanovené termodynamické parametry reakce naznačují, resp. hodnota logaritmu frekvenčního faktoru ( $\log A$ ), že se ve všech případech jedná o bimolekulární reakci. Navíc záporné hodnoty pro  $\Delta S$  ukazují, že entropie klesá po vytvoření přechodného stavu, což indikuje asociativní mechanismus. Tímto mechanismem tvoří SL a nukleofil jediný aktivovaný komplex, adiční produkt A, který je výsledkem adičně-eliminačního mechanismu. Závěrem experimentu a zakončení kapitoly byl provedeno monitorování produktu nukleofilní reakce GR24 pomocí UHPLC-MS/MS. Bylo pozorována tvorba produktu ABC-Nu, což opět potvrdilo adičně-eliminační mechanismus reakce. Důležité je zmínit, že reakce probíhala v nadbytku nukleofilu, tudíž po vyčerpání substrátu (GR24), přebytek Nu reagoval z již uvolněným D-kruhem. Tohoto výsledku bychom bez použití MS/MS nedosáhli, protože v případě UV záznamu není možné rozeznat UV profil reaktantů od produktů. UHPLC-MS/MS představuje vynikající metodu pro sledování průběhu reakce.

## 4 ZÁVĚR

- Jako modelový organismus pro studium strigolaktonů byly vybrány: bob setý (*V. faba*), hrách setý (*P. sativum*), vikev setá (*V. sativa*) a čírok dvoubarevný (*S. bicolor*).
- Byla testována úspěšnost různých doposud publikovaných protokolů pro izolaci a purifikaci SL z rostlinného pletiva, přičemž nejvyšší hodnoty návratnosti byly dosaženy za současného použití homogenizace a přečištění vzorku pomocí SPE.
- Optimalizovaná metoda UPLC-MS/MS byla úspěšně použita pro identifikaci SL u vybraných rostlinných modelů: bob setý (orobanchol, 5-deoxystrigol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát), hrách setý (orobanchol, 5-deoxystrigol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát), čírok dvoubarevný (5-deoxystrigol, sorgolakton), vikev setá (orobanchol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát).
- DART-HR-MS (přímá analýza v reálném čase) je vhodným nástrojem pro rychlou identifikaci SL. Hlavní výhodou této metody je minimální příprava vzorku. Jen malá část segmentu rostliny (kořen, stonek) byla zavedena přímo do iontového zdroje a použita pro analýzu k získání důvěryhodných výsledků, které byly podpořeny UPLC-MS/MS analýzou.
- DESI-MS přinesla důležitou informaci o prostorovém zastoupení SL ve vybraných rostlinných pletivech.
- Na základě testování stability SL v kultivačních médiích, pufrech a různých rozpouštědlech byla navržena následující pravidla pro experimentální práci s roztoky SL.
  - Zásobní roztoky SL by měli být připraveny v bezvodých rozpouštědlech, jako je například DMF a aceton a skladovány při -20 °C.
  - Kdykoliv je SL rozpuštěn ve vodném roztoku, musí být tento roztok použit do 24 hodin.
  - Některé pufrы jako Tris-HCl a HEPES, jsou nevhodné pro experimenty se SL.
  - Reakce GR24 s nukleofilem probíhala prostřednictvím adičně-eliminačního mechanismu a za současného oddělení D-kruhu (hydroxymethylbutenolidu). Bylo potvrzeno, že se jedná biomolekulární reakci, pro kterou se uplatňuje Michaelova reakce (adice) následovaná eliminační reakcí.

## 5 LITERATURA

- Abe S., Sado A., Tanaka K., Kisugi T., Asami K., Ota S., Kim H.I., Yoneyama K., Xie X., Ohnishi T., Seto Y., Yamaguchi S., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T. (2014). Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in Arabidopsis and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. **111**, 18084-18089.
- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435**, 824–827.
- Akiyama K., Ogasawara S., Ito S., Hayashi H. (2010). Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol*. **51**, 1104-1117.
- Al-Babili S., Bouwmeester H.J. (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu Rev Plant Biol*. **66**, 161–186.
- Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmeester H., Beyer P., Al-Babili S. (2012): The Path from  $\beta$ -Carotene to Carlactone, a Strigolactone-Like Plant Hormone. *Science*. **335**, 1348–1351.
- Antal B., Kuki Á., Nagy L., Nagy T., Zsuga M., Kéki S. (2016). Rapid detection of hazardous chemicals in textiles by direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS). *Anal Bioanal Chem*. **408**, 5189–5198.
- Arite T., Iwata H., Ohshima K., Maekawa M., Nakajima M., Kojima M., Sakakibara H., Kyoizuka J. (2007). DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant J*. **51**, 1019–1029.
- Awad A.A., Sato D., Kusumoto D., Kamioka H., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2006). Characterization of strigolactones for the root parasitic plants Striga and Orobanche, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regul*. **248**, 221-227.
- Babiker A.G.T., Ibrahim N. E., Edwards W. G. (1988). Persistence of GR7 and Striga germination stimulant(s) from Euphorbia aegyptiaca Boiss. in soils and in solutions. *Weed Res*. **28**, 1–6.
- Badu-Tawiah A., Bland C., Campbell D.L., Cooks R.G. (2010). Non-aqueous spray solvents and solubility effects in desorption electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*. **21**, 572–579.
- Bagger C.L., Sørensen H., Sørensen J.C. (1998). High-quality oils, proteins, and bioactive products for food and non-food purposes based on biorefining of cruciferous oilseed crops. In: Gueguen J, Popineau Y (eds). *Plant proteins from European crops*. Berlin: Springer, 272-278.
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J.C., Roux C., Bécard G., Séjalon-Delmas N. (2006). Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *PLoS Biol* **4**, e226.
- Bertin C., Yang X., Weston L.A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*. **67**, 67–83
- Benassi M., Wu C. P., Nefliu M., Ifa D.R., Volny M., Cooks R.G. (2009). Redox transformations in desorption electrospray ionization. *Int J Mass Spectrom*. **280**, 235–240.
- Bennett, T. *et al.* (2016). Strigolactone regulates shoot development through a core signalling pathway. *Biol. Open* **5**, 1806–1820.
- Brewer P.B., Yoneyama K., Filardo F., Meyers E., Scaffidi A., Frickey T., Akiyama K., Seto Y., Dun E. A., Cremer J.E. (2016). LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in Arabidopsis. *PNAS*. **113**, 6301–6306.
- Brooks D.W., Bevinakatti H.S., Powell D.R. (1985). The absolute structure of (+)-strigol. *J Org Chem*. **50**, 3779–3781
- Bonsler A.M., Lynch J., Snapp S. (1996). Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol*. **132**, 281–288
- Booker J., Sieberer T., Wright W., Williamson L., Willett B., Stimberg P., Turnbull C., Srinivasan M., Goddard P., Leyser O. (2005). MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell*. **8**, 443–449.
- Boughton B.A., Thinagaran D., Sarabia D., Bacic A., Roessner U. (2016). Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem Rev*. **15**, 445–488.
- Boutet-Mercey S., Perreau F., Roux A., Clavé G., Pillot J.P., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Mouille G., Rameau C., Boyer F.D. (2018). Validated method for strigolactone quantification by ultra high-

- performance liquid chromatography - electrospray ionisation tandem mass spectrometry using novel deuterium labelled standards. *Phytochem Anal.* **29**, 59-68.
- Bouwmeester HJ., Matušová R., Zhongkui S., Beale MH. (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 358–364.
- Boyer FD., de Saint Germain A., Pillot JP., Pouvreau JB., Chen VX., Ramos S., Stévenin A., Simier P., Delavault P., Beau JM., Rameau C. (2012). Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: Molecule design for shoot branching. *Plant Physiol.* **159**, 1524-1544.
- Butler LG. (1995). Chemical communication between the parasitic weed *Striga* and its crop host: a new dimension of allelochemistry. In: Inderjit, Dakshini, K.M.M. and Einhellig, F.A. eds. *Allelopathy: organisms, processes and applications*. American Chemical Society, Washington, 158-168. ACS Symposium Series no. 582.
- Cabral EC., Mirabelli MF., Perez CJ, Ifa DR. (2013). Blotting assisted by heating and solvent extraction for DESI-MS imaging. *J Am Soc Mass Spectrom.* **24**, 956-965.
- Cai Z., Kastell A, Knorr D, Smetanska I. (2012). Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root culture. *Plant Cell Rep.* **31**, 461-477.
- Cardoso C., Ruyter-Spira C., Bouwmeester HJ. (2011). Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanch* and *Phelipanche* spp. *Plant Sci.* **180**, 414–420.
- Cha S., Zhang H., Ilarsla, HI., Wurtele ES., Brachova L., Nikolau BJ., Yeung ES. (2008). Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Plant J.* **55**, 348-360.
- Cha S., Song Z., Nikolau BJ., Yeung ES. (2009). Direct profiling and imaging of epicuticular waxes on *Arabidopsis thaliana* by laser desorption/ionization mass spectrometry using silver colloid as a matrix. *Anal Chem.* **81**, 2991–3000.
- Chamikhova TV., Gaus K., Lumbroso A., Sanders M., Vincken JP., De Mesmaeker A., Ruyter-Spira CP., Screpanti C., Bouwmeester HJ. (2017). Zealactones. Novel natural strigolactones from maize. *Phytochemistry.* **137**, 123-131.
- Crawford S., Shinohara N., Sieberer T., Williamson L., George G., Hepworth J., Müller D., Domagalska M. A., Leyser O. (2010). Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development (Cambridge, England)* **137**, 2905–2913.
- Cody RB., Laramée JA., Durst HD. (2005). Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem.* **77**, 2297-2302.
- Cody RB. (2009). Observation of molecular ions and analysis of nonpolar compounds with the direct analysis in real-time ion source. *Anal Chem.* **81**, 1101–1107.
- Cody RB., Dane AJ., Dawson-Andoh B., Adedipe EO., Nkansah K. (2012). Rapid classification of White Oak (*Quercus alba*) and Northern Red Oak (*Quercus rubra*) by using pyrolysis direct analysis in real time (DART™) and time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrolysis.* **95**, 134–137.
- Cook CE., Whichard LP., Turner B., Wall ME., Egle GH. (1966). Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science.* **154**, 1189–1190.
- Cook CE., Whichard LP., Turner B., Wall ME., Egle GH. (1969). Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154**, 1189–1190.
- Costa AB., Cooks RG. (2007). Simulation of atmospheric transport and droplet-thin film collisions in desorption electrospray ionization. *Chem Commun.* **38**, 3915–3917.
- Costa AB., Cooks RG. (2008). Simulated splashes: elucidating the mechanism of desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Phys Lett.* **464**, 1–8.
- Davies P. (Ed.) (2004). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer Science & Business Media Press, New York.
- Delaux PM., Xie XN., Timme RE., Puech-Pages V., Dunand C., Lecompte E., Delwiche CF., Yoneyama K., Becard G., Sejalón-Delmas N. (2012). Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytol.* **195**, 857-871.
- Dong Y., Lin B., Malitsky B., Rogachev I., Aharoni A., Kaftan F., Svatoš A., Franceschi P. (2016). Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: a review. *Front Plant Sci.* **60**, 1-16.

- Erickson J., Schott D., Reverri T., Muhsin W., Rutledge T. (2001). GC-MS Analysis of hydrophobic root exudates of Sorghum and implications on the parasitic plant *Striga asiatica*. *J Agric Food Chem.* **49**, 5537–5542.
- Fleet C., Williams M., (2011). Gibberellins. Teaching tools in plant biology: lecture notes. *Plant Cell*. 110. [www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc](http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc)
- Flematti GR., Scaffidi A., Waters MT., Smith SM. (2016). Stereospecificity in strigolactone biosynthesis and perception. *Planta*. **243**, 1361–1373.
- Foo E., Bullier E., Goussot M., Foucher F., Rameau C., Beveridge CA. (2005). The Branching Gene RAMOSUS1 Mediates Interactions among Two Novel Signals and Auxin in Pea. *The Plant Cell*. **17**, 464–474.
- Foo E., Davies NW. (2011). Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta*. **234**, 1073–1081.
- Foo E., Yoneyama K., Hugill CJ., Quittenden LJ., Reid JB. (2013). Strigolactones and the regulation of pea symbioses in response to nitrate and phosphate deficiency. *Mol Plant*. **6**, 76–87.
- Giffen JE., Lesiak AD., Dane AJ., Cody RB., Musah RA. (2017). Rapid species-level identification of salvias by chemometric processing of ambient ionisation mass spectrometry-derived chemical profiles. *Phytochem Anal.* **28**, 16–26.
- Gobena D., Shimels M., Rich PJ., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. (2017). Mutation in sorghum LOW GERMINATION STIMULANT 1 alters strigolactones and causes *Striga* resistance. *PNAS*. **114**, 4471–4476.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun EA., Pillot JP., Letisse F., Matusová R., Danoun S., Portais J.-C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge CA., Rameau C., Rochange SF. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*. **455**, 189–194.
- Green FM., Salter TL., Gilmore IS., Stokes P., O'Connor G. (2010). The effect of electrospray solvent composition on desorption electrospray ionisation (DESI) efficiency and spatial resolution. *Analyst*. **135**, 731–737.
- Grenz JH., Sauerborn J. (2007). Mechanisms limiting the geographical range of the parasitic weed *Orobancha crenata*. *Agr. Ecosyst. Environ.* **122**, 275–281.
- Halouzka R., Tarkowski P., Zwanenburg B., Zeljkovic SC. (2018). Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles. *Pest Manage Sci.* **74**, 896–904.
- Hamiaux C., Drummond RSM., Janssen BJ., Ledger SE., Cooney JM., Newcomb RD., Snowden KC. (2012). DAD2 Is an  $\alpha/\beta$  Hydrolase Likely to Be Involved in the Perception of the Plant Branching Hormone, Strigolactone. *Curr Biol*. **22**, 2032–2036.
- Harrison MJ. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* **59**, 19–42.
- Harrison STL. (2011). Cell disruption. In: Moo-Young M (ed) *Comprehensive biotechnology*, 2nd edn. Elsevier, Oxford, 619–640.
- Hayward A., Stenberg P., Beveridge C., Leyser O. (2009). Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiol.* **151**, 400–412.
- Heyman H. M., Dubery I. A. (2015). The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review. *Phytochem Rev.* **14**, 1–20.
- Hillman JR. (1978). *Isolation of plant growth substances*. Cambridge University Press, London.
- Hu, Z. *et al.* (2014). Strigolactone and cytokinin act antagonistically in regulating rice mesocotyl elongation in darkness. *Plant Cell Physiol.* **55**, 30–41.
- Hu, Q. *et al.* (2017). DWARF14, a receptor covalently linked with the active form of strigolactones, undergoes strigolactone-dependent degradation in rice. *Front Plant Sci.* **8**, 1935.
- Humphrey AJ, Galster AM, Beale MH. (2006). Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? *Nat Pro Rep.* **23**, 592–614.
- Ifa DR., Manicke NE., Rusine AL., Cooks RG. (2008). Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **22**, 503–510.
- Ifa D., Srimany A., Eberlin LS., Naik HR., Bhat V., Cooks RG., Thalappil P. (2011). Tissue imprint imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Method.* **3**, 1910–1912.
- Iseki M., Shida K., Kuwabara K., Wakabayashi T., Mizutani M., Takikawa H., Sugimoto Y. (2018). Evidence for species-dependent biosynthetic pathways for converting carlactone to strigolactones in plants. *J Exp Bot.* **69**, 2305–2318.

- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I, Kyoizuka J. (2005). Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* **46**, 79-86
- Jamil M., Chamikhova T., Cardoso C., Jamil T., Ueno K., Verstappen F., Asami T., Bouwmeester H. J. (2011). Quantification of the relationship between strigolactones and *Striga hermonthica* infection in rice under varying levels of nitrogen and phosphorus. *Weed Res.* **51**, 373–385.
- Jiang L., Liu X., Xiong G. *et al.* (2013). DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature.* **504**, 401–405.
- Johnson AW., Roseberry G. and Parker C. (1976). A novel approach to *Striga* and *Orobanch*e control using synthetic germination stimulants. *Weed Res.* **16**, 223-227.
- Johnson AW., Gowada G., Hassanali A., Knox J., Monaco S., Razavi Z., Rosebery G. (1981). The preparation of synthetic analogues of strigol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.* **10**, 1734–1743.
- Kameoka H., Kyoizuka J. (2018). Spatial regulation of strigolactone function. *J Exp Bot.* **69**, 2255–2264.
- Kannan C., Zwanenburg B. (2014). A novel concept for the control of parasitic weeds by decomposing germination stimulants prior to action. *Crop Prot.* **61**, 11–15.
- Kapulnik Y., Delaux PM., Resnick N., Mayzlish-Gati E., Wininger S., Bhattacharya C., Séjalon-Delmas N., Combier JP., Bécard G., Belausov E., Beeckman T., Dor E., Hershenhorn J., Koltai H. (2011). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta.* **233**, 209–216.
- Kim HI., Kisugi T., Khetkam P., Xie X., Yoneyama K., Uchida K., Yokota T., Nomura T., McErlean C. S., Yoneyama K. (2014). Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*. *Phytochemistry.* **103**, 85–88.
- Kisugi T., Xie X. N., Kim H. I., Yoneyama K., Sado A., Akiyama K., Hayashi H., Uchida K., Yokota T., Nomura T., Yoneyama K. (2013). Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*. *Phytochemistry.* **87**, 60-64.
- Kohlen W., Chamikhova T., Liu Q., Bours R., Domagalska M. A., Beguerie S., Verstappen F., Leyser O., Bouwmeester H., Ruyter-Spira C. (2011). Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**, 974–98
- Koltai H., Dor E., Hershenhorn J., Joel DM., Weininger S., Lekalla S., Shealtiel H., Bhattacharya C., Eliahu E., Resnick N. (2010). Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. *J Plant Growth Regul.* **29**, 129-136.
- Koltai H. (2014). Receptors, repressors, PINs: a playground for strigolactone signaling. *Trends Plant Sci.* **19**, 727–733.
- Korte AR., Song Z., Nikolau BJ., Lee YJ. (2012). Mass spectrometric imaging as a high-spatial resolution tool for functional genomics: tissue-specific gene expression of TT7 inferred from heterogeneous distribution of metabolites in *Arabidopsis* flowers. *Anal Methods* **4**, 474–481.
- Kořistka (2016). Strigolaktony-nová skupina fytohormonů. <https://theses.cz/id/mjxgey/metadataTheses.xml>
- Lesiak AD., Cody RB., Ubukata M., Musah RA. (2016) Direct analysis in real time high resolution mass spectrometry as a tool for rapid characterization of mind-altering plant materials and revelation of supplement adulteration—The case of Kanna. *Forensic Sci Int.* **260**, 66–73.
- Li B., Bjarnholt N., Hansen SH., Janfelt C. (2011). Characterization of barley leaf tissue using direct and indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **46**, 1241–1246.
- Lin H., Wang R., Qian Q., Yan M., Meng X., Fu Z., Yan C., Jiang B., Su Z., Li J., Wang Y. (2009). DWARF27, an Iron-Containing Protein Required for the Biosynthesis of Strigolactones, Regulates Rice Tiller Bud Outgrowth. *Plant Cell.* **21**, 1512–1525.
- López-Bucio J., Hernandez-Abreu E., Sanchez-Calderon L., Nieto-Jacobo MF., Simpson J., Herrera-Estrella L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* **129**, 244–56.
- López-Ráez JA., Chamikhova T., Gómez-Roldán V., Matusova R., Kohlen W., De Vos R., Verstappen F., Puech-Pages V., Bécard G., Mulder P., Bouwmeester H. (2008a). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol.* **178**, 863-874.
- López-Ráez JA., Chamikhova T., Mulder P., Kohlen W., Bino R., Levin I., Bouwmeester H. (2008b). Susceptibility of the tomato mutant high pigment-2dg (hp-2dg) to *Orobanch*e spp. infection. *J Agric Food Chem.* **56**, 6326–6332.

- López-Ráez JA., Kohlen W., Charnikhova T., Mulder P., Undas A. K., Sergeant M. J., Verstappen F., Bugg TDH., Thompson AJ., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. (2010). Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytol.* **187**, 343–354.
- Lostun D., Perez C. J., Licence P., Barrett DA., Ifa DR. (2015). Reactive DESI-MS imaging of biological tissues with dicationic ion-pairing compounds. *Anal. Chem.* **87**, 3286–3293.
- Mach J. (2015). Strigolactones regulate plant growth in Arabidopsis via degradation of the DWARF53-like proteins SMXL6, 7, and 8. *Plant Cell.* **27**, 3022–3023.
- Mangnus EM., Zwanenburg B. (1992). Tentative molecular mechanism for germination stimulation of Striga and Orobanche seeds by strigol and its synthetic analogs. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1066–1070.
- Manicke NE., Wiseman JM., Ifa DR., Cooks RG. (2008). Desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry and tandem mass spectrometry (MS/MS) of phospholipids and sphingolipids: ionization, adduct formation, and fragmentation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 531–543.
- Matušová R., Rani K., Verstappen FWA., Franssen MCR., Beale MH., Bouwmeester HJ. (2005). The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic Striga and Orobanche spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway. *Plant Physiol.* **139**, 920–934.
- Merbach W., Mirus E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulze J. (1999). Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *J Plant Nutr Soil Sci.* **162**, 373–383.
- Mori K. (1998). Semiochemicals: synthesis, stereochemistry and bioactivity. *Eur J Org Chem.* 1479–1489.
- Muller T., Oradu S., Ifa DR., Cooks RG., Krautler B. (2011). Direct plant tissue analysis and imprint imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* **83**, 5754–5761.
- Mwakaboko AS., Zwanenburg B. (2011a). Strigolactone analogs derived from ketones using a working model for germination stimulants as a blueprint. *Plant Cell Physiol.* **52**, 699–715.
- Mwakaboko AS., Zwanenburg B. (2011b). Single step synthesis of strigolactone analogues from cyclic keto enols, germination stimulants for seeds of parasitic weeds. *Bioorg Med Chem.* **19**, 5006–5011.
- Nakamura H. *et al.* (2013). Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat Commun.* **4**, 2613.
- Navare AT., Mayoral JG., Nouzova M., Noriega FG., Fernández FM. (2010). Rapid direct analysis in real time (DART) mass spectrometric detection of juvenile hormone III and its terpene precursors. *Anal Bioanal Chem.* **398**, 3005–3013.
- Nefkens G. H. L., Thuring J. W. J. F., Beenackers M. F. M., Zwanenburg B. (1997). Synthesis of a Phthaloylglycine-Derived Strigol Analogue and Its Germination Stimulatory Activity toward Seeds of the Parasitic Weeds Striga hermonthica and Orobanche crenata. *J Agri Food Chem.* **45**, 2273–2277.
- Nemes P., Barton AA., Vertes A. (2009). Three-dimensional imaging of metabolites in tissues under ambient conditions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* **81**, 6668–6675.
- Nomura S., Nakashima H., Mizutani M., Takikawa H., Sugimoto Y. (2013). Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of Striga gesnerioides seeds. *Plant Cell Rep.* **32**, 829–838.
- Paciorek, T. *et al.* (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature.* **435**, 1251–1256.
- Parker C. (2009). Observations on the current status of Orobanche and Striga problems worldwide. *Pest Manag Sci.* **65**, 453–59.
- Parker C. (2012). Parasitic weeds: A world challenge. *Weed Sci.* **60**, 269–276.
- Pavan S., Schiavulli A., Marcotrigiano AR., Bardaro N., Bracuto V., Ricciardi F., Charnikhova T., Lotti C., Bouwmeester H., Ricciardi L. (2016). Characterization of low-strigolactone germplasm in pea (Pisum sativum L.) resistant to crenate broomrape (Orobanche crenata Forsk.). *Mol Plant-Microbe Interact.* **29**, 743–749.
- Proust H., Hoffmann B., Xie X., Yoneyama K., Schaefer DG., Yoneyama K., Nogué F., Rameau C. (2011). Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss Physcomitrella patens. *Dev.* **138**, 1531–1539.
- Rasmussen A., Heugebaert T., Matthys C., Van Deun R., Boyer FD, Goormachtig S., Stevens C., Geelen D. (2013). A fluorescent alternative to the synthetic strigolactone GR24. *Mol Plant* **6**, 100–112.
- Rani K., Zwanenburg B., Sugimoto Y., Yoneyama K., Bouwmeester HJ. (2008). Biosynthetic considerations could assist the structure elucidation of host plant produced rhizosphere signalling compounds (strigolactones) for arbuscular mycorrhizal fungi and parasitic plants. *Plant Physiol Bioch.* **46**, 617–626.

- Rejšek J., Vrkoslav V., Pokorný V., Příbyl V., Cvačka J. (2017). Ion source with laser triangulation for ambient mass spectrometry of nonplanar samples. *Anal Chem.* **89**, 11452–9.
- Rial C., Varela RM., Molinillo JM. G., López-Ráez JA., Macías FA. (2018). A new UPLC-MS/MS method for the direct determination of strigolactones in root exudates and extracts. *Phytochem Anal.* **30**, 110–116.
- Rothman J. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* **372**, 55–63.
- Roycewicz P. a Malamy JE. (2012) Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on Arabidopsis root and shoot system growth in laboratory assays. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **367**, 1489–1500.
- Rubiales D., Fernández-Aparicio M., Wegmann K., Joel D. (2009). Revisiting strategies for reducing the seedbank of Orobanche and Phelipanche spp. *Weed Res.* **49**, 23–33.
- Ruyter-Spira C., Kohlen W., Chamikhova T., van Zeijl A., van Bezouwen L., de Ruijter N., Cardoso C., Lopez-Raez J. A., Matusova R., Bours R., Verstappen F., Bouwmeester H. (2011). Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol.* **155**, 721–734.
- de Saint Germain A., Ligerot, Y., Dun, E.A. et al. (2013). Strigolactones stimulate internode elongation independently of gibberellins. *Plant Physiol.* **163**, 1012–1025
- de Saint Germain A., Clave G., Badet-Denisot MA. et al. (2016). An histidine covalent receptor and butenolide complex mediates strigolactone perception. *Nat Chem Biol.* **12**, 787–794.
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA., Estelle M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth, *Nat Chem Biol.* **5**, 301–307.
- Santner A, Estelle M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling, *Nature.* **459**, 1071–1078.
- Sato D., Awad AA., Chae SH., Yokota T., Sugimoto Y., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2003). Analysis of strigolactones, germination stimulants for striga and orobanche, by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agri Food Chem.* **51**, 1162–1168.
- Sato D., Awad AA., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2005). Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants Striga and Orobanche, produced by cotton. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**, 98–102
- Scaffidi A. Waters MT., Bond CS., Dixon K. W., Smith SM., Ghisalberti EL., Flematti GR. (2012). Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorg Med Chem Lett.* **22**, 3743–3746.
- Seto Y., Sado A., Asami K., Hanada A., Umehara M., Akiyama K., Yamaguchi S. (2014). Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *PNAS.* **111**, 1640–1645.
- Siame BA., Weerasuriya Y., Wood K., Ejeta G., Butler LG. (1993). Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *J Agri Food Chem.* **41**, 1486–1491.
- Shinohara N., Taylor C. & Leyser O. (2013). Strigolactone can promote or inhibit shoot branching by triggering rapid depletion of the auxin efflux protein PIN1 from the plasma membrane. *PLoS Biol.* **11**, e1001474.
- Snowden KC., Simkin AJ., Janssen BJ., Templeton KR., Loucas HM., Simons JL. Karunairetnam S., Gleave AP, Clark DG., Klee HJ. (2005). The Decreased apical dominance 1/petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell.* **17**, 746–759.
- Soundappan I., Bennett T., Morffy N., Liang Y., Stanga JP., Abbas A., Leyser O., Nelson DC. (2015). SMAX1-LIKE/D53 family members enable distinct MAX2-dependent responses to strigolactones and karrikins in Arabidopsis. *The Plant Cell.* **27**, 3143–3159.
- Su Y., Xia S., Wang R., Xiao L. (2017). “Phytohormonal quantification based on biological principles,” in *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Eds. Li J., Li C., Smith S. M. (London, UK: Academic Press), 431–470.
- Sun H., Tao J., Liu S., Huang S., Chen S., Xie X., Yoneyama K., Zhang Y. and Xu G. (2014). Strigolactones are involved in phosphate-and nitrate-deficiency-induced root development and auxin transport in rice. *J Exp Bot.* **65**, 6735–6746.
- Sun H., Tao J., Hou M., Huang, S. Chen, S., Chen S. (2015). A strigolactones signal is required for adventitious root formation in rice. *Ann Bot.* **115**, 1155–1162.
- Takats Z., Wiseman JM., Cooks RG. (2005). Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J Mass Spectrom.* **40**, 1261–1275.

- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski. P., Turečková V., Grúz, J. *et al.* (2014). Quo vadis plant hormone analysis? *Planta*. **240**, 55–76.
- Thunig J., Hansen S. H., Janfelt C. (2011). Analysis of secondary plant metabolites by indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem*. **83**, 3256–3259.
- Trabelsi I., Yoneyama K., Abbas Z., Amri M., Xie X., Kisugi T., Kim I., Kharrat M., Yoneyama K. (2017). Characterization of strigolactones produced by *Orobancha foetida* and *Orobancha crenata* resistant faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes and effects of phosphorous, nitrogen, and potassium deficiencies on strigolactone production. *S Afr J Bot*. **108**, 15–22.
- Tsuchiya, Y. *et al.* (2010). A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone. *Nat Chem Biol*. **6**, 741–749.
- Tsuchiya Y., McCourt P. (2012). Strigolactones as small molecule communicators. *Mol Biosyst*. **8**, 464–469.
- Ueno K., Furumoto T., Umeda S., Mizutani M., Takikawa H., Batchvarova R., Sugimoto Y. (2014). Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry*. **108**, 122–128.
- Ueno K., Fujiwara M., Nomura S., Mizutani M., Sasaki M., Takikawa H., & Sugimoto Y. (2011). Structural Requirements of Strigolactones for Germination Induction of *Striga gesnerioides* Seeds. *J Agri Food Chem*. **59**, 9226–9231.
- Ueno K., Sugimoto Y., Zwanenburg B. (2015a). The genuine structure of aletrrol: end of a long controversy. *Phytochem Rev*. **14**, 835–847.
- Ueno K., Ishiwa S., Nakashima H., Mizutani M., Takikawa H., Sugimoto Y. (2015b). Regioselective and stereospecific hydroxylation of GR24 by *Sorghum bicolor* and evaluation of germination inducing activities of hydroxylated GR24 stereoisomers toward seeds of *Striga* species. *Bioorg Med Chem*. **23**, 6100–6110.
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojuka J., Yamaguchi S. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*. **455**, 195–200.
- Umehara M., Hanada A., Magome H., Takeda-Kamiya N., Yamaguchi S. (2010). Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant Cell Physiol*. **51**, 1118–1126.
- Venter A., Sojka PE., Cooks, RG. (2006) Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. **78**, 8549–8555.
- Venter A., Nefliu M., Cooks RG. (2008). Ambient desorption ionization mass spectrometry. *Trends Anal Chem*. **27**, 284–290.
- Volny M., Venter A., Smith SA., Pazzi M., Cooks RG. (2008). Surface effects and electrochemical cell capacitance in desorption electrospray ionization. *Analyst*. **133**, 525–531.
- Walker TS., Bais HP., Grotewold E., Vivanco JM. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol*. **132**, 44–51.
- Wang L., Smith S.M. (2016). Strigolactones redefine plant hormones. *Sci. China Life Sci*. **59**, 1083–1085.
- Wang Y., Bouwmeester HJ. (2018). Structural diversity in the strigolactones. *J Exp Bot*. **69**, 2219–2230
- Waters MT., Brewer PB., Bussell JD., Smith SM., Beveridge CA. (2012a). The Arabidopsis Ortholog of Rice DWARF27 Acts Upstream of MAX1 in the Control of Plant Development by Strigolactones. *Plant Physiol*. **159**, 1073–1085.
- Waters MT., Bussell JD., Jost R. (2012b). Arabidopsis Hydroponics and Shoot Branching Assay. *Bio-protocol*. **2**(19), e264
- Weston DJ. (2010). Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst*. **135**, 661–668.
- Xie X., Kusumoto D., Takeuchi Y., Yoneyama K., Yamada Y., Yoneyama K. (2007). 2'-Epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *J Agric Food Chem*. **55**, 8067–8072
- Xie X., Yoneyama K., Kusumoto D., Yamada Y., Yokota T., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2008). Isolation and identification of aletrrol as (+)-orobanchyl acetate, a novel germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry*. **69**, 427–431.
- Xie X., Yoneyama K., Harada Y., Fusegi N., Yamada Y., *et al.* (2009). Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry*. **70**, 211–15.

- Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K. (2010). The Strigolactone Story. *Annu Rev Phytopathol.* **48**, 93–117.
- Xie X., Yoneyama K., Kisugi T. *et al.* (2013). Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Mol Plant.* **6**, 153–163.
- Xie X. (2016). Structural diversity of strigolactones and their distribution in the plant kingdom. *J Pestic Sci.* **41**, 175–180.
- Xie X., Kisugi T., Yoneyama K., Nomura T., Akiyama K., Uchida K., Yokota T., McErlean CSP., Yoneyama K. (2017). Methyl zealactonoate, a novel germination stimulant for root parasitic weeds produced by maize. *Pestic Sci.* **42**, 58–61.
- Yao R., Ming Z., Yan L. *et al.* (2016). DWARF14 is a non-canonical hormone receptor for strigolactone. *Nature.* **536**, 469–473.
- Yao R., Wang F., Ming Z., Du X., Chen L., Wang Y., Zhang W., Deng H., Xie D. (2017). ShHTL7 is a non-canonical receptor for strigolactones in root parasitic weeds. *Cell Res.* **27**, 838–841.
- Yew J. (2019). Natural Product Discovery by Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Mass Spectrom.* **8**.
- Yokota T., Sakai H., Okuno K., Yoneyama K., Takeuchi Y. (1998). Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry.* **49**, 1967–1973.
- Yoneyama K., Yoneyama K., Takeuchi Y., Sekimoto H. (2007a). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta.* **225**, 1031–1038.
- Yoneyama K., Xie X., Kusumoto D., Sekimoto H., Sugimoto Y., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2007b). Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta.* **227**, 125–132.
- Yoneyama K., Xie X., Sekimoto H., Takeuchi Y., Ogasawara S., *et al.* (2008). Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol.* **179**, 484–494.
- Yoneyama K., Awad AA., Xie X., Yoneyama K., Takeuchi Y. (2010). Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1095–1103.
- Yoneyama K., Xie X., Kisugi T., Nomura T., Sekimoto H., Yokota T., Yoneyama K. (2011). Characterization of strigolactones exuded by *Asteraceae* plants. *Plant Growth Regul.* **65**, 495–504.
- Yoneyama K., Xie X., Kim H. I., Kisugi T., Nomura T., Sekimoto H., Yokota T., Yoneyama K. (2012). How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta.* **235**, 1197–1207.
- Yoneyama K., Xie X., Kisugi T., Nomura T., Yoneyama K. (2013). Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta.* **238**, 885–894.
- Yoneyama K., Arakawa R., Ishimoto K., Kim H. I., Kisugi T., Xie X., Nomura T., Kanampiu F., Yokota T., Ezawa T., Yoneyama K. (2015). Difference in *Striga*-susceptibility is reflected in strigolactone secretion profile, but not in compatibility and host preference in arbuscular mycorrhizal symbiosis in two maize cultivars. *New Phytol.* **206**, 983–989.
- Yoneyama K., Xie X., Nomura T., Yoneyama K. (2016). Extraction and measurement of strigolactones in sorghum roots. *Bio-protocol.* **6**, e1763.
- Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T. (2018a). Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? *J Exp Bot.* **69**, 2231–2239.
- Yoneyama K., Mori N., Sato, T., Yoda A., Xie X., Okamoto M., Iwanaga M., Ohnishi T., Nishiwaki H., Asami, T. and Yokota, T. (2018b). Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX 1 homologs in strigolactone biosynthesis. *New Phytol.* **218**, 1522–1533.
- Zhang Y., Chen H. (2010). Detection of saccharides by reactive desorption electrospray ionization (DESI) using modified phenylboronic acids. *Int J Mass Spectrom.* **289**, 98–107.
- Zhang Y., van Dijk A. D., Scaffidi A., Flematti GR., Hofmann M., Charnikhova T., Verstappen F., Hepworth J., van der Krol S., Leyser O., Smith S. M., Zwanenburg B., Al-Babili S., Ruyter-Spira C., Bouwmeester HJ. (2014). Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat Chem Biol.* **10**, 1028–1033.
- Zhang J., Mazur E., Balla, J. *et al.* (2020). Strigolactones inhibit auxin feedback on PIN-dependent auxin transport canalization. *Nat Commun.* **11**, 3508.

- Zhou F., Lin Q., Zhu L., Ren Y., Zhou K. *et al.* (2013). D14-SCFD3-dependent degradation of D53 regulates strigolactone signalling. *Nature*. **504**, 406–410.
- Zwanenburg B., Mwakaboko AS., Reizelman A., Anilkumar G., Sethumadhavan D. (2009). Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag Sci.* **65**, 478–491.
- Zwanenburg B., Pospíšil T. (2013). Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Mol Plant*. **6**, 38–62.
- Zwanenburg B., Čavar Zeljković S., Pospíšil T. (2016). Synthesis of strigolactones, a strategic account. *Pest Manag Sci.* **72**, 15–29.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**4-DO** 4-deoxyorobanchol  
**ACN** acetonitril  
**AM** arbuskulární mykorhiza  
**APCI** chemická ionizace za atmosférického tlaku  
**BFA** brefeldin A  
**CCD** karotenoid štěpící dioxygenasy  
**CLA** kyselina karlaktonová  
**DAD** detektor diodového pole  
**DART** přímá analýza v reálném čase  
**DESI** desorpční ionizace elektrosprejem  
**DMF** 2,2-dimethylformamid  
**DMSO** dimethyl sulfoxid  
**ESI** ionizace elektrosprejem  
**EtOAc** ethyl acetát  
**GC** plynová chromatografie  
**GR5** syntetický analog strigolaktonů  
**GR7** syntetický analog strigolaktonů  
**GR24** syntetický analog strigolaktonů  
**HEPES** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina  
**HR** vysokorozlišovací  
**HRMS** vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie  
**LC** kapalinová chromatografie  
**LC-MS/MS** kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií  
**LOD** limity detekce  
**LOQ** limit kvantifikace  
**MALDI** laserovou desorpce a ionizace za účasti matrice  
**MeCLA** methylkarlaktonová kyselina  
**MES** 2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina  
**MRM** selektivní monitorování více reakcí  
**MS** hmotnostní spektrometrie  
**MS médium** Murashige a Skoog médium  
**MSI** hmotnostní zobrazovací spektrometrie  
**NAA** kyselina 1-naftyloctová  
**NMR** nukleární magnetická rezonance  
**Nu** nukleofil  
**OS** orobanchol synthasa  
**Pi** fosfát  
**PIN** výtokové přenosové proteiny  
**RP** reverzní fáze  
**SPE** extrakce na pevné fázi  
**SL** strigolakton  
**TLC** Chromatografie na tenké vrstvě  
**TMSi** tetramethylsilyl  
**WT** rostlina divokého typu („wild type“)  
**UHPLC** ultraúčinná kapalinová chromatografie

## 7 PŘÍLOHY

### ***Příloha 1 – manuskript prvoautorské publikace a doplňující materiály***

Halouzka R., Zeljkovic SC., Klejdus B., Tarkowski P., Hajný J. Introducing Mass Spectrometry Ambient Techniques in Strigolactone Analysis. Nepublikováno.

### ***Příloha 2 – prvoautorská publikace***

Halouzka R., Zeljkovic SC., Klejdus B., Tarkowski P. (2020). Analytical methods in strigolactone research. *Plant Methods*. **16**,76.

### ***Příloha 3 – prvoautorská publikace***

Halouzka R., Tarkowski P., Zwanenburg B., Zeljkovic SC. (2018). Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles. *Pest Manage Sci*. **74**,896-904.

### ***Příloha 4 – spoluautorská publikace***

Zhang J., Mazur E., Balla J., Gallei M., Kalousek P., Medvedova Z., Li Y., Prát T., Vasileva M., Reinöhl V., Procházka S., Halouzka R., Tarkowski P., Luschnig C., Brewer PB., Friml J. (2020). Strigolactones inhibit auxin feedback on PIN-dependent auxin transport canalization. *Nat Commun*. **11**, 3508.

***Příloha 1 – manuskript prvoautorské publikace a doplňující materiály***

Halouzka R., Zeljkovic SC., Klejdus B., Tarkowski P., Hajný J. Introducing Mass Spectrometry Ambient Techniques in Strigolactone Analysis. Nепublikováno.

## Introducing Mass Spectrometry Ambient Techniques in Strigolactone Analysis

Rostislav Halouzka<sup>a\*</sup>, Sanja Čavar Zeljković<sup>a,b</sup>, Bořivoj Klejdus<sup>c,d</sup>, Jakub Hajný<sup>e,f</sup> and Petr Tarkowski<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Central Laboratories and Research Support, Faculty of Science, Palacky University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup> Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Central Laboratories and Research Support, Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Šlechtitelů 29, 78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> CEITEC – Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Chemistry and Biochemistry – Mendel University in Brno, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic

<sup>e</sup> Institute of Science and Technology (IST), Klosterneuburg, Austria

<sup>f</sup> Laboratory of Growth Regulators, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

\*Corresponding author. E-mail: halouzka.rostislav@upol.cz; halouzka@seznam.cz

### Abstract

Strigolactones (SLs) are structurally diverse class of plant hormones which control plant development, stimulate symbiotic interaction with arbuscular mycorrhizal fungi, and promote a germination of root parasitic plants. All of these features make them potentially powerful tool in the variety of agriculture fields. For this purpose, a vast knowledge of genetics, biochemistry, and cell biology accompanied by elaborated analytical methods is required. In recent years, a huge progress of analytical methods was made for detection and quantification of SLs. However, all of them involve tedious sample preparation. Therefore, we applied ambient techniques with sample ionization out of a mass spectrometer – DART, DESI – to identify SLs in several plant samples. Whereas DART significantly simplifies sample preparation, DESI allows analysis of SLs 2D distribution in plant tissue. Collectively, both approaches open a new avenue for testing the spatiotemporal distribution of plant hormones within diverse plant tissue. Moreover, the presence of SLs, particularly 5-deoxystrigol, orobanchol, orobanchyl acetate, sorgolactone and, fabacyl acetate, in four different plant tissues was confirmed by conventional

UHPLC-MS/MS method. In addition, three the most used isolation protocols were used and compared.

**Keywords:** Strigolactones, MS ambient techniques, DART, DESI, UHPLC-MS/MS.

## 1. Introduction

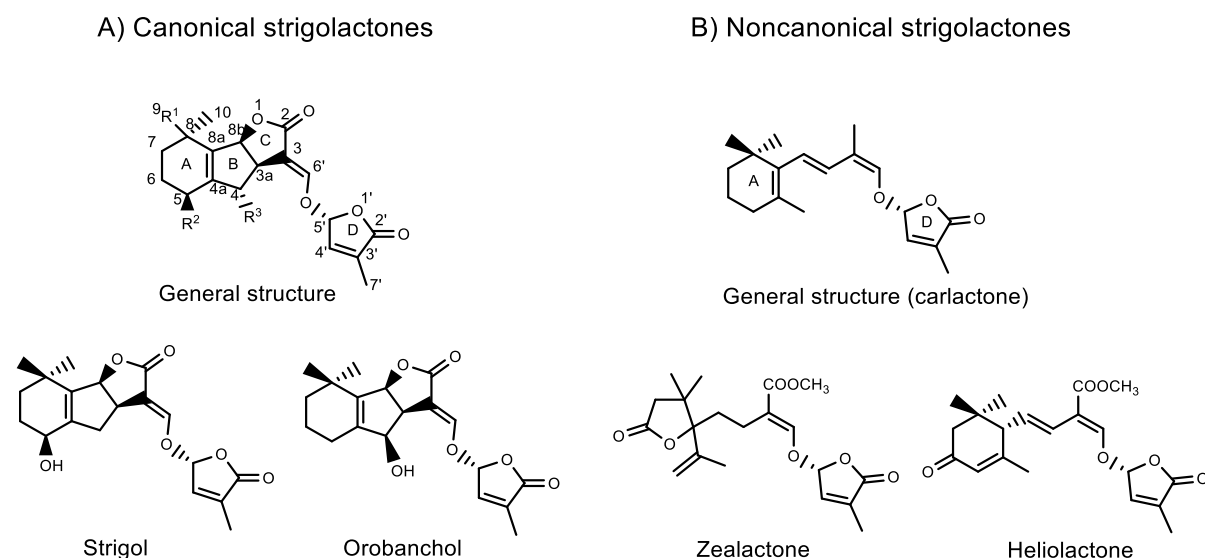
Strigolactones (SL), as plant hormones, regulate various development processes by interacting and communicating ("cross-talk") in signalling pathways with other phytohormones (Matusova et al., 2005; Xie et al., 2010; Al-Babili and Bouwmeester, 2015). Firstly, they were described as secondary metabolites that mediate the germination of a parasitic plant belonging to *Striga* and *Orobanch*e families (Cook et. al., 1966). On the other hand, they serve as important signalling molecules for inducing branching of the fungal hyphae by participating in process of arbuscular mycorrhiza (Akiyama et. al., 2005).

SLs occur in the entire plant kingdom, from moss-like plant or charales to higher plants such as *Pinus* or *Eucalyptus* species (Xie et al., 2010; Delaux et al., 2012). They are produced by root system from where are either released into the rhizosphere in form of exudates, or transported to the above-ground part of the plant (Kolhen et al., 2011; Foo et al., 2013). Individual plant species produce SLs in different structural variations and extremely low concentration corresponding to 15-30 pg/day/plant (Sato et al., 2005; Cardoso et al., 2011, Xie et al., 2013).

Therefore, precise sample preparation (isolation and purification) together with highly sophisticated instrumental equipment are the most important factors that influence the chemical analysis of the SLs (Kohlen et. al., 2013). Generally, SLs levels were analysed in plants that are grown in a hydroponic system. The timeframe of SLs production is controlled via a defined amount of nutrients in the medium. SLs are released into cultivation medium and collected by adsorption on active charcoal or directly extracted by liquid/liquid extraction with ethyl acetate (Awad et. al., 2006; Yoneyama et al., 2007; Delaux et al., 2012). In addition, harvested root tissue or shoots are processed either by maceration or extraction of grinded tissue (Yoneyama et al., 2012; Yoneyama et al., 2013, Yoneyama et al., 2016; Boutet-Mercey et al., 2018). Target molecules migrate into an appropriate solvent, and in the next step are purified via SPE (solid-phase extraction). The SPE suppresses negative effects of interferences with compounds occurring in much higher concentration than SLs and helps to obtain sufficient recoveries.

Chemically, SLs can be divided into two groups, canonical and non-canonical (Figure 1). The canonical is formed from the tricyclic ABC-lactone ring which is attached via an enol-ether

linkage to a D-ring (hydroxylated butenolide). The second group, non-canonical SLs are lacking the A, B or C ring, but still there is the enol-ether linkage to D ring, which is essential for their biological activities (Zwanenburg and Pospíšil, 2013; Yoneyama et al., 2018).



**Figure 1.** Chemical structures of selected strigolactones.

The most used analytical technique for detection and quantification of SLs is ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), (Sato et al., 2003, Xie et. al., 2010). The MS/MS methods are useful tools that are capable of simultaneous quantification and identification of metabolites with diverse properties of phytohormone group/s.

However, ambient mass spectrometry is a relatively novel technique that is used for the identification of compounds in their native environment. The most common are DART-MS (direct analysis in real-time) and DESI-MS (desorption electrospray ionization), (Venter et al., 2008; Weston, 2010). DART surpasses another MS techniques by rapid analysis in the open laboratory environment with minimal or no sample preparation at all (Venter et al., 2008). This technique has a huge potential to be used as a new screening tool for any phytohormones in plant tissue including SLs. A small part of a tissue can be placed directly into the ion source and analysed in a few seconds.

DESI belongs to the mass spectrometry imaging (MSI) techniques, which provides information about the spatial distribution of the target analyte/s. DESI employs charged solvent stream under a certain angle to ionize analytes from the surface and introduces them into mass analyser. Samples can be scanned along x and y axis which allows obtaining 2D distribution map of analyte/s.

Therefore, the MS ambient techniques DART and DESI were used in this study as novel tools for phytohormones analysis. DART is presented as a screening method for rapid identification of SLs without any sample preparation, and DESI as a powerful method for determination of the spatial distribution of target molecules. These two ambient methods can become an important instrumental setup to get profound knowledge about SLs effect on plant development. The SLs content was confirmed by UHPLC-MS/MS method. Moreover, this work compares different protocols of isolation and purification of SLs from four different plant tissues (*Vicia faba*, *Vicia sativa*, *Pisum sativum*, and *Sorghum bicolor*) analysed via UHPLC-MS/MS.

## **2. Material and Methods**

### *2.1.Plants cultivation and growth conditions*

*Vicia faba* and *Pisum sativum* were obtained from the breeding station Selgen a.s. in Chlumec nad Cidlinou, Czech Republic, while *Vicia sativa* and *Sorghum bicolor* were obtained from the collection of genetic resources of the gene bank of Crop Research Institute v.v.i. Praha Ruzyně, Czech Republic.

Plant seedlings (*Vicia faba* L. cv. Merkur; *Vicia sativa* L. cv. Ebona; *Pisum sativum* L. cv. Terno; *Sorghum bicolor* L. cv. Ruzrok) were grown in a greenhouse in pots with vermiculite. The temperature range was 15-24 °C, with light/dark 16/8 hours periods. The medium was periodically refreshed every 2-3 days. Control medium consisted of tap water (0-5<sup>th</sup> day), and later of half-strength-modified Hoagland's nutrient solution (5<sup>th</sup>-21<sup>st</sup> day). Test medium consisted of tap water (0-5<sup>th</sup> day), half-strength-modified Hoagland's nutrient solution (5<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> day), and then half-strength-modified Hoagland's nutrient solution without phosphorus (14<sup>th</sup>-21<sup>st</sup> day). Plants were harvested after 3 weeks.

### *2.2.Chemicals and reagents*

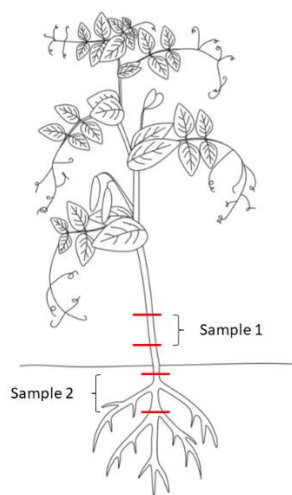
Hexane, heptane, and ethyl acetate were of HPLC grade, and were purchased from Chromservis (Praha, Czech Republic). Methanol and acetonitrile (ACN) were of LC-MS grade (Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO, USA). Fresh deionized water (Milli-Q) was used throughout the study. Strigolactones (5-deoxystrigol, orobanchol, and strigol) were purchased from Olchemim (Olomouc, Czech Republic). Sorgolactone, fabacyl acetate, orobanchyl acetate, and GR24 were kindly provided from Professor Binne Zwanenburg, Radboud University Nijmegen Nijmegen, The Netherlands.

### *2.3.DART analysis*

The determination was carried out via DART-Standardized Voltage and Pressure Adjustable (SVPA) ion source with DIP-it holder module (IonSense, Saugus, USA) coupled to Orbitrap (HRMS – high resolution mass spectrometry) Elite mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) through the interface evacuated by the diaphragm pump. The DART ion source was operated in the positive ion mode with helium ionizing gas at the pressure 0.65 MPa. The beam was heated in the temperature range 300 °C to 350 °C and the grid electrode voltage was in the range of 300 - 350 V. The parameters of the mass spectrometer were following: capillary voltage 50 V, tube lens voltage 100 V, skimmer voltage 18 V and capillary temperature in the range of 300 - 350 °C. All DART mass spectra were acquired over a mass range of  $m/z$  50-500. Xcalibur software (Thermo Fischer Scientific, Germany) with DART web-based module was used for the instrument operation, data acquisition and processing. DART analysis was performed in positive ion mode where monoisotopic masses of protonated molecular ions were for carlactone ( $m/z$  - 303.1954), orobanchol ( $m/z$  - 347.1489), 5-deoxystrigol ( $m/z$  - 331.1540), fabacyl acetate ( $m/z$  - 405.1543), orobanchyl acetate ( $m/z$  - 389.1594), and sorgolactone ( $m/z$  - 317.1383).

#### *2.4. Sample preparation for DESI-MSI*

The selection of plants was carried out according to their physiological conditions e. g. size of stems/roots. *Vicia faba* and *Pisum sativum* appeared to be the most suitable for DESI-MSI. Segments of the stems and primary roots were cut into approximately 15 mm size, and their location is showed by Figure 2. Subsequently, plant segments were mounted to a solution of 4% agarose at 38 °C. Agarose solidification was maintained in the perpendicular position. Then, cubes of approximately 1 cm<sup>3</sup> were cut and glued onto a sample hold attached to the vibratome. Cross sections were prepared on the vibratome (Leica VT1000S, Leica Biosystems, Germany). Cutting thickness ranged 50 - 400 µm. The integrity of the incisions was checked under a 10× magnification microscope (BX50, Olympus, Japan).



**Figure 2.** Selected plant from *Fabaceae* family (*V. sativa*). The localisation of sections: stem (Sample 1) and primary root (Sample 2).

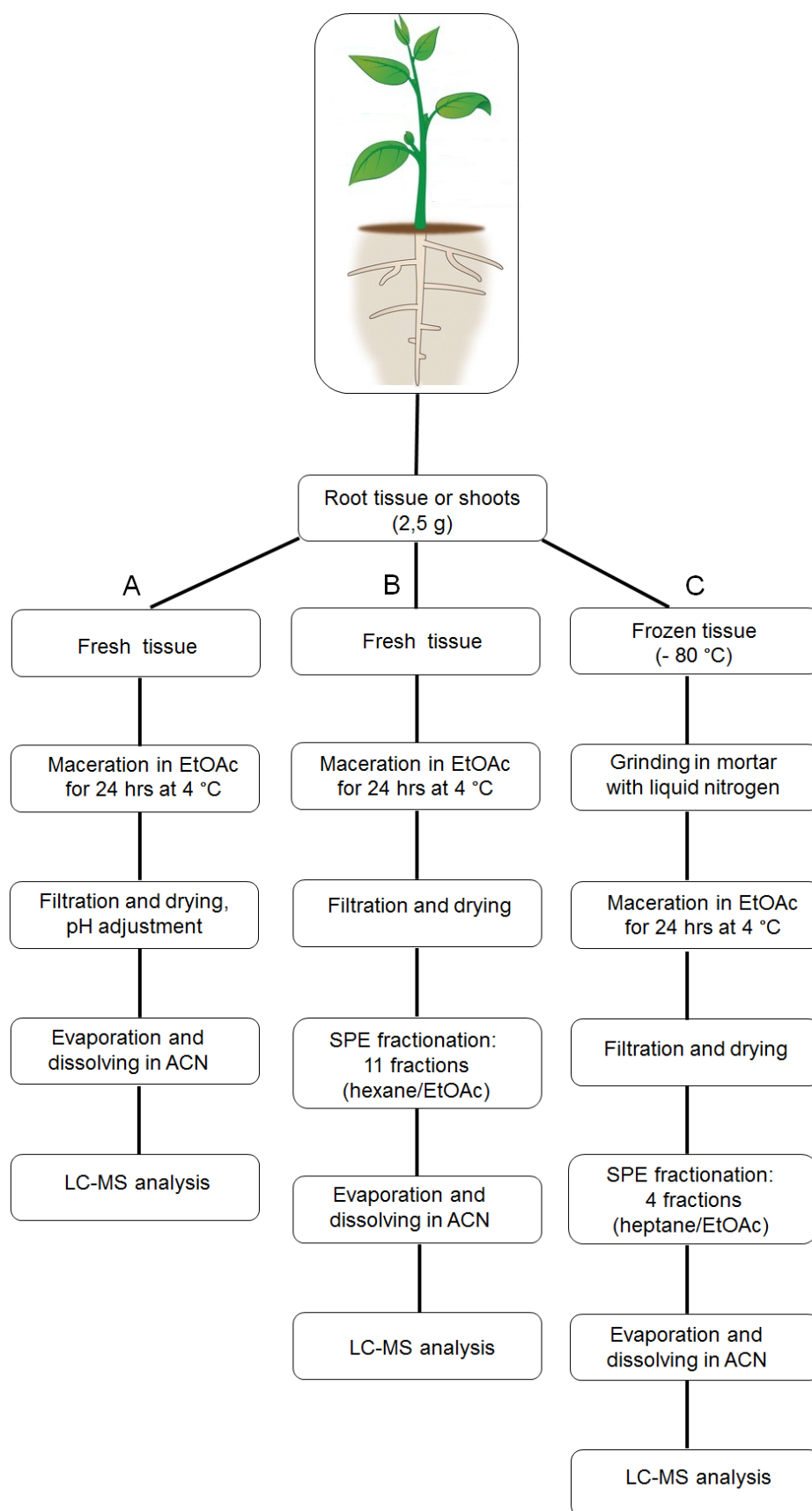
### 2.5. DESI analysis

DESI imaging analysis was performed using an OrbiTrap Elite (Thermo Scientific, San Jose, CA) with a DESI-2D ion source (Prosolia, Indianapolis, IN). Samples were fixed to the glass slides (Prosolia, Indianapolis, IN) by doubled-side tape. Imaging experiments were performed by continuously scanning the surface in the x-direction and stepping in the y-direction (moving opposite to the direction of the spray) at the end of each line. Spraying liquid (80% methanol / 0.2% acetic acid mixture, v/v) at flow rate 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , scanning velocity 65  $\mu\text{m}/\text{s}$  and a spray impact angle of  $65^\circ$  was used. Data were acquired in the mass range  $m/z$  300 - 450. Typical time of the analysis was less than 100 min. The obtained data were processed by the mean of the BioMap software and two-dimensional ion images were created. Parameters of the MS analysis were optimised to following values: nebulizer pressure ( $\text{N}_2$ ): 7 bar, capillary heating:  $350^\circ\text{C}$ , spray voltage: 5 kV, lens voltage: 60 V, ion injection time: 400 ms. Two microscans were carried out for each pixel. DESI-MSI analysis was performed in positive ion mode in form of sodium adducts for carlactone ( $m/z$  - 325.1774), orobanchol ( $m/z$  - 369.1308), 5-deoxystrigol ( $m/z$  - 353.1359), fabacyl acetate ( $m/z$  - 427.1363), orobanchyl acetate ( $m/z$  - 411.1414) and sorgolactone ( $m/z$  - 339.1202).

### 2.6. Sample preparation for UHPLC-MS/MS analysis

Isolation and purification of SLs from roots were performed by three different methods found in the literature (Yoneyama et al., 2016; Kisugi et al. 2013; Boutet-Mercey et al., 2018). All steps are summarized in Figure 3. A 2.5 g of root tissues of 3 weeks old plants were used in all

three protocols, and 7.5 mL of freshly distilled ethyl acetate containing 0.1 nmol of internal standard (GR24 or sorgolactone). A Supelclean LC-Si (500 mg/3 mL) cartridges (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) were used for SPE.



**Figure 3.** Isolation of strigolactones from plant roots. A - Yoneyama et al. (2016); B - Kisugi et al. (2013), and C - Boutet-Mercey et al. (2018).

## 2.7.UHPLC-MS/MS

Purified extracts were analysed on a Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japan) coupled with an MS-8050 (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japan). Chromatographic separation was performed with an AQUILITY BEH C18 analytical column ( $50 \times 2.1$  mm;  $1.7 \mu\text{m}$ ; Waters, Milford, MA, USA), under the following conditions: column temperature  $40^\circ\text{C}$ , flow rate  $0.50\text{ mL/min}$ . The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B) with elution as follows: 40% B for 1 min, 60% B 4.00 min, to 100% over 6.00 min, isocratic 100% B for 0.5 min, with gradient to 40% B for 0.5 min and stabilized at this condition for 3.0 min. The mass spectra were obtained via electrospray ionization in positive mode with the following operating parameters: capillary voltage  $-3000\text{ V}$ ; interface voltage  $4\text{ kV}$ ; full scan  $50\text{--}500\text{ m/z}$ ; interface temperature  $300^\circ\text{C}$ , heating and drying gas flow  $10\text{ L/min}$ ; nebulizing gas flow  $3\text{ L/min}$ . The MS/MS spectra of the protonated molecular ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and sodium adducts  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  were acquired. Strigolactones were identified by the comparison of the retention times ( $R_t$ ) and MRM channels corresponding to authentic standards. Multiple reaction monitoring (MRM) transitions, as well as collision energies (CE) were optimized for each analyte, and data are summarized in Table 1. Software LabSolutions 5.72 (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japan) was used for processing the data.

**Table 1.** MRM conditions for endogenous strigolactones and GR24.

| Compound           | MRM (CE)                    |                             |                             |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                    | Quantifier                  | Qualifier 1                 | Qualifier 2                 |
| Orobanchol         | 368.80 > 325.20<br>(-13 eV) | 368.80 > 272.10<br>(-16 eV) | 368.80 > 239.00<br>(-24 eV) |
| 5-Deoxystrigol     | 352.80 > 256.15<br>(-18 eV) | 352.80 > 241.15<br>(-23 eV) | -                           |
| Sorgolactone       | 339.20 > 242.20<br>(-17 eV) | 339.20 > 227.05<br>(-21 eV) | -                           |
| Strigol            | 369.20 > 271.75<br>(-20 eV) | 369.20 > 257.15<br>(-24 eV) | 369.20 > 351.00<br>(-13 eV) |
| GR24               | 299.00 > 97.00<br>(-22 eV)  | 299.00 > 281.10<br>(-20 eV) | 299.00 > 185.05<br>(-9 eV)  |
| Fabacyl acetate    | 405.10 > 97.00<br>(-30 eV)  | 405.10 > 231.00<br>(-20 eV) | 405.10 > 345.20<br>(-15 eV) |
| Orobanchyl acetate | 411.00 > 254.00<br>(-15 eV) | 411.00 > 239.00<br>(-20 eV) | -                           |

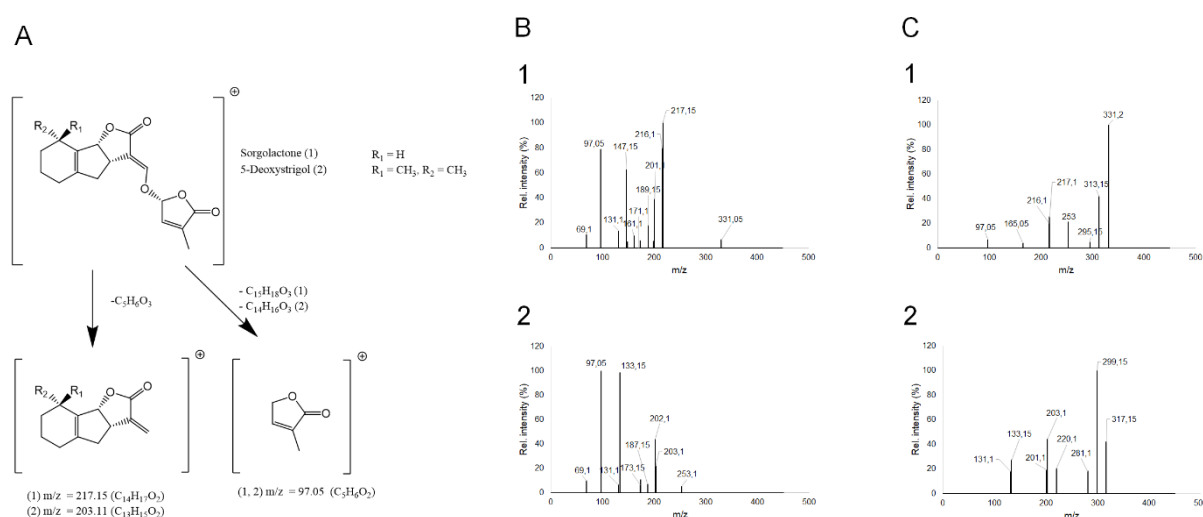
### 3. Results and Discussion

#### 3.1. DART-HRMS analysis of strigolactones

Plant material for DART analysis was cultivated in phosphate deficient and/or with half-strength Hoagland medium (Waters et al., 2012; Charnikhova et al., 2017). A small part of root tissue (1 × 0.5 cm) was inserted with a tweezer into ion source to acquire mass spectra, from which calculated masses were extracted (Table 2). In all cases, only protonated molecular ions were observed. The values of the theoretical masses of strigolactones analytes are presented in the Experimental section. The mass accuracy was less than 5 ppm for all analysed strigolactones. Referring to the previously published data, selected SLs were already found in few members of *Fabaceae* and *Poaceae* families (Awad et al., 2006; Yoneyama et al., 2008, Xie et al., 2008; Gomez-Roldan et al., 2008; Foo and Davies et al., 2011; Boutet-Mercey et al., 2018), and results presented here confirm those previously published findings. SLs were detected in both roots and stems for *Fabaceae* family (*P. satium*, *V. faba* and *sativa*) and *Poaceae* family (*S. bicollor*), (Table 2). However, no SLs were detected in leaves, which is in the agreement with available literature. A limitation of the DART technique is an inability to distinguish isomers, e. g. orobanchol, strigol, and sorgomol (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>). Hence, for *Sorghum*

*bicolor*, it cannot be clarified whether orobanchol or sorgomol is detected. Fortunately, by optimized UHPLC-MS/MS method it is possible to distinguish these geometrical isomers (see UHPLC-MS/MS section below).

In addition, even ESI-MS/MS and DART are different MS approaches, primarily in the mode of ionization of analyte, both techniques provide different mass spectra of target molecules, but with same fragmentation pattern and spectral characteristics. An example was presented in Figure 4 for 5-deoxystrigol and sorgolactone. Selected protonated ions of 5-deoxystrigol (217.15 -  $C_{14}H_{17}O_2$  and 97.05 -  $C_5H_5O_2$ ) and sorgolactone (133.15 -  $C_{10}H_{13}$ , 97.05 -  $C_5H_5O_2$ ) were predominantly observed for both approaches and are in agreement with previously published data. Mohamed et al. (2018) used these masses as MRM channels for quantification of strigolactones in sorghum root exudates. The typical losses of protonated butenolide with mass 97.05 were characteristic for both molecules in both MS techniques (Cavar et al., 2015).



**Figure 4.** MS collision spectra of (1) 5-deoxystrigol and (2) sorgolactone obtained by two different MS techniques.

A) Fragmentation patterns. B) Collision spectra obtained via ESI-MS/MS (CE, -20 eV). C) Collision obtained via DART-HRMS (CE, -18 eV).

**Table 2.** Measured mass ( $m/z$ ) of endogenous SLs detected in various plant species using DART-HRMS.

| Plant species          | Compound           | Root           |                | Stem           |                |
|------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                        |                    | Mass ( $m/z$ ) | Accuracy (ppm) | Mass ( $m/z$ ) | Accuracy (ppm) |
| <i>Vicia faba</i>      | Orobanchol         | 347.14975      | 2.405308       | 347.15048      | 4.508152       |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 331.15482      | 2.476189       | 331.15488      | 2.657374       |
|                        | Fabacyl acetate    | 405.15483      | 1.076133       | -              | -              |
|                        | Orobanchyl acetate | 389.15986      | 0.976463       | -              | -              |
|                        | Sorgolactone       | -              | -              | -              | -              |
|                        | Carlactone         | 303.19617      | 2.305443       | 303.19443      | 3.433429       |
| <i>Vicia sativa</i>    | Orobanchol         | 347.14929      | 1.080228       | -              | -              |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 331.15462      | 1.872241       | 331.15485      | 2.566782       |
|                        | Fabacyl acetate    | 405.15521      | 2.014047       | -              | -              |
|                        | Orobanchyl acetate | 389.15998      | 1.284820       | -              | -              |
|                        | Sorgolactone       | -              | -              | -              | -              |
|                        | Carlactone         | 303.19605      | 1.909659       | 303.19601      | 1.777731       |
| <i>Pisum sativum</i>   | Orobanchol         | 347.14957      | 1.886798       | 347.15044      | 4.392927       |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 331.15463      | 1.902438       | 331.15497      | 2.929151       |
|                        | Fabacyl acetate    | 405.15469      | 0.730586       | -              | -              |
|                        | Orobanchyl acetate | 389.16012      | 1.644570       | -              | -              |
|                        | Sorgolactone       | -              | -              | -              | -              |
|                        | Carlactone         | 303.19635      | 2.899120       | 303.19662      | 3.789634       |
| <i>Sorghum bicolor</i> | Orobanchol         | 347.14978      | 2.491726       | 347.15024      | 3.816806       |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 331.15497      | 2.929151       | 331.15509      | 3.291520       |
|                        | Fabacyl acetate    | -              | -              | -              | -              |
|                        | Orobanchyl acetate | -              | -              | -              | -              |
|                        | Sorgolactone       | 317.13901      | 2.081111       | 317.13966      | 4.130689       |
|                        | Carlactone         | 303.19601      | 1.777731       | 303.19446      | 3.334483       |

This paper reports the very first use of DART-OrbiTrap for the screening of phytohormones, and this system has been proven to be a fast and sensitive method for the identification of SLs without any sample preparation. This approach was found to be appropriate for SLs, which are chemically very unstable and produced in extremely low

concentrations, and we are certain that it might be suitable for screening of any other class of plant hormones. Only a part of the plant tissue (e. g. root, leaf, stem) is sufficient for analysis of molecule/s of interest. DART-OrbiTrap has already established a method for rapid identification and characterization of a wide spectrum of secondary metabolites and pharmaceutical drugs which are presented in significantly higher quantities than any of phytohormones (Chernetsova et al., 2012; Srbek et al., 2014).

### 3.2.DESI analysis

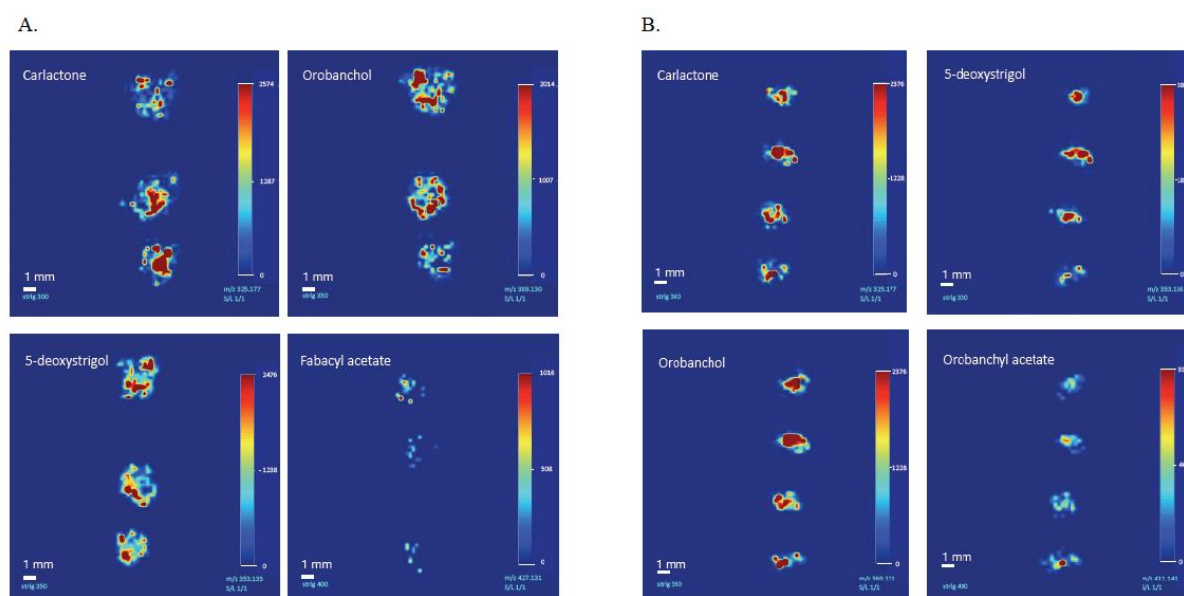
Another MS ambient approach used with reduced sample preparation was DESI coupled with Orbitrap. To get a stable signal with good sensitivity, parameters such as spraying solvent composition, the angle of spraying capillary and speed of scanning were optimized. In contrast to DART, DESI was performed on sections of plant tissue. Interestingly, sodium adducts  $[M+Na]^+$  of SLs were the most abundant in the spectrum. This might be explained by the different nature of ionization compared to DART, as DESI ionization is similar with electrospray ionization where single-charge sodium and potassium adducts are commonly observed. Calculated masses are presented in Table 3. Similarly, the errors (mass accuracy) obtained via DART-OrbiTrap were mostly below 1 ppm. Values of mass accuracy are connected to the concentration level of target compounds in plant tissue. In short, lower values of mass accuracy indicate a higher amount of analyte in the examined sample. It was found that estimated values of mass accuracy for all canonical SLs from root tissue were predominantly lower than the section of stems. This might be explained by the fact that canonical SLs are occurring in approximately 1000 times lower levels in shoots or even are usually below the limit of detection according to mass spectrometry data (Yoneyama et al., 2007; Umehara et al., 2010; Xie et al., 2015). On the other hand, carlactone level in plant tissues is several times higher compared to the levels of canonical strigolactones and is not affected by phosphorus starvation (Yoneyama et al., 2012; Seto and Yamaguchi, 2014), and it fits with presented data, where the mass accuracy for both cases (root and stem) is estimated by similar values. Moreover, a big advantage of DESI is a possibility to obtain the two-dimensional spatial distribution of molecule/s of interest. This approach was tested on sections of *Vicia faba* and *Pisum sativum* since these provide a well-defined structure important for quality scanning (Figure 5). Despite, the number of future advantages of DESI, many limitations are occurring in MSI analysis. The most crucial step in DESI is sample preparation. Without appropriate sample handling, the sufficient spatial resolution and abundance of targets molecules cannot be determined (Grassl et al., 2011; Kaspar et al., 2011; Peukert et al., 2012; Spengler, 2014, Dong

et al., 2016). Simple, handling is the most crucial step for preparation of plant tissue for DESI approach, as only an appropriate sample preparation can maintain the origin, distribution and abundance of the molecules, ensuring high quality signals and sufficient spatial resolution (Grassl et al., 2011; Kaspar et al., 2011; Peukert et al., 2012; Spengler, 2014). Moreover, when we compare phytohormones (like strigolactones) with some secondary metabolites by MSI, they are relatively more unstable, occurring in extremely low amounts, decomposed through exposure to light, heat or pH conditions (Lee et al., 2012, Halouzka et al., 2018), oxidized or degraded via enzymatic and chemical processes or migrated to other plant compartments/tissues through diffuse during cross sections or sample fixation (Lee et al., 2012, Dong et al., 2016).

However, our attitude to DESI is multifaceted positive. Despite limitations and contras, many studies are presenting DESI approach for plant tissue is more challenging than for mammal tissue. Firstly, soft ionization techniques represented by DESI hard to penetrate the cuticles of higher plants (Thunig et al., 2011). Moreover, cell wall represents an impartial barrier which decreased a success of extraction efficiency of target molecules. After cross or longitudinal sections, samples were very fast dehydrated because of sublimation of water and started to be a shrink. This process was hardly affected by morphological changes of sample surface exhibiting by a mismatch between optical image and presumed MS image. Originally, planar sections became non-planar. Non-planar sections are inappropriate for MSI due to inaccurate determination of spatial distribution and have an influence on analyte ionization process (Cha et al., 2008; Benassi et al., 2009; Takahashi et al., 2015; Dong et al., 2015).

In present study, optimization of DESI approach required testing of cross sections of stems and primary roots with a various time of preparation (6 months, 2 weeks, 24 hrs). The sample was stored under vacuum in desiccator prior analysis. Cross sections were prepared at minimum 2 weeks in advance and were exhibited a higher mass accuracy of target compounds (above 5 ppm) or even compounds were not observed (data are not shown). The time delay between single preparation and measurement plays a key role in DESI imaging. Itself section of samples and their storage can be provided by different MSI-compatible embedding mediums or via vacuum sealing. On the other hand, phytohormones like strigolactones are sensitive to nucleophiles (e. g. methanol), and can be easily hydrolysed in aqueous solution, plus dispersing of plant juice during the cutting process has an influence on their stability too. Due to these factors, samples were prepared on a vibratome and mounted on glass slides via double slide tape to prevent any contamination. The 2-D maps of SL spatial distribution in *V. faba* and *P. sativum* (Figure 5, root tissue) showed that strigolactones are not only concentrated in xylem parts, i.e. they are found in different concentrations on entire surface of the slice. The reason

might be due to the fact that non-planar surface is affecting ionization efficiency and therefore it is difficult to estimate strigolactone maxima in analysed tissue. Moreover, the timeframe of the imaging process could have influence on the quality of the obtained data too, i.e. reduced signal intensity was observed in the samples that are analysed later. An imprinting of freshly cut plant tissue without any chemical modification should give more reliable results (Li et al., 2011, 2013, Thunig et al., 2011). This approach should provide planar surface and therefore enhanced ionization efficiency with higher spatial resolution. To conclude, presented DESI-OrbiTrap technique has potential to be novel method for imaging of the phytohormones and thereby providing valuable information about their distribution during various developmental stages, or stress conditions (salinity, nutrient deficiency, drought, etc.) and hint to the supposed mode of action and transport. Additionally, utilization of DESI would be a great supporting technique to confocal microscopy data about phytohormones localization (auxin – DR5<sub>rev</sub>::GFP, cytokinin – TCSn::GFP).



**Figure 5.** 2-D scans of spatial distribution of selected SLs in root tissue of *V. faba* (A) and *P. sativum* (B).

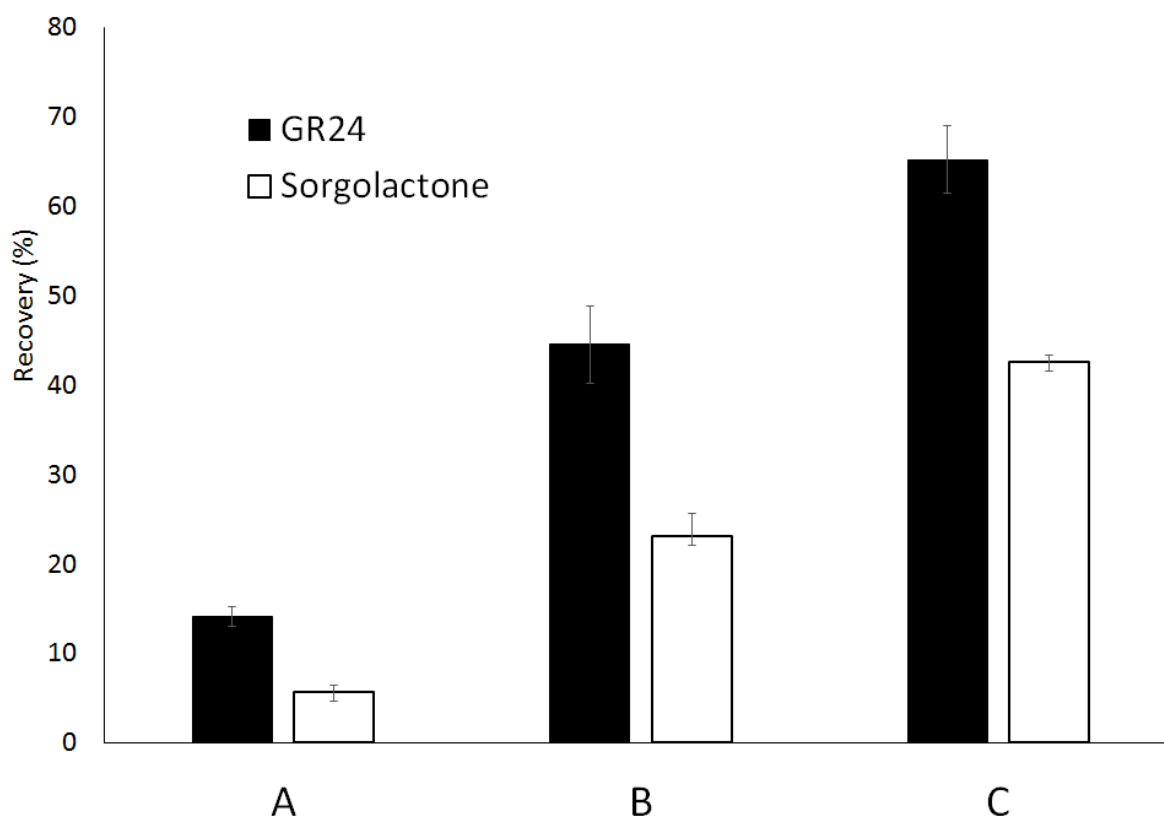
**Table 3.** Measured masses (m/z) of endogenous SLs detected in various plant species using DESI.

| Plant species | Compound | Root       |                | Stem       |                |
|---------------|----------|------------|----------------|------------|----------------|
|               |          | Mass (m/z) | Accuracy (ppm) | Mass (m/z) | Accuracy (ppm) |

|                        |                    |           |          |           |          |
|------------------------|--------------------|-----------|----------|-----------|----------|
| <i>Vicia faba</i>      | Orobanchol         | 369.13089 | 0.081272 | 369.13068 | 0.568904 |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 353.13629 | 0.976961 | 353.13746 | 4.290133 |
|                        | Fabacyl acetate    | 427.13644 | 0.236458 | 427.13607 | 0.629775 |
|                        | Orobanchyl acetate | 411.14127 | 0.374567 | 411.14088 | 1.323146 |
|                        | Sorgolactone       | -         | -        | -         | -        |
|                        | Carlactone         | 325.17743 | 0.043053 | 325.17749 | 0.227568 |
| <i>Vicia sativa</i>    | Orobanchol         | 369.13089 | 0.731448 | 369.13097 | 0.948174 |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 353.13620 | 0.722102 | 353.13493 | 2.874247 |
|                        | Fabacyl acetate    | 427.13647 | 0.306694 | 427.13625 | 0.208364 |
|                        | Orobanchyl acetate | 411.14146 | 0.087561 | 411.14190 | 1.157752 |
|                        | Sorgolactone       | -         | -        | -         | -        |
|                        | Carlactone         | 325.17734 | 0.233719 | 325.17740 | 0.049204 |
| <i>Pisum sativum</i>   | Orobanchol         | 369.13062 | 0.731448 | 369.13083 | 0.568904 |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 353.13586 | 0.240701 | 353.13461 | 3.780414 |
|                        | Fabacyl acetate    | 427.13637 | 0.072576 | 427.13632 | 0.044482 |
|                        | Orobanchyl acetate | 411.14091 | 1.250178 | 411.13988 | 3.755399 |
|                        | Sorgolactone       | -         | -        | -         | -        |
|                        | Carlactone         | 325.17735 | 0.202966 | 325.17737 | 0.141461 |
| <i>Sorghum bicolor</i> | Orobanchol         | 369.13074 | 0.325088 | 369.13092 | 0.812720 |
|                        | 5-Deoxystrigol     | 353.13599 | 0.127430 | 353.13529 | 1.854810 |
|                        | Fabacyl acetate    | -         | -        | -         | -        |
|                        | Orobanchyl acetate | -         | -        | -         | -        |
|                        | Sorgolactone       | 339.12061 | 0.928874 | 339.12113 | 2.462253 |
|                        | Carlactone         | 325.17746 | 0.135311 | 325.17763 | 0.658102 |

### 3.3.Isolation of SLs for UHPLC-MS/MS analysis

In order to estimate the best conditions for isolation and purification of SLs from root tissue, three recently published protocols were used in this study: A) Yoneyama et al. (2016), B) Kisugi et al. (2013) and C) Boutet-Mercey et al. (2018), (Figure 3). The 3 weeks old *V. faba* was used in these tests, and the results of recoveries are summarized in Figure 6. Two compounds were used as internal standard, GR24, a synthetic SL analogue, and natural SL sorgolactone which is not endogenous for *V. faba* (Yoneyama et al. 2008), both in the concentration of 0.1 nmol.



**Figure 6.** Recoveries of GR24 (■) and sorgolactone (□) in three tested SL isolation and purification protocols. A - Yoneyama et al. (2016); B - Kisugi et al. (2013); C - Boutet-Mercey et al. (2018).

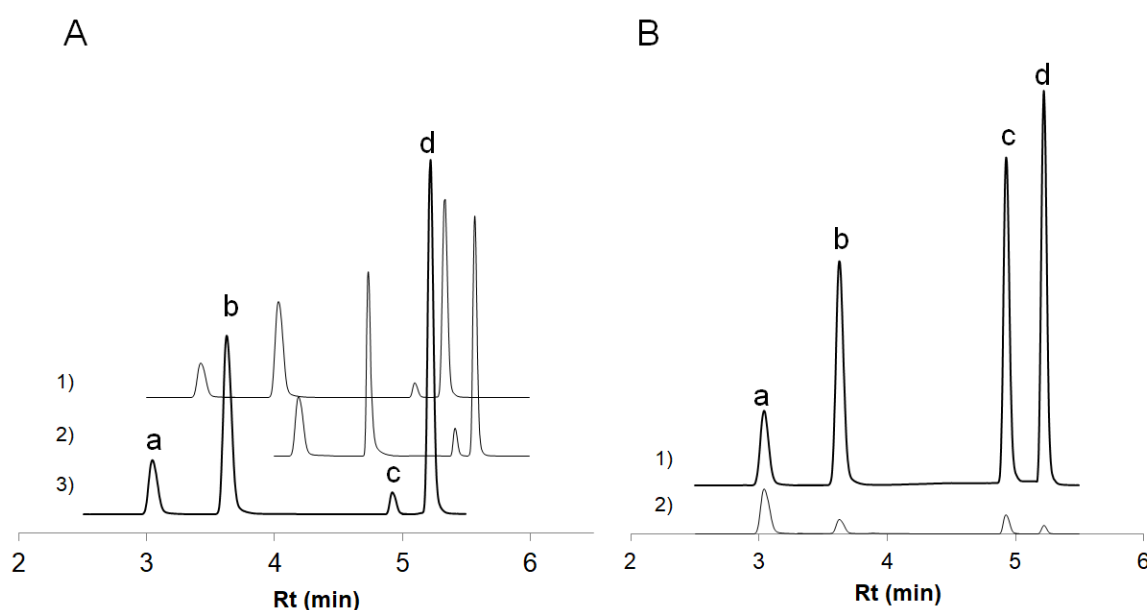
Yoneyama et al. (2016) optimized isolation protocol for quantification of sorgomol and 5-deoxystrigol, the major SLs in sorghum roots. Isolation is based on cutting the fresh roots, maceration within 24 hrs in ethyl acetate, and LC-MS/MS analysis. On contrary, Kisugi et al. (2013) and Boutet-Mercey et al. (2018) used solid phase extraction (SPE) to purify the crude extract prior LC-MS/MS analysis. Presented results clearly show that SPE cannot be avoided in isolation of SLs. According to presented data, the lowest recoveries ( $14.13 \pm 1.08$  % for GR24, and  $5.60 \pm 0.88$  % for sorgolactone) were obtained using the protocol of Yoneyama et al. (2016), i.e. LC-MS/MS analysis of the crude extract. Introducing SPE fractionation (Kisugi et al. 2013), recoveries were about four times higher, i.e.  $44.50 \pm 4.37$  % for GR24, and  $23.08 \pm 2.49$  % for sorgolactone. However, the SPE fractionation into ten fractions in protocol B (Kisugi et al. 2013) seems quite laborious, and still recoveries are below 50 %. The highest recoveries ( $65.19 \pm 3.77$  % for GR24, and  $42.50 \pm 0.76$  % for sorgolactone) were obtained using protocol C (Boutet-Mercey et al. 2018), where the main difference, beside the number of an

isolated fraction, is the homogeneity of the sample. Presented results clearly show that plant tissue has to be pulverized prior to extraction.

### 3.4. UHPLC-MS/MS analysis of strigolactones

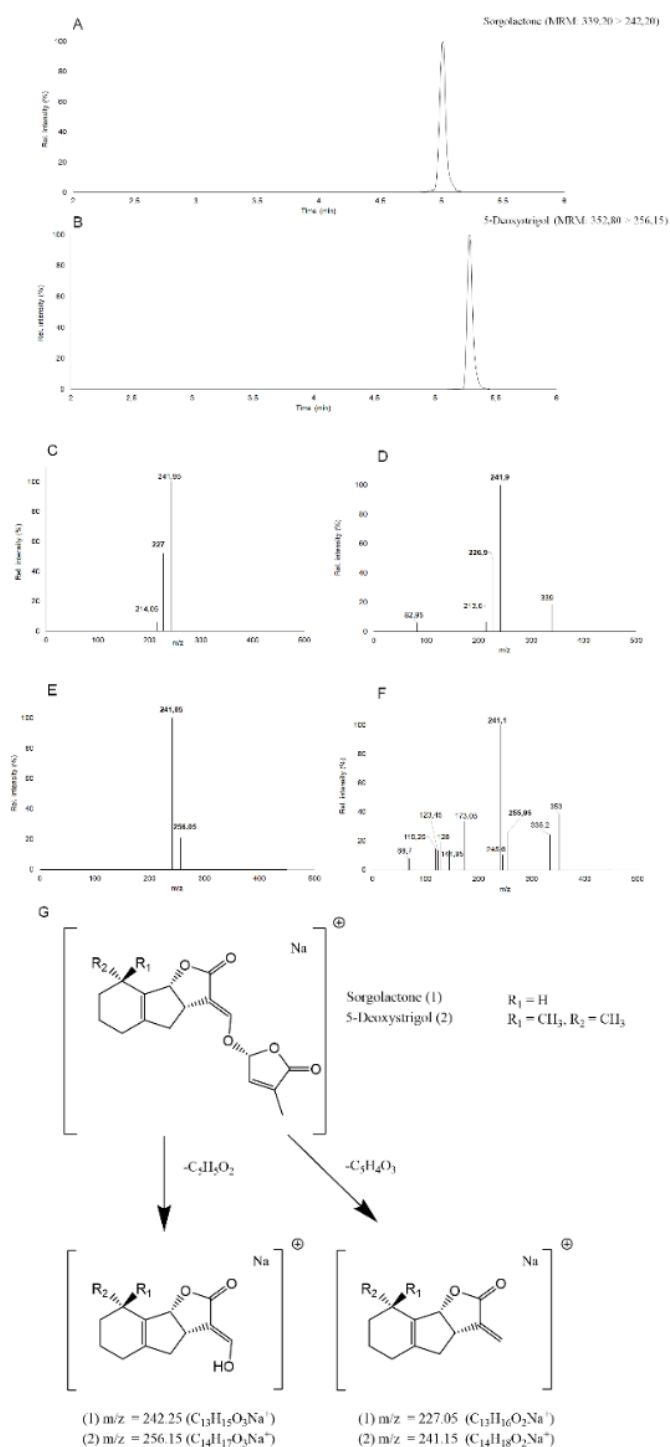
To obtain the highest sensitivity and separation, different LC and MS conditions were tested, i.e. the mobile phase composition and selection of MRM transitions. The reversed phase C18 column is the most commonly used one for separation of SLs, with a combination of water (neutral or acidified) and MeOH or ACN as the mobile phase. Here we tested three mobile phase compositions: (1) 20 mM ammonium acetate/methanol; (2) 20 mM ammonium formate/methanol; (3) water/methanol; and it was found that the best separation was achieved with mixture of neutral water and MeOH (Figure 7), and it was found that neutral mobile phase gives the most appropriate separation.

Since the neutral mobile phase is used, the most abundant ions for all analytes except for fabacyl acetate and GR24 were sodium adducts, and therefore, they were used as quantifiers (Table 1). Finally, the method was optimized for separation of 6 naturally occurring strigolactones, i.e. orobanchol, strigol, fabacyl acetate, orobanchyl acetate, sorgolactone and 5-deoxystrigol, as well as for synthetic analogue GR24. In the case of *Sorghum bicolor*, sorgolactone and 5-deoxystrigol were observed in relatively high levels, and their MRM transitions, MS/MS spectra (collision energy, - 30 eV) and proposed fragmentation pattern are presented in Figure 8. Spectral data of identified strigolactones from analyzed plant material are summarized in Supplementary material.



**Figure 7.** MRM chromatograms of a mixture of chosen endogenous strigolactones: (a) orobanchol, (b) strigol, (c) sorgolactone and (d) 5-deoxystrigol. A) impact of composition of mobile phase on separation (1 – 20 mM ammonium acetate/methanol; 2 – 20 mM ammonium formate/methanol; 3 – water/methanol, B) impact of MRM transitions on sensitivity (1 – sodium adducts; 2 – protonated molecular ions).

Boutet-Mercey et al. (2018) and Riaz et al. (2018) recently validated LC-MS/MS methods for the routine analysis of SLs. Both methods were successfully used for quantification of endogenous SL, using GR24 as an internal standard (IS). In addition, Boutet-Mercey et al. (2018) used deuterium labelled endogenous SLs for fabacyl acetate, orobanchyl acetate and for orobanchol, GR24 as IS. They were working with CE as we did (Table 1) and were using both MRM transitions (protonated and sodium adduct) for identification of SLs, which both occurring when neutral mobile phase. On the other hand, Rial et al. (2018) validated method for 7 naturally occurring SLs in less than 11 minutes of analysis, but they were not able to separate all SL standards used. There was coelution of two isomers, strigol and orobanchol, which normally have same MRM transitions (Sato et al., 2003; Xie et al., 2009). They also presented very simple sample preparation without any additional purification procedure from both plant root extract and exudates using MeOH as extraction solvent. MeOH is very strong nucleophile that hydrolyze SLs (e. g. a half-life for endogenous 5-deoxystrigol in 3% MeOH is 1.5 days), (Akiyama *et al.*, 2005; Halouzka *et al.*, 2018). Moreover, Rial et al. (2018) used different precursor ions for MRM qualifier and quantifier transitions, i.e. MRM transitions for strigol were 369>272 and 347>215, which are transitions of sodium adduct and molecular ion, respectively. Also, CE used in that study seems to be too low, and therefore, Rial et al. (2018) were not able to quantitatively fragment selected precursor ions.



**Fig. 8.** UHPLC-MS/MS analysis using multiple reaction monitoring (MRM) of roots extracts of *S. bicolor*. The MRM transition of sodium adducts molecular ions for sorgolactone (A), 5-deoxystrigol (B). MS/MS fragmentation spectra of identified sorgolactone, C) root extract, D) authentic standard, and 5-deoxystrigol, E) root extract, F) authentic standard. G) The proposed fragmentation pathway of compounds (1) and (2).

Here, isolated and purified root extracts of *V. faba*, *V. sativa*, *P. sativum* and *S. bicolor* were analysed and results are summarized in Table 4. Presented data are in the agreement with those found in the literature (Awad et al. 2006; Xie et al., 2008; Yoneyama *et al.*, 2008; Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Foo and Davies *et al.*, 2011; Boutet-Mercey *et al.*, 2018), but also confirm the findings obtained from MS ambient techniques used in this study. Moreover, this is a very first report on SL analysis of *Vicia sativa*, where fabacyl acetate, orobanchyl acetate, orobanchol, and 5-deoxystrigol were identified.

**Table 4.** The presence of SLs in the roots of four plant species detected by UHPLC-MS/MS.

| Compound           | <i>V. faba</i> | <i>P. sativum</i> | <i>S. bicolor</i> | <i>V. sativa</i> |
|--------------------|----------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Orobanchol         | +              | +                 | -                 | +                |
| Strigol            | -              | -                 | -                 | -                |
| 5-Deoxystrigol     | +              | +                 | +                 | -                |
| Sorgolactone       | -              | -                 | +                 | -                |
| Fabacyl acetate    | +              | +                 | -                 | +                |
| Orobanchyl acetate | +              | +                 | -                 | +                |

#### 4. Conclusion

Here, we report a novel application of ambient mass spectrometry methods in phytohormone analysis applied particularly on strigolactones. DART-MS approach with significantly reduced sample preparation was found to be suitable for a fast screening method for identification or semi-quantitative analysis of strigolactones. Moreover, DESI-MS technique for 2-dimensional imaging to obtain the spatial distribution of strigolactones was successful. Several plant species (*Vicia faba*, *Vicia sativa*, *Pisum sativum* and *Sorghum bicolor*) and various plant tissue (root, stem, leaves) were used. The credibility of presented results is supported by the literature and by conventional UHPLC-MS/MS method optimized in this work.

#### Acknowledgements

xxxxxxxxxx

#### Reference

1. Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH and Bouwmeester HJ, The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* **139**:920-934 (2005).
2. Xie X, Yoneyama K and Yoneyama K, The strigolactone story. *Ann Rev Phytopatol* **48**:93-117 (2010).
3. Al-Babili S and Bouwmeester HJ, Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu Rev Plant Biol* **66**:161-166 (2015).
4. Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME and Egley GH, Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154**:1189-1190 (1966).
5. Akiyama K, Matsuzaki K and Hayashi H, Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fung. *Nature* **435**:824-827 (2005).
6. Delaux PM, Xie X, Timme RE, Peuch-Pages V, Dunand C, Lecompte E, Delwiche CF, Yoneyama K, Bécard G, Séjalon-Delmas N, Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytol* **195**: 857-871 (2012).
7. Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, Ruyter-Spira C, Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **155**: 974-987(2011).
8. Foo E, Yoneyama K, Hugill CJ, Quittenden LJ, Reid JB, Strigolactones and the regulation of pea symbioses in response to nitrate and phosphate deficiency. *Mol Plant* **6**:76-87 (2013).
9. Sato D, Awad AA, Takeuchi Y, Yoneyama K, Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobanch*, produced by cotton. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 98-102 (2005).
10. Cardoso C, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ, Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanch* and *Phelipanche* spp. *Plant Sci* **180**:414-420 (2011).
11. h
12. Kohlen W, Charnikhova T, Bours R, López-Ráez JA, Bouwmeester H, Tomato strigolactones: a more detailed look. *Plant Signal Behav* **8**:e22785 (2013).
13. Awad AA, Sato D, Kusumoto D, Kamioka H, Takeuchi Y, Yoneyama K, Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants

- Striga and Orobanche, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regul* **48**:221-224 (2006).
14. Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K, Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**:125-132 (2007).
  15. Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* **235**:1197-1207 (2012).
  16. Yoneyama K, Xie X, Kisugi T, Nomura T, Yoneyama K, Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta* **238**:885-894 (2013).
  17. Yoneyama K, Xie X, Nomura T, Yoneyama K, Extraction and measurement of strigolactones in sorghum roots. *Bio-protocol* **6**:e1763 (2016).
  18. Boutet-Mercey S, Perreau F, Roux A, Clavé G, Pillot JP, Schmitz-Afonso I, Touboul D, Mouille G, Rameau C, Boyer FD, Validated Method for Strigolactone Quantification by Ultra High-Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry Using Novel Deuterium Labelled Standards. *Phytochem Anal* **29**:59-68 (2018).
  19. Zwanenburg B and Pospíšil T, Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Mol Plant* **6**:38-62 (2013).
  20. Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Nomura T, Nakatani Y, Akiyama K, McErlean CSP, Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? *J Exp Bot* **69**:2231-2239 (2018).
  21. Sato D, Awad AA, Chae SH, Yokota T, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K. Analysis of strigolactones, germination stimulants for Striga and Orobanche, by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **51**: 1162-1168 (2003).
  22. Venter A, Nefliu M, Cooks RG, Ambient desorption mass spectrometry. *TrAC* **27**:284-90 (2008).
  23. Weston DJ, Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst* **135**:661-668 (2010).

24. Kisugi T, Xie X, Kim HI, Yoneyama K, Sado A, Akiyama K, Hayashi H, Uchida K, Yokota T, Nomura T, Yoneyama K. 2013. Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*. *Phytochemistry* **87**: 60-64 (2013).
25. Waters MT, Bussel JD and Jost R, *Arabidopsis* hydroponics and shoot branching assay. *Bio-protocol* **2**:e264 (2012).
26. Charnikhova TV, Gaus K, Lumbroso A, Sanders M, Vincken JP, De Mesmaeker A, Ruyter-Spira CP, Screpanti C, Bouwmeester HJ, Zealactones. Novel natural strigolactones from maize. *Phytochemistry* **137**:123-131 (2017).
27. Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K, Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol* **179**:484–494 (2008).
28. Xie X, Yoneyama K, Kusumoto D, Yamada Y, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K, Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry* **69**:427-341 (2008).
29. Foo E, Davies NW, Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta* **234**:1073-1081 (2011)
30. Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF, Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**:189-194 (2008).
31. Cavar S, Zwanenburg B and Tarkowski P, Strigolactones: occurrence, structure, and biological activity in the rhizosphere. *Phytochem Rev* **14**:691–711 (2015).
32. Chernetsova ES, Bromirski M, Scheibner O, Morlock GE, DART-Orbitrap MS: a novel mass spectrometric approach for the identification of phenolic compounds in propolis. *Anal Bioanal Chem* **403**:2859-2867 (2012).
33. Srbek J, Klejdus B, Douša M, Břicháč J, Stasiak P, Reitmajer J, Nováková L, Direct analysis in real time--high resolution mass spectrometry as a valuable tool for the pharmaceutical drug development. *Talanta* **130**:518-526 (2014).
34. Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N, Yamaguchi S, Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant Cell Physiol* **51**:1118-1126 (2010).
35. Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Nomura T, Akiyama K, Asami T, Yoneyama K, Strigolactones are transported from roots to shoots, although not through the xylem. *J Pestic Sci* **40**:214-216 (2015).

36. Seto Y and Yamaguchi S, Strigolactone biosynthesis and perception. *Curr Opin Plant Biol* **21**:1-6 (2014).
37. Grassl, J., Taylor, N. L., and Millar, A. H. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging. *Plant Methods* **7**:21(2011).
38. Kaspar, S., Peukert, M., Svatos, A., Matros, A., and Mock, H. P.. MALDI-imaging mass spectrometry - an emerging technique in plant biology. *Proteomics* **11**,: 1840–1850 (2011).
39. Peukert, M., Matros, A., Lattanzio, G., Kaspar, S., Abadia, J., and Mock, H. P. Spatially resolved analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI). *New Phytol* **193**:806–815 (2012).
40. Spengler, B. Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Anal Chem* **87**: 64–82 (2014).
41. Dong Y, Lin B, Malitsky B, Rogachev I, Aharoni A, Kaftan F, Svatoš A, Franceschi P. Sample Preparation for Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues: A Review. *Front Plant Sci* **7**:60 (2016).
42. Lee YJ, Perdian DC, Song Z, Yeung ES, Nikolau BJ. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *Plant J.* **70**: 81–95 (2012).
43. Thunig J, Hansen, SH, Janfelt C. Analysis of secondary plant metabolites by indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem* **83**:3256–3259 (2011).
44. Cha S, Zhang H, Ilarslan HI, Wurtele ES, Brachova L, Nikolau BJ, Yeung ES. Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Plant J.* **55**:348–360 (2008).
45. Benassi M, Wu CP, Nefliu M, Ifa DR, Volny M, Cooks RG. Redox transformations in desorption electrospray ionization. *Int J Mass Spectrom.* **28**:235–240 (2009).
46. Takahashi K, Kozuka T, Anegawa A, Nagatani A, Mimura, T. Development and application of a high-resolution imaging mass spectrometer for the study of plant tissues. *Plant Cell Physiol.* **56**:1329–1338 (2015).
47. Dong Y, Guella G, Mattivi F, Franceschi P. High production of small organic dicarboxylate dianions by DESI and ESI. *J Am Soc Mass Spectrom.* **26**:386–389 (2015).
48. Li B, Bjarnholt, N, Hansen, SH, Janfelt, C. Characterization of barley leaf tissue using direct and indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **46**:1241–1246 (2011).

49. Li B, Knudsen, C, Hansen NK, Jorgensen K, Kannangara R, Bak S. Takos A, Rook F, Hansen SH, Møller BL, Janfelt C, Bjarnholt N. Visualizing metabolite distribution and enzymatic conversion in plant tissues by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. *Plant J.* **74**:1059–107 (2013).
50. Rial C, Varela RM, Molinillo JMG, López-Ráez JA, Macías FA. A new UPLC-MS/MS method for the direct determination of strigolactones in root exudates and extracts. *Phytochemical analysis* **30**:110-116 (2018).
- 51.

***Příloha 2 – prvoautorská publikace***

Halouzka R., Zeljkovic SC., Klejdus B., Tarkowski P. (2020). Analytical methods in strigolactone research. *Plant Methods*. **16**,76.

REVIEW

Open Access



# Analytical methods in strigolactone research

Rostislav Halouzka<sup>1</sup>, Sanja Čavar Zeljković<sup>1,2</sup>, Bořivoj Klejdus<sup>3,4</sup> and Petr Tarkowski<sup>1,2\*</sup> 

## Abstract

Strigolactones (SLs) are important plant hormones that are produced via the carotenoid biosynthetic pathway and occur at extremely low concentrations in various plant species. They regulate root development, play important roles in symbioses between higher plants and mycorrhizal fungi, and stimulate germination of plant-parasitic *Orobanch* and *Striga* species. Chemical analysis is central to research on the biochemistry of SLs and their roles in developmental biology and plant physiology. Here we summarize key issues relating to the identification and quantification of SLs isolated from plant tissues and exudates. The advantages and drawbacks of different protocols used for strigolactone analysis are discussed, and guidelines for selecting a procedure that will minimize losses during isolation and purification prior to final analysis are proposed. Hyphenated techniques suitable for SL analysis such as GC-MS and LC-MS/MS are also discussed, and newer ambient techniques such as HR-DART-MS and DESI-MS are highlighted as tools with considerable potential in SL research. A key advantage of these methods is that they require only simple sample preparation.

**Keywords:** Strigolactones, Isolation, Determination, GC-MS, LC-MS/MS, HR-DART-MS, DESI-MS

## Background

Strigolactones (SLs) are a poorly characterized group of plant hormones [1], although they have been known for over 60 years because of their interactions with parasitic weeds such as *Orobanch*, *Striga* and *Phelipanche*. They occur in diverse plant species, ranging from mosses to higher plants such as *Pinus* sp. and *Eucalyptus* sp. [2–5]. The first SLs to be described were strigol and its acetate, both of which were isolated from cotton and named after the plant genus *Striga*, which is parasitic on cotton [2, 6].

As plant hormones, SLs regulate developmental processes including the induction of secondary growth, acceleration of leaf senescence, stimulation of internode growth, and root elongation. They also inhibit axillary bud outgrowth and the formation of adventitious and lateral roots [7]. Additionally, SLs serve as signaling molecules with important roles in the induction of hyphal

branching in arbuscular mycorrhiza (AM) and stimulating seed germination in parasitic plants [1, 8]. Recent findings indicate variation in the biological activity of SLs. For instance, orobanchol is highly active towards AM fungi but is a weaker stimulator of parasitic seed germination in *Striga hermonthica* than its biosynthetic precursor *ent-2'-epi-5-deoxystrigol* [9].

SL biosynthesis occurs primarily in the roots [3], from where SLs are either secreted into the rhizosphere or transported to the shoots [10–12]. They are synthesized via the carotenoid biosynthetic pathway [1]. In structural terms, SLs consist of a tricyclic lactone (ABC moiety) and a methylated butenolide (ring D) coupled via an enol ether linkage. The enol ether is unstable and easily cleaved or hydrolysed even under mild conditions [13]. Ring D is a characteristic feature of all naturally occurring SLs (Fig. 1), [14]. Minor modifications of the ABC moiety such as methylation, acetylation, or hydroxylation influence the compound's biological activity. Enzymatic hydroxylation can occur on the AB rings; hydroxylation at the C-4, C-5, and C-9 positions results in the formation of orobanchol, strigol, and sorgomol, respectively. Conversely, no SLs hydroxylated on the C or D rings have

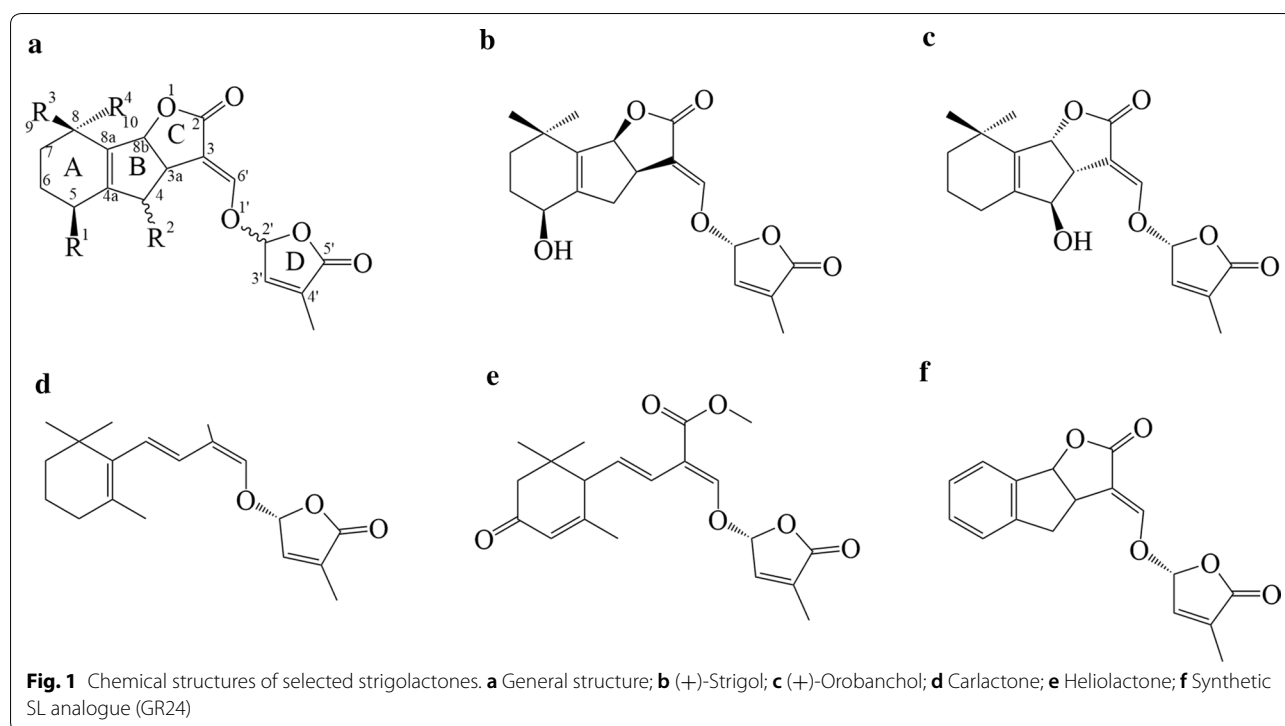
\*Correspondence: petr.tarkowski@upol.cz; tarkowski@genobanka.cz

<sup>1</sup> Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Phytochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czechia

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



yet been reported [9, 15]; such structures would be quite unstable. There are also non-canonical SLs such as heliolactone (Fig. 1e) from sunflowers [16] and lotuslactone from *Lotus japonicus* [17]. These compounds lack the A-, B-, or C- ring but retain the enol-ether-D ring moiety, which is essential for the biological activities of SLs.

Chemical analysis of small molecules, including plant hormones, is central to studies on plant development and host-microbe interactions. In particular, information on hormone levels is essential for researchers working on any kind of hormone-regulated process. The analysis of phytohormones such as strigolactones is very challenging because the endogenous concentration of the target molecules in plant tissues are often very low (on the order of pg/g fresh weight), so the presence of much more abundant compounds can cause significant interference. These problems can be particularly severe if the interfering compounds have similar structures and/or physico-chemical properties to the target analytes. Other factors that complicate hormonal analysis include the high complexity of plant matrices and the limited chemical, light, and thermal stability of many target compounds [18–20]. Proper purification is necessary to obtain reliable data, and simplification of purification protocols often intensifies matrix effects, making final analysis very difficult or even impracticable [21, 22]. The most popular technique for final analysis of phytohormones over the last decade has been liquid chromatography-tandem mass

spectrometry, which combines a high-resolution chromatographic system with sensitive and acceptably selective mass spectrometric detection [20].

This review summarizes the advantages and disadvantages of isolating SLs from root tissue and exudates, presents noteworthy findings related to their qualitative and quantitative chemical analysis, and offers some future perspectives on research in this area.

### Isolation and purification

Sample preparation is an essential step in any chemical analysis of plant metabolites, especially phytohormones. SLs occur mainly in root exudates and root tissues [11, 23] but the SL profiles of root exudates and roots differ, probably because of the different biological roles of individual compounds. Their isolation from root exudates is limited by the presence of inorganic salts in the medium. Extracts containing such salts are incompatible with the chromatographic methods used for final analyses due to their harmful effects on the detectors. In addition, extraction requires the processing of relatively large volumes of media (typically litres). Therefore, the capacity of the solvent and/or sorbent used must be carefully considered when analyzing root exudates.

Conversely, isolating and purifying SLs from root tissues requires pre-concentration of the target compounds, sample desalting, and also removal of interfering substances. In this case, the main unwanted contaminants

are organic compounds with physicochemical properties similar to the target analytes.

SLs are produced in very low quantities, on the order of 15–30 pg/plant/day [18, 24, 25]. It is therefore essential to minimize losses during isolation and purification in order to maximize recovery of the target compounds over the sample preparation process. Isolating SLs from plants is very laborious, and it is generally impossible to guarantee that the quantities obtained will be sufficient to determine the structure of previously uncharacterized SLs [14, 18]. The first SL isolation procedures required over 25,000 plants, but the use of modern chromatographic and spectrometric methods has significantly reduced the number of plants needed [26, 27]. Over the last two decades, the quantity of plant material required for SL profiling has fallen from tens of kilograms (e.g. Yokota et al. [27]) to grams or even milligrams (e.g. Charnikova et al. [28] or Rial et al. [29]), mainly because of advances in instrumentation, but also because of more efficient sample isolation and purification procedures.

The most common procedures for SL isolation from root exudates are based on adsorption on charcoal [30–32]. Many rather similar protocols for isolating and purifying SLs from root tissue have been presented [11, 33, 34]; that developed by Yoneyama et al. [34] is generally accepted as the standard protocol, but was recently modified by Boutet-Mercey et al. [35]. They ground the plant material before extraction, while Yoneyama et al. [34] extracted intact plant tissue. In addition, Boutet-Mercey et al. [35] purified the extract via SPE. More details and the differences between these two approaches are described in the following section.

### Isolation of SLs from root exudates

Plant exudates are complex mixtures of bioactive phytochemicals containing both low- and high-molecular weight compounds that are important for plant adaptation and defence [36, 37]. Exudates are generally secreted by plant root hairs, calli, and suspension cells [36]. The collection of exuded bioactive phytochemicals is a non-destructive process that can be repeated several times to obtain higher quantities of the desired molecules [38, 39]. Plant seedlings for SL production are usually grown in hydroponic culture systems. In these systems, seeds are sterilized and germinated, then once the seedlings are 2 days old, they are transferred into a strainer with a sheet of gauze linked to a slightly larger container containing various volumes of tap water or nutrient solution [40, 41]. Tap water can typically be used as the medium for the first 3–5 days to acclimatize the plants, after which a growth medium containing nutrients is applied. The medium can be used throughout the cultivation process, and because

SL production and exudation are sensitive to nutrient availability [40–43], the cultivation timeframe can be tuned. Three different types of cultivation media are widely used today: most European groups use Hoagland medium, but Japanese researchers prefer Tadano and Tanaka medium or a modified Long Ashton nutrient solution [28, 44, 45]. These cultivation media contain various inorganic salts, which may bind to target compounds. For instance, higher concentrations of phosphate ( $\geq 5$  mM) in the cultivation media negatively affect both the production and stability of SLs in root exudates. Rial et al. [29] analyzed both exudates and root tissues from tomato plants grown under  $-P$  and  $+P$  conditions, and observed significantly lower SL concentrations in samples grown under  $+P$  conditions. We found that phosphate and some other nucleophiles promoted the degradation of the SL synthetic analog, GR24 [13]. Phosphate is a good example of an inorganic ion influencing both SL biosynthesis in plants and their stability in aqueous solutions.

There are two common approaches for collection/extraction of SLs from root exudates: (A) combined collection with charcoal followed by SPE (solid phase extraction) and (B) direct LLE (liquid/liquid extraction) of target compounds from the media [23, 30, 40, 43] (Table 1). Combined collection yields relatively low recoveries—typically,  $>20\%$  (Halouzka, unpublished results)—and the selectivity of adsorption on charcoal is limited by the large quantities of hydroponic solution that must be passed through the sorbent. Adsorbed root exudates are eluted with acetone, evaporated to dryness, re-dissolved in water, and then extracted with ethyl acetate (EtOAc) via LLE [30]. EtOAc is the preferred extraction solvent for SLs due to its moderate polarity and low toxicity. However, the use of freshly distilled solvent is strongly recommended because residual acetic acid degrades SLs. The EtOAc extracts are then washed with 0.2 M  $K_2HPO_4$  (pH 8.3) to obtain a neutral fraction. Finally, the extract is dried over anhydrous  $MgSO_4$  or  $NaSO_4$  and concentrated *in vacuo* [40, 43].

The LLE approach involves directly extracting SLs from the cultivation media without prior adsorption on a sorbent. The collected root exudates are extracted repeatedly with an equal volume of EtOAc [43], then the extracts are combined and neutralized (Fig. 2B). Collection and extraction are repeatable processes that can be performed over several days [31]. Most SLs characterized to date were isolated from root exudates [18, 28, 30, 32, 33].

A third way of isolating SLs from exudates was presented by Rial et al. [29], who analyzed concentrated exudates without pretreatment after dissolution in MeOH. This resulted in successful quantification even though the nucleophilicity of MeOH makes it a suboptimal

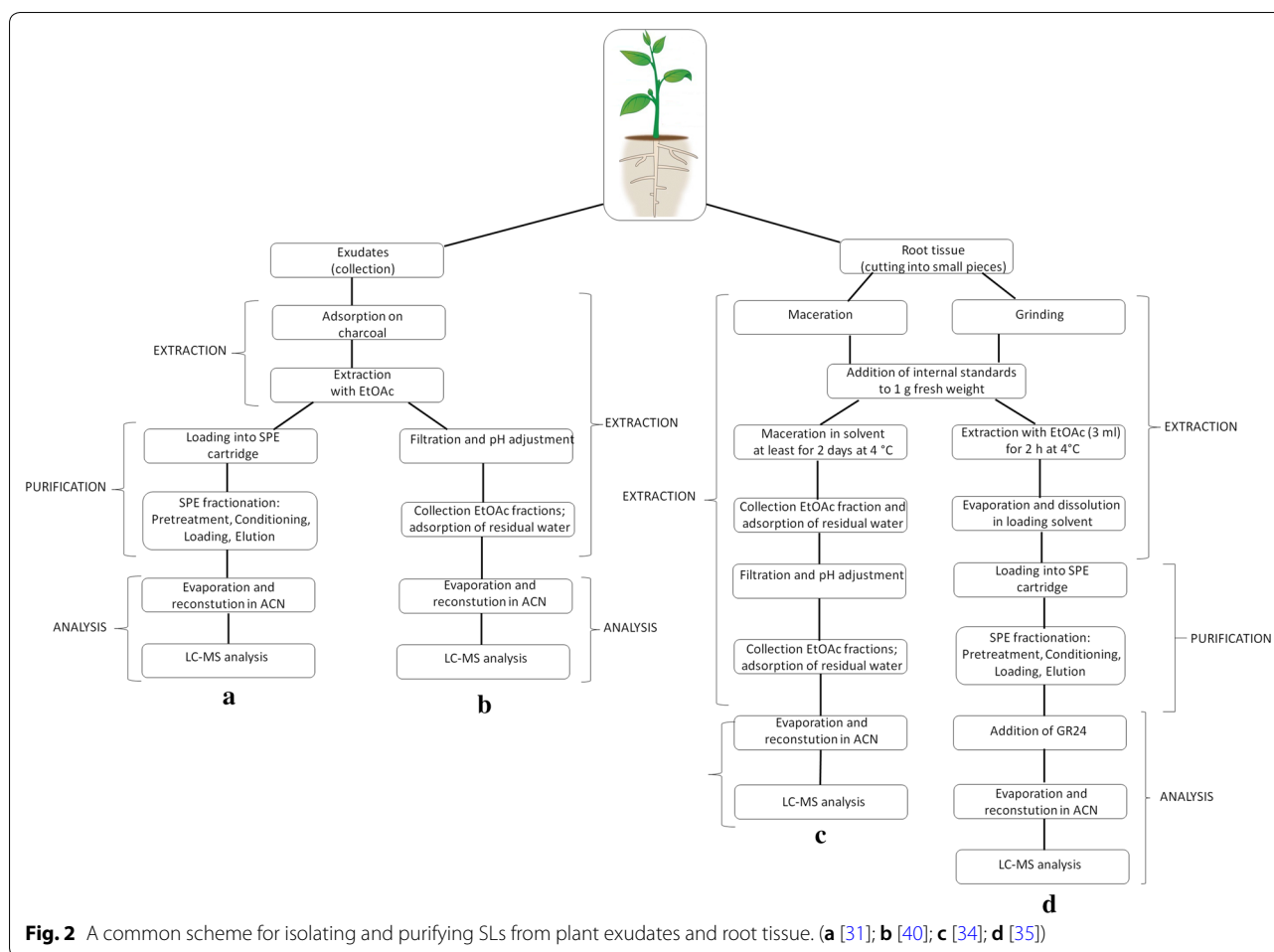
**Table 1 Overview of analytical methods for strigolactones**

| Analytical technique | Column                                        | Mobile phase composition                                           | Analysis time             | Matrix                         | Extraction solvent | Purification                                                                                            | Strigolactone                 | References                                 |
|----------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|
| LC-ESI-MS/MS         | ODS (C18), Mightysil RP-18 (2 × 250 mm, 5 µm) | A—H <sub>2</sub> O<br>B—MeOH                                       | 34–60 min                 | Tissue<br>Exudates             | EtOAc<br>–         | LLE<br>Adsorption on charcoal and elution with acetone; LLE with EtOAc                                  | 5-Deoxystrigol                | [5, 15, 18, 30, 32, 40, 41, 43–45, 48, 49] |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 7-Oxo-orobanchyl acetate      |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 7α-Hydroxy-orobanchyl acetate |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Didehydro-orobanchol          |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Fabacyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Methyl zealactonoate          |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchol                    |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchyl acetate            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Solanacol                     |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Sorgolactone                  |                                            |
|                      | L-Column2 ODS (2.1 × 50 mm, 2.0 µm)           | A—H <sub>2</sub> O<br>B—MeOH                                       | 22 min                    | Exudates                       | –                  | Adsorption on charcoal and elution with acetone; LLE with EtOAc                                         | Strigol                       | [25]                                       |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Strigyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 5-Deoxystrigol                |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchol                    |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchyl acetate            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 4-Deoxy-orobanchol            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 5-Deoxystrigol                |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Carlactone                    |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Carlactonoic acid             |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Heliolactone                  |                                            |
|                      | ACE Excel 1.7 C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)   | A—0.1% FA/H <sub>2</sub> O<br>B—0.1% FA/ACN                        | 10.5 min                  | Exudates<br>Tissue             | –<br>EtOAc         | Adsorption on C18 and elution with acetone                                                              | 5-Deoxystrigol                | [29]                                       |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 7-Oxo-orobanchyl acetate      |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Fabacyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchol                    |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchyl acetate            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Solanacol                     |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Strigol                       |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Zealactones 1–5               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Fabacyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchol                    |                                            |
|                      | ACQUITY BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 µm)        | A—0.1% FA/H <sub>2</sub> O<br>B—ACN<br>A—H <sub>2</sub> O<br>B—ACN | 12 min<br>19 min<br>9 min | Exudates<br>Tissue<br>Exudates | –<br>EtOAc<br>–    | Adsorption on C18 and elution with acetone<br>CC (silica)<br>Adsorption on C18 and elution with acetone | 5-Deoxystrigol                | [28]                                       |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 7-Oxo-orobanchyl acetate      |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Fabacyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchol                    |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchyl acetate            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Solanacol                     |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Strigol                       |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Zealactones 1–5               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Fabacyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchol                    |                                            |
|                      | ACCLAIM 120C18 (2.1 mm × 250 mm, 5 µm)        | A—0.1% FA/H <sub>2</sub> O<br>B—0.1% FA/ACN                        | 40 min                    | Exudates<br>Tissue             | EtOAc<br>EtOAc     | C18 SPE<br>CC (silica)                                                                                  | 5-Deoxystrigol                | [23]                                       |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Fabacyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchyl acetate            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchol                    |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchyl acetate            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Solanacol                     |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Strigol                       |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | 5-Deoxystrigol                |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Fabacyl acetate               |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Orobanchyl acetate            |                                            |
|                      |                                               |                                                                    |                           |                                |                    |                                                                                                         | Solanacol                     |                                            |

Table 1 (continued)

| Analytical technique | Column                             | Mobile phase composition                      | Analysis time | Matrix             | Extraction solvent | Purification                                                     | Strigolactone                      | References   |
|----------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|--------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------|
| GC-MS                | Kinetex C18 (2.1 × 150 mm, 2.6 μm) | A—0.1% AcA/H <sub>2</sub> O<br>B—0.1% AcA/ACN | 23 min        | Tissue             | EtOAc              | CC (silica)                                                      | 5-Deoxystrigol                     | [34]         |
|                      | DB-5 (4 m × 0.25 mm)               | He                                            | 27 min        | Exudates<br>Tissue | –<br>EtOAc         | Adsorption on XAD-4 and elution with EtOAc; CC on Sephadex LH-20 | Methyl zealactonoate<br>Orobanchol | [27, 47, 48] |

AcA acetic acid, FA formic acid, LLE liquid–liquid extraction, CC column chromatography, SPE solid phase extraction



solvent for SLs: 5-deoxystrigol reportedly has a half-life of 1.5 days in 3% MeOH [8, 13].

### Isolation of SLs from root tissues

The transfer of target analytes from root tissues to organic solvents requires either maceration or extraction of the ground tissue. Maceration involves submerging the intact tissue in freshly distilled solvent for a few days, while extraction involves first homogenizing the plant tissue with a vibration mill or mortar and pestle. To avoid enzymatic or chemical degradation, the tissue must be cooled to 4 °C during extraction. The efficiency of maceration/extraction depends on the target molecule's polarity and subcellular localisation. Plant hormones are usually associated with other compounds such as phenolics, lipids, and proteins. The extraction solvent must therefore minimize the extraction of interfering substances and not affect the stability or chemical properties of the target compounds [34, 46].

Yoneyama et al. [34] established a standard SL isolation protocol (Fig. 2c) that was successfully applied to

sorghum root tissue. This protocol involves macerating small pieces of roots or shoots from 2 to 4 week-old plants in EtOAc. Maceration should not be performed for more than 3 days due to the water content of the plant tissue; water can easily decompose both SLs and EtOAc under slightly acidic conditions. Other measures to prevent potential analyte loss include pH neutralization, water removal, and omitting nucleophilic substances or solvents (MeOH). EtOAc and acetone are popular solvents for these processes. The final steps are similar to those for isolation from exudates, i.e. washing with  $K_2HPO_4$ , drying over anhydrous  $MgSO_4$  or  $Na_2SO_4$ , filtration, and evaporation under reduced pressure at temperatures below 35 °C. A very similar isolation protocol was described by López-Ráez et al. [33], who directly analysed EtOAc extracts of tomato tissues [29, 33].

An alternative approach was developed by Boutet-Mercy et al. [35], who combined the extraction of homogenized tissue with purification by SPE (Fig. 2d). Their protocol was tested and optimized for SLs isolated from garden peas (fabacyl acetate, orobanchyl acetate, and

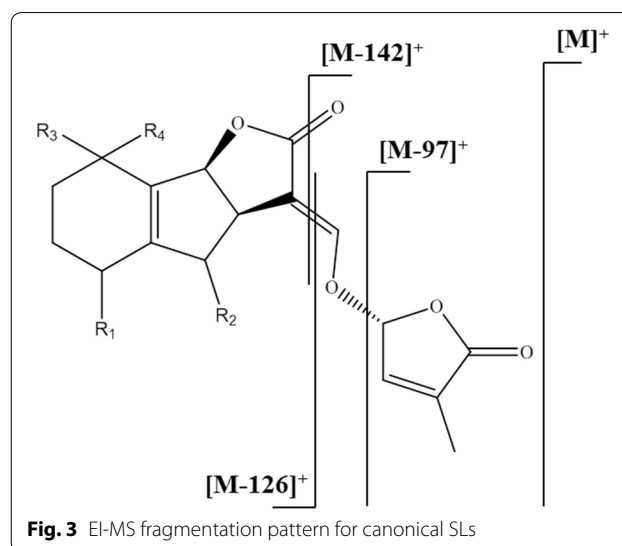
orobanchol). While other phytohormones are often purified by SPE using hydrophobic C18-type or polymer-type sorbents, silica is commonly used for SLs. This prevents the use of aqueous solvents, which has the additional benefit of improving SL stability and reducing evaporation times [20, 35]. Successful quantitative analysis of SLs from tissue samples requires both purification and fractionation. However, fractionation requires the handling of many fractions—more than ten in some cases. To generate these fractions, elution is performed stepwise while varying the composition of the eluent. The elution solvent is typically a mixture of EtOAc with heptane or hexane, in ratios ranging from 100:0 to 0:100 [31]. The optimized SPE protocol of Boutet-Mercey et al. [35] generates only four fractions (2 washing and 2 elutions). These authors also reported significant matrix effects for fractions containing higher amounts of EtOAc. A drawback of the SPE procedure is that it increases the total time required for analysis to over 24 h [29], which is problematic because the instability of SLs means that time is an important factor in their analysis. It is therefore necessary to strike a balance between extraction efficiency and stability. Based on experience and published results, we make the following recommendations for the use of endogenous SL and synthetic analogues such as GR24 in plant treatments [13, 31–33]:

- Stock solutions should be prepared using dry inert solvents such as DMF, acetone or acetonitrile, with a maximum storage temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
- Aqueous solutions containing SLs must be used within 24 h;
- Methanol is not a suitable solvent for experiments with SLs;
- EtOAc is a good extraction solvent but must be redistilled before extraction; and
- Sample preparation (including SPE purification) should be fast and produce an appropriate number of fractions.

## Identification and quantification

### GC–MS

Gas chromatography (GC) is a very important method in phytohormone analysis, although it is often replaced by liquid chromatography because it requires the derivatization of non-volatile analytes. Nevertheless, Yokota et al. [27] showed that GC is a viable tool for studying SLs by using GC coupled with a mass spectrometer (MS) operating in electron ionization mode (EI) to identify strigol and orobanchol in red clover. They used a non-polar capillary column packed with 5% (phenyl)



**Fig. 3** EI-MS fragmentation pattern for canonical SLs

methylpolysiloxane, which was also used by Erickson et al. [47], and Xie et al. [48] (Table 1).

SLs are non-volatile and thermolabile compounds. Their volatility and stability in the injection port of a GC system ( $150\text{--}250^{\circ}\text{C}$ ) can be improved by derivatization with tetramethylsilane (TMSi), which causes cleavage of the D-ring.

Electron ionization in GC–MS analyzers is always performed at 70 eV, which is clearly too high for SLs, causing their molecular peaks to have very low intensities (approximately 4% of relative abundance). Based on the data summarized by Čavar et al. [46], we propose that SLs exhibit the fragmentation pattern shown in Fig. 3 when ionized at 70 eV in a GC–EI–MS analyzer. The base peak for all SLs analyzed by GC–EI–MS is  $m/z$  97, which corresponds to the cleaved hydroxymethyl butenolide, i.e.  $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2^+$ . The peaks corresponding to the ABC-moiety and its fragments formed by cleavage of the enol ether  $[\text{M}-126]^+$  and further cleavage of the oxo-group from the lactone  $[\text{M}-142]^+$  have quite low intensities—at most 15% of relative abundance.

Since the introduction of HPLC coupled with triple quadrupole (QqQ) mass detectors for identification of SLs by Sato et al. [18], GC has largely served as a supporting method for confirming the spectral characteristics of SLs [47, 49].

### LC–MS

The most popular separation method for SLs is high-performance liquid chromatography (HPLC). Separation of SLs is usually performed on a reversed-phase stationary phase with C18 bonded silica columns. The most common mobile phases are mixtures of neutral or acidified water with methanol or acetonitrile (Table 1). In the early

**Table 2 Overview of  $m/z$  transitions for known canonical and non-canonical SLs**

| Strigolactone                         | $[M + H]^+$ | MRM1      | MRM2      | References | $[M + Na]^+$ | MRM1      | MRM2      | References |
|---------------------------------------|-------------|-----------|-----------|------------|--------------|-----------|-----------|------------|
| Orobanchol                            | 347         | 347 > 205 | 347 > 97  | [11]       | 369          | 369 > 272 |           | [82]       |
| Orobanchyl acetate                    | 389         | 389 > 347 | 389 > 233 | [11]       | 411          | 411 > 254 | 411 > 239 | [49]       |
| 4-deoxyorobanchol                     | 331         | 331 > 216 |           | [52]       |              |           |           |            |
| 7-oxoorobanchol                       |             |           |           |            | 383          | 383 > 286 |           | [44]       |
| 7-oxoorobanchyl acetate               |             |           |           |            | 425          | 425 > 268 |           | [44]       |
| 7 $\alpha$ -hydroxyorobanchol         |             |           |           |            | 385          | 385 > 288 |           | [44]       |
| 7 $\alpha$ -hydroxyorobanchyl acetate |             |           |           |            | 427          | 427 > 270 |           | [44]       |
| 7 $\beta$ -hydroxyorobanchol          |             |           |           |            | 385          | 385 > 288 |           | [44]       |
| 7 $\beta$ -hydroxyorobanchyl acetate  |             |           |           |            | 427          | 427 > 270 |           | [44]       |
| Solanacol                             | 343         | 343 > 97  | 343 > 183 | [87]       | 365          | 365 > 268 |           | [33]       |
| Solanacyl acetate                     |             |           |           |            | 407          | 407 > 250 |           | [25]       |
| Strigol                               |             |           |           |            | 369          | 369 > 272 |           | [18]       |
| Strigyl acetate                       |             |           |           |            | 411          | 411 > 254 |           | [83]       |
| Strigone                              |             |           |           |            | 367          | 367 > 270 |           | [31]       |
| 5-deoxystrigol                        | 331         | 331 > 216 | 331 > 97  | [88]       | 353          | 353 > 256 |           | [84]       |
| Sorgolactone                          | 317         | 317 > 97  |           | [23]       | 339          | 339 > 242 |           | [83]       |
| Sorgomol                              |             |           |           |            | 369          | 369 > 272 |           | [85]       |
| Fabacyl acetate                       | 405         | 405 > 231 | 405 > 97  | [29]       | 427          | 427 > 219 | 427 > 242 | [44]       |
| Fabacol                               |             |           |           |            | 385          | 385 > 288 |           | [44]       |
| Heliolactone                          | 361         | 361 > 233 | 361 > 97  | [16]       |              |           |           |            |
| Zealactone                            | 377         | 377 > 345 | 377 > 97  | [28]       |              |           |           |            |
| Avenaol                               | 377         | 377 > 263 | 377 > 97  | [89]       |              |           |           |            |
| Carlactone                            | 303         | 303 > 97  |           | [52]       |              |           |           |            |
| Calactonic acid*                      | 331         | 331 > 113 |           | [52]       |              |           |           |            |
| Methyl carlactonate                   | 347         | 347 > 97  |           | [86]       |              |           |           |            |
| Methoxy-5-deoxystrigol                |             |           |           |            | 383          | 383 > 286 |           | [25]       |

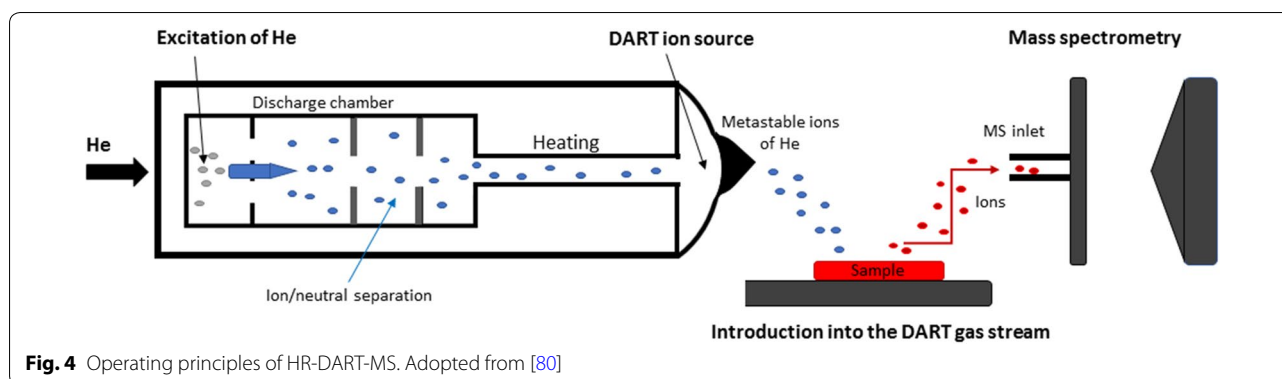
\*Carlactonic acid—precursor ion  $[M - H]^-$

days of SL research, HPLC systems equipped with spectrophotometric detectors (UV or DAD) were used. The usefulness of such systems is limited by their sensitivity and the difficulty of interpreting the UV profiles of SLs—for example, strigol and orobanchol have the same chromophore [27, 50]. This problem is illustrated by the example of Siame et al. [50], who used UV detection and mistakenly reported that strigol occurred in maize (*Zea mays*). Two decades later, Jamil et al. [51] disproved this finding and showed that neither strigol nor any other canonical SLs occur in maize. Instead, several non-canonical SLs were detected in maize root exudates [28, 48, 51].

Traditional HPLC is being replaced by UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography), which offers shorter analysis times and greater separation efficiencies. Routine run-times in UHPLC are typically less than 20 min (Table 1). Quantitation of SLs by UHPLC–MS/MS (tandem mass spectrometry) is typically performed using the multiple reaction monitoring (MRM) mode [3, 18, 52]. The value of this selective detection mode is

demonstrated in a recently published paper by Rial et al. [29], who could not completely separate the isomeric compounds strigol and orobanchol by reversed-phase chromatography but were able to selectively distinguish them by monitoring the relevant MRM transitions.

It should be noted that most SLs are analyzed in positive ion mode but carlactonic acid is analyzed in negative ion mode (Table 2), [52]. Additionally, the choice of MRM transitions depends strongly on mobile phase composition and pH. Acidic conditions suppress formation of sodium or potassium adducts in favor of protonated quasi-molecular ions ( $[M + H]^+$ ). However, most authors focus on transitions of sodium adduct ions  $[M + Na]^+$ , with the most abundant fragment corresponding to neutral loss of  $[M + Na - 97]^+$  [15, 18, 30, 33–35, 44, 49, 53]. This transition is monitored because all known SLs have identical D-ring moieties [3]. Table 2 provides an overview of canonical and non-canonical SLs with defined MRM transitions observed in LC–MS/MS experiments.



**Fig. 4** Operating principles of HR-DART-MS. Adopted from [80]

## Future tools

### Flash chromatography

As demonstrated by the above discussion, there is still a need for a general and practical tool for SL isolation. Flash chromatography or extraction using monolithic sorbents could be attractive alternatives to SPE purification. Flash chromatography uses a hybrid medium with small silica gel particles (250–400 mesh size) that necessitate the application of positive pressure to force solvent through the column. Automated flash chromatography systems are multifunction devices that closely resemble HPLC systems: they have gradient pumps, sample injection ports, UV detectors, and inbuilt fraction collectors. They can be used to separate target analytes on scales ranging from a few mg to kilograms, and are much cheaper than preparative HPLC systems [54]. An alternative option is to use monolithic sorbents, whose pore systems enable their use as general tools for isolating SLs and separating their stereoisomers. Some monolithic silica sorbents have additional useful features such as high linear velocities, which increase separation efficiency and thus facilitate the isolation of pure isomers [55].

### Nuclear magnetic resonance

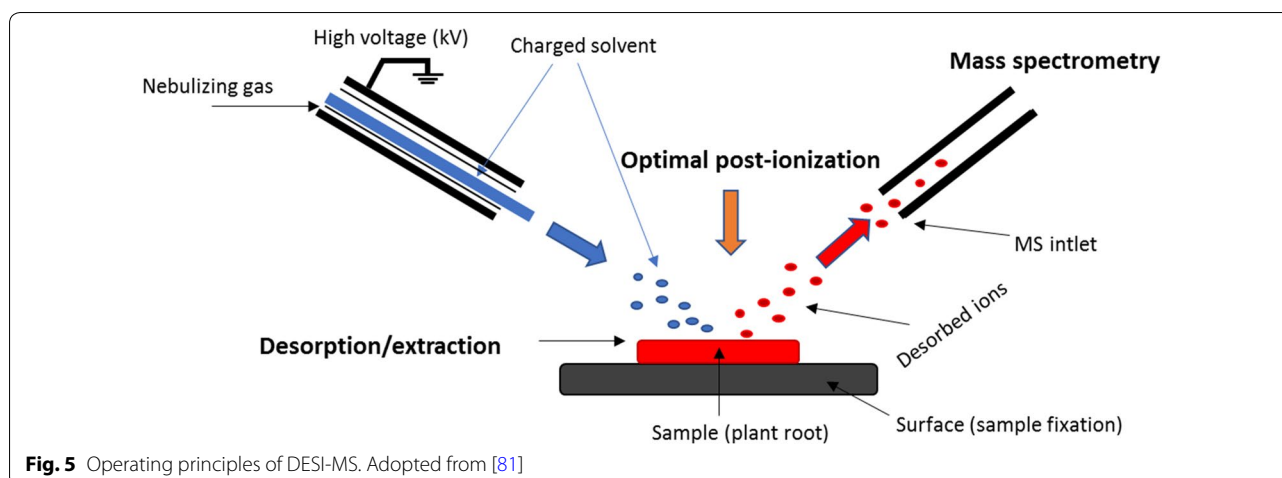
Mass spectrometric techniques are currently indispensable tools for SL detection. A wide range of techniques suitable for diverse applications are available. In recent years, several research groups studying SLs have used a TOF (time of flight) mass analyser together with a tandem mass spectrometry (MS/MS) setup that enables fragmentation of separated compounds and analysis of the resulting ionized fragments [28, 48].

An overlooked technique is LC coupled with on-line NMR, which enables real-time detection and detailed characterization of the eluting compounds, including determination of factors such as their stereochemical properties [56]. Unfortunately, its sensitivity and selectivity are much lower than those of MS methods, so it is mainly used for nonselective analysis. The sensitivity

of NMR can be improved by using dynamic molecular polarization or cryo- and microprobes [57, 58]. However, even these refinements are insufficient to match the sensitivity and selectivity of MS-based methods, which can detect target analytes in the pmol to fmol range [59, 60]. On the other hand, NMR offers very high reproducibility and requires minimal sample preparation [57]. It is therefore often used in metabolomic fingerprinting studies that focus on identifying and quantifying compounds associated with drug metabolism and food intake, and for NMR-based metabolomics in phytochemical studies [59–61].

### MS ambient techniques

Other important modern methods are ambient techniques (AT) such as DART (direct analysis in real time) and DESI (desorption electrospray ionization) [62, 63], which can be used to determine the spatial distribution of target compounds in a sample. These relatively new mass spectrometric techniques use an ion source located outside the mass analyser and are suitable for a wide range of low molecular mass compounds. A huge advantage of DART is that it requires minimal or even no sample preparation; small tissue samples or crude extracts can be introduced directly into the ion source [64], (Fig. 4). However, the reproducibility of AT techniques can be limited by problems resulting from outer ionization. AT techniques could potentially serve as the basis of a general fast identification method suitable for detecting SLs in various plant tissues (stems, roots, and leaves). However, many issues remain to be addressed including problems with sample shrinkage (due to losses of water), which changes the nature of the tissue surface [65–68]. Also, each plant organ has a unique structure and thus requires separate process optimization. Coupling DART with HRMS (high resolution mass spectrometry) could make it possible to determine the mass ( $m/z$ ) of any compound in a plant tissue sample with relatively high mass accuracy (below 1 ppm).



DESI is a mass spectrometry imaging (MSI) technique that provides information about the spatial distribution of target analytes [69] by combining electrospray ionization (ESI) and desorption ionization. It is particularly suitable for low molecular weight compounds such as SLs. The sample to be analysed is fixed or imprinted (Fig. 5) onto the solid surface of a plate, which can be a TLC plate or a plate made from porous Teflon, paper, glass, or plastic [69–71].

The key advantages of MSI (DESI) are that it requires minimal sample manipulation and no separation steps. However, it is very sensitive to matrix effects, which can significantly affect the observed spatial distribution of analytes. In particular, physical properties (roughness on the surface of the analysed sample) can profoundly affect the analysis and the reliability of results obtained using this method [72–74]. Rejšek et al. [74] recently showed that DESI-MS can also be applied to non-planar samples by using an ion source with a laser triangulation system. This upgraded DESI setup obviates the need for chemical pretreatment of samples or sample preparation by imprinting. Moreover, it preserves the native spatial distribution of SLs and other target compounds in the sample.

Another important MSI technique is laser ablation electrospray ionization (LAESI), which was introduced in 2007 [75]. This method also achieves high spatial resolutions (below 1  $\mu\text{m}$ ) and has been used to perform quantitative analyses of tissue samples from several plants. For example, it was used to study arginine levels in *A. cepa* bulbs [76]. However, like DESI, it is limited by being much less well-developed than MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization). While DESI and LAESI cannot yet match the resolution achieved with MALDI, they are potentially powerful tools for analysing plant metabolomes and could thus help answer a number of

outstanding questions about chemical organization in plants [68, 77, 78]. Plant hormones occur in minute quantities, so that sensitive analytical tools are required for their analyses. The major limitation of MS ambient techniques is their low sensitivity, which could be improved by increasing either the ionization efficiency or the sensitivity of ion detection. To assess the potential of DART- and DESI-MS we are currently finalizing a method paper that discusses this issue.

## Conclusions

Chemical analysis is central to research on the biochemistry of SLs and their roles in plant development and physiology. Before performing any such analysis, it is essential to know at least the main chemical properties of the target analytes, such as their structures, stability under certain conditions, and chemical reactivity, as well as the levels at which they exist in the tissues of interest. This review summarized the different methods that have been used to isolate and purify SLs from root tissues and exudates, and to identify the SLs present in the resulting isolates. The advantages and drawbacks of each method have been highlighted, which should be valuable information for plant scientists seeking to study these phytohormones. Additionally, we have presented guidelines for protocol selection that should help minimize losses during isolation and purification prior to final analysis.

Qualitative and especially quantitative analyses of SLs are needed to clarify their roles in regulating plant development and their interactions with other phytohormones. Of the techniques available for this purpose, LC–MS/MS continues to be the most generally useful and widely used [79]. However, more recently developed highly sensitive analytical methods such as HR-DART-MS and HR-DESI-MS can provide information that

cannot be obtained using LC-MS/MS, such as data on the spatial distribution of target analytes. As such, they could be valuable complementary tools for semi-quantitative analysis of SLs. Additionally, these methods require little or no sample preparation, enabling rapid analysis with minimal risk of analyte degradation.

#### Acknowledgements

This work was supported by institutional support MZE-RO0418. PT was supported also from ERDF project “Plants as a tool for sustainable global development” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000827). BK was supported from CEITEC 2020 (LQ1601) with additional financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the National Sustainability Programme II. The authors are grateful to Sees-editing Ltd. (UK) and Prof. Peter Hedden for editing the manuscript.

#### Authors' contributions

RH and PT proposed the idea of the manuscript and wrote the outline. All authors wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

This work was supported by institutional support MZE-RO0418. PT was supported also from ERDF project “Plants as a tool for sustainable global development” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000827). BK was supported from CEITEC 2020 (LQ1601) with additional financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the National Sustainability Programme II.

#### Availability of data and materials

Not applicable

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declared that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup> Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Phytochemistry, Faculty of Science, Palacky University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czechia. <sup>2</sup> Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Šlechtitelů 29, 78371 Olomouc, Czechia. <sup>3</sup> Central European Institute of Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czechia. <sup>4</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czechia.

Received: 30 March 2020 Accepted: 15 May 2020

Published online: 29 May 2020

#### References

- Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH, Bouwmeester HJ. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol*. 2005;139:920–34.
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egle GH. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*. 1966;154:1189–90.
- Xie X, Yoneyama K, Yoneyama K. The strigolactone story. *Ann Rev Phytopatol*. 2010;48:93–117.
- Nomura S, Nakashima H, Mizutani M, Takikawa H, Sugimoto Y. Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds. *Plant Cell Rep*. 2013;32:829–38.
- Proust H, Hoffmann B, Xie XN, Yoneyama K, Schaefer DG, Yoneyama K, Nogue F, Rameau C. Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*. 2011;138:1531–9.
- Cook CE, Whichard LP, Wall ME, Egle GH, Coggon P, Luhan PA, McPhail AT. Germination stimulants. II. The structure of strigol-a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea* Lour.). *J Amer Chem Soc*. 1972;94:6198–9.
- Al-Babili S, Bouwmeester HJ. Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Ann Rev Plant Biol*. 2015;66:161–6.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. 2005;435:824–7.
- Zhang Y, van Dijk AD, Scaffidi A, Flematti GR, Hofmann M, Charnikhova T, Verstappen F, Hepworth J, van der Krol S, Leyser O, Smith SM, Zwanenburg B, Al-Babili S, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ. Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat Chem Biol*. 2014;10:1028–33.
- Joel DM. The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. *Crop Prot*. 2000;19:753–8.
- Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, Ruyter-Spira C. Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2011;155:974–87.
- Xie X. Structural diversity of strigolactones and their distribution in the plant kingdom. *Pest Sci*. 2016;41:175–80.
- Halouzka R, Tarkowski P, Zwanenburg B, Čavar Zeljković S. Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles. *Pest Manag Sci*. 2018;74:896–904.
- Zwanenburg B, Pospíšil T. Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Mol Plant*. 2013;6:38–62.
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol*. 2008;179:484–94.
- Ueno K, Furumoto T, Umeda S, Mizutani M, Takikawa H, Batchvarova R, Sugimoto Y. Helioslactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry*. 2014;108:122–8.
- Xie X, Mori N, Yoneyama K, Nomura T, Uchida K, Yoneyama K, Akiyama K. Lotuslactone, a non-canonical strigolactone from *Lotus japonicus*. *Phytochemistry*. 2019;157:200–5.
- Sato D, Awad AA, Chae SH, Yokota T, Sugimoto Y, Takeuchi Y, Yoneyama K. Analysis of strigolactones, germination stimulants for *Striga* and *Orobanch*, by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2003;51:1162–8.
- Podlešáková K, Tarkowská D, Pěnčík A, Oklešťková J, Turečková V, Floková K, Tarkowski P. Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem Listy*. 2012;106:373–9.
- Tarkowská D, Novák O, Floková K, Turečková V, Grúz J, Rolčík J, Strnad M. Quo vadis plant hormone analysis? *Planta*. 2014;240:55–76.
- Novák O, Tarkowski P, Tarkowská D, Doležal K, Lenobel R, Strnad M. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2003;480:207–18.
- Tarkowski P, Ge L, Yong JWH, Tan SN. Analytical methods for cytokinins. *Trend Anal Chem*. 2009;28:323–35.
- Delaux PM, Xie XN, Timme RE, Puech-Pages V, Dunand C, Lecompte E, Delwiche CF, Yoneyama K, Becard G, Sejalón-Delmas N. Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytol*. 2012;195:857–71.
- Cardoso C, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ. Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanch* and *Phelipanche* spp. *Plant Sci*. 2011;180:414–20.
- Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Uchida K, Ito S, Akiyama K, Hayashi H, Yokota T, Nomura T, Yoneyama K. Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Mol Plant*. 2013;6:153–63.

26. Šimura J, Antoniadis I, Široká J, Tarkowska D, Strnad M, Ljung K, Novák O. Plant Hormonomics: multiple phytohormone profiling by targeted metabolomics. *Plant Phys.* 2018;177:476–89.
27. Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y. Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobancha minor*, from its host red clover. *Phytochemistry.* 1998;49:1967–73.
28. Charnikhova TV, Gaus K, Lumbroso A, Sanders M, Vincken JP, De Mesmaeker A, Ruyter-Spira CP, Screpanti C, Bouwmeester HJ. Zealactones. Novel natural strigolactones from maize. *Phytochemistry.* 2017;137:123–31.
29. Rial C, Varela RM, Molinillo JMG, López-Ráez JA, Macías FA. A new UPLC-MS/MS method for the direct determination of strigolactones in root exudates and extracts. *Phytochem Anal.* 2018;30:110–6.
30. Awad AA, Sato D, Kusumoto D, Kamioka H, Takeuchi Y, Yoneyama K. Characterization of strigolactones for the root parasitic plants *Striga* and *Orobancha*, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regul.* 2006;48:221–7.
31. Kisugi T, Xie XN, Kim HI, Yoneyama K, Sado A, Akiyama K, Hayashi H, Uchida K, Yokota T, Nomura T, Yoneyama K. Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*. *Phytochemistry.* 2013;87:60–4.
32. Yoneyama K, Arakawa R, Ishimoto K, Kim HI, Kisugi T, Xie X, Nomura T, Kanampiu F, Yokota T, Ezawa T, Yoneyama K. Difference in *Striga*-susceptibility is reflected in strigolactone secretion profile, but not in compatibility and host preference in arbuscular mycorrhizal symbiosis in two maize cultivars. *New Phytol.* 2015;206:983–9.
33. López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, De Vos R, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulder P, Bouwmeester H. Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol.* 2008;178:863–74.
34. Yoneyama K, Xie X, Nomura T, Yoneyama K. Extraction and measurement of strigolactones in sorghum roots. *Bio-protocol.* 2016;2016(6):e1763.
35. Boutet-Mercey S, Perreau F, Roux A, Clavé G, Pillot JP, Schmitz-Afonso I, Touboul D, Mouille G, Rameau C, Boyer FD. Validated method for strigolactone quantification by ultra high-performance liquid chromatography—electrospray ionisation tandem mass spectrometry using novel deuterium labelled standards. *Phytochem Anal.* 2018;29:59–68.
36. Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 2003;132:44–51.
37. Merbach W, Mirus E, Knof G, Remus R, Russow R, Gransee A, Schulze J. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *J Plant Nutr Soil Sci.* 1999;162:373–83.
38. Bagger CL, Sørensen H, Sørensen JC. High-quality oils, proteins, and bioactive products for food and non-food purposes based on biorefining of cruciferous oilseed crops. In: Gueguen J, Popineau Y, editors. *Plant proteins from European crops*. Berlin: Springer; 1998. p. 272–8.
39. Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root culture. *Plant Cell Rep.* 2012;31:461–77.
40. Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta.* 2007;225:1031–8.
41. Yoneyama K, Xie X, Kusumoto D, Sekimoto H, Sugimoto Y, Takeuchi Y. Yoneyama K Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta.* 2007;227:125–32.
42. Jamil M, Charnikhova T, Cardoso C, Jamil T, Ueno K, Verstappen F, Asami T, Bouwmeester HJ. Quantification of the relationship between strigolactones and *Striga hermonthica* infection in rice under varying levels of nitrogen and phosphorus. *Weed Res.* 2011;51:373–85.
43. Yoneyama K, Xie X, Kisugi T, Nomura T, Yoneyama K. Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta.* 2013;238:885–94.
44. Yoneyama K, Xie X, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K. Characterization of strigolactones exuded by *Asteraceae* plants. *Plant Growth Regul.* 2011;65:495–504.
45. Foo E, Yoneyama K, Hugill CJ, Quittenden LJ, Reid JB. Strigolactones and the regulation of pea symbioses in response to nitrate and phosphate deficiency. *Mol Plant.* 2013;6:76–87.
46. Cavar S, Zwanenburg B, Tarkowski P. Strigolactones: occurrence, structure and biological activity in the rhizosphere. *Phytochem Rev.* 2015;14:691–711.
47. Erickson J, Schott D, Reverri T, Muhsin W, Rutledge T. GC-MS Analysis of hydrophobic root exudates of Sorghum and implications on the parasitic plant *Striga asiatica*. *J Agric Food Chem.* 2001;49:5537–42.
48. Xie X, Kisugi T, Yoneyama K, Nomura T, Akiyama K, Uchida K, Yokota T, McElean CSP, Yoneyama K. Methyl zealactonoate, a novel germination stimulant for root parasitic weeds produced by maize. *J Pestic Sci.* 2017;42:58–61.
49. Xie X, Yoneyama K, Kusumoto D, Yamada Y, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K. Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a novel germination stimulant for root parasitic plants. *Phytochemistry.* 2008;69:427–31.
50. Siame BA, Weerasuriya Y, Wood K, Ejeta G, Butler LG. Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *J Agri Food Chem.* 1993;41:1486–91.
51. Jamil M, Kanampiu FK, Karaya H, Charnikhova T, Bouwmeester HJ. *Striga hermonthica* parasitism in maize in response to N and P fertilisers. *Field Crops Res.* 2012;134:1–10.
52. Iseki M, Shida K, Kuwabara K, Wakabayashi T, Mizutani M, Takikawa H, Sugimoto Y. Evidence for species-dependent biosynthetic pathways for converting carlactone to strigolactones in plants. *J Exp Bot.* 2018;69:2305–18.
53. López-Ráez JA, Kohlen W, Charnikhova T, Mulder P, Undas AK, Sergeant MJ, Verstappen F, Bugg TDH, Thompson AJ, Ruyter-Spira C, Bouwmeester H. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytol.* 2010;187:343–54.
54. Ayare P, Khanvilkar V, Chalak N. Flash Chromatography: area & Applications. *Pharma Tutor.* 2014;2:89–103.
55. Schulte M, Dingenen J. Monolithic silica sorbents for separation of diastereomers by means of simulated moving bed chromatography. *J Chromatogr A.* 2001;923:17–25.
56. Linton JC, Bailey NJC, Nicholson JK, Wilson ID. Biomedical applications of directly-coupled chromatography-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS). In: Wilson D, editor. *Handbook of analytical separations, vol. 4*. Amsterdam: Elsevier; 2003. p. 293–329.
57. Emwas AMS, Salek RM, Griffi JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics.* 2013;9:1048–72.
58. Emwas AHMS. The strengths and weaknesses of nmr spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Method Mol Biol.* 2015;1277:161–93.
59. Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry.* 2003;62:817–36.
60. Bedair M, Sumner LW. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trac-Trend Anal Chem.* 2008;27:238–50.
61. Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem Rev.* 2007;6:3–14.
62. Venter A, Nefliu M, Cooks RG. Ambient desorption mass spectrometry. *Trac Trend Anal Chem.* 2008;27:284–90.
63. Weston DJ. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst.* 2010;135:661–8.
64. Gross JH. Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406:63–80.
65. Cha S, Zhang H, Ilarsla HI, Wurtele ES, Brachova L, Nikolau BJ, Yeung ES. Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Plant J.* 2008;55:348–60.
66. Nemes P, Barton AA, Vertes A. Three-dimensional imaging of metabolites in tissues under ambient conditions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2009;81:6668–75.
67. Navare AT, Mayoral JG, Nouzova M, Noriega FG, Fernández FM. Rapid direct analysis in real time (DART) mass spectrometric detection of juvenile hormone III and its terpene precursors. *Anal Bioanal Chem.* 2010;398:3005–13.

68. Dong Y, Lin B, Malitsky B, Rogachev I, Aharoni A, Kaftan F, Svatoš A, Franceschi P. Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: a review. *Front Plant Sci.* 2016;7(60):1–16.
69. Thunig J, Hansen SH, Janfelt C. Analysis of secondary plant metabolites by indirect desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83:3256–9.
70. Venter A, Sojka PE, Cooks RG. Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2006;78:8549–55.
71. Ifa D, Srimany A, Eberlin LS, Naik HR, Bhat V, Cooks RG, Thalappil P. Tissue imprint imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Method.* 2011;3:1910–2.
72. Takats Z, Wiseman JM, Cooks RG. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J Mass Spectrom.* 2005;40:1261–75.
73. Ifa DR, Manicke NE, Rusine AL, Cooks RG. Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22:503–10.
74. Rejšek J, Vrkoš V, Pokorný V, Přibyl V, Cvačka J. Ion source with laser triangulation for ambient mass spectrometry of nonplanar samples. *Anal Chem.* 2017;89:11452–9.
75. Nemes P, Vertes A. Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. *Anal Chem.* 2007;79:8098–106.
76. Shrestha B, Patt JM, Vertes A. In situ cell-by-cell imaging and analysis of small cell populations by mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83:2947–55.
77. Shroff R, Schramm K, Jeschke V, Nemes P, Vertes A, Gershenzon J, Svatoš A. Quantification of plant surface metabolites by matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry imaging: glucosinolates on *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* 2015;81:961–72.
78. Bartels B, Svatoš A. Spatially resolved in vivo plant metabolomics by laser ablation-based mass spectrometry imaging (MSI) techniques: LDI-MSI and LAESI. *Front Plant Sci.* 2015;6:471.
79. Wang L, Zou Y, Kaw HY, Wang G, Sun H, Cai L, Li C, Meng L-Y, Li D. Recent developments and emerging trends of mass spectrometric methods in plant hormone analysis: a review. *Plant Methods.* 2020;16:54.
80. Cody RB, Laramée JA, Durst HD. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem.* 2005;77:2297–302.
81. Hiraoka K, Mori K, Asakawa D. Fundamental aspects of electrospray drop-let impact/SIMS. *J Mass Spectrom.* 2006;41:894–902.
82. Xie X, Yoneyama K, Kurita J-Y, Harada Y, Yamada Y, Takeuchi Y. 7-Oxo-orobanchyl acetate and 7-oxo-orobanchol as germination stimulants for root parasitic plants from flax (*Linum usitatissimum*). *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009;73:1367–70.
83. Sato D, Awad AA, Takeuchi Y, Yoneyama K. Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobancha*, produced by cotton. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69:98–102.
84. Xie X, Kusumoto D, Takeuchi Y, Yoneyama K, Yamada Y, Yoneyama K. 2'-Epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *J Agric Food Chem.* 2007;55:8067–72.
85. Yoneyama K, Awad AA, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y. Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol.* 2010;51:1095–103.
86. Abe S, Sado A, Tanaka K, Kisugi T, Asami K, Ota S, Kim HI, Yoneyama K, Xie X, Ohnishi T, Seto Y, Yamaguchi S, Akiyama K, Yoneyama K, Nomura T. Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in *Arabidopsis* and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2014;111:18084–9.
87. López-Ráez JA, Charnikova T, Mulder P, Kohlen W, Bino R, Levin I, Bouwmeester H. Susceptibility of the tomato mutant high pigment-2dg (hp-2dg) to *Orobancha* spp. infection. *J Agric Food Chem.* 2008;56:6326–32.
88. Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J, Yamaguchi S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature.* 2008;455:195–200.
89. Kim HI, Kisugi T, Khetkam P, Xie X, Yoneyama K, Uchida K, Yokota T, Nomura T, McElean CSP, Yoneyama K. Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*. *Phytochemistry.* 2014;103:85–8.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



***Příloha 3 – prvoautorská publikace***

Halouzka R., Tarkowski P, Zwanenburg B., Zeljkovic SC. (2018). Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles. *Pest Manage Sci.* **74**,896-904.

## Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles

Rostislav Halouzka<sup>a</sup>, Petr Tarkowski<sup>a,b</sup>, Binne Zwanenburg<sup>c</sup> and Sanja Čavar Zeljković<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre of Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Central Laboratories and Research Support, Faculty of Science, Palacky University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Šlechtitelů 29, 78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Organic Chemistry, Institute for Molecules and Materials, Radboud University Nijmegen, Heyendaalseweg 135, 6525 AJ Nijmegen, The Netherlands

\*Corresponding author. E-mail: sanja.cavar@upol.cz; sanjacavar.sc@gmail.com

**Running title:** Stability of GR24

### Abstract

**BACKGROUND:** Strigolactones (SLs) are plant hormones that play various roles in plant development. The chemical stability of SLs depends on the solvent, pH, and the presence of nucleophiles. Hydrolysis leads to detachment of the butenolide ring, and plays a crucial role in the initial stages of the signal-transduction process occurring between the receptor and the SL signaling molecule.

**RESULTS:** To date, two different mechanisms have been proposed for SL hydrolysis. Results obtained from kinetic, thermodynamic, and mass spectral data of the reaction between widely used synthetic strigolactone analog GR24 and seven different nucleophiles, demonstrate that the reaction proceeds via the Michael addition-elimination mechanism.

**CONCLUSIONS:** This paper provides valuable information on the chemical stability of GR24 in different plant growing media and buffers. Such information is valuable for scientists using GR24 treatments to study SL-regulated processes in plants.

**Keywords:** strigolactones; GR24; stability; chemical kinetics; UHPLC-MS/MS

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/ps.4782

## 1. INTRODUCTION

Strigolactones (SLs) are compounds classified as plant hormones.<sup>1</sup> For more than 60 years, SLs have been known as signaling molecules that are involved in the stimulation of seed germination of parasitic plants belonging to the *Striga* and *Orobanche* (*Phelipanche*) families.<sup>2</sup> Seeds of these parasitic plants germinate only when they are exposed to SLs produced by their plant host. SLs also play a crucial role in the symbiosis between higher plants (compared with the parasitic plants) and arbuscular mycorrhizal fungi.<sup>3</sup> In addition, SLs affect many physiological processes (such as regulation of secondary growth, adventitious root formation, shoot branching, and development) in plants.<sup>4</sup>

Plant roots are the main site of SL biosynthesis,<sup>1,5</sup> where extremely low quantities ( $10^{-7}$ – $10^{-15}$  M) of SLs are exuded into the rhizosphere.<sup>6–7</sup> The chemical structure of SLs (Figure 1) contains a tricyclic lactone (ABC-scaffold) that is connected to a butenolide (D-ring) by an enol-ether bridge.<sup>8,9</sup> The C-D ring moiety is essential for biological activity toward parasitic seeds and arbuscular mycorrhizal fungi.<sup>8–11</sup> Some naturally occurring SLs with oxo and hydroxy groups in the AB-moiety also exhibit considerable stimulant activity for hyphal branching.<sup>12</sup> Zhang et al.<sup>13</sup> demonstrated that the enzymes responsible for structural diversification of SLs may lead to modification of the SL composition produced by plant in certain time and plant organ.

The chemical stability of SLs depends on experimental conditions, such as the solvent, pH, and the presence of nucleophiles, and must be considered in a study of SLs. SLs are stable in root exudates, which are usually composed of an oily mixture of various chemicals that play a key role in the plant defense against pathogenic attack.<sup>14</sup> In contrast, SLs exhibit limited stability in aqueous solutions and may decompose during expulsion (via several extraction and chromatographic steps) from these solutions.

At present, two main families of natural SLs are known, namely the strigol family and the orobanchol family with (+)-strigol and (-)-orobanchol BC stereochemistry, respectively (see Figure 1). The structure of natural SLs is rather complex and accordingly SL synthesis requires many steps. For example, at least 20 steps are required for the synthesis of enantiopure (+)-strigol.<sup>8,15</sup>

The preparation of synthetic SL analogs with the same bioactophore as natural ones constitutes an important development in SL research. These synthetic analogs exhibit a somewhat lower activity, but usually a higher stability, than their natural counterparts.<sup>12, 16</sup> One of the most potent and commonly used SL analog is GR24, a synthetic analog of strigol, which was invented by Gerald Rosebery.<sup>17</sup> GR24 is widely available and is used as the

standard for investigating the role of SLs in plant development. Several other synthetic analogs are now available (see Figure 1 for some of these analogs). Compared with the natural SLs, these analogs allow more detailed studies of SLs, especially the stability toward hydrolysis under a variety conditions.

However, little is known about their behavior in aqueous conditions. The hydrolytic stability of GR5 over a range of pH values was measured in 1976, and the results showed that hydrolysis increases with increasing pH.<sup>18</sup> Johnson et al.<sup>17</sup> and Babiker et al.<sup>19</sup> showed that GR24 is rapidly hydrolyzed at alkaline pH. In contrast, the rate of hydrolysis decreases significantly when alcohol is used as a co-solvent.<sup>20</sup> The half-life of GR24 is ~10 days in 3% MeOH<sup>12</sup> and ~15 days in aqueous 20% EtOH. On the other hand, negligible hydrolysis occurs at pH values of 5.0–6.3.<sup>20-21</sup> Naturally occurring solanacol, solanacyl acetate, and 5-deoxystrigol were also investigated. Half-lives of 2 days and 4 days were determined for solanacol and solanacyl acetate, respectively, in a mixture of ethanol and water (1:4; v/v).<sup>20</sup> A half-life of 1.5 day was determined for 5-deoxystrigol in 3% MeOH.<sup>12</sup>

The first-ever mechanism for the hydrolysis of SLs (Figure 2) was proposed in 1992.<sup>10</sup> This mechanism is characterized by several steps. In the first step, a nucleophile is added to the enol ether unit (an element occurring in all natural and synthetic SLs) through a Michael addition. Subsequent elimination, as shown in Scheme 1 (Pathway A), leads to detachment of the D-ring moiety. When a nucleophilic agent is used, the addition product can be isolated. Scaffidi et al.<sup>22</sup> proposed an alternative mechanism (Pathway B) for D-ring detachment, based on the assumed similarity between the reaction of nucleophiles with SLs and the reaction of nucleophiles with karrikins, although the substitution pattern of the butenolide ring occurring in karrikins differs significantly from that of the ring occurring in SLs (Figure 2). The detachment of the hydroxy D-ring via both pathways A and B for the reaction with water (Nu = H<sub>2</sub>O, Figure 2), yields the formyl-substituted ABC scaffold. Indeed, Hamiaux et al.<sup>23</sup> observed this product and the hydroxy butenolide for the hydrolysis of GR24.

The hydrolysis process plays a crucial role in the initial stages of the signal-transduction process involving  $\alpha/\beta$  hydrolases.<sup>23</sup> The D14/AtD14/DAD2, i.e., rice D14, *Arabidopsis thaliana* (At)D14, and petunia DECREASED APICAL DOMINANCE (DAD2), were proved to be the SL-signal receptors. The D14 orthologs consist of a conserved catalytic triad (Ser-His-Asp), which plays a key role in SL hydrolysis and the signal transduction.<sup>23-25</sup> It was confirmed that, owing to its enzymatic activity, the SL receptor cleaves the hydroxy D-ring from the SL ligand.<sup>26-27</sup>

In this work, the chemical stability of GR24 was examined in different cultivation media and buffers commonly used in plant experimental biology. The aim of the study is to provide biologists with information about GR24 features that may affect the design of experiments involving plant treatment with aqueous solutions of GR24. In addition, the hydrolysis of GR24 in the presence of different nucleophiles was investigated and some of the first-ever determined thermodynamic and kinetic parameters of this reaction are presented. The data demonstrate that hydrolysis of SLs in aqueous solutions is governed by an addition-elimination mechanism.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Determining the stability of GR24 in different media and buffers

All measurements of the chemical stability of GR24 were performed with an Agilent Cary 8454 (Santa Clara, California, USA) spectrophotometer. A solution containing 5  $\mu$ L of GR24 (0.01 M in DMF) was mixed with 2995  $\mu$ L of medium or buffer, and the mixture was stirred magnetically. All measurements were monitored at 239 nm for 24 h at 25 °C, with readings every 60 min.

Hoagland medium as well as Murashige and Skoog (MS) medium were prepared according to protocols described in the literature.<sup>28–29</sup> The concentration of phosphate ions (0.025–0.25 M) in the Hoagland medium was varied in these experiments. HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), phosphate, phosphate-citrate, MES (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid), and Tris-HCl buffers (pH 7.0) were prepared in 0.1 M concentrations and stored in the dark at 4 °C. Citrate, phosphate, formate, and acetate buffers (pH 6.0; 0.01 M) were obtained under the same conditions. The effect of the concentration (0.10–1.00 M) of the phosphate buffer (pH 6.0) was determined.

The chemicals (Sigma-Aldrich Chemical Company, Germany) used were all of the highest purity available. GR24 was synthesized in our laboratory (Radboud University Nijmegen, The Netherlands). Deionized water (18.2 M $\Omega$ /cm, Direct-Q; Millipore, Molsheim, France) was used as a blank for all tests, as well as in the preparation of aqueous solutions.

### 2.2 Determination of kinetic parameters associated with the reaction between GR24 and different nucleophiles

The reaction of GR24 (33 mM) with 10 equivalents of nucleophile (benzylamine, imidazole, methanol) in different solvents (acetone, acetonitrile, methanol, and ethanol) was monitored spectrophotometrically (Agilent Cary 8454; Santa Clara, California, USA). The measurements were performed at 240 nm for 24 h at 30 °C, with 30-min reading intervals. All experiments were performed in triplicate and, in each case, the reaction mixtures were stirred magnetically.

To determine the activation parameters of the reaction, GR24 (33 mM) was mixed with 10 equivalents of nucleophiles (*p*-anisidine, benzylamine, 4-methoxybenzylamine, benzyl mercaptan, thiophenol, aniline, imidazole, and ammonium hydroxide) in methanol and the reaction progress was monitored spectrophotometrically (Shimadzu UV-2450 PC (SHIMADZU Handels GmbH, Kyoto, Japan). The measurements were monitored at 240–244 nm for 3 h at 25, 30, 35, and 40 °C, with 5–15-min reading intervals. The reaction mixture was stirred magnetically during each experiment. Methanol was used as a blank.

Absorption spectra of the reaction mixtures were recorded at wavelengths ranging from 200 to 450 nm. Thermodynamic parameters, such as the activation energy ( $E_a$ ), enthalpy of activation ( $\Delta H^\ddagger$ ), entropy of activation ( $\Delta S^\ddagger$ ), and Gibbs energy of activation ( $\Delta G^\ddagger$ ), were calculated via the Arrhenius method.

The progress of the reaction was monitored on a Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japan) coupled with a MS-8050 (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japan). Chromatographic separation was performed with a AQUILITY BEH C8 analytical column (150 × 2.1 mm; 1.7 μm; Waters, Milford, MA, USA), under the following conditions: temperature of the column thermostat: 40 °C, flow rate: 0.25 mL/min. The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B) with elution as follows: 20% B for 1 min, 60% B 4.50 min, to 80% over 6.30 min, isocratic 80% B for 1 min, with gradient to 20% B for 0.4 min and stabilized at this condition for 3.4 min. The mass spectra were obtained via electrospray ionization in positive mode with the following operating parameters: capillary voltage -3000 V; interface voltage 4 kV; full scan 50–500 *m/z*; interface temperature 300 °C, heating and drying gas flow 10 L/min; nebulizing gas flow 3 L/min. The MS/MS spectra of the protonated molecular ions ( $M+H^+$ ) were acquired.

The chemicals used (Sigma-Aldrich Chemical Company, Germany) were of the highest purity available.

### 2.3 Synthesis of reaction products

The reaction products were synthesized in accordance with published protocols.<sup>[9]</sup> During synthesis, 0.015 mol of GR24 was mixed with 0.023 mol of methoxybenzylamine in 400  $\mu$ L of ethanol. Another reaction mixture contained GR24 and benzylamine (as the nucleophile) in the same amounts. These mixtures were stirred at room temperature for 24 h under nitrogen.

The reaction products were extracted with ethyl acetate, dried under nitrogen. Furthermore, the structure of each product was determined from MS collision spectra obtained on a LCMS-8050 (Shimadzu, Handels GmbH, Kyoto, Japan), and via analysis of <sup>1</sup>H-NMR spectra recorded on a 500 MHz Jeol ECA-500.

*3-[(Phenylamino)methylidene]-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno [1,2-b]furan-2-one*. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  2.06 (s, 1H), 3.35–3.40 (m, 2H), 4.48 (d,  $J$  = 5.8 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.85–5.23 (m, NH), 5.77 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 6.77–6.83 (m, 5H). ESI-MS: 292.05 [M+H]<sup>+</sup>, 274.10 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 183.05 [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>, 91.10 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>.

*3-[[4-methoxyphenyl]amino]methylidene}-3,3a,4,8b-tetrahydro-2H-indeno[1,2-b]furan-2-one*. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  2.07 (s, 1H), 3.38–3.42 (m, 2H), 3.66 (s, OMe), 4.44 (d,  $J$  = 5.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 4.78–5.19 (m, NH), 5.74 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.65–6.79 (m, 5H). ESI-MS: 321.14 [M+H]<sup>+</sup>, 121.10 [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>O]<sup>+</sup>, 91.10 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Generally, many biological experiments with SLs are performed in cultivation media or aqueous buffers and determining the stability of SLs under such conditions is essential. Hence, the stability of GR24 in a Hoagland medium (a nutrient solution containing different amounts and types of inorganic salts that are essential for plant growth)<sup>28</sup> with different concentrations of phosphates, and Murashige and Skoog medium<sup>29</sup> with and without sucrose was determined. Spectrophotometric monitoring of the GR24 concentration at 239 nm for 24 h (Figure 3) revealed a relatively small decrease in concentration. For example, 10% (maximum) of GR24 decomposed in the  $\frac{1}{2}$  Hoagland medium with a phosphate concentration of 50–250  $\mu$ M. GR24 exhibited very high stability in  $\frac{1}{4}$  Hoagland medium with and without 25  $\mu$ M of phosphate. The Murashige and Skoog medium, with and without sucrose, was also found to be suitable for experiments with GR24, i.e., after 24 h, only 3–5% of GR24 decomposed in these media.

The results show that increased decomposition of GR24 can be expected in such trials, especially in the phosphate-containing Hoagland medium. For example, a 10 mM phosphate buffer combined with methanol (3:1) decreases the half-life of GR24 stability by 9 h.<sup>30</sup> We assume that phosphate ions act as nucleophiles in the same manner as the other nucleophiles considered in this study (results shown below). Therefore, the concentration of these ions will have an influence on the chemical stability of both GR24 and naturally occurring SLs. The concentration of SLs in root exudates is affected by the concentration of phosphates in growing media. Phosphate-free plant treatments are commonly used to obtain increased SL yields from root exudates.<sup>31–33</sup> According to López-Ráez et al.<sup>31</sup>, a minimum period of 24 h is required for revealing the difference in SL concentrations in plant treatments with and without phosphate.

Interestingly, the question remains whether increased concentrations of SLs arise from phosphate starvation or from their limited decomposition in the presence of low phosphates in a growing medium.

The hydrolytic stability of GR24 in buffers at two different pH values, pH 6.0 (Figure 4A) and pH 7.0 (Figure 4B), was also determined. The buffers were selected based on their buffering capacity at these pH values. Mili-Q water was used as a control, where GR24 has a half-life of ~11 days. This concurs with previously published data.<sup>12</sup> The concentration of GR24 in buffers with a pH of 6.0 (acetate, phosphate, formate, and citrate), and some with a pH of 7.0 (phosphate, phosphor-citrate, and MES) decreased by 5% within 24 h. This indicates that these buffers are suitable for short-term storage and experiments with GR24. In contrast, the concentration of GR24 in HEPES and Tris-HCl buffers (pH 7.0) decreased by 15–25% after 24 h of measurement. Both molecules, HEPES and Tris-HCl, contain electron donor moieties that can act as nucleophiles, thereby hydrolyzing the SL molecule and, hence, these buffers are unsuitable for experiments with SLs.

The hydrolytic stability of GR24 and 5-deoxystrigol in these buffers was also monitored for 96 hours and results consistent with those presented above were obtained. Consistent with data presented in the literature,<sup>12</sup> 5-Deoxystrigol was considerably less stable than GR24, especially in the Tris-HCl buffer (pH 7.0), where 5-deoxystrigol decomposes more than 95 % after 96 hours of monitoring (Figure 5A). Stability of 5-deoxystrigol in selected buffers at pH 6.0 is summarized in Figure 5B, where the highest decomposition was observed in formate buffer.

Kannan and Zwanenburg<sup>21</sup> determined the hydrolytic stability of various synthetic SL analogs in ammonium acetate (5 mM; pH=6.0), and estimated a half-life of ~6 days for GR24. They also showed that SLs were rapidly hydrolyzed at pH >7.5. This indicates that differences in pH, solvent composition, and temperature affect the half-life of GR24. Consequently, those media can be used in SL research, although long-term storage will lead to a decrease in the concentration of SL.

The hydrolysis of SLs in nucleophile-containing solutions was further evaluated, by considering several nucleophiles in four different solvent systems, i.e., acetonitrile, acetone, ethanol, and methanol. The progress of the reaction was monitored spectrophotometrically (at 240 nm) for 24 h at 30 °C, in 30-min reading intervals. GR24 exhibited good stability in acetonitrile, acetone, and ethanol (data not shown), as evidenced by the small amount of GR24 lost in these solvents in the 24-h period. In contrast, a solution of GR24 in methanol is extremely unstable (i.e., 24% of GR24 decomposed within 24 h). These results concur with those obtained by Akiyama et al.<sup>12</sup> and Rasmussen et al.<sup>30</sup>

Methanol was selected as the solvent for further kinetic experiments with nucleophiles, as reactions in acetone were too slow to obtain reliable data for calculations of kinetic and thermodynamic parameters.

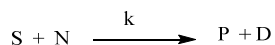
For the addition-elimination mechanism<sup>10, 34</sup>, the most logical set-up is as follows. The addition reaction is probably reversible, as proposed in the literature<sup>35</sup>, whereas the elimination reaction is irreversible<sup>36</sup>. Therefore,  $k_3$  is the rate-determining step.



where S = SL, N = Nu, A = addition product, P = product, and D = hydroxy butenolide.

Since  $v = k_3 \times [A]$ ,  $[A] / [S] \times [Nu] = K$ , and  $[A] = K \times [S] \times [N]$ , then  $v = k_3 \times K \times [S] \times [N]$ . The [N] can be considered constant, owing to its excess. The reaction is therefore pseudo-first order in [S]. If  $k_1 \gg k_2$ , the reaction is also first order in [S] when [N] can be considered constant.

For the acyl substitution mechanism<sup>22</sup>, the kinetic expression is second order, but owing to the excess Nu, the expression is considered pseudo first order.



The reaction rate is expressed as  $v = k \times [S] \times [N]$ . For  $[N] \gg [S]$ , this yields  $v = k_e \times [S]$  where,  $k_e = k \times [N]$ .

Therefore, the proposed mechanisms are indistinguishable when only kinetic data are considered.

The reaction of GR24 with various nucleophiles was investigated in methanolic solution at 30 °C using UV at 240–244 nm (Figure 6).

Nucleophilic reactions of GR24 were, in general, proven to be second order. The second-order rate constants obtained from spectrophotometric measurements, under pseudo-first-order conditions are presented in Table 1.

The activation parameters of this reaction (see Table 2) were calculated, using the Arrhenius and Eyring methods. Values of the logarithm of the frequency factor ( $\log A$ ), in all examined cases, indicate the bimolecular behavior of the reaction.<sup>36</sup> Moreover, negative values for  $\Delta S^\ddagger$  indicate that the entropy decreases with formation of the transition state, which is often indicative of an associative mechanism. Through this mechanism, SL and the nucleophile form a single activated complex, i.e., addition product A resulting from the addition/elimination mechanism (Figure 2).

Consistent with the literature,<sup>8–10, 34</sup> our results demonstrate that the reaction of GR24 with nucleophiles can be considered a bimolecular reaction that proceeds in the same manner as the Michael reaction. The Michael addition-elimination reaction of compounds with vinyl moiety has been described in the literature.<sup>37</sup> Generally, the Michael reaction constitutes one of the most versatile methods in organic synthesis for the construction of new carbon-carbon or carbon-heteroatom bonds, through a well-established mechanism.<sup>38</sup> The kinetic and activation parameters obtained for this reaction concur with those presented in the literature.<sup>37–40</sup>

The products of the reaction between GR24 and benzylamine and 4-methoxybenzylamine were synthesized following the procedure outlined by Mangnus and Zwanenburg.<sup>9</sup> The structures of the products were characterized using NMR and MS techniques (see below for the corresponding spectral data), and the results concur with those reported in previous studies.<sup>9</sup> Reactions between GR24 and other nucleophiles were also monitored using UHPLC-MS/MS. The developed method provides information on the reaction progress in relatively short times, without isolation or purification prior to analysis. Therefore, the possible effect of product isolation on the progress of the reaction is prevented. The reaction mixture was efficiently separated on the reversed phase and structures of reactants and products were determined via MS. Furthermore, fragmentation patterns (Figure 7) were obtained via the multiple reaction monitoring (MRM) method and analysis of the relevant collision spectra (MS/MS). The product derived from the ABC-scaffold and the product derived from the reaction of the liberated hydroxy D-ring with the nucleophile were observed. The hydroxy butenolide is, in fact, a hemi acetal that can react with a nucleophile

(especially primary amines) and thiols are less reactive in this respect. The mass fragments of other reaction products are summarized in Table 3.

The results of UHPLC-MS/MS monitoring (Figure 7) show that the ABC-Nu product is formed first. After almost all GR24 had reacted, excess nucleophile reacted with liberated hydroxy butenolide (hydroxy D-ring), after ~24 h. Separation on an octylsilane reversed phase (C8 column) showed that products derived from GR24 with nucleophiles occur as geometric isomers, which yield identical collision mass spectra (see Table 3).

However, the hydroxy D-ring did not react with aniline, thiophenol and benzyl mercaptan as nucleophiles, even after 24 h. This is attributed to the fact that reactions involving these nucleophiles proceed very slowly (Table 1) and within the timeframe considered here the hydroxy butenolide liberated is insufficient for reaction with the excess nucleophile. This observation is consistent with mechanistic pathway A, where a reaction occurs after hydroxy butenolide has been liberated. Pathway B should lead to a reaction with thiophenol, which results in detachment of the D-ring.

Similar UV profiles (see Figure 8), with maxima of 244 nm for GR24, and 277 for compounds 2 and 4, are obtained for GR24 and its reaction products, compounds 2 and 4. For cases where the UV profiles of the reactants are indistinguishable from those of the products, UHPLC-MS/MS constitutes an excellent method for monitoring the reaction.

#### 4. CONCLUSIONS

The first part of this study considered the chemical stability of the synthetic strigolactone analog GR24, in different plant growth media and buffers. Most of the tested buffers are suitable for short-term storage and experiments with SLs. In addition to the temperature, alkaline pH, a high concentration (>0.5 M) of phosphate or potential nucleophiles have a significant effect on the chemical stability, leading to increased rates of GR24 decomposition. Based on our results, we make the following recommendations for the use of GR24 and naturally occurring SLs in plant treatments:

- a. Stock solutions of SLs should be prepared in inert dry solvents, such as DMF, with a maximum storage temperature of -20 °C.
- b. Whenever an SL is dissolved in an aqueous solution, this solution must be used within 24 h.
- c. Some buffers, such as Tris-HCl and HEPES, are unsuitable for experiments with SLs.

The hydrolysis of GR24 in the presence of seven different aromatic nucleophiles was considered in the second part of this work. The fastest reaction occurred for ammonium hydroxide, benzylamine, and 4-methoxybenzylamine, with half-lives of  $\leq 3$  h, while the slowest reaction involved sulfur-containing nucleophiles (half-life  $\geq 19$  h). The kinetic and thermodynamic data, as well as the structures of the reaction products (determined from their spectral characteristics) confirm that the reaction of GR24 with nucleophiles proceeds via a bimolecular reaction. In this biomolecular reaction, a Michael reaction is followed by an elimination reaction. Negative values for the entropy of activation are indicative of an associative reaction mechanism, where the SL and the nucleophile form a single activated complex through an addition/elimination mechanism<sup>8-9, 23</sup>. UHPLC-MS/MS monitoring of the reaction yielded results consistent with the above-mentioned results.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grant No. LO1204 (Sustainable development of research in the Centre of the Region Haná) from the National Program of Sustainability I, MEYS and the IGA\_PrF\_2017\_016 grant.

## REFERENCES

1. Matusova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH and Bouwmeester HJ, The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* **139**:920–934 (2005).
2. Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME and Egley GH, Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154**:1189–1190 (1966).
3. Akiyama K, Matsuzaki K and Hayashi H, Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fung. *Nature* **435**:824–827 (2005).
4. Al-Babili S and Bouwmeester HJ, Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu Rev Plant Biol* **66**:161–166 (2015).
5. Xie X, Yoneyama K and Yoneyama K, The strigolactone story. *Ann Rev Phytopatol* **48**:93–117 (2010).

6. Joel DM, The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite *Crop Prot* **19**:753–758 (2000).
7. Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P, and Leyser O, MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* **8**:443–449 (2005).
8. Zwanenburg B and Pospíšil T, Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Mol Plant* **6**:38-62 (2013).
9. Zwanenburg B, Pospíšil T, and Cavar Zeljkovic S, Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta* **243**:1311–1326 (2016).
10. Mangnus EM and Zwanenburg B, Tentative Molecular Mechanism for Germination Stimulation of *Striga* and *Orobanch*e seeds by strigol and its synthetic analogues. *J Agric Food Chem* **40**:1066–1070 (1992).
11. Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K and Takeuchi Y, Strigolactones: structures and biological activities. *Pest Manag Sci* **65**:467–470 (2009).
12. Akiyama K, Ogasawara S, Ito S and Hayashi H, Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* **51**:1104–1117 (2010).
13. Zhang Y, van Dijk AD, Scaffidi A, Flematti GR, Hofmann M, Charnikhova T, Verstappen F, Hepworth J, van der Krol S, Leyser O, Smith SM, Zwanenburg B, Al-Babili S, Ruyter-Spira C and Bouwmeester HJ, Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat Chem Biol* **10**:1028–1033 (2014).
14. Baetz U and Martinoia E, Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci* **19**:90-98 (2014).
15. Reizelman A, Scheren M, Nefkens GHL and Zwanenburg B, Synthesis of All Eight Stereoisomers of the Germination Stimulant Strigol. *Synthesis* **13**:1944–1951 (2000).
16. Ruyter-Spira K, Kohlen W, Charnikhova T, van Zeijl A, van Bezouwen L, de Ruijter N, Cardoso C, Lopez-Raez JA, Matusova R, Bours R, Verstappen F and Bouwmeester H, Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol* **155**:721–734 (2011).

17. Johnson AW, Gowda G, Hassanali A, Knox J, Monaco S, Razavi Z and Roseberry G, The preparation of synthetic analogues of strigol. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* 1734–1743 (1981).
18. Johnson AW, Roseberry G and Parker C, A novel approach to *Striga* and *Orobanch*e control using synthetic germination stimulants. *Weed Res* **16**:223–227 (1976).
19. Babiker AGT, Hamboun AM, Rudwan A, Mansi NG and Faki HH, Influence of soil moisture on activity and persistence of the strigol analogue GR 24. *Weed Res* **27**:173–178 (1987).
20. Boyer FD, de Saint Germain A, Pillot JP, Pouvreau JB, Chen VX, Ramos S, Stévenin A, Simier P, Delavault P, Beau JM and Rameau C, Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: molecule design for shoot branching. *Plant Physiol* **159**:1524–1544 (2012).
21. Kannan C and Zwanenburg B, A novel concept for the control of parasitic weeds by decomposing germination stimulants prior to action. *Crop Prot* **61**:11–15 (2014).
22. Scaffidi A, Waters MT, Bond CS, Dixon KW, Smith SM, Ghisalberti EL and Flematti GR, Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorg Med Chem Lett* **22**:3743–3746 (2012).
23. Hamiaux C, Drummond RS, Janssen BJ, Ledger SE, Cooney JM, Newcomb RD and Snowden KC, DAD2 is an  $\alpha/\beta$  hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr Biol* **22**:2032–2036 (2012).
24. Seto Y and Yamaguchi S, Strigolactone biosynthesis and perception. *Curr Opin Plant Biol* **21**:1–6 (2014).
25. Kagiya M, Hirano Y, Mori T, Kim SY, Kyojuka J, Seto Y, Yamaguchi S and Hakoshima T, Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathways. *Genes Cells* **18**:147–160 (2013).
26. de Saint Germain A, Clavé G, Badet-Denisot MA, Pillot JP, Cornu D, Le Caer JP, Burger M, Pelissier F, Retailleau P, Turnbull C, Bonhomme S, Chory J, Rameau C, and Boyer FD, An histidine covalent receptor and butenolide complex mediates strigolactone perception. *Nat Chem Biol* **12**:787–794 (2016).
27. Lumba S, Holbrook-Smith D and McCourt P, The perception of strigolactones in vascular plants. *Nat Chem Biol* **13**:599–606 (2017).
28. Waters MT, Bussel JD and Jost R, *Arabidopsis* hydroponics and shoot branching assay. *Bio-protocol* **2**:e264 (2012).

29. Roycewicz P and Malamy JE, Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**:1489–1500 (2012).
30. Rasmussen A, Heugebaert T, Matthys C, Van Deun R, Boyer FD, Goormachtig S, Stevens C and Geelen D, A fluorescent alternative to the synthetic strigolactone GR24. *Mol Plant* **6**:100–112 (2013).
31. López-Ráez JA, Charnikhova T, Gómez-Roldán V, Matusova R, Kohlen W, Vos RD, Verstappen F, Puech-Pages V, Bécard G, Mulder P and Bouwmeester H, Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol* **178**:863–874 (2008).
32. Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yakota T and Yoneyama K, How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* **235**:1197–1207 (2012).
33. Jamil M, Charnikhova T, Cardoso C, Jamil T, Ueno K, Verstappen F, Asami T and Bouwmeester H, Quantification of the relationship between strigolactones and *Striga hermonthica* infection in rice under varying levels of nitrogen and phosphorus. *Weed Res* **51**:373–385 (2011).
34. Zwanenburg B and Mwakaboko AS, Strigolactone analogues and mimics derived from phthalimide, saccharine, *p*-tolylmalondialdehyde, benzoic and salicylic acid as scaffolds. *Bioorg Med Chem* **24**:7394–7400 (2011).
35. Chen J, Jiang X, Carroll SL, Huang J and Wang J, Theoretical and experimental investigation of thermodynamics and kinetics of thiol-Michael addition reactions: a case study of reversible fluorescent probes for glutathione imaging in single cells. *Org Lett* **17**:5978–5981 (2015).
36. Sarathi PA, Gnanasekaran C and Shunmugasundaram A, Kinetics and Mechanism of Triethylamine Catalysed Michael addition of benzenethiol to 1-(2-nitrovinyl)benzene in acetonitrile. *Bull Korean Chem Soc* **29**:790–794 (2008).
37. Rollefson GK, Frequency factors of some bimolecular reactions. *J Phys Chem* **56**:976–979 (1952).
38. Csáky G, de la Herrána G and Murcia MC, Conjugate addition reactions of carbon nucleophiles to electron-deficient dienes. *Chem Soc Rev* **39**:4080–4102 (2010).
39. Finley KT, Call DR, Sovocool GW and Hayle WJ, Kinetic investigation of the classic Michael reaction. *Can J Chem* **45**:571–573 (1976).

40. Vlasov VM, Effects of substituents on activation parameter changes in the Michael-type reactions of nucleophilic addition to activated alkenes and alkynes in solution. *Monatsh Chem* **147**:319–328 (2016).

**Table 1.** Reaction rates and half-times associated with the reaction between GR24 and selected nucleophiles at 30 °C.

| Nucleophile          | $k \times 10^{-5}$ (mol/L s) | $t_{1/2}$ (h) |
|----------------------|------------------------------|---------------|
| Methanol             | 0.50                         | 38.51         |
| Thiophenol           | 0.67                         | 28.88         |
| Aniline              | 0.67                         | 28.88         |
| Imidazole            | 0.83                         | 23.10         |
| Benzyl mercaptan     | 1.00                         | 19.25         |
| <i>p</i> -Anisidine  | 1.67                         | 11.55         |
| Benzylamine          | 9.33                         | 2.06          |
| 4-Methoxybenzylamine | 11.17                        | 1.72          |
| Ammonium hydroxide   | 12.67                        | 1.52          |

**Table 2.** Activation parameters for the nucleophilic substitution on GR24 at 40 °C.

| Nucleophile          | $E_a$<br>kJ/K mol | $\Delta H^\ddagger$<br>kJ/K mol | $\Delta S^\ddagger$<br>J/mol | $\Delta G^\ddagger$<br>kJ/Kmol | logA  |
|----------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------|
| Benzylamine          | 31.62             | 29.01                           | -230.86                      | 101.31                         | 15.46 |
| 4-Methoxybenzylamine | 27.96             | 25.36                           | -232.16                      | 98.06                          | 14.16 |
| Ammonium hydroxide   | 24.60             | 22.00                           | -233.48                      | 95.11                          | 12.84 |

**Table 3.** Mass fragments ( $m/z$ ) of the reaction products.

| Nucleophile          | ABC-Nu                                                                                 | D-Nu                                                                     |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Imidazole            | 253.05 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 166.07 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                      | 185.05 [M+H-C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                | 97.05 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>   |
|                      | 69.05 [M+H-C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> | 69.05 [M+H-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>   |
| <i>p</i> -Anisidine  | 308.05 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 220.05 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                      | 290.00 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                             | 108.10 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> NO] <sup>+</sup>               |
|                      | 162.05 [M+H-C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                | 97.05 [M+H-C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NO] <sup>+</sup>                |
| 4-Methoxybenzylamine | 321.14 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 234.11 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                      | 121.10 [M+H-C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>             | 121.10 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> |
|                      | 91.10 [M+H-C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>              | 97.05 [M+H-C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO] <sup>+</sup>               |
|                      |                                                                                        | 91.10 [M+H-C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>  |
| Benzylamine          | 292.05 [M+H] <sup>+</sup>                                                              | 204.10 [M+H] <sup>+</sup>                                                |
|                      | 274.10 [M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                             | 97.05 [M+H-C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N] <sup>+</sup>                 |
|                      | 183.05 [M+H-C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO] <sup>+</sup>                             | 91.10 [M+H-C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>  |
|                      | 91.10 [M+H-C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>              |                                                                          |
| Ammonium hydroxide   | 200.80 [M+H] <sup>-</sup>                                                              |                                                                          |
|                      | 157.15 [M+H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                             |                                                                          |
|                      | 139.15 [M+H-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                              |                                                                          |

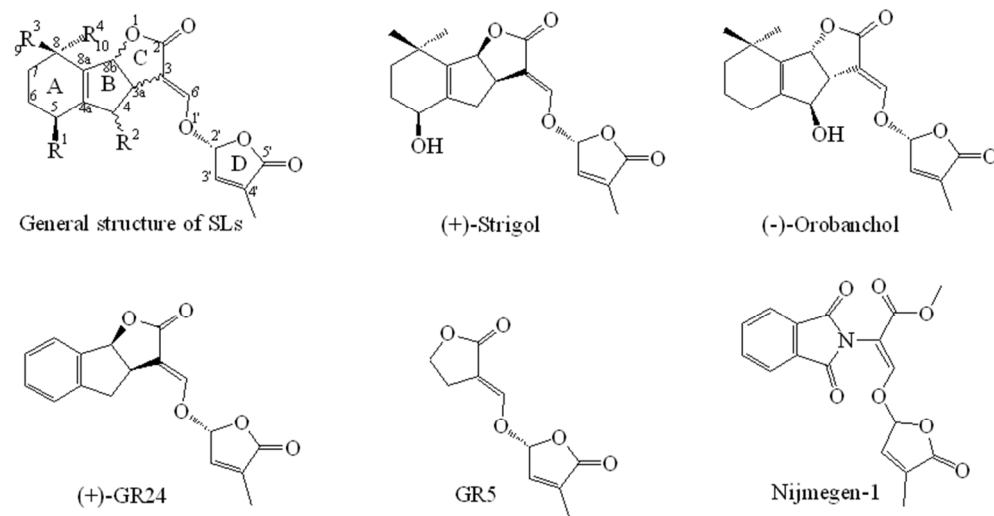


Figure 1. General structure of SLs and some naturally occurring and synthetic analogs.

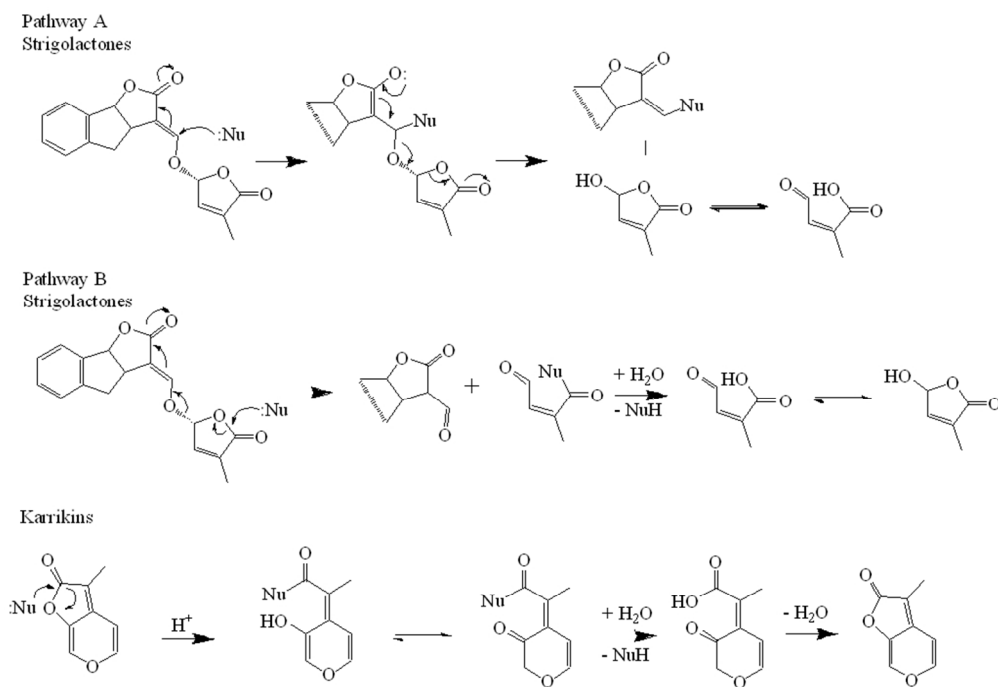


Figure 2. Proposed mechanisms of SL hydrolysis. Pathway A;9,22 Pathway B.21

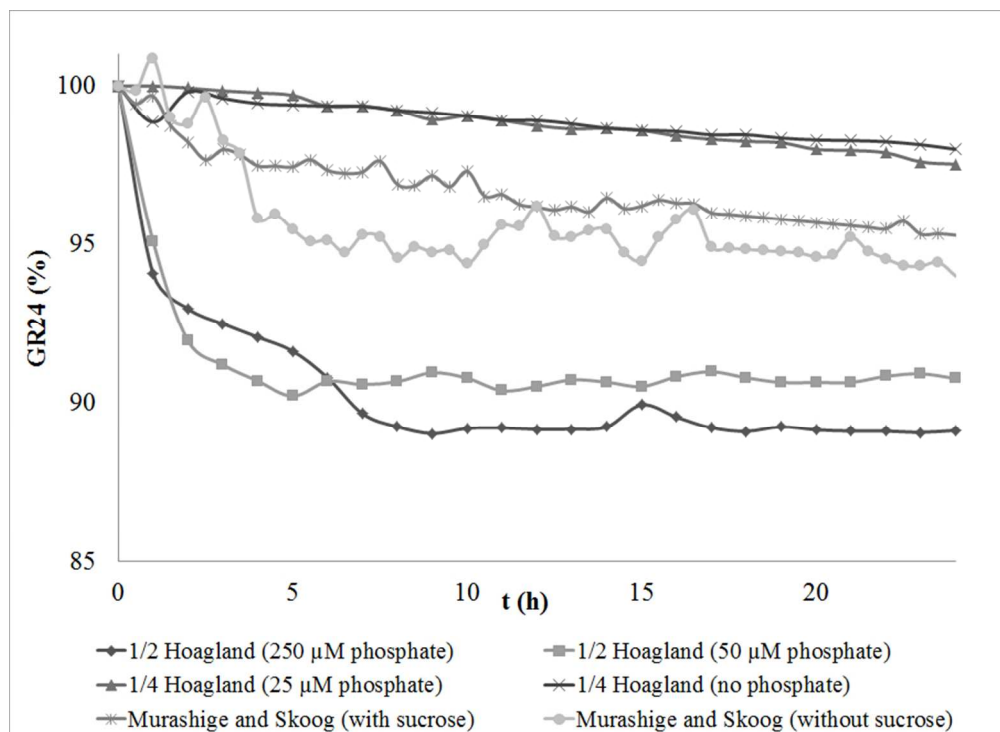


Figure 3. Stability of GR24 in different cultivation media.

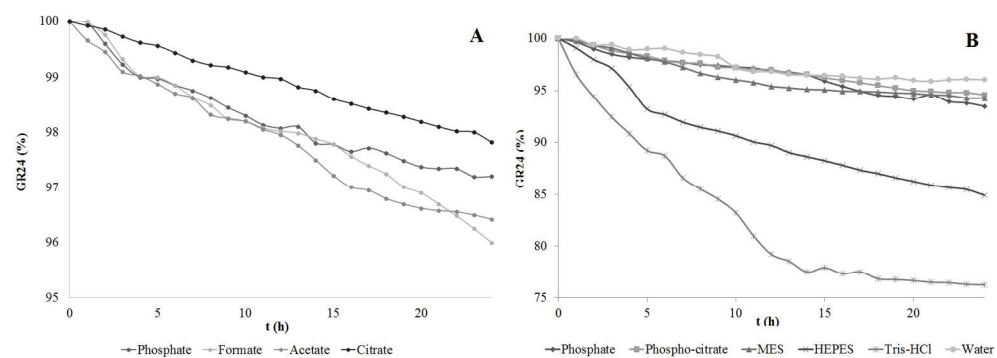


Figure 4. Stability of GR24 in buffers with a pH of 6.0 (A) and a pH of 7.0 (B).

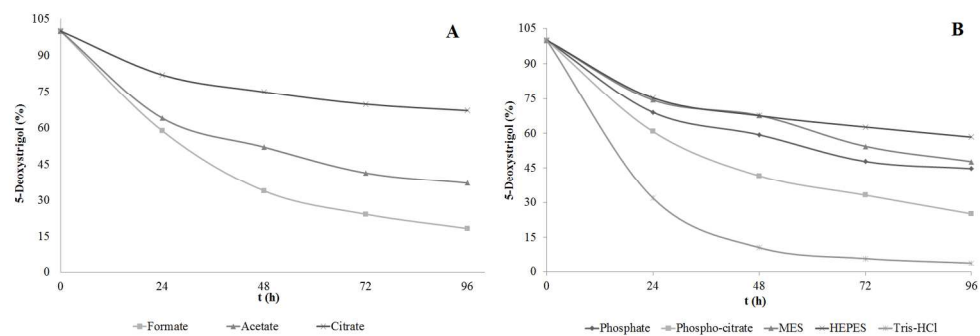


Figure 5. Stability of 5-deoxystrigol in buffers with a pH of 6.0 (A) and a pH of 7.0 (B).

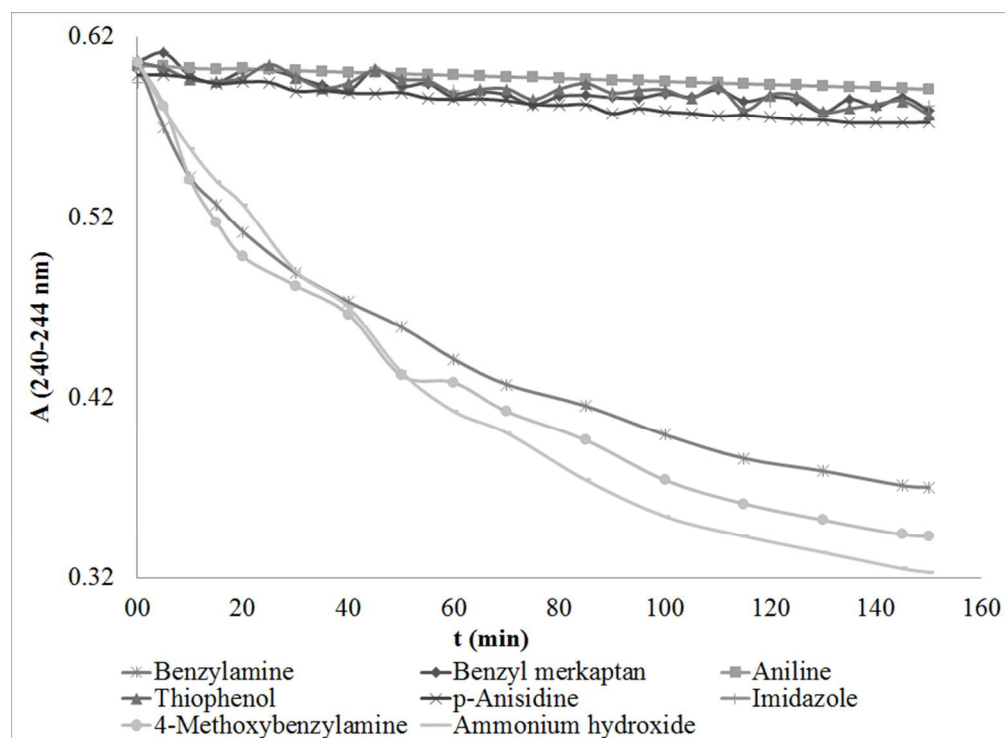


Figure 6. Reaction progress of GR24 with various nucleophiles.

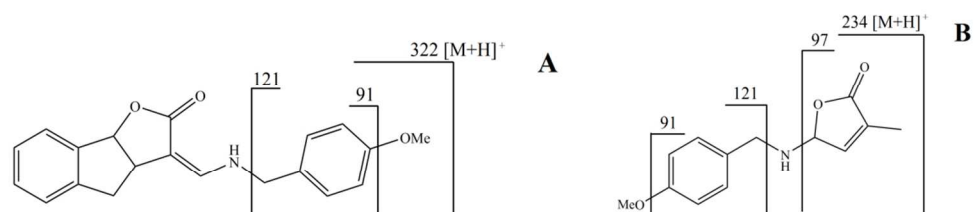


Figure 7. Fragmentation pattern of reaction products. Product of (A) ABC-scaffold of GR24 and 4-methoxybenzylamine, (B) D-ring of GR24 and 4-methoxybenzylamine.

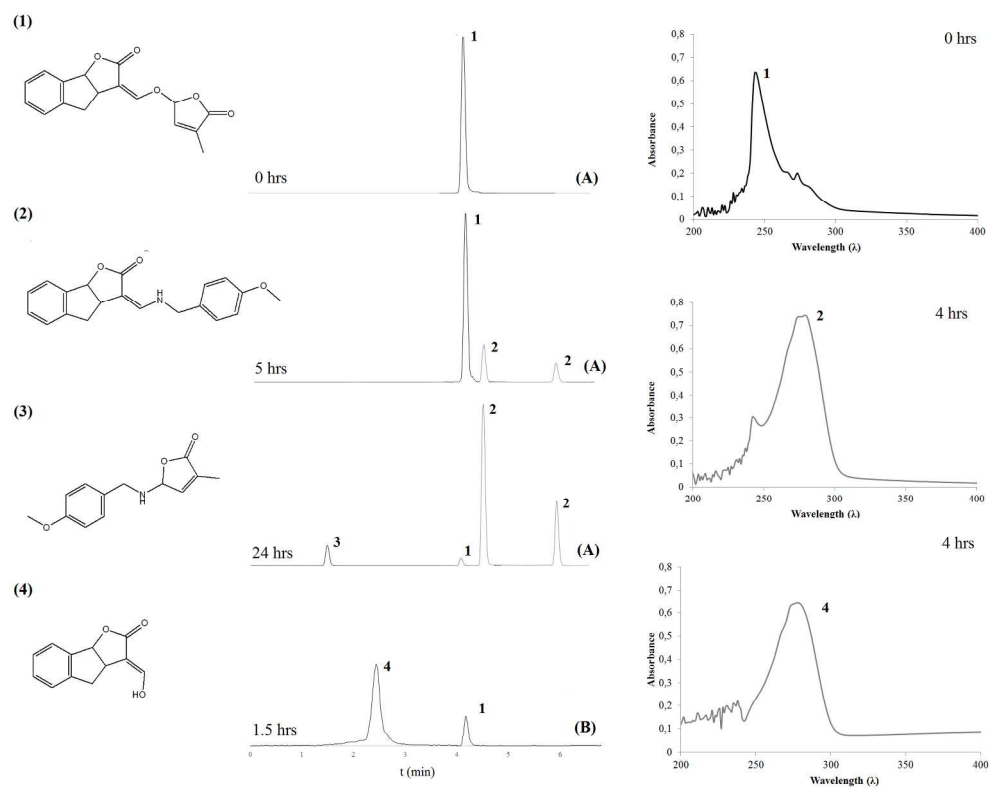


Figure 8. MS/MS chromatograms corresponding to reaction mixture of GR24 and 4-methoxybenzylamine (A), and ammonium hydroxide (B), and UV profiles of corresponding compounds and reaction products. (1) GR24; (2) ABC-Nu (two geometric isomers); (3) D-Nu; (4) formylated ABC.

***Příloha 4 – spoluautorská publikace***

Zhang J., Mazur E., Balla J., Gallei M., Kalousek P., Medvedova Z., Li Y., Prát T., Vasileva M., Reinöhl V., Procházka S., Halouzka R., Tarkowski P., Luschnig C., Brewer PB., Friml J. (2020). Strigolactones inhibit auxin feedback on PIN-dependent auxin transport canalization. *Nat Commun.* **11**, 3508.

.

## ARTICLE


<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17252-y>

OPEN

# Strigolactones inhibit auxin feedback on PIN-dependent auxin transport canalization

Jing Zhang<sup>1</sup>✉, Ewa Mazur<sup>2,3</sup>, Jozef Balla<sup>4,5</sup>, Michelle Gallei<sup>6</sup>, Petr Kalousek<sup>5</sup>, Zuzana Medvedová<sup>4</sup>, Yang Li<sup>1</sup>, Yaping Wang<sup>1</sup>, Tomáš Prát<sup>6</sup>, Mina Vasileva<sup>6</sup>, Vilém Reinöhl<sup>4</sup>, Stanislav Procházka<sup>4</sup>, Rostislav Halouzka<sup>7</sup>, Petr Tarkowski<sup>7</sup>, Christian Luschnig<sup>8</sup>, Philip B. Brewer<sup>9</sup> & Jiří Friml<sup>6</sup>✉

Directional transport of the phytohormone auxin is a versatile, plant-specific mechanism regulating many aspects of plant development. The recently identified plant hormones, strigolactones (SLs), are implicated in many plant traits; among others, they modify the phenotypic output of PIN-FORMED (PIN) auxin transporters for fine-tuning of growth and developmental responses. Here, we show in pea and *Arabidopsis* that SLs target processes dependent on the canalization of auxin flow, which involves auxin feedback on PIN subcellular distribution. D14 receptor- and MAX2 F-box-mediated SL signaling inhibits the formation of auxin-conducting channels after wounding or from artificial auxin sources, during vasculature de novo formation and regeneration. At the cellular level, SLs interfere with auxin effects on PIN polar targeting, constitutive PIN trafficking as well as clathrin-mediated endocytosis. Our results identify a non-transcriptional mechanism of SL action, uncoupling auxin feedback on PIN polarity and trafficking, thereby regulating vascular tissue formation and regeneration.

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China. <sup>2</sup> University of Silesia in Katowice, Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland. <sup>3</sup> Mendel Centre for Plant Genomics and Proteomics, Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University (MU), 62500 Brno, Czech Republic. <sup>4</sup> Central European Institute of Technology (CEITEC), Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 61300 Brno, Czech Republic. <sup>5</sup> Department of Plant Biology, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, 61300 Brno, Czech Republic. <sup>6</sup> Institute of Science and Technology (IST), Klosterneuburg 3400, Austria. <sup>7</sup> Central Laboratories and Research Support, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic. <sup>8</sup> Department of Applied Genetics and Cell Biology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Muthgasse 18, 1190 Wien, Austria. <sup>9</sup> ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, School of Agriculture, Food and Wine, Waite Research Precinct, The University of Adelaide, Glen Osmond, SA 5064, Australia. ✉email: [zhangj@cau.edu.cn](mailto:zhangj@cau.edu.cn); [jiri.friml@ist.ac.at](mailto:jiri.friml@ist.ac.at)

Plant development is characterized by self-organizing processes, such as the regular patterns of organ initiation at the shoot apical meristem, branching of roots and shoots, the connection of newly formed organs with pre-existing vasculature, or the spontaneous occurrence of vasculature veins in developing leaves. The plant hormone auxin and its directional transport through tissues have been implicated in all these traits<sup>1</sup>. The process that is called auxin canalization establishes narrow auxin transport routes between cells and tissues of relatively high auxin concentration (source), to locations where auxin is being depleted (sink)<sup>2–4</sup>. A self-reinforcing system has been proposed to drive canalization. In this system, auxin feeds back on PIN-FORMED (PIN) auxin transporters by promoting the expression of *PIN* genes specifically in auxin transport routes and by localizing PINs to plasma membrane (PM) domains facing the auxin sink<sup>3,5</sup>. Auxin is typically transported basipetally from source to sink and canalization seems to be driven by auxin sink rather than source<sup>6–8</sup>. For example, developing vasculature tissue is characterized by relatively high auxin contents; therefore, sink strength in such a system primarily depends on PIN-dependent auxin flux rates depleting auxin from sources. New vein patterns in leaves develop away from a localized sink at the base, opposite to the direction of auxin flow<sup>6–8</sup>. Vasculature formation and its connection to already existing vascular strands hence is intimately linked to the effects of auxin flux on the subcellular positioning of PINs, which in turn defines auxin flux rates and directionality<sup>6–8</sup>. Related feedback mechanisms controlling PIN polarity have been described for additional developmental processes, such as embryonic axis formation<sup>9,10</sup>, shoot and root organogenesis<sup>11,12</sup> as well as the control of the directional growth of organs<sup>13</sup>.

In spite of the biological significance of PIN proteins function, the mechanisms by which auxin controls polarization of PINs have remained conceptually unclear. Modeling of auxin-mediated polarization<sup>14</sup> has linked auxin feedback on PIN polarity to the auxin effect on PIN subcellular trafficking<sup>15–17</sup>. PM-associated PINs are internalized in clathrin-coated vesicles in a process called endocytosis<sup>18–20</sup> that might precede PIN relocation to different (plasma) membrane domains<sup>21,22</sup>. Numerous pharmacological and genetic determinants that impact on specific cellular events in the control of auxin transport have shaped our current picture of cellular mechanisms and crosstalk therein<sup>1</sup>. For example, treatment with the fungal toxin Brefeldin A (BFA) revealed the constitutive endocytic recycling of PIN proteins. This requires BFA-mediated interference of GNOM ARF-GEF activity, causing PM proteins, including PINs, to aggregate in cells<sup>18,20</sup>. Notably, auxin itself appears to inhibit the process of endocytosis and antagonize the BFA effect on PIN recycling<sup>15</sup>. In addition to auxin effects on PINs, various other plant hormones can influence PIN-dependent auxin transport, such as cytokinins<sup>23</sup>, brassinosteroids<sup>24,25</sup>, gibberellins<sup>26</sup>, salicylic acid<sup>27</sup>, abscisic acid<sup>28</sup>, and strigolactones (SLs)<sup>29</sup>. However, much remains to be uncovered about the modes of action, by which these plant hormones regulate PINs, thereby ultimately defining plant development.

SLs represent a recently discovered class of plant growth regulators and their developmental roles and signaling mechanisms are not yet fully characterized. SLs have been shown to influence a range of plant traits including shoot branching<sup>30,31</sup>, shoot gravitropism<sup>32</sup>, secondary growth<sup>33</sup>, adventitious rooting<sup>34</sup> as well as lateral rooting and root hair elongation<sup>35,36</sup>. Many of the processes targeted by SLs also require auxin transport, specifically its canalization as proposed for the classical SL effect on shoot branching<sup>37</sup>. This response has been linked to SL-mediated interference of PIN PM targeting and the modulation of auxin flux<sup>29,37</sup>, but we still lack insight into the mechanisms by which SLs might impact the sorting of PINs.

Our observations in this study extend the spectrum of physiological SL effects on processes associated with auxin transport canalization, namely leaf venation and vascular tissue regeneration and formation induced by wounding or external auxin sources. At the cellular level, we show that SLs specifically interfere with the feedback of auxin on PIN polarization and clathrin-mediated internalization, providing a mechanistic framework for the molecular action of SLs in many developmental processes.

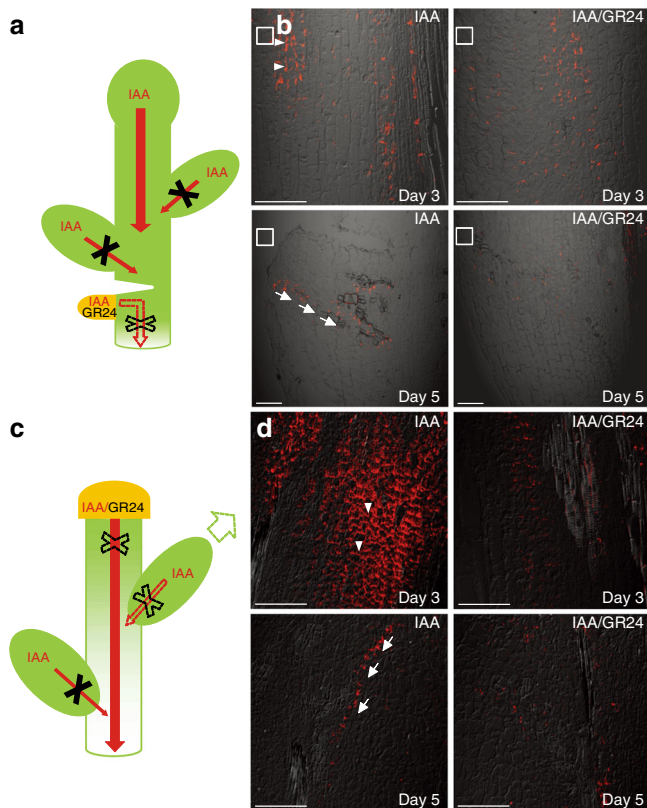
## Results

**SLs interfere with auxin canalization in pea.** Inhibition of shoot branching is among the best-understood responses of SLs in flowering plants. This is a process that involves auxin canalization, because when buds are released from dormancy, they initiate the formation of PIN1-expressing channels to increase vascular connections with the main vasculature<sup>5</sup>. These channels appear similar to those that form after adding exogenous auxin to the side of the stem<sup>3,5</sup>. These canalization events can be inhibited by auxin produced in shoot apices, hinting at a possible mechanism, by which dominant shoot tips might control branching<sup>5</sup>. When SLs are applied directly to buds after decapitation, they inhibit bud outgrowth<sup>38</sup> and reduce the transport of auxin (indole-3-acetic acid, [<sup>3</sup>H]-IAA) from buds into the stem (Supplementary Fig. 1a–d). However, the precise action of SLs in controlling auxin canalization and vascularization is less obvious<sup>39</sup>. Therefore, we explored the effect of synthetic SL, *rac*-GR24 (hereafter called GR24) using intact or fully decapitated pea (*Pisum sativum*) plants that had been treated with auxin (indole-3-acetic acid; IAA).

First, we analyzed PIN1 channel and subsequent vasculature formation originating from an artificial lateral auxin source. Lateral, local auxin application in lanolin paste onto pea stems just below a cut (Fig. 1a) was sufficient to induce the formation of PIN1-expressing auxin channels and subsequent vascular connections to the stem vasculature<sup>4,40</sup>. In our control situation, strong PIN1 expression in the vicinity of the local IAA application was observed with a predominantly lateral PIN1 localization, pointing away from the auxin source (Fig. 1b). An initially large area of PIN1-expressing cells narrowed down about 5 days after auxin application, resulting in the establishment of fully defined and strongly polarized narrow PIN1 channels, often accompanied by differentiated xylem vessels (Fig. 1b). This is in agreement with the classical canalization hypothesis in the absence of competing auxin sources<sup>2</sup>. In contrast, co-application of GR24 interfered with strongly polarized PIN1 expression as well as with the formation of PIN1 channels and continuous de novo vasculature; only occasional fragmented xylem cells appeared instead (Fig. 1b).

Related observations were made when we analyzed PIN1 expression in fully decapitated pea stems. IAA application to the stump (Fig. 1c) led to a massive increase of PIN1 expression in the polarized field below the application site within the first 3 days, while the formation of narrow PIN1-expressing channels accompanied with differentiated xylem strands became visible after 5 days (Fig. 1d). The simultaneous application of GR24 strongly inhibited this process, as we failed to observe a pronounced increase in polarized PIN1 expression and channel formation under these conditions (Fig. 1d).

Together, our findings suggest an inhibitory role of SLs in the formation of new auxin-conducting, PIN-expressing channels induced from auxin sources. This effect of SLs on auxin canalization would offer a plausible explanation for how SLs regulate auxin transport, vascularization and branching.



**Fig. 1** SL effects on PIN-dependent auxin canalization in pea. **a** Scheme representing plants wounded below the lower buds. Red arrows represent auxin (IAA) flow. Red arrows crossed with black X represent inhibited auxin flow. Lanolin pastes containing IAA or IAA/GR24 (marked in yellow) were applied to the side of the pea stem below the wound. Dashed red arrow crossed with dashed black X represents formation of a new auxin flow route from the auxin source that can be inhibited by GR24 application. **b** Immunolocalization of PIN1 in the primary stem. The concentrations of IAA and GR24 applied locally in lanolin pastes were 0.16 and 0.09  $\mu\text{M}$ , respectively. In total, 10 plants were analyzed for each treatment. White rectangles indicate the places of IAA or IAA/GR24 application. Arrowheads indicate polarity of the PIN localization. Arrows indicate newly formed auxin channels. The fluorescence signals were evaluated on Olympus Fluoview 200 confocal scanning microscope with UPlanFI 20 $\times$ /0.5 and/or UPlanApo 10 $\times$ /0.40 objectives. PIN1 immunolocalization signals (red) are overlaid with the transmitted light images. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . **c** Scheme of decapitated plants treated with IAA or IAA/GR24 paste on the stump. Red arrows represent auxin (IAA) flow. Red arrow crossed with dashed black X represents formation of a new auxin flow route from the auxin application to the stump that is inhibited by GR24 application. Dashed red arrow crossed with dashed black X represents intermitted auxin flow after temporary bud activation. Dashed green arrow represents temporary bud outgrowth. Red arrows crossed with black X represent inhibited auxin flow. **d** Immunolocalization of PIN1 in the stem of decapitated plants. In total, 10 plants were analyzed for each treatment. Arrowheads indicate polarity of the PIN localization. Arrows indicate newly formed auxin channels. The fluorescence signals were evaluated on Olympus Fluoview 200 confocal scanning microscope with UPlanFI 20 $\times$ /0.5 objective. PIN1 immunolocalization signals (red) are overlaid with the transmitted light images. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . The above experiments were repeated three times with similar results. Images shown are representative of each treatment.

**SLs inhibit vasculature formation and regeneration.** To further explore the role of SLs in other processes that have been mechanistically linked to canalization, we examined canalization-dependent vasculature regeneration following wounding<sup>2</sup>, which

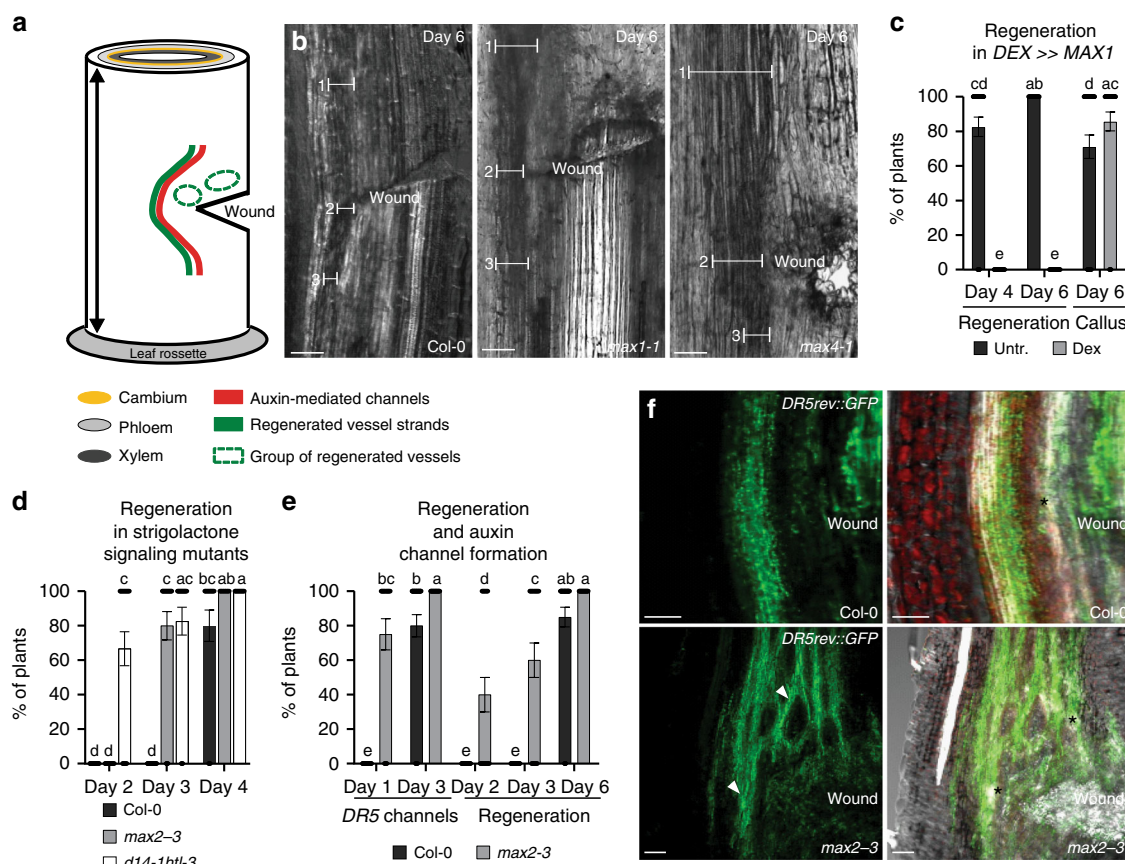
has recently been established in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) stems<sup>41</sup> (Fig. 2a). This allowed us to use the extensive genetic toolkit in the model species, and also allowed us to test plant-produced, endogenous SLs rather than relying on synthetic SLs.

In control experiments, we observed vascular regeneration initiated with a broad PIN1 expression field and auxin accumulation above the wound about 2 days after wounding. This was subsequently followed by the establishment of narrow, polarized PIN1-expressing, auxin-conducting channels circumventing the wounded site<sup>41</sup> during the next days (Supplementary Fig. 2a). Strikingly, vasculature regeneration in the SL biosynthesis mutants *more axillary growth* (*max*)1-1 and *max*4-1 occurred as fast as in control (Supplementary Fig. 2b), but the regenerated vasculature in the mutants was more abundant than that in the wild-type control (Fig. 2b). To test the effect of increased endogenous SLs, we employed conditional overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase *MAX1* in the *max1* mutant background (*DEX*>*MAX1* *max1*-1; hereafter named *DEX*>*MAX1*). In un-induced control plants, the first vessels around the wound appeared after 4 days and fully regenerated vasculature was observed after 6 days (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2c). In contrast, although we detected clusters of isolated vessel-like cells that developed from callus in both untreated and dexamethasone (Dex)-treated plants (Fig. 2c), there was no regeneration of vasculature around the wound observed after Dex induction (Fig. 2c, Supplementary Fig. 2c). These results are in line with the observations that we made in pea, substantiating an inhibitory role for SLs in the regulation of canalization-mediated vasculature regeneration.

We also determined the efficiency of vasculature regeneration in mutants affected in SL/karrikin-related signaling, including a mutant allele affected in the MAX2 F-box protein (*max2*-3) and a double mutant affected in SL/karrikin receptors *dwarf14*-1 *hyp insensitive to light*-3 (*d14*-1 *htl*-3)<sup>42</sup>. In both genotypes, regeneration occurred faster (Fig. 2d) and the regenerated strands were more abundant compared with wild-type control (Supplementary Fig. 2d), suggesting that SL/karrikin signaling normally restricts vasculature regeneration.

To directly assess whether SL/karrikin signaling is involved in auxin channel formation, we analyzed the expression of the *DR5* auxin response reporter (*DR5rev::GFP*) during regeneration. Comparison between wild type and *max2*-3 revealed that the *DR5*-positive channels formed faster and more abundantly when SL/karrikin signaling was compromised (Fig. 2e, f). Consistently, the layer of regenerated vasculature was also formed earlier and thicker in the *max2*-3 mutant (Fig. 2e, f).

Together, these results identify SLs as crucial regulators of vasculature regeneration after wounding, and that increased SL levels inhibit, whereas decreased SL biosynthesis or compromised SL signaling promotes, canalization-mediated vasculature regeneration. Another presumably auxin canalization-dependent process that involves vasculature patterning along auxin channels is *de novo* leaf venation formation<sup>2,6,8,43</sup>. We questioned whether SLs might participate in this process as well, and thus examined leaf vascular development in presence of GR24 or upon induction of endogenous SL biosynthesis. After growth on GR24, simplified leaf vascular network patterns with occasional discontinuities were detected (Supplementary Fig. 3a, b). Dex-treated *DEX*>*MAX1* plants also caused more simplified leaf veins with more free ends (Supplementary Fig. 3c, d). This two-component glucocorticoid system can occasionally cause non-specific growth defects<sup>44</sup>. However, our Dex-treated transgenic plants expressing only the chimeric GAL4-VP16-GR (GVG) transcription factor grew normally and leaf vasculature was unaffected (Dex: 11.1 free-ending veins per leaf,  $n = 20$  leaves; Control: 10.7 free-ending veins per leaf,  $n = 20$  leaves). Therefore, these data support the



**Fig. 2 SL regulation of vasculature regeneration after wounding in *Arabidopsis* stems.** **a** Scheme representing spatial changes around a wound during vascular tissue regeneration in incised stems of *Arabidopsis*. Wounding is made in the basal part of inflorescence stem just above the rosette leaves to disturb the longitudinal continuum of the vascular cambium. Green line represents development of regenerated vessel strands around a wound. Red line represents auxin-mediated channels formation. Green circles represent the groups of vessel-like cells developed from outer cortex or callus in the neighborhood of the wound. **b** Vascular tissue regeneration in SL biosynthesis defective mutants *max1-1* and *max4-1*. Line segments indicate the thickness of regenerated vasculature; above the wound (1), close to the wound (2), below the wound (3). Scale bars: 100  $\mu$ m. **c** Vascular tissue regeneration in wounded *DEX* $\gg$ *MAX1* plants. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. ( $n \geq 22$  inflorescence stems). Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Fisher LSD test). **d** Vascular tissue regeneration in SL/karrikin signaling-defective mutants *max2-3* and *d14-1htl-3*. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. ( $n \geq 15$  inflorescence stems). Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Fisher LSD test). **e**, **f** The formation of auxin channels around a wound as inferred from *DR5rev::GFP* expression during vascular tissue regeneration. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. ( $n \geq 24$  inflorescence stems). Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Fisher LSD test). Right panels in **f** are merged images of fluorescence and light transmitted signals. Arrowheads indicate abundant channels. Asterisks indicate regenerated vasculature. Scale bars: 100  $\mu$ m. The above experiments were repeated twice with similar results. Images shown are representative of each treatment. Source data of **c–e** are provided in the Source data file.

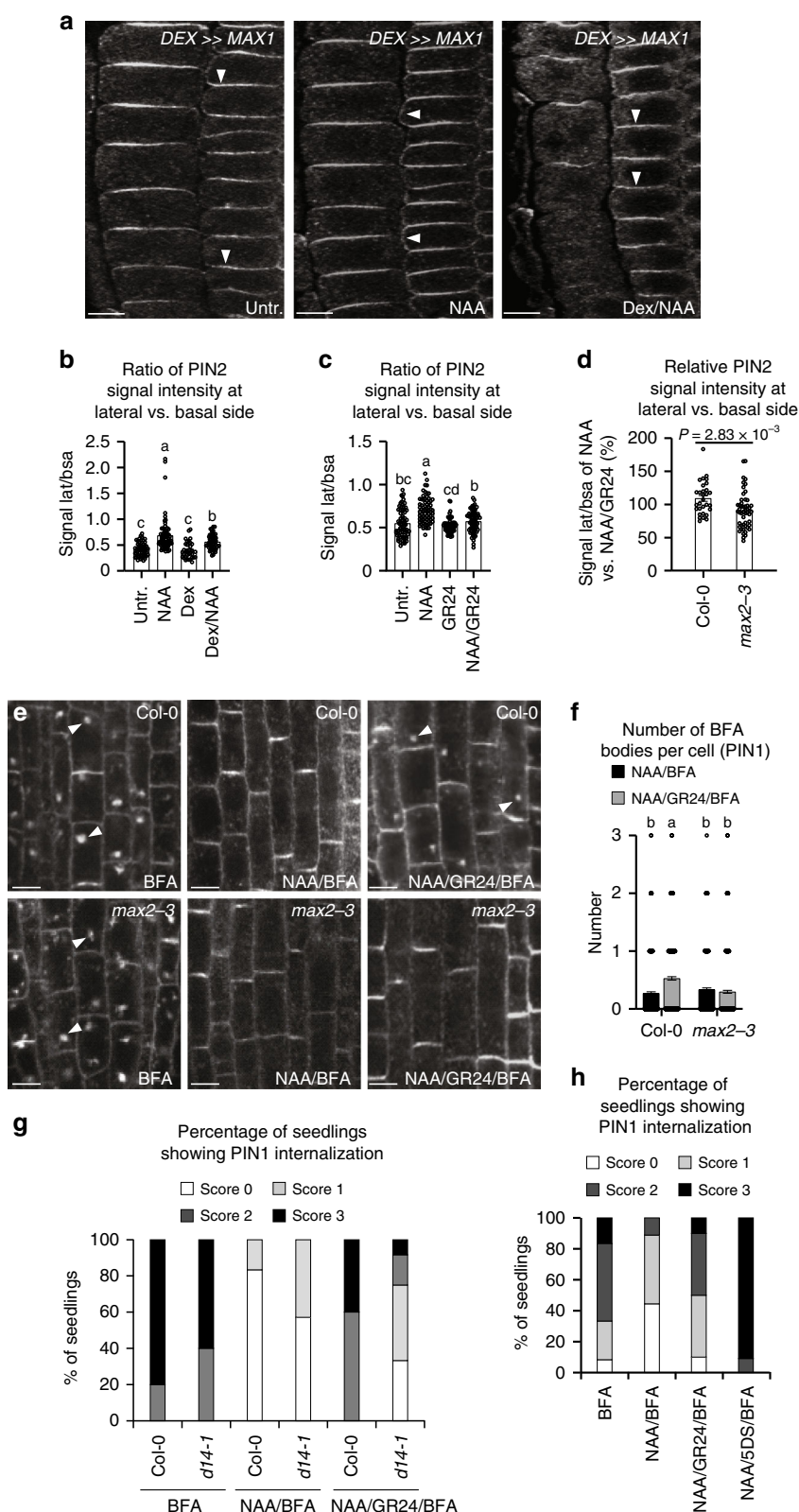
notion that SLs regulate vasculature regeneration as well as de novo formation during venation patterning in leaves.

**SLs interfere with auxin-mediated PIN polarization.** The mechanism by which a local auxin source promotes the formation of auxin channels and vascularization is largely unknown. The classical canalization hypothesis proposes positive auxin feedback on auxin transport directionality<sup>14</sup>, which can be realized at the cellular level by the effect of auxin on PIN polar distribution. This can be visualized by auxin-mediated PIN polarity rearrangements in *Arabidopsis* roots<sup>4,45</sup>. In primary roots, PIN2 localizes to the apical side of epidermal cells, and preferentially to the basal cell side in the young cortex cells<sup>22</sup>. Auxin (synthetic 1-naphthaleneacetic acid; NAA or natural; IAA) treatments led to rearrangement in PIN2 distribution to the outer lateral sides of cortex cells<sup>4</sup> (Fig. 3a–c). This PIN lateralization effect of auxin was consistently attenuated by induction of SL biosynthesis in the *DEX* $\gg$ *MAX1* line (Fig. 3a, b), and by NAA/GR24 co-treatment in wild-type seedlings (Fig. 3c). In addition, we tested the effect of a

natural SL, (+)-5-deoxystrigol (5DS), on NAA-mediated PIN2 lateralization and observed an inhibitory response similar to that of GR24 (Supplementary Fig. 6c). In contrast, the GR24 effect on auxin-mediated PIN2 lateralization was diminished in *max2-3* (Fig. 3d).

These observations suggest that SLs, acting via a MAX2-dependent signaling pathway, not only negatively regulate the canalization processes at the organ and tissue levels, but also auxin-mediated polarization of PIN transporters at the level of individual cells.

**SLs interfere with auxin effect on PIN endocytic recycling.** How auxin can regulate PIN polarity and, in particular, how a localized auxin source can lead to the coordinated polarity changes in a whole field of cells, is conceptually unclear. Modeling of canalization and PIN polarization suggests that auxin feedback on PIN polarity can be related to the known inhibitory auxin effect on PIN internalization in individual cells<sup>14</sup>. PIN proteins are known to constitutively cycle between the PM and the endosomes<sup>18,46</sup>.



This cycling is sensitive to BFA<sup>18</sup>, which preferentially inhibits PIN trafficking to the PM<sup>22,47</sup>, leading to the intracellular accumulation of constitutively cycling PIN proteins<sup>18</sup>. Previous studies have shown that PIN endocytosis and constitutive recycling are important in determining PIN polarity<sup>48–50</sup>, and intracellular PIN accumulation is rapidly and transiently inhibited by auxin itself<sup>15</sup>.

We investigated the SL effect on auxin-mediated inhibition of PIN endocytic recycling. As shown previously<sup>15</sup>, PIN proteins accumulated intracellularly after BFA treatment and such internalization was inhibited by NAA (Fig. 3e). GR24 treatment showed no effect on BFA-induced PIN intracellular accumulation (Supplementary Fig. 4a, b), but it clearly interfered with NAA-mediated inhibition of PIN internalization. This was reflected by

**Fig. 3 SL effect on auxin-regulated PIN subcellular dynamics.** **a, b** Endogenous SL effect on auxin-mediated PIN2 polarity changes in young cortex cells. Immunolocalization of PIN2 is shown (**a**). Arrowheads indicate the polarity of PIN localization. Scale bars: 5  $\mu$ m. Ratio between mean fluorescence intensity of the lateral and basal membrane in young cortex cells was scored (**b**  $n \geq 34$  cells). **c** Exogenous SL effect on auxin-mediated PIN2 polarity changes in young cortex cells. Ratio between mean fluorescence intensity of the lateral and basal membrane in young cortex cells was scored (**c**  $n \geq 70$  cells). Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Fisher LSD test) (**b, c**). **d** Less pronounced effect in *max2-3* SL/karrikin signaling mutant in terms of GR24 inhibition of NAA action on PIN2 lateralization (**d**  $n \geq 30$  cells). Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m.  $P$  value was calculated using Welch's two-tailed  $t$ -test. **e, f** GR24 effect on NAA inhibition of BFA-induced PIN1 internalization. Immunolocalization of PIN1 in root cells is shown (**e**). Arrowheads indicate PIN1 proteins internalized into BFA compartments. Scale bars: 5  $\mu$ m. The number of BFA bodies per root cell in NAA/BFA- or NAA/GR24/BFA-treated wild-type and *max2* seedlings was scored (**f**  $n \geq 425$  cells). Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Fisher LSD test). **g, h** Quantification of PIN1 internalization in roots. Both synthetic SL GR24 (25  $\mu$ M, **g**; 50  $\mu$ M, **h**) and natural SL 5DS (50  $\mu$ M, **h**) were applied. The same position of root tip was imaged with the same microscope settings for each independent experiment. The roots ( $n \geq 5$ ) were then scored blind and the percentage of roots displaying almost undetectable (Score 0), weak (Score 1), stronger (Score 2), or very severe (Score 3) PIN1 internalization was determined. The above experiments were repeated three times with similar results. Images shown are representative of each treatment. Source data of **b–d** and **f–h** are provided in the Source data file.

increased accumulation of PIN1 and PIN2 in BFA-induced compartments, upon co-treatment with NAA/GR24 (Fig. 3e, f, Supplementary Fig. 4c–e). Similarly, 5DS also interfered with the auxin effect on the BFA-induced PIN intracellular accumulation (Fig. 3h, Supplementary Fig. 4f).

Note that some of these short-term pharmacological experiments required high concentrations of *rac*-GR24. High GR24 concentrations may impact on photoreceptor pathways<sup>51</sup> and the use of *rac*-GR24 may lead to non-SL responses due to stereoisomer specificity<sup>52</sup>. However, 5  $\mu$ M GR24 or higher can be required to trigger responses, particularly in roots<sup>37,53–55</sup>. We aimed to resolve these issues by testing the transgenic line *DEX* $\gg$ *MAX1* that stimulates endogenous SL biosynthesis<sup>29</sup>, and also comparing GR24 treatment responses with SL mutants. The same antagonistic SL effect on auxin-mediated inhibition of PIN internalization was observed in *Dex*-treated *DEX* $\gg$ *MAX1* line (Supplementary Fig. 4g–k). Furthermore, we tested whether the effect of SLs on PIN trafficking depends on SL signaling components. In the absence of GR24, BFA-induced PIN internalization or NAA-mediated inhibition was similar in the *max2* SL/karrikin signaling mutant or the *d14* SL-specific signaling mutant as that of the wild type (Fig. 3e–g, Supplementary Fig. 4d, e). Importantly, these mutants showed less sensitivity to GR24 in counteracting the NAA action on PIN endocytic trafficking (Fig. 3e–g, Supplementary Fig. 4d, e), which appeared consistent with the results from other pharmacological studies.

In summary, our findings imply that synthetic or endogenous SLs interfere with the antagonistic auxin effect on BFA-induced intracellular accumulation of PINs, by acting via D14- and MAX2-dependent SL signaling.

**SLs interfere with auxin effect on endocytosis.** PIN proteins are internalized by clathrin-mediated endocytosis (CME)<sup>19</sup> and this endocytic pathway is inhibited by auxin through a TIR1-independent mechanism<sup>16</sup>. Notably, in shoots, SL action has been linked to clathrin-mediated PIN internalization, acting independently of de novo protein synthesis<sup>37</sup>. To gain further insights into the mode of SL action in uncoupling auxin feedback on PIN internalization, we asked whether SLs specifically interfere with the auxin effect on CME in roots. Quantitative evaluation of uptake of the fluorescent endocytic tracer FM4-64<sup>56</sup> revealed that, as for BFA-induced PIN internalization (Supplementary Fig. 4a, b), FM4-64 uptake itself was not influenced by GR24 treatment (Fig. 4c). However, in contrast, NAA-mediated inhibition of FM4-64 uptake was clearly suppressed in response to GR24 (Fig. 4a, c).

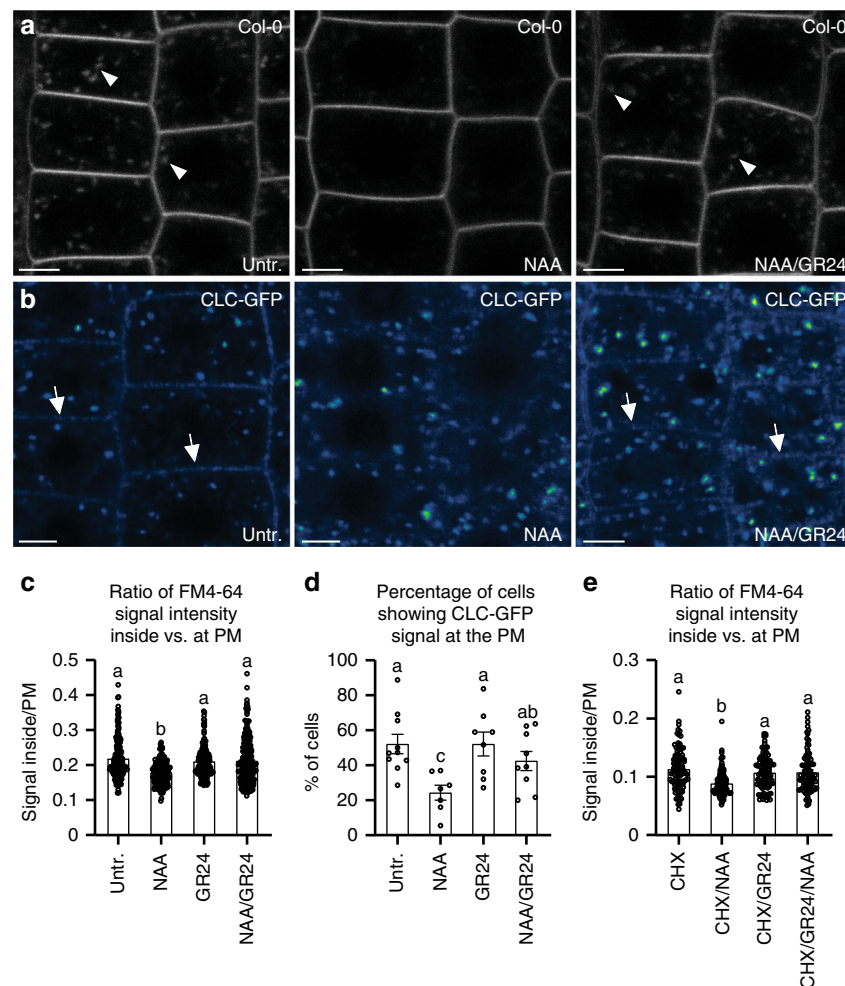
Auxin inhibition of endocytosis coincides with auxin depleting clathrin from the PM. A clathrin light chain fused to GFP

reporter protein (CLC-GFP) was found associated with intracellular endomembranes as well as with the PM<sup>57</sup>, and NAA treatment caused a decrease of clathrin-associated fluorescence preferentially at the PM<sup>16</sup>. We then tested the consequence of GR24 treatment, which revealed no visible effect on CLC-GFP localization (Fig. 4d). However, upon co-incubation with NAA, GR24 counteracted NAA-mediated depletion of the PM-localized CLC-GFP, reflected in an efficient recovery of CLC-GFP signal at the PM (Fig. 4b, d). Thus, while SLs alone do not have an obvious effect on PIN internalization, endocytosis or clathrin association with the PM, they specifically interfere with auxin effects on these processes.

Notably, the GR24 effect on auxin-inhibited BFA-induced PIN internalization and FM4-64 uptake could also be observed upon inhibition of de novo protein synthesis (Fig. 4e, Supplementary Fig. 5a–d). We further obtained comparable results that affecting transcription by cordycepin treatments did not influence the ability of GR24, as it was still effective enough to counteract the NAA effect on FM4-64 uptake (Supplementary Fig. 5e) and CLC-GFP depletion from the PM (Supplementary Fig. 5f). Given the involvement of protein ubiquitination in the control of PIN2 endocytic sorting<sup>58</sup>, we determined the 5DS effect on NAA-regulated PIN2 recycling in presence of avadomide and carfilzomib, targeting ubiquitination and proteasome activity, respectively. Both drugs antagonized 5DS effects on NAA-induced inhibition of PIN2 internalization (Supplementary Fig. 5g), highlighting an involvement of protein ubiquitination and proteasome activity in the transmission of the SL effect on the control of auxin feedback on protein endocytosis.

Together, these results are in agreement with, and further extend, previous findings for SL effects on PIN internalization in shoots<sup>37</sup>, as they establish a non-transcriptional SL effect modulating auxin-dependent control of PIN internalization by CME in roots.

**Protein trafficking is linked with auxin canalization.** We then asked if the observed SL cellular effects are functionally related with SL regulation of auxin canalization. For this purpose, we tested various mutants defective in CME (*chc2-1* and *chc2-2* alleles) or the auxin effect on PIN trafficking (*doc1* and *big*). Indeed, all these mutants interfered with developmental processes involving canalization, such as leaf venation patterning (Supplementary Fig. 5h), vascular tissue regeneration and formation induced by wounding or external auxin sources<sup>59</sup>. These data strengthen the previously established connection<sup>59</sup> between subcellular trafficking and their dynamic auxin regulations at the level of individual cells and long-term auxin-induced canalization processes across tissues.



**Fig. 4 Regulation of auxin-mediated inhibition on endocytosis by SLs in *Arabidopsis*.** **a, c, e** Effect of GR24 on NAA-inhibited FM4-64 uptake. GR24 (1  $\mu$ M), which alone had no detectable effect on FM4-64 uptake, largely diminished the NAA (10  $\mu$ M) action of inhibiting FM4-64 uptake (**a, c**). Quantitative evaluation of FM4-64 uptake: the quotient between mean fluorescence intensity of the intracellular and PM in the roots was scored (**c**  $n \geq 150$  cells). GR24 treatment also effectively attenuated NAA-mediated inhibition of FM4-64 uptake, when protein synthesis was inhibited by 50  $\mu$ M cycloheximide (CHX; **e**  $n \geq 91$  cells). Arrowheads indicate endosomal compartments of FM4-64. Scale bars: 5  $\mu$ m. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Fisher LSD test). **b, d** Effect of GR24 on NAA-regulated clathrin localization. CLC-GFP distributed at the trans-Golgi network and the PM. NAA (30  $\mu$ M) treatment induced a transient decrease of the CLC-GFP signal at the PM. GR24 (10  $\mu$ M), which alone had no detectable effect on CLC-GFP signal, largely prevented NAA action on depletion of CLC-GFP signal from the PM. The percentage of root cells showing CLC-GFP labeling at the PM was scored (**d**  $n \geq 7$  roots). Arrows indicate CLC-GFP distribution at the PM. Scale bars: 5  $\mu$ m. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  (one-way ANOVA with Fisher LSD test). The above experiments were repeated three times with similar results. Images shown are representative of each treatment. Source data of **c–e** are provided in the Source data file.

**SL/karrikin signaling interferes with auxin feedback.** SLs and karrikins act via MAX2-dependent signaling, and we therefore questioned whether both signals exert long-term effects on vasculature patterning in response to external auxin sources (droplets of auxin in lanolin). IAA application promoted the formation of PIN1-mediated auxin channels and regeneration of vascular strands in *Arabidopsis*, whereas GR24 treatment alone had no influence neither on auxin channel nor on vascular tissue formation (Supplementary Fig. 6a, b). Although SL signaling is essential for lateral bud development, in this experimental set-up, regardless of the presence or absence of lateral buds, GR24 effectively inhibited IAA-induced formation of PIN1-GFP channels and vascular strands from the position where IAA and GR24 were co-applied (Supplementary Fig. 6a, b). Notably, antagonistic effects on auxin channel and vasculature formation were also

observed in response to karrikinolide (KAR<sub>1</sub>; Supplementary Fig. 6a, b).

Moreover, we also examined short-term effects of KAR<sub>1</sub> on auxin feedback at the subcellular level. As in case with SLs, KAR<sub>1</sub> treatment antagonized NAA-mediated PIN2 lateralization (Supplementary Fig. 6c), and attenuated the NAA effect on BFA-induced PIN2 intracellular accumulation as well (Supplementary Fig. 6d).

Taken together, these data suggest that MAX2-dependent SL and karrikin signaling interfere with auxin feedback control of canalization at the tissue level as well as PIN polarity and trafficking at the cellular level.

## Discussion

Our observations extend the current knowledge about developmental processes regulated by SLs and provide insights into the

cellular mechanism of SL action. We show that SLs negatively regulate vascularization of leaves, vasculature regeneration after wounding as well as de novo formation of vasculature from artificial exogenous auxin sources. These processes, together with well-documented effects of SLs on shoot branching, are thought to at least partially depend on the canalization of auxin flow through narrowed auxin-conducting channels that demarcate future vasculature.

Prerequisites for canalization involve the feedback regulation of directional auxin transport, as manifested at the cellular level by the auxin effect on polar, subcellular localization of PIN auxin transporters<sup>4,40</sup>. Our results show that endogenous as well as exogenous SLs interfere with canalization-dependent developmental processes, and specifically interfere with auxin feedback on PIN polarity and clathrin-mediated endocytosis of PIN proteins. This SL action does not require the regulation of transcription and occurs through the known D14- and MAX2-mediated signaling pathways. Thus, SLs may repress a mechanism that enables auxin to inhibit PIN internalization and polarization or SLs may inhibit auxin bioactivity in this cellular context. This is indicated by a proposed role for SLs in the regulation of auxin biosynthesis in context of shoot gravitropism<sup>32</sup>. However, auxin biosynthesis and auxin levels could also be repressed as a consequence of inhibition of auxin transport<sup>60</sup>. Moreover, in our tests, SLs also inhibit the action of exogenously applied auxin, suggesting SLs act downstream of auxin biosynthesis.

It was suggested previously that, in context of shoot branching, SLs destabilize PINs via promoting their internalization from the PM<sup>29,37,61</sup>. However, our observations in roots suggest that SLs do not affect endocytosis or PIN internalization per se, but specifically uncouple the effect of auxin on endocytosis and trafficking processes. Alternatively, SLs could divert endocytic PIN trafficking into an auxin-insensitive pathway, thus making PIN retrieval from membranes more efficient and possibly auxin-insensitive. In any case, given that SLs also interfere with canalization-mediated processes in context of branching and vascular tissue formation and regeneration in shoots, it is likely that the above-mentioned PIN1-GFP-based observations in shoots<sup>29,37,61</sup> are in fact results of the here-identified SL effects on auxin feedback on PIN internalization.

Our findings identify a cellular mechanism, acting downstream of D14 and MAX2-dependent SL and karrikin signaling, and provide a mechanistic framework for the important part of developmental roles of the pathways, including vascularization and the regulation of root and shoot architecture. Further work should identify the precise molecular links between the SL/karrikin-related pathways and auxin feedback on PIN polarity.

## Methods

**Plant materials.** The following transgenic plants and mutants have been described previously: *DR5rev::GFP*<sup>62</sup>; *PIN1::PIN1-GFP*<sup>11</sup>; *CLC::CLC-GFP*<sup>57</sup>; *max1-1*<sup>63</sup>; *DEX>MAX1*, *max1*<sup>29</sup>; *max2-364*; *max4-165*; *d14-166*; *d14-1 htl-342*.

*Arabidopsis* was stably transformed with pTA7002<sup>67</sup> to only express the empty Dex-inducible GVG cassette. This cassette can occasionally cause unspecific growth and defense defects<sup>44</sup>. However, we observed normal plant growth upon Dex treatment.

**Growth conditions.** *Pisum sativum* L. cv. Vladan (Pea) plants were grown in perlite soaked with Richter's nutrient solution under a 16-h light/8-h dark cycle at 20 °C/18 °C for 7 days. Intact or decapitated (10 mm above the upper bud) plants were used. *Arabidopsis* Columbia ecotype (Col-0) adult plants used for inflorescence stems wounding were individually grown in pots with a soil and vermiculite mixture (1:1, v/v) under a 16 h light/8 h dark cycle at 20 °C for 7–8 weeks. *Arabidopsis* seedlings were grown vertically on half-strength Murashige and Skoog (MS) agar plates under a 16-h light/8-h dark cycle at 21 °C for 4–5 days.

**Drug application and experimental conditions.** Exogenous drugs were applied as following: GR24 (*rac*-GR24; 50 mM stock in acetone made freshly; Radboud University Nijmegen or Olchemim) (0.01/0.03/0.09/0.1/1/5/10/20/25/50 μM), (+)-5-deoxystrigol [5DS; 50 mM stock in acetone; Olchemim] (50 μM), karrikinolide (KAR<sub>1</sub>; 10 mM stock in methanol; Toronto Research Chemicals) (10/50 μM), dex-amethasone (Dex; 50 mM stock in DMSO; Sigma) (15/50 μM), indole-3-acetic acid (IAA; 10 mM stock in DMSO; Sigma) (0.16/10 μM), 1-naphthaleneacetic acid (NAA; 10 mM stock in DMSO; Sigma) (10/30 μM), BFA (50 mM stock in DMSO; Invitrogen) (25 μM), cycloheximide (CHX; 100 mM stock in DMSO; Sigma) (50 μM), cordycepin (COR; 50 mM stock in DMSO; Sigma) (50 μM), avadomide (Avad; 349.3 mM stock in DMSO; MedChemExpress) (100 μM), or carfilzomib (CFZ; 100 mM stock in DMSO; BioVision) (100 μM). Control treatments contained an equivalent amount of solvent.

For morphological analyses on vein patterning, *Arabidopsis* seedlings were grown on solid MS medium supplemented with GR24. Regarding Dex induction experiments, unless otherwise noted: seedlings were always germinated on medium containing 50 μM Dex. For vasculature regeneration detection, *DEX>MAX1* plants were treated with 15 μM Dex for 5 h by applying Dex directly to the basal parts of inflorescence stems with a brush. For observations on NAA-induced PIN1 relocation, *DEX>MAX1* seedlings were treated with 50 μM Dex on solid medium for 24 h. For testing NAA inhibition on BFA-induced internalization, if not mentioned otherwise: 90 min with 25 μM BFA; or 90 min with 10 μM NAA/BFA co-treatment after 50 min of NAA pretreatment; or 90 min with NAA/5 μM GR24/BFA co-treatment after 50 min of NAA/GR24 pretreatment, in liquid half-strength MS medium. Only for Fig. 3h, i, conditions were slightly different: 60 min with 25 μM BFA; or 30 min pretreatment with 10 μM NAA, followed by 60 min co-treatment of NAA/BFA; or first a 30 min pretreatment with 25/50 μM GR24 or 50 μM 5DS, then another 30 min pretreatment with NAA/GR24 or NAA/5DS, followed by concomitant NAA/GR24/BFA or NAA/5DS/BFA treatment for 60 min. For the other 100% stacked column charts: 60 min with 25 μM BFA; or 30 min pretreatment with 10 μM NAA, followed by 60 min co-treatment of NAA/BFA; or first a 30 min pretreatment with 10 μM NAA, then another 60 min pretreatment with NAA/50 μM GR24, NAA/50 μM 5DS or NAA/50 μM KAR<sub>1</sub>, followed by concomitant NAA/GR24/BFA, NAA/5DS/BFA or NAA/KAR<sub>1</sub>/BFA treatment for 60 min. For other BFA related visualization, seedlings were treated by 60 min with 25 μM BFA; or 60 min with 5 μM GR24/BFA co-treatment after 30 min of GR24 pretreatment. For inhibition of de novo protein synthesis in BFA related visualization, pretreatments of 30 min with 50 μM CHX were always applied beforehand. For inhibition of ubiquitination and proteasomal degradation in BFA related visualization, pretreatments of 80 min with 100 μM Avad or 100 μM CFZ were always applied beforehand. For evaluating NAA-induced PIN relocation, seedlings were treated by 10 μM NAA for 4 h; 50 μM GR24, 50 μM 5DS, or 50 μM KAR<sub>1</sub> for 4 h; or NAA/GR24, NAA/5DS, or NAA/KAR<sub>1</sub> for 4 h following 1 h of GR24, 5DS, or KAR<sub>1</sub> pretreatment. For observation on FM4-64 uptake, seedlings were treated by 10 μM NAA, 1 μM GR24, or NAA/GR24 for 80 min, respectively. For observation on CLC-GFP abundance at the PM, seedlings were treated by 30 μM NAA, 10 μM GR24, or NAA/GR24 for 80 min, respectively. For inhibition of de novo protein synthesis or transcription in both experiments, 50 μM CHX or 50 μM COR was always applied together with NAA, GR24, or NAA/GR24.

**Auxin transport assays in pea.** For auxin transport assay on the axillary buds, the upper axillary buds were treated with water lanolin pastes or pastes with GR24 (0.03 μM). After 4 h, the treated and untreated plants were decapitated 10 mm above the upper bud. 0.5 μl of [5-<sup>3</sup>H]-IAA (American Radiolabeled Chemicals, 925 Bq mmol<sup>-1</sup>, 6666 Bq μl<sup>-1</sup>) diluted in 50% ethanol was then applied to the tip of the axillary buds after decapitation in 6 h. Following 1.5 h treatment, the stems at a distance of 0–4 and 4–8 mm below the upper axillary buds were cut into 4 mm segments, respectively. All samples were incubated in a dioxane-based liquid scintillator cocktail overnight. The [<sup>3</sup>H] activity was then measured with a scintillation spectrophotometer Packard TRI/Carb 2000 (Packard).

**Gene expression analyses.** For gene expression of *PsDRM1*, GR24 (0.03 μM) in water lanolin paste was applied on the upper axillary bud of decapitated plants as a ring. *PsDRM1* expression was then followed in the untreated lower and treated upper axillary buds.

Total RNA was extracted from buds of pea plants using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). RNase-free DNase I (Qiagen) was used to remove genomic DNA. RNA was then reverse transcribed using the Superscript III cDNA kit (Invitrogen). Resulting cDNAs were used to detect *PsDRM1* gene expression by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) using LC 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics) with the specific primers<sup>40</sup> (Supplementary Table 1). The gene expression normalization was performed by using the combination of three reference genes (*Psβ-tubulin*, *PsActin*, and *PsEF1-α*).

**Vascular tissue formation analyses.** Young *Arabidopsis* plants with inflorescence stems having primary tissue architecture (vascular bundles separated by interfascicular parenchyma sectors) were used for analyzing vasculature regeneration and formation after wounding or from local application of compounds according

to method described in previous study<sup>41,68</sup>. Briefly, first step was aimed to obtain a closed ring of active vascular cambium and secondary tissue architecture in immature inflorescence stems; second step was to analyze regeneration of incised vascular cambium and formation of new vessels in wounded stems.

**In situ expression and localization analyses.** In *Arabidopsis*, whole-mount immunolocalization was performed following the published protocol<sup>69</sup>. Antibodies were diluted as follows: 1:1000 for rabbit anti-PIN1<sup>15</sup> (produced and processed in lab); 1:1000 for rabbit anti-PIN2<sup>70</sup> (produced and processed in lab); and 1:600 for CY3-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Sigma, C2306). In pea, water lanolin pastes containing IAA (0.16  $\mu$ M), or IAA/GR24 (0.16  $\mu$ M/0.09  $\mu$ M) were applied on the stem stump or on the stem 2 mm below lateral incision. Immunolocalization was performed on longitudinal pea stem segments as described for *Arabidopsis* stem<sup>69</sup>. The *Arabidopsis* anti-PIN1 antibody can also recognize the homologous PIN protein in pea<sup>4</sup>. Antibodies were diluted as follows: 1:1000 for rabbit anti-PIN1<sup>15</sup> (produced and processed in lab); and 1:500 for CY3-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Sigma, C2306). All the fluorescence signals were evaluated on Zeiss LSM 700, Zeiss LSM 710, Zeiss Observer. Z1, Leica TCS SP2, Olympus Fluoview FV1000, or Olympus Fluoview 200 confocal scanning microscopes. Unless otherwise noted, the same microscope settings were usually used for each independent experiment and pixel intensities were taken into account when comparing the images between different samples. Images were finally assembled in Adobe Photoshop CC 2015 and Adobe Illustrator CS6.

## Data availability

The data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files, or from the corresponding authors upon reasonable request. The source data underlying Figs. 2c–e, 3b–d, f–h, 4c–e, and Supplementary Figs. 1b–d, 2b, 3b, d, 4a, b, e, f, i–k, 5c–h, 6b–d are provided as a Source data file.

Received: 13 October 2018; Accepted: 15 June 2020;

Published online: 14 July 2020

## References

- Adamowski, M. & Friml, J. PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell* **27**, 20–32 (2015).
- Sachs, T. The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Adv. Bot. Res.* **9**, 151–162 (1981).
- Bennett, T. et al. Connective auxin transport in the shoot facilitates communication between shoot apices. *PLoS Biol.* **14**, e1002446 (2016).
- Sauer, M. et al. Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev.* **20**, 2902–2911 (2006).
- Balla, J., Kalousek, P., Reinohl, V., Friml, J. & Prochazka, S. Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant J.* **65**, 571–577 (2011).
- Scarpella, E., Marcos, D., Friml, J. & Berleth, T. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes Dev.* **20**, 1015–1027 (2006).
- Rolland-Lagan, A. G. & Prusinkiewicz, P. Reviewing models of auxin canalization in the context of leaf vein pattern formation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **44**, 854–865 (2005).
- Sawchuk, M. G. & Scarpella, E. Polarity, continuity, and alignment in plant vascular strands. *J. Integr. Plant Biol.* **55**, 824–834 (2013).
- Robert, H. S. et al. Local auxin sources orient the apical-basal axis in *Arabidopsis* embryos. *Curr. Biol.* **23**, 2506–2512 (2013).
- Robert, H. S. et al. Maternal auxin supply contributes to early embryo patterning in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* **4**, 548–553 (2018).
- Benková, E. et al. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591–602 (2003).
- Heisler, M. G. et al. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr. Biol.* **15**, 1899–1911 (2005).
- Rakusová, H. et al. Termination of shoot gravitropic responses by auxin feedback on PIN3 polarity. *Curr. Biol.* **26**, 3026–3032 (2016).
- Wabnik, K. et al. Emergence of tissue polarization from synergy of intracellular and extracellular auxin signaling. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 447 (2010).
- Paciorek, T. et al. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* **435**, 1251–1256 (2005).
- Robert, S. et al. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* **143**, 111–121 (2010).
- Baster, P. et al. SCF<sup>TIR1/AFB</sup>-auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism. *EMBO J.* **32**, 260–274 (2013).
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.-D., Jürgens, G. & Palme, K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**, 425–428 (2001).
- Dhonukshe, P. et al. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **17**, 520–527 (2007).
- Wang, X. et al. The roles of endomembrane trafficking in plant abiotic stress responses. *J. Integr. Plant Biol.* **62**, 55–69 (2019).
- Kleine-Vehn, J. et al. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **18**, 526–531 (2008).
- Kleine-Vehn, J. et al. Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Mol. Plant* **1**, 1056–1066 (2008).
- Marhavý, P. et al. Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. *Curr. Biol.* **24**, 1031–1037 (2014).
- Du, J. et al. Somatic embryogenesis receptor kinases control root development mainly via brassinosteroid-independent actions in *Arabidopsis thaliana*. *J. Integr. Plant Biol.* **54**, 388–399 (2012).
- Retzer, K. et al. Brassinosteroid signaling delimits root gravitropism via sorting of the *Arabidopsis* PIN2 auxin transporter. *Nat. Commun.* **10**, 5516 (2019).
- Löffke, C. et al. Asymmetric gibberellin signaling regulates vacuolar trafficking of PIN auxin transporters during root gravitropism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 3627–3632 (2013).
- Du, Y. et al. Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 7946–7951 (2013).
- Li, Y. et al. Root growth adaptation is mediated by PYLs ABA receptor-PP2A protein phosphatase complex. *Adv. Sci. (Weinh.)* **7**, 1901455 (2019).
- Crawford, S. et al. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development* **137**, 2905–2913 (2010).
- Waldie, T., McCulloch, H. & Leyser, O. Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *Plant J.* **79**, 607–622 (2014).
- Chen, J. et al. Non-dormant Axillary Bud 1 regulates axillary bud outgrowth in sorghum. *J. Integr. Plant Biol.* **60**, 938–955 (2018).
- Sang, D. et al. Strigolactones regulate rice tiller angle by attenuating shoot gravitropism through inhibiting auxin biosynthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 11199–11204 (2014).
- Agusti, J. et al. Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 20242–20247 (2011).
- Rasmussen, A. et al. Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant Physiol.* **158**, 1976–1987 (2012).
- Koltai, H. Cellular events of strigolactone signalling and their crosstalk with auxin in roots. *J. Exp. Bot.* **66**, 4855–4861 (2015).
- Kapulnik, Y. & Koltai, H. Fine-tuning by strigolactones of root response to low phosphate. *J. Integr. Plant Biol.* **58**, 203–212 (2016).
- Shinohara, N., Taylor, C. & Leyser, O. Strigolactone can promote or inhibit shoot branching by triggering rapid depletion of the auxin efflux protein PIN1 from the plasma membrane. *PLoS Biol.* **11**, e1001474 (2013).
- Gomez-Roldan, V. et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194 (2008).
- Brewer, P. B., Dun, E. A., Gui, R., Mason, M. G. & Beveridge, C. A. Strigolactone Inhibition of Branching Independent of Polar Auxin Transport. *Plant Physiol.* **168**, 1820–1829 (2015).
- Balla, J. et al. Auxin flow-mediated competition between axillary buds to restore apical dominance. *Sci. Rep.* **6**, 35955 (2016).
- Mazur, E., Benková, E. & Friml, J. Vascular cambium regeneration and vessel formation in wounded inflorescence stems of *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **6**, 33754 (2016).
- Toh, S., Holbrook-Smith, D., Stokes, M. E., Tsuchiya, Y. & McCourt, P. Detection of parasitic plant suicide germination compounds using a high-throughput *Arabidopsis* HTL/KAI2 strigolactone perception system. *Chem. Biol.* **21**, 988–998 (2014).
- Dong, J. & Huang, H. Auxin polar transport flanking incipient primordium initiates leaf adaxial-abaxial polarity patterning. *J. Integr. Plant Biol.* **60**, 455–464 (2018).
- Kang, H.-G., Fang, Y. & Singh, K. B. A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in *Arabidopsis* and induces defense-related genes. *Plant J.* **20**, 127–133 (1999).
- Prát, T. et al. WRKY23 is a component of the transcriptional network mediating auxin feedback on PIN polarity. *PLoS Genet.* **14**, e1007177 (2018).
- Sancho-Andrés, G. et al. Sorting motifs involved in the trafficking and localization of the PIN1 auxin efflux carrier. *Plant Physiol.* **171**, 1965–1982 (2016).
- Naramoto, S. et al. ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 21890–21895 (2010).

48. Kitakura, S. et al. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 1920–1931 (2011).
49. Kleine-Vehn, J. et al. Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 540 (2011).
50. Tanaka, H. et al. Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **9**, e1003540 (2013).
51. Tsuchiya, Y. et al. A small-molecule screen identifies new functions for the plant hormone strigolactone. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 741–749 (2010).
52. Scaffidi, A. et al. Strigolactone hormones and their stereoisomers signal through two related receptor proteins to induce different physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **165**, 1221–1232 (2014).
53. Hu, Z. et al. Strigolactone and cytokinin act antagonistically in regulating rice mesocotyl elongation in darkness. *Plant Cell Physiol.* **55**, 30–41 (2014).
54. Bennett, T. et al. Strigolactone regulates shoot development through a core signalling pathway. *Biol. Open* **5**, 1806–1820 (2016).
55. Hu, Q. et al. DWARF14, a receptor covalently linked with the active form of strigolactones, undergoes strigolactone-dependent degradation in rice. *Front Plant Sci.* **8**, 1935 (2017).
56. Jelinková, A. et al. Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking? *Plant J.* **61**, 883–892 (2010).
57. Konopka, C. A., Backues, S. K. & Bednarek, S. Y. Dynamics of *Arabidopsis* dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. *Plant Cell* **20**, 1363–1380 (2008).
58. Leitner, J. et al. Lysine<sup>63</sup>-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of *Arabidopsis* root growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 8322–8327 (2012).
59. Mazur, E. et al. Clathrin-mediated trafficking and PIN trafficking are required for auxin canalization and vascular tissue formation in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* **293**, 110414 (2020).
60. Ljung, K., Bhalerao, R. P. & Sandberg, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **28**, 465–474 (2001).
61. Soundappan, I. et al. SMAX1-LIKE/D53 family members enable distinct MAX2-dependent responses to strigolactones and karrikins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**, 3143–3159 (2015).
62. Friml, J. et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 147–153 (2003).
63. Stirnberg, P., van De Sande, K. & Leyser, H. M. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Dev.* **129**, 1131–1141 (2002).
64. Umehara, M. et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200 (2008).
65. Sorefan, K. et al. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev.* **17**, 1469–1474 (2003).
66. Waters, M. T. et al. Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in *Arabidopsis*. *Dev.* **139**, 1285–1295 (2012).
67. Aoyama, T. & Chua, N. H. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* **11**, 605–612 (1997).
68. Mazur, E., Kulik, I., Hajný, J. & Friml, J. Auxin canalization and vascular tissue formation by TIR1/AFB-mediated auxin signaling in *Arabidopsis*. *N. Phytol.* **226**, 1375–1383 (2020).
69. Friml, J., Benková, E., Mayer, U., Palme, K. & Muster, G. Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *Plant J.* **34**, 115–124 (2003).
70. Abas, L. et al. Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat. Cell Biol.* **8**, 249–256 (2006).

## Acknowledgements

We are grateful to David Nelson for providing published materials and extremely helpful comments, and Elizabeth Dun and Christine Beveridge for helpful discussions. The research leading to these results has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (742985). This work was also supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (5192011), Beijing Outstanding University Discipline Program, the National Natural Science Foundation of China (31370309), CEITEC 2020 (LQ1601) project with financial contribution made by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within special support paid from the National Program of Sustainability II funds, Australian Research Council (FT180100081), and China Postdoctoral Science Foundation (2019M660864).

## Author contributions

J.Z. and J.F. designed and supervised the study. J.Z., E.M., J.B., M.G., P.K., Z.M., Y.L., Y.W., T.P., M.V., V.R., S.P., R.H. and P.T. performed all the experiments. J.Z., C.L., P.B.B. and J.F. wrote the paper, which was discussed and approved by all authors.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17252-y>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.Z. or J.F.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Yohann Boutte for his contribution to the peer review of this work.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



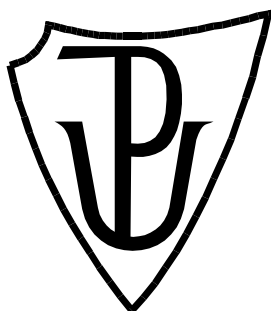
**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Autoreferát disertační práce**

**Chemické metody studia strigolaktonů**

Mgr. Rostislav Halouzka

P1416 Biochemie

Olomouc 2020

Disertace byla vypracována na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a na Oddělení fytochemie a Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnický a zemědělský výzkum.

Disertant: Mgr. Rostislav Halouzka

Školitel: doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.  
Oddělení fytochemie  
Univerzita Palackého v Olomouci, CR Haná

Odborný konzultant: Ing. Sanja Čavar Zeljković, Ph.D.  
Oddělení fytochemie  
Univerzita Palackého v Olomouci, CR Haná

Oponenti: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.  
Katedra kvality a bezpečnosti potravin  
Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00  
Praha-Suchbát

RNDr. Mgr. Tomáš Vaněk, CSc.  
Laboratoř rostlinných biotechnologií  
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 313,  
165 02 Praha 6 - Lysolaje

## ABSTRAKT

Strigolaktony patří mezi rostlinné hormony, které hrají velmi důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Byly řešeny různé způsoby izolace a purifikace strigolaktonů z rostlinného materiálu (kořenů). Jako vhodný model byl vybrán zástupce z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), bob setý (*Vicia faba* L.). Vybraný izolační protokol byl použit společně s optimalizovanými podmínkami separace UHPLC-MS/MS k úspěšné identifikaci SL. Dále jsou představeny ambientní techniky jako budoucí nástroj pro analýzu SL. Obě diskutované metody (DART a DESI) významně zjednodušují přípravu vzorků. Přístup DESI navíc umožňuje zaznamenat prostorovou distribuci analytů v řezu pletiva. Strigolaktony jsou poměrně nestabilní látky, které jsou snadno hydrolyzovány i za mírných podmínek. Jedním z dalších cílů práce bylo otestování jejich chemické stability SL. Testován byl vliv rozpouštědla, kultivačních médií o definovaném složení a několik vybraných pufrů (pH 6,0 a 7,0). Výsledkem byl seznam doporučení a základních pravidel pro použití GR24 a přirozeně se vyskytujících SL. Výsledky získané z kinetických, termodynamických a spektrálních dat reakce GR24 se sedmi různými nukleofily prokázaly, že reakce probíhá prostřednictvím adičně-eliminačního mechanismu (Michaelova reakce).

## ABSTRACT

Strigolactones are phytohormones which play a key role in plant growth and development. Various methods of isolation and purification from the plant material (roots) have been studied. Sown bean (*Vicia faba* L.) from the family *Fabaceae* was chosen as a representative model plant. To successfully identify SL in various plant materials, the selected isolation protocol was used together with optimized separation conditions of UHPLC-MS/MS. In addition, ambient techniques were introduced as future tools for the SL analysis. Both methods (DART and DESI) significantly simplified sample preparation. Moreover, the DESI approach made it possible to record the spatial distribution of the analytes in a tissue section. Strigolactones are unstable substances that are easily hydrolysed even under mild conditions. The study aimed to examine the chemical stability of SL. The effect of the solvent, plant growing media with defined composition and several selected buffers (pH 6.0 and 7.0) were tested. The outcome was a list of recommendations and basic rules on how to use and apply GR24 and naturally occurring SL. Furthermore, the reaction mechanism of hydrolysis was studied. Results obtained from kinetic, thermodynamic, and mass spectral data of the reaction between widely used synthetic strigolactone analogue GR24 and seven different nucleophiles, demonstrated that the reaction proceeded via Michael addition-elimination mechanism.

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 CÍLE PRÁCE .....</b>                                                       | <b>6</b>  |
| <b>2 TEORETICKÝ ÚVOD.....</b>                                                   | <b>7</b>  |
| 2.1 Charakterizace strigolaktonů a jejich výskyt .....                          | 7         |
| 2.2 Stabilita a mechanismus hydrolýzy strigolaktonů .....                       | 8         |
| 2.3 Metabolismus strigolaktonů a signalizace .....                              | 9         |
| 2.4 Fyziologické funkce strigolaktonů .....                                     | 10        |
| 2.5 Metody studia strigolaktonů .....                                           | 11        |
| <b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>                                                | <b>13</b> |
| <b>4 VÝSLEDKY .....</b>                                                         | <b>13</b> |
| 4.1 Selektce vybraných modelových organismů .....                               | 13        |
| 4.2 Vývoj metod izolace a purifikace strigolaktonů z rostlinného pletiva.....   | 13        |
| 4.3 Vývoj UHPLC-MS/MS metody profilování strigolaktonů .....                    | 15        |
| 4.4 Využití ambientních technik – DART a DESI ve studiu strigolaktonů .....     | 18        |
| 4.4.1 Stabilita strigolaktonů ve vybraných kultivačních mediích a pufrech ..... | 20        |
| 4.4.2 Nukleofilní reakce GR24 .....                                             | 23        |
| <b>5 ZÁVĚR .....</b>                                                            | <b>26</b> |
| <b>6 LITERATURA .....</b>                                                       | <b>27</b> |
| <b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>                                         | <b>30</b> |
| <b>8 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE.....</b>                          | <b>31</b> |

## 1 CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce byla aplikace chemických metod ve studiu strigolaktonů.

Konkrétně byly naplánovány tyto cíle:

1. Selektce vhodných biologických modelů pro studium strigolaktonů.
2. Vývoj metod izolace a purifikace strigolaktonů z rostlinného pletiva.
3. Vývoj UHPLC-MS/MS metodiky pro profilování strigolaktonů.
4. Využití ambientních technik – DART a DESI ve studiu strigolaktonů.
5. Studium stability strigolaktonů a mechanismus hydrolýzy GR24.

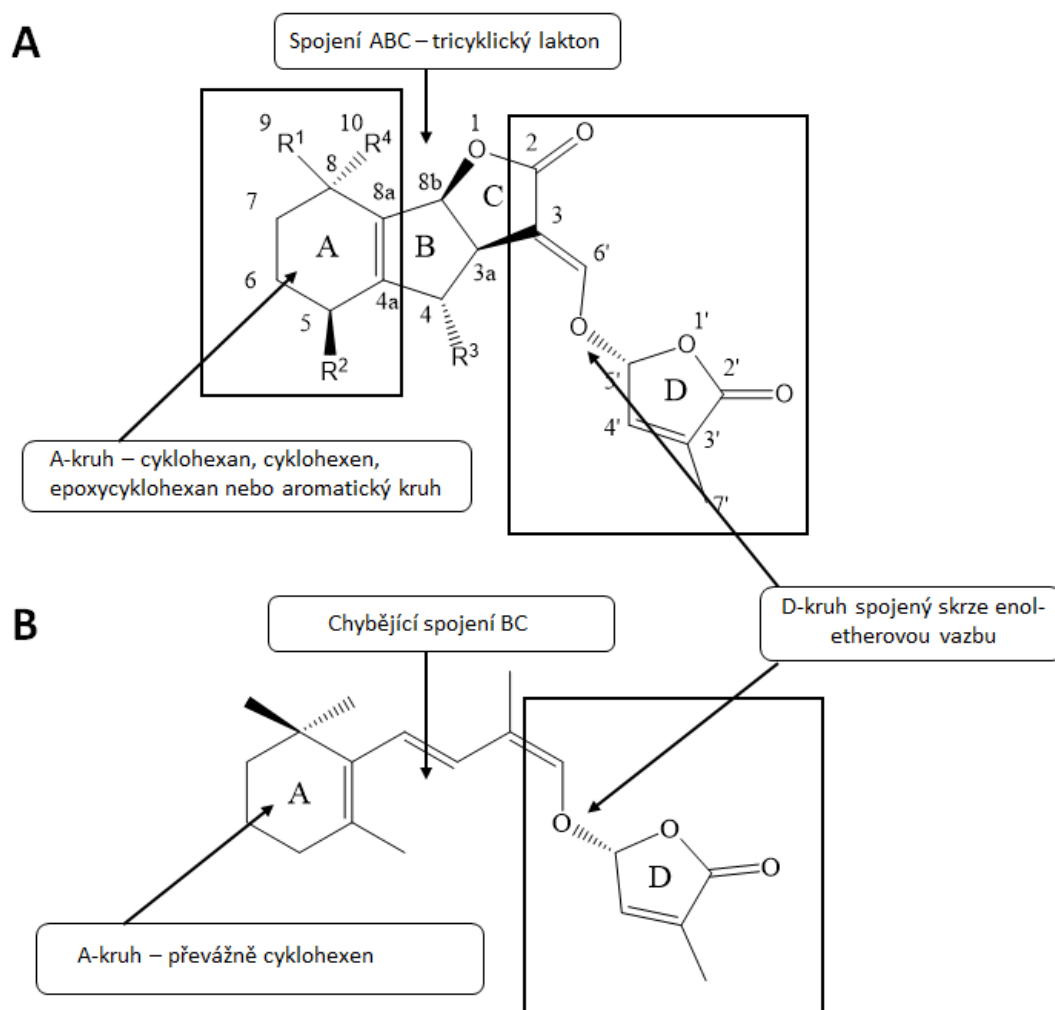
Většina výsledků disertační práce je obsahem publikací v impaktovaném časopise.

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Charakterizace strigolaktonů a jejich výskyt

Strigolaktony (SL), dříve označované jako seskviterpenoidní laktony, jsou látky příbuzné karotenoidům a jejich prekurzorům. Regulují široké spektrum vývojových procesů rostlin prostřednictvím vzájemné interakce a komunikace („cross-talk“) signálních drah s jinými hormony (Xie *et al.*, 2010; Al-Babili a Bouwmeester, 2015). Vyskytují se napříč celou rostlinnou říší, od nižších rostlin, jako jsou mechorosty (*Physcomitrella patens* L.), až po krytosemenné rostliny (Proust *et al.*, 2011). Doposud byly detekovány v kořenových exudátech a pletivech široké škály jednoděložných a dvouděložných rostlin. Je známo, že jednotlivé druhy rostlin mohou produkovat řadu různých SL ve variabilním poměru a množství. Uvádí se, že průměrná denní produkce se pohybuje mezi 15-30 pg/rostlina (Sato *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2013).

SL mohou být rozděleny do dvou skupin dle jejich struktury: kanonické a nekanonické. Kanonické jsou tvořeny D-kruhem (hydroxymethylbutenolid), který je připojený skrze enol-etherovou vazbu k tricyklickému ABC-laktonovému kruhu (Obr. 1). Druhá skupina, nekanonické SL, postrádá jedno nebo více spojení mezi jednotlivými částmi základního tricyklického laktonu za stálého zachování enol-etherové vazby a D kruhu. Toto spojení, jak již bylo uvedeno, je esenciální pro vyjádření biologické aktivity všech doposud známých SL (Yoneyama *et al.*, 2018).



**Obr. 1** Strukturní vzorec SL, A) základní tricyklický skelet kanonických SL, B) modelová struktura karlaktonu – zástupce nekanonických SL.

## 2.2 Stabilita a mechanismus hydrolýzy strigolaktonů

Stabilita SL je velmi důležitým klíčem k pochopením jejich biologické aktivity. Jedná se o velmi nestabilní látky, u kterých jejich chemická stabilita závisí především na zvolených experimentálních podmínkách: pH, použitém rozpouštědle, teplotě, intenzitě osvětlení, a především přítomnosti nukleofilních látek. Naopak vykazují vysokou stabilitu v kořenových exudátech, které jsou charakterizované jako olejovité směsi tvořené řadou nízko a vysokomolekulárních látek (Zwanenburg a Pospíšil, 2013; Halouzka *et al.*, 2018).

Mechanismus štěpení vlivem ataku nukleofilní látky nebo hydrolýzy má za následek porušení stability enol-etherové vazby a oddělení hydroxybutenolidu (D-kruhu) od základního ABC skeletu. Doposud bylo postulováno několik mechanismů nukleofilního ataku na molekulu strigolaktonu. První mechanismus nukleofilního ataku na molekulu SL byl navržen v roce 1992 (Mangnus a Zwanenburg, 1992; Zwanenburg a Pospíšil, 2013). Reakční mechanismus je

charakterizován sledem několika kroků a byl potvrzen na základě reaktivity syntetického analoga GR24 vůči vybraným nukleofilním látkám. Model předpokládá v prvním kroku tzv. Michaelovu reakci, při níž dochází k nukleofilní adici karbanionu nebo jiného nukleofilu k  $\alpha/\beta$ -nenasycené karbonylové sloučenině. Mechanismus reakce spočívá v ataku nukleofilního činidla na enol etherovou vazbu SL, za současného odštěpení D-kruhu a tvorby komplexu ABC-nukleofil. Vzniklý produkt je možné izolovat (Mangnus a Zwanenburg, 1992, Zwanenburg a Pospíšil, 2013). Avšak tento model byl kritizován Scaffidim (2012) ve snaze sjednotit molekulární mechanismy karrikinů a SL. Namísto adiční-eliminačního mechanismu byl navržen alternativní model, který předpokládá adici nukleofilu na nenasyčený furanon v pozici C5'. Tento postulovaný model je založen na podobnosti reakce mezi nukleofilními činidly s karrikininy, ačkoliv substituční schéma butenolidového kruhu karrikinů se výrazně liší od SL (Scaffidi *et al.*, 2012).

### 2.3 Metabolismus strigolaktonů a signalizace

Hlavním místem biosyntézy SL jsou kořeny, ze kterých jsou následně distribuovány do nadzemních částí rostliny, kde ovlivňují nejen růst stonku, ale také regulují vývoj nových výhonků. Druhou možností jejich distribuce je vyloučení do rhizosféry pomocí kořenového systému, za jejich aktivní účasti na vzniku symbiotického vztahu mezi rostlinou a houbou (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2010; 2016). V roce 2005 (Matušová *et al.*, 2005) byl objasněn biosyntetický původ SL, který potvrdil skutečnost, že jsou stejně jako kyselina abscisová odvozeny od karotenoidů (Matušová *et al.*, 2005; López-Ráez *et al.*, 2008; Rani *et al.*, 2008).

Proces přeměny karotenoidů vyžaduje řadu enzymatických reakcí, které způsobují změny základní struktury molekuly karotenoidu (C40) za vzniku tricyklického laktonu (hydroxylace, methylace a epoxidace) (Matušová *et al.*, 2005). Důležitým krokem je vznik karlaktonu, prekursoru SL, až po vzájemné přeměny jeho derivátů. Jedná se o sled reakcí, které začínají reverzibilní konverzí všech *trans*- $\beta$ -karotenů na 9-*cis*-karoten, katalyzovanou karotenisomerasou (EC 5.2.1.14). Karotenisomerasa nese specifické označení DWARF27 (D27). V případě karotenoid-štěpící dioxygenasy jsou to zkratky CCD7 a CCD8, které jsou esenciální složky pro metabolismus SL. Gen *D27* byl poprvé charakterizován v kořenech rýže a huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.) (Matušová *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2012). Vzniklý 9-*cis*-karoten je štěpen stereospecifickou monooxygenasou (CCD7) na dvojně vazbě C9'-C10', čímž vzniká 9-*cis*-apo-10'-karotenal (C27) a  $\beta$ -ionon (C13). Ve třetím kroku jiná stereospecifická monooxygenasa (CCD8) katalyzuje přeměnu 9-*cis*- $\beta$ -apo-10'-karotenalu

na karlakton a sloučeninu C8  $\omega$ -OH-(4-CH<sub>3</sub>)heptanal. Primárním produktem biosyntetické dráhy je molekula karlaktonu (C19), který je považován za prekursor kanonické a nekanonické SL. Jeho další přeměna je katalyzována pomocí enzymů z rodiny hemových proteinů cytochromů P450 na další bioaktivní SL (Booker *et al.*, 2005).

## 2.4 Fyziologické funkce strigolaktonů

SL byly původně identifikovány jako signální látky, které indukují klíčení parazitických rostlin rodu *Striga* a *Orobanch*e (Cook *et al.*, 1966). K stimulaci růstu a nastartování životního cyklu parazita dochází jen tehdy, pokud je zachycen signál ve formě molekuly SL. Koncentrace, která je nutná pro jeho vyklíčení, odpovídá hodnotě  $10^{-12}$  M, přičemž pro hormonální funkci v rostlině je dostatečná koncentrace  $10^{-8}$  M. *Striga* a *Orobanch*e parazitují na zcela rozdílném hostiteli a vyskytují se v různých částech světa, ale i přesto je jejich životní cyklus do značné míry podobný (Bouwmeester *et al.*, 2003; Humphrey *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2012). Signalizace mezi hostitelskou rostlinou a parazitem probíhá v několika etapách. Nejdůležitějším krokem životního cyklu parazitické rostliny je zachycení signálu ve formě molekuly SL, které jsou uvolněny z kořenů hostitelské rostliny do rhizosféry, kde indukují klíčení parazitických semen. Avšak indukce signálu a úspěšné klíčení nezaručují přežití parazita. Průběh infekce je charakterizován tvorbou tzv. apresorií (slouží pro mechanické narušení buněčné stěny), ze kterých se diferencují tenká vlákna – haustoria. Haustorium je specifický orgán, který usnadňuje průnik parazitické rostliny přes kořenový systém hostitele (Butler, 1995; Bouwmeester *et al.*, 2003).

Další významná biologická funkce SL souvisí se zapojením v symbiotickém vztahu mezi vyššími rostlinami a houbami, jedná se o tzv. arbuskulární mykorhizu (AM). Zvýšená produkce SL představuje vyšší pravděpodobnost vytvoření symbiózy s mykorhizními houbami, z oddělení *Glomeromycota*; třída *Glomeromycetes* (Harrison *et al.*, 2005). Symbiotický vztah je závislý na dostupnosti živin a minerálů. V případě jejich nedostatku, zejména fosforu nebo dusíku, obsahují kořenové exudáty vyšší koncentraci SL. AM symbióza je nejrozšířenějším vztahem v rostlinné říši (80 % rostlin), díky kterému mohou rostliny zvyšovat příjem fosforu (López-Ráez *et al.*, 2008).

SL ovlivňují řadu aspektů vývoje a růstu nejen růst nadzemní části rostlin, kde potlačují růst auxilárních pupenů a větvení stonku, ale také hrají důležitou roli ve vývoji kořene (Kapulnik *et al.*, 2011; Koltai *et al.*, 2010). Při nedostatku fosforu dochází ke změnám kořenového systému (López-Bucio *et al.*, 2002) a zároveň k ovlivnění produkce SL. Změny tvaru a struktury kořenového systému jsou nutné pro adaptaci, přičemž změny koncentrace

fosforu v půdě vedou ke zvýšenému větvení, které rostlině umožní se lépe vypořádat s limitujícími podmínkami prostředí. Pro rostliny potýkající se s nedostatkem fosforu je charakteristický zvýšený růst a prodlužování postranních kořenů a tyto projevy jsou zprostředkovány endogenními signálními molekulami SL (Bonser *et al.*, 1996; Ruyter-Spira *et al.*, 2011).

## 2.5 Metody studia strigolaktonů

Izolace SL je poměrně náročným procesem vzhledem k tomu, že jsou produkovány v extrémně nízké koncentraci, navíc je zde i poměrně často diskutována otázka jejich omezené stability. Preferovanou metodou jejich izolace je extrakce z rostlinných exudátů produkováných kořenovým systémem rostliny (Yoneyama *et al.*, 2007). Nejčastějším způsobem izolace SL z kořenových exudátů je extrakce kapalina/kapalina. Kolekce a extrakce jsou opakovatelné procesy, které lze aplikovat po několik dní, což zajišťuje získání dostatečného množství cílových analytů (Awad *et al.*, 2006; Yoneyama *et al.*, 2007; Yoneyama *et al.*, 2013). Alternativní způsobem kolekce exudátů může být zajištěna také pomocí adsorpce na aktivní uhlí (Awad *et al.*, 2006; Yoneyama *et al.*, 2013). Bohužel tato metoda není dostatečně selektivní a hodnoty návratnosti po eluci acetonem jsou extrémně nízké.

Mimo sběr exudátů jsou SL izolovány z rostlinných pletiv (kořene), zde ale obecně platí, že množství výchozího materiálu odpovídá řádově jednotkám gramů (Hillman, 1978; Harrison, 2011; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Mezi tradiční a běžně používanou metodu pro izolaci SL patří macerace, která je založena na ponoření malých kusů nastříhaných kořenů o průměru 2 mm do čerstvě redestilovaného EtOAc po dobu nejméně 24-48 hodin. Cílové sloučeniny se uvolňují do rozpouštědla a jsou dále zpracovávány (Yoneyama *et al.*, 2016). V současnosti byl navržen a optimalizován alternativní způsob, který kombinuje homogenizaci rostlinného pletiva pomocí tekutého dusíku a jeho následnou extrakci do zvoleného rozpouštědla (Boutet-Mercey *et al.*, 2018).

Nejčastěji používanou separační technikou pro analýzu SL je ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Na počátku výzkumu SL byla ale nejprve využívána metoda HPLC vybavená spektrofotometrickými detektory (UV nebo DAD). Tato technika byla omezena nedostatečnou citlivostí a nepřesnou interpretací UV profilů analyzovaných látek, např. strigol a orobanchol mají stejný chromofor (Yokota *et al.*, 1998) a tudíž jejich rozlišení bylo možné pouze na základě retenčních časů. To samé platilo pro plynovou chromatografii (GC), která v době U(H)PLC-MS/MS už nemá pro studium SL dostatečné využití (Sato *et al.*, 2003, 2005; Xie *et al.*, 2010).

V poslední době se začíná diskutovat o možnosti použití ambientních technik (AT) pro studium rostlinných hormonů. Tyto poměrně mladé hmotnostní techniky mají iontový zdroj mimo hmotnostní analyzátor a jsou vhodné pro studium širokého spektra nízkomolekulárních látek. Mezi nejčastěji používané (AT) patří DART (přímá analýza v reálném čase) a DESI (desorpční ionizace elektrosprejem) (Venter *et al.*, 2008; Weston, 2010). Značná výhoda těchto technik spočívá v minimální nebo vůbec žádné přípravě vzorku, jen malá část rostlinného pletiva (list, stonek nebo kořen) nebo surový extrakt může být zaveden přímo do iontového zdroje a připraven pro analýzu (Cha *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2016). Na druhé straně uvedené techniky čelí problému reprodukovatelnosti výsledků. I přesto mají velký potenciál pro studium rostlinných hormonů.

### 3 MATERIÁL A METODY

Detailní popis použitých metod a výběr biologického materiálu je uveden v disertační práci, případně v příložených publikacích (Halouzka *et al.*, 2018; Halouzka *et al.*, 2020).

### 4 VÝSLEDKY

#### 4.1 Selektce vybraných modelových organismů

Jedním z prvotních cílů byla selektce vhodného biologického modelu a kultivaru, který by díky rychlému růstu a relativně vysoké koncentraci produkovaných SL umožnil vývoj analytické metody pro profilování SL. Nejlepším modelem se ukázali být bob setý (*Vicia Faba L.*), hrách setý (*Pisum sativum L.*), a čirok dvoubarevný (*Sorghum bicolor L.*). Mezi modelové rostliny jsem zařadil i vikev setou, u níž nebyla přítomnost SL doposud publikována. Všechny uvedené plodiny jsou schopny během kultivace o délce 3 týdnů vytvořit bohatý kořenový systém s dostatečným množstvím kořenové biomasy. Jako nevhodné pro další práci byly rajče jedlé a kukuřice setá. V minulosti byl čirok dvoubarevný použit jako modelová rostlina pro optimalizaci protokolu izolace a purifikace SL (Yoneyama *et al.*, 2016). Bob setý a hrách setý byly vybrány, protože patří do dobře prostudované čeledi bobovitých (Yoneyama *et al.*, 2008; Foo a Davies, 2011 Pavan *et al.*, 2016; Boutet-Mercey *et al.*, 2018).

#### 4.2 Vývoj metod izolace a purifikace strigolaktonů z rostlinného pletiva

Metody izolace a purifikace SL jsou základním stavebním kamenem, od kterého se odvíjí úspěšná koncová analýza. V rámci disertační práce byla řešena řada způsobů izolace SL z kořenových pletiv. Nejjednodušším přístupem zůstává macerace nastříhaných kousků (2-5 mm) kořenů rostlin v EtOAc nebo homogenizace kořenů v tekutém dusíku s následnou extrakcí EtOAc. Samotná prostá extrakce nezajišťuje dostatečné přečištění vzorku, a proto je nutné přidat izolační krok v podobě extrakce na pevné fázi (SPE).

V rámci studie byly testovány tyto sorbenty: organický polymerní sorbent styren divinilbenzen (Strata-X), silikagel (Supelclean LC-Si) a C18 (Strata C18-U). Pro všechny sorbenty byla určena návratnost GR24 ( $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) jak z čistého rozpouštědla, tak z rostlinného extraktu. Pro sorbenty Strata C18U a Strata-X byla typická časově nenáročná SPE procedura s dlouhou dobou odpařování vzorku. Doba odpaření byla ovlivněna především množstvím vody zachycené v sorbentu kolony, která následně koeluovala s analytem a bránila tak rychlé prekoncentraci vzorku. Uvedené faktory významně ovlivňují výslednou návratnost procesu. Nejvyšších hodnot návratnosti bylo dosaženo při použití silikagelu, a to při externí

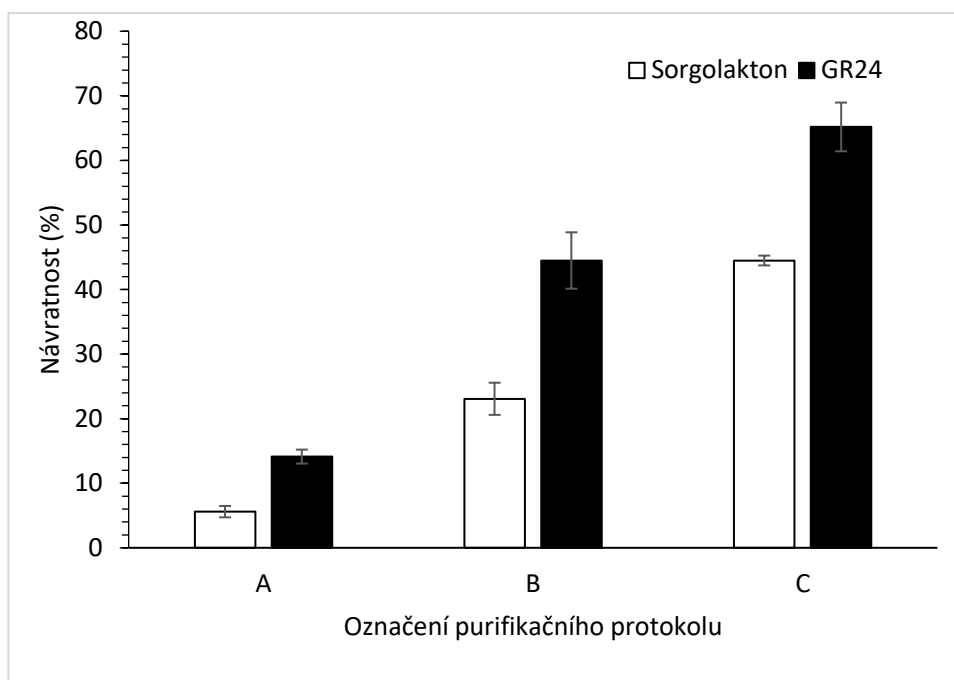
aplikaci GR24 v čistém rozpouštědle (92 %), tak i do rostlinného extraktu (cca 70 %). Sorbent Strata-C18U poskytoval nejnižší hodnoty návratnosti (pouze 43 % z rostlinného extraktu), byl tedy pro purifikaci SL nejméně vhodný. Hodnoty návratnosti jsou uvedeny v Tab. 1.

**Tab. 1** Návratnost vybraných sorbentů pro stanovení návratnosti GR24.

| Sorbent   | GR24         |              |
|-----------|--------------|--------------|
|           | A            | B            |
| Strata-X  | 87,01 ± 2,82 | 58,90 ± 4,41 |
| Silikagel | 92,36 ± 5,10 | 70,09 ± 5,88 |
| C18       | 69,68 ± 3,12 | 42,71 ± 3,17 |

A – v čistém rozpouštědle; B – v rostlinném extraktu

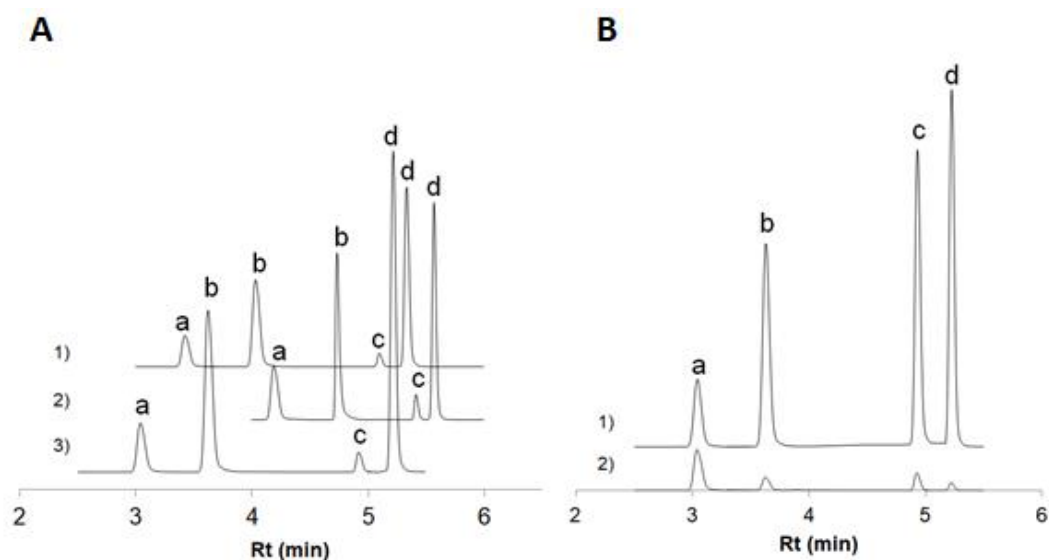
Pro další část práce byla na základě dílčích experimentů vyselektována modelová rostlina. Jednalo se o 3 týdny staré sazenice *V. faba*. Jako vhodný SPE sorbent pro purifikaci SL byl vybrán silikagel. Testoval jsem několik izolačních a purifikačních protokolů, které se současně využívají ve vědecké praxi: A) Yoneyama *et al.* (2016), B) Kisugi *et al.* (2013) a C) Boutet-Mercey *et al.* (2018). Srovnání protokolů je prezentováno ve formě Obr. 2. Nejvyšší návratnost (65,19 ± 3,77 % pro GR24 a 42,50 ± 0,76 % pro sorgolakton) byla dosažena za použití protokolu C (Boutet-Mercey *et al.*, 2018), kde byl hlavní rozdíl vedle počtu izolovaných frakcí dán především homogenitou vzorku. Oba analyty byly přidány na začátku extrakce.



**Obr. 2** Testování návratnosti GR24 (■) a sorgolaktonu (□) pomocí vybraných izolačních a purifikačních postupů z rostlinného pletiva (A – Yoneyama *et al.* (2016); B – Kisugi *et al.* (2013); C - Boutet-Mercey *et al.* (2018).

### 4.3 Vývoj UHPLC-MS/MS metody profilování strigolaktonů

Metoda UHPLC nabízí kratší doby analýzy a větší účinnost separace. Ve spojení s MS/MS tvoří nejúčinnější metodu SL identifikace a kvantifikace. Při detekci a kvantifikaci se využívá režim MRM, který slouží pro monitorování charakteristických fragmentů a tím zajišťuje vysokou selektivitu (Sato *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2010; Iseki *et al.*, 2018). Nejvyšší citlivost společně s optimální separací analyzovaných složek poskytovala mobilní fáze o složení voda/methanol. Dále byl sledován vliv vybraných mobilních fází na absolutní intenzitu mateřských ionů. Monitorování proběhlo v režimu načítání plných hmotnostních spekter (Full Mass Scan). Získaná data pomohla s výběrem a optimalizací MRM přechodů. Je důležité zmínit, že podmínky byly optimalizovány pro orobanchol, strigol, sorgolakton a 5-deoxystrigol. Později byly do metody zahrnuty i další SL (GR24, fabacyl acetát a orobanchyl acetát). Vyjma protonizovaných molekulárních iontů GR24 a fabacylu acetátu  $[M+H]^+$  (nejsou uvedeny na Obr. 3) byla pozorována nejvyšší intenzita signálu ve formě sodných aduktů  $[M+Na]^+$  SL.



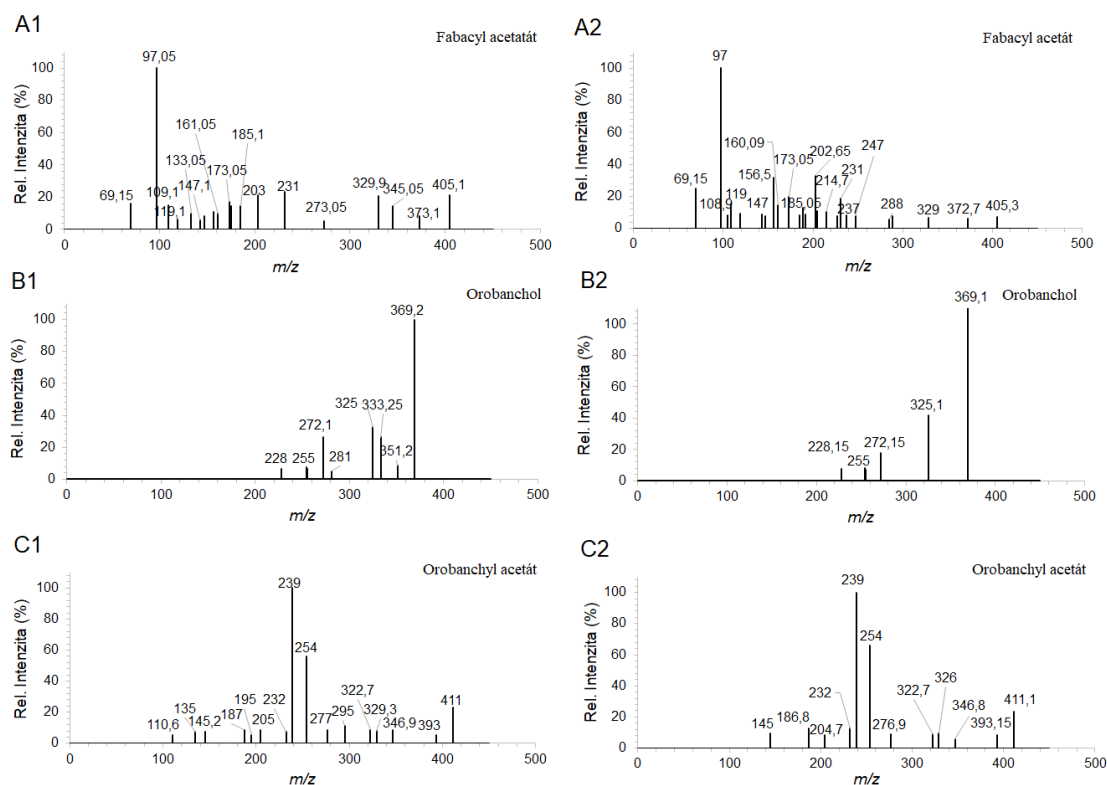
**Obr. 3** MRM chromatogram směsi vybraných endogenních strigolaktonů (a – orobanchol, b – strigol, c – sorgolactone, d – 5DS). A) vliv složení mobilní fáze na separaci (1 – 20 mM octan amonný/methanol; 2 – 20 mM mravenčan amonný/methanol; 3 – voda/methanol, B) vliv výběru MRM přechodů na citlivost (1 – sodné adukty; 2 – protonované molekulární ionty).

MRM záznam je velice důležitý pro jednoznačnou identifikaci SL, jak bylo prokázáno v nedávno publikovaném článku Rial *et al.*, (2018.) V jejich případě nedokázali oddělit stereoizomerní sloučeniny strigol a orobanchol RP chromatografií, ale byli schopni je rozlišit pomocí příslušných přechodů MRM. Je třeba poznamenat, že většina SL je analyzována v pozitivní módu ionizace. Jedinou výjimkou je kyselina karlaktonová, která je detekovaná v negativním módu, jako mnoho jiných kyselin (Iseki *et al.*, 2018). Volba přechodů MRM závisí na složení mobilní fáze a pH. Nízké pH mobilní fáze potlačuje tvorbu sodných nebo draselných aduktů ve prospěch protonovaných molekulárních iontů  $[M+H]^+$ . Preferovanou volbou řady autorů je neokyselená mobilní fáze a s tím spojené monitorování sodných aduktů  $[M+Na]^+$ , pro které je charakteristický fragment odpovídající neutrální ztrátě  $[M+Na-97]^+$  (Sato *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2009; Yoneyama *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2016, Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Námi zvolené přechody vycházely z automatické MRM optimalizace. Jediný fabacyl acetát poskytoval vyšší intenzitu signálu ve formě protonizovaných molekulových iontů  $[M+H]^+$  ( $405 > 231$  a  $405 > 97$ ), což korespondovalo s prací Rial *et al.*, (2018). Výsledky identifikace jsou prezentovány v Tab. 2.

**Tab. 2** Analýza zastoupení SL v kořenových extraktech z vybraných rostlinných druhů pomocí UHPLC-MS/MS. Pozitivní identifikaci +, negativní -.

| Analyt            | <i>V. faba</i> | <i>P. sativum</i> | <i>S. bicolor</i> | <i>V. sativa</i> |
|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Orobanchol        | +              | +                 | -                 | +                |
| Strigol           | -              | -                 | -                 | -                |
| 5DS               | +              | +                 | +                 | -                |
| Sorgolakton       | -              | -                 | +                 | -                |
| Fabacyl acetát    | +              | +                 | -                 | +                |
| Orobanchyl acetát | +              | +                 | -                 | +                |

Je důležité zdůraznit, že se jedná o první práci pojednávající o analýze SL ve *V. sativa*, ve které byl identifikován fabacyl acetát (405,1 > 97,0), orobanchyl acetát (411,0 > 254,0) a ve stopovém množství byl detekován i orobanchol (368,8 > 325,2,0). Přítomnost uvedených SL potvrdila předpoklad, že kvalitativně bude podobná *V. faba* a *P. sativum*, protože všichni tři uvedení zástupci patří do čeledi bobovitých a produkují pro ně charakteristické SL. Mezi běžně vyskytující se SL u čeledi bobovitých patří také 5-deoxystrigol (352,8 > 256,1), který však nebyl v extraktu *V. Sativa* detekován, na rozdíl od extraktů *V. faba* (Yoneyama *et al.*, 2008; Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Trabelsi *et al.*, 2017) a *P. sativum* (Yoneyama *et al.*, 2008, Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009; Pavan *et al.* 2016; Boutet-Mercey *et al.*, 2018). Další rostlinou byl *S. bicolor*, který patří mezi nejčastěji analyzovaný model v rámci SL problematiky. V minulosti sloužil jako modelová rostlina pro optimalizaci metody izolace a purifikace SL z rostlinných pletiv (Yoneyama *et al.*, 2016), navíc je znám produkcí několika důkladně prostudovaných SL: sorgolaktonu, sorgomolu a 5-deoxystrigolu (Sato *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2010; Delaux *et al.*, 2012). V kořenovém extraktu *S. bicolor* se mi podařilo detekovat 5-deoxystrigol a sorgolakton (339,20 > 242,20). Oba uvedené SL byly identifikovány na základně shody hmotnostního spektra, MRM přechodů a retenčních časů s příslušnými standardy (Obr. 4).



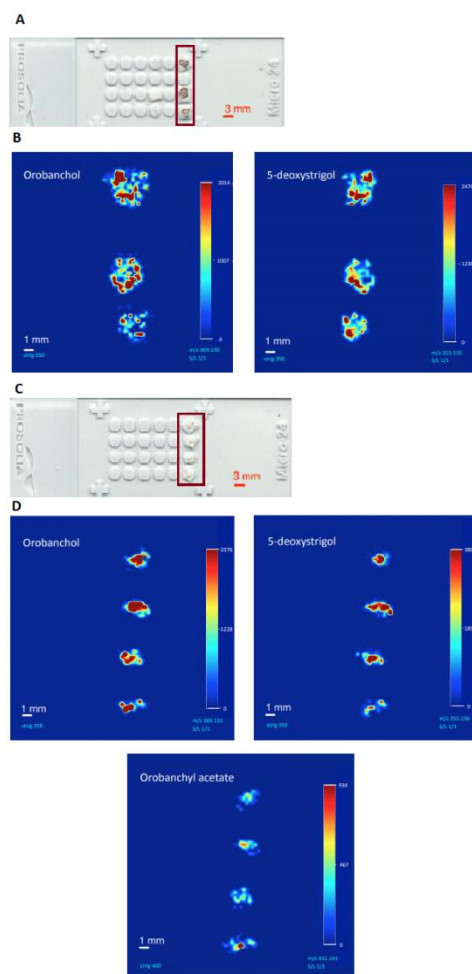
**Obr. 4** Příklad MS/MS spekter identifikovaných SL: fabacyl acetátu, orobancholu a orobachyl acetátu. Porovnání spekter příslušných standardů (A1, B1 a C1) s MS/MS spektry SL detekovaných v extraktu *P. sativum* (A2, B2) a *V. faba*. (C2)

#### 4.4 Využití ambientních technik – DART a DESI ve studiu strigolaktonů

Identifikace pomocí techniky DART byla zvolena na základě dobrých vlastností, kterými jsou minimální příprava vzorku a rychlá analýza. Technika DART je vhodná pro analýzu nízkomolekulárních látek s hmotou  $m/z < 1500$  (Yew, 2019). V minulosti byla úspěšně použita pro studium řady látek např. alkaloidů (Lesiak *et al.*, 2016), silic (Giffen *et al.*, 2017), lipidů (Antal *et al.*, 2016), a mastných kyselin (Cody *et al.*, 2012). Důvodem, proč doposud nenašla využití při studiu fytohormonů je extrémně nízká endogenní koncentrace těchto látek.

V daném uspořádání HR-DART-Orbitrap-MS byla zjištěna přítomnost SL, která se shodovala s naměřenými daty pomocí UHPLC-MS/MS. Výstupem měření bylo určení hodnoty správnosti měření, pro každý detekovaný SL. Správnost měření je definována jako relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou a teoreticky vypočtenou hodnotou  $m/z$  sledovaného iontu, vztažený k teoretické hodnotě. Je to bezrozměrná veličina a je vyjádřena v ppm. Pro určení správného elementárního složení se uvádí jako dostatečné hodnoty menší než 5 ppm, kterých bylo dosaženo u všech identifikovaných SL.

Další použitou ambientní technikou byla HR-DESI-Orbitrap-MS, která byla použita pro detekci SL, ale hlavním záměrem aplikovat metodu pro vytvoření 2D mapy prostorové distribuce SL v řezu stonku a kořene. Pro přípravu řezů byl použit vibratom, díky kterému jsme zajistili reprezentativní řezy pouze od *V. faba* a *P. sativum*. V ostatních případech jsem nebyl schopen získat řezy o definované tloušťce, docházelo k deformaci povrchu segmentů pletiva. Jedná o první záznam prostorové distribuce SL pomocí HR-DESI. Dle našich předpokladů byla nejvyšší intenzita signálu soustředěna v centrální oblasti řezu kořene. Pro ilustraci je zobrazena destička s upevněným biologickým materiálem (Obr. 5A – *V. faba*, C – *P. sativum*), který byl posléze skenován a výsledkem byl 2D záznam intenzit analyzovaných látek (Obr. 5B - orobanchol, 5-deoxystrigol; 5D - orobanchol, 5-deoxystrigol a orobanchyl acetát). Dalším pozorovaným problémem bylo smršťování řezů rostlinných pletiv, které bylo způsobeno jejich dehydratací. Jako možné řešení se nabízí otisk segmentu rostlinného pletiva nebo celého orgánu (např. listu). Biologický materiál je lisován pomocí mírného tlaku na porézní teflon při současném zachování prostorového rozložení analyzovaných analytů (Li *et al.*, 2011, 2013, Thunig *et al.*, 2011). V práci Rejšek *et al.*, (2017) byl problém analýzy neplanárních povrchů vyřešen pomocí iontového zdroje s laserovou triangulací. Pohyb iontového zdroje po souřadnicích os xyz umožňuje udržovat konstantní vzdálenost mezi povrchem fixovaného vzorku a sprejovací kapiláry. Pohyb je důkladně snímán pomocí laserového senzoru a následně vyhodnocen tak, aby nedošlo k přímému kontaktu s povrchem vzorku.



**Obr. 5** Preparáty příčného řezu kořene *V. faba* (A) a *P. sativum* (C) upevněných na podložním skle. Záznam 2D mapy prostorové distribuce vybraných SL, B) *V. faba*, - orobanchol, 5-deoxystrigol, D) *P. sativum* – orobanchol, 5-deoxystrigol a orobanchyl acetát. Měření proběhlo na přístroji HR-DESI-Orbitrap-MS.

#### 4.4.1 Stabilita strigolaktonů ve vybraných kultivačních médiích a pufrech

Záměrem bylo sledovat pokles obsahu SL v různých kultivačních médiích nebo ve tlumivých roztocích (pufrech), což by poskytlo cenné informace o tom, jak správně skladovat vzorky a časově rozvrhnout biologický/chemický experiment, než dojde k poklesu koncentrace či úplnému rozkladu SL.

Stabilita GR24 byla stanovena v modifikovaném  $\frac{1}{2}$  Hoaglandově živném médiu (roztok obsahující definované množství anorganických solí, které jsou nezbytné pro růst rostlin s různými koncentracemi fosfátu (Pi). Dále bylo testováno Murashige a Skoog (MS) médium (sacharosa; +/-) (Roycewicz a Malamy, 2012). Spektrofotometrické monitorování koncentrace GR24 proběhlo při 239 nm po dobu 24 hodin. Nejvýraznější pokles koncentrace GR24 (10 %) by pozorován v  $\frac{1}{2}$  Hoaglandově médiu s koncentrací Pi 250  $\mu$ M. GR24 vykazoval velmi vysokou stabilitu v  $\frac{1}{4}$  Hoaglandově médiu (obsahujícím 25  $\mu$ M +Pi/-Pi). MS médium

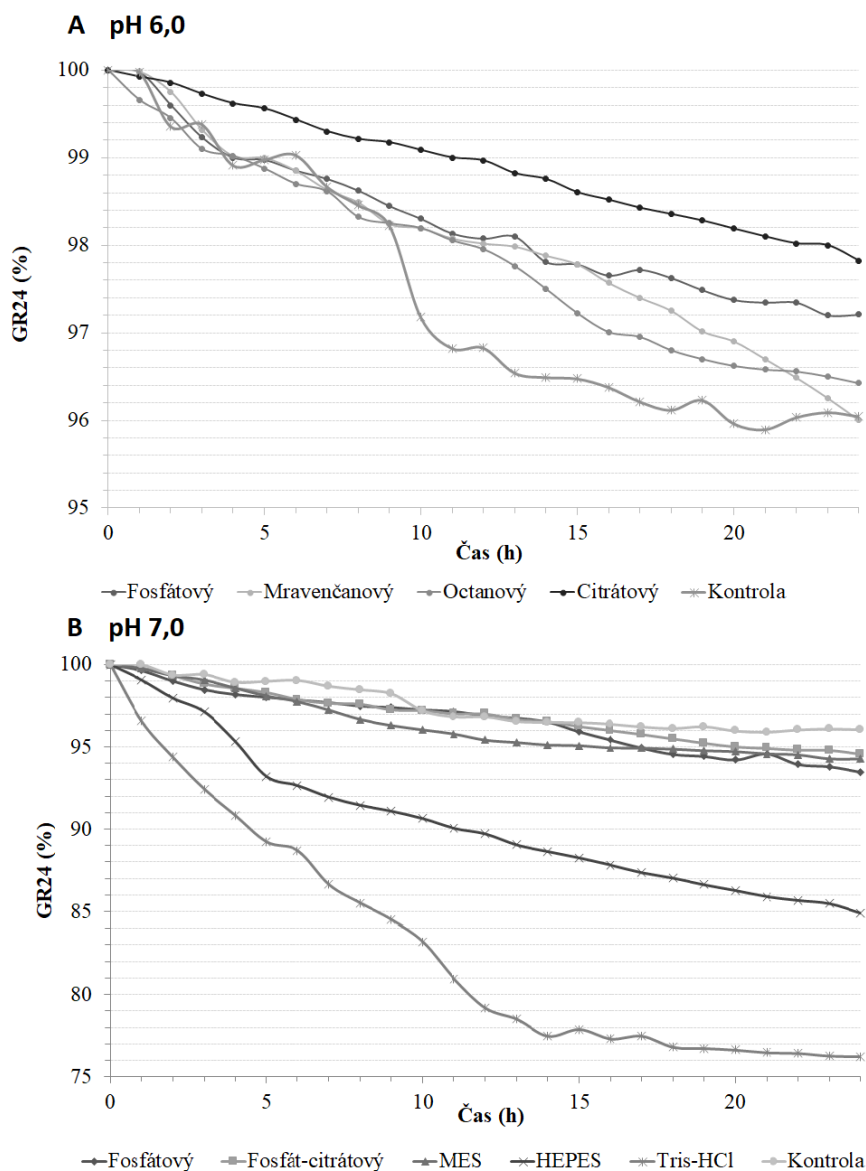
(sacharosa; +/-) bylo také vhodné pro pokusy s GR24, tj. po 24 hodinách se rozložilo minoritní množství odpovídající 3-5 % GR24. Získané výsledky byly navíc podpořeny další studií, ve které byl testován vliv  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  fosfátového pufru s methanolem (3:1; v/v) s poločasem rozkladu 9 h (Rasmussen *et al.*, 2013). Předpokládáme-li, že fosfátové ionty působí jako nukleofilní činidlo stejným způsobem jako ostatní nukleofilní látky (Nu) zvažované v této studii (např. methanol), tak jejich přítomnost bude mít značný vliv na chemickou stabilitu přirozeně se vyskytujících SL.

Lze konstatovat, že celková koncentrace SL v kořenových exudátech je do značné míry ovlivněna složením chemickým složením kultivačního média. Hydroponická kultivace rostlin bez  $\text{Pi}$  je běžně používanou metodou pro zvýšení produkce SL a jejich následné uvolnění a sběr ve formě kořenových exudátů (López-Ráez *et al.*, 2008; Jamil *et al.*, 2011; Yoneyama *et al.*, 2012). Významný rozdíl v koncentraci produkovaných SL lze pozorovat nejdříve po 24 h od odstranění  $\text{Pi}$  z média. Avšak stále zůstává nezodpovězená otázka, jestli je zvýšená koncentrace SL důsledkem nedostatku  $\text{Pi}$  nebo se jedná pouze o eliminaci interferující složky ovlivňující jejich hydrolytickou stabilitu.

Stabilita GR24 byla stanovena pro vybrané pufrы o pH 6,0 (Obr. 6A) a pH 7,0 (Obr. 6B). Pufrы byly vybrány na základě pufráční kapacity, která se nacházela v rozsahu hodnot 6,0-8,0 stupnice pH. V tomto rozmezí pH jsou SL relativně stabilní. Jako kontrola, byla použita Mili-Q voda, kde byl stanoven poločas rozkladu GR24  $\sim 11$  dnů, což je v souladu s dříve publikovanými daty (Akiyama *et al.*, 2010). Byla sledována změna koncentrace GR24 v pufrách s hodnotou pH 6,0 (acetátový, fosfátový, formátový a citrátový) a vybraných pufrách o pH 7,0 (fosfátový, fosfát-citrátový a MES). Uvedené pufrы vykazovaly pokles koncentrace o pouhých 5 % za dobu 24 hodin. Lze konstatovat, že jsou vhodnými roztoky nejen pro experimenty s GR24, ale také i pro jeho krátkodobé skladování. Naproti tomu koncentrace GR24 se v pufrách HEPES a Tris-HCl (pH 7,0) po 24 hodinách snížila o 15-25 %. Oba testované pufrы, HEPES a Tris-HCl obsahují látky, které fungují jako donor elektronového páru. Takové sloučeniny mohou působit jako nukleofilní činidla a jejich přítomnost v roztoku může vést k hydrolyze GR24, resp. molekuly SL, a proto jsou nevhodné.

Dalším experimentem v rámci testování bylo srovnat stabilitu GR24 a 5-deoxystrigolu. Testování probíhalo po dobu 4 dnů ve 24 h intervalech. Bylo potvrzeno, že 5-deoxystrigol, jako zástupce přirozených SL je méně stabilní než jeho syntetický analog. Ztráty se pohybovaly v rozmezí 20 a 95 %. Nejvyšší úbytek koncentrace byl pro oba analyty pozorován v Tris-HCl pufru (pH 7,0). Po 96 h došlo k více jak 95% ztrátě 5-deoxystrigolu a 63% GR24. Největší úbytek 5-deoxystrigolu byl pozorován ve mravenčanovém pufru. Oba analyty vykazovaly

nejnižší pokles koncentrace v citrátovém pufru (pH 6,0). V případě 5-deoxystrigolu došlo k poklesu koncentrace přibližně o 33% za 96 hodin. Tento pokles je výrazně nižší ve srovnání s dalšími testovanými pufrů (pH 6,0 a pH 7,0). Pozorován byl i výrazný úbytek 5-deoxystrigolu v kontrole (Milli-Q voda), a to přibližně 86 % za 96 hodin. Ve srovnání s GR24 v kontrole byl pokles koncentrace okolo 20 %.



**Obr. 6** Stabilita GR24 v pufrech o pH 6,0 (A) a pH 7,0 (B).

#### 4.4.2 Nukleofilní reakce GR24

Při studiu mechanismu nukleofilního ataku byla sledována efektivita vybraných potenciálních nukleofilních látek na rychlost hydrolýzy GR24. Jednalo se zejména o aromatické látky s dusíkem nebo sírou ve své struktuře (benzylamin, methoxybenzylamin, thiofenol, benzyl merkaptan apod.). Monitorování reakce bylo provedeno spektrometricky při 240-244 nm (30 °C). O SL je všeobecně známo, že jsou nestabilní a snadno podléhají hydrolýze, při které dochází porušení stability enol-etherové vazby a oddělení hydroxybutenolidu od základního ABC skeletu. V případě nukleofilní reakce se nukleofil (Nu) váže na ABC skelet za tvorby ABC-Nu.

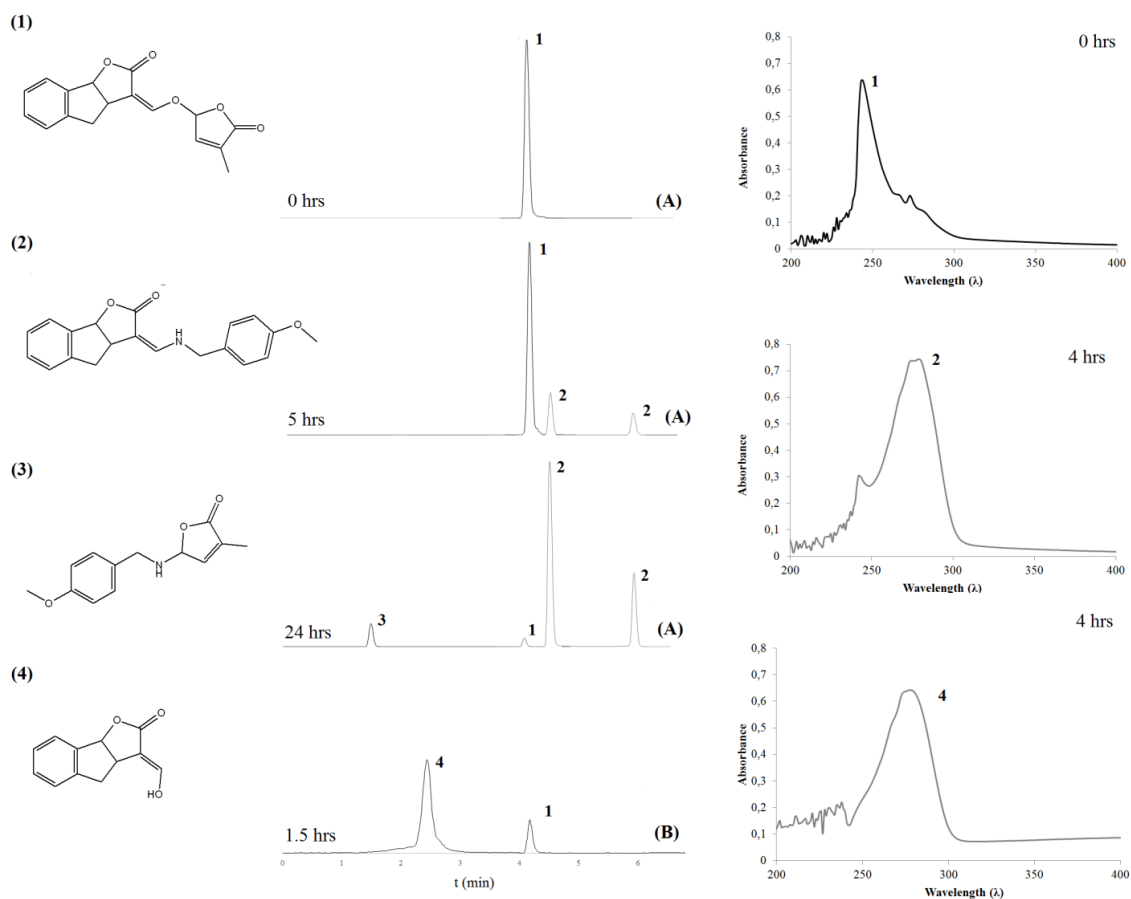
Na základě stanovených parametrů rychlostní konstanty a poločasu rozkladu bylo prokázáno, že nukleofilní reakce GR24 je reakcí druhého řádu. Rychlostní konstanty druhého řádu získané ze spektrofotometrických měření v podmínkách pseudo-prvního pořadí jsou uvedeny chronologicky. Nejrychlejší průběh reakce byl pozorován pro benzylamin a 4-methoxybenzylamin s poločasem rozpadu  $\text{GR24} \leq 3 \text{ h}$ , zatímco nejpomalejší reakce zahrnovala nukleofily obsahující atom síry (thiofenol, benzyl merkaptan; poločas rozpadu  $\geq 19$  hodin). Zjištěné parametry pro reakce benzylamin a 4-methoxybenzylamin byly použity pro výpočet termodynamických parametrů reakce (Tab. 3). Kinetická a termodynamická data, jakož i reakční produkty určené pomocí NMR a HRMS potvrzují, že reakce GR24 s nukleofily probíhá bimolekulárním mechanismem. V daném případě se uplatňuje mechanismus Michaelovy reakce, která je následovaná eliminací. Záporné hodnoty pro  $\Delta S$  indikují asociativní reakční mechanismus, kde SL a nukleofil tvoří jediný aktivovaný komplex přes adičně-eliminační mechanismus. Testování zahrnovalo vlastní syntézu potencionálních produktů reakce a jejich následnou charakterizaci pomocí  $^1\text{H}$ -NMR.

**Tab. 3** Reakční rychlosti a poločasy rozkladu spojené s reakcí mezi GR24 a vybranými nukleofily při 30 ° C.

| Nukleofil           | $k \times 10^{-5} \text{ (mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ | $t_{1/2} \text{ (h)}$ |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Methanol            | 0,50                                                                     | 38,51                 |
| Thiofenol           | 0,67                                                                     | 28,88                 |
| Anilin              | 0,67                                                                     | 28,88                 |
| Imidazol            | 0,83                                                                     | 23,10                 |
| Benzyl merkaptan    | 1,00                                                                     | 19,25                 |
| <i>p</i> -Anisidin  | 1,67                                                                     | 11,55                 |
| Benzylamin          | 9,33                                                                     | 2,06                  |
| 4-Methoxybenzylamin | 11,17                                                                    | 1,72                  |
| Hydroxid amonný     | 12,67                                                                    | 1,52                  |

Cílem tohoto experimentu bylo najít vhodnou metodu, která by byla schopná jednoznačně identifikovat vznikající produkty reakce GR24 s vybranými nukleofily. Pro monitorování byla zvolena optimalizovaná UHPLC-MS/MS metoda. V daném uspořádání byl experiment navržen tak, aby bylo dosaženo úspěšné separace všech složek reakční směsi. Mezi testované látky patřily: benzylamin, 4-methoxybenzylamin, *p*-anisidin, imidazol, thiofenol a benzyl merkaptan.

Průběh reakce je znázorněn a prezentován na reakci s 4-methoxybenzylaminem na Obr. 7. Z počátku byl pozorován pouze úbytek GR24 (1) a nárůst intenzity signálu nově vznikajícího komplexu ABC-Nu (2). Po vyčerpání reaktantu GR24, reagoval přebytek Nu s hydroxybutenolidem (hydroxy-D-kruh) za vzniku D-Nu (3). Je důležité zmínit, že byl pozorován další signál se shodným hmotnostním a kolizním spektrem jako ABC-Nu. Jednalo se o epimer ABC-Nu. Pro porovnání je uveden záznam spektrofotometrického měření, kde nelze jednoznačně rozlišit produkty reakce na základě UV profilu. Lze pouze identifikovat nejvíce zastoupenou látku. Dle získaných výsledků D-kruh nereagoval s anilinem, thiofenolem a benzylmerkaptanem ani po 24 h.



**Obr. 7** A) MS záznam reakční směsi (A) GR24 a 4-methoxybenzylaminu v čase 0, 5 a 24 h. B) UV profil GR24 (1) a vzniklého produktu (2). (1) GR24; (2) ABC-Nu; (3) D-Nu.

## 5 ZÁVĚR

- Jako modelový organismus pro studium strigolaktonů byly vybrány: bob setý (*V. faba*), hrách setý (*P. sativum*), vikev setá (*V. sativa*) a čírok dvoubarevný (*S. bicolor*).
- Byla testována úspěšnost různých doposud publikovaných protokolů pro izolaci a purifikaci SL z rostlinného pletiva, přičemž nejvyšší hodnoty návratnosti byly dosaženy za současného použití homogenizace a přečištění vzorku pomocí SPE.
- Optimalizovaná metoda UPLC-MS/MS byla úspěšně použita pro identifikaci SL u vybraných rostlinných modelů: bob setý (orobanchol, 5-deoxystrigol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát), hrách setý (orobanchol, 5-deoxystrigol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát), čírok dvoubarevný (5-deoxystrigol, sorgolakton), vikev setá (orobanchol, fabacyl acetát, orobanchyl acetát).
- DART-HR-MS (přímá analýza v reálném čase) je vhodným nástrojem pro rychlou identifikaci SL. Hlavní výhodou této metody je minimální příprava vzorku. Jen malá část segmentu rostliny (kořen, stonek) byla zavedena přímo do iontového zdroje a použita pro analýzu k získání důvěryhodných výsledků, které byly podpořeny UHPLC-MS/MS analýzou.
- DESI-MS přinesla důležitou informaci o prostorovém zastoupení SL ve vybraných rostlinných pletivech.
- Na základě testování stability SL v kultivačních médiích, pufrch a různých rozpouštědlech byla navržena následující pravidla pro experimentální práci s roztoky SL:
  - Zásobní roztoky SL by měly být připraveny v bezvodých rozpouštědlech, jako je například DMF a aceton a skladovány při -20 °C.
  - Kdykoliv je SL rozpuštěn ve vodném roztoku, musí být tento roztok použit do 24 hodin.
  - Některé pufrы jako Tris-HCl a HEPES, jsou nevhodné pro experimenty se SL.
- Reakce GR24 s nukleofilem probíhala prostřednictvím adičně-eliminačního mechanismu a za současného oddělení D-kruhu (hydroxymethylbutenolidu). Bylo potvrzeno, že se jedná biomolekulární reakci, pro kterou se uplatňuje Michaelova reakce (adice) následovaná eliminační reakcí.

## 6 LITERATURA

- Akiyama K., Ogasawara S., Ito S., Hayashi H. (2010). Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1104-1117.
- Al-Babili S., Bouwmeester HJ. (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu Rev Plant Biol.* **66**, 161-186.
- Antal B., Kuki Á., Nagy L., Nagy T., Zsuga M., Kéki S. (2016). Rapid detection of hazardous chemicals in textiles by direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS). *Anal Bioanal Chem.* **408**, 5189-5198.
- Awad AA., Sato D., Kusumoto D., Kamioka H., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2006). Characterization of strigolactones for the root parasitic plants *Striga* and *Orobancha*, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regul.* **248**, 221-227.
- Booker J., Sieberer T., Wright W., Williamson L., Willett B., Stirnberg P., Turnbull C., Srinivasan M., Goddard P., Leyser O. (2005). MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev Cell* **8**, 443-449.
- Bonser AM, Lynch J, Snapp S. (1996). Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* **132**, 281-288
- Bouwmeester HJ., Matusova R., Zhongkui S., Beale MH. (2003). Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 358-364.
- Boyer FD., de Saint Germain A., Pillot JP., Pouvreau JB., Chen VX., Ramos S., Stévenin A., Simier P., Delavault P., Beau J. M., Rameau C. (2012). Structure-activity relationship studies of strigolactone-related molecules for branching inhibition in garden pea: Molecule design for shoot branching. *Plant Physiol.* **159**, 1524-1544.
- Butler, LG., 1995. Chemical communication between the parasitic weed *Striga* and its crop host: a new dimension of allelochemistry. In: Inderjit, Dakshini, K.M.M. and Einhellig, F.A. eds. Allelopathy: organisms, processes and applications. American Chemical Society, Washington, 158-168. ACS Symposium Series no. 582.
- Boutet-Mercey S., Perreau F., Roux A., Clavé G., Pillot JP., Schmitz-Afonso I., Touboul D., Mouille G., Rameau C., Boyer F.D. (2018). Validated method for strigolactone quantification by ultra high-performance liquid chromatography - electrospray ionisation tandem mass spectrometry using novel deuterium labelled standards. *Phytochem Anal.* **29**, 59-68.
- Cardoso C., Ruyter-Spira C., Bouwmeester HJ. (2011). Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobancha* and *Phelipanche* spp. *Plant Sci* **180**, 414-420
- Cha S., Zhang H., Ilarsla, Hl., Wurtele ES., Brachova L., Nikolau BJ., Yeung ES. (2008). Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Plant J.* **55**, 348-360.
- Cody RB., Dane AJ., Dawson-Andoh B., Adedipe EO., Nkansah K. (2012). Rapid classification of White Oak (*Quercus alba*) and Northern Red Oak (*Quercus rubra*) by using pyrolysis direct analysis in real time (DART™) and time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrolysis.* **95**, 134-137.
- Cook CE., Whichard LP., Turner B., Wall ME., Egley GH. (1966). Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science (New York, N. Y.)* **154**, 1189-1190.
- Delaux PM., Xie XN., Timme RE., Puech-Pages V., Dunand C., Lecompte E., Delwiche CF., Yoneyama K., Becard G., Sejalón-Delmas N. (2012). Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytol.* **195**, 857-871.
- Dong Y., Lin B., Malitsky B., Rogachev I., Aharoni A., Kaftan F., Svatoš A., Franceschi P. (2016). Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: a review. *Front Plant Sci.* **60**, 1-16.
- Foo E., Davies NW. (2011). Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta.* **234**, 1073-1081.
- Giffen JE., Lesiak AD., Dane AJ., Cody RB., Musah RA. (2017). Rapid species-level identification of salvias by chemometric processing of ambient ionisation mass spectrometry-derived chemical profiles. *Phytochem Anal.* **28**, 16-26.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer PB., Puech-Pagès V., Dun E. A., Pillot JP., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais JC., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C. A., Rameau C., Rochange SF. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189-194.
- Halouzka R., Tarkowski P., Zwanenburg B., Zeljkovic SC. (2018). Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles. *Pest Manage Sci* **74**, 896-904.
- Harrison MJ. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* **59**, 19-42.
- Humphrey AJ, Galster AM, Beale MH. 2006. Strigolactones in chemical ecology: waste products or vital allelochemicals? *Nat Prod Rep.* **23**, 592-614.

- Iseki M., Shida K., Kuwabara K., Wakabayashi T., Mizutani M., Takikawa H., Sugimoto Y. (2018). Evidence for species-dependent biosynthetic pathways for converting carlactone to strigolactones in plants. *J Exp Bot.* **69**, 2305-2318.
- Jamil M., Chamikhova T., Cardoso C., Jamil T., Ueno K., Verstappen F., Asami T., Bouwmeester H. J. (2011). Quantification of the relationship between strigolactones and *Striga hermonthica* infection in rice under varying levels of nitrogen and phosphorus. *Weed Res.* **51**, 373–385.
- Jiang L., Liu X., Xiong G. *et al.* (2013). DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature.* **504**, 401–405.
- Kapulnik Y., Delaux PM., Resnick N., Mayzlish-Gati E., Wininger S., Bhattacharya C., Séjalon-Delmas N., Combier JP., Bécard G., Belausov E., Beeckman T., Dor E., Hershenhorn J., Koltai H. (2011). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta.* **233**, 209–216.
- Kisugi T., Xie X., Kim HI., Yoneyama K., Sado A., Akiyama K., Hayashi H., Uchida K., Yokota T., Nomura T., Yoneyama K. (2013). Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*. *Phytochemistry.* **87**, 60–64.
- Koltai H., Dor E., Hershenhorn J., Joel D. M., Weininger S., Lekalla S., Shealtiel H., Bahattacharya C., Eliahu E., Resnick N. (2010). Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation may be mediated by auxin-efflux carriers. *J Plant Growth Regul.* **29**, 129–136.
- Lesiak AD., Cody RB., Ubukata M., Musah RA. (2016) Direct analysis in real time high resolution mass spectrometry as a tool for rapid characterization of mind-altering plant materials and revelation of supplement adulteration—The case of Kanna. *Forensic Sci Int.* **260**, 66–73.
- Li B., Bjarnholt N., Hansen SH., Janfelt C. (2011). Characterization of barley leaf tissue using direct and indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **46**, 1241–1246.
- Lin H., Wang R., Qian Q., Yan M., Meng X., Fu Z., Yan C., Jiang B., Su Z., Li J., Wang Y. (2009). DWARF27, an Iron-Containing Protein Required for the Biosynthesis of Strigolactones, Regulates Rice Tiller Bud Outgrowth. *Plant Cell.* **21**, 1512–1525.
- López-Bucio J., Hernandez-Abreu E., Sanchez-Calderon L., Nieto-Jacobo M. F., Simpson J., Herrera-Estrella L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* **129**, 244–56.
- López-Ráez JA., Chamikhova T., Gómez-Roldán V., Matusova R., Kohlen W., De Vos R., Verstappen F., Puech-Pages V., Bécard G., Mulder P., Bouwmeester H. (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol.* **178**, 863-874.
- Mangnus E. M., Zwanenburg B. (1992). Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanch* seeds by strigol and its synthetic analogs. *J Agric Food Chem.* **40**, 1066–1070.
- Matušová R., Rani K., Verstappen FW. A., Franssen MCR., Beale MH., Bouwmeester HJ. (2005). The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway. *Plant Physiol.* **139**, 920–934.
- Pavan S., Schiavulli A., Marcotrigiano AR., Bardaro N., Bracuto V., Ricciardi F., Chamikhova T., Lotti C., Bouwmeester H., Ricciardi L. (2016). Characterization of low-strigolactone germplasm in pea (*Pisum sativum* L.) resistant to crenate broomrape (*Orobanch crenata* Forsk.). *Mol Plant-Microbe Interact.* **29**, 743–749.
- Proust H., Hoffmann B., Xie X., Yoneyama K., Schaefer D. G., Yoneyama K., Nogué F., Rameau C. (2011). Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Dev.* **138**, 1531-1539.
- Rial C., Varela RM., Molinillo JMG., López-Ráez JA., Macías FA. (2018). A new UPLC-MS/MS method for the direct determination of strigolactones in root exudates and extracts. *Phytochem Anal.* **30**, 110-116.
- Roycewicz P. a Malamy JE. (2012) Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**, 1489–1500.
- Sato D., Awad AA., Chae SH., Yokota T., Sugimoto Y., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2003). Analysis of strigolactones, germination stimulants for striga and orobanche, by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agri Food Chem.* **51**, 1162-1168.
- Sato D., Awad AA., Takeuchi Y., Yoneyama K. (2005). Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants *Striga* and *Orobanch*, produced by cotton. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**, 98–102
- Scaffidi A. Waters MT., Bond CS., Dixon KW., Smith SM., Ghisalberti EL., Flematti GR. (2012). Exploring the molecular mechanism of karrikins and strigolactones. *Bioorg Med Chem Lett.* **22**, 3743–3746.

- Rasmussen A., Heugebaert T., Matthys C., Van Deun R., Boyer FD, Goormachtig S., Stevens C., Geelen D. (2013). A fluorescent alternative to the synthetic strigolactone GR24. *Mol Plant*. **6**, 100-112.
- Rani K., Zwanenburg B., Sugimoto Y., Yoneyama K., Bouwmeester H J. (2008). Biosynthetic considerations could assist the structure elucidation of host plant produced rhizosphere signalling compounds (strigolactones) for arbuscular mycorrhizal fungi and parasitic plants. *Plant Physiol. Bioch.* **46**, 617–626.
- Rejšek J., Vrkoš V., Pokorný V., Příbyl V., Cvačka J. (2017). Ion source with laser triangulation for ambient mass spectrometry of nonplanar samples. *Anal Chem.* **89**, 11452–9.
- Ruyter-Spira C., Kohlen W., Chamikhova T., van Zeijl A., van Bezouwen L., de Ruijter N., Cardoso C., López-Ráez JA., Matusova R., Bours R., Verstappen F., Bouwmeester H. (2011). Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiol.* **155**, 721–734.
- Thunig J., Hansen S. H., Janfelt C. (2011). Analysis of secondary plant metabolites by indirect desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem.* **83**, 3256-3259.
- Trabelsi I., Yoneyama K., Abbas Z., Amri M., Xie X., Kisugi T., Kim I., Kharat M., Yoneyama K. (2017). Characterization of strigolactones produced by *Orobancha foetida* and *Orobancha crenata* resistant faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes and effects of phosphorous, nitrogen, and potassium deficiencies on strigolactone production. *S Afr J Bot.* **108**, 15–22.
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyoizuka J., Yamaguchi S. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature.* **455**, 195-200.
- Venter A., Nefliu M., Cooks RG. (2008). Ambient desorption ionization mass spectrometry. *Trends Anal Chem.* **27**, 284–290.
- Waters MT., Brewer PB., Bussell JD., Smith SM., Beveridge CA. (2012). The Arabidopsis Ortholog of Rice DWARF27 Acts Upstream of MAX1 in the Control of Plant Development by Strigolactones. *Plant Physiol.* **159**, 1073–1085.
- Weston DJ. (2010). Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst.* **135**, 661-668.
- Xie X., Yoneyama K., Harada Y., Fusegi N., Yamada Y., et al. (2009). Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry.* **70**, 211–15.
- Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K. (2010). The Strigolactone Story. *Annu Rev Phytopathol.* **48**, 93–117.
- Xie X., Yoneyama K., Kisugi T. et al. (2013). Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Molecular Plant* **6**, 153–163.
- Xie X. (2016). Structural diversity of strigolactones and their distribution in the plant kingdom. *J Pestic Sci.* **41**, 175–180.
- Yew J. (2019). Natural Product Discovery by Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Mass Spectrom.* **8**.
- Yokota T., Sakai H., Okuno K., Yoneyama K., Takeuchi Y. (1998). Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobancha minor*, from its host red clover. *Phytochemistry.* **49**, 1967-1973.
- Yoneyama K., Yoneyama K., Takeuchi Y., Sekimoto H. (2007). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta.* **225**, 1031-1038.
- Yoneyama K., Xie X., Sekimoto H., Takeuchi Y., Ogasawara S., et al. (2008). Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol.* **179**, 484–494.
- Yoneyama K., Xie X., Kisugi T., Nomura T., Yoneyama K. (2013). Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta.* **238**, 885–894.
- Yoneyama K., Xie X., Nomura T., Yoneyama K. (2016). Extraction and measurement of strigolactones in sorghum roots. *Bio-protocol.* **6**: e1763.
- Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T. (2018). Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? *J Exp Bot.* **69**, 2231–2239.
- Zwanenburg B., Pospíšil T. (2013). Structure and activity of strigolactones: new plant hormones with a rich future. *Mol Plant.* **6**, 38–62.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**AM** arbuskulární mykorhiza  
**AT** ambientní technika  
**DAD** detektor diodového pole  
**DART** přímá analýza v reálném čase  
**DESI** desorpční ionizace elektrosprejem  
**DMF** 2,2-dimethylformamid  
**EtOAc** ethyl acetát  
**GC** plynová chromatografie  
**GR24** syntetický analog strigolaktonů  
**HEPES** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina  
**HRMS** vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie  
**LC** kapalinová chromatografie  
**LC-MS/MS** kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií  
**MRM** selektivní monitorování více reakcí  
**MS** hmotnostní spektrometrie  
**MS médium** Murashige a Skoog médium  
**NMR** nukleární magnetická rezonance  
**Nu** nukleofil  
**Pi** fosfát  
**SPE** extrakce na pevné fázi  
**SL** strigolakton  
**UHPLC** ultraúčinná kapalinová chromatografie

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE

**Halouzka R.**, Tarkowski P., Zeljković S. (2016). Characterisation of Phenolics and other Quality Parameters of Different Types of Honey. *Czech J Food Sci.* **3**, 244-253.

**Halouzka R.**, Tarkowski P., Zwanenburg B., Zeljkovic SC. (2018). Stability of strigolactone analog GR24 toward nucleophiles. *Pest Manage Sci.* **74**,896-904.

**Halouzka R.**, Zeljkovic SC., Klejdus B., Tarkowski P. (2020). Analytical methods in strigolactone research. *Plant Methods.* **16**,76.

Zhang J., Mazur E., Balla J., Gallei M., Kalousek P., Medvedova Z., Li Y., Prát T., Vasileva M., Reinöhl V., Procházka S., **Halouzka R.**, Tarkowski P., Luschig C., Brewer PB., Friml J. (2020). Strigolactones inhibit auxin feedback on PIN-dependent auxin transport canalization. *Nat Commun.* **11**, 3508.