



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

**Centrum regionu Haná pro biotechnologický a
zemědělský výzkum**

**STUDIUM ROLE CYTOKININŮ V NEPŘÍMÉ ORGANOGENEZI VYBRANÝCH
HOSPODÁŘSKY VÝZNAMNÝCH DRUHŮ ROSTLIN**

Diplomová práce

Autor: **Jakub HRDLIČKA**

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr., DSc.**

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jakub Hrdlička
Název práce:	Studium role cytokininů v nepřímé organogenezi vybraných hospodářsky významných druhů rostlin
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce:	Mgr. Karel Doležal, Dr., DSc.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	Diplomová práce se zabývá stanovením hladin cytokininů a jejich metabolitů v rostlinných tkáňových kulturách hrachu setého (<i>Pisum sativum</i> L.), konopí setého (<i>Cannabis sativa</i> L.) a knotovky bílé (<i>Silene latifolia</i> Poir.). Stanovení cytokininů bylo provedeno pomocí UHPLC-ESI-MS/MS
Klíčová slova:	Cytokinin, rostlinné tkáňové kultury, hrách setý, konopí seté, knotovka bílá
Počet stran:	45
Počet příloh:	5
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jakub Hrdlička

Title of thesis: Research the role of cytokinin in indirect organogenesis selected agriculturally important plants

Type of thesis: Master

Department: Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research

Supervisor: Mgr. Karel Doležal, Dr., DSc.

The year of presentation: 2015

Abstract: This thesis deals with the determination of cytokinins and their metabolites in plant tissue cultures of pea (*Pisum sativum* L.), hemp (*Cannabis sativa* L.) and white campion (*Silene latifolia* Poir.). The determination was performed using cytokinin UHPLC-ESI-MS / MS

Key words: Cytokinin, plant tissue culture, *Pisum sativum* L., *Cannabis sativa* L., *Silene latifolia* Poir.

Number of pages: 45

Number of appendices: 5

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci, 1. 5. 2015

.....

podpis

Rád bych poděkoval Mgr. Karlu Doležalovi, Dr, DSc. za vedení této diplomové práce, spoustu rad a komentářů, které mi po celou dobu studia dal a zejména dostatek trpělivost, kterou se mnou měl. Poděkování za spolupráci a pomoc na této diplomové práci patří také Mgr. Lence Plačkové za laboratorní vedení a časté konzultace, RNDr. Miroslavu Grigovi, CSc, Ing. Ivě Smýkalové, Ph.D. a RNDr. Magdaleně Cvečkové z AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk za poskytnuté vzorky i pomoc v laboratoři při pěstování rostlinných tkáňových kultur hrachu setého a konopí setého, Ing. Vojtěchu Hudzieczkovi, Biofyzikální ústav, AVČR, v.v.i., Brno za poskytnuté vzorky knotovky bílé. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu při studiu a všem zaměstnancům laboratoře LRR za příjemné prostředí a pomocnou ruku v těžkých chvílích bádání.

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce.....	10
2 Cytokininy.....	11
2.1 Metabolismus	12
2.2.1 Modifikace adeninu.....	12
2.2.2 Modifikace postranního řetězce	13
2.2 Degradace.....	14
3 Rostlinné tkáňové kultury	16
4 Metody studia metabolismu cytokininů.....	18
4.1 Extrakce a čištění	18
4.1.1 Extrakce kapalina-kapalina (Liquid – liquid extraction, LLE)	18
4.1.2 Extrakce na pevné fázi (Solid phase extraction, SPE)	19
4.1.3 Imunoafinitní chromatografie (Imunoafinity chromatography, IAC)	19
4.2 GC/MS	20
4.3 LC/MS.....	20
4.4 Imunochemické metody	21
4.5 Biotesty	21
5 Experimentální část.....	23
5.1 Biologický materiál.....	23
5.1.1 Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.).....	23
5.1.2 Konopí seté (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	24
5.1.3 Knotovka bílá (<i>Silene latifolia</i> Poir. – ekotyp Tišnov)	24
5.2 Přístrojová technika a chemikálie	25
5.3 Příprava vzorků pro analýzu CK.....	25
5.4 Analýza CK metodou UPLC-ESI-MS/MS	27
6 Výsledky	28
6.1 Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.).....	28
6.2 Konopí seté (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	29
6.3 Knotovka bílá (<i>Silene latifolia</i> Poir. – ekotyp Tišnov)	31
7 Diskuze.....	32
7.1 Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.).....	32
7.2 Konopí seté (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	33
7.3 Knotovka bílá (<i>Silene latifolia</i> Poir. – ekotyp Tišnov)	33
8 Závěr	35

9	Použitá literatura	36
10	Příloha	45

Seznam zkratek

5'MP	5-monofosfát
9G	9-glukosid
AMP	adenosinmonofosfát
AP	alkalická fosfatasa
B	frakce obsahující volné báze, ribosidy a N-glukosidy
BAP	6-benzylaminopurin
BAP9THP	6-benzylamino-9-(tetrahydroxypranyl)purin
CK	cytokinin
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DHZ	dihydrozeatin
ELISA	enzymová imunoanalýza
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GC	plynová chromatografie
GMP	guanosinmonofosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	indol-3-octová kyselina
IAC	imunoafinitní chromatografie
iP	6-isopentenylaminopurin
IPT	isopentenyltransferasa
Kin	6-furfurylaminopurin
LC	kapalinová chromatografie

LLE	extrakce kapalina – kapalina
MeOH	methanol
MRM	multiplereaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MS médium	Murashige – Skoog médium
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mT	<i>meta</i> -topolin
NAA	naftalen-1-octová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NT	frakce obsahující nukleotidy
OG	frakce obsahující <i>O</i> -glukosidy
oT	<i>ortho</i> -topolin
pT	<i>para</i> -topolin
R	ribosid
RIA	radioimunoanalýza
SPE	extrakce na pevné fázi
TDP	thiamindifosfát
tZ	<i>trans</i> -zeatin
UDP	uridindifosfát
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie

1 Úvod a cíle práce

Cytokininy (CK) jsou významnou skupinou rostlinných hormonů, které ovládají fyziologické i vývojové procesy u rostlin. CK v přítomnosti auxinů stimulují buněčné dělení rostlinných buněk. Těto vlastnosti je využíváno v rostlinných tkáňových kulturách, kdy pomocí regulace poměrů CK a auxinů dochází k ovlivnění diferenciaci totipotentních buněk.

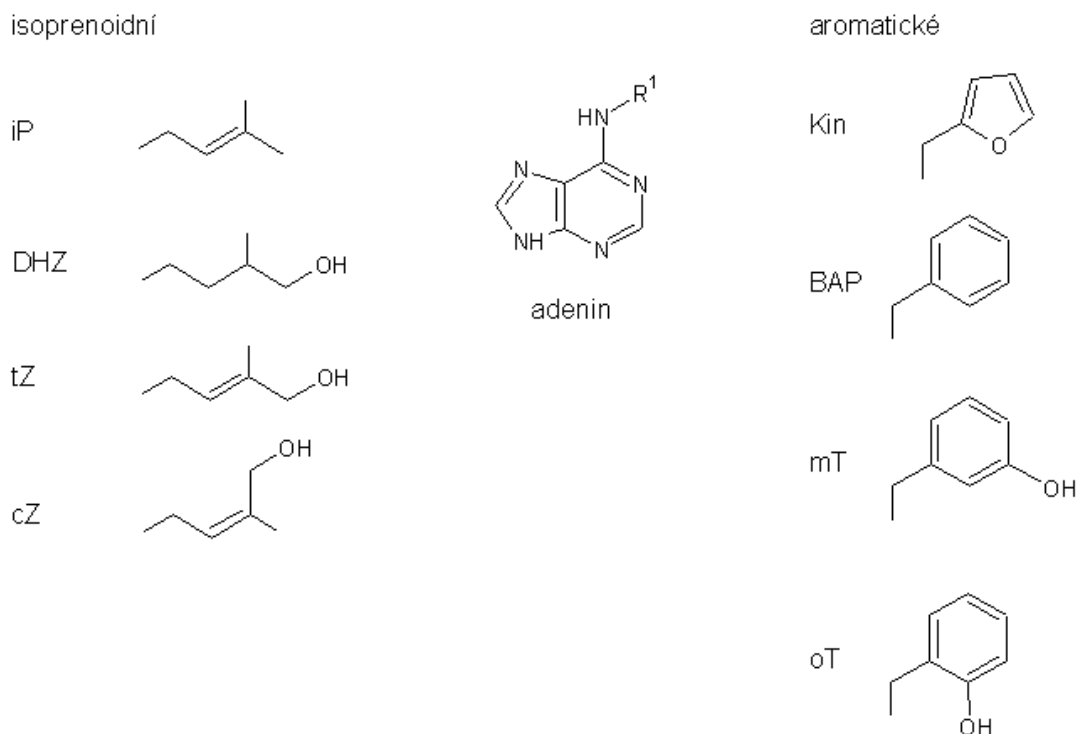
Cílem diplomové práce je studium hladin cytokininů a jejich metabolitů v rostlinných tkáňových kulturách hrachu setého (*Pisum sativum* L.), konopí setého (*Cannabis sativa* L.) a knotovky bílé (*Silene latifolia* Poir.). Byly studovány tři kultury hrachu setého odlišného stáří, dvě kultury konopí setého různých odrůd a dvě kultury knotovky bílé, kdy jedna regenerovala a druhá ne. Ke kvalifikaci a kvantifikaci CK bylo použito UHPLC-ESI-MS/MS.

2 Cytokininy

Cytokininy (CK) patří mezi jednu z nejdůležitějších skupin rostlinných hormonů, tzv. fytohormonů. Strukturně se jedná o N^6 deriváty adeninu, které dle navázaných substituentů dělíme na isoprenoidní a aromatické (Obr. 1) (Mok a Mok, 2001).

Účinek CK – stimulace dělení, diferenciaci a růst buněk za přítomnosti auxinů dal základ rostlinným tkáňovým kulturám, kdy Skoog a Miller (1957) aplikovali na buňky tabáku různé poměry hladin CK a auxinu a sledovali jejich účinky. Požadované koncentrace obou fytohormonů se liší v závislosti na druhu kultivovaných rostlin. Je však zřejmé, že CK stimulují tvorbu výhonků, zatímco auxiny stimulují vznik kořenů.

Později bylo prokázáno, že CK také v rostlinách regulují dormanci semen a klíčení, stárnutí, uvolnění pupenů z apikální dominance, *de novo* tvorbu pupenů a stimulaci růstu listů (Mok, 1994), kontrolují vývoj orgánů rostlin a zajišťují odpověď na vnější faktory (světelné podmínky, dostupnost živin a vody) a biotický i abiotický stres (Werner a Schmülling, 2009). Účinnost CK na fyziologické procesy je patrná již v nízkých koncentracích, 10^{-10} – 10^{-15} mol/g čerstvé hmoty (Tarkowski et al., 2004).



Obr. 1 Struktury základních isoprenoidních a aromatických CK

2.1 Metabolismus

Jednou z možností studia metabolismu CK je sledování exogenně aplikovaných radioaktivně značených cytokininů do rostlin (Taverner et al., 1999). Při aplikaci CK na rostlinná pletiva dochází k jejich distribuci mezi příslušné formy nukleotidů, nukleosidů a bází, které se dále přeměňují na degradační produkty nebo cukerné konjugáty (Letham, 1994). Metabolismus CK může probíhat substitucemi na samotném adeninu nebo pomocí enzymatických přeměn postranních řetězců. Dle pokročilých výzkumů byla potvrzena shoda mezi modifikacemi adeninu a metabolismem purinů (Mok a Mok, 2001). Specifický enzym pro modifikace adeninového kruhu CK dosud nebyl objeven. Porovnáme-li však množství CK (nM) a ostatních sloučenin adeninu (mM) v organismu, enzymy metabolismu purinů jsou dostačující i pro CK. Opačná situace však nastává u modifikací postranních řetězců, kde se enzymy pro CK zdají být specifické (Davies, 2010).

2.2.1 Modifikace adeninu

Defosforylace nukleotidů na nukleosidy je katalyzována pomocí 5'-ribonukleotid fosfohydrolasy (5'-nukleotidasa, EC 3.1.3.5). Dosud jsou známé dvě aktivní formy: F-I (110 kD) a F-II (57 kD). Obě tyto formy jsou schopné katalyzovat AMP, iPRMP, GMP a IMP. Vyžadují však přítomnost dvoumocného iontu, např. Mg^{2+} (Davies, 2010).

Deribosylace nukleosidů na volné báze je katalyzována pomocí adenosin nukleosidasy (EC 3.2.2.7). Tento krok je pro regulaci účinku CK velmi důležitý, protože volné báze jsou fyziologicky aktivním metabolitem CK (Davies, 2010).

Konverze volných bází na nukleosidy může být katalyzována pomocí purin nukleosid fosforylasy (EC 2.4.2.1). Reakce je reverzibilní, zvýhodněný je však vznik nukleosidů. Tento enzym je odlišný od inosin-guanosin fosforylasy, který se podílí na metabolismu purinů (Davies, 2010).

Tvorbu nukleotidů z odpovídajících nukleosidů může katalyzovat adenosin kinasa (EC 2.7.1.20) (Davies, 2010).

Další možností konverze volných bází na nukleosidy může být pomocí adenin fosforibosyltransferasy (EC 2.4.2.7). V *Arabidopsis* bylo nalezeno pět genů (APT1 – APT5), z nichž APT1 – APT3 byly již biochemicky popsány (Allen et al., 2002, Schnorr et al., 1996) (Davies, 2010).

Na pozicích 3, 7 a 9 purinového zbytku může proběhnout *N*-glykosylace. Glukosyltransferasa (EC 2.4.1.118) katalyzuje tvorbu 7- a 9-glukosidů pomocí UDP- nebo TDP-glukosy. Zvýhodněná je tvorba 7-glukosidů (Entsch et al., 1979). Kromě 3-glykosidů jsou *N*-glykosidy v biologických testech neaktivní (Mok a Mok, 2001). 3-glykosidy je možné pomocí β -glukosidasy zpětně hydrolyzovat na volné báze (Brzobohatý et al., 1993). Poslední výzkumy zjistily, že 9-glykosidy jsou výhodnými substráty pro některé isoformy CKX (Galuszka et al., 2007, Kowalska et al., 2010).

N-alanylace, tedy přeměna tZ, cZ, iP a DHZ na 9-alanyl deriváty je katalyzována β -(9-cytokinin)-alanin syntasou (EC 4.2.99.13). Fyziologický význam *N*-alanylace není doposud znám (Davies, 2010).

2.2.2 Modifikace postranního řetězce

Zeatin isomerasa, pravděpodobně 68 kD glykoprotein, katalyzuje konverzi cZ na tZ za přítomnosti flavinu (FAD nebo FMN), světla a dithiothreitolu. Fyziologický význam této izomerace není doposud znám, pravděpodobně však souvisí s metabolismem tRNA a tZ syntézou (Davies, 2010).

Nevratná konverze tZ na DHZ je katalyzována zeatin reduktasou (EC 1.3.1.69). Byly objeveny dvě aktivní formy: izozym HMW (55 kD) a izozym LMW (25 kD), které mají odlišné elektrické náboje. Obě formy však potřebují kofaktor NADPH a specificky katalyzují pouze tZ, nikoliv cZ, iP a deriváty nukleosidu (Davies, 2010).

Konverze CK typu iP na typ tZ je katalyzována hydroxylasou. Citlivost na metyrapon (inhibitor cytochromu P450) a závislost na přítomnosti NADPH předpokládá, že reakce bude katalyzována enzymem P450 (Davies, 2010).

Isoprenoidní postranní řetězce mohou být glykosylovány za vzniku O- β -D-glukopyranosyl derivátů tZ a/nebo cZ. Pro jednotlivé typy tZ i cZ cytokininů jsou zeatin O-glukosyltransferasy specifické (ZOG/cZOG) za využití UDP-glukosy. O-glykosylace patří mezi vratné modifikace, jelikož jsou zpětně hydrolyzovány β -glukosidasou (EC 3.2.1.21), což vysvětluje biologickou aktivitu O-glukosylovaných CK v biologických testech (Brzobohatý et al., 1993). O-glukosylovaný dihydrozeatin (DHZ) je lokalizován ve vakuolách (Fusseder a Ziegler, 1988). Je tedy zřejmé, že O-glykosylace vede ke vzniku neaktivních, ovšem stabilních forem CK vhodných pro skladování a následné využití. Tento děj hraje důležitou roli v regulaci hladin CK (Mok a Mok, 2001).

UDP-glukosa může být nahrazena UDP-xylosou za katalýzy *O*-xylosyltransferasy (EC 2.4.1.204). *O*-xylosylace probíhá u tZ a DHZ, avšak nikoli u tZR a cZ. Doposud byl *O*-xylozeatin objeven pouze u *Phaseolus* (fazol obecný) (Davies, 2010).

2.2 Degradace

Nevratná deaktivace CK je katalyzována enzymem cytokinin oxidasou/dehydrogenasou (CKX) (EC 1.5.99.12). Při degradaci CK dochází k odštěpení postranních řetězců za vzniku samotného adeninu (Davies, 2010). Průběh reakce nevyžaduje přítomnost kyslíku a peroxid vodíku není během katalytické reakce produkován, takže se CKX chová spíše jako dehydrogenasa než oxidasa (Galuszka et al., 2001).

CKX je zpravidla kódována malými rodinami genů. Počet genů v těchto rodinách je však u rostlin různý, a to v závislosti na druhu – například genom *A. thaliana* obsahuje 7 genů, *Brachypodium* 11 a kukuřice 13 (Mameaux et al., 2012). Jednotlivé CKX jsou v rostlinách exprimovány v různých pletivech a orgánech a i v jednotlivých etapách vývoje (Vyroubalová et al., 2009). Každá CKX má odlišnou preferenci substrátu a rychlost reakce (Galuszka et al., 2007, Kowalska et al., 2010).

U většiny rostlinných zdrojů bylo prokázáno, že CKX je glykoproteinem (Armstrong, 1994). CKX u kukuřice má osm glykosylačních míst. U ostatních zkoumaných rostlin byla nalezena CKX s 1-8 glykosylačními místy. Výskyt neglykosylovaných CKX a/nebo CKX s nízkým stupněm glykosylace byl objeven u tabáku a fazolu (Kamínek a Armstrong, 1990, Motyka a Kamínek, 1994, Zhang et al., 1995, Motyka et al., 1996, Motyka et al., 2003). U glykosylovaných a neglykosylovaných forem CKX byly nalezeny velké rozdíly v optimech pH. Přítomnost glykosylovaných a neglykosylovaných izoform CKX v kalusech tabáku byla léčena přidáním CK. Zvýšení aktivity CKX dokazuje spojení s glykosylovanou formou enzymu (Motyka et al. 2003). Glykosylace proteinů přispívá k regulaci enzymatické aktivity, translokaci a/nebo proteionové stabilitě, čímž se stává významnou a důležitou složkou regulace CKX (Schmülling et al., 2003).

Původně bylo předpokládáno, že CKX vyžaduje ke své činnosti molekulární kyslík a v aktivním centru obsahuje měď. Proto byl enzym také klasifikován, jako měď amin oxidasa (EC 1.4.3.6.) (Whitty a Hall, 1974, Hare a Van Staden, 1994). Následně bylo objeveno flavinové vazebné místo (Morris et al., 1999, Bilyeu et al., 2001) a atomová absorpční analýza dále vyvrátila přítomnost mědi (Bilyeu et al., 2001). Zarovnání sekvencí

pomocí Clustal W ukázalo, že vazebná doména FAD je dobře konzervována v N-koncové polovině všech známých CKX sekvencí (Thompson et al., 1994). Hypotéza byla také potvrzena zjištěním, že CKX může používat širokou škálu umělých elektronových donorů za anaerobních podmínek (Galuszka et al., 2001, Frébort et al., 2002). Předpokládá se, že elektrony jsou transportovány přes flavin kofaktor do druhého redoxního centra enzymu, který je zprostředkovává ubichinonu sloužícího jako akceptor elektronů (Schmülling et al., 2003).

Exprese AtCKX1 byla objevena v cévním válci postranních kořenů, AtCKX2 na vrcholcích prýtlů a AtCKX3 v mladých pletivech. Exprese AtCKX4 má vliv na vývoj trichomů, průduchů, palistů a kořenových čepiček. AtCKX5 byla exprimována v tyčinkách při vývoji pylu, zatímco AtCKX6 v gyneceu (Frébort et al., 2011). Drobné variace aminokyselinových zbytků CKX významně přispívají k výběru substrátu. AtCKX2 a AtCKX4 obsahující glutamát jsou nejvíce aktivní enzymy a v neutrálním nebo slabě zásaditém prostředí dávají přednost volným bazím CK, AtCKX1 (alanin místo glutamátu) preferuje naopak nukleotidy CK a AtCKX7 (serin místo glutamátu) *N*⁹-glukosidy (Galuszka et al., 2007). Substrátová specifita také úzce souvisí se subcelulární lokalizací těchto enzymů. Vakuolární AtCKX1 preferuje nukleotidy, cytoplazmatické AtCKX7 *N*⁹-glukosidy (Kowalska et al., 2010).

3 Rostlinné tkáňové kultury

Rostlinné tkáňové kultury jsou metodou umožňující kultivovat (a množit) rostlinné buňky, pletiva nebo orgány izolované z mateřské rostliny na umělém médiu. Použití této techniky dovoluje dopěstovat i úplné rostliny s genetickou informací identickou s výchozím explantátem. Rostlinné tkáňové kultury vychází z totipotence rostlinných buněk, která umožňuje vývoj různým směrem vedoucím i ke vzniku celé rostliny (Motte, 2013). Vývoj této metody je dále úzce spojen s objevem fytohormonů a jejich popisem, kdy Skoog a Miller (1957) zjistili, že tvorba prýtů by mohla být indukována použitím nízké hladiny auxinů a vysokou koncentrací CK v růstovém médiu. Následovaly další objevy řízení aspektů buněčné diferenciaci a organogeneze v tkáňových a orgánových kulturách interakcemi mezi CK a auxiny (George et al., 2008).

Mezi rostlinné tkáňové kultury, kdy nedochází ke změně genotypu, patří meristémové, embryonální a kořenové kultury. Meristémové kultury jsou vhodné pro pěstování rostlin, které byly zasaženy virovou infekcí. Explantáty jsou odebírány z vrcholového nebo postranního meristému. Embryonální kultury se často používají například pro iniciaci tvorby kalusů. Embrya jsou izolována ze semen a klíčí *in vitro*. Tato metoda se uplatňuje pro rychlou tvorbu sazenic ze semen s velkou periodou dormance. Kořenové kultury jsou připravovány z explantátů obsahujících malé segmenty kořenů s primárním nebo bočním meristémem, které dále pokračují v růstu kořenového systému složeného z primárních a postranních kořenů (George et al., 2008).

Naopak genetickou variabilitu zajišťují kalusové, suspenzní, protoplastové, prašnickové a mikrosporové kultury. Kalus je koherentní a amorfní pletivo, které vzniká neuspořádaným způsobem dělení rostlinné buňky. Tvorba kalusu může být indukována přítomností hmyzu, mikroorganismů, stresem nebo *in vitro* použitím fytohormonů. Užitím růstových regulátorů je pletivo postupně diferenciováno a dochází k jeho aktivnímu dělení. Kalusové kultury slouží k regeneraci kořenů a prýtů, ale i jako výchozí materiál pro suspenzní kultury. Rozptýlením drobných kalusů v tekutém médiu vznikají suspenzní kultury, které dále dělíme na dávkové kultury (pevný objem média) a kontinuální kultury (kontinuální doplňování živného média). Růst buněk v suspenzních kulturách je oproti kalusovým kulturám rychlejší a snadněji regulován. Základem pylových a mikrosporových kultur je možnost indukce tvorby haploidních vegetativních buněk z buněk gametofytických. Tvorba rostlin z mikrospor je nazývána androgenese, zatímco při použití neoplozených vajíček se jedná o gynogenesi. Protoplasty jsou rostlinné buňky zbavené

buněčné stěny a mohou být izolovány z rostlinných orgánů stejně jako z tkáňových kultur. Pomocí vhodného živného média může být opětovně obnovena tvorba buněčné stěny a dělení buněk. Protoplastové kultury se používají pro výzkum virových onemocnění rostlin, v genovém inženýrství a při tvorbě hybridních rostlin (George et al., 2008).

Vznik rostlinných tkáňových kultur umožnil průmyslovou výrobu rostlinných produktů, rozvoj některých aplikací v zemědělství a v zahradnictví, zachování genofondu a genetické inženýrství rostlin (Dagla, 2012).

4 Metody studia metabolismu cytokininů

Koncentrace cytokininů v rostlinách se pohybuje v řádech $\text{fmol} - \text{pmol} \cdot \text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Hlavním problémem analýzy těchto látek je odlišit vybrané analyty od nečistot, které se v rostlinném materiálu vyskytují. Vhodná analytická metoda pro studium metabolismu CK by tedy měla spojovat efektivní čistící postup a dostatečnou analytickou koncovku pro identifikaci. S vývojem citlivějších technik (HPLC/MS, GC/MS) se rozšiřují možnosti studia CK a zároveň se snižuje množství potřebného vstupního materiálu pro danou analýzu (Tarkowski et al., 2004).

4.1 Extrakce a čištění

Extrakce je proces, při kterém se převádí látky z matrice do extrakčního činidla (rozpouštědla). Rozpouštědla jsou vybírána dle povahy analytu. Je nutné dát pozor, aby při tomto procesu nedocházelo k degradaci látek v závislosti na teplotě, enzymatických reakcích, apod. Pro extrakci CK je nejčastěji používán vícesložkový Bielskiho pufr, který minimalizuje účinnost degradačních enzymů, zejména fosfatasy (Bielski, 1964). Po extrakci se pomocí centrifugace oddělí pelet od extraktu analytu. Ten je dále čištěn od balastních látek, které se vyextrahovaly společně s analytem. K tomuto čištění se nejčastěji využívá extrakce na pevné fázi (SPE) a imunoafinitní chromatografie (IAC) (Tarkowski et al., 2004).

4.1.1 Extrakce kapalina-kapalina (Liquid – liquid extraction, LLE)

Extrakce kapalina – kapalina je založena na ustálení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami (analyt v roztoku a rozpouštědlo pro převedení analytu). Rozpouštědlo je voleno tak, aby v něm byl analyt rozpustnější, než je roztok, ve kterém se aktuálně nachází. Vyšší účinnosti systému se docílí pomocí opakované extrakce s menšími objemy rozpouštědla oproti extrakci celým objemem najednou. Extrakce lze urychlit zvětšením plochy pomocí protřepávání (Štulík et al., 2004).

Extrakce 1-butanolem poskytuje vynikající metodu pro základní cytokininy a jejich nukleotidy. Je nutné upravit pH extraktu, aby CK zůstaly v méně polární neprotonované formě. Nepochárné CK, jako je iP nebo kinetin mohou být extrahovány do ethylacetátu. Toto rozpouštědlo však není vhodné pro extrakci zeatinu (Horgan a Scott, 1987).

4.1.2 Extrakce na pevné fázi (Solid phase extraction, SPE)

Extrakce na pevné fázi slouží k rychlé a selektivní přípravě vzorků. Metoda je založena na mezimolekulových interakcích, které způsobují zachycení vybraných molekul na tuhém sorbentu. Extrakt je nanesen na SPE kolonu, kde se analyty zachytí a balastní látky jsou odmyty. Analyt je ze sorbentu uvolněn elučním činidlem. Sorbent může být i naopak vybrán k zadržení balastních látek a volnému průtoku analytu. SPE je proti LLE efektivnější a úspornější na spotřebu organických rozpouštědel (Štulík et al., 2004).

Cytokininy jsou amfoterní látky s pK_{a1} kolem 4 (vliv atomu dusíku na C6) a pK_{a2} kolem 10 (vliv atomu dusíku v imidazolovém kruhu), které umožňuje protonizaci ($pH < 3$) nebo deprotonizaci ($pH > 11$). CK mohou být snadno ionizovány kromě jejich nukleotidů, které obsahují fosfátové skupiny s pK_{a1} kolem 1 a pK_{a2} kolem 6. Tohoto jevu je využito při dělení a čištění CK pomocí kombinovaných SPE (reverzní fáze, iontová výměna) (Fu et al., 2011). Efektivní SPE metoda byla vyvinuta pro prekoncentraci a purifikaci CK z kokosové vody pomocí C18 a MAX kolon (Ge et al., 2004). C18 je velmi účinným sorbentem pro odstranění lipidů a rostlinných barviv. Dalším purifikačním krokem je možnost použití iontoměničů SPE (MAX – anex, MCX – katex) s dobrou návratností (Hoyerová et al., 2006).

Pro purifikaci CK byly vyvinuty protokoly založené na různých kombinacích reverzní fáze a iontové výměny – DEAE Sephadex/RP-C18 (Novák et al., 2003, Hoyerová et al., 2006), RP-C18 (Novák et al., 2008), SCX (Novák et al., 2003), MCX (Dobrev a Kamínek, 2002).

4.1.3 Imunoafinitní chromatografie (Imunoaffinity chromatography, IAC)

Imunoafinitní chromatografie je metoda založená na selektivitě monoklonální protilátky tvořící komplex antigen – protilátka. Protilátky mohou být aplikovány přímo ke vzorku pomocí tzv. vsádkové metody (Hauserová et al., 2005) nebo navázány na pevný nosič, který může být vložen do prázdné kolony (cartridge) a následně uchovávány v PBS pufru s NaN_3 . Extrakt je nanesen na nosič s protilátkou, kde se požadovaný antigen na základě vazby antigen – protilátka zachytí a balastní látky jsou vymyty. Antigen je následně eluován elučním činidlem, které je schopné přerušit specifickou vazbu komplexu (Hennion a Pichon, 2003). Tato metoda se běžně používá pro úpravu vzorků před použitím analytických metod, jako je LC, GC a CE (Moser a Hage, 2010, Hage, 1998).

4.2 GC/MS

Plynová chromatografie (GC) v on-line spojení s hmotností spektrometrií (MS) je běžně užívanou metodou pro analýzu fytohormonů v rostlinných pletivech (Morris et al., 1977). Tato metoda poskytuje vysoké rozlišení s nízkým limitem detekce, vyžaduje však velké množství materiálu (až desítky gramů) (Balcke et al., 2012). Přirozeně se vyskytující CK nejsou těkavé sloučeniny, a proto je nutné před jejich analýzou provést derivatizaci (Novák et al., 2003). Při derivatizaci může docházet k problémům, jako je hydrolýza derivátů, tvorba vedlejších produktů či nestabilita některých derivátů (Tarkowski et al., 2009). Tyto problémy byly popsány při derivatizaci CK za použití trimethylsilylu (Horgan a Scott, 1987, Most et al., 1968), permethylu (MacLeod et al., 1976), *t*-butyldimethylsilylu (Hocart et al., 1986), trifluoracethylu (Ludewig et al., 1982) nebo acetylu (Björkman a Tillberg, 1996). Ideální metodou se jeví silylace s *N*-methyl-*n*(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (Birkemeyer et al., 2003). Hlavní výhodou použití GC-MS pro analýzu CK v porovnání s měkkými ionizačními technikami je diferenciací cukerných zbytků (Tarkowski et al., 2009).

4.3 LC/MS

Jednou z nejběžněji používaných technik v oblasti analýzy fytohormonů je kapalinová chromatografie (LC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Doposud bylo použito mnoho různých ionizačních technik, jako je elektrosprej (ESI), termosprej (TSI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo ionizace rychlými atomy (FAB) (Novák et al., 2003). V současné době je pro kvantitativní analýzu pomocí MS nejčastěji používanou ionizací ESI, která poskytuje dostatečnou účinnost ionizace nejen pro CK, ale pro většinu dalších fytohormonů (Novák et al., 2008, Svačinová et al., 2012, Farrow a Emery, 2012, Dewitte et al., 1999).

První použití LC-MS pro analýzu CK zahrnující separaci nederivatizovaných CK publikoval Imbault et al. (1993). Následnou derivatizací byla citlivost zvýšena na fmol limit detekce (Ästot et al, 1998, Nordström et al., 2004). Nové výzkumy v technologii separace vedly k zavedení vysokoúčinné LC (HPLC) a následně až k ultraúčinné LC (UHPLC), která poskytuje lepší výkon, větší rozlišení a vyšší citlivost (Novák et al., 2008).

HPLC poskytuje rychlou a vysoce účinnou separaci CK před MS detektorem. HPLC analýza může poskytnout spolehlivou identifikaci CK, ke kvantifikaci se používá izotopicky značených standardů pro MS detekci s ionizací elektrosprejem (LC-ESI-MS)

(Novák et al., 2003). Volné báze CK a jejich cukerné konjugáty jsou relativně hydrofóbní sloučeniny, které se chovají jako slabé báze. K jejich separaci se využívá reverzní fáze (RP-HPLC). Pro separaci a analýzu CK se používají RP-C18 nebo RP-C8 kolony (Novák et al., 2003, Ge et al., 2005). Prinsen et al. (1997) popsal spojení LC-ESI-MS/MS s MRM (multiple reaction monitoring) pro stanovení CK, jako rychlou metodu s limitem detekce 1 pmol. Zavedení kapilární kolony a zlepšení elučního gradientu vedlo ke změně limitu detekce na hladinu fmol (Prinsen et al., 1998).

UHPLC umožňuje průtok kapaliny až do 1000 MPa. Tato metoda je tedy schopna dosáhnout rychlejší separace s následným vyšším rozlišením a vyšší citlivostí (Von Schwanzenberg et al., 2007, Novák et al., 2008). UHPLC-MS/MS je postupně zaváděno pro kvalitativní i kvantitativní stanovení jak CK tak i dalších skupin fytohormonů (Naito et al., 2007, Arite et al., 2007, Zentella et al., 2007, Hirano et al., 2007, Novák et al., 2008).

4.4 Imunochemické metody

Ke stopové analýze fytohormonů je možné použít také imunologické metody, které mají nízký limit detekce (Morris et al., 1993, Wang et al., 1995, Yong et al., 2000). Následně byly vyvinuty metody přímo pro detekci CK (Casanova et al., 2004).

Radioimunoanalýza (RIA) je velmi citlivou metodou, která je schopná detekovat koncentrace v řádech nmol až pmol. Své uplatnění našla také při studiu biochemických procesů. Kvůli silným křížovým reakcím protilátek pro RIA je nutné nejprve z rostlinných extraktů odstranit interferující látky s RIA protilátkami (Cook et al., 2001). V porovnání s RIA je ELISA levnější a jednodušší provedení, navíc nevzniká radioaktivní odpad. ELISA je schopná také detekovat fmol hladiny. Pro detekci endogenních hladin CK byly vyvinuty haptén-homologní a haptén-heterologní ELISA testy bez potřeby intenzivní purifikace. Pro imunodetekci a identifikaci CK je možné také spojení HPLC-ELISA (Strnad et al., 1992). ELISA jsou stále velice používanou metodou (Tarkowski et al., 2009).

4.5 Biotesty

Biotesty slouží k detekci látek nebo ověření biologické aktivity. Používají se k tomu jednoduché i dvouděložné rostliny. Výsledek testu závisí na specifitě a selektivitě sledovaných biologických reakcí na testovaný objekt (Nissen, 1985). Doba analýzy je

dlouhá, v rádech hodin, několika dnů až týdnů. Problémy s příjmem exogenních látek a jejich metabolismem mohou vést k nižší citlivosti. Kvůli dosažení přesnosti je nutné četné opakování přinášející velké množství rostlinného materiálu i testovaných vzorků. Problém mohou také tvořit nečistoty, včetně inhibitorů či jiných aktivních molekul. Výhodou naopak je jedinečná selektivnost pro některé fytohormony. Biotesty jsou také často nutné pro určení významu fytohormonu ve vybraném rostlinném druhu (Davis et al., 1985). Dle klasifikace jsou biotesty děleny na čtyři typy: buněčné prodloužení (cytokininy indukované prodlužování koleoptil, cytokininy indukovaná expanze), dělení buněk (cytokininy indukovaná tvorba kalusu), funkce buněk (cytokininy indukovaná tvorba pigmentu, cytokininy zpomalující senescenci listů, cytokininy stimulovaná transpirace) a diferenciaci buněk (cytokininy indukovaná morfogeneze) (Gyulai a Heszky, 1994). V dnešní době se již užívají převážně jen k ověření biologické aktivity.

5 Experimentální část

5.1 Biologický materiál

5.1.1 Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

V roce 1983 byly založeny kultury hrachu setého z prýtů apikálního meristému, axilárních meristémů děložních lístků a primární stupnice klíčících semenáčků (Griga et al., 1986). Tyto kultury byly neustále udržovány na MS médiu s B5 vitamíny (Gamborg et al., 1968), 20 μM BAP a 0,1 μM NAA (fotoperioda: 16/8, teplota: 20 ± 2 °C). Minimálně čtyřicet 100ml Erlenmeyerových baněk s kulturami bylo každé 4 týdny přepasážíováno na čerstvá média (Griga et al., 1984, Griga et al., 1986, Griga a Novák, 1990). Dodnes tedy tato kontinuální kultura podstoupila minimálně 370 subkulturních cyklů (Bohatýr 83).

V roce 2004 byla založena nová kultura (Bohatýr 04), která sloužila ke studiu genetické stability (Smýkal et al., 2007).

Pro srovnání analýzy cytokininů byla založena čerstvá kultura (Bohatýr NS, nodální segmenty). K analýze bylo odebráno čtyřicet jednotlivých výhonků ze tří nezávislých kulturních systémů.

Biologický materiál (*Pisum sativum* L.) byl pěstován pod vedením Ing. I. Smýkalové, Ph.D. a RNDr. M. Cvečkové, AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk.



Obr. 2 Kultury hrachu setého: zleva Bohatýr 83, Bohatýr 04 a Bohatýr NS (Foto: RNDr. M. Griga, CSc.)

5.1.2 Konopí seté (*Cannabis sativa* L.)

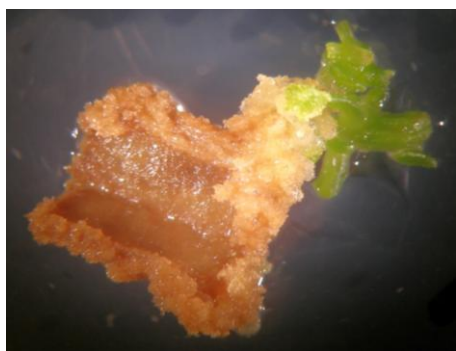
Explantáty konopí setého byly pěstovány na MS médiu s B5 vitamíny a přísávkem 20 μM BAP nebo jeho derivátu 20 μM BAP9THP (fotoperioda: první tři dny 0/24, poté 16/8). Kalusy byly pasážovány na čerstvé médium každé 4 týdny.

Biologický materiál (*Cannabis sativa* L.) byl pěstován pod vedením Ing. I. Smýkalové, Ph.D. a RNDr. M. Cvečkové, AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk.

5.1.3 Knotovka bílá (*Silene latifolia* Poir. – ekotyp Tišnov)

Kultury knotovky bílé byly pěstovány na MS médiu s přísávkem vitamínů (Duchefa), 2 mg/l mT a 0,5 mg/l NAA. (fotoperioda: 16/8). Listové disky o průměru 1 cm byly pasážovány na čerstvá média po 14 dnech. Vzorky pro analýzu byly odebrány po 5 týdnech.

Biologický materiál (*Silene latifolia* Poir.) byl pěstován Ing. V. Hudzieczkem, Biofyzikální ústav, AVČR, v.v.i., Brno.



Obr. 3 Kultury *S. latifolia* Poir., regenerující explantát (Foto: Ing. V. Hudzieczek)



Obr. 4 Kultury *S. latifolia* Poir., neregenerující explantát (Foto: Ing. V. Hudzieczek)

5.2 Přístrojová technika a chemikálie

K homogenizaci, extrakci a purifikaci rostlinného materiálu pro analýzu CK byl použit Kulový mlýnek MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany), Mechanický rotátor Stuart, Centrifuga Avanti™ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), Spe-ed SPE Cartridge C18/18%, 100 mg/ 1 ml (Applied Separation), Preimunní (PI) a imunoafinitní (IA) kolony s agarózovým gelem Affi-Gel 10 (Bio-Rad Labs, Hercules, USA) s monoklonálními protilátkami anticytokininu NZRD nebo 1G6 (Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého, Olomouc), Vakuová rotační odparka Rotavapor® R-200 (Buchi Labortechnik AG, Postfach, Switzerland), Biological thermostat BT120, MicroTubes Brand a Micro Insert 0,1 ml, 28x6 mm, with Spring Bottom, Supelco, USA.

Jako interní standardy byly použity: volné báze (B): [¹³C₅]cZ, [¹³C₅]tZ, [²H₅]tZR, [²H₅]tZ9G, [²H₃]DHZ, [²H₃]DHZR, [²H₃]DHZ9G, [²H₆]iP, [²H₆]iPR, [²H₆]iP9G, [²H₇]BAP, [²H₇]BAPR, [²H₇]BAP9G, [¹⁵N₄]mT, [¹³C₅]oT, [¹⁵N₄]K; *O*-glukosidy (OG): [²H₅]tZOG, [²H₅]tZROG, [²H₇]DHZOG; nukleotidy (NT): [²H₅]tZRMP, [²H₃]DHZRMP, [²H₆]iPRMP, [²H₇]BAPRMP (Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého, Olomouc)

Použité chemikálie: Deionizovaná (Milli-Q) H₂O, Bielsky pufr – modifikovaný (60 % MeOH + 30 % H₂O + 10 % HCOOH), Methanol (Gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv, Merck), Ethylalkohol pro UV Spektroskopii (99,8%, Lachner, Česká Republika), Kyselina mravenčí (Merck, Darmstadt, Germany), Hydroxid amonný (Merck, Darmstadt, Germany), Chlorid sodný, (Lachner, Česká Republika), Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachner, Česká Republika), Hydrogenuhlíčan sodný (Lachner, Česká Republika), Octan amonný (Sigma-Aldrich, USA), β-glukosidasa (2,31 U/mg, Sigma-Aldrich, USA), Alkalická fosfatasa (±3,5 U/mg, EIA Grade, Invitrogen, USA), PBS (50 mM NaH₂PO₄ · 2 H₂O (7,8 g/l) + 15 mM NaCl (0,877 g/l); pH 7,2), 50 mM NaHCO₃ (420 mg/100 ml; pH 9,6) a 100 mM NH₄COOCH₃ (770 mg/100 ml, pH 5)

5.3 Příprava vzorků pro analýzu CK

Zlyofilizované vzorky kalusů byly zhomogenizovány a přesně rozváženy do 2 ml mikrozkušavek po 30 ± 5 mg.

Extrakce vzorků byla provedena do 1 ml modifikovaného Bieleskiho pufru společně s přidávanými interními standardy cytokininů (10 μl 10^{-7} M B, 20 μl 10^{-7} M OG, 20 μl 10^{-7} M NT) pro kvantitativní stanovení. Následovala homogenizace na kulovém mlýnku (27 Hz; 3 min; 4 °C) a ultrazvuku (5 min; 4 °C). Extrakce vzorků byla provedena na rotátoru Stuart při 4 °C po dobu 30 minut. Pomocí centrifugace (15000 rpm; 10 min; 4 °C) byly odděleny supernatanty a poté byly sedimenty reextrahovány 1 ml modifikovaným Bieleski pufrům.

Purifikace byla provedena pomocí SPE kolon. První z nich bylo použití C18 (100 mg/1 ml). Po kondicionaci a equilibraci C18 kolon byly nanášeny spojené supernatanty extrakce a reextrakce a ihned eluovány 1 ml extrakčního činidla. Takto získané eluáty (3 ml) byly odpařeny na vodnou fázi na vakuové odparce. Druhým purifikačním krokem bylo použití MCX (30 mg/1 ml). Vodné fáze byly naředěny 3 ml 1M HCOOH a po kondicionaci a equilibraci MCX kolon byly nanášeny. Po promytí byla provedena eluce nukleotidů (NT) 2 ml eluční směsi I (0,35M NH_4OH v H_2O), následně eluce volných bazí (B) a *O*-glukosidů (OG) 2 ml eluční směsi II (0,35M NH_4OH v 60% MeOH). Takto získané eluáty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce.

Purifikace byla zakončena imunoafinitní chromatografií (IAC), která spočívá na principu interakce protilátka – antigen za vzniku imunokomplexu (Ab-Ag) (Chase, 1983). Vzorky byly přečištěny na preimunních (PI) a imunoafinitních (IA) kolonkách, na kterých došlo k oddělení OG frakce (eluce PBS pufrům) od B frakce (eluce MeOH). Oba eluáty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce (Novák et al., 2003).

Po purifikaci byly OG a NT frakce pomocí enzymů β -glukosidasy a alkalické fosfatasy (AP) převedeny na volné báze. Po rozpuštění OG odparků v 200 μl 100 mM $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$ a 50 μl β -glukosidasy došlo k jejich inkubaci v biologickém termostatu (1 hod; 37 °C; tma) a následnému přečištění na IA kolonkách. Eluce byla provedena 3 ml MeOH (-20 °C). NT odparky byly rozpuštěny v 20 μl 70% EtOH, 180 μl NaHCO_3 a 50 μl AP a opět inkubovány (2 hod; 37 °C; tma). Následovalo přečištění pomocí PI a IA kolonek a eluce 3 ml MeOH (-20 °C). Eluáty byly odpařeny do sucha na vakuové odparce (Novák et al., 2003).

5.4 Analýza CK metodou UPLC-ESI-MS/MS

Separace a kvantifikace CK metabolitů byla provedena pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (Acquity UPLCTM, Waters) ve spojení s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (XevoTM TQ MSTM, Waters) vybaveným elektrosprejem (ESI).

Eluáty po IAC byly rozpuštěny ve 20 μ l 10% MeOH v mobilní fázi (15 mM HCOONH₄; pH 4,0) a poté převedeny do 2 ml vialek s 0,1 ml mikroinsertem. Takto připravené vzorky byly nastříknuty na kolonu s reverzní fází (Acquity UPLC, BEH C18, 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm, Waters). Vzorky byly eluovány v rámci 5-ti minutového lineárního gradientu složeného z MeOH (A) a 15mM HCOONH₄ (B), který byl upraven na pH 4,0 při průtoku 0,5 ml/min, poměru od 10:90 do 100:0 a teplotě kolony 40 °C. Equilibrace kolony na původní podmínky se provádí pomocí 10% A po dobu dvou minut.

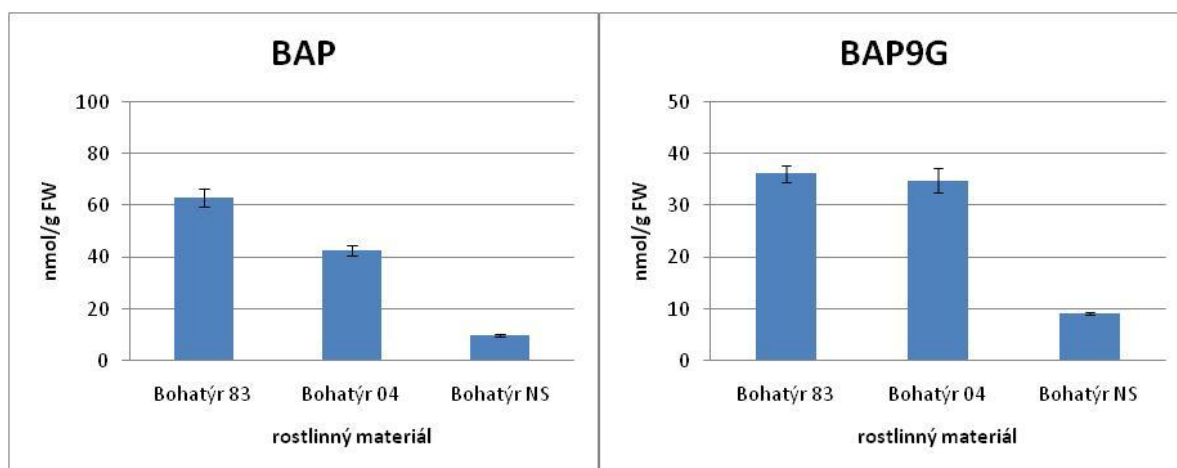
Kvantifikace endogenních CK byla provedena pomocí MRM analýzy (kapilární napětí 2,51 kV; teplota zdroje/desolvatačního plynu 120/550 °C; průtok desolvatačním plynem 600 l/h; LM/HM rozlišení 12,5; energie iontů 1 0,9 V; energie iontů 2 0,5 V, vstupní, výstupní napětí a napětí násobiče 2,0 V, 2,0 V a 650 eV. Jako kolizní plyn byl použit argon. Doby prodlevy, napětí kužele a kolizní energie pro jednotlivé přechody byly optimalizovány pro maximální citlivost. Doba prodlevy pro každý MRM kanál byla vypočtena na 16 skenovacích bodů na pík, během této doby bylo mezikanálové zpoždění 0,1 s a doba cyklů byla 0,55 – 0,65 s) (modifikováno Novák et al., 2008: eluce s 5-ti minutovým lineárním gradientem metanolem a mravenčanem amonným v poměru od 10:90 do 100:0 při průtokové rychlosti 0,5 ml/min; retenční časy sledovaných látek v rozmezí skenování píků: 1,5 až 4,5 minut; kapilární napětí 2,51 kV; teplota zdroje/desolvatačního plynu 120/550 °C; průtok desolvatačním plynem 600l/h; energie iontů 1 0,9 V; energie iontů 2 0,5 V). Ke kvantifikaci byl použit software MassLynx s metodou porovnání poměru endogenních CK a poměru použitých značených standardů o známé koncentraci (Novák et al., 2008).

6 Výsledky

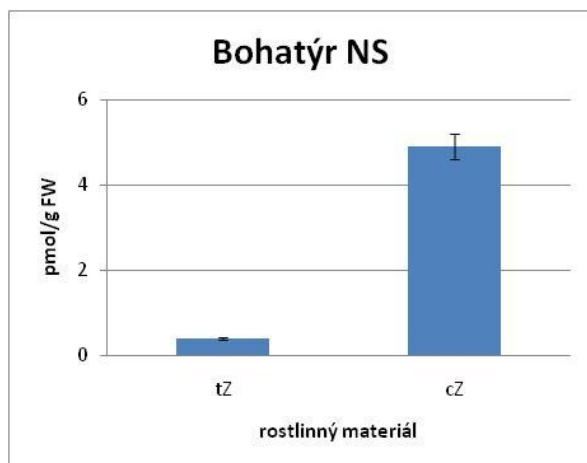
6.1 Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

Analyzovány byly tři *in vitro* kultury hrachu setého různého stáří. Ve vzorcích hrachu bylo pomocí UHPLC-ESI-MS/MS stanoveno 47 metabolitů CK (Tab. 1, 2).

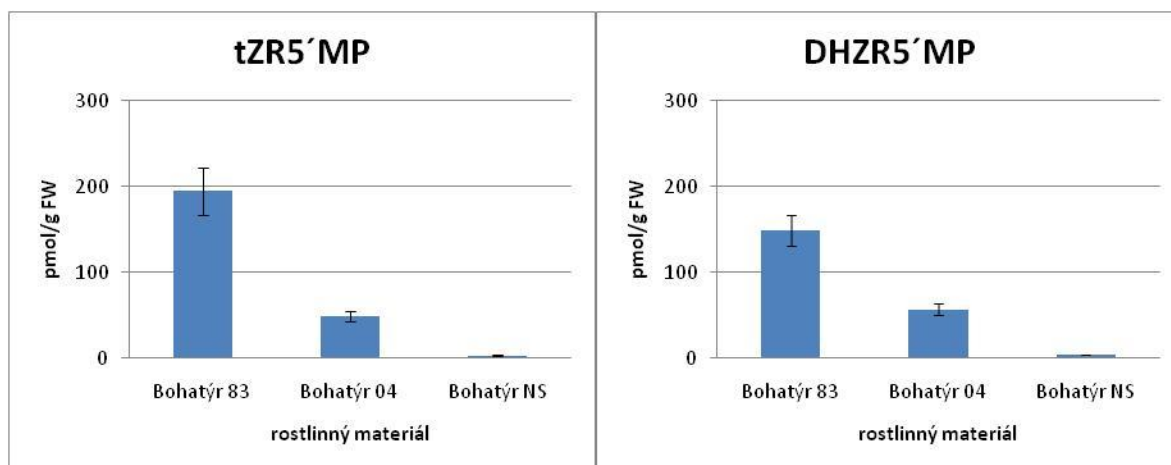
Koncentrace BAP a jeho derivátů byla v nejstarší kultuře několikanásobně vyšší, než jakou obsahovaly čerstvé kultury. Totéž platilo pro hladiny endogenních isoprenoidních CK kromě cZ a některých jeho metabolitů. Čerstvé kultury obsahovaly mnohem více cZ než tZ. Hladiny nukleotidů tZR5'MP a DHZR5'MP byly ve starších kulturách oproti čerstvým až o dva řády vyšší. Hladiny BAPR5'MP se ale ve všech kulturách nelišily. Přestože do média byly přidány pouze aromatické CK, celková hladina isoprenoidních nukleotidů byla mnohem vyšší, než aromatických.



Obr. 5 Hladiny BAP a BAP9G v kulturách hrachu setého



Obr. 6 Hladiny tZ a cZ v čerstvé kultuře hrachu setého



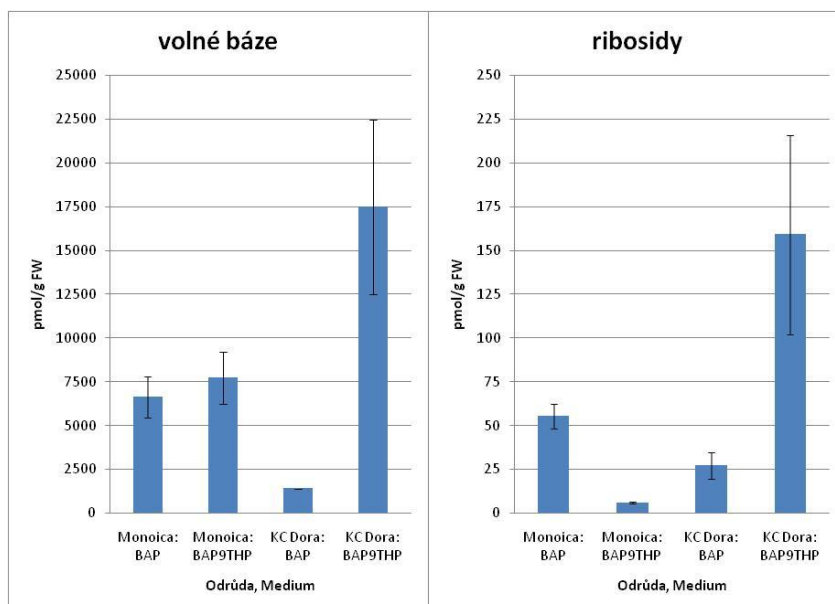
Obr. 7 Hladiny tZR5'MP a DHZR5'MP v kulturách hrachu setého

6.2 Konopí seté (*Cannabis sativa* L.)

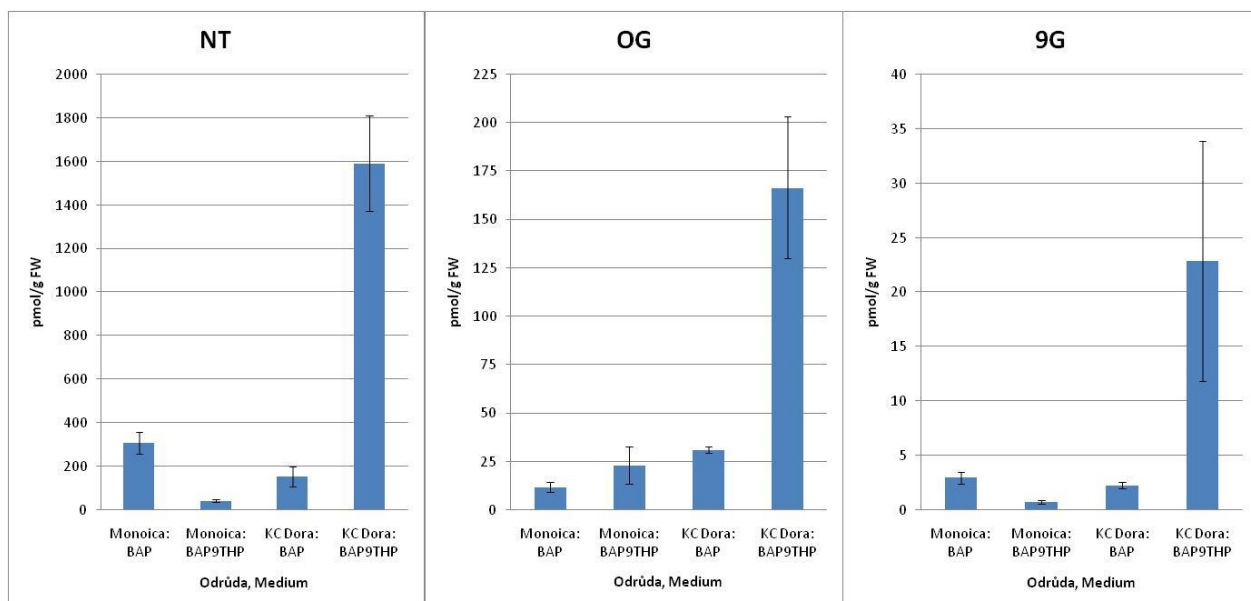
Analyzovány byly dvě odrůdy *in vitro* kultury konopí setého, pěstované na dvou různých kultivačních médiích, lyšících se přidaným exogenním cytokininem, BAP resp. BAP9THP v koncentraci 20 μ M. Ve vzorcích konopí bylo pomocí UHPLC-ESI-MS/MS stanoveno 47 metabolitů CK (Tab. 3).

Odrůda Monoica obsahovala téměř shodné množství aktivních volných bazí na obou médiích. Obsah neaktivních 9-glukosidů, které jsou pro rostlinu toxické, je na obou médiích naopak velmi nízký. Rostliny pěstované na médiu s BAP9THP však mají dvojnásobně vyšší hladiny zásobních *O*-glukosidů. Poměr aktivních a neaktivních CK byl vyšší v explantátech pěstovaných na BAP9THP.

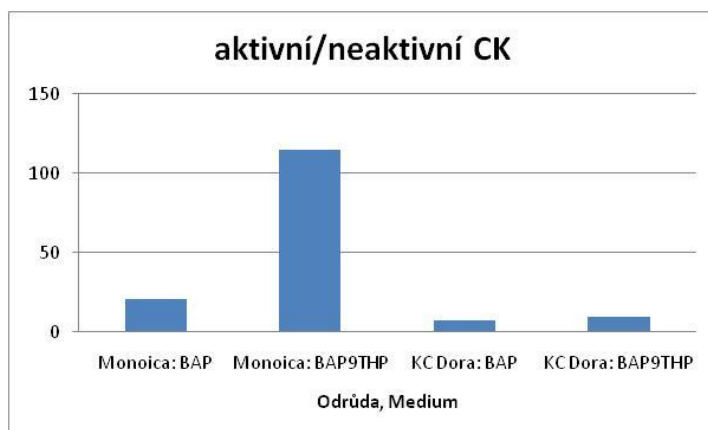
Odrůda KC Dora obsahuje na médiu s BAP9THP vysokou koncentraci aktivních volných bazí. Zvýšená je i hladina zásobních *O*-glukosidů a toxických 9-glukosidů. Poměr aktivních a neaktivních CK byl ovšem téměř shodný.



Obr. 8 Hladiny aktivních forem CK v explantátech konopí setého



Obr. 9 Hladiny neaktivních forem CK v explantátech konopí setého

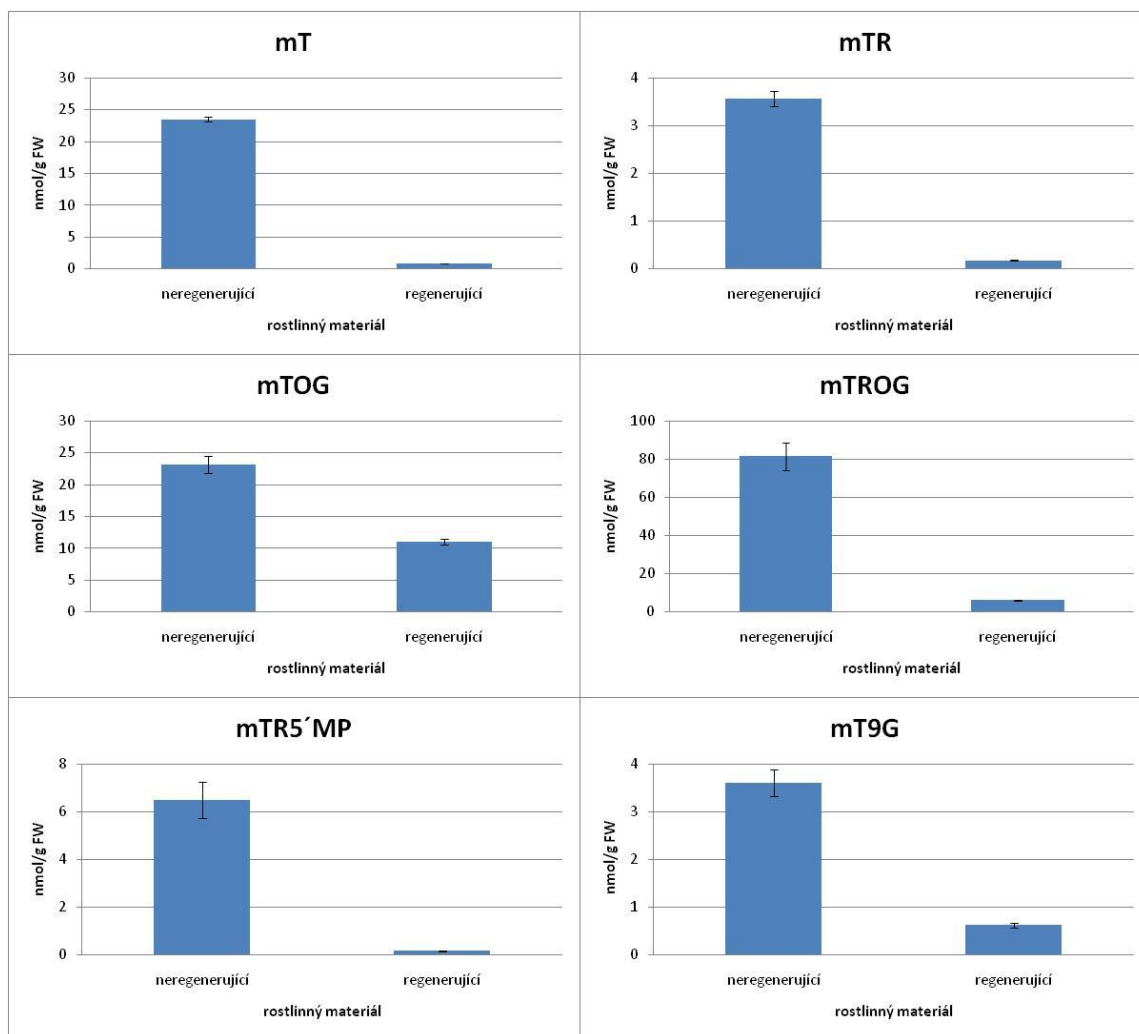


Obr. 10 Poměr aktivních a neaktivních forem CK v explantátech konopí setého

7.3 Knotovka bílá (*Silene latifolia* Poir. – ekotyp Tišnov)

Analyzovány byly dvě *in vitro* kultury knotovky bílé s rozdílnou regenerací. Ve vzorcích knotovky bylo pomocí UHPLC-ESI-MS/MS stanoveno 47 metabolitů CK (Tab. 4).

Hladiny mT a jeho derivátů byly výrazně vyšší u neregenerujících kultur knotovky oproti hladinám regenerujících kultur.



Obr. 11 Hladiny mT a jeho metabolitů v kulturách knotovky bílé

7 Diskuze

7.1 Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

Klonální *in vitro* množení by mělo vést ke vzniku identických kopií vybraného genotypu. V kombinaci se stresem ale může dojít k poruše kontrolních mechanismů a následné nestabilitě genomu (Smýkal et al., 2007). Vysoké hladiny BAP v kultivačním médiu stimulují v *in vitro* kultuře hrachu proliferaci již existujících axilárních meristémů, ale také aktivují *de novo* tvorbu nových, náhodných (Griga et al., 1986, Griga a Novák, 1990). Toto společně s dediferenciací kalusu může vést ke snížení genetické stability a zvýšení pravděpodobnosti vzniku mutací.

BAP je levným a široce používaným růstovým regulátorem, ale má také negativní účinky na růst některých druhů rostlin a působí negativně při zakořeňování, což působí komplikace při práci s rostlinnými tkáňovými kulturami (Aremu et al., 2012). Navíc i dlouhodobé *in vitro* kultury hrachu mohou vést k tvorbě poškozených regenerantů (Gostimskii et al., 1995, Ezhova et al., 1995) v závislosti na složení média a obsahu růstových regulátorů (Kumar a Mathur, 2004). Snížené zakořeňování může být částečně spojené s tvorbou a kumulací *N*-glukosidů zejména v bazálních částech rostliny. Tyto metabolity jsou totiž biologicky neaktivní, avšak chemicky stabilní a nevratné (Werbrouck et al., 1995, Bairu et al., 2011). Problém nastane v době, kdy rostlina vyžaduje CK signalizaci a zásobní *O*-glukosidy poskytující aktivní volné báze CK a CK ribosidy jsou *N*-glykosylovány (Bairu et al., 2011, Aremu et al., 2012). Dále bylo zjištěno, že přidání IAA také podporuje tvorbu 9-glukosidů (Bairu et al., 2011).

Jednotlivé námi analyzované kultury hrachu různého stáří vykazovaly rozdílné hladiny BAP a veškerých cukerných konjugátů. Čerstvé kultury oproti starším obsahovaly mnohonásobně nižší hladiny. Stejně výsledky platí i pro endogenní isoprenoidní CK kromě cZ a některých jeho metabolitů. Vyšší hladiny cZ než tZ (Obr. 6) u čerstvých kultur korelují s výzkumem u dalších druhů rostlin (Gajdošová et al. 2011). Hladiny cZOG byly ale vyšší u starších kultur, což potvrzuje, že *O*-glykosylace závisí na stáří kultury (Plačková et al., 2015).

Tyto výsledky korelují s dříve publikovanými daty, kdy akumulace exogenních CK z kultivačního média a jejich metabolitů je mnohem výraznější u starších *in vitro* kultur hrachu. Toto hromadění CK vysvětluje předchozí zjištění, kdy se dlouhodobé kultury

špatně potýkají s růstem a vývojem zakořeněných rostlin (Griga a Stejskal, 1994, Smýkal et al., 2007) a předčasným stárnutím (Aremu et al., 2012).

7.2 Konopí seté (*Cannabis sativa* L.)

Exogenně přidané růstové faktory mají vliv na biochemické dráhy, které regulují endogenní hladiny CK v rostlinách. Isoprenoidní a aromatické CK se svým spektrem biologické aktivity překrývají, avšak nezastupují (Strnad, 1997). Isoprenoidní CK mají vyšší účinek na růstové procesy související s buněčným cyklem. Aromatické CK řídí vývojové procesy, jako například morfogenezi a stárnutí (Holub et al., 1998). V rostlinách bez přídavku exogenních cytokininů převládají endogenní formy isoprenoidních CK (Aremu et al., 2014).

Dalším faktorem ovlivňujícím hladiny endogenních CK může být aktivita CKX. Výsledky experimentů na dvou různých odrůdách hrachu naznačují, že existují různé alely cckx v genomech obou odrůd. Aktivita CKX v těchto kultivarech je poté různá (Vaseva et al., 2006).

Předchozí práce (Hrdlička, bakalářská práce, 2013) se zabývala hledáním vhodného složení CK v médiu pro regeneraci kultur konopí setého. Opakované *in vitro* experimenty s různými odrůdami konopí ovšem nevedly k úspěšné regeneraci. V pokračujícím výzkumu jsme se tedy zaměřili na genotypovou specifickou při pěstování rostlin na médiích s BAP a jeho derivátem BAP9THP.

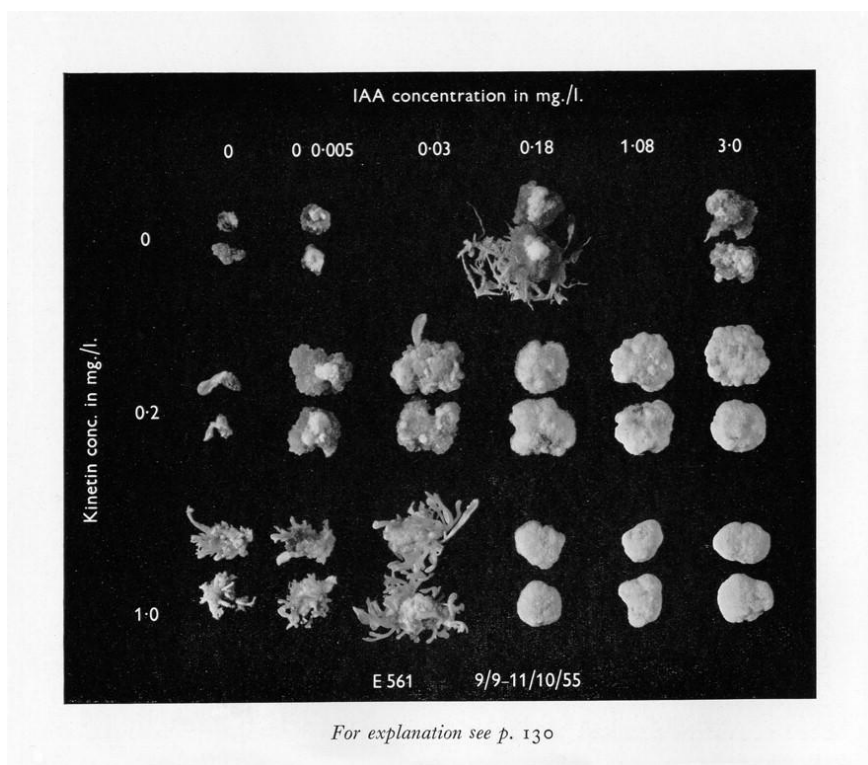
Pomocí analýzy CK v odlišných odrůdách konopí jsme objevili různé hladiny cytokininů v jednotlivých odrůdách (Obr. 8, 9). Kromě jednotlivých hladin se změnil i poměr aktivních a neaktivních forem CK v jednotlivých explantátech (Obr. 10).

Významné rozdíly hladin a poměrů aktivních a neaktivních metabolitů CK značí, že nejen různé druhy, ale i jednotlivé odrůdy konopí setého jsou specificky rozdílné a pro regeneraci vyžadují odlišné složení CK v regeneračních médiích.

7.3 Knotovka bílá (*Silene latifolia* Poir. – ekotyp Tišnov)

Skoog a Miller (1957) na svých experimentech s buňkami tabáku dokázali, že vysoká koncentrace auxinů i CK způsobuje tvorbu nediferenciovaného pletiva, tzv. kalusu. Následné úpravy poměrů těchto růstových regulátorů jsou zodpovědné za diferenciaci

kořenů a prýtů (obr. 12). V regenerujících rostlinách by tedy měly klesnout hladiny obou fytohormonů a jejich následující poměr určí, v jaký orgán se budou buňky dělit.



Obr. 12 Regulace organogeneze pomocí CK a auxinu (Skoog a Miller, 1957)

Tuto teorii potvrzují i naše výsledky, kdy neregenerující kultury knotovky obsahovaly vysoké koncentrace mT a jeho derivátů (Obr. 11) potřebných pro tvorbu a udržení kalusu. Naopak v regenerujících kulturách hladiny mT výrazně klesly. Toto snížení přispělo k diferenciaci totipotentních buněk v jednotlivá pletiva.

8 Závěr

V rámci této práce byly zkoumány hladiny cytokininů a jejich metabolitů v rostlinách v rámci tří kritérií:

- 1) Kultury stejného druhu rozdílného stáří (*Pisum sativum* L.)
- 2) Kultury rozdílných odrůd jednoho druhu (*Cannabis sativa* L.)
- 3) Regenerující/neregenerující kultury stejného druhu (*Silene latifolia* Poir.)

Ke kvalifikaci a kvantifikaci cytokininů a jejich metabolitů bylo využito metody UHPLC-ESI-MS/MS. Purifikace vzorků byla provedena pomocí SPE metod za využití reverzní fáze, iontoměničů a imunoafinitní chromatografie.

V prvním experimentu byly zkoumány rozdíly hladin cytokininů v kulturách hrachu setého (*Pisum sativum* L.) založených v roce 1983, 2004 a nově založené čerstvé kultury. Všechny kultury byly pěstovány na médiu s BAP. Výsledkem experimentu bylo potvrzení teorie, že kumulace exogenních cytokininů a jejich metabolitů je výraznější u starších *in vitro* kultur hrachu. Toto hromadění nejspíš stojí za problémem horšího růstu a vývoje dlouhodobých kultur a jejich předčasného stárnutí.

Druhý experiment zkoumal specifitu rozdílných genotypů konopí setého (*Cannabis sativa* L.) k BAP a BAP9THP. V jednotlivých genotypech byly objeveny významné rozdíly hladin a poměrů aktivních a neaktivních metabolitů CK.

V třetím experimentu byly porovnávány hladiny cytokininů a jejich metabolitů v regenerujících a neregenerujících kalusových kulturách knotovky bílé (*Silene latifolia* Poir.) pěstovaných na mT. Vysoké hladiny cytokininů v neregenerujících kulturách korelují s teorií nutné přítomnosti vysokých hladin cytokininů (a auxinů) pro tvorbu a udržení kalusu.

Výsledky provedených experimentů potvrdily význam exogenních a endogenních CK pro úspěšnost studovaných regeneračních systémů.

9 Použitá literatura

- Allen M, Qin W, Moreau F, Moffatt B, 2002. Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiol Plant* 115, 56-68
- Aremu AO, Plačková L, Bairu MV, Novák O, Szüčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J, 2012. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tissue Organ Cult* 108, 1-16
- Aremu AO, Plačková L, Bairu MV, Novák O, Szüčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J, 2014. Endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured and acclimatized 'Williams' bananas subjected to different aromatic cytokinin treatments. *Plant Science* 214, 88-98
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J, 2007. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* 51, 1019-1029
- Armstrong DJ, 1994. Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. See Ref. 125a, 139-54
- Ästot C, Doležal K, Moritz T, Sandberg G, 1998. Precolumn derivatization and capillary liquid chromatographic/frit-fast atom bombardement mass spectrometric analysis of cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *J Mass Spectrom* 33, 892-902
- Bairu MW, Novák O, Doležal K, Van Staden J, 2011. Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regul* 63, 105-114
- Balcke GU, Handrick V, Bergau N, Fichtner M, Henning A, Stellmach H, Tissier A, Hause B, Frolov A, 2012. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* 8, 47
- Bieleski RL, 1964. The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal. Biochem.* 9, 431-442
- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO, 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol* 125, 378-386

- Birkemeyer C, Kolasa A, Kopka J, 2003. Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *J. Chromatogr. A* 993, 89-102
- Björkman PO, Tillberg E, 1996. Acetylation of Cytokinins and Modified Adenine Compounds: A Simple and Non-destructive Derivatization Method for Gas Chromatography–Mass Spectrometric Analysis. *Phytochem. Anal.* 7, 57
- Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, Bakó L, Campos N, Schell J, Palme K, 1993. Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 262, 1051-1054
- Casanova E, Valdés AE, Fernández B, Moysset L, Trillas MI, 2004. Levels and immunolocalization of endogenous cytokinins in thidiazuron-induced shoot organogenesis in carnation. *J Plant Physiol.* 161, 95-104
- Cook NC, Bellstedt DU, Jacobs G, 2001. Endogenous cytokinin distribution patterns at budburst in Granny Smith and Braeburn apple shoots in relation to bud growth. *Scientia Hort.* 87, 53-63
- Davis GC, Hein MB, Neely BC, Sharp CR, Carnes MG, 1985. Strategies for the Determination of Plant Hormones. *Analytical Chemistry* 57, 638-648
- Dagla HR, 2012. Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. *Resonance* 17, 759-767
- Davies PJ, 2010, *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, Springer Dordrecht Heidelberg London New York
- Dewitte W, Chiappetta A, Azmi A, Witters E, Strnad M, Rembur J, Noin M, Chriqui D, Van Onckelen H, 1999. Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral Tobago during floral transition and flower formation. *Plant Physiol* 119, 1111-1122
- Dobrev P, Kaminek M, 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 950, 21-29
- Entsch B, Parker CW, Letham DS, Summons RE, 1979. Preparation and characterization, using high-performance liquid chromatography, of an enzyme forming glucosides of cytokinins. *Biochim Biophys Acta* 570, 124-139

- Ezhova TA, Bagrova AM, Gostimski SA, 1995. Cell selection as a possible reason for the specificity of somaclonal variation in pea. *Plant Breed* 114, 520-524
- Farrow SC, Emery RJN, 2012. Concurrent profiling of indole-3-acetic acid, abscisic acid, and cytokinins and structurally related purines by high-performance-liquid chromatography tandem electrospray mass spectrometry. *Plant Methods* 8, 42
- Frébort I, Šebela M, Galuszka P, Werner T, Schmülling T, Peč P, 2002. Cytokinin oxidase/dehydrogenase assay: optimized procedures and applications. *Anal. Biochem.* 306, 1-7
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P, 2011. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* 62, 2431-2452
- Fu JH, Sun XH, Wang JD, Chu JF, Yan CY, 2011. Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* 56, 355-366
- Fusseder A, Ziegler P. 1988. Metabolism and compartmentation of dihydrozeatin exogenously supplied to photoautotrophic suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta* 173, 104-109
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinova A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, Vaňková R, Strnad M, Motyka V, 2011. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot* 62, 2827-2840
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, Sauer P, Jacobsen S, Peč P, 2001. Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur J Biochem* 268, 450-461
- Galuszka P, Popelková H, Werner T, Frébortová J, Pospíšilová H, Mik V, Köllmer I, Schmülling T, Frébort I, 2007. Biochemical characterization and histochemical localization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Growth Regul.* 26, 255-267
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158
- Ge L, Yong JWH, Goh NK, Chia LS, Tan SN, Ong ES, 2005. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of

- liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 829, 26-34
- Ge L, Yong JWH, Tan SN, Yang XH, Ong ES, 2004. Analysis of some cytokinin in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 1048, 119-126
- George EF, Hall MA, Klerk GJD, 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, Springer Dordrecht, The Netherlands
- Gostimskii SA, Bagrova AM, Ezhova TA, 1995. Discovery and cytogenetic analysis of the variability in plants regenerated from tissue-culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Dokl Akad Nauk SSSR* 283, 1007-1011
- Griga M, Novák FJ, 1990. Pea (*Pisum sativum* L.). V knize Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, legumes and oil seed crops*, Vol 10. Springer, Berlin, 65-99
- Griga M, Stejskal J. 1994. Micropropagation of pea (*Pisum sativum* L.)-in vitro system and its practical applications. V knize Lumsden PJ, Nicholas JR, Davies WJ (eds) *Physiology, growth and development of plants in culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 278-283
- Griga M, Tejklová E, Novák FJ, 1984. Hormonal regulation of growth of pea (*Pisum sativum* L.) shoot apices in in vitro culture. *Rost Výt* 30, 523-530
- Griga M, Tejklová E, Novák FJ, Kubaláková M, 1986. In vitro clonal propagation of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 6, 95-104
- Gyulai G, Heszky LE, 1994. Auxin and cytokinin bioassays: A short overview. *Acta Agronomica Hungarica* 43, 185-197
- Hage DS, 1998. Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. B* 715, 3-28
- Hare PD, Van Staden J, 1994. Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiol Plant* 91, 128-136
- Hauserová E, Swaczynová J, Doležal K, Lenobel R, Popa I, Hajdúch M, Vydra D, Fuksová K, Strnad M, 2005. Batch immunoextraction method for efficient purification of aromatic cytokinins. *J. Chromatogr. A* 1100, 116-125
- Hennion MC, Pichon V, 2003. Immuno-based sample preparation for trace analysis. *J. Chromatogr. A* 1000, 29-52

- Hirano K, Nakajima M, Asano K, Nishiyama T, Sakakibara H, Kojima M, Katoh E, Xiang H, Tanahashi T, Hasebe M, Banks JA, Ashikari M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M, 2007. The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 19, 3058-3079
- Hocart CH, Wong OC, Letham DS, Tay SAB, Macleod JK, 1986. Mass spectrometry and chromatography of t-butyltrimethylsilyl derivatives of cytokinin bases. *Anal. Biochem.* 153, 85-96
- Holub J, Hanuš J, Hanke DE, Strnad M, 1998. Biological activity of cytokinins derived from ortho- and meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regul* 26, 109-115
- Horgan R, Scott IM 1987. V knize Rivier L, Crozier A 1987. Cytokinins in „Principles and Practice of Plant Hormone Analysis, Volume 2. Academic Press, London.
- Hoyerová K, Gaudinová A, Malbeck J, Dobrev PI, Kocábek T, Šolcová B, Trávníčková A, Kamínek M, 2006. Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* 67, 1151-1159
- Hrdlička J, 2013. Izolace a kvantifikace cytokininů ve vybraném rostlinném materiálu (pomocí UPLC-MS/MS). Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci
- Chase HL, 1983. Affinity separations utilizing immobilized monoclonal antibodies. *Chemical Engineering. Science* 39, 1099-1125
- Imbault N, Moritz T, Nilsson O, Chen HJ, Bollmark M, Sandberg G, 1993. Separation and identification of cytokinins using combined capillary liquid chromatography mass-spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* 22, 201-210
- Kamínek M, Armstrong DJ, 1990. Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus callus* cultures. *Plant Physiol.* 93, 1530-1538
- Kowalska M, Galuszka P, Frébortová J, Šebela M, Béres T, Hluska T, Šmehilová M, Bilyeu KD, Frébort I, 2010. Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry* 71, 1970-1978
- Kumar PS, Mathur VL, 2004. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 78, 267-271

- Letham DS, 1994. Cytokinins as phytohormones-sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. V knize Mok DWS, Mok MC, eds, Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. CRC Press, Boca Raton, Florida, 57-80
- Ludewig M, Dörffling K, König WA, 1982. Electron-capture capillary gas chromatography and mass spectrometry of trifluoroacetylated cytokinins. *J. Chromatogr.* 243, 93-98
- MacLeod JK, Summons RE, Letham DS, 1976. Mass spectrometry of cytokinin metabolites. Per(trimethylsilyl) and permethyl derivatives of glucosides of zeatin and 6-benzylaminopurine. *J. Org. Chem.* 41, 3959
- Mameaux S, Cockram J, Thiel T, Steuernagel B, Stein N, Taudien S, Jack P, Werner P, Gray JC, Greenland AJ, Powell W, 2012. Molecular, phylogenetic and comparative genomic analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family in the Poaceae. *Plant Biotechnol. J.* 10, 67-82
- Mok MC, 1994. Cytokinins and plant development - an overview. See Ref. 125a, 155–66
- Mok DW, Mok MC, 2001. Cytokinin Metabolism and Action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 89-118
- Morris RO, 1977. Mass Spectroscopic Identification of Cytokinins: Glucosyl Zeatin and Glucosyl Ribosylzeatin from *Vinca rosea* Crown Gall. *Plant Physiol.* 59, 1029–1033
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh N, 1999. Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem Biophys Res Comm* 255, 328-333
- Morris RO, Blevins DG, Dietrich JT, Durley RC, Gelvin SB, Gray J, Hommes NG, Kamínek M, Matthews LJ, Meilan R, Reinbott TM, Sayavedra-Soto L, 1993. Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains. *Aust J Plant Physiol* 20, 621-637
- Moser AC, Hage DS, 2010. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* 2, 769-790
- Most BH, Williams JC, Parker KJ. 1968. Gas chromatography of cytokinins. *J. Chromatogr.* 38, 136-138
- Motte H, 2013. Factors controlling shoot regeneration from *Arabidopsis* root explants. Ghent University, Ghent, Belgium

- Motyka V, Faiss M, Strnad M, Kamínek M, Schmölling T, 1996. Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of *ipt* gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. *Plant Physiol* 112, 1035-1043
- Motyka V, Kamínek M, 1994. Cytokinin oxidase from auxin and cytokinin-dependent callus cultures of tobacco *Nicotiana tabacum* L. *J Plant Growth Regul* 13, 1-9
- Motyka V, Vaňková R, Čapková V, Petrášek J, Kamínek M, Schmölling T, 2003. Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiologia Plantarum* 117, 11-21
- Naito T, Yamashino T, Kiba T, Koizumi N, Kojima M, Sakakibara H, Mizuno T, 2007. A link between cytokinin and *ASL9* (*ASYMMETRIC LEAVES 2 LIKE 9*) that belongs to the *AS2/LOB* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES*) family genes in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1269-1278
- Nissen P, 1985. Dose responses of auxins. *Physiol Plant* 65, 357-374
- Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Doležal K, Ästot C, Sandberg G, Moritz T, 2004. Derivatization for LC-Electrospray Ionization-MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI responses of bases, ribosides, and intact nucleotides. *Anal Chem* 76, 2869-2877
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Doležal K, Strnad M, 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochem.* 69, 2214-2224
- Novák O, Tarkowski P, Tarkovská D, Doležal K, Lenobel R, Strnad M, 2003. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography/singlequadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 480, 207-218
- Plačková L, Hrdlička J, Smýkalová I, Cvečková M, Novák O, Griga M, Doležal K, 2015. Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures. *Plant Growth Regul* (v tisku)
- Prinsen E, Van Dongen W, Esmans E, Van Onckelen H, 1997. HPLC linked electrospray tandem mass spectrometry: a rapid and reliable method to analyse indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. *J. Mass Spectrom* 32, 12-22
- Prinsen E, Van Dongen W, Esmans EL, Van Onckelen HA, 1998. Micro and capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a new dimension in phytohormone research. *J. Chromatogr. A* 826, 25-37

- Skoog F, Miller CO, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11, 118-131
- Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I, 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research* 116, 241-252
- Schnorr KM, Gaillard C, Biget E, Nygaard P, Laloue M, 1996. A second form of adenine phosphorybosyltransferase in Arabidopsis thaliana with relative specificity towards cytokinins. *Plant J.* 9, 891-898
- Smýkal P, Valledor L, Rodriguez R, Griga M, 2007. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep* 26, 1985-1998
- Strnad M, 1997. The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* 101, 674-688
- Strnad M, Peters W, Beck E, Kamínek M, 1992. Immunodetection and identification of N⁶-(o-Hydroxybenzylamino)Purine as a Naturally Occurring Cytokinin in *Populus x canadensis* Moench cv Robusta Leaves. *Plant. Physiol* 99, 74-80
- Svačinová J, Novák O, Plačková L, Lenobel R, Holík J, Strnad M, Doležal K, 2012. A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* 8, 17
- Štulík K, Ševčík J, Pacáková V, Jelínek I, Coufal P, Bosáková Z, 2004. Analytické separační metody. Nakladatelství Karolinum, Praha
- Taverner E, Letham DS, Wang J, Cornish E, Willcocks DA, 1999. Influence of ethylene on cytokinin metabolism in relation to *Petunia* corolla senescence. *Phytochemistry* 51, 341-347
- Tarkowski P, Doležal K, Strnad M, 2004. Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy* 98, 834-841
- Tarkowski P, Ge L, Yong JWH, Tan SN, 2009. Analytical methods for cytokinins. *Trends Anal Chem* 28, 323-335
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680

- Vaseva I, Todorová D, Malbeck J, Trávníčková A, Macháčková I, Karanov E, 2006. Two pea varieties differ in cytokinin oxidase/dehydrogenase response to UV-B irradiation. *Gen Appl. Plant Physiology, Special Issue*, 131-136
- Von Schwartzberg K, Nunez MF, Blaschke H, Dobrev PI, Novák O, Motyka V, Strnad M, 2007. Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiol.* 145, 786-800
- Vyroubalová Š, Václavíková K, Turečková V, Novák O, Šmehilová M, Hluska T, Ohnoutková L, Frébort I, Galuszka P, 2009. Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol.* 151, 433-447
- Wang J, Letham DS, Taverner E, Badenoch-Jones J, Hocart CH, 1995. A procedure for quantification of cytokinins as free bases involving scintillation proximity immunoassay. *Physiol. Plant.* 95, 91-98
- Werbrouck S, Van der Jeugt B, Dewitte W, Prinsen E, Van Onckelen H, Debergh P, 1995. The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* 'Schott Petite' in relation to acclimatisation problems. *Plant Cell Rep* 14, 662-665
- Werner T, Schmülling T, 2009. Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 527-538
- Whitty CD, Hall RH, 1974. A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can J Biochem* 52, 787-799
- Yong JWH, Wong SC, Letham DS, Hocart CH, Farquhar GD, 2000. Effects of elevated [CO₂] and nitrogen nutrition on cytokinins in the xylem sap and leaves of cotton. *Plant Physiol* 124, 767-780
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP, 2007. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3037-3057
- Zhang R, Zhang X, Wang J, Letham DS, McKinney SA, Higgins TJV, 1995. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissues expressing an *ipt* gene. *Planta* 196, 84-94

10 Příloha

Tab. 1 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v kulturách hrachu setého [pmol/g FW]

Tab. 2 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v kulturách hrachu setého [pmol/g FW]

Tab. 3 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v explantátech konopí setého [pmol/g FW]

Tab. 4 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v kulturách knotovky bílé [pmol/g FW]

Plačková L, Hrdlička J, Smýkalová I, Cvečková M, Novák O, Griga M, Doležal K, 2015.
Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures. *Plant Growth Regul*

Samples	IZ	IZOG	IZR	IZROG	IZR9G	IZR5 MP
B6 Bohatýr 83	41,095 ± 2,499	47,291 ± 2,020	330,435 ± 38,297	39,666 ± 3,580	1,070 ± 0,091	353,438 ± 72,566
B6 Bohatýr 83	17,842 ± 1,028	19,515 ± 0,789	99,407 ± 4,103	10,284 ± 0,577	0,465 ± 0,144	83,816 ± 3,596
B6 Bohatýr 83	21,403 ± 1,588	26,622 ± 2,023	120,708 ± 19,737	15,375 ± 3,277	0,621 ± 0,004	146,996 ± 7,250
B6 Bohatýr 04	5,705 ± 3,415	35,571 ± 20,969	35,704 ± 13,094	13,320 ± 4,589	0,413 ± 0,021	83,604 ± 9,235
B6 Bohatýr 04	5,324 ± 1,591	7,018 ± 0,763	8,362 ± 2,996	2,163 ± 0,182	<LOD	32,325 ± 4,346
B6 Bohatýr 04	3,026 ± 0,624	6,730 ± 0,499	7,551 ± 0,816	3,010 ± 0,196	0,118 ± 0,040	29,397 ± 3,969
B6 Bohatýr NS	1,189 ± 0,107	2,281 ± 0,573	0,719 ± 0,161	2,078 ± 0,100	<LOD	5,790 ± 1,006
B6 Bohatýr NS	<LOD	2,798 ± 0,639	0,259 ± 0,021	2,040 ± 0,355	<LOD	1,507 ± 0,265
B6 Bohatýr NS	<LOD	4,458 ± 1,008	0,502 ± 0,034	2,070 ± 0,175	<LOD	2,041 ± 0,391
Samples	CZ	CZOG	CZR	CZROG	CZR9G	CZR5 MP
B6 Bohatýr 83	4,855 ± 0,548	14,111 ± 0,838	79,734 ± 8,271	39,268 ± 3,316	0,783 ± 0,082	258,873 ± 40,704
B6 Bohatýr 83	7,217 ± 0,921	16,045 ± 2,225	95,687 ± 5,690	40,816 ± 4,005	0,833 ± 0,093	277,696 ± 16,906
B6 Bohatýr 83	6,995 ± 0,317	13,392 ± 2,064	76,052 ± 13,889	32,993 ± 3,505	1,096 ± 0,113	282,312 ± 4,077
B6 Bohatýr 04	3,796 ± 0,812	8,576 ± 1,589	61,549 ± 4,444	23,208 ± 1,205	0,317 ± 0,030	269,553 ± 9,676
B6 Bohatýr 04	4,306 ± 0,529	10,493 ± 0,014	80,104 ± 11,403	17,365 ± 0,681	0,339 ± 0,009	364,322 ± 25,172
B6 Bohatýr 04	4,740 ± 0,457	9,549 ± 0,893	51,842 ± 8,390	24,292 ± 5,640	0,413 ± 0,029	260,878 ± 24,550
B6 Bohatýr NS	5,258 ± 0,073	10,630 ± 1,501	28,621 ± 3,400	17,356 ± 0,835	0,335 ± 0,038	179,703 ± 6,110
B6 Bohatýr NS	4,318 ± 0,395	10,362 ± 1,001	23,815 ± 1,680	19,610 ± 1,571	0,301 ± 0,046	168,232 ± 14,191
B6 Bohatýr NS	5,118 ± 0,438	13,585 ± 1,086	26,360 ± 0,973	19,098 ± 1,455	0,343 ± 0,013	182,841 ± 16,980
Samples	DHZ	DHZOG	DHZR	DHZROG	DHZR9G	DHZR5 MP
B6 Bohatýr 83	6,506 ± 0,360	66,127 ± 6,634	267,703 ± 37,765	15,526 ± 0,352	0,932 ± 0,074	257,205 ± 50,605
B6 Bohatýr 83	2,839 ± 0,294	19,486 ± 1,253	76,563 ± 3,581	7,266 ± 0,535	0,478 ± 0,022	71,464 ± 2,988
B6 Bohatýr 83	2,864 ± 0,219	18,966 ± 8,803	102,367 ± 16,939	6,948 ± 0,994	0,606 ± 0,130	117,674 ± 1,668
B6 Bohatýr 04	2,541 ± 0,198	18,969 ± 0,049	36,141 ± 0,129	12,562 ± 1,908	0,738 ± 0,196	106,657 ± 13,481
B6 Bohatýr 04	0,898 ± 0,200	4,120 ± 0,664	10,282 ± 2,563	3,407 ± 0,061	0,100 ± 0,045	35,740 ± 5,623
B6 Bohatýr 04	0,793 ± 0,039	5,299 ± 0,483	8,621 ± 0,641	6,061 ± 0,341	0,426 ± 0,009	29,360 ± 3,050
B6 Bohatýr NS	0,192 ± 0,057	2,014 ± 0,449	0,765 ± 0,025	2,667 ± 0,110	0,113 ± 0,048	5,179 ± 0,497
B6 Bohatýr NS	<LOD	1,220 ± 0,234	0,757 ± 0,015	2,272 ± 0,181	0,143 ± 0,036	3,821 ± 0,235
B6 Bohatýr NS	<LOD	0,812 ± 0,122	0,778 ± 0,105	2,271 ± 0,298	0,054 ± 0,036	3,950 ± 0,730
Samples	mT	mTOG	mTR	mTROG	mTR9G	mTR5 MP
B6 Bohatýr 83	71,847 ± 2,865	34,181 ± 17,088	6,564 ± 2,227	52,373 ± 5,299	15,997 ± 1,391	<LOD
B6 Bohatýr 83	47,602 ± 4,957	26,191 ± 4,134	9,910 ± 2,167	69,473 ± 12,163	30,008 ± 3,391	5,106 ± 0,513
B6 Bohatýr 83	31,981 ± 4,782	18,620 ± 1,597	7,628 ± 3,048	49,145 ± 5,417	32,837 ± 4,296	<LOD
B6 Bohatýr 04	30,878 ± 5,505	30,186 ± 13,772	9,189 ± 1,080	70,291 ± 0,096	49,313 ± 2,615	15,756 ± 6,390
B6 Bohatýr 04	8,947 ± 1,462	10,358 ± 4,278	3,192 ± 1,468	29,124 ± 3,094	11,486 ± 1,161	5,863 ± 0,360
B6 Bohatýr 04	16,430 ± 3,584	13,715 ± 3,044	4,759 ± 2,303	43,854 ± 0,889	28,598 ± 3,661	13,448 ± 1,984
B6 Bohatýr NS	3,635 ± 0,707	6,234 ± 2,555	1,018 ± 0,283	15,321 ± 0,601	5,200 ± 0,039	3,170 ± 0,219
B6 Bohatýr NS	4,257 ± 1,069	11,244 ± 5,117	1,303 ± 0,295	17,957 ± 2,653	5,468 ± 1,165	3,127 ± 0,316
B6 Bohatýr NS	5,559 ± 0,354	12,256 ± 1,603	1,035 ± 0,254	13,733 ± 0,944	4,189 ± 0,747	3,039 ± 0,391
Samples	oT	oTOG	oTR	oTROG	oTR9G	oTR5 MP
B6 Bohatýr 83	159,583 ± 13,342	<LOD	50,201 ± 0,254	19,690 ± 1,159	29,869 ± 4,575	10,427 ± 4,365
B6 Bohatýr 83	394,632 ± 40,406	39,872 ± 1,326	57,290 ± 4,615	20,597 ± 1,869	56,013 ± 5,704	23,652 ± 6,771
B6 Bohatýr 83	200,337 ± 21,835	41,123 ± 6,166	32,361 ± 0,436	14,140 ± 0,991	59,811 ± 14,331	8,538 ± 2,283
B6 Bohatýr 04	183,953 ± 8,579	<LOD	38,830 ± 3,129	11,617 ± 1,310	78,114 ± 6,529	34,511 ± 4,471
B6 Bohatýr 04	77,266 ± 0,732	<LOD	18,712 ± 0,400	17,343 ± 4,519	29,366 ± 2,721	11,766 ± 0,756
B6 Bohatýr 04	131,241 ± 3,684	<LOD	30,447 ± 2,835	<LOD	37,463 ± 1,118	28,613 ± 5,148
B6 Bohatýr NS	38,011 ± 2,223	<LOD	7,683 ± 1,252	<LOD	9,355 ± 0,471	<LOD
B6 Bohatýr NS	54,816 ± 8,693	<LOD	7,778 ± 0,812	<LOD	5,453 ± 0,630	<LOD
B6 Bohatýr NS	36,571 ± 7,512	<LOD	10,223 ± 0,347	<LOD	6,451 ± 0,091	<LOD

Tab. 1 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v kulturách hrachu setého [pmol/g FW]

Samples	pT	pTOG	pTR	pTROG	pTR5MP
B6 Bohatýr 83	118,402 ± 27,644	255,730 ± 30,638	1014,919 ± 31,294	652,161 ± 60,629	363,325 ± 50,039
B6 Bohatýr 83	141,507 ± 17,938	298,523 ± 12,281	844,471 ± 138,813	759,429 ± 26,886	363,854 ± 49,695
B6 Bohatýr 83	85,906 ± 6,835	227,915 ± 41,550	517,453 ± 34,210	516,653 ± 129,680	287,227 ± 15,368
B6 Bohatýr 04	90,445 ± 3,410	372,132 ± 10,552	436,630 ± 18,862	893,891 ± 22,464	483,101 ± 158,759
B6 Bohatýr 04	25,743 ± 0,789	109,340 ± 10,384	144,435 ± 54,620	276,231 ± 10,428	236,036 ± 21,580
B6 Bohatýr 04	45,767 ± 2,036	192,929 ± 13,482	154,789 ± 49,103	535,461 ± 14,796	358,160 ± 22,724
B6 Bohatýr NS	8,436 ± 1,421	39,170 ± 4,729	28,482 ± 4,427	201,742 ± 11,197	62,077 ± 0,447
B6 Bohatýr NS	12,102 ± 1,399	44,325 ± 7,546	37,749 ± 9,326	163,742 ± 19,566	66,211 ± 1,499
B6 Bohatýr NS	7,295 ± 0,508	37,504 ± 5,359	22,307 ± 2,881	161,379 ± 15,714	34,364 ± 1,228

Samples	K	KR	K9G	KR5MP
B6 Bohatýr 83	<LOD	2,379 ± 1,678	0,392 ± 0,055	<LOD
B6 Bohatýr 83	0,882 ± 0,299	6,716 ± 2,054	0,532 ± 0,067	<LOD
B6 Bohatýr 83	7,444 ± 0,097	3,200 ± 3,003	0,801 ± 0,150	<LOD
B6 Bohatýr 04	<LOD	4,034 ± 0,807	0,767 ± 0,053	<LOD
B6 Bohatýr 04	<LOD	4,106 ± 0,707	0,353 ± 0,005	<LOD
B6 Bohatýr 04	<LOD	<LOD	0,539 ± 0,100	<LOD
B6 Bohatýr NS	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
B6 Bohatýr NS	<LOD	<LOD	0,150 ± 0,015	<LOD
B6 Bohatýr NS	<LOD	<LOD	0,147 ± 0,027	<LOD

Samples	IP	IPR	IP9G	IPR5MP
B6 Bohatýr 83	41,559 ± 9,656	543,368 ± 59,356	4,724 ± 0,678	2137,452 ± 234,761
B6 Bohatýr 83	96,380 ± 13,630	466,561 ± 28,290	4,439 ± 0,685	1374,095 ± 37,463
B6 Bohatýr 83	64,420 ± 2,168	333,009 ± 24,707	6,464 ± 0,187	1392,898 ± 58,999
B6 Bohatýr 04	21,375 ± 0,028	301,929 ± 35,007	3,477 ± 0,864	2185,081 ± 279,561
B6 Bohatýr 04	17,664 ± 0,237	203,997 ± 11,994	3,399 ± 0,819	1963,398 ± 163,511
B6 Bohatýr 04	22,396 ± 0,701	136,556 ± 17,917	2,867 ± 0,187	2097,423 ± 245,957
B6 Bohatýr NS	4,200 ± 0,586	40,033 ± 5,792	<LOD	640,713 ± 62,381
B6 Bohatýr NS	2,356 ± 0,386	17,942 ± 2,794	<LOD	279,810 ± 28,163
B6 Bohatýr NS	3,226 ± 0,567	24,569 ± 4,498	<LOD	370,480 ± 52,216

Samples	BAP	BAPR	BAP9G	BAPR5MP
B6 Bohatýr 83	41006,007 ± 1201,334	3548,478 ± 276,967	26972,939 ± 593,023	5600,195 ± 788,066
B6 Bohatýr 83	88444,405 ± 8603,727	9722,259 ± 1146,873	37918,666 ± 1580,947	17043,493 ± 515,728
B6 Bohatýr 83	60368,566 ± 652,293	4665,463 ± 330,993	43629,628 ± 2729,803	7161,065 ± 434,779
B6 Bohatýr 04	51926,086 ± 230,908	4936,920 ± 602,076	44126,113 ± 3168,506	30276,955 ± 4367,143
B6 Bohatýr 04	22426,642 ± 1657,993	2600,821 ± 382,528	21203,132 ± 323,805	17524,135 ± 1382,087
B6 Bohatýr 04	53536,550 ± 4124,898	5968,533 ± 679,799	39333,198 ± 3477,447	41438,772 ± 4430,296
B6 Bohatýr NS	8385,846 ± 488,877	842,354 ± 71,618	9335,377 ± 363,000	4369,940 ± 32,468
B6 Bohatýr NS	12936,146 ± 494,298	1131,763 ± 146,744	9563,573 ± 326,843	6329,385 ± 441,155
B6 Bohatýr NS	7953,643 ± 272,602	931,164 ± 140,605	8541,554 ± 241,277	4933,959 ± 128,655

Tab. 2 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v kulturách hrachu setého [pmol/g FW]

Odrůdka 1										
Monoica: BAP	IZ	IZOG	IZR	IZROG	IZ9G	IZRS'MP				
	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD				
Monoica: BAP9THP			0,029 ± 0,003	0,206 ± 0,042		0,079 ± 0,010				
KC Dora: BAP	0,679 ± 0,012	0,998 ± 0,102	0,414 ± 0,062	1,514 ± 0,023		0,373 ± 0,079				
KC Dora: BAP9THP	<LOD	1,687 ± 0,161	0,206 ± 0,016	2,304 ± 0,085		2,073 ± 0,642				
						1,223 ± 0,288				
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	CZ	CZOG	CZR	CZROG	CZ9G	CZRS'MP				
	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD				
Monoica: BAP9THP										
KC Dora: BAP	<LOD	<LOD	0,412 ± 0,098	1,300 ± 0,174						
KC Dora: BAP9THP	<LOD	<LOD	0,283 ± 0,054			1,548 ± 0,691				
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	DHZ	DHZOG	DHZR	DHZROG	DHZ9G	DHZRS'MP				
	0,083 ± 0,008	0,050 ± 0,015	0,123 ± 0,032	4,131 ± 1,582		0,055 ± 0,013				
Monoica: BAP9THP	0,082 ± 0,012	0,423 ± 0,154	0,154 ± 0,032	18,840 ± 8,935		0,150 ± 0,068				
KC Dora: BAP	0,127 ± 0,020	2,193 ± 0,100	0,423 ± 0,036	22,295 ± 1,047		0,204 ± 0,013				
KC Dora: BAP9THP	0,070 ± 0,007	2,119 ± 0,473	0,478 ± 0,219	33,720 ± 2,475		0,341 ± 0,055				
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	mT	mTOG	mTR	mTROG	mT9G	mTRS'MP				
	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD				
Monoica: BAP9THP	3,622 ± 3,032	1,529 ± 0,044								
KC Dora: BAP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD				
KC Dora: BAP9THP	51,793 ± 12,609	18,950 ± 4,965	3,251 ± 0,117							
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	oT	oTOG	oTR	oTROG	oT9G	oTRS'MP				
	16,428 ± 3,830	<LOD	<LOD	<LOD	0,356 ± 0,022	<LOD				
Monoica: BAP9THP	20,812 ± 1,741	2,143 ± 0,554	<LOD	<LOD	0,677 ± 0,131	<LOD				
KC Dora: BAP	15,216 ± 5,182	1,718 ± 0,385	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD				
KC Dora: BAP9THP	549,790 ± 133,389	93,604 ± 27,191	<LOD	<LOD	22,234 ± 10,893	<LOD				
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	pT	pTOG	pTR	pTROG	pT9G	pTRS'MP				
	0,664 ± 0,188	2,895 ± 1,068	0,349 ± 0,023	4,773 ± 2,282	0,867 ± 0,065	<LOD				
Monoica: BAP9THP	0,606 ± 0,092	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD				
KC Dora: BAP	<LOD	<LOD	<LOD	1,121 ± 0,151	<LOD	<LOD				
KC Dora: BAP9THP	14,580 ± 1,412	10,741 ± 1,297	0,528 ± 0,167	3,272 ± 0,773	3,133 ± 0,277	<LOD				
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	K	KR	K9G	KRS'MP						
	0,428 ± 0,138	<LOD	<LOD	<LOD						
Monoica: BAP9THP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD						
KC Dora: BAP	1,279 ± 1,037	<LOD	<LOD	<LOD						
KC Dora: BAP9THP	0,092	<LOD	<LOD	<LOD						
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	iP	iPR	iP9G	iPRS'MP						
	<LOD	<LOD	<LOD	1,814 ± 0,192						
Monoica: BAP9THP	<LOD	<LOD	<LOD	2,083 ± 0,298						
KC Dora: BAP	<LOD	0,969 ± 0,701	<LOD	3,570 ± 0,510						
KC Dora: BAP9THP	<LOD	8,089 ± 1,924	<LOD	58,881 ± 4,138						
Odrůdka 1										
Monoica: BAP	BAP	BAPR	BAP9G	BAPRS'MP						
	6617,774 ± 1171,711	54,906 ± 7,085	2,614 ± 0,511	306,204 ± 48,158						
Monoica: BAP9THP	7688,070 ± 1472,731	5,572 ± 0,454	0,087 ± 0,023	40,695 ± 6,778						
KC Dora: BAP	1379,677 ± 1,966	24,835 ± 6,768	2,280 ± 0,312	147,418 ± 44,008						
KC Dora: BAP9THP	16854,057 ± 4840,168	146,128 ± 54,199	0,618 ± 0,129	1526,732 ± 213,118						

Tab. 3 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v explantátech konopí setého [pmol/g FW]

Samples	tZ	tzOG	tzR	tzROG	tz9G	tzR5'MP
Vzorek 1 - SN	<LOD	<LOD	<LOD	12,26 ± 1,73	<LOD	<LOD
Vzorek 2 - SR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Samples	cZ	cZOG	cZR	cZROG	cZ9G	cZR5'MP
Vzorek 1 - SN	0,62 ± 0,20	21,37 ± 1,07	4,63 ± 0,36	286,71 ± 22,21	<LOD	<LOD
Vzorek 2 - SR	0,82 ± 0,20	126,86 ± 11,08	14,87 ± 1,00	222,94 ± 15,59	0,52 ± 0,07	<LOD
Samples	DHZ	DHZOG	DHZR	DHZROG	DHZ9G	DHZR5'MP
Vzorek 1 - SN	<LOD	<LOD	0,36 ± 0,08	26,60 ± 6,49	<LOD	<LOD
Vzorek 2 - SR	<LOD	<LOD	0,47 ± 0,03	6,55 ± 0,78	<LOD	<LOD
Samples	mT	mTOG	mTR	mTROG	mT9G	mTR5'MP
Vzorek 1 - SN	23498,97 ± 357,02	23168,54 ± 1342,78	3567,73 ± 164,93	81355,66 ± 7303,64	3604,29 ± 280,60	6481,85 ± 766,87
Vzorek 2 - SR	821,82 ± 52,62	11071,43 ± 438,87	179,02 ± 4,03	6178,43 ± 235,84	626,54 ± 52,40	161,71 ± 34,89
Samples	oT	oTOG	oTR	oTROG	oT9G	oTR5'MP
Vzorek 1 - SN	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Vzorek 2 - SR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Samples	pT	pTOG	pTR	pTROG	pTR5'MP	
Vzorek 1 - SN	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
Vzorek 2 - SR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
Samples	K	KR	K9G	KR5'MP		
Vzorek 1 - SN	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD		
Vzorek 2 - SR	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD		
Samples	IP	IPR	IP9G	IPR5'MP		
Vzorek 1 - SN	3,63 ± 0,45	<LOD	<LOD	<LOD		
Vzorek 2 - SR	3,00 ± 0,20	3,19 ± 0,68	<LOD	<LOD		
Samples	BAP	BAPR	BAP9G	BAPR5'MP		
Vzorek 1 - SN	49,20 ± 4,73	<LOD	3,61 ± 0,42	<LOD		
Vzorek 2 - SR	66,48 ± 8,59	<LOD	<LOD	<LOD		

Tab. 4 Hladiny cytokininů a jejich metabolitů v kulturách knotovky bílé [pmol/g FW]

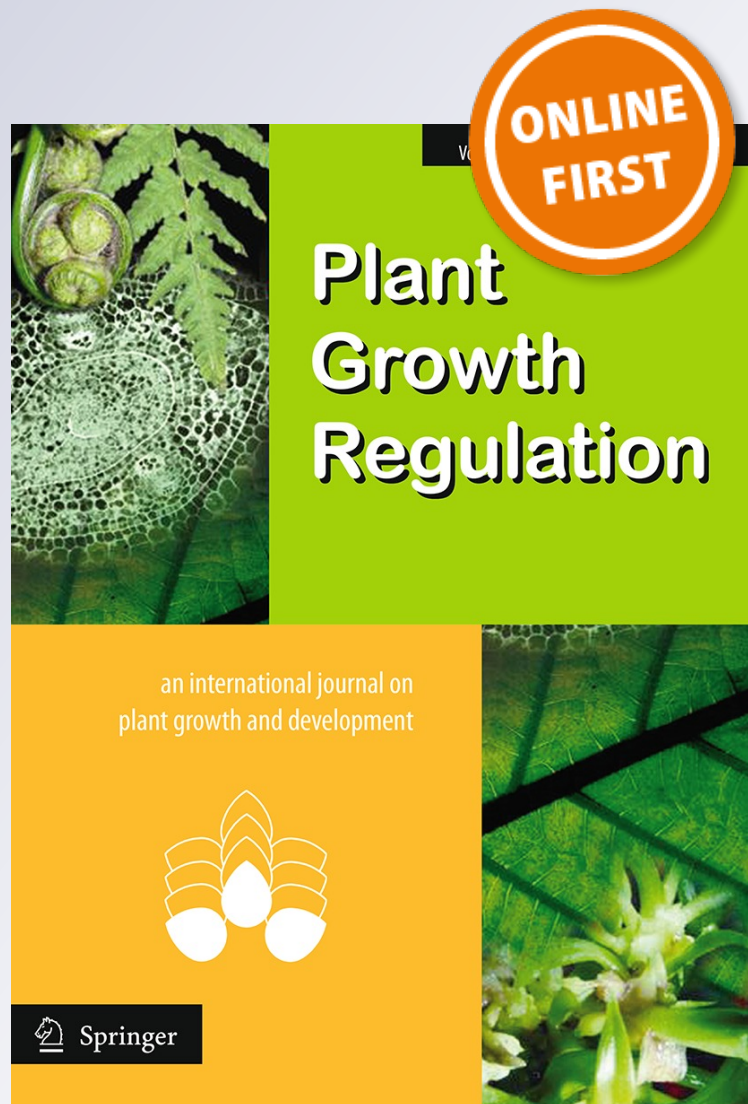
Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (Pisum sativum L.) shoot cultures

Lenka Plačková, Jakub Hrdlička, Iva Smýkalová, Magdalena Cvečková, Ondřej Novák, Miroslav Griga & Karel Doležal

Plant Growth Regulation
An International Journal on Plant
Growth and Development

ISSN 0167-6903

Plant Growth Regul
DOI 10.1007/s10725-015-0044-z



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media Dordrecht. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures

Lenka Plačková · Jakub Hrdlička · Iva Smýkalová ·
Magdalena Cvečková · Ondřej Novák ·
Miroslav Griga · Karel Doležal

Received: 7 August 2014 / Accepted: 16 February 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Forty-seven endogenous cytokinin metabolites were determined in samples of long-term in vitro multiple shoot cultures of pea (*Pisum sativum* L.). Significant differences were found in the levels of all cytokinin groups except *cis*-zeatin and some of its derivatives. Old cultures (30 or 10 years old) contained larger total and active cytokinin pools than freshly prepared cultures. Long-term shoot cultures maintained on cytokinin-supplemented media initially exhibit gradually increasing concentrations of endogenous cytokinins that subsequently stabilise at a high level, which can make it more difficult to induce rooting later on. This is consistent with previous findings concerning the growth and development of plantlets derived from long-term cultures and the generally accepted role of cytokinins during root development. The results presented herein demonstrate the utility of long-term pea cultures as model systems for studying the influence of long-term cultivation on genetic stability, and suggest ways of circumventing the rooting problems associated with such cultures.

Keywords Cytokinins · Pea · Quantification · UHPLC–MS/MS · Long-term culture in vitro

Abbreviations

BAP	6-Benzylaminopurine
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
DHZ	Dihydrozeatin
*9G	9-β-D-Glucopyranosyl derivative
*5'MP	5'-Monophosphate derivative
*OG	O-β-D-Glucopyranosyl derivative
tZ	<i>trans</i> -Zeatin
UHPLC–ESI(+)-MS/MS	Ultra high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry

Introduction

Cytokinins are named for their ability to stimulate cell division (Skoog and Armstrong 1970), which makes them indispensable in plant tissue culture (Aremu et al. 2012). They play various important roles in plant development, including the regulation of root development. The spatial and temporal maintenance of optimal cellular concentrations of active cytokinin is essential for growth regulation, and is achieved by a combination of biosynthesis, activation and catabolism. However, the precise roles of individual cytokinins remain to be determined (Del Bianco et al. 2013). A down-regulation of the cytokinin response is required for the specification of new stem cell niches during embryo and lateral root development (Del Bianco et al. 2013). In the case of root development, once the root meristem has been established it must grow to its final size,

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10725-015-0044-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Plačková · J. Hrdlička · O. Novák · K. Doležal (✉)
Laboratory of Growth Regulators & Department of Chemical Biology and Genetics, Faculty of Science, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany ASCR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic
e-mail: karel.dolezal@upol.cz

I. Smýkalová · M. Cvečková · M. Griga
Plant Biotechnology Department, AGRITEC Plant Research Ltd., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk, Czech Republic

stop growing, and then maintain its final size. This sequence is vital for the plant's future fitness, although the details of the process differ between species adapted to different environments (Del Bianco et al. 2013). It was recently shown that after seed germination, root meristem growth is controlled by increases in the rate of cell differentiation relative to cell division, and that cytokinin signalling is central in this process (Moubayidin et al. 2010). The growth-regulating functions of cytokinins, which include control of rooting (both in vitro and ex-vitro) as well as the inhibition of senescence, are also important during in vitro multiplication (Aremu et al. 2012).

Cytokinins may be conjugated reversibly or irreversibly with sugars and amino acids in plant tissues. The unconjugated free bases are the most active members of the cytokinin family; conjugation is one way by which their activity is regulated. Different cytokinin conjugates serve as storage, transport and/or deactivated forms (Bajguz and Piotrowska 2009).

6-Benzylaminopurine (BAP) is an important and inexpensive cytokinin that is widely used in micropropagation because of its growth-stimulating properties. However, BAP is also known to have negative effects on growth, rooting and acclimatization in some plant species (Werbrouck et al. 1995).

The multiple shoot in vitro cultures are frequently used for purposes including pathogen resistance screening and genetic transformation (Švábová and Lebeda 2005; Lebeda and Švábová 2010; Švábová et al. 2005, 2011; Švábová and Griga 2008). Therefore, their long term genetic stability is very important. Cytokinin treatment of Multiple shoot culture of dry-seed pea cv. Bohatýr is known to stimulate the proliferation of isolated shoot apical meristems and axillary cotyledon meristems. Primary scale cultures of this species were established in our laboratories for clonal propagation purposes in 1983 (Griga et al. 1984, 1986; Griga and Stejskal 1994) and have been maintained ever since. These in vitro cultures, which have been continuously maintained on BAP-supplemented media, represent an excellent model for studying the effects of long-term culture on genetic (in)stability, or somaclonal variation. A previous investigation used several molecular techniques to assess the genetic stability of this long term in vitro culture (Smýkal et al. 2007). No major changes in the culture's primary genomic DNA structure or the extent of DNA methylation were detected, but AFLP analysis revealed subtle genomic DNA mutations and rearrangements. No clear evidence of de novo transpositions beyond individual sample variation were observed for any of the three tested retrotransposons. These results suggest that long term cultivation of multiple shoot pea cultures can be regarded as a true-to-type method of multiplying the original genotype (Smýkal et al. 2007). In addition, the pea cultures exhibited

no decrease in multiple-shoot forming capacity and only very subtle morphological alterations (Griga and Stejskal 1994). However, shoots isolated from the long-term culture were more difficult to root than shoots isolated from a freshly established culture (Griga and Stejskal 1994; Smýkal et al. 2007). In addition, rooted plantlets from the long-term culture were less vital ex vitro than plantlets from freshly established cultures and sometimes exhibited developmental abnormalities such as parthenocarpy (Smýkal et al. 2007). There have also been a few publications describing long-term (i.e. at least 10 years old) shoot cultures of other plant species, including *Vanilla planifolia* (Sreedhar et al. 2007), *Chrysanthemum morifolium* (Jevremović et al. 2006, 2012), *Musa acuminata* (Lakshmanan et al. 2007). These cultures are all maintained on media supplemented with cytokinins (usually BAP) and auxins (typically NAA; IAA, IBA) to induce and maintain shoot proliferation capacity (George and Ravishankar 1997; Jevremović et al. 2006). Another interesting case is a long-term oil palm culture (Rival et al. 2003; Inpuay et al. 2012), which is maintained using an unusual regeneration scheme based on repetitive somatic embryogenesis in callus/suspension cultures in the presence of synthetic auxins (2,4-D; dicamba). Our culture is maintained under very different conditions to those described above, and is therefore unique. In addition, most studies on long-term culture have focused on the genetic (in)stability of their progeny, which has been evaluated using molecular markers (Ngezahayo and Liu 2014), and morphological characters, as was done in a previous study on pea cultures from our group (Smýkal et al. 2007; Fletcher 1994). There are no reported studies on the phytohormonal status of long-term shoot cultures or the influence of sustained multi-year exposure to exogenous cytokinins on the internal phytohormone balance of explants/clumps of shoots and their rooting ability. The aim of our study was therefore to measure endogenous levels of all cytokinin metabolites in long-term in vitro shoot cultures of pea, compare them to data for fresh cultures, and relate any identified differences to morphological, physiological and developmental changes/abnormalities previously observed in the pea culture established in 1983. The results presented below provide new insights into our long-term pea shoot culture and complement previous studies on its morphological, molecular-genetic, and physiological/biochemical (specifically, phytohormonal) features.

Materials and methods

Plant material

The model plant material was dry pea seeds of the cultivar *Pisum sativum* L. var *sativum*, cv. Bohatýr. This cultivar,

which was developed by selection from the cross (Kralický Unikum × Pyram) × Dik Trom, was made available for cultivation in the former Czechoslovakia in 1980 and subsequently distributed globally due to its extreme growth plasticity and intermediate growth habit, which make it very suitable for machine harvesting (<http://selgen.cz/luskoviny/hrach-sety/bohatyr/>).

Cultures were established from shoot apical meristems and axillary meristems of cotyledons and primary scales of germinated seedlings (Griga et al. 1984, 1986) in 1983 on media consisting of Murashige and Skoog (1962) salts with B5 vitamins (Gamborg et al. 1968), 20 µM BAP, and 0.1 µM NAA (16 h photoperiod, temperature 20 ± 2 °C). The induced multiple shoot culture (Griga et al. 1984, 1986) was continually maintained in the medium described above. A minimum of forty 100 ml Erlenmeyer flasks of culture were subcultured every 4 weeks (Griga et al. 1984, 1986; Griga and Novák 1990). To date, this continuous culture, which is referred to as Bohatýr 83, has undergone a minimum of 370 subculture cycles. In 2004, a new culture was established for use in a genetic stability study (Smýkal et al. 2007), and continues to be maintained; this culture is designated Bohatýr 04. Finally, in 2014, a fresh culture was prepared for comparative analysis in this work; this culture is referred to as Bohatýr NS, where 'NS' stands for nodal segments. Fifteen individual shoots from three independent culture systems were sampled for each of the three cultures.

Cytokinin analyses

Harvested-micropropagated shoots (five for each biological replicate) were washed, dried with filter paper and immediately frozen in liquid nitrogen. Prepared biological triplicates were, after homogenization in liquid nitrogen, further divided into three technical replicates (each containing around 35 mg of FW plant material) and subsequently extracted and purified using a minor modification of our previously reported method (Novák et al. 2008). Prepared samples were extracted in 1 ml modified Bielecki buffer (60 % MeOH, 10 % HCOOH and 30 % H₂O) (Bielecki 1964) containing a cocktail of 23 deuterium-labelled CK internal standards at 1 pmol per sample (2 pmol for monophosphates and *O*-β-D-glucopyranosyl derivatives) to assess the recovery of each analyte during purification and to validate the determination (Novák et al. 2008). The samples were purified using a combination of C18 (100 mg/1 ml) and MCX cartridges (30 mg/1 ml) and immunoaffinity chromatography (IAC) based on wide-range specific monoclonal antibodies against cytokinins (Faiss et al. 1997). The eluates from the IAC columns were evaporated to dryness and dissolved in 20 µl of the mobile phase used for quantitative analysis. The samples were

analyzed using an ultra-high performance liquid chromatograph (Acquity UPLCTM; Waters) coupled to a XevoTM TQ MSTM (Waters) triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electro-spray interface (ESI). Thereafter, the purified samples were injected onto a C18 reversed-phase column (Waters Acquity UPLC BEH C18; 1.7 µm; 2.1 × 50 mm). Elution was performed using a methanolic gradient consisting of 100 % methanol (A) and 15 mM formic acid (B) adjusted to pH 4.0 with ammonium. With a flow rate of 0.5 ml/min and column temperature of 40 °C, the following conditions were applied: a linear gradient from 10 to 50 % solvent A in 5 min and 100 % solvent A for 1 min. The column was re-equilibrated at 10 % solvent A for 2 min. Endogenous CK quantification was achieved by multiple reaction monitoring (MRM) of [M + H]⁺ and the appropriate product ion (Novák et al. 2008). For selective MRM experiments, optimal conditions (dwell time, cone voltage, and collision energy in the collision cell) corresponding to exact diagnostic transition were optimized for each CK (Novák et al. 2008). Quantification was performed with Masslynx software using a standard isotope dilution method. The ratio of endogenous CK to appropriate labelled standard was determined and subsequently used to quantify the level of endogenous CKs, based on the known concentrations of the added internal standards (Novák et al. 2008). Significant differences between measured values were identified using Student's *t* test with a significance threshold of *p* < 0.05.

Results

Forty-seven cytokinin metabolites were determined in samples of multiple shoot in vitro pea (*P. sativum* L.) cultures of different age (Fig. 1) by UHPLC–ESI(+)-MS/MS. The levels of 44 cytokinin species were found to be above the detection limit of the UHPLC–MS/MS quantification method used (Novák et al. 2008) and were therefore quantified in the three pea shoot in vitro cultures. Cultures of different age exhibited significantly different levels of BAP and all its sugar conjugates. Specifically, the concentrations of these compounds in the oldest culture were several times greater than those in the fresh culture (Fig. 2, Supplementary material). The same was true for the levels of endogenous isoprenoid cytokinins other than *cis*-zeatin and some of its metabolites (Fig. 3, Supplementary material). Interestingly, in the fresh cultures, the levels of *cis*-zeatin (cZ) and its derivatives were much higher than those of the corresponding *trans*-zeatin derivatives, which is consistent with previous reports on other plant species (Gajdošová et al. 2011). In addition, the extent of cZ *O*-glucosylation depended on the age of the culture (Supplementary material). For example, levels of

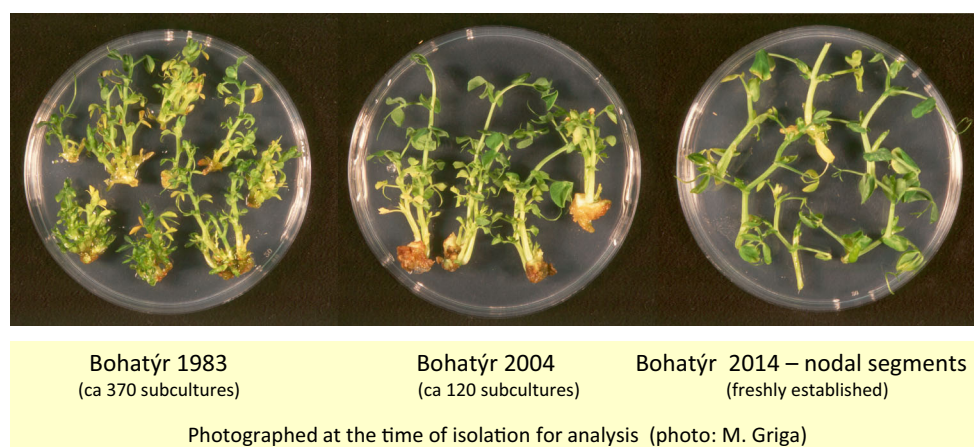


Fig. 1 Multiple shoot in vitro pea (*Pisum sativum* L.) cultures of different ages, photographed at the time of isolation for analysis

cis-zeatin-*O*-glucoside (cZOG) in the oldest culture were around 10 times greater than those in freshly derived explants (Supplementary material).

The most pronounced differences between the cultures related to their levels of cytokinin nucleotides: the 1983 culture contained 195 pmol/g and 149 pmol/g of tZR5'MP and DHZR5'MP, respectively, while the levels of these metabolites in the fresh culture were two orders of magnitude lower (Supplementary material). However, the levels of BAPR5'MP levels in the oldest culture and newest cultures did not differ significantly (Fig. 4). Moreover, the total levels of isoprenoid nucleotides in all of the cultures were much higher than those of the corresponding aromatic nucleotides even though the only exogenous cytokinins present in the media were aromatic (Fig. 4).

Discussion

In principle, clonal in vitro propagation of plants should generate identical copies of the selected genotype. However, stresses experienced during cloning and cultivation could cause a breakdown of control mechanisms leading to genomic instability (Smýkal et al. 2007). Pea shoot cultures that have been maintained in vitro on a continuous basis for extended periods of time provide an excellent opportunity for studying the effects of long-term culture on various aspects of somaclonal variation (Griga et al. 1984, 1986). The high BAP level in the culture media stimulates serial proliferation of pre-existing axillary meristems but also triggers *de novo* initiation of adventitious ones (Griga et al. 1986; Griga and Novák 1990). This, together with the presence of a dedifferentiated callus phase, may reduce the cultures' genetic stability and increase the likelihood of mutations.

BAP is known to have such a negative effects on the growth of certain plant species; among other things, it can

be detrimental to rooting, which is often problematic when working with plant tissue cultures (Aremu et al. 2012). In addition, several authors have reported that also long term in vitro pea cultures can give rise to morphologically deviant regenerants (Gostimskii et al. 1995; Ezhova et al. 1995). The incidence of these deviations is reportedly dependent on the composition of the media and its contents of growth regulators (Kumar and Mathur 2004). Our experimental model behaved somewhat similarly: the growth and development of rooted shoots and complete plantlets derived from our long-term in vitro shoot pea cultures was limited. Specifically, regenerants often exhibited early senescence in vitro or ex vitro and died after several weeks without flowering or seed set (Smýkal et al. 2007). It was suggested that this behaviour is linked to problems with root formation as previously observed in pea shoot explants, and that the likelihood of such problems depends on the age of the culture and the BAP concentration in the cultivation media (Kubaláková et al. 1988). In micro-propagated plants, there is a positive correlation between inadequate rooting and reduced ability to successfully acclimatize, as shown for *Spathiphyllum* by Werbrouck et al. (1996). The reduced rooting capacity of the regenerants from the long-term cultures may be partly due to the formation and accumulation of BAP-*N*-glucosides, which are biologically inactive and chemically stable BAP metabolites (Werbrouck et al. 1995). Extremely high levels of these metabolites were detected, especially in the basal portions of the plantlets, which may have reduced their rooting and acclimatization competence (Werbrouck et al. 1995; Bairu et al. 2011). It was assumed that when plants are cultured in the presence of exogenous BAP, most of the BAP that is taken up will be detoxified and inactivated by irreversible *N*-glucosylation. This may cause problems later on, when the plantlets need CK signalling to achieve various physiological functions because the extensive

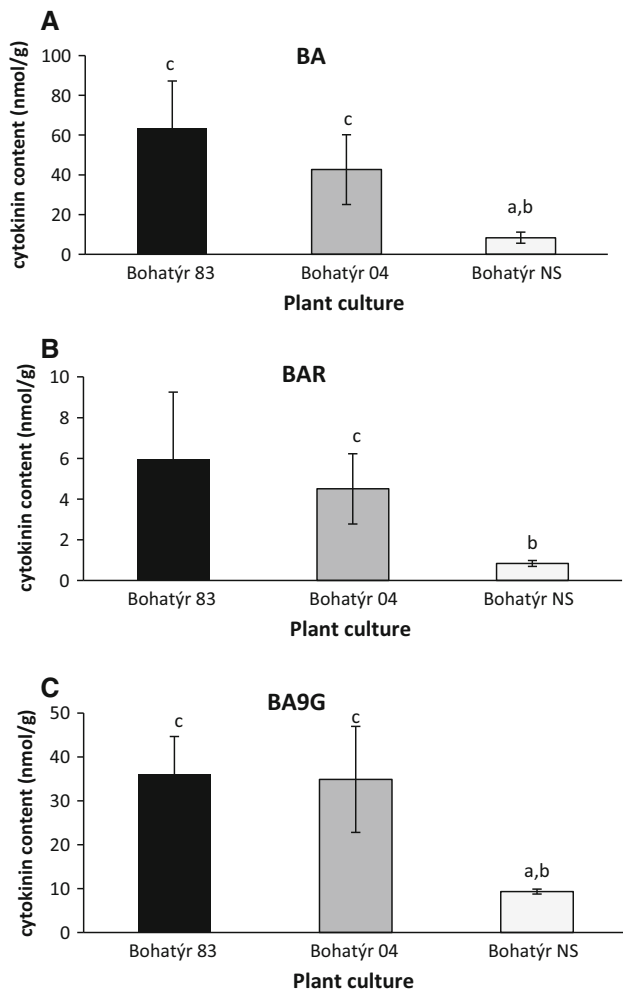


Fig. 2 Cytokinin levels in samples from multiple shoot in vitro pea (*Pisum sativum* L.) cultures of different ages determined by UHPLC–ESI(+)-MS/MS. **a** 6-Benzylaminopurine, **b** 6-benzylamino-9- β -D-ribofuranosylpurine, **c** 6-benzylamino-9- β -D-glucopyranosylpurine. Harvested-micropropagated shoots (five in each case) were washed, dried with filter paper and immediately frozen in liquid nitrogen. The prepared biological triplicates were further divided into three technical replicates and subsequently extracted, purified by C18/SCX column chromatography followed by batch immunoextraction, and measured by tandem mass spectrometry. Mean values (\pm SDs) from triplicate measurements of three biological replicates are shown. Letters above the bars indicate: a significantly different from Bohatyr 83; b significantly different from Bohatyr 04; c significantly different from Bohatyr NS (Student's *t* test, *p* value <0.05)

N-glucosylation will consume the plant's stored O-glycosylated cytokinins that would otherwise provide a source of active free base CKs and CK ribosides to support normal growth and development. This hypothesis is supported by results observed in *Harpagophytum* by Bairu et al. (2011), and was discussed at length by Aremu et al. (2012). Increased levels of N-glucosides were also observed in our cultures, and were presumably connected to the plantlets' reduced rooting capacity. It has also been reported (Bairu

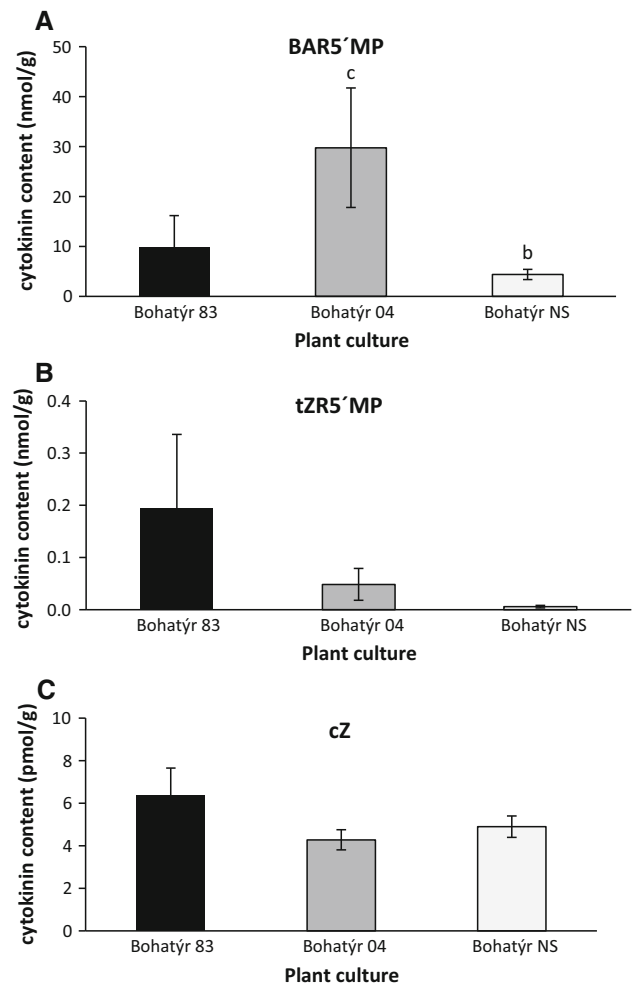


Fig. 3 Cytokinin levels in samples of multiple shoot in vitro pea (*Pisum sativum* L.) cultures of different ages determined by UHPLC–ESI(+)-MS/MS. **a** 6-Benzylaminopurine nucleotide, **b** *trans*-zeatin nucleotide, **c** *cis*-zeatin. Harvested-micropropagated shoots (five in each case) were washed, dried with filter paper and immediately frozen in liquid nitrogen. The prepared biological triplicates were further divided into three technical replicates and then extracted, purified by SCX column chromatography followed by batch immunoextraction, and characterized by tandem mass spectrometry. Mean values (\pm SDs) from triplicate measurements of three biological replicates are shown. Letters above the bars indicate: a significantly different from Bohatyr 83; b significantly different from Bohatyr 04; c significantly different from Bohatyr NS (Student's *t* test, *p* value <0.05)

et al. 2011) that adding IAA promotes the formation of 9-glucosides and increases the size of the overall CK pool in BAP-treated cultures. Since auxins generally reduce the size of the CK pool by suppressing isopentenyladenosine-5'-monophosphate-independent biosynthetic pathways (Nordström et al. 2004), the observed increases in the levels of BAP9G and the size of the total cytokinin pool in IAA-treated cultures is probably attributable to poor root development and other developmental disorders (Bairu

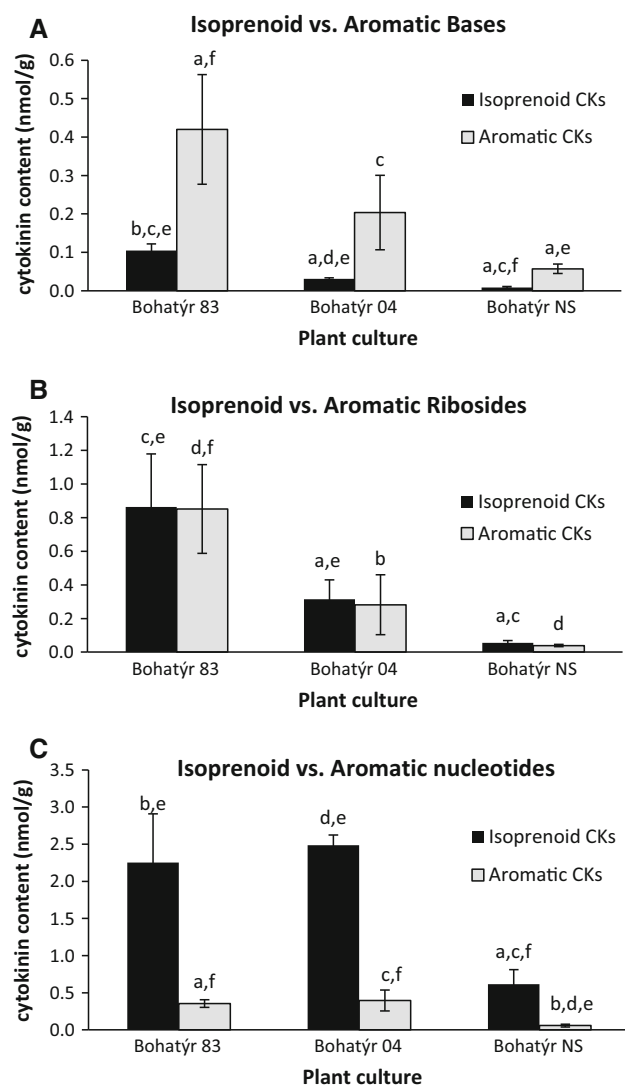


Fig. 4 Cytokinin nucleotide levels in samples of multiple shoot in vitro pea (*Pisum sativum* L.) cultures of different ages determined by UHPLC–ESI(+)-MS/MS. **a** Isoprenoid versus aromatic bases, **b** isoprenoid versus aromatic ribosides, **c** isoprenoid versus aromatic nucleotides. Harvested-micropropagated shoots (five in each case) were washed, dried with filter paper and immediately frozen in liquid nitrogen. The prepared biological triplicates were further divided into three technical replicates and then extracted, purified by C18/SCX column chromatography followed by batch immunoextraction, and characterized by tandem mass spectrometry. Mean values (\pm SDs) from triplicate measurements of three biological replicates are shown. Letters above the bars indicate: *a* significantly different from Bohatýr 83 isoprenoid cytokinins; *b* significantly different from Bohatýr 83 aromatic cytokinins; *c* significantly different from Bohatýr 04 isoprenoid cytokinins; *d* significantly different from Bohatýr 04 aromatic cytokinins; *e* significantly different from Bohatýr NS isoprenoid cytokinins; *f* significantly different from Bohatýr NS aromatic cytokinins (Student's *t* test, *p* value <0.05)

et al. 2011). These contrasting effects of IAA treatment also highlight the complexity of the auxin–cytokinin interaction, although the profound influence of

auxin:cytokinin ratios on organogenesis has been recognized for some time (Skoog and Miller 1957).

Our results confirm the previously reported findings discussed above and clearly show that the accumulation of exogenous cytokinins from the culture media (and their metabolites) is much more pronounced in older in vitro pea shoot cultures than in their fresh counterparts. These results also explain previous findings (Griga and Stejskal 1994; Smýkal et al. 2007) concerning the poor growth and development of rooted shoots and complete plantlets from long-term cultures, as well as their early senescence when grown in vitro or ex vitro, which was previously attributed to altered cytokinin metabolism (Aremu et al. 2012).

Similar changes in abundance were observed for endogenous isoprenoid cytokinins. The only cytokinins of this class that were abundant in freshly derived explants were *cis*-zeatin (*cZ*) and its metabolites, whose levels remained constant during long-term in vitro cultivation of these pea shoot cultures. *cZ* is usually considered to be one of the less active CKs. However, several reports have shown that it and/or its derivatives are highly abundant in algae, mosses, and various seed plants (Gajdošová et al. 2011). It was therefore suggested that *cZ*-type CKs may be delicate regulators of CK responses in plants under growth-limiting conditions. In our opinion, this hypothesis merits further investigation.

One possible way of eliminating the adverse effects of in vitro micropropagation in BAP-rich media would be to replace BAP with a synthetic analogue having similar activity such as a topinin, a 9-tetrahydropyranlypurine or an 6-anilinopurine derivative (Strnad 1997; Doležal et al. 2006, 2007; Szüčová et al. 2009; Zatloukal et al. 2008). Comparative studies on the regulatory effects of BAP and such analogues during organogenesis showed the latter to have different impact on endogenous cytokinin levels (Bairu et al. 2011; Aremu et al. 2014) and better multiplication, rooting, and ex-vitro acclimatization of explants (Bairu et al. 2011; Malá et al. 2013). Moreover, some of these BAP derivatives were shown to have much less severe detrimental effects than BAP on somaclonal variation of ‘Williams’ banana in vitro regenerants (Aremu et al. 2013). Replacing BAP in culture media with such analogues could thus be an effective way of improving the fitness of long-term in vitro shoot cultures.

Conclusions

Cytokinin profiling of long-term in vitro pea (*P. sativum* L.) shoot cultures maintained on media containing 20 μ M BAP and 0.1 μ M NAA revealed that the levels of endogenous cytokinins generally within the cultures initially increased gradually but subsequently stabilized. Long-term

cultures exhibited elevated concentrations of both aromatic and isoprenoid cytokinins (with the exception of *cis*-zeatin and some of its metabolites) relative to fresh explants. These data may partly explain the finding that rooted shoots and plantlets derived from such long-term cultures exhibit limited rooting ability and poor growth performance.

Acknowledgments This work was supported by the Ministry of Education Youth and Sports, Czech Republic (Grant LO1204 from the National Program of Sustainability), by IGA of Palacký University (IGA_PrF_2014006) and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic project No. RO 1014. The authors would like to thank to Dave Richardson and Sees-editing Ltd. for careful reading and editing of this manuscript.

References

- Aremu AO, Plačková L, Bairu MV, Novák O, Szüčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J (2012) Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tissue Organ Cult* 108:1–16
- Aremu AO, Bairu MV, Szüčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J (2013) Genetic fidelity in tissue-cultured ‘Williams’ bananas—the effect of high concentration of topolins and benzyladenine. *Sci Hortic* 161:324–327
- Aremu AO, Bairu MV, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J (2014) Endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured and acclimatized ‘Williams’ bananas subjected to different aromatic cytokinin treatments. *Plant Sci* 214:88–98
- Bairu MW, Novák O, Doležal K, Van Staden J (2011) Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regul* 63:105–114
- Bajguz A, Piotrowska A (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* 70:957–969
- Bieleski RL (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal Biochem* 9:431–442
- Del Bianco M, Giustini L, Sabatini S (2013) Spatiotemporal changes in the role of cytokinin during root development. *New Phytol* 199:324–338
- Doležal K, Popa I, Kryštof V, Spíchal L, Fojtíková M, Holub J, Lenobel R, Schmülling T, Strnad M (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg Med Chem* 14:875–884
- Doležal K, Popa I, Hauserová E, Spíchal L, Chakrabarty K, Novák O, Kryštof V, Voller J, Holub J, Strnad M (2007) Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorg Med Chem* 15:3737–3747
- Ezhova TA, Bagrova AM, Gostimskii SA (1995) Cell selection as a possible reason for the specificity of somaclonal variation in pea. *Plant Breed* 114:520–524
- Faiss M, Zalubilová J, Strnad M, Schmülling T (1997) Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J* 12:401–415
- Fletcher PJ (1994) In vitro long-term storage of asparagus. *N Z J Crop Hort Sci* 22:351–359
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinova A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, Vaňková R, Strnad M, Motyka V (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot* 62:2827–2840
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- George PS, Ravishankar GA (1997) In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Rep* 16:490–494
- Gostimskii SA, Bagrova AM, Ezhova TA (1995) Discovery and cytogenetic analysis of the variability in plants regenerated from tissue-culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Dokl Akad Nauk SSSR* 283:1007–1011
- Griga M, Novák FJ (1990) Pea (*Pisum sativum* L.). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, legumes and oil seed crops*, vol 10. Springer, Berlin, pp 65–99
- Griga M, Stejskal J (1994) Micropropagation of pea (*Pisum sativum* L.)—in vitro system and its practical applications. In: Lumsden PJ, Nicholas JR, Davies WJ (eds) *Physiology, growth and development of plants in culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 278–283
- Griga M, Tejklková E, Novák FJ (1984) Hormonal regulation of growth of pea (*Pisum sativum* L.) shoot apices in in vitro culture. *Rost Vým* 30:523–530 (in Czech)
- Griga M, Tejklková E, Novák FJ, Kubaláková M (1986) In vitro clonal propagation of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 6:95–104
- Inpuay K, Arthipatjaporn A, Te-chato S (2012) Assessment of genetic instability of regenerated plantlets from long-term culture of oil palm through SSE formation by SSR marker. *Int J Agric Technol* 8:585–595
- Jevremović S, Trifunović M, Nikolić M, Subotić A, Radojević L (2006) Clonal fidelity of *Chrysanthemum* regenerated from long term cultures. *Genetika* 38:243–249
- Jevremović S, Subotić D, Mijlković D, Trifunović M, Petrić M, Cingel A (2012) Clonal fidelity of *Chrysanthemum* cultivars after long term micropropagation by stem segment culture. *Acta Hort (ISHS)* 961:211–216
- Kubaláková M, Tejklková E, Griga M (1988) Some factors affecting root formation on in vitro regenerated pea shoots. *Biol Plant* 30:179–184
- Kumar PS, Mathur VL (2004) Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 78:267–271
- Lakshmanan V, Venkataramareddy SR, Neelwarne B (2007) Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electr J Biotechnol* 10:106–113
- Lebeda A, Švábová L (2010) In vitro screening methods for assessing of plant disease resistance. Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases. IAEA, Vienna, pp 5–45
- Malá J, Máchová P, Cvrčková H, Karady M, Novák O, Mikulík J, Dostál J, Strnad M, Doležal K (2013) The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. *Biol Plant* 57(1):174–178
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S (2010) The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* 20:1138–1143
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:472–497
- Ngezahayo F, Liu B (2014) Axillary bud proliferation approach for plant biodiversity conservation and restoration. *Intern J Biodivers*. doi:10.1155/2014/727025
- Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Åstot C, Doležal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *PNAS* 101:8039–8044

- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Doležal K, Strnad M (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69:2214–2224
- Rival A, Tregear J, Jaligot E, Morcillo F, Aberlenc F, Billotte N, Richaud F, Beulé T, Borgel A, Duval Y (2003) Biotechnology of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). In: Jaiwal Pawan K, Singh Rana P (eds) Plant genetic engineering. Improvement of commercial plants–II. Sci Tech Publishing, Houston, pp 261–318
- Skoog F, Armstrong DJ (1970) Cytokinins. *Ann. Rev Plant Physiol* 21:359–384
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11:118–131
- Smýkal P, Valledor L, Rodríguez R, Griga M (2007) Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep* 26:1985–1998
- Sreedhar RV, Venkatachalam L, Bhagyalakshmi N (2007) Genetic fidelity of long-term micropropagated shoot cultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) as assessed by molecular markers. *Biotechnol J* 2:1–7
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plantarum* 101:674–688
- Švábová L, Griga M (2008) The effect of cocultivation treatments on transformation efficiency in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 95:293–304
- Švábová L, Lebeda A (2005) In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *J Phytopathol* 153:52–64
- Švábová L, Smýkal P, Griga M, Ondřej V (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pisum sativum* in vitro and in vivo. *Biol Plant* 49:361–370
- Švábová L, Lebeda A, Kitner M, Sedlářová M, Petřivalský M, Dostálová R, Ondřej M, Horáček J, Smýkalová I, Griga M (2011) Comparison of the effects of *Fusarium solani* filtrates in vitro and in vivo on morphological characteristics and peroxidase activity in pea cultivars with different susceptibility. *J Plant Pathol* 93:19–30
- Szüčová L, Spíchal L, Doležal K, Zatloukal M, Greplová J, Galuszka P, Kryštof V, Voller J, Popa I, Massino FJ, Jørgensen J-E, Strnad M (2009) Synthesis, characterization and biological activity of ring-substituted 6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl and 9-tetrahydrofuran-2-ylpurine derivatives. *Bioorg Med Chem* 17:1938–1947
- Werbrouck S, Van der Jeugt B, Dewitte W, Prinsen E, Van Onckelen H, Debergh P (1995) The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* ‘Schott Petite’ in relation to acclimatisation problems. *Plant Cell Rep* 14:662–665
- Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen HA, Debergh PC (1996) Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol Plant* 98:291–297
- Zatloukal M, Gemrotová M, Doležal K, Havlíček L, Spíchal L, Strnad M (2008) Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorg Med Chem*. 16:9268–9275