



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Izolace cytokininů s využitím paralelní extrakce
pomocí umělých kapalných membrán**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Anna Krnáčová
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivan Petřík
Konzultant:	doc. Mgr. Ondřej Novák, Ph.D
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a Příjmení:	Anna Krnáčová
Název práce:	Izolace fytohormonů s využitím paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Ivan Petřík
Rok obhajoby:	2021
Abstrakt:	<p>Fytohormony jsou nízkomolekulární látky, které se přirozeně vyskytují v rostlinných pletivech, kde regulují růst, vývoj a odpověď rostlin na vnější prostředí. Endogenní koncentrace fytohormonů jsou zpravidla velmi nízké. Pro jejich stanovení je proto klíčové nejprve rostlinný vzorek náležitě připravit a pak je důležité použít velmi citlivé instrumentální analytické metody. Relativně komplexní příprava vzorku obvykle zahrnuje krok extrakce a purifikace. Před několika lety byla představena nová extrakční a purifikační metoda Paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME). Tato inovativní a miniaturizovaná metoda byla původně vyvinuta za účelem extrakce farmakologicky významných analytů a v analýze fytohormonů doposud nenašla uplatnění. Experimentální část této bakalářské práce je proto zaměřena na aplikaci a optimalizaci metody PALME pro extrakci a purifikaci metabolitů ze skupiny cytokininů. Teoretická část je věnována biologickému významu cytokininů a metodám vhodným pro analýzu jejich koncentračních hladin.</p>
Klíčová slova:	Cytokiny, biosyntéza a metabolismus, metody izolace a analýzy fytohormonů, huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>), paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME)
Počet stran:	62
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Anna Krnáčová
Title of thesis:	Isolation of phytohormones using parallel artificial liquid membrane extraction
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Ivan Petřík
The year of presentation:	2021
Abstract:	<p>Phytohormones are low molecular mass compounds naturally occurring in plant tissues. They act as regulators of growth, development, and response of plants to environmental stimuli. Endogenous concentrations of phytohormones are usually very low. Therefore, appropriate methods for sample preparation and instrumental analysis are crucial to quantify their concentration levels. Relatively complex sample preparation procedures usually consist of extraction and purification steps. Several years ago, a new extraction and purification method so-called Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME) was introduced as an innovative and miniaturized method for the analysis of drug-related compounds. However, this purification approach has not yet been employed in phytohormone analysis. Therefore, the experimental part of this bachelor thesis is aimed at the optimization and application of PALME method for the extraction and purification of cytokinin metabolites. The theoretical introduction focuses on the biological importance of cytokinins and methods for their analysis.</p>
Key words:	Cytokinins, biosynthesis and metabolism, methods of isolation and analysis of phytohormones, <i>Arabidopsis thaliana</i> ; Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME),
Number of pages:	62
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Izolace fytohormonů s využitím paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán“ vypracovala pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně za použití uvedené literatury.

V Olomouci dne:

.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Ivanu Petříkovi za odborné vedení práce, za podporu a velkou trpělivost při jejím vytváření. Děkuji doc. Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za cenné rady při konzultování této práce. Mé poděkování také patří i ostatním zaměstnancům pracoviště LLR, za pomoc při praktické části a poskytnutí potřebného materiálu.

Obsah

Seznam zkratk.....	8
Cíle práce.....	11
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1.1. Rostlinné hormony (fytormony).....	12
1.2. Cytokininy.....	12
1.2.1. Biosyntéza a metabolismus cytokininů.....	14
1.2.2. Biosyntéza.....	14
1.2.3. Metabolismus.....	17
1.2.4. Modifikace adeninu.....	17
1.2.5. Modifikace postranního řetězce.....	18
1.2.6. Degradace.....	19
1.2.7. Percepce signálu CK.....	20
1.3. Metody extrakce a purifikace cytokininů.....	21
1.3.1. Extrakce a purifikace.....	21
1.3.2. Extrakce tuhou fází (SPE).....	22
1.3.3. Imunoafinitní chromatografie (IAC).....	23
1.3.4. Extrakce kapalina – kapalina (LLE).....	24
1.3.5. Paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME).....	25
1.4. Metody analýzy fytormonů.....	26
1.4.1. Imunochemické metody.....	26
1.4.2. Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní tandemovou spektrometrií (LC-MS/MS)	27
1.4.5. Hmotnostní spektrometrie.....	28
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
2.1. Materiál.....	30
2.2. Přístrojová technika.....	30
2.3. Chemikálie.....	30
2.3.1. Neznačené CK standardy.....	31
2.3.2. Izotopicky značené CK standardy.....	31
2.4. Roztoky.....	32
2.4.1. Stanovení metabolického profilu CK v semenáčcích <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.4.2. Optimalizace složení kapalných membrán - výběr organické tekuté fáze.....	32
2.4.3. Optimalizace složení kapalných membrán - výběr polymerního nosiče.....	32
2.4.4. Optimalizace složení kapalných membrán prostřednictvím LLE.....	33
2.4.5. Optimalizace akceptorového rozpouštědla.....	33
2.4.6. Stabilita CK v kyselém prostředí.....	33
2.4.7. Analýza pomocí UHPLC-MS/MS.....	33

2.5. Pracovní postup	33
2.5.1. Stanovení metabolického profilu CK v semenáčcích <i>A. thaliana</i>	33
2.5.2. Purifikace vzorku pomocí SPE s využitím multimodálního sorbentu Oasis® MCX (Waters)	34
2.5.3. Příprava donorového roztoku pro optimalizaci metody PALME	34
2.5.4. Optimalizace složení kapalné membrány - výběr organické tekuté fáze	34
2.5.5. Optimalizace složení kapalné membrány - výběr polymerního nosiče	35
2.5.6. Optimalizace složení kapalné membrány prostřednictvím LLE	35
2.5.7. Stabilita CK v kyselém prostředí	35
2.5.8. Analýza CK pomocí UHPLC-MS/MS a zpracování dat	36
2.6. Výsledky a diskuze	37
2.6.1. Stanovení metabolického profilu CK v semenáčcích <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.6.2. Optimalizace složení kapalné membrány - výběr organické tekuté fáze	38
2.6.3. Optimalizace složení kapalné membrány - výběr polymerního nosiče	41
2.6.4. Optimalizace složení kapalné membrány prostřednictvím LLE	42
2.6.5. Optimalizace složení akceptorového rozpouštědla	43
2.6.6. Stabilita CK v kyselém prostředí	44
3. Závěr	46
Zdroje	48

Seznam zkratk

7G	cytokininové N7-glukosidy
9G	cytokininové N9-glukosidy
ABA	kyselina abscisová
AHK	<i>Arabidopsis</i> histidin kinasa
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidin fosfotransferový protein
APCI	ionizace atmosférického tlaku
B	cytokininové báze
BAP	N6-benzylaminopurin
CE	kapilární elektroforéza
CI	chemická ionizace
CK	cytokininy
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
CRE1	„cytokinin response element“
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
DDA	dodecylacetát
DEDTCA	diethyldithiokarbamát
DHE	dihexylether
DHEP	bis(2-ethylhexyl) fosforečná kyselina
DHZ	dihydrozeatin
DLLME	disperzní mikroextrakce kapalina – kapalina
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
ELISA	enzymová imunoanalýza
ESI	ionizace elektrospřejem
EtAc	ethylacetát
ER	endoplazmatické retikulum
FA	„formic acid“ kyselina mravenčí
FAB	„fast atom bombardment“ ; bombardování urychlenými atomy
FAD	flavinadeninukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FT- ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GFP	„green fluorescent protein“
HF-LPME	mikroextrakce kapalinou fází využívající duté vlákno

HF-LLLME	„Hollow fiber liquid liquid liquid extraction“
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HXL	hexanol
CHASE	senzorická extracelulární doména spojená s cyklásou / His kinásou
IAA	indol-3-octová kyselina
IAC	imunoafinitní chromatografie
iP	N6-isopentenyladenin
iPR	N6-isopentenyladenin ribosid
iPRM /D/TP	N6-isopentenylaminopurin ribosid mono/di/trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IS	interní standard
K	N6-furfurylaminopurin
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina-kapalina
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce
MAX	smíšená iontově výměnná chromatografie na anexu
MCX	smíšená iontově výměnná chromatografie na katexu
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mT	<i>meta</i> -topolin
mTR	<i>meta</i> -topolin ribosid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NT	cytokininové nukleotidy
NON	nonanon
OCL	oktanol
OCN	oktanon
OG	cytokininové O-glukosidy
oT	<i>ortho</i> -topolin
oTR	<i>ortho</i> -topolin ribosi
PALME	paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán
PBS	sodnofosfátový pufr
PM	plasmatická membrána
PP	polypropylen
pT	<i>para</i> -topolin

PVDF	polyvinylidenfluorid
Q	Kvadrupólový hmotnostní analyzátor
QIT	analyzátor kvadrupólové iontové pasti
QToF	Kvadrupólový hmotnostní analyzátor doby letu
R	cytokininové ribosidy
RIA	radioimunoanalýza
SAX	iontově výměnná chromatografie na silném anexu
SCX	iontově výměnná chromatografie na silném katexu
SLM	kapalná membrána („supported liquid membrane“)
SPE	extrakce tuhou fází („solid phase extraction“)
TCS	dvousložková signální dráha
TSI	ionizace termosprejem
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZRMP	<i>trans</i> -zeatin-ribosid-5'-monofosfát
tZRDP	<i>trans</i> -zeatin-ribosid-5'-difosfát
tZRTP	<i>trans</i> -zeatin-ribosid-5'-trifosfát
TOF	analyzátor doby letu
UDP	uridindifosfát
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
WAX	iontově výměnná chromatografie na slabém anexu
WCX	iontově výměnná chromatografie na slabém katexu

Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je:

- Seznámit se s problematikou cytokininů a možností jejich extrakce a purifikace před UHPLC-MS/MS analýzou
- Osvojit si rutinní extrakční a purifikační metody cytokininů prováděných v Laboratoři růstových regulátorů
- Optimalizovat hlavní parametry PALME, které mají vliv na výtěžek vybraných analytů.
- Aplikovat PALME jako novou metodu izolace cytokininů před UHPLC-MS/MS analýzou.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Rostlinné hormony (fytohormony)

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou nízkomolekulární látky, které působí ve velmi nízkých koncentracích (10^{-10} – 10^{-15} mol/l). Tyto látky hrají zásadní roli v regulaci a vývoji rostlin. Podílejí se na komunikaci mezi jednotlivými buňkami a na obraně před biotickým a abiotickým stresem (Bari & Jones, 2009).

Na rozdíl od živočišných hormonů, rostlinné hormony nejsou produkovány specializovanými žlázami, ale jsou tvořeny v buňkách ve většině částí rostliny (Srivastava & Latit, 2002). Co do efektů, tak rostlinné hormony jsou ve srovnání s těmi živočišnými univerzálnější a jejich výsledný účinek se odvíjí od lokální koncentrace (Davies, 2010).

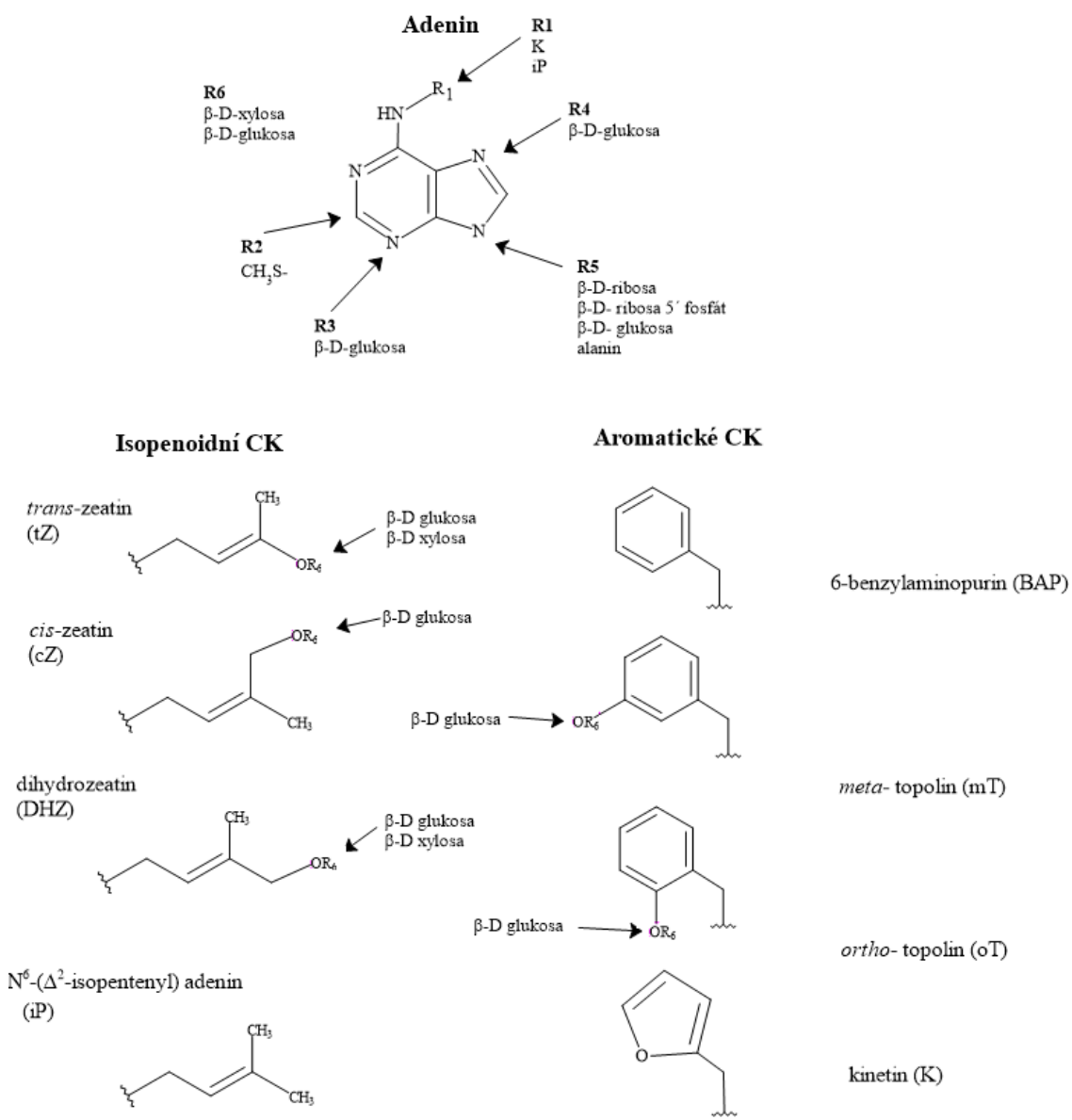
V současnosti je známo několik fytohormonálních skupin a látek, které jsou svými vlastnostmi rostlinným hormonům příbuzné. Patří mezi ně auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová, ethylen, strigolaktony, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová (SA), signální peptidy a polyaminy (Davis, 2004). Samotné hormony regulují většinou vývojové procesy společně s dalšími hormony a jejich účinky mohou být jak antagonistické, tak synergické (Gray, 2004).

1.2. Cytokininy

Cytokininy (CK) patří mezi jednu z nejdůležitějších a nejlépe prostudovaných skupin rostlinných hormonů a v rostlinách se nacházejí zpravidla ve velmi nízkých koncentracích (10^{-10} – 10^{-15} mol/g čerstvé hmoty) (Tarkowski *et al*, 2004). Z chemického hlediska se jedná o deriváty adeninu, které jsou v pozici N⁶ substituované buďto isoprenoidním nebo aromatickým řetězcem. Jejich předním fyziologickým účinkem je stimulace buněčného dělení, indukce klíčení semen, tvorba pupenů *de novo*, regulace apikální dominance, rozvoj listů a oddálení senescence (Mok & Mok, 2001). Rostlinné hormony také ale zprostředkovávají odpověď na vnější podmínky, jako je množství světla nebo dostupnost vody a živin v půdě (Werner & Schmülling, 2009).

CK zpravidla vývojové a regulační procesy neřídí samostatně, ale v komplexní spolupráci s jinými fytohormony. Prvním objeveným CK byl v 50. letech kinetin (K; N⁶-furfurylaminopurin), jenž byl vyizolován Millerem a Skoogem z autoklávované DNA spermií sledě (Miller & Skoog, 1955). Stejní autoři později prokázali, že různé koncentrace kinetinu v kombinaci s auxinem (kyselinou indol-3-ylactovou, IAA) ovlivňují morfogenezi kořene a prýtu tkáňové kultury tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Skoog & Miller, 1957). Zatímco při vyšších koncentracích kinetinu v médiu byl stimulován růst prýtu, zvýšená koncentrace IAA podporovala růst kořene. Na tomto experimentu byl poprvé demonstrován proliferační účinek kinetinu, jakožto cytokininu, který však neměl přirozený rostlinný původ.

První přirozeně vyskytující se isoprenoidní CK byl objeven o několik let později Carlosem O. Millerem v semenech kukuřice (*Zea Mays*), podle které byl nazván zeatin (Miller, 1961).



Obrázek 1: Struktura CK adeninového typu. R1 je charakterizován jako determinující postranní řetězec, R2 až R6 označují typ CK konjugátů, které vznikly metabolickými přeměnami zobrazených v Obrázku 2. Místo připojení zbytku na N⁶ pozici adeninu je označeno vlnovkou. (Adaptováno dle: Spíchal 2012)

V případě aromatických CK byl jako první objeven N⁶-(2-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin (*ortho*-topolin ribosid, *oTR*) v listech topolu *Populus × robusta* (dnes *P. × canadensis*) (Horgan *et al*, 1973; Horgan *et al*; 1975.). Výzkum těchto látek pokročil teprve až v 90. letech, a to díky kombinaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s biotesty ELISA, která poskytla detekci aromatických CK v extraktech rostlinných pletiv. Nově objevené hydroxybenzyladeniny byly pojmenovány topoliny dle českého názvu „topol“, z kterého byly

vyizolovány poprvé (Strnad, 1997). Nejaktivnějším zástupcem této skupiny je *meta*-topolin (*mT*), který je stejně aktivní jako dosud nejaktivnější přirozeně se vyskytující isoprenoidní cytokinin zeatin (Holub *et al.*, 1998).

Bylo prokázáno, že topoliny zvyšují proliferaci prýtů, udržují histogenní stabilitu, zlepšují účinnost zakořenění a zmírňují různé fyziologické poruchy při mikropropagaci (Aremu *et al.*, 2012). N6-benzylaminopurin (BAP) je dlouhodobě používaným aromatických CK v mikropropagaci založené na tkáňové kultuře. Má však mnohé nevýhody jako je inhibice růstu postranních kořenů, heterogenita růstu, problematická aklimatizace rostlin ve skleníku a nekróza vrcholu prýtu (Vylíčilová, 2020). Ukázalo se, že použití aromatického *mT* je při mikropropagaci výhodnější oproti BAP, protože dochází ke snižování některých výše jmenovaných nepříznivých účinků (Aremu *et al.*, 2012, Souza *et al.*, 2019). Přestože jsou *ortho*-topolin (*oT*) a *para*-topolin (*pT*) považovány za aromatické CK s nízkou biologickou aktivitou (Strnad, 1997), stále více se prokazuje, že by mohly být zapojeny do různých buněčných a biochemických procesů, např. indukce buněčné diferenciaci a apoptózy u savců (Wang *et al.*, 2019).

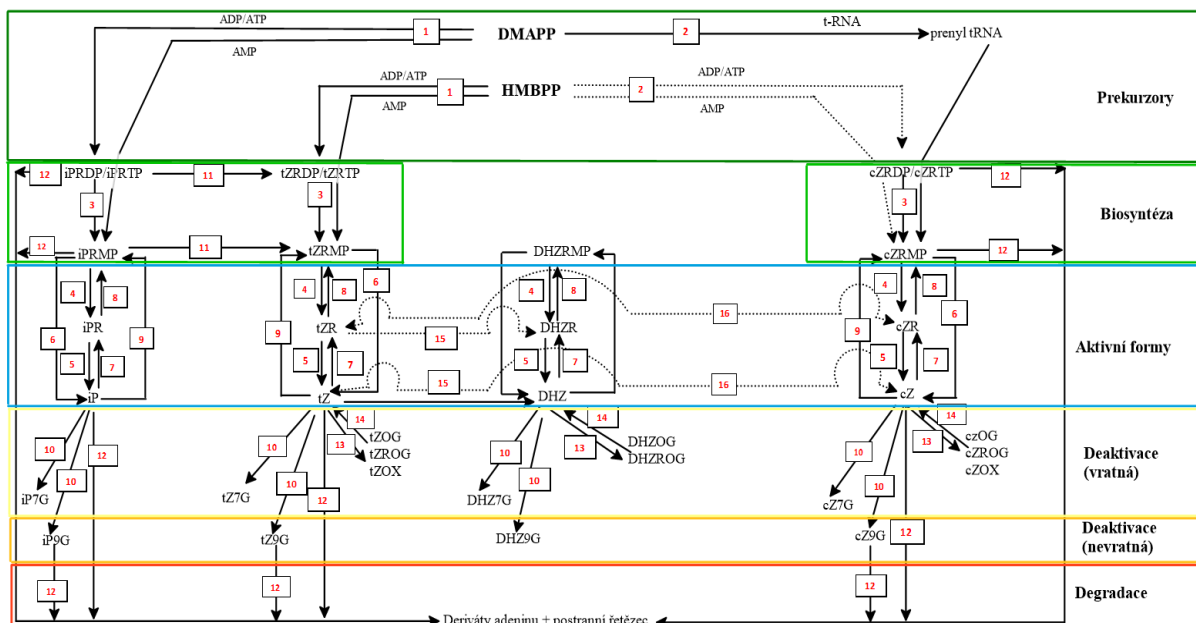
1.2.1. Biosyntéza a metabolismus cytokininů

Biologicky aktivní cytokininy se v rostlinách nacházejí ve formě volných bází. Aby byla zajištěná homeostáza a bioaktivní cytokininy byly udržovány na stálých fyziologických koncentračních hladinách, jsou rostlinné organismy vybaveny enzymatickou mašinerií zodpovědnou za cytokininový metabolismus a biosyntézu (Zürcher & Müller, 2016).

1.2.2. Biosyntéza

Předpokládá se, že pro isoprenoidní CK jsou dosud známy dvě dráhy biosyntézy. Jedna z nich je založena na isopentenylaci adeninových nukleotidů (přímá cesta), ta druhá na degradaci transferové ribonukleové kyseliny (tRNA) (nepřímá cesta) (Kamínek, 1992).

Prvním krokem přímé cesty biosyntézy je připojení isopentenylové skupiny dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP) na adenosinmonofosfát (AMP), difosfát (ADP) nebo trifosfát (ATP) (Zürcher & Müller, 2016). Reakci katalyzuje enzym adenosinfosfát-isopentenyltransferasa (IPT). Jeho aktivita byla poprvé popsána u hlenky *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978); později bylo ve vyšší rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) identifikováno celkem 9 izoform *AtIPT*, přičemž 7 z nich je zapojeno do přímé biosyntézy CK *de novo*, zbylé dva jsou součástí nepřímé biosyntézy skrze degradaci tRNA (Kakimoto, 2001). Výchozím substrátem pro tvorbu isopentenyladenosin-5'-monofosfátu (iPRMP), difosfátu (iPRDP) a trifosfátu (iPRTP) je DMAPP a příslušné nukleotidy AMP, ADP, resp. ATP. Rostlinné IPT ale přednostně využívají ADP a ATP za vzniku iPRDP a iPRTP, přičemž konverze na iPRMP je zprostředkována fosfatasami (Kakimoto, 2001). Podobným způsobem vznikají *trans*-zeatin-ribosid-5'-monofosfát (*tZRMP*), difosfát (*tZRDP*) a trifosfát (*tZRTP*), jejichž biosyntéza je založena na připojení isopentenylové skupiny HMBDP s příslušným nukleotidem (Sakakibara, 2006).



Obrázek 2: Schéma biosyntézy, metabolismu a degradace CK v rostlinách. Enzymy zapojené do biosyntézy, metabolismu a degradace CK jsou označeny červeně. Přerušované čáry, představují cesty, které nebyly dosud prokázány.

- (1) adenylát-isopentenyltransferasa; (2) tRNA specifická isopentenyltransferasa; (3) fosfatasa; (4) 5'-ribonukleotid fosfohydrolasa; (5) adenosin nukleosidasa; (6) CK fosforibohydrolasa „Lonely guy“; (7) purin nukleosid fosforylaza; (8) adenosin kinasa; (9) adeninfosforibosyltransferasa; (10) N-glukosyltransferasa; (11) cytochrom P450 mono-oxygenasa; (12) cytokinin dehydrogenasa; (13) zeatin-*O*-glukosyltransferasa, buď specifická pro *trans*-zeatin nebo specifická pro *cis*-zeatin, s využitím xylosy místo glukosy; (14) b-glukosidasa; (15) zeatin reduktasa; (16) zeatin izomerasa.

DMAPP: dimethylallylpyrofosfát; HMBPP: 4-hydroxy-3-methyl-2- (E) -butenyldifosfát;

iPRDP: *N*⁶-isopentenyladenosin-50-difosfát; iPRTP: *N*⁶-isopentenyladenosin-50-trifosfát;

iPRMP, *N*⁶-isopentenyladenosin-50-monofosfát; iPR: *N*⁶-isopentenyladenosin;

iP7G: *N*⁶-isopentenyladenosin-7-glukosid; iP9G: *N*⁶-isopentenyladenosin-9-glukosid a ekvivalenty pro tZ, DHZ a cZ; tZOG: *trans*-zeatin-*O*-glukosid; tZROG: *trans*-zeatin-*O*-glukosid ribosid a ekvivalenty pro DHZ a cZ; tZOX: *trans*-zeatin-*O*-xylosid; cZOX: *cis*-zeatin-*O*-xylosid. (Adaptováno dle: Spíchal 2012)

Vzniklé cytokininové nukleotidy iPRMP, iPRDP a iPRTP mohou být následně konvertovány pomocí cytochromu P450 monooxygenasou CYP735A na tZRMP, tZRDP, tZRTP (Takei *et al*, 2004b). Touto cestou především vzniká *trans* zeatin (tZ) a N-(3-methyl-2-buten-1-yl)-9H-purin-6-amine (isopentenyladenin, iP) (Sakakibara, 2006).

Nepřímá cesta spočívá v navázání DMAPP na tRNA pomocí enzymu tRNA isopentenyltransferázy (tRNA- IPT). Tento enzym byl objeven například u *Escherichia coli*,

Saccharomyces cerevisiae, *Lactobacillus acidophilus*, *Homo sapiens* a v *Zea mays* (Takei *et al*, 2001). U *A. thaliana* je tRNA IPT kódována pomocí genů *AtIPT2* a *AtIPT9* (Miyawaki *et al*, 2006).

Prostřednictvím tRNA IPT je zajištěn přenos isopentenylové skupiny z DMAPP k adeninu 37 (A37) na tRNA a vzniká tímto prenylovaná tRNA. Následně degradací tRNA dochází k uvolnění cytokininových nukleotidů a odstranění fosforibosylové skupiny pomocí enzymu „lonely guy“ LOG (Hrtyan *et al*, 2015). Prenylace tRNA je řízena enzymem tRNA- $\Delta 2$ -isopentenyltransferou (Taylor *et al*, 2003). Jedna z methylových skupin postranního řetězce může být dále modifikována hydroxylací za vzniku *cis*-isomeru zeatinu (Prinsen *et al*. 1997).

Od doby, kdy byl v hydrolyzátu rostlinné tRNA špenátu (*Spinacia oleracea*) objeven *cis*-zeatin (*cZ*), byla tRNA považována za zdroj *cZ* cytokininových typů (Vreman *et al*. 1978). Předpokládá se, že CK odvozené od tRNA mohou tvořit až 50 % volných CK v rostlinách (Taylor, 2003), ale *cZ* má oproti *tZ* nižší biologickou aktivitu (Gajdošová *et al*, 2011). Aktivita *cZ* v klasických biologických zkouškách byla nepatrná (Vreman *et al*, 1974) a tak se dlouho biologická role tohoto hormonu v rostlinách nebyla brána v potaz. V průběhu let se ale tento hormon stal jedním z předmětů bádání. Existuje mnoho příkladů o tom, že *cZ* cytokininové typy mohou změnit růst a vývoj rostlin. Kupříkladu rostliny bez *cZ* vykazují pozmeněné fenotypy, což naznačuje význam *cZ* v rostlinách (Hluska *et al*, 2021). Jedno z nedávných fytohormonálních profilování isoprenoidních CK v *A.thaliana* odhalilo, že při zamezení přísunu fosfátu rostlinám se koncentraci *tZ* snižuje, ale významně se zvyšuje množství *cZ* a *cis*-zeatin ribosidu (*cZR*). Transkriptomické studie také naznačují, že *cZ* modifikují expresi specifických genů a pozitivně regulují růst buněk a prodlužování kořenového vlášení (Silva-Navas *et al*, 2019).

Z degradované tRNA tedy vznikají *cZ* ribotidy postupnými přeměnami katalyzovanými 5'-ribonukleotid fosfohydrolasou. *cZ* ribosidy jsou přeměněny pomocí adenosin nukleosidasu na *cZ* (Kudo *et al*, 2010).

Výsledkem přímé i nepřímé cesty biosyntézy jsou tedy cytokininové nukleotidy, které jsou dále konvertovány na příslušné ribosidy a biologicky aktivní volné báze. Defosforylaci nukleotidů na nukleosidy katalyzuje 5'-ribonukleotid fosfohydrolasa. Adenosin nukleosidasa katalyzuje defosforylaci cytokininů na volné báze. Tento krok je klíčový v regulaci CK vzhledem k biologické aktivitě volných bází CK (Sakakibara, 2010). Dané reakce mohou probíhat i zpětné. Volné cytokininové báze mohou být přeměněny zpět na ribosidy prostřednictvím purin nukleosid fosforylasy; ribosidy na ribotidy pak pomocí adenosin kinasy (Sakakibara, 2010).

Biosyntéza a degradace aromatických cytokininů dosud stále není zcela objasněna, ale předpokládá se, že některé kroky biosyntézy jsou shodné s isoprenoidními CK, a že aromatický zbytek má původ ve fenolických sekundárních metabolitech (Strnad, 1997).

Vzhledem k tomu, že jsou topoly schopné syntetizovat aromatické CK, bylo v tomto ohledu provedeno několik studií, v kterých se zjišťovala zvláštnost IPT topolu. Byl učiněn závěr, že enzymy IPT nejsou odpovědné za biosyntézu aromatických CK, protože *A. thaliana* transformovaná topolovými IPT neobsahovala žádné aromatické CK (Jaworek *et al*, 2019).

Během jedné ze studií zabývající se syntézou isoprenoidních a aromatických cytokininů byly porovnávány dráhy isoprenoidních CKs (iP) a aromatických cytokininů. Bylo zjištěno, že ribo-, 2'-deoxyribo-, 5'-deoxyribo-deriváty iP, stejně jako ribosidy aromatických CK jsou schopné se u *A. thaliana* transformovat na aktivní CK a vykazují hormonální aktivitu, zatímco 5'-deoxyribo- a 2'-deoxyribo-deriváty aromatických CK jsou neaktivní. Ukázalo se tak ribo-, 2'-deoxyribo-, 5'-deoxyribo-deriváty iP a ribosidy aromatických CK mohou být prekurzory aktivních CK, alespoň v případě *A. thaliana*. Nicméně se ale zdá, že jediným způsobem biosyntézy aromatických CK je přímé štěpení 5'-monofosfátů na aktivní nukleové báze katalyzované enzymem LOG, zatímco biosyntéza iP může evidentně probíhat také hydrolýzou CK nukleosidů katalyzováno adenosin nukleosidasou. Při srovnání biosyntetické dráhy isoprenoidů (př. iP) a aromatických CK se došlo k tomu, že se dráhy liší a pro objasnění je nutné dalšího výzkumu (Oslovsky *et al*, 2020).

Na rozdíl od isoprenoidních cytokininů nejsou aromatické cytokininy náchylné k degradaci CKX, místo toho upřednostňují glukosylaci (Tarkowská *et al*, 2003). Pozdější studie však ukázaly, že CKX z kukuřice (*Zea mays*) (ZmCKX1) je schopna štěpit aromatické cytokininy, ačkoli velmi pomalu (Frébotová *et el*, 2004).

1.2.3. Metabolismus

K udržení fyziologických koncentračních hladin CK disponují rostlinné buňky kromě biosyntézy také metabolickou inaktivací volných CK bází. Podobně jako u biosyntézy byly v souvislosti s metabolismem CK popsány dvě dráhy této přeměny. První z nich modifikuje adeninovou část CK molekuly, při té druhé je přeměněn postranní řetězec. Oba typy modifikací vedou k dočasné nebo trvalé inaktivaci cytokininů (Sakakibara, 2006).

1.2.4. Modifikace adeninu

Na přeměně adeninového kruhu se podílí 5'-ribonukleotid fosfohydrolasa, adenosin nukleosidas, adenin fosforibosyltransferasa a adenosin kinasa (Mok & Mok 2001).

5'-ribonukleotid fosfohydrolasa katalyzuje defosforylaci nukleotidů na nukleosidy. Dosud byly objeveny její 2 aktivní formy: F-I (110 kD) and F-II (57 kD), přičemž obě jsou schopné katalyzovat přeměnu nukleotidů na nukleosidy. K tomu však potřebují dvojmocné ionty jako např. Mg²⁺

(Sakakibara, 2010). Adenosin nukleosida katalyzuje přeměnu cytokininových ribosidů na volné báze. Tento krok je klíčový v regulaci CK vzhledem k biologické aktivitě volných bází CK (Sakakibara, 2010).

Volné báze CK mohou být v rostlinách konvertovány na nukleotidy za katalýzy enzymem fosforibosyltransferasy (Chen *et al.*, 1982). Stejnou schopnost má i purin nukleosid fosforylasa, u které je ale reakce reverzibilní. Při reakcích je ale silně podporován vznik nukleosidů (Sakakibara, 2010). Nukleotidy cytokininů mohou být vytvořeny také z nukleosidů prostřednictvím adenosin kinasy (Mok & Mok 2001).

Do skupiny enzymů modifikujících adeninových kruh patří také CK specifická fosforibohydrolasa LOG, která neaktivní nukleotidy CK přímo převádí na volné báze (Kurakawa *et al.*, 2007). Prve byla aktivita LOG potvrzena v rýži (*Oryza sativa*). Později byla role těchto enzymů prokázána i u *A. thaliana* (Kuroha *et al.*, 2009).

Jednou z dalších metabolických přeměn adeninového kruhu cytokininů je glukosylace purinové báze, která může probíhat na pozicích *N3*, *N7* a *N9* (Sakakibara, 2006). *N*-glukosidy udržují homeostázy CK (Hoyerová & Hošek, 2020). *N7*- a *N9*- glukosidy byly dlouho považovány za nevratně inaktivované cytokininové metabolity (Letham & Palni, 1983). Ukázalo se však, že rekombinantní *AtCKX* proteiny projevily schopnost degradovat *N9*-glukosidy (Galuszka *et al.*, 2007, Zalabák *et al.*, 2016). *N3*-glukosidy podléhají štěpení enzymem β -glukosidasou (EC 3.2.1.21) zpět na volné cytokininové báze (Brzobohatý *et al.*, 1993). Glukosylace *N7* a *N9*- glukosidů je zajišťována enzymem glukotransferasou využívající uridin difosfát glukosu (UDP) nebo thymidin difosfát glukosu (TDP). *N*-glukosidy *iP*-typů slouží k rychlému a účinnému snížení aktivních CK v případě náhlého nadbytku nebo nadprodukce CK typu *iP*. *N*-glukosidy *iP*-typů se tak hromadí v rostlinných pletivech ve vysokých hladinách. Naproti tomu, *N*-glukosidy *tZ*-typů a *DHZ*-typů jsou hydrolyzovány na příslušné aktivní báze. Je ale důležité zmínit, že dosud u žádného *N*-glukosidu CK nebyla prokázána interakce s percepční signalizační dráhou CK (Hoyerová & Hošek, 2020). Ukazuje se, že CK *N*-glukokonjugáty se vyskytují všudypřítomně v cévnatých rostlinách. Jejich výskyt i podíl mezi *N7*- a *N9*-glukosidy je však velmi variabilní (Pokorná *et al.*, 2021).

1.2.5. Modifikace postranního řetězce

Dalším typem glykosylace je tzv. *O*-glukosylace, při které je glukosylován postranní řetězec za vzniku *O*- β -D-glukopyranosyl derivátů *tZ* nebo *cZ*. Dané metabolity jsou označovány jako *O*-glukosidy. *O*-glukosyltransferasy jsou specifické pro typy *tZ*, *DHZ* a *cZ* cytokininů (Sakakibara, 2010). *O*-glukosylovaný dihydrozeatin (*DHZ*) byl lokalizován ve vakuolách (Fusseder & Ziegler, 1988), a vzhledem k tomuto faktu se od té doby předpokládalo, že *O*-glukosylace produkuje neaktivní, ale za to stabilní formy CK, které je možno skladovat a posléze využívat (Mok & Mok, 2001). *O*-glukosylace je

proti *N*-glukosylaci reverzibilní (Sakakibara, 2006). Zpětně jsou *O*-glukosidy hydrolyzovány pomocí β -glukosidasy (Sakakibara, 2010).

Postranní řetězec modifikují 3 hlavní enzymy: zeatin isomerasa, zeatin reduktasa, zeatin isomerasa hydroxylasa. Zeatin isomerasa katalyzuje konverzi *cZ* na *tZ* za přítomnosti flavinadenindinukleotidu (FAD) nebo flavinmononukleotidu (FMN), světla a dithiothreitolu. Nevratnou konverzi *tZ* na DHZ umožňuje zeatin reduktasa, která jako kofaktor využívá nikotinamidadenindinukleotid (NADH).

1.2.6. Degradace

Nevratná inaktivace CK je katalyzována enzymem cytokinin oxidasou/dehydrogenasou (CKX) při které dochází k odštěpení N⁶ postranního řetězce (Schmülling *et al*, 2003). CKX pracuje ve dvou módech, buď jako oxidasa nebo dehydrogenasa. CKX jako oxidasa přijímá kyslík za vzniku peroxidu vodíku; CKX jako dehydrogenasa redukuje chinony. Při štěpení CKs je ale upřednostňována dehydrogenasa, neboť DHZ a aromatické CKs jsou vůči působení oxidasy rezistentní (Zürcher & Müller, 2016). Rovněž *O*-glukosylace chrání cytokininy před oxidativním štěpením (Sakakibara, 2010). CKX se uplatňuje u štěpení cytokininů s isoprenoidními nenasycenými řetězci jako *tZ*, *cZ*, iP. (Werner *et al.*, 2006).

Poprvé byly CKX objeveny v kukuřici (*Zea mays*) (Houba-Hérin, 1999); posléze v rýži, *A. thaliana*, pšenici, žitu (Frébort *et al*, 2011). Je známo, že *A. thaliana* obsahuje celkem 7 isoform CKX (AtCKX 1-7). Exprese AtCKX1 byla prokázána v cévních svazcích postranních kořenů, na vzrostném vrcholu byla detekována exprese AtCKX2 a v mladých pletivech pak AtCKX3. AtCKX4 byl exprimován trichomech, průduchách, palistech a kořenových čepičkách. Genová exprese AtCKX5 byla zjištěna v tyčinkách při vývoji pylu a AtCKX6 v gyneceu v různých fázích vývoje (Frébort *et al*, 2011).

Obecně je známo, že nadměrná exprese AtCKX vede ke zvýšenému růstu kořenů, včetně vyšší hustoty postranních kořenů (Chen *et al*, 2019). V předchozích studiích se ukázalo, že nadměrná exprese AtCKX1, 3 a 5 v transgenní rostlině *Arabidopsis* vedla k silnějším změnám než při nadměrné expresi AtCKX2, AtCKX4 a AtCKX6 (Werner *et al*, 2003).

1.2.7. Percepce signálu CK

Přenos cytokininového signálu u rostlin se uskutečňuje pomocí víceúrovňové dvousložkové (TCS – two-component regulatory system / two component signal transduction system) signální dráhy na základě analogie se signálními drahami u bakterií (To & Kieber, 2008). Prvním komponentem dvousložkové signální dráhy je senzorový protein histidinkinasa, která vnímá vnější environmentální stimul, druhým komponentem je pak regulátor odezvy, který zprostředkovává výstup a správnou změnu fyziologie (Maxwell & Kieber, 2010). Princip cytokininové percepce spočívá v postupném přenosu fosfátu cestou His → Asp → His → Asp. Jakmile se cytokinin naváže na extracelulární doménu receptoru CHASE, dochází k autofosforylaci histidinu jedné z intracelulárních domén receptoru a následně je tento fosfát intramolekulárně přenesen na aspartát druhé z intracelulárních domén (To & Kieber, 2008). Fosfát je přenesen do cytoplazmy a poté do buněčného jádra prostřednictvím nízkomolekulárního proteinu fosfotransmiteru (Punwani *et al*, 2010). Po vstupu tohoto proteinu dochází k fosforylaci jaderných proteinů s funkcí transkripčních faktorů ARR typu B (*Arabidopsis* regulátory odpovědi typu B) mající schopnost regulovat (typicky aktivovat) primární odpověď transkripce genů (Hradilová *et al*, 2007). Kromě ARRR typu B jsou známy také ARR typu A. Přechná nadměrná exprese některých ARR typu A způsobuje represi ostatních ARR typu B, což se projevuje negativní zpětnou vazbou řízení CK signální dráhy. Negativní regulace CK signalizace ARR typu A s největší pravděpodobností zahrnuje interakce závislé na fosforylaci (To *et al*. 2007). ARR typu C (ARR22 a ARR24) mají doménovou strukturu podobnou ARR typu A, ale jejich exprese není indukována cytokininy. Výzkum naznačuje, že ARR22 hraje pozitivní roli v toleranci vůči stresu zlepšením integrity buněčné membrány. Zvýšení exprese ARR22 moduluje geny reagující na abiotický stres, což může napomáhat toleranci vůči suchu a mrazu (Kang *et al*, 2013).

Funkčně se receptory řadí mezi histidinkinasy. Receptory se nacházejí v endoplazmatickém retikulu (ER) nebo i v plasmatické membráně (PM), kde tvoří dimery. Především se však receptory nacházejí v ER (Wulfetange *et al*, 2011).

První cytokininové receptory byly objeveny a poté popsány na modelové rostlině *A. thaliana* Jako první byl nalezen receptor CRE1 (Inoue *et al*. 2001), a AHK (*Arabidopsis* histidin kinasa) 2,3,4 (Suzuki, 2001). Bylo zjištěno, že CRE1 je identický s AHK4 stejně jako s WOL („Wooden Leg“), který se ukázal jako nezbytný pro růst kořene a při asymetrickém dělení cévních buněk (Mähönen, 2000). Vzhledem k tomu, že AHK 2 a 3 obsahují navázanou CHASE doménu (senzorická extracelulární doména spojená s cykloasparát / His kinasou), která je velmi podobná CHASE doméně vyžadované pro vazbu CK k AHK4, fungují také jako cytokininové receptory (Maxwell & Kieber, 2010). AHK3 hraje roli také v regulaci nástupu stárnutí (Kim *et al.*, 2006). Zatímco AHK 2 a 3 jsou exprimovány v několika orgánech, AHK4 jsou exprimovány hlavně v kořenech (Ueguchi *et al*, 2001). AHK2 se ve vysoké aktivitě exprimuje v žilnatině listů a květu; s relativně nízkou aktivitou se pak exprimuje v kořenech. Naproti tomu AHK3 se exprimuje jak v pletivech kořene, tak prýtu, včetně listů a květů (Higuchi *et al*,

2004). AHK2 byla lokalizována na membráně ER a v PM (Wulfetange *et al*, 2011). Stejně tak byla AHK3 objevena na membráně ER i na PM, v níž je umístění tohoto receptoru podporováno nadměrnou expresí fúzního proteinu AHK3-GFP (Kim *et al.*, 2006). AHK4 byla lokalizována v membráně ER a PM (Ceasar *et al*, 2011).

Ukázalo se, že percepce extracelulárních CK je nejvíce narušena u rostlin, které postrádaly AHK4 (Antoniadi *et al*, 2020). Později bylo prokázáno, že subcelulární distribuce AHK4 se liší u různých buněčných typů s aktivně dělícími se buňkami, které na PM obsahují AHK4 (Kubiasová *et al*, 2020). Postavení AHK4 je mezi receptory CK výjimečné. Je totiž vysoce specifický pro volné báze tZ a iP (Spíchal *et al*, 2004) a vykazuje aktivitu fosfatasy při absenci CK (Nam *et al*, 2012). Fosfatasová aktivita AHK4 způsobuje defosforylaci všech AHP (*Arabidopsis* histidin fosfotransferový protein) (Nam *et al*, 2012). AHK4 proto může v cévním svazku vnímat signály dlouhého dosahu se silnými účinky na celkovou stavbu rostlin. Naproti tomu většina AHK2 a AHK3 na vnitřních membránách vnímají širší škálu CK, včetně cZ, který slouží jako lokální autokrinní signál (Hluska *et al*, 2021).

1.3. Metody extrakce a purifikace cytokininů

CK se nacházejí v rostlinných pletivech jsou ve velmi nízkých koncentracích. Proto je nutné k jejich analýze použít velmi citlivé analytické metody jako např. plynová chromatografie spojená s hmotností spektrometrií (GC-MS) nebo ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotností detekcí (UHPLC-MS/MS). Vzhledem k tomu, že signál CKs bývá často překryt signálem vysoce abundantních látek přítomných v matricích, je potřeba CKs před samotnou analýzou nejprve izolovat. Analytická metoda by měla tedy být vhodnou kombinací efektivního přečištění s dostatečnou výtěžností analytu a vhodnou analytickou koncovkou, která má dostatečnou citlivost pro detekci sledované látky. Dnes se kombinované analytické metody (UHPLC-MS/MS, GC-MS) stávají čím dál citlivější a umožňují tak stanovit fytohormony nacházející se v nízkých koncentracích za spotřeby malých množství vzorků. Tímto způsobem lze studovat cytokininy nejen na úrovni celé rostliny či rostlinných orgánů, ale i na úrovni pletiv či buněk (Tarkowski *at al*, 2004).

1.3.1. Extrakce a purifikace

Extrakce je procesem, při kterém dochází k přesunu látek z matrice do extrakčního činidla. Je potřeba, aby v průběhu nedocházelo k degradaci látek (oxidativní, enzymatická, teplotní). (Tarkowski *at al*, 2004). Nejčastěji se k extrakci CK z rostlinných pletiv využívá methanol či vícesložková extrakční směs podle Bielekého (methanol-chloroform-kyselina mravenčí, voda; 12:5:1:2), která je schopna minimalizovat účinky degradačních enzymů (Bielecki, 1964). Chloroform však zvyšuje extrakci lipofilních molekul, jež mohou posléze ztížit následné čištění, a proto byl Bielsky pufr později

modifikován tak, aby obsahoval pouze methanol, kyselinu mravenčí a vodu (15:1:4) (Hoyerová *et al*, 2006). Proces purifikace často zahrnuje extrakci tuhou fází (SPE) využívající nepolární sorbenty (C18), iontoměničiče nebo i směsné sorbenty, které kombinují vlastnosti obou pevných fází (Dobrev a Kamínek, 2002). Vysoce selektivním čistícím krokem je pak například imunoafinitní chromatografie (Tarkowski *et al*, 2004).

1.3.2. Extrakce tuhou fází (SPE)

SPE metoda je založena na rozdělení analytu mezi dvě fáze s rozdílnou rozpustností. V případě SPE metody jde však o rozdělení analytu mezi kapalnou fází (extraktem) a tuhou fází (sorbentem) (Camel, 2003). Sorbent je umístěn ve formě sloupce či membrány v krátké koloně tzv. cartridge. Před nanesením extraktu na cartridge, musí být sorbent nejprve aktivován a kondicionován vhodným rozpouštědlem. Následně je na kolonu nanesen vzorek a analyty se v závislosti na typu použitého sorbentu zachytí na pevné fázi na základě specifických (nevazebných) interakcí (van der Waalovy síly; vodíkové vazby, dipól-dipólové síly či kation-aniontové interakce (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006). Tímto krokem se malé množství zachyceného analytu zakoncentruje. Poté jsou kontaminanty vymyty a cílové analyty jsou uvolněny vhodným elučním činidlem a sbírány do zkumavky (Camel, 2003). Ve srovnání s LLE, SPE zajišťuje účinnější extrakci a větší úspornost při spotřebě rozpouštědel (Berrueta *et al*, 1995).

Mezi hojně využívané sorbenty patří např. reverzní fáze C18, u níž dochází k velmi efektivnímu odstranění polárních látek a rostlinných pigmentů ze vzorku. Ze všech sorbentů představuje C18 jedenu z nejuniverzálnějších SPE fází a může být tak využita při extrakci většiny fytohormonů (Fu *et al.*, 2011). Pro izolaci fytohormonů našel uplatnění také reverzní sorbent typu DEAE Sephadex (Hoyearová *et al*, 2006)

V relativně nedávné době se však do popředí dostávaly polymerní sorbenty. Jedním z představitelů polymerních sorbentů je reverzní fáze Oasis HLB, která našla uplatnění např. v purifikaci auxinů (Novák *et al*, 2012), stresových fytohormonů (Floková *et al*, 2014) nebo při stanovení celkového fytohormonálního profilu *Arabidopsis* (Šimura *et al*, 2018). Její výhodou je, že během procesu extrakce může sorbent vyschnout, aniž by došlo ke snížení schopnosti zadržovat analyty. Kromě toho je stabilní v celém rozsahu pH (Camel, 2003).

Iontově výměnné sorbenty jsou vhodné pro purifikaci kyselých (např. gibereliny) nebo bazických analytů (např. cytokininy). Patří zde sorbenty založené na silné iontové výměně (strong anion change – SAX; strong cation change – SCX) a na slabé iontové výměně (weak anion change – WAX, weak cation change WCX). Podobně jako v případě reverzní fáze, kde našel uplatnění polymerní sorbent Oasis HLB, se jako iontové výměnné sorbenty uplatnily Oasis MCX a Oasis MAX. Oba sorbenty jsou kombinací jak reverzní fáze, tak iontové výměny (Fontanals *et al*, 2010). Ukázalo se, že MCX ve

srovnání s DEAE Sephadexem a reverzní fází C18 poskytuje vyšší návratnost při extrakci cytokininů (Hoyerová *et al.*, 2007).

1.3.3. Imunoafinitní chromatografie (IAC)

Imunoafinitní chromatografie (IAC) je izolační metoda využívající specifické interakce monoklonálních nebo polyklonálních protilátek s antigenem za vzniku komplexu antigen-protilátka (Moser *et al.*, 2010). Navázáním protilátek pomocí NH₂ skupiny na pevný nosič je možné stanovit antigen; protilátka je stanovena vazbou specifického antigenu na stacionární fázi. Roztok, který obsahuje specifickou protilátku či antigen je aplikován na pevný nosič a je posléze vkládán do krátké kolony (cartidge), která je následně uchovávána v PBS a NaN₃ (Wang *et al.*, 2011). Na základě specifických interakcí dochází k navázání antigenu na nosič s protilátkou pomocí nekovalentních vazeb (vodíkové můstky, iontové vazby, van der Waalsovy síly nebo hydrofobní interakce) za vzniku komplexu; nežádoucí látky jsou poté vymyty (Fitzgerald *et al.* 2011). Požadovaný antigen je uvolněn pomocí elučního činidla (např. roztok solí nebo organického rozpouštědla), schopného nekovalentní interakce přerušit (Hennion & Pichon, 2003).

Imunoafinitní chromatografie je obecně využívána kvůli své schopnosti poskytnout rychlou a účinnou vazbu požadovaného analytu nebo cílové sloučeniny k imobilizovaným protilátkám (Moser & Hage, 2010). Slouží především k purifikaci vzorků před samotnou analýzou pomocí kapalinové chromatografie (LC), plynové chromatografie (GC), hmotnostní spektrometrie (MS) a kapilární elektroforézy (CE), ale také k imunodepleci (odstranění abundantních analytů ze směsi), k chromatografickým imunotestům a kombinovaným analytickým metodám (Moser & Hage, 2010).

IAC je oblíbenou metodou vyžívanou k izolaci fytohormonů z různých skupin, např. cytokininů (Faiss *et al.*, 1997; Novák *et al.*, 2003; Hauserová *et al.*, 2005; Novák *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012), auxinů (Sundberg *et al.*, 1986; Pěničik *et al.*, 2009), kyseliny abscisové (Hradecká *et al.*, 2005; Turečková *et al.*, 2009). Nedávno byla také publikována metodika využívající protilátky navázané na magnetických mikročasticích, která umožnila izolaci CK z miniaturních navážek manších než 1mg čerstvé hmoty (Plačková *et al.*, 2017). IAC lze použít i při stanovení látek odvozených od fytohormonů, které se využívají jako rostlinné herbicidy, např. 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny (Eyer *et al.*, 2016).

1.3.4. *Extrakce kapalina – kapalina (LLE)*

Princip extrakce kapalina-kapalina (LLE) spočívá v tom, že analyt je distribuován mezi dvě nemísitelné kapaliny. Obvykle je jedno rozpouštědlo vodné, a to druhé organické. Polárnější hydrofilní sloučeniny preferují vodnou (polární) fázi a nepolární hydrofobní sloučeniny preferují organické rozpouštědlo. K extrakci dojde proto, že analyt a kontaminanty z matrice mají v obou kapalinách odlišnou rozpustnost (Dean, 2009). LLE je tedy založena na rozdílné rozpustnosti analytu většinou ve vodě (vodná fáze) nebo v organickém rozpouštědle při různém pH (Tarkowski *et al.*, 2004). Rozpouštědla jsou tedy volena tak, aby byla vzájemně nemísitelná a zároveň, aby rozpustnost analytů byla v obou rozpouštědlech odlišná. Jakmile dojde k extrakci analytu, stává se z něj extrakčního rozpouštědla a extrakt z rozpouštědla zbařeného analytu se stává tzv. rafinát (Koncsag & Barbulescu, 2011).

V 70. letech byla v souvislosti s extrakcí cytokininů za pomoci LLE testována rozpouštědla jako je butan-1-ol a ethylacetát (EtAc). Hemberg a Wremlin v roce 1973 použili ethylacetát (EtAc) v kombinaci s kyselým vodným roztokem. Po trojnásobné extrakci kinetinu prošlo do EtAc fáze asi 90 % původního množství kinetinu. Při separaci kinetinu mezi butan-1-ol a alkalickým vodným roztokem (pH 7-9) se ukázalo, že kinetin do butanolové fáze přešel téměř všechnen (Hemberg & Wremlin, 1973). Předpokládalo se, že distribuce přirozeně se vyskytujících se cytokininů bude podobná (Hemberg & Westlin, 1973), ale tento závěr nebyl zcela opodstatněný (Letham, 1974). Při další studii bylo zjištěno, že koeficienty u kinetinu byly podstatně vyšší než u zeatinu, oproti iP u něhož byla účinnost extrakce nižší. Opět se ukázalo, že butan-1-ol v kombinaci vodným roztokem o pH 7 poskytl lepší výtěžnost než EtAc s okyseleným vodným roztokem o pH 3 (Letham, 1974).

Za inovativnější přístup LLE lze považovat mikroextrakci kapalina-kapalina (LLME), mikroextrakce kapalinou fází využívající duté vlákno (HF-LPME) či disperzní mikroextrakci kapalina-kapalina (DLLME).

Metoda HF-LPME je založena na extrakci cílových analytů z vodného roztoku vzorku do podpůrné kapalně membrány (SLM) udržované v pórech stěny porézního dutého vlákna a poté do akceptorové fáze uvnitř dutého vlákna (Ghambarian *et al.*, 2012). Část porézního dutého vlákna je namočená ve stejném organickém rozpouštědle pro nasycení porů a vlákno je spojeno s jehlou mikroinjekční stříkačky, kterou jsou během extrakce nabírány malé objemy vodného vzorku. Ty jsou poté vstříkované do detekčního systému. V třífázovém režimu jsou nejprve analyty extrahovány z vodné matrice vzorku a do tenké vrstvy organické fáze uvnitř porů stěny dutého vlákna a poté jsou extrahovány ještě jednou do lokalizované vodné akceptorové fáze uvnitř dutého vlákna (Pawliszyn & Stig Pedersen-Bjergaard, 2006). HF-LPME je levná, má vysoký koeficient obohacení, nízkou spotřebu nebezpečných organických rozpouštědel a je zde možnost automatizace (Gjelstad & Pedersen-Bjergaard, 2013).

Nevýhodou může být pomalejší proces extrakce, poměrně náročná manipulace či možnost kontaminace vláknem (Bayat & Bozorgi, 2020).

Metoda „Hollow fiber liquid liquid liquid extraction“ (HF-LLLME) byla v kombinaci s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí například využita pro stanovení několika kyselých fytohormonů v kokosové šťávě (SA, IAA, ABA a kyseliny jasmonové) (Wu & Hu, 2009).

DDLME je metoda založena na použití směsi obsahující extrakční a disperzní rozpouštědla, která se vstříkuje do vodného vzorku a následně se protřepává. Výsledkem je, že extrakční rozpouštědlo se rozptýlí do vzorku ve formě jemných kapiček a vytvoří zakalený roztok, do kterého se přenesou analyty a následným odstředěním se izolují. Jedná se o snadnou, jednoduchou, rychlou a levnou metodu extrakce organických sloučenin ve vodných vzorcích (Rezaee *et al.* 2006). Problematický může být výběr extrakčního rozpouštědla, jež musí být těžší než voda (chloroform, nitrobenzen, bromobenzen atd.) a současně by neměla být toxická (Quigley *et al.*, 2016 *et al.*, 2012). DLLME v kombinaci s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a fluorescenční detekcí byl využit při extrakci auxinů, při níž byl použit chloroform jako extrakční rozpouštědlo a aceton jako disperzní rozpouštědlo (Lu *et al.*, 2010). Poté proběhla podobná studie, která stanovovala za pomoci DLLME kyselinu gibberelovou (GA3), ABA, IAA, kyselinu indol-3-ylmásečnou, kyselinu indol-3-ylpropionovou, SA a kinetin ribosid (KR) v zelených mořských řasách (*Monostroma*, *Ulva*). ABA a IAA poskytly větší výtěžnost než KR či SA (Gupto *et al.*, 2011).

1.3.5. Paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME)

Paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (Parallel artificial liquid membrane extraction; PALME) je extrakční a purifikační metoda založená na extrakci analytů z kapaliny (donoru) do kapaliny (akceptoru) přes polymerní membránu s nemísitelnou organickou kapalnou fází („supported SLM“), která se mezi těmito dvěma kapalnými fázemi nachází. Jedná se tzv. 3-fázový systém, který je prováděn ve formátu 96jamkové destičky (Gjestad *et al.*, 2013). Princip metody spočívá v tom, že během procesu extrakce dochází k postupné pasivní difúzi cílových analytů z donorového rozpouštědla přes odpovídající umělou kapalinou membránu (SLM) do rozpouštědla akceptoru. Donorový roztok je navržen tak, aby analyty v něm rozpuštěné byly nábojově neutrální. To zajišťuje snadnější přesun analytů z donoru do kapalných membrán. Naopak složení akceptoru je navrženo tak, aby byl analyt ionizován, čímž je zajištěn snadnější přesun z kapalných membrán do akceptoru (Gjestad *et al.*, 2017).

Výhoda metody spočívá v minimální spotřebě rozpouštědel i vzorku a ve srovnání s již zavedenými metodami jako je např. SPE. Vynechává krok odpařování, což urychluje proces extrakce. Navíc je tato metoda kompatibilní s LC-MS, protože umožňuje přímý nástřik extraktu.

PALME tak představuje vysoce efektivní, rychlou a levou metodu umožňuje purifikaci biologického vzorku (Gjelstad *et al*, 2017). Metoda PALME byla původně vyvinuta pro izolaci farmakologických analytů ze vzorků lidské krve, séra a moči. V jednom z prvních experimentů byly za pomoci PALME extrahovány roztoky léčivých látek petidin, nortriptylin, metadon a haloperidol krevní plazmy. Do vodné roztoky plazmy se zmíněnými látkami byl přidán hydroxid sodný (NaOH). Bylo testováno několik rozpouštědel nanášených na membránu, např. dodecyl acetát (DDA)-hexadekan isopentylbenzen, n-Dihexylether (DHE), 2-nitrofenyloktylether atd., přičemž jako nejlepší se osvědčilo DDA, které poskytlo nejvyšší výtěžnost (Gjelstad *et al*, 2013).

1.4. Metody analýzy fytohormonů

1.4.1. Imunochemické metody

Imunochemické metody umožňují detekovat relativně nízké hladiny koncentrací fytohormonů (Wang *et al*, 1995). Jsou založeny na specifické interakci analytu (antigenu) s protilátkou, z nichž jeden je označen takovou látkou, aby mohl být komplex detekován.

Mezi imunochemické metody patří především radioimunoanalýza (RIA) a ELISA (enzymová imunoanalýza). Radioimunoanalýza (RIA) je citlivou metodou se schopností detekce v řádech nmol až pmol (Tarkowski *et al*, 2004). V případě imunochemické analýzy CK může být použito značení radioaktivním prvkem (např.: ^{125}I , ^3H , ^{14}C), fluorescenční či chemiluminiscenční látkou nebo enzymem (Chan, 1987). Samotné CK nemohou imunitní odpověď vyvolat, schopnost získávají až po navázání na vhodný makromolekulární nosič (Tarkowski *et al*, 2004). Aby nedocházelo k nežádoucímu vyvázání protilátek maticí v hrubém extraktu, je potřeba látky interferující s RIA protilátkami předem odstranit (Cook *et al*, 2001). Rostlinné hormony a některé jejich metabolity byly metodou RIA analyzovány od 70 let. Prvně byla metodou analyzována IAA (Pengelly & Meins, 1977), následně pak isopentenyladenosin (iPR) (Khan *et al*, 1977), ABA (Weiler, 1979), *tZ* (Weiler, 1980b) a GA3 (Weiler & Wiczorek 1981). Vyjma GA3, která byla radioaktivně značena ^{125}I , byly všechny uvedené hormony značeny ^3H (Weiler, 1982).

Metoda ELISA, jejíž detekční limit dosahuje řádově fmol byla v oblasti fytohormonů poprvé uplatněna v kombinaci avidin-biotin komplexem při analýze IAA, ABA a zeatin ribosidů (ZR) v pletivech rajčete (Maldiney *et al*, 1986). Od 80. let nad metodou RIA převažuje ELISA metoda svými výhodami, neboť v porovnání s RIA je ELISA levnější a má jednodušší provedení. Navíc zde nedochází ke vzniku radioaktivního odpadu (Tarkowski *et al*, 2009).

1.4.2. Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní tandemovou spektrometrií (LC-MS/MS)

Fytohormony se zpravidla vyskytují velmi nízkých koncentracích (10^{-10} až 10^{-15} mol/g živé hmoty), a proto je potřeba využít velmi citlivých a přesných instrumentálních metod, které jejich detekci zprostředkují. Citlivou analýzu rostlinných hormonů umožnily až technologie založené na separačních technikách spojených s hmotnostní spektrometrií (MS).

Vzhledem k tomu, že, klasické kolonové uspořádání nemá potřebnou účinnost, dnes se využívá především HPLC a UHPLC systémy (Klouda, 2003). LC systém slouží k separaci analytu mezi kapalnou (mobilní) a pevnou (stacionární) fází. Uplatnění v případě analýzy fytohormonů nalezlo především spojení ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie (UHPLC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií typu trojitého kvadrupólu (QqQ). Tato kombinace metod umožňuje rychlou separaci, identifikaci a kvantifikaci analytů (Klouda, 2003).

1.4.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejpoužívanějších separačních technik zajišťující jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu látek rozpustných v kapalině, včetně fytohormonů. HPLC se pro kvantitativní analýzu fytohormonů využívala již od 70 let. Poprvé byla metoda v rámci fytohormonů využita při analýze cytokininů (Challice, 1975), později při analýze ABA (Sweetser & Vatvars, 1976) a IAA (Sweetser & Swartzfager, 1978). HPLC, která může s polárními sloučeninami pracovat přímo, je vhodnější pro většinu nederivatizovaných rostlinných hormonů za použití UV detektoru. (Fu *et al*, 2011). Vysoká citlivost a selektivnost metody je zajištěna většinou spojením HPLC s tandemovou hmotnostní spektroskopií (MS/MS) (Ma *et al*, 2008). HPLC ve spojení s MS/MS je využívána k analýze fytohormonů od 90 let. Byla využita například při analýze cytokininů v tabáku (*N. tabacum*) (Redig *et al.*, 1996), auxinů (IAA) v rýži (Matsuda *et al*, 2005) či ABA v *A. thaliana* (López-Carbonell, 2005).

1.4.4. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) zajišťuje vyšší rozlišení, vyšší citlivosti a rychlejší separaci. Vzhledem k tomu, že pracuje se stacionární fází, jejíž částice mají daleko nižší průměr než u HPLC, je potřeba pracovat při vyšších tlacích až 1000 bar (cca 100 MPa) (Von Schwartzenberg *et al*, 2007). Mobilní fáze může probíhat za isokratické nebo gradientové eluce. Při isokratické eluci se složení fáze nemění a fáze je přiváděna jedním vysokotlakým čerpadlem. Při gradientové eluci se složení mobilní fáze s časem mění a je dopravena dvěma či více vysokotlakými čerpadly do směšovacího zařízení. Před vstupem do čerpadla je umístěn filtr k zachycení nečistot v mobilní fází. Mobilní fáze je také předem nutno odplynit, aby se s poklesem tlaku při výstupu z kolony zabránilo vzniku vzduchových bublin, které ruší detekci. Mezi čerpadlem a kolonou je zařazeno dávkovací zařízení (dávkovací ventily či autosamplery), z něhož je tokem mobilní fáze vzorek odnášen

na kolonu. Vzorek je na koloně separován na jednotlivé složky, přičemž každá složka získává svůj definovaný retenční čas. Na konci kolony je umístěn detektor, který zaznamenává výstupní signály vyhodnocovacím systémem (Nováková & Douša, 2013).

V oblasti rostlinných hormonů byla UHPLC ve spojení s MS/MS a elektrosprejem (ESI) byla poprvé použita při analýze cytokininů (von Schwartzberg *et al.*, 2007). Později byla metodika blíže popsána v roce 2008 (Novák *et al.*, 2008). Od této doby nachází tento metodický přístup uplatnění při analýze cytokininů, auxinů, ABA a giberelinů v rýži. Cytokiny a auxiny zde byly detekovány v pozitivním iontovém módu; ABA a gibereliny byly identifikovány v režimu negativních iontů (Kojima *et al.*, 2009). V tomtéž roce bylo touto metodou analyzováno 8 metabolitů ABA v listech *N. tabacum* (Turečková *et al.*, 2009). Další vývoj metody vedoucí ke zvýšení její citlivosti umožnil kromě ABA i detekci jasmonátů (Balcke *et al.*, 2012). Metoda UHPLC-MS/MS byla využita také pro analýzu stresových hormonů a jejich metabolitů jako jsou jasmonáty, SA, ABA (Floková *et al.*, 2014).

1.4.5. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je založená na převedení neutrálních molekul na nabitě ionty, které se dělí podle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z) (Siuzdak, 2004). Hmotnostní spektrometrie v tandemu představuje propojení dvou hmotnostních spektrometrů (MS^2) za sebou, díky čemuž se zvyšuje schopnost selektivity metody (McLafferty, 1981).

Ionizací získávají molekuly vzorku náboj a na základě m/z jsou přitahovány elektromagnetickým polem. Ionty jsou tímto rozseparovány v hmotnostním analyzátoru a poté detekovány detektorem (Ho *et al.*, 2003). K ionizaci se využívá technika jako elektrosprej (ESI), chemická ionizace (CI), ionizace za atmosférického tlaku (APCI), termosprej (TSI), bombardování rychlými atomy (FAB) či matricí asistovaná laserová desorpce (MALDI) (Siuzdak, 2004). Z daných technik je v současné době nejběžnější ESI (Novák *et al.*, 2008; Tarkowski *et al.*, 2009). Na rozdíl od jiných technik, ESI umožňuje tvorbu několika násobně nabitých iontů (Ho *et al.*, 2003). Díky tomu se rozsah hodnot m/z u výsledných iontů snižuje, tudíž lze ionizované molekuly analyzovat hmotnostními spektrometry s mnohem menším rozsahem hodnot m/z . Výhodou ESI, jako měkké ionizační techniky, je také majoritní vznik prekursorových iontů $[M+H]^+$ a potlačení tvorby fragmentů v iontovém zdroji (Holčapek *et al.*, 2010).

Bez ohledu na zdroj ionizace, citlivost hmotnostního spektrometru souvisí především s hmotnostním analyzátozem, kde dochází k separaci iontů. Široce používán je především kvadrupólový hmotnostní analyzátor (Q), analyzátor kvadrupólové iontové pasti (QIT), analyzátor doby letu (ToF) a Fourierova transformace iontové cyklotronové rezonance (FT-ICR).

Kvadrupól je tvořen čtyřmi paralelně uspořádanými tyčemi, na něž je vkládáno napětí, které mezi póly vytvoří elektrické pole (Koenig & Jack 1999). Jakmile ionty vstoupí do elektrického pole začnou oscilovat. Na základě stability trajektorií iontů v oscilačním elektrickém poli jsou následně

separovány, přičemž oscilace je stabilní pouze pro ionty s určitým poměrem m/z . Vybrané ionty tak mohou procházet kvadrupólem, zatímco zbylé ionty jsou zachyceny na tyčích.

Pro tandemové uspořádání je typický trojitý kvadrupól (QqQ), který představuje 3 kvadrupóly zapojené za sebou v sérii (Ho *et al.*, 2003). První kvadrupól (Q1) společně s třetím kvadrupólem (Q3) patří mezi tzv. filtry. Q3 zároveň slouží k analýze fragmentů vzniklých tzv. kolizní cele (q2), která je umístěna mezi Q1 a Q3 (de Hoffmann & Vincent Stroobant, 2007). Selektované ionty z Q1 přicházejí do q2, kde jsou fragmentovány prostřednictvím neutrálních molekul plynu o vysoké energii (často argon nebo dusík). Pomocí Q3 jsou hledané fragmenty selektovány a na detektoru za Q3 finálně analyzovány (de Hoffmann & Vincent Stroobant, 2007). Hmotnostní analyzátoři na bázi trojitých kvadrupólů jsou v současnosti nejrozšířenějšími přístroji pro ultra citlivé stanovení rostlinných hormonů (Tarkovská *et al.*, 2014; Novák *et al.*, 2017).

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor (Q) a analyzátor doby letu (TOF), lze také společně konfigurovat jako tandemové hmotnostní spektrometrické přístroje, tzv. Q-ToF. Liší se rozlišením, hmotnostním rozsahem a schopností provádět tandemové experimenty, např. sken prokutových iontů nebo sken neutrálních ztrát (El-Aneed *et al.*, 2009). Spojením LC-QToF-MS/MS byly v xylemové míze detekovány cytokininy, ABA a gibereliny. Ve srovnání s klasickou LC-MS/MS, LC-QToF-MS/MS dosáhla vyšší přesnosti hmoty a lepšího rozlišení (Fletcher & Mader, 2007).

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Materiál

Polymerní polypropylénové membránové filtry produkované v Laboratoři růstových regulátorů z 8jamkových proužků a membrány Accurel PP flat membrane 1E(R/P) 100 μm /0,1 μm (3M, Německo); komerčně dostupné polymerní polyviniliden fluorid (PVDF) membránové (Merck, USA), borosilikátové zkumavky 12 \times 5 mm skleněné zkumavky Fisher Brandt (Fisher Scientific, USA) SPE kolonky Oasis® MCX 30 mg/1 ml (Waters, USA), mikrozkušavky (Eppendorf, Německo), nylonové centrifugační filtry μSpin Filtr 0,2 μm (Chromservis, Česká republika), LC vialky (Labicom, Česká Republika), skleněné mikroinzerty (0,25 mm; 5,8 x 29 mm; Chromservis, Česká republika), mikrotitrační 96jamková destička multiscreen (Merck, USA); automatické pipety s příslušenstvím Eppendorf Research plus (rozsah pipet: 1-10 μl ; 10- 100 μl , 100-1000 μl ; 500-5500 μl ; Německo)

2.2. Přístrojová technika

Oscilační mlýn Retsch MM400 (Retsch, Německo), vakuová komůrka SUPELCO Visiprep™ (Merck, USA) příslušenstvím, ultrazvuková lázeň SONOREX (Bandelin, Německo), ultrazvuková lázeň ultrazvuk Elmasonic S10 (Elma, Německo), mechanický rotátor Stuart SB3 (Merck, USA), výrobce deionizované vody Millipore Direct Q® 3UV (Merck, USA), analytické váhy Sartorius (Německo), vortex mixer Wizard IR (Velp, Itálie), centrifugační odparka JOUAN (Trigon-plus®, Česká Republika), centrifuga Eppendorf miniSpin (Merck, USA), centrifuga Avanti™ (Beckman Coulter, USA), hmotnostní spektrometr typu trojitého kvadrupólu vybavený ionizací elektrosprejem Xevo® TQ-S (Waters, Velká Británie), ultra-vysokoúčinný chromatograf Acquity® UPCL (Waters, USA) vybavený chromatografickou kolonou Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1,7 μm (Waters, USA), orbitální standartní třepačka (VWR USA), pH metr ph 700 (Eutech Instruments, Singapur)

2.3. Chemikálie

Deionizovaná (Milli-Q) voda, kapalný dusík (Messer, Německo), methanol (Lichrosolv, Německo), amoniak (Merck, USA), kyselina dusičná (Fluka, USA), kyselina mravenčí (FA; Merck, USA), kyselina diethyldithiokarbamová (Sigma-Aldrich, USA), Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachner, Česká Republika), dodekahydrát fosforečnanu disodného (Lachner, Česká republika), hexanol (HXL; Sigma-Aldrich, USA), 1-oktanol (OCL; Sigma-Aldrich, USA) 2-oktanon (OCN; Sigma-Aldrich, USA), 2-nonanon (NON; Sigma-Aldrich, USA); dodecylacetát (DDA; Sigma-Aldrich, USA), dihexylether (DHE; Sigma-Aldrich, USA), ethyl-acetát (EtAc; Merck, USA), kyselina bis(2-ethylhexyl) fosforečná (DEHP; Sigma-Aldrich, USA).

2.3.1. Neznačené CK standardy

trans-zeatin (*tZ*), *trans*-zeatin ribosid (*tZR*), *trans*-zeatin monofosfát (*tZRMP*), *trans*-zeatin *O*-glukosid (*tZOG*), *trans*-zeatin ribosid *O*-glukosid (*tZROG*), *trans*-zeatin *N7*-glukosid (*tZ7G*), *trans*-zeatin *N9*-glukosid (*tZ9G*), *cis*-zeatin (*cZ*), *cis*-zeatin ribosid (*cZR*), *cis*-zeatin ribosid monofosfát (*cZRMP*), *cis*-zeatin *O*-glukosid (*cZOG*), *cis*-zeatin ribosid *O*-glukosid (*cZROG*), *cis*-zeatin *N7*-glukosid (*cZ7G*), *cis*-zeatin *N9*-glukosid (*cZ9G*), dihydrozeatin (DHZ), dihydrozeatin ribosid (DHZR), dihydrozeatin *O*-glukosid (DHZOG), dihydrozeatin *N7*-glukosid (DHZ7G), dihydrozeatin *N9*-glukosid (DHZ9G) isopentenyladenin (iP), isopentenyladenin ribosid (iPR), isopentenyladenin *N7*-glukosid (iP7G), isopentenyladenin *N9*-glukosid (iP9G), benzyl aminopurin (BAP), benzyl aminopurin ribosid (BAPR), benzyl aminopurin ribosid monofosfát (BAPRMP), benzyl aminopurin *N7*-glukosid (BAP7G), benzyl aminopurin *N9*-glukosid (BAP9G), *ortho*-topolin (*oT*), *ortho*-topolin ribosid (*oTR*), *ortho*-topolin *N7*-glukosid (*oT7G*), *ortho*-topolin *N9*-glukosid (*oT9G*), *meta*-topolin (*mT*), *meta*-topolin ribosid (*mTR*), *meta*-topolin *N7*-glukosid (*mT7G*), *meta*-topolin *N9*-glukosid (*mT9G*), *para*-topolin (*pT*), *para*-topolin ribosid (*pTR*), *para*-topolin *N7*-glukosid (*pT7G*), *para*-topolin *N9*-glukosid (*pT9G*), kinetin (K), kinetin ribosid (KR), kinetin *N9*-glukosid (K9G) (všechny Laboratoř růstových regulátorů).

2.3.2. Izotopicky značené CK standardy

$[^{13}\text{C}_6]$ -*trans*-zeatin, $[^2\text{H}_5]$ -*trans*-zeatin ribosid, $[^2\text{H}_5]$ -*trans*-zeatin monofosfát, $[^2\text{H}_5]$ -*trans*-zeatin *O*-glukosid, $[^2\text{H}_5]$ -*trans*-zeatin ribosid *O*-glukosid, $[^2\text{H}_5]$ -*trans*-zeatin *N7*-glukosid, $[^2\text{H}_5]$ -*trans*-zeatin *N9*-glukosid, $[^{13}\text{C}_6]$ -*cis*-zeatin, $[^{15}\text{N}_4]$ -*cis*-zeatin *N7*-glukosid, $[^2\text{H}_3]$ -dihydrozeatin, $[^2\text{H}_3]$ -dihydrozeatin ribosid, $[^2\text{H}_7]$ -dihydrozeatin *O*-glukosid, $[^2\text{H}_3]$ -dihydrozeatin *N9*-glukosid, $[^2\text{H}_6]$ -isopentenyladenin, $[^2\text{H}_6]$ -isopentenyladenin ribosid, $[^2\text{H}_6]$ -isopentenyladenin *N7*-glukosid, $[^2\text{H}_6]$ -isopentenyladenin *N9*-glukosid, $[^2\text{H}_7]$ -benzyl aminopurin, $[^2\text{H}_7]$ -benzyl aminopurin ribosid, $[^2\text{H}_7]$ -benzyl aminopurin *N9*-glukosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*ortho*-topolin, $[^{15}\text{N}_4]$ -*ortho*-topolin ribosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*ortho*-topolin *N7*-glukosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*ortho*-topolin *N9*-glukosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*meta*-topolin, $[^{15}\text{N}_4]$ -*meta*-topolin ribosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*meta*-topolin *N7*-glukosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*meta*-topolin *N9*-glukosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*para*-topolin, $[^{15}\text{N}_4]$ -*para*-topolin ribosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*para*-topolin *N7*-glukosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -*para*-topolin *N9*-glukosid, $[^{15}\text{N}_4]$ -kinetin (všechny Laboratoř růstových regulátorů).

2.4. Roztoky

2.4.1. Stanovení metabolického profilu CK v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*

- Modifikovaný extrakční roztok Bielski: 75% MeOH, 20% voda, 5% FA (v/v)
- Kondicionální roztok: 50% kyselina dusičná (v/v)
- Promývací roztok 1: 1M FA
- Promývací roztok 2: 80% MeOH (v/v)
- Eluční roztok 1: 0,35 M hydroxid amonný
- Eluční roztok 2: 0,35M hydroxid amonný v 60% MeOH (v/v)
- Rekonstrukční roztok: 5% MeOH
- Roztok izotopicky značených interních standardů:
 - $2 \cdot 10^{-8}$ M CK báze, ribosidy, *N7*-glukosidy a *N9*-glukosidy
 - $5 \cdot 10^{-8}$ M CK nukleotidy, *O*-glukosidy

2.4.2. Optimalizace složení kapalně membrány - výběr organické tekuté fáze

- Donorový roztok: 0,05M sodnofosfátový pufr (NaPBS) pH 7,4
- Kapalná membrána:
 - 100% OCL
 - 100% OCN
 - 100% HXL
 - 100% NON
 - 15% DHEP (v/v) v DHE
 - 15% DHEP (v/v) v DDA
- Akceptorový roztok: 0,2M FA
- Roztok CK standardů: $4 \cdot 10^{-9}$ mol/l donorového roztoku

2.4.3. Optimalizace složení kapalně membrány - výběr polymerního nosiče

- Donorový roztok: 0,05M NaPBS pH 7,4
- Kapalná membrána: 15% DHEP (v/v) v DDA
- Akceptorový roztok: 0,2M FA
- Roztok CK standardů: $2 \cdot 10^{-9}$ mol/l donorového roztoku

2.4.4. Optimalizace složení kapalné membrány prostřednictvím LLE

- Donorový roztok: 0,05M NaPBS pH 7,4
- Organická fáze:
 - 100% EtAc
 - 15% DHEP (v/v) v DDA
- Roztok CK standardů: $2,5 \cdot 10^{-8}$ mol/l donorového roztoku

2.4.5. Optimalizace akceptorového rozpouštědla

- Donorový roztok: 0,05M NaPBS pH 7,4
- Kapalná membrána: 15% DHEP (v/v) v DDA
- Akceptorový roztok:
 - 0,01M FA
 - 0,05M FA
 - 0,10M FA
 - 0,20M FA
- Roztok CK standardů: $2 \cdot 10^{-9}$ mol/l donorového roztoku

2.4.6. Stabilita CK v kyselém prostředí

- Roztok CK standardů: $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l CK ve vodě
- Roztok CK standardů kyselý: $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l CK ve vodě v 0,2M FA

2.4.7. Analýza pomocí UHPLC-MS/MS

- Mobilní fáze A: 15mM mravenčan amonný pH 3,95
- Mobilní fáze B: 100% MeOH

2.5. Pracovní postup

2.5.1. Stanovení metabolického profilu CK v semenáčcích *A. thaliana*

Sedmnáctidenní semenáčky *A. thaliana* ekotyp Col-0 byly zhomogenizovány za pomoci třecí misky, tloučku a kapalného dusíku a rozváženy ve čtyřech technických replikátech do 2ml mikroskopavek po 20 mg čerstvé hmoty. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml modifikovaného Bielského extrakčního roztoku společně s 10 μ l roztoku izotopicky značených interních standardů. Vzorky byly následně vloženy do oscilačního mlýnku a extrahovány za podmínek 27 Hz, 4 °C po dobu

5 minut. Poté byly přeneseny do ultrazvuku na 3 minuty a následně do mechanického rotátoru, kde byly extrahovány při 15 rpm, 4 °C po dobu 30 minut. Vzorky byly zcentrifugovány při 15 200 rpm, 10 min, 4 °C a ze zkumavky byl následně sbírán supernatant. Extrakt byl zředěn 6× pomocí 1M FA ve vodě (k 0,5 ml extraktu bylo přidáno 2,5 ml 1M FA) a purifikován pomocí SPE s využitím multimodálního sorbentu Oasis® MCX (Waters). Vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS metody.

2.5.2. Purifikace vzorku pomocí SPE s využitím multimodálního sorbentu Oasis® MCX (Waters)

Vzorek byl nanesen na kondicionovanou SPE kolonku Oasis® MCX (30 mg/1ml). Kolonka byla před nanesením extraktu kondicionována pomocí 1 ml MeOH, 1 ml vody, 1 ml 50% kyseliny dusičné, 1 ml vody a nakonec 1 ml 1M FA. Kontaminanty byly vymyty nejprve 1 ml 1M FA ve vodě a poté 1 ml 80% MeOH. Na SPE kolonky byl následně aplikován 1 ml 0,35 M hydroxidu amonného ve vodě, který sloužil jako eluční roztok 1 a eluát byl sbírán do skleněné zkumavky. Poté byly na kolonku naneseny 2 ml 0,35 M hydroxidu amonného v 60% MeOH a eluát byl sbírán do stejné zkumavky. Přechištěné vzorky byly poté odpařeny v centrifugační vakuové odparce (Dobrev a Kamínek, 2002; Svačinová *et al*, 2012). Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 40 µl 5% roztoku MeOH a umístěny do ultrazvuku po dobu 5 minut. Vzorky byly poté zvortexovány, přepipetovány na centrifugační µSpin filtry a centrifugovány při 7 500 rpm po dobu 5 minut. Zfiltrované vzorky byly následně převedeny do LC vialek opatřených skleněnými inzerty a analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS.

2.5.3. Příprava donorového roztoku pro optimalizaci metody PALME

Do odměrné baňky bylo naváženo 17,9 g dihydrátu dihydrofosforečnanu sodného a objem byl doplněn vodou na 100 ml za vzniku zásobního roztoku A o koncentraci 0,5 M. Do další odměrné baňky bylo naváženo 7,8 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného, který byl po doplnění objemu na 100 ml rozpuštěn za vzniku 0,5 M zásobního roztoku B. Oba roztoky byly ultrazvukovány až do úplného rozpuštění solí.

Poté byly oba roztoky smíchány v poměru 57,7 ml A a 42,3 ml B tak, aby vznikl zásobní roztok C, jehož složení odpovídalo 0,5M NaPBS pH 7,4. Tento roztok byl poté zředěn 10× na celkový objem 100 ml, ve kterém bylo rozpuštěno 20 mg kyseliny diethyldithiokarbamové.

2.5.4. Optimalizace složení kapalné membrány - výběr organické tekuté fáze

Do čtyř jamek 96jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 250 µl donorového roztoku, který obsahoval směs CK standartů o koncentraci 4 pmol/ml. Další čtyři jamky, které představovaly slepý vzorek, byly vyplněny 250 µl donorového roztoku bez standardů. Na PVDF membránovou „multiscreen“ platformu byly do čtyř jamek aplikovány 3 µl organického rozpouštědla. Platforma byla vložena do 96jamkové mikrotitrační destičky tak, aby impregnovaná membrána byla v kontaktu

s hladinou donorového rozpouštědla. Membrána byla poté překryta 40 μ l akceptorového rozpouštědla a na destičku bylo upevněno plastové víko. Tímto způsobem byly připraveny čtyři replikáty pro organická rozpouštědla OCL, OCN, HXL, NON, DHE, DDA, 15% DEHP (v/v) v DHE a 15% DEHP v DDA (v/v). Takto připravená sestava PALME byla umístěna na orbitální třepačku a míchána při 900 rpm po dobu 30 minut. Poté byl akceptorový roztok převeden do skleněného inzertu a uzavřen v LC vialce. Vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC-ESI-MS/MS.

2.5.5. Optimalizace složení kapalně membrány - výběr polymerního nosiče

Do čtyř jamek 96jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 250 μ l donorového roztoku obsahujícího směs CK standardů o koncentraci 2 pmol/ml. Čtyři jamky membránové „multiscreen“ platformy z polyvinylidenfluoridu (PVDF) byly impregnovány 3 μ l organického rozpouštědla 15% DEHP v DDA (v/v). Platforma byla vložena do 96jamkové destičky a na membránu bylo napipetováno 40 μ l akceptorového rozpouštědla. Stejným způsobem byla připravena destička, jejíž polymerní membrána byla tvořena polypropylenem (PP). Obě destičky byly překryty plastovým víkem a míchány na orbitální třepačce při 900 rpm po dobu 30 minut. Poté byly extrakty představované akceptorovým rozpouštědlem přepipetovány do inzertu, uzavřeny v LC vialce a analyzovány pomocí UHPLC-ESI-MS/MS.

2.5.6. Optimalizace složení kapalně membrány prostřednictvím LLE

Do 1,5ml eppendorfky bylo ve třech technických replikátech napipetováno 40 μ l donorového roztoku obsahujícího standardy CK v koncentraci 1 pmol/40 μ l. Extrakce byla provedena následujícím způsobem. Donorový roztok byl převrstven 40 μ l 15% DEHP v DDA (v/v) a vzorek byl promíchán na vortexu. Organická a anorganická frakce byly poté rozděleny centrifugací při 8 000 rpm po dobu 5 minut. Organická frakce byla odpipetována a nahrazena čistými 40 μ l 15% DEHP v DDA (v/v). Extrakce byla zopakována ještě 2 \times . Organická frakce byla naředěna do 1 ml 1M FA v MeOH a purifikována prostřednictvím multimodálního sorbentu Oasis® MCX dle výše uvedeného postupu. Vzorky byly poté analyzovány pomocí UHPLC-ESI-MS/MS.

2.5.7. Stabilita CK v kyselém prostředí

Do vialek s inzerty bylo ve čtyřech technických replikátech napipetováno 40 μ l směsi CK standardů rozpuštěných ve vodě nebo 0,2M FA o koncentraci $1 \cdot 10^{-8}$ M. Vzorky byly umístěny do chladničky a sbírány v časových intervalech 0 h, 1 h, 6 h, 24 h a 72 h. Sbírané vzorky byly ihned odpařeny ve vakuové odparce a poté rozpuštěny ve 40 μ l 10% MeOH. Následně byla provedena UHPLC-MS/MS analýza. Stabilita byla spočítána jako procentuální podíl průměrné plochy píku v definovaném čase k průměrné ploše píku v čase nula.

2.5.8. Analýza CK pomocí UHPLC-MS/MS a zpracování dat

Na chromatografickou kolonu nastříknuto 10 μ l vzorku. Vzorek byl z kolony eluován gradientovou elucí podle podmínek uvedených v Tabulce 1.

Tabulka 1: Podmínky gradientové eluce během UHPLC-MS/MS analýzy CK

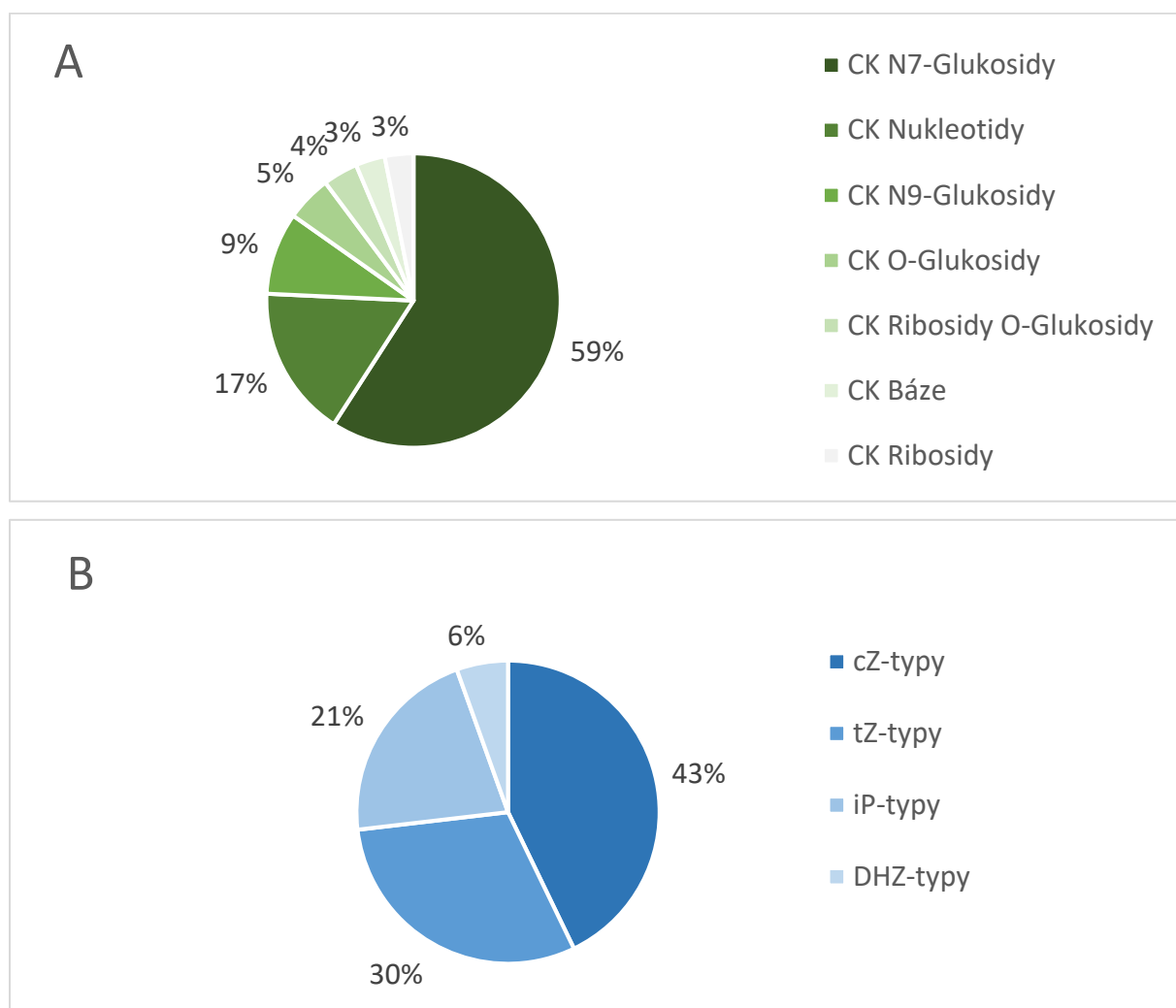
Čas (min)	Průtok (ml/min)	%A	%B
0,0	0,4	5	95
4,0	0,4	5	95
10,0	0,4	20	80
15,0	0,4	50	50
15,5	0,4	99	1
16,0	0,4	99	1
16,5	0,4	5	95
18,5	0,4	5	95

Chromatograficky rozdělený vzorek byl následně ionizován v iontovém zdroji typu ESI a analyzován MS/MS systémem typu trojitého kvadrupólu. Kapilární napětí bylo nastaveno na 0,75 kV. Jako desolvatační plyn byl použit dusík, který byl vyhříván na 600 °C při konstantním průtoku 1000 l/h. Teplota iontového zdroje byla 150 °C a tlak na nebulizéru byl nastaven na hodnotu 7 bar. Jako kolizní plyn sloužil argon. CK byly analyzovány v ESI+ módu, přičemž kuželové napětí a kolizní energie se lišily pro každou látku zvlášť dle optimalizované metody publikované v práci Svačinová *et al*, 2012. Data byla sbírána pomocí programu Mass Lynx v4.2 v režimu selektivního záznamu více reakcí (MRM) a následně zpracována a automaticky integrována pomocí vyhodnocovacího programu Target Lynx XS. Plochy integrovaných píků byly exportovány do tabulky MS Excel, kde byly provedeny finální výpočty. Koncentrace CK byly vypočítány z detekovaných ploch analytů a interních standardů metodou izotopového zředování. Relativní návratnosti CK standardů byly vypočítány jako procentuální podíl plochy píku detekovaného ve vzorku a plochy píku ekvivalentního látkového množství v kalibrační řadě. Kalibrační řadu představovala šestibodová koncentrační řada s logaritmicky vzrůstající koncentrací neznačených CK standardů od 0,01 fmol do 1 000 fmol a konstantní koncentrací interních standardů 10 fmol pro CK báze, ribosidy, N7- a N9-glukosidy a 100 fmol pro CK O-glukosidy a nukleotidy.

2.6. Výsledky a diskuze

2.6.1. Stanovení metabolického profilu CK v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*

Jak již bylo naznačeno v teoretickém úvodu, analýza CK v rostlinném materiálu pomocí UHPLC-MS/MS vyžaduje důkladnou přípravu vzorku, která zahrnuje krok extrakce a purifikace. Konvenční metody purifikace CK jsou obvykle založeny na SPE. Spolehlivou a dlouhodobě používanou metodou je v tomto směru využití SPE kolonek obsahujících multimodální sorbent Oasis® MCX (Waters, Milford, USA) (Dobrev a Kamínek, 2002, Hoyerová *et al*, 2006).



Obrázek 3: Cytokininový profil 17-denních rostlin *Arabidopsis* ekotyp Col-0 stanovený ve 20 mg FW purifikovaných pomocí SPE kroku s využitím Oasis® MCX 30 mg/1ml (Waters, Milford USA). Panel A zobrazuje procentuální zastoupení metabolických skupin, panel B vyjadřuje procentuální zastoupení cytokininových typů. Stanovení bylo provedeno ve čtyřech technických replikátech, přičemž relativní směrodatná odchylka nepřesáhla 15%.

V této bakalářské práci byla purifikace CK pomocí multimodálního Oasis® MCX sorbentu (Waters) použita za účelem osvojení si zásad analýzy CK v rostlinném materiálu (Dobrev a Kamínek,

2002). To zahrnovalo praktické provedení extrakce a purifikace, UHPLC-MS/MS analýzu, identifikaci a kvantifikaci látek metodou izotopového zředování. Jako biologický materiál zde sloužily 17-denní rostliny *A. thaliana* ekotypu Col-0.

Jak ukazuje obrázek 3, z metabolických typů byly v tomto typu materiálu nejvíce zastoupeny N7-glukosidy, které jsou považovány za produkty CK metabolismu (Hou *et al*, 2004). Přibližně šestina z celkového množství kvantifikovaných CK byla zastoupena CK nukleotidy, které plní funkci prekurzorů CK (Zürcher a Müller, 2016). Nejmenší podíl tvořily biologicky aktivní CK báze spolu CK ribosidy, jejichž funkce byla popsána jako transportní (Lomin *et al*, 2015). Z CK typů převažovaly cZ-typy, naopak nejméně byly zastoupeny DHZ-typy.

Poznatky a zkušenosti získané v tomto experimentu byly následně využity při aplikaci a optimalizaci metody PALME za účelem analýzy CK.

2.6.2. Optimalizace složení kapalné membrány - výběr organické tekuté fáze

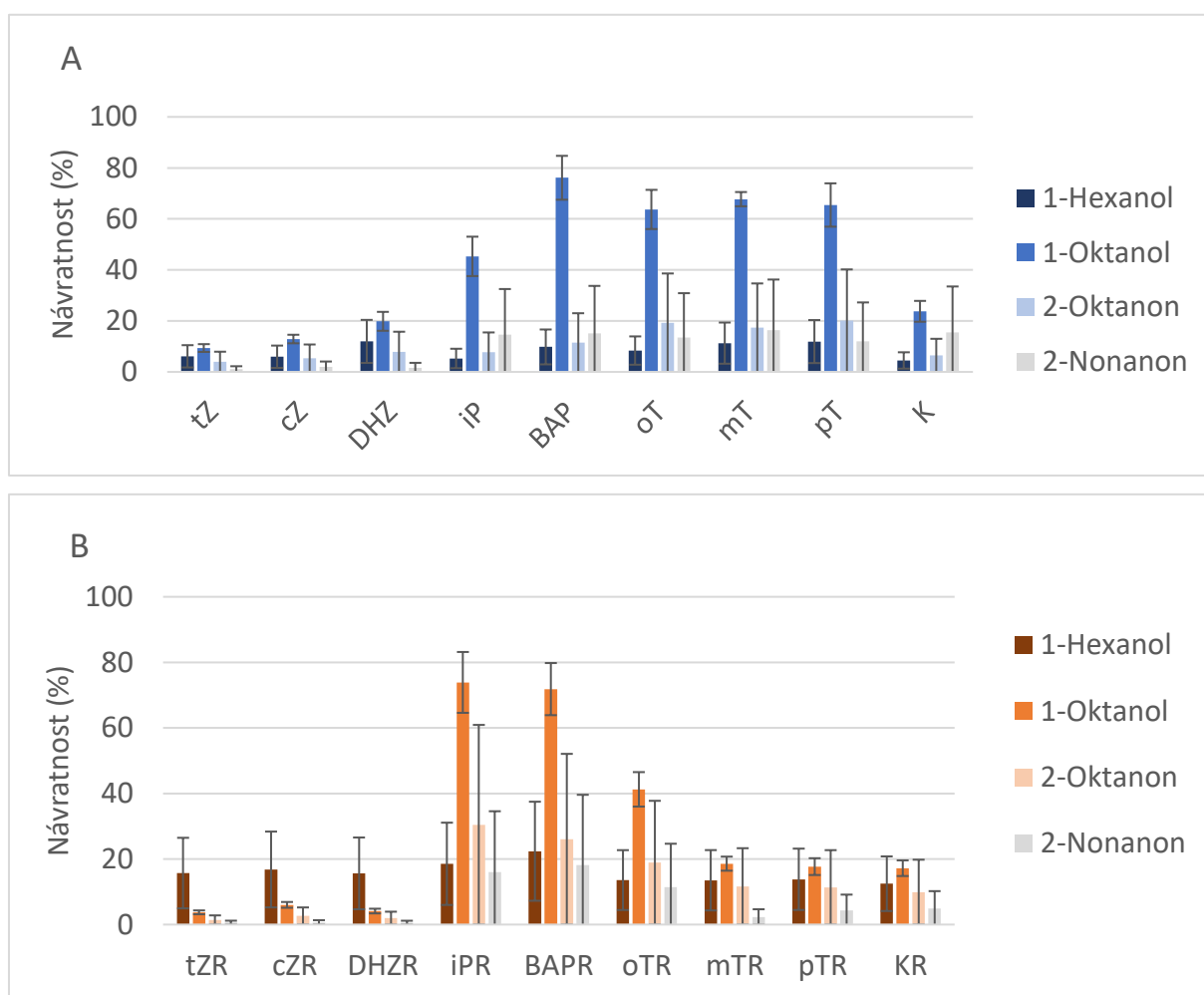
Metoda PALME představuje inovativní a miniaturizovanou metodu extrakce a izolace nízkomolekulárních látek z biologické matrice. Je založena na třífázovém systému extrakce z kapaliny do kapaliny v 96jamkové destičce, přičemž dvě vodné fáze jsou odděleny tenkou vrstvou organické kapalné membrány (Gjestad *et al*, 2013). Kapalná membrána představuje jednu z nejdůležitějších součástí extrakční sestavy PALME, která má zásadní vliv na účinnost extrakčního procesu. Skládá se z malého množství organické kapaliny (nižší jednotky μl), která je imobilizovaná na pevném polymerním nosiči. Na účinnosti extrakce se proto může podílet na jednu stranu výběr pevného nosiče a na stranu druhou volba kapalné organické složky.

Složení organické tekuté fáze bylo prvním parametrem, který byl optimalizovaný z hlediska návratnosti CK standardů extrahovaných pomocí PALME. Standardy byly rozpuštěny v NaPBS pufru, který byl překryt membránovým filtrem z PVDF materiálu impregnovaným 3 μl čtyř různých organických rozpouštědel. Dvě z nich byla alkoholická (HXL a OCL) a další dvě ketonická (OCN a NON). Kapalná membrána byla převrstvena roztokem 0,2M FA, který během 30minutové extrakce sloužil jako akceptor.

Z celkem 47 analyzovaných CK standardů extrahovaných metodou PALME v kombinaci s použitými rozpouštědly byly detekovány CK báze a CK ribosidy. Nejvyšší návratnosti CK bází a ribosidů a zároveň nejvyšší opakovatelnosti bylo dosaženo s použitím OCL. Ukázalo se, že účinnost extrakce byla nepřímo závislá na polaritě analytů. Méně polární CK báze a ribosidy jako např. iP, iPR, BAP, BAPR, oT, oTR dosahovaly vyšší návratnosti (až 75 %) než polárnější CK jako např. tZ, tZR, cZ, cZR, DHZ nebo DHZR.

Nejvyšší průměrná návratnost polárních CK byla dosažena v kombinaci s HXL. To se týkalo i polárních CK nukleotidů a glukosidů, které v přítomnosti HXL vykazovaly průměrnou návratnost

přibližně 10 %. V přítomnosti ostatních organických rozpouštědel byly nukleotidy a glukosidy pod limitem detekce. Oproti výsledkům získaným za pomoci OCL však kombinace s HXL vykazovala vysoké relativní směrodatné odchylky dosahující až 100 %, což dramaticky snižovalo robustnost metody. Tato nízká opakovatelnost byla pravděpodobně způsobena částečnou nebo úplnou ztrátou objemu akceptorového rozpouštědla během extrakce. Jedním z důvodů této ztráty mohla být částečná rozpustnost HXL ve vodě, což mohlo vést k tomu, že kapalná membrána přestala být funkční a došlo k nežádoucímu smísení akceptoru s donorem. Rozpustnost HXL ve vodě (5,9 g/l) je totiž přibližně 20x vyšší než rozpustnost OCL ve vodě (0,3 g/l) (Tabulka 2). Tento efekt navíc mohl být zesílen vysokým nadbytkem vody obsažené v donorovém a akceptorovém rozpouštědle (v součtu téměř 300 μ l oproti 3 μ l HXL).



Obrázek 4: Návratnost CK bází (A) a ribosidů (B) při optimalizaci složení tekuté složky kapalně membrány s využitím HXL, OCL, OCN a NON v kombinaci s PVDF materiálem. Výsledky byly vypočteny jako průměr \pm SD, n = 4.

Vysoká variabilita výsledků v kombinaci se ztrátou akceptoru byla pozorována rovněž po extrakci za pomoci OCN a NON. Tato dvě rozpouštědla však na rozdíl od HXL byla v minulosti

opakovaně použita jako součást kapalných membrán (Pilařová et al, 2017). Jejich mísitelnost ve vodě je navíc ve srovnání s HXL výrazně nižší (0,9 g/l, resp. 0,17 g/l) (Tabulka 2). To naznačuje, že na ztrátách akceptoru a vysoké variabilitě návratnosti se mohly podílet i jiné, doposud neobjasněné, faktory.

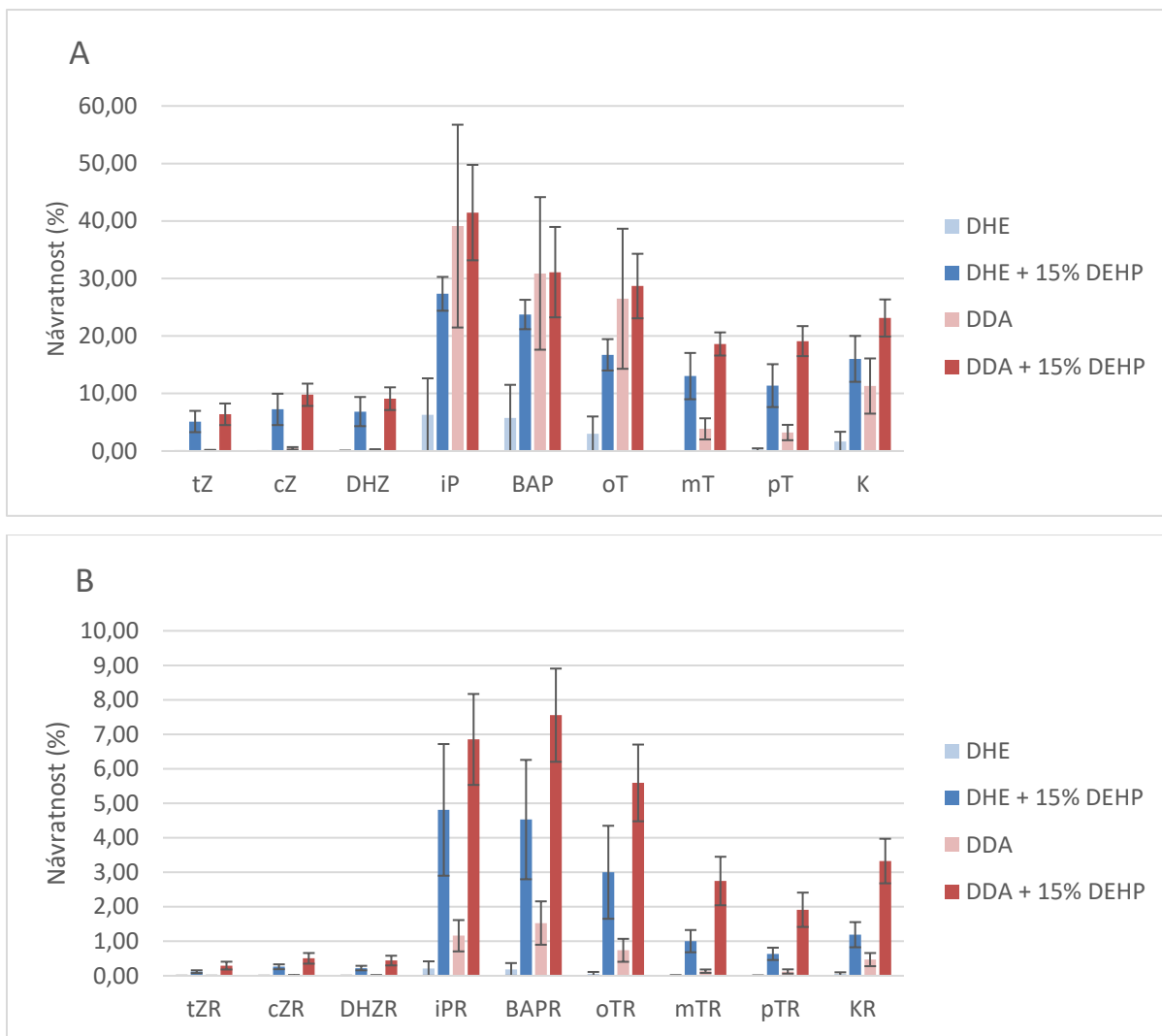
Kombinace s OCL se tedy ukázala v tomto experimentu jako optimální, nicméně i zde byly pozorovány částečné ztráty akceptorového rozpouštědla. Proto byly pro další optimalizaci tekuté složky kapalných membrán zvoleny DHE a DDA, jejichž mísitelnost s vodou je o dva, resp. tři řády nižší než v případě OCL.

Podobně jako v předchozím experimentu byly v kombinaci s DHE a DDA detekovány pouze CK báze a ribosidy. I zde se projevil efekt závislosti návratnosti na polaritě analytu. Nepochopitelně CK báze a příslušné ribosidy byly extrahovány s vyšší účinností než polární CK. Celkově vyšších návratností bylo dosaženo s použitím DDA ve srovnání s DHE. U obou rozpouštědel se opět projevila relativně vysoká variabilita výsledků, nicméně ztráty akceptoru během extrakce byly téměř eliminovány. Oproti extrakci s OCL však bylo dosaženo celkově nižších návratností a navíc výtěžky některých analytů, jako např. *tZ*, *cZ*, DHZ a jejich příslušných ribosidů byly sníženy až na limit detekce (Obrázek 3, světlé sloupce).

Na nižších výtěžcích se pravděpodobně podílela vyšší hydrofobicita obou rozpouštědel. Míru hydrofobicity rozpouštědla lze vyjádřit pomocí relativní permitivity (Tabulka 2). U hydrofilních látek je hodnota této veličiny vyšší, než u látek hydrofobních. V případě DDA je relativní permitivita přibližně 3× nižší než v případě OCL. Proto byla rozpustnost relativně hydrofilních CK v DDA značně omezená. Z tohoto důvodu byly DDA a DHE obohaceny aditivem DEHP, které je hydrofilnější a v minulosti bylo pro polární analyty využito v kapalných membránách jako iontový přenašeč (Pilařová et al, 2017). Ukázalo se, že přidávek tohoto aditiva v koncentraci 15 % (v/v) vedl ke zvýšení návratnosti hydrofilních analytů až na desetinásobek a to jak v případě DDA, tak v případě DHE. Lepších výsledků z hlediska výtěžnosti CK standardů dosáhl 15% DEHP (v/v) v DDA (Obrázek 5), proto bylo toto rozpouštědlo použito v následujících experimentech jako tekutá složka kapalných membrán.

Tabulka 2: Fyzikálně chemické vlastnosti vybraných organických rozpouštědel (Haynes a Lide, 2012; databáze Gestis)

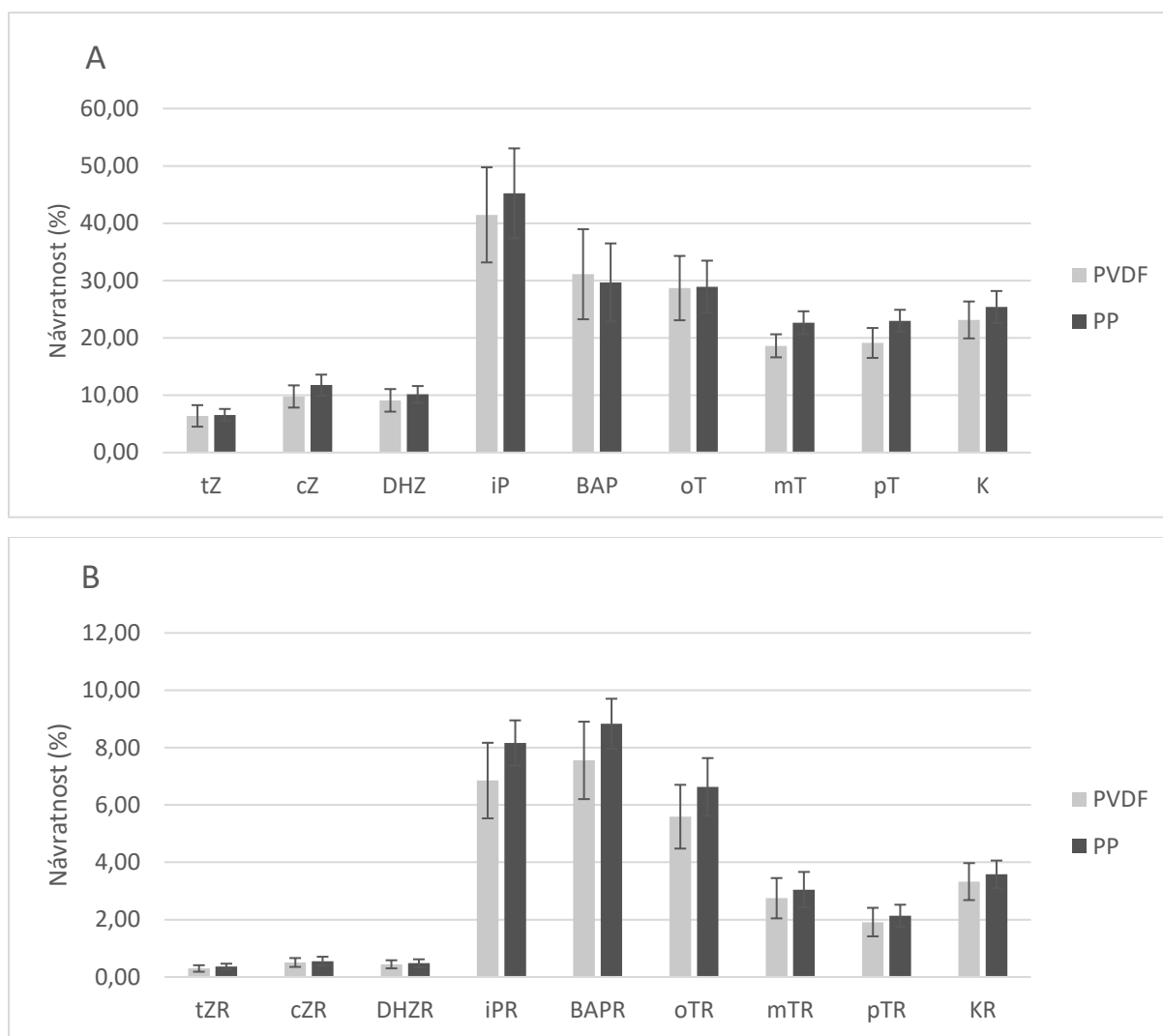
Název	Zkratka	Sumární vzorec	Relativní permitivita	Rozpustnost ve vodě (g/l)
1-hexanol	HXL	C ₆ H ₁₄ O	13,30	5,9000
2-oktanon	OCN	C ₈ H ₁₆ O	9,51	0,9000
1-oktanol	OCL	C ₈ H ₁₈ O	10,30	0,3000
2-nonanon	NON	C ₉ H ₁₈ O	9,14	0,1670
dihexyl ether	DHE	C ₁₂ H ₂₆ O	-	0,0030
dodecyl acetát	DDA	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	3,60	0,0004



Obrázek 5: Návratnost CK bází (A) a ribosidů (B) při optimalizaci složení kapalné membrány s využitím 3 μ l DDA, 15% DEHP (v/v) v DDA, DHE, 15% DEHP (v/v) v DHE v kombinaci s PVDF membránou. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n = 4.

2.6.3. Optimalizace složení kapalné membrány - výběr polymerního nosiče

Druhou optimalizovanou složkou kapalné membrány byl polymerní nosič. CK standardy rozpuštěné v donorovém roztoku byly extrahovány přes kapalnou membránu tvořenou 15% DEHP (v/v) v DDA, která byla imobilizovaná buďto na PP nebo PVDF polymerním nosiči. Jako akceptor zde sloužil roztok 0,2M FA. Ve vzorcích, které byly extrahovány tímto způsobem, byly detekovány CK báze a ribosidy. Rozdíly v návratnosti těchto detekovaných analytů však nebyly při srovnání PP a PVDF statisticky významné (Obrázek 2). Ostatní metabolické skupiny, mezi které patří CK glukosidy a nukleotidy zůstaly v obou případech pod limitem detekce. Výběr polymerního materiálu proto neměl na výslednou návratnost CK standardů vliv. I přes toto zjištění byl pro další experimenty zvolen jako polymerní nosič PP. Membránové filtry z PP materiálu jsou totiž vyráběny přímo v Laboratoři růstových regulátorů a jejich použití je proto levnější oproti komerčně dostupným membránovým filtrům z PVDF.

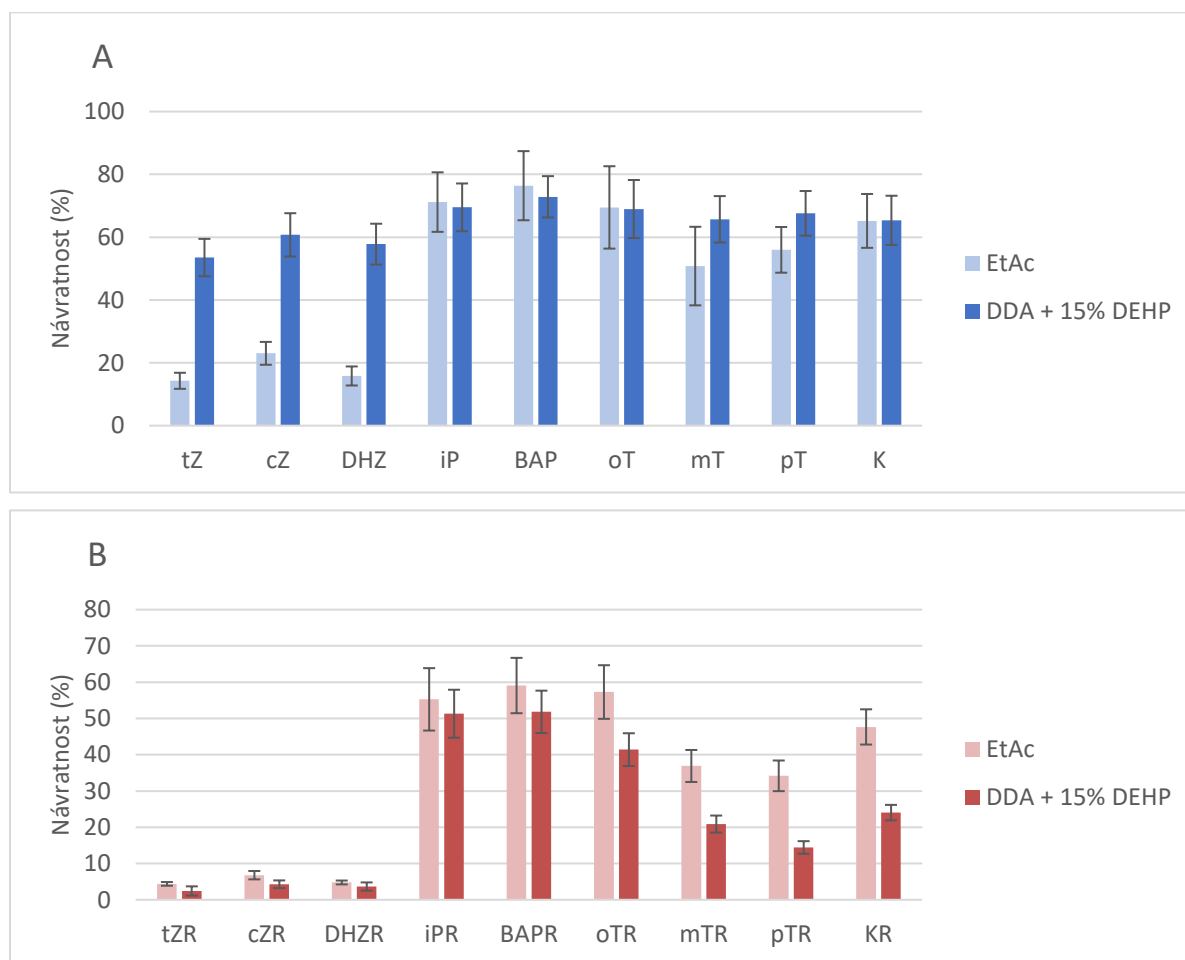


Obrázek 6: Návrtnost CK bází (A) a ribosidů (B) při optimalizaci pevného nosiče kapalné membrány. Tekutou složku tvořil roztok 15% DEHP (v/v) v DDA, který byl imobilizován v PVDF nebo PP polymerní membráně. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n = 4.

2.6.4. Optimalizace složení kapalné membrány prostřednictvím LLE

Aby bylo zjištěno, zda jsou nízká návratnost a vysoký rozptyl CK zapříčiněny technickým uspořádáním PALME nebo rozpustností analytů ve zvoleném rozpouštědle, byla provedena extrakce CK z donorového roztoku do kapalné membrány v klasickém uspořádání LLE. CK standardy byly rozpuštěny v NaPBS pufru, ke kterému bylo přidáno stejné množství DDA obohaceného 15% DEHP. Vedle této varianty vzorku byl připraven ještě referenční vzorek, v němž byla organická fáze tvořená EtAc. Toto organické rozpouštědlo představuje nejpolarnější rozpouštědlo mezi těmi, která jsou nemísitelná s vodou, a je proto vhodné jednak pro LLE a pak pro extrakci relativně polárních cytokininů. Celkově bylo pomocí LLE v přítomnosti DDA+15% DEHP dosaženo vyšších návratností než v extrakci PALME protokolem (Obrázek 4). Např. CK báze zeatinových typů byly extrahovány v LLE uspořádání s přibližně 50-60% účinností (Obrázek 4) oproti 5-6% účinnosti dosažené v metodě PALME

(Obrázek 3), což činí desetinásobný rozdíl. Dále se ukázalo, že LLE v kombinaci s DDA+15% DEHP poskytla přibližně trojnásobně vyšší návratnost pro CK báze zeatinových typů ve srovnání s extrakcí do EtAc (Obrázek 4A). CK báze ostatních typů měly návratnost srovnatelnou s EtAc. U CK ribosidů se projevil opačný trend. Vyšších návratností bylo dosaženo extrakcí do EtAc a to až trojnásobně oproti DDA+15% DEHP v případě topolin ribosidů a KR (Obrázek 4B). Ostatní metabolické skupiny CK zůstaly na úrovni limity detekce stejně jako při extrakci pomocí PALME protokolu.

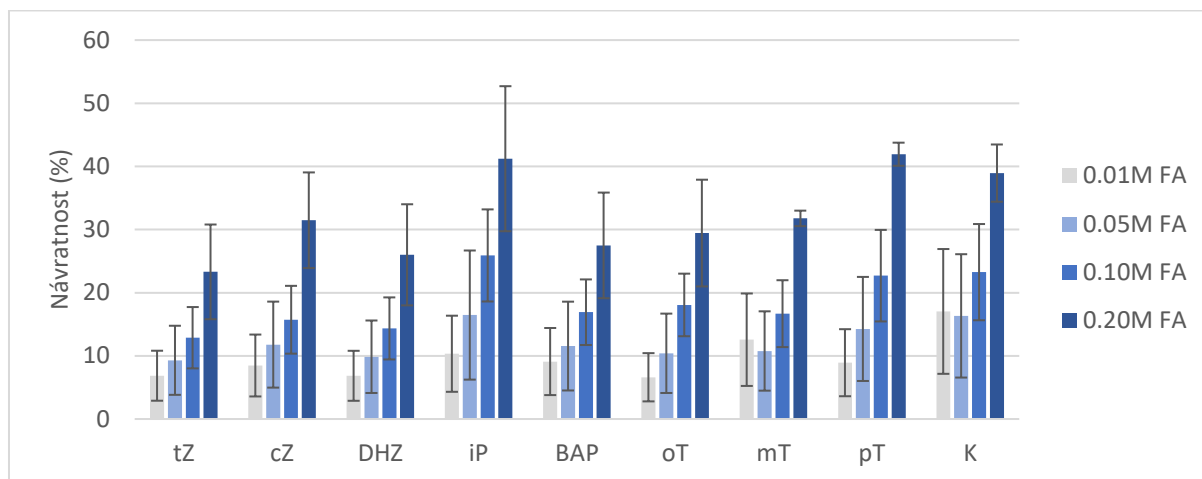


Obrázek 7: Návratnosti standardů CK bází (A) a CK ribosidů (B) extrahovaných v uspořádání LLE z donorového roztoku do EtAc nebo 15% DEHP (v/v) v DDA. Výsledky byly vypočteny jako průměr \pm SD, n = 4.

2.6.5. Optimalizace složení akceptorového rozpouštědla

Za účelem zvýšení návratnosti CK standardů byla optimalizována koncentrace FA v akceptorovém rozpouštědle. Byly zde srovnávány čtyři koncentrace FA od 0,01M až po 0,2M. U CK bází se ukázalo, že se zvyšující se koncentrací FA dochází ke zvyšování návratnosti, přičemž nejvyšší koncentrace FA poskytovala trojnásobně až čtyřnásobně vyšší průměrnou návratnost než koncentrace nejnižší (Obrázek 3). Podobného výsledku bylo dosaženo i u CK ribosidů, kde byl tento trend pozorován

u iPR, BAPR a ribosidů topolinových typů. Dále bylo zjištěno, že koncentrace FA v tomto rozsahu neovlivňuje návratnost ostatních metabolických skupin, které opět dosahovaly návratností na úrovni limitu detekce. I přes toto zjištění byla za optimální akceptorové rozpouštědlo prohlášena 0,2M FA.



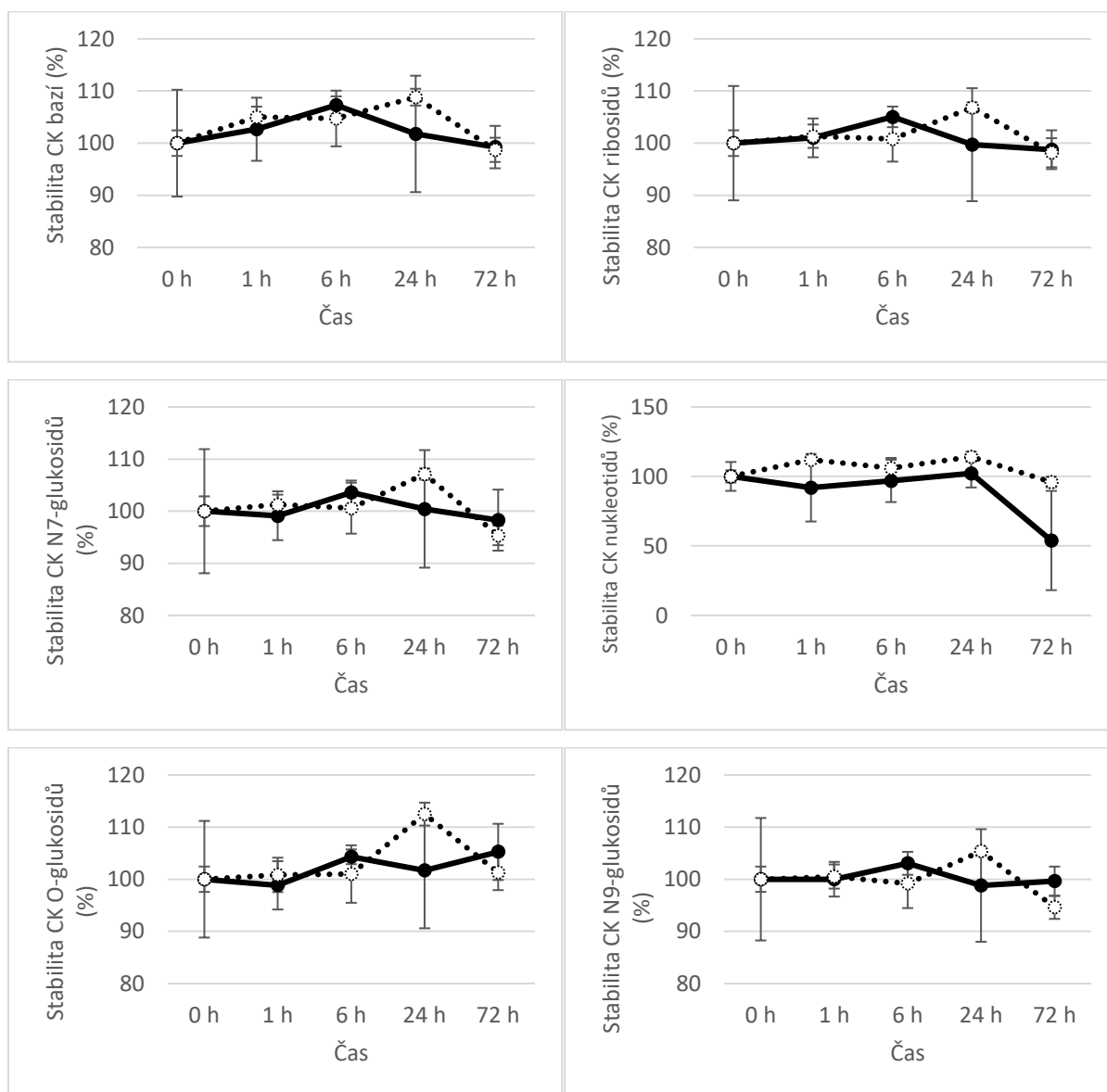
Obrázek 8: Návratnosti standardů CK bází při optimalizaci akceptorového roztoku obsahujícího různou koncentraci FA ve vodě. Výsledky jsou průměrem \pm SD, $n = 4$.

2.6.6. Stabilita CK v kyselém prostředí

Vzhledem k relativně vysoké koncentraci FA v optimálním akceptorovém rozpouštědle byla testována stabilita CK v tomto kyselém prostředí. Standardy CK byly rozpuštěny v roztoku 0,2M FA a ve vodě, která sloužila jako kontrola. Vzorky ve čtyřech replikátech byly uchovávány při 4 °C a sbírány v definovaných časech. Poté byly odpařeny, znovu rozpuštěny v 10% MeOH a analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS. Stabilita byla vyjádřena jako procentuální podíl signálu CK získaného v definovaném čase a signálu v čase nula. Čas 0 h tedy sloužil jako reference, čas 1 h představoval dobu extrakce, časy 6 h, 24 h a 72 h představovaly dobu uložení vzorků v autosampleru kapalinového chromatografu. Ukázalo se, že průměrná stabilita CK bází v 0,2M FA nevykazovala statisticky významný pokles ani po 72 h (Obrázek 4A).

V minulosti byla stabilita CK bází testována na látkách, které se běžně používají v kultivačních médiích při mikropropagaci rostlin. Růstové regulátory BAP, mT, K, iP a tZ byly ve vodném prostředí vystaveny podmínkám jako různá teplota a pH a byla sledována změna jejich koncentrace v čase. Autoři popisují, že tZ byl v prostředí 0,05M FA a 25 °C stabilní po dobu téměř dvou měsíců. K degradaci tZ došlo až při zvýšení teploty na 85 °C (Hart *et al.*, 2016). K podobnému výsledku došli Trávníček *et al.*, kteří popsali mechanismus změny chemické struktury iP rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové a zahřátého na 50 až 100 °C. Zvyšující se koncentrace kyseliny chlorovodíkové a teploty vedla k postupné protonizaci molekuly, cyklizaci N6 postranního řetězce až ke kyselé hydrolyze adeninového kruhu (Trávníček *et al.*, 2011). Výsledky obou prací ukazují, že stabilita vybraných CK bází závisí kromě

koncentrace kyseliny také na teplotě, která v případě PALME protokolu zdaleka nedosahovala publikovaných kritických hodnot, aby zapříčinila změnu chemické struktury tZ nebo iP. Stabilita CK bazí zjištěná během několikadenního experimentu v této bakalářské práci tedy odpovídala očekávání. Podobně, jako u CK bazí zde byla za podmínek 0,2M FA a 4 °C potvrzena stabilita také u CK ribosidů, O-Glukosidů a N-Glukosidů. Výjimku tvořily CK nukleotidy, u kterých byl v čase 72 h pozorován pokles signálu průměrně o 50 %.



Obrázek 9: Stabilita standardů CK metabolitů v kyselém prostředí (plná linka) a ve vodě (tečkovaná linka) v závislosti na čase. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, n = 4)

3. Závěr

Extrakce a purifikace je nedílnou součástí analýzy koncentračních hladin CK v biologických vzorcích. Prostřednictvím extrakce se získávají cílové analyty z matrice, purifikace pak zajišťuje odstranění kontaminantů a usnadňuje tak UHPLC-MS/MS analýzu. Konvenční metody purifikace CK jsou dnes založeny převážně na SPE. Před několika lety byla nicméně představena nová extrakční a purifikační metoda PALME, která byla původně vyvinuta za účelem analýzy farmakologicky významných látek. Výhodou této metody oproti metodám konvenčním je jednak nízká spotřeba organických rozpouštědel, která mohou zatěžovat životní prostředí, a potom vynechání kroku odpařování, což významně urychluje extrakční a purifikační proces. V analýze fytohormonů tato metoda doposud využita nebyla. Tato bakalářská práce si kladla za cíl optimalizovat a aplikovat metodu PALME za účelem extrakce a purifikace CK před UHPLC-MS/MS analýzou.

Úvodní experiment se zabýval profilováním CK metabolitů v 17denních semenáčcích *A. thaliana*. Za tímto účelem byla v purifikačním kroku využita konvenční metoda SPE založená na multimodálním sorbentu Oasis® MCX, který je kombinací reverzní fáze a kationtového iontoměniče a v Laboratoři růstových regulátorů je pro svou robustnost využíván už několik let. S využitím této purifikační metody byly v semenáčcích *A. thaliana* detekovány izoprenoidní typy CK, přičemž nejvíce zastoupeny byly *N7*-glukosidy.

Metoda PALME byla optimalizována z hlediska složení kapalně membrány, která sestávala ze dvou částí – tekutého organického rozpouštědla a pevného nosiče. Jako optimální kapalná membrána byla zvolena 15% DEHP (v/v) v DDA imobilizovaná na pevném nosiči z PP materiálu. Během optimalizace se stále více ukazovalo, že výtěžky CK standardů jsou nízké (jednotky až nižší desítky procent v závislosti na polaritě analytu), a že po extrakci jsou ze všech metabolických skupin detekovatelné pouze CK báze a CK ribosidy. Navíc byla metoda PALME zatížena vysokou směrodatnou odchylkou. Z tohoto důvodu byla provedena extrakce z kapaliny do kapaliny v klasickém uspořádání, aby bylo zjištěno, zda je tato metoda limitována spíše z hlediska technického uspořádání nebo z hlediska rozpustnosti analytů v organickém rozpouštědle. Bylo zjištěno, že s použitým složením roztoků má metoda PALME stále potenciál dosáhnout vyšších výtěžků i nižších směrodatných odchylek.

Dalším optimalizovaným parametrem bylo složení akceptorového roztoku, přičemž jako optimální složení byla stanovena FA o koncentraci 0,2 mol/l. Aby bylo zjištěno, zda v průběhu extrakce nedochází k poklesu koncentrace CK vlivem kyselého prostředí v akceptorovém rozpouštědle, byla provedena stabilitní studie. Ukázalo se, že v přítomnosti FA o koncentraci 0,2 mol/l byly vybrané analyty stabilní až po dobu tří dnů s výjimkou CK nukleotidů, u kterých po třech dnech došlo k poklesu signálu průměrně o polovinu.

Z důvodu probíhající pandemie onemocnění COVID-19 a souvisejících opatření nebyly všechny plánované experimenty dokončeny. Další optimalizace metody může být zaměřena s ohledem na účinnost extrakce např. na složení donorového rozpouštědla, celkovou dobu extrakce nebo intenzitu míchání během extrakce. Další možností optimalizace je volba nových aditiv v kapalné membráně, jako je např. trioktylamin (Vardal *et al.*, 2017; Ask *et al.*, 2018; Gjelstad, 2019). V neposlední řadě je naplánováno stanovení CK profilů v rostlinném materiálu a srovnání výsledků s konvenčními SPE metodami.

Již nyní je zřejmé, že metoda PALME je limitována výběrem analytů, které musí splňovat podmínku rozpustnosti ve vodě a zároveň v kapalné membráně. Pro tento protichůdný požadavek je využití PALME za účelem analýzy CK v biologických vzorcích velkou výzvou. Přestože je metoda v tomto ohledu výrazně limitována, stále může v rostlinné biologii najít své místo, protože nízké výtěžky mohou být kompenzovány použitím izotopicky značených interních standardů.

Zdroje

- Antoniadi, I., Novák, O., Gelová, Z., Johnson, A., Plíhal, O., Simerský, R., Mik, V., Vain, T., Mateo-Bonmatí, E., Karady, M., Pernisová, M., Plačková, L., Opassathian, K., Hejátko, J., Robert, S., Friml, J., Doležal, K., Ljung, K., & Turnbull, C. (2020). Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17700>
- Aremu, A. O., Bairu, M. W., Doležal, K., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2012). Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *108*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>
- Ask, K. S., Øiestad, E. L., Pedersen-Bjergaard, S., & Gjelstad, A. (2018). Dried blood spots and parallel artificial liquid membrane extraction—A simple combination of microsampling and microextraction. *Analytica Chimica Acta*, *1009*, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.024>
- Balcke, G. U., 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*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-47>
- Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, *69*(4), 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Bassil, N. V., Mok, D., & Mok, M. C. (1993). Partial Purification of a cis-trans-Isomerase of Zeatin from Immature Seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant physiology*, *102*(3), 867–872. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.867>
- Bayat, F., & Hajiagha Bozorgi, A. (2020). Hollow fiber-based liquid-phase microextraction and HPLC-UV determination of lovastatin in biological fluids. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, *9*(2), 203–208. https://doi.org/10.4103/jrptps.JRPTPS_71_19
- Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (1995). A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia*, *40*(7–8), 474–483. <https://doi.org/10.1007/BF02269916>
- Bieleski, R. L. (1964). THE PROBLEM OF HALTING ENZYME ACTION WHEN EXTRACTING PLANT TISSUES. *Analytical biochemistry*, *9*, 431–442. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90204-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90204-0)
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science (New York, N.Y.)*, *262*(5136), 1051–1054. <https://doi.org/10.1126/science.8235622>

Caesar, K., Thamm, A. M. K., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J., & Harter, K. (2011). Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5571–5580. <https://doi.org/10.1093/jxb/err238>

Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 58(7), 1177–1233. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7)

Cook, N. C., Bellstedt, D. U., & Jacobs, G. (2001). Endogenous cytokinin distribution patterns at budburst in Granny Smith and Braeburn apple shoots in relation to bud growth. *Scientia Horticulturae*, 87(1–2), 53–63. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00161-8)

Davies, P. J. (2010). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (pp. 39–45). Springer Netherlands. ISBN: 978-1-4020-2685-0

Dean, J. R. (2009). Classical Approaches for Aqueous Extraction. In *Extraction Techniques in Analytical Sciences* (pp. 39–45). John Wiley & Sons.

de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). Mass analysers. In *Mass spectrometry: principles and applications* (3rd ed., p. 169). John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-03310-4

Dobrev, I. P., & Kamínek, M. (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 950(1–2), 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00024-9)

El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>

Eyer, L., Vain, T., Pařízková, B., Oklestkova, J., Barbez, E., Kozubíková, H., Pospíšil, T., Wierzbicka, R., Kleine-Vehn, J., Fránek, M., Strnad, M., Robert, S., & Novak, O. (2016). 2,4-D and IAA amino acid conjugates show distinct metabolism in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 11(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159269>

Faiss, M., Zalubilova, J., Strnad, M., & Schmulling, T. (1997). Faissetal97.pdf. In *The Plant Journal* (Vol. 12, Issue 2, pp. 401–415).

Fitzgerald, J., Leonard, P., Darcy, E., & O'Kennedy, R. (2011). Immunoaffinity Chromatography. In D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (pp. 35–59). Humana Press.

Fontanals, N., Marcé, R. M., Borrull, F., & Cormack, P. A. G. (2010). Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 765–779. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.015>

Floková, K., Tarkowská, D., Miersch, O., Strnad, M., Wasternack, C., & Novák, O. (2014). UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry*, 105, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.015>

Flores, M. I. A., Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2011). QuEChERS-based extraction procedure for multifamily analysis of phytohormones in vegetables by UHPLC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 34(13), 1517–1524. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100093>

Fletcher, A. T., & Mader, J. C. (2007). Hormone profiling by LC-QToF-MS/MS in dormant *Macadamia integrifolia*: Correlations with abnormal vertical growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(4), 351–361. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9023-6>

Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2431–2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>

Fu, J. H., Sun, X. H., Wang, J. De, Chu, J. F., & Yan, C. Y. (2011). Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin*, 56(4–5), 355–366. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-4243-8>

Fusseder, A., & Ziegler, P. (1988). Metabolism and compartmentation of dihydrozeatin exogenously supplied to photoautotrophic suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta*, 173(1), 104–109. <https://doi.org/10.1007/BF00394494>

Gajdosová, S., Spíchal, L., Kamínek, M., Hoyerová, K., Novák, O., Dobrev, P. I., Galuszka, P., Klíma, P., Gaudinová, A., Zizková, E., Hanus, J., Dancák, M., Trávníček, B., Pesek, B., Krupicka, M., Vanková, R., Strnad, M., & Motyka, V. (2011). Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of experimental botany*, 62(8), 2827–2840. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq457>

Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Köllmer, I., Schmülling, T., & Frébort, I. (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 255–267. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9008-5>

Gestis Substance Database. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. Dosupné z: <https://gestis-database.dguv.de>

Ghambarian, M., Yamini, Y., & Esrafil, A. (2012). Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications. *Microchimica Acta*, 177(3–4), 271–294. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0773-x>

Gjelstad, A., & Pedersen-Bjergaard, S. (2013). Perspective: Hollow fibre liquid-phase microextraction - principles, performance, applicability, and future directions. *Scientia Chromatographica*, 5(3), 181–189. <https://doi.org/10.4322/sc.2014.003>

Gjelstad, A., Rasmussen, K. E., Parmer, M. P., & Pedersen-Bjergaard, S. (2013). Parallel artificial liquid membrane extraction: Micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format. *Bioanalysis*, 5(11), 1377–1385. <https://doi.org/10.4155/bio.13.59>
Gray, W. M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*, 2(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020311>

Gjelstad, A. (2019). Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction and parallel artificial liquid membrane extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 113, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.007>

Gupta, V., Kumar, M., Brahmabhatt, H., Reddy, C. R. K., Seth, A., & Jha, B. (2011). Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(11), 1259–1263. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.004>

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. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.020>

Hart, D. S., Keightley, A., Sappington, D., Nguyen, P. T. M., Chritton, C., Seckinger, G. R., & Torres, K. C. (2016). Stability of adenine-based cytokinins in aqueous solution. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 52(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9734-5>

Hemberg, T., & Westlin, P. E. (1973). The Quantitative Yield in Purification of Cytokinins. Model-experiments with Kinetin, 6-Furfuryl-amino-purine. *Physiologia Plantarum*, 28(2), 228–231. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1973.tb01180.x>

Haynes WM (2012). Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (92nd ed.) CRC Press. ISBN: 978-1-4398-5512-6

Hennion, M. C., & Pichon, V. (2003). Immuno-based sample preparation for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 29–52. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00529-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00529-6)

Higuchi, M., Pischke, M. S., Mähönen, A. P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M. R., & Kakimoto, T. (2004). In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), 8821–8826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101>

Hluska, T., Hlusková, L., & Emery, R. J. N. (2021). The hulks and the deadpools of the cytokinin universe: A dual strategy for cytokinin production, translocation, and signal transduction. *Biomolecules*, 11(2), 1–40. <https://doi.org/10.3390/biom11020209>

Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W., & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 24(1), 3–12.

Holčapek, M., Jirásko, R., & Lída, M. (2010). Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 3908–3921. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.049>

Holub, J., Hanuš, J., Hanke, D. E., & Strnad, M. (1998). Biological activity of cytokinins derived from Ortho – and Meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation*, 26(2), 109–115. <https://doi.org/10.1023/A:1006192619432>

Horgan, R., Hewett, E. W., Purse, J. G., & Wareing, P. F. (1973). A new cytokinin from populus robusta. *Tetrahedron Letters*, 14(30), 2827–2828. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)96062-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96062-9)

Horgan, R., Hewett, E. W., Horgan, J. M., Purse, J., & Wareing, P. F. (1975). A new cytokinin from Populus x robusta. *Phytochemistry*, 14(4), 1005–1008. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85176-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85176-4)

- Hou, B., Lim, E. K., Higgins, G. S., & Bowles, D. J. (2004). N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry*, 279(46), 47822–47832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409569200>
- Houba-Hérin, N., Pethe, C., D'Alayer, J., & Laloue, M. (1999). Cytokinin oxidase from *Zea mays*: Purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant Journal*, 17(6), 615–626. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00408.x>
- Hoyerová, K., Gaudinová, A., Malbeck, J., Dobrev, P. I., Kocábek, T., Šolcová, B., Trávníčková, A., & Kamínek, M. (2006). Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, 67(11), 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.010>
- Hoyerová, K., & Hošek, P. (2020). New Insights Into the Metabolism and Role of Cytokinin N-Glucosides in Plants. *Frontiers in plant science*, 11, 741. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00741>
- Hradecká, V., Novák, O., Havlíček, L., & Strnad, M. (2007). Immunoaffinity chromatography of abscisic acid combined with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 847(2), 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.034>
- Hradilová, J., Malbeck, J., & Brzobohatý, B. (2007). Cytokinin regulation of gene expression in the AHP gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 229–244. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9011-x>
- Hrtyan, M., Šliková, E., Hejátko, J., & Růžička, K. (2015). RNA processing in auxin and cytokinin pathways. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4897–4912. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv189>
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., & Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409(6823), 1060–1063. <https://doi.org/10.1038/35059117>
- Chan, D. W. (1987). General Principle of Immunoassay. In *Immunoassay*. ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-167635-3.50004-3>
- Challice J. S. (1975). Separation of cytokinins by High Pressure Liquid Chromatography. *Planta*, 122(2), 203–207. <https://doi.org/10.1007/BF00388659>
- Chen, C. M., Melitz, D. K., & Clough, F. W. (1982). Metabolism of cytokinin: phosphoribosylation of cytokinin bases by adenine phosphoribosyltransferase from wheat germ. *Archives of biochemistry and biophysics*, 214(2), 634–641. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90069-8)

- Jaworek, P., Kopečný, D., Zalabák, D., Šebela, M., Kouřil, Š., Hluska, T., Končítíková, R., Podlešáková, K., & Tarkowski, P. (2019). Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta*, 250(1), 229–244. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03152-z>
- Kamínek M. (1992). Progress in cytokinin research. In *Trends in Biotechnol.* 10,159-164. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(92\)90204-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90204-9)
- Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, 42(7). <https://doi.org/10.1093/pcp/pce112>
- Kakimoto, Tatsuo. (2003). Perception and Signal Transduction of Cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 605–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>
- Kamada-Nobusada, T., & Sakakibara, H. (2009). Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(4), 444–449. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.02.007>
- Kang, N. Y., Cho, C., & Kim, J. (2013). Inducible expression of Arabidopsis response regulator 22 (ARR22), a Type-C ARR, in transgenic Arabidopsis enhances drought and freezing tolerance. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079248>
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., & Sakakibara, H. (2004). Distinct Isoprenoid Origins of cis- and trans-Zeatin Biosyntheses in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14049–14054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314195200>
- Khan, S. A., Humayun, M. Z., & Jacob, T. M. (1977). A sensitive radioimmunoassay for isopentenyladenosine. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 632–635. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90067-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90067-7)
- Kim, H. J., Ryu, H., Hong, S. H., Woo, H. R., Lim, P. O., Lee, I. C., Sheen, J., Nam, H. G., & Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 814–819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505150103>
- Klouda, P. (2003). Chromatografie. In *Moderní analytické metody* (2nd ed., pp. 25–32). ISBN: 80-86369-07-2
- Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K., & Sakakibara, H. (2009). Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using ms-probe modification and liquid chromatography-tandem

mass spectrometry: An application for hormone profiling in *oryza sativa*. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1201–1214. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp057>

Koncsag, I., & Barbulescu, A. (2011). Liquid-Liquid Extraction with and without a Chemical Reaction. *Mass Transfer in Multiphase Systems and Its Applications*. <https://doi.org/10.5772/152294>

Kubiasová, K., Montesinos, J. C., Šamajová, O., Nisler, J., Mik, V., Semerádová, H., Plíhalová, L., Novák, O., Marhavý, P., Cavallari, N., Zalabák, D., Berka, K., Doležal, K., Galuszka, P., Šamaj, J., Strnad, M., Benková, E., Plíhal, O., & Spíchal, L. (2020). Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17949-0>

Kudo, T., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 53–60. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x>

Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., & Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128), 652–655. <https://doi.org/10.1038/nature05504>

Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., & Sakakibara, H. (2009). Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 21(10), 3152–3169. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068676>

Letham, D. S. (1974). Regulators of cell division in plant tissues - XXI. Distribution coefficients for cytokinins. *Planta*, 118(4), 361–364. <https://doi.org/10.1007/BF00385586>

Letham, D. S., & Palni, L. M. S. (1983). The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology*, 34(1), 163–197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.001115>

Liang, Y., Zhu, X., Zhao, M., & Liu, H. (2012). Sensitive quantification of isoprenoid cytokinins in plants by selective immunoaffinity purification and high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Methods*, 56(2), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.08.006>

Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Arkhipov, D. V., Osolodkin, D. I., Schmülling, T., & Romanov, G. A. (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1851–1863. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru522>

- López-Carbonell, M., & Jáuregui, O. (2005). A rapid method for analysis of abscisic acid (ABA) in crude extracts of water stressed *Arabidopsis thaliana* plants by liquid chromatography - Mass spectrometry in tandem mode. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(4), 407–411. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.02.006>
- Lu, Q., Chen, L., Lu, M., Chen, G., & Zhang, L. (2010). Extraction and analysis of auxins in plants using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2763–2770. <https://doi.org/10.1021/jf903274z>
- Maldiney, R., Leroux, B., Sabbagh, I., Sotta, B., Sossountzov, L., & Miginiac, E. (1986). A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. *Journal of Immunological Methods*, 90(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90070](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90070)
- Mähönen, A. P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P. N., & Helariutta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development*, 14(23), 2938–2943. <https://doi.org/10.1101/gad.189200>
- Matsuda, F., Miyazawa, H., Wakasa, K., & Miyagawa, H. (2005). Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(4), 778–783. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.778>
- Maxwell, B. B., & Kieber, J. J. (2010). Cytokinin signal transduction. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, 6, 329–357. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_16
- McLafferty, F. W. (1981). Tandem mass spectrometry. *Science*, 214(4518), 280–287. <https://doi.org/10.1126/science.7280693>
- Miller, C. O. (1961). A KINETIN-LIKE COMPOUND IN MAIZE. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.47.2.170>
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., & Kakimoto, T. (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16598–16603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603522103>

- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Biology*, 52. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>
- Moser, A. C., & Hage, D. S. (2010). Immunoaffinity chromatography: An introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis*, 2(4), 769–790. <https://doi.org/10.4155/bio.10.31>
- Nam, Y. J., Tran, L. S. P., Kojima, M., Sakakibara, H., Nishiyama, R., & Shin, R. (2012). Regulatory Roles of Cytokinins and Cytokinin Signaling in Response to Potassium Deficiency in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047797>
- Novák, O., Tarkowski, P., Tarkowská, D., Doležal, K., Lenobel, R., & Strnad, M. (2003). Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 480(2), 207–218. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00025-4)
- 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(11), 2214–2224. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.022>
- Novák, O., Napier, R., & Ljung, K. (2017). Zooming In on Plant Hormone Analysis: Tissue- and Cell-Specific Approaches. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 323–348. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040812>
- Nováková, L.; Douša, M. (2013). Kvalifikace HPLC systému. In *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* (pp. 162–172). Nováková L. Douša M. ISBN: 978-80-260-4243-3
- Oslovsky, V. E., Savelieva, E. M., Drenichev, M. S., Romanov, G. A., & Mikhailov, S. N. (2020). Distinct Peculiarities of In Planta Synthesis of Isoprenoid and Aromatic Cytokinins. *Biomolecules*, 10(1), 86. <https://doi.org/10.3390/biom10010086>
- Pawliszyn, J., & Pedersen-Bjergaard, S. (2006). Analytical microextraction: current status and future trends. *Journal of chromatographic science*, 44(6), 291–307. <https://doi.org/10.1093/chromsci/44.6.291>
- Pengelly, W., & Meins, F. (1977). A specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta*, 136(2), 173–180. <https://doi.org/10.1007/BF00396195>
- Pěňčík, A., Rolčík, J., Novák, O., Magnus, V., Barták, P., Buchtík, R., Salopek-Sondi, B., & Strnad, M. (2009). Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta*, 80(2), 651–655. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.043>

- Plačková, L., Oklestkova, J., Pospíšková, K., Poláková, K., Buček, J., Stýskala, J., Zatloukal, M., Šafařík, I., Zbořil, R., Strnad, M., Doležal, K., & Novák, O. (2017). Microscale magnetic microparticle-based immunopurification of cytokinins from Arabidopsis root apex. *Plant Journal*, 89(5), 1065–1075. <https://doi.org/10.1111/tpj.13443>
- Pokorná, E., Hluska, T., Galuszka, P., Hallmark, H. T., Dobrev, P. I., Drábková, L. Z., Filipi, T., Holubová, K., Plíhal, O., Rashotte, A. M., Filepová, R., Malbeck, J., Novák, O., Spíchal, L., Brzobohatý, B., Mazura, P., Zahajská, L., & Motyka, V. (2021). Cytokinin n-glucosides: Occurrence, metabolism and biological activities in plants. *Biomolecules*, 11(1), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom11010024>
- Prinsen, E., Kamímek, M., & Van Onckelen, H. A. (1997). Cytokinin biosynthesis: A black box? *Plant Growth Regulation*, 23(1–2), 3–15. <https://doi.org/10.1023/a:1005990123270>
- Punwani, J. A., Hutchison, C. E., Schaller, G. E., & Kieber, J. J. (2010). The subcellular distribution of the Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *Plant Journal*, 62(3), 473–482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04165.x>
- Quigley, A., Cummins, W., & Connolly, D. (2016). Dispersive liquid-liquid microextraction in the analysis of milk and dairy products: A review. *Journal of Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4040165>
- Redig, P., Schmülling, T., & Van Onckelen, H. (1996). Analysis of cytokinin metabolism in ipt transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Plant Physiology*, 112(1), 141–148. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.141>
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Sasakibara, H. (2010). Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. In P. J. Davies (Ed.), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (pp. 39–45). Springer Netherlands. ISBN: 978-1-4020-2685-0
- 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(3), 241–252. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0096-4>

- Siuzdak, G. (2004). An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 9(2), 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2004.01.004>
- Souza, L. M. de, Silva, M. M. de A., Herculano, L., Ulisses, C., & Camara, T. R. (2019). Meta-topolin: an alternative for the prevention of oxidative stress in sugarcane micropropagation. *Hoehnea*, 46(3), 0–4. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-107/2018>
- Spíchal, L. (2012). Cytokinins - Recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39(4), 267–284. <https://doi.org/10.1071/FP11276>
- Srivastava, L. M. (2002). *Plant Growth and Development Hormones and Environment*. Academic press.
- Strnad, M. (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101(4), 674–688. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1010403.x>
- sundberg, B., Sandberg, G., & Crozier, A. (1986). Purification of indole-3-acetic acid in plant extracts by immunoaffinity chromatography. *Phytochemistry*, 25(2), 295–298. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85469-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85469-2)
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, 42(2), 107–113. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce037>
- Sweetser, P. B., & Vatvars, A. (1976). High-performance liquid chromatographic analysis of abscisic acid in plant extracts. *Analytical Biochemistry*, 71(1), 68–78. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90012-9)
- Šimura, J., Antoniadi, I., Šíroká, J., Tarkowská, D., Strnad, M., Ljung, K., & Novák, O. (2018). Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant physiology*, 177(2), 476–489. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00293>
- Tarkowská, D., Doležal, K., Tarkowski, P., Åstot, C., Holub, J., Fuksová, K., Schmölling, T., Sandberg, G., & Strnad, M. (2003). Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*, 117(4), 579–590. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00071.x>

- Tarkowská, D., Novák, O., Floková, K., Tarkowski, P., Turečková, V., Grúz, J., Rolčík, J., & Strnad, M. (2014). Quo vadis plant hormone analysis? *Planta*, 240(1), 55–76. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2063-9>
- Tarkowski, P., Doležal, K., & Strnad, M. (2004). Analytické metody studia cytokininů. *Chemicke Listy*, 98(9), 834–841.
- Tarkowski, P., Ge, L., Yong, J. W. H., & Tan, S. N. (2009). Analytical methods for cytokinins. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(3), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.11.010>
- Taya, Y., Tanaka, Y., & Nishimura, S. (1978). 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. In *Nature* (Vol. 271, Issue 5645, pp. 545–547). <https://doi.org/10.1038/271545a0>
- Taylor, N. J., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2003). The elusive cytokinin biosynthetic pathway. *South African Journal of Botany*, 69(3), 269–281. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30313-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30313-6)
- To, J. P. C., & Kieber, J. J. (2008). Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*, 13(2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.005>
- Trávníček, Z., Novotná, R., Marek, J., Popa, I., & Ipl, M. (2011). Transformations of the natural cytokinin N⁶-isopentenyladenine in aqueous acidic media: Structural aspects. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9(16), 5703–5713. <https://doi.org/10.1039/c1ob05649b>
- Turečková, V., Novák, O., & Strnad, M. (2009). Profiling ABA metabolites in *Nicotiana tabacum* L. leaves by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 80(1), 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.027>
- Ueguchi, C., Koizumi, H., Suzuki, T., & Mizuno, T. (2001). Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 42(2), 231–235. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce015>
- Vårdal, L., Askildsen, H. M., Gjelstad, A., Øiestad, E. L., Edvardsen, H. M. E., & Pedersen Bjergaard, S. (2017). Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1048, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.010>
- Von Schwartzenberg, K., Núñez, M. F., Blaschke, H., Dobrev, P. I., 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 Physiology*, 145(3), 786–800. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103176>

Vylíčilová, H., Bryksová, M., Matušková, V., Doležal, K., Plíhalová, L., & Strnad, M. (2020). Naturally occurring and artificial n9-cytokinin conjugates: From synthesis to biological activity and back. *Biomolecules*, 10(6), 1–29. <https://doi.org/10.3390/biom10060832>

Wang, J., Letham, D. S., Taverner, E., Badenoch-Jones, J., & Hocart, C. H. (1995). A procedure for quantification of cytokinins as free bases involving scintillation proximity immunoassay. *Physiologia Plantarum*, 95(1), 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00813.x>

Wang, G., Li, Y., Li, X., Wang, X., Guo, Q., Wu, J., Xi, C., & Li, Z. (2011). Preparation and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of salbutamol from pork sample. *Journal of chromatographic science*, 49(4), 276–280. <https://doi.org/10.1093/chrscl/49.4.276>

Wang, L., Cheng, J., Lin, F., Liu, S., Pan, H., Li, M., Li, S., Li, N., & Li, W. (2019). Ortho-Topolin Riboside Induced Differentiation through Inhibition of STAT3 Signaling in Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*, 36(3), 162–168. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0020>

Weiler, E. W., & Zenk, M. H. (1976). Radioimmunoassay for the determination of digoxin and related compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 15(10), 1537–1545. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88933-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88933-5)

Weiler E. W. (1979). Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta*, 144(3), 255–263. <https://doi.org/10.1007/BF00388767>

Weiler E. W. (1980). Radioimmunoassays for trans-zeatin and related cytokinins. *Planta*, 149(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/BF00380877>

Weiler, E. W., Wiczorek, U. (1981). Determination of femtomol quantities of gibberellic acid by radioimmunoassay, *Planta*, 152(2), 159–167. doi:10.1007/bf00391188

Weiler, E. W. (1982). Plant hormone immunoassay. *Physiologia Plantarum*, 54(2), 230–234. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb06331.x>

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell*, 15(11), 2532–2550. <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>

Werner, T., & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.002>

Wu, Y., & Hu, B. (2009). Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7657–7663. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.008>

Wulfetange, K., Lomin, S. N., Romanov, G. A., Stolz, A., Heyl, A., & Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, 156(4), 1808–1818. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180539>

Zürcher, E., & Müller, B. (2016). Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function-Advances and New Insights. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 324). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.01.001>

Zwir-Ferenc, A., & Biziuk, M. (2006). Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677–690.