



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

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

**IZOLACE A KVANTIFIKACE CYTOKININŮ VE VYBRANÉM ROSTLINNÉM
MATERIÁLU (POMOCÍ UPLC – MS/MS)**

Bakalářská práce

Autor: **Jakub HRDLIČKA**
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Karel DOLEŽAL, Dr.**

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jakub Hrdlička
Název práce:	Izolace a kvantifikace cytokininů ve vybraném rostlinném materiálu (pomocí UPLC – MS/MS)
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce:	Mgr. Karel Doležal, Dr.
Rok obhajoby práce:	2013
Abstrakt:	Bakalářská práce se zabývá izolací a kvantifikací cytokininů a jejich metabolitů v explantátech konopí setého, které byly pěstovány na médiích s různým přídatkem cytokininů. Podstatou analýzy bylo zjištění vlivu přidaných cytokininů na metabolismus endogenních cytokininů a tvorbu neaktivních (toxických) metabolitů. Ke stanovení bylo využito ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.
Klíčová slova:	cytokininy, rostlinné tkáňové kultury, konopí seté
Počet stran:	40
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author's first name and Suriname: Jakub Hrdlička

Title of thesis: Isolation and kvantification of cytokinins in selected plant material (using UPLC - MS/MS).

Type of thesis: Bachelor

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

Supervisor: Mgr. Karel Doležal, Dr.

The year of presentation: 2013

Abstract: This thesis deals with the isolation and quantification of cytokinins and their metabolites in explants of *Cannabis sativa*, that were grown by using media with the addition of different amount of cytokinins. The gist of the analysis was to determine the influence of added cytokinins on metabolism of endogenous cytokinins and generation inactive (toxic) metabolites. To determine that was used ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

Keywords: cytokinins, plant tissue culture, *Cannabis sativa*

Number of page: 40

Number of appendices: 0

Language: Czech

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

V Olomouci, červen 2013

.....

podpis

Děkuji Mgr. Karlu Doležalovi, Dr. za cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval, Mgr. Lence Plačkové za laboratorní vedení, Ing. Ivě Smýkalové, Ph.D. z AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk za poskytnuté vzorky i pomoc, a RNDr. Miroslavu Grigovi, CSc. z AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk za laskavě poskytnuté fotografie.

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratk	7
1 Úvod a cíle práce.....	11
2 Cytokininy.....	12
2.1 Biosyntéza.....	13
2.1.1 Isoprenoidní cytokininy	13
2.1.2 Aromatické cytokininy.....	13
2.2 Metabolismus	13
2.2.1 Cukerné konjugáty	14
2.3 Degradace.....	14
2.4 Stanovení cytokininů.....	16
3 Rostlinné tkáňové kultury	17
3.1 Indukce kalusu	17
4 Experimentální část.....	19
4.1 Materiál	19
4.2 Přístrojová technika a chemikálie	19
4.3 Příprava vzorků	21
4.3 Separace a kvantifikace cytokininových metabolitů metodou UPLC-ESI-MS/MS.....	22
5 Výsledky	23
6 Diskuze.....	28
7 Závěr	32
8 Použitá literatura	33

Seznam zkratek

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyoctová kyselina
3MeOBA9THPP	3-methoxy(-6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl)purin
ABA	kyselina abscisová
AMP	adenosinmonofosfát
ADP	adenosindifosfát
AP	alkalická fosfatasa
B	frakce obsahující volné báze, ribosidy a N-glukosidy
BAP	6-benzylaminopurin
BAP9G	6-benzylaminopurin-9-glukosid
BAP9THP	6-benzylamino-9-(tetrahydroxypranyl)purin
BAPR	6-benzylaminopurin ribosid
BAPR5'MP	6-benzylamino-5-(monofosfát)purin
CK	cytokinin
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZ9G	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
cZOG	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
cZR5'MP	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5-monofosfát
cZROG	<i>cis</i> -zeatin ribosid- <i>O</i> -glukosid
DHZ	dihydrozeatin
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid
DHZOG	dihydrozeatin- <i>O</i> -glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DHZR5'MP	dihydrozeatin ribosid-5-monofosfát

DHZROG	dihydrozeatin ribosid- <i>O</i> -glukosid
DMAPP	dimethylallyldifosfát
GC–MS	spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GC	plynová chromatografie
HPLC–MS/MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	indol-3-octová kyselina
IAC	imunoafinitní chromatografie
INCYDE	2-chloro-6-(3-methoxyfenyl)aminopurin
iP	6-isopentenylaminopurin
iP9G	6-isopentenylamino-9-(glukosid)purin
iPR	6-isopentenylaminopurin ribosid
iPR5'MP	6-isopentenylamino-5-(monofosfát)purin
IPT	isopentenyltransferasa
K	6-furfurylaminopurin, kinetin
K9G	kinetin-9-glukosid
KR	kinetin ribosid
KR5'MP	kinetin ribosid-5-monofosfát
LC–MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC	kapalinová chromatografie
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MS medium	Murashige – Skoog médium
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mT	<i>meta</i> -topolin
mT9G	<i>meta</i> -topolin-9-glukosid

mTOG	<i>meta</i> -topolin <i>O</i> -glukosid
mTR	<i>meta</i> -topolin ribosid
mTR5'MP	<i>meta</i> -topolin ribosid-5-monofosfát
mTROG	<i>meta</i> -topolin ribosid <i>O</i> -glukosid
NAA	naftalen-1-octová kyselina
NT	frakce obsahující nukleotidy
OG	frakce obsahující <i>O</i> -glukosidy
oT	<i>ortho</i> -topolin
oT9G	<i>ortho</i> -topolin-9-glukosid
oTOG	<i>ortho</i> -topolin <i>O</i> -glukosid
oTR	<i>ortho</i> -topolin ribosid
oTR5'MP	<i>ortho</i> -topolin ribosid-5-monofosfát
oTROG	<i>ortho</i> -topolin ribosid <i>O</i> -glukosid
pT	<i>para</i> -topolin
pTOG	<i>para</i> -topolin <i>O</i> -glukosid
pTR	<i>para</i> -topolin ribosid
pTR5'MP	<i>para</i> -topolin ribosid-5-monofosfát
pTROG	<i>para</i> -topolin ribosid <i>O</i> -glukosid
RIA	radioimunoanalýza
TDZ	thidiazuron
TLC	tenkovrstvá chromatografie
tRNA-IPT	tRNA – isopentenyltransferasa
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZ9G	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
tZOG	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZR5'MP	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5-monofosfát

tZROG	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
UPLC–MS/MS	spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie

1 Úvod a cíle práce

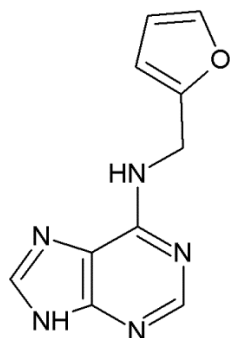
Cytokininy patří mezi rostlinné hormony, tzv. fytohormony. Jejich hlavní funkcí je stimulace buněčného dělení rostlinných buněk v přítomnosti auxinů. Toho je využíváno v tkáňových kulturách, kde se pomocí úprav poměrů cytokininů a auxinů v kultivačním médiu a s využitím totipotence dá vypěstovat i z jedné buňky požadované rostlinné pletivo nebo i celá rostlina. Cytokininy tedy jsou organické sloučeniny regulující růst a vývoj rostlin.

Bakalářská práce se zabývá izolací a kvantifikací cytokininů a jejich metabolitů v explantátech konopí setého, které byly pěstovány na médiích s různým přídavkem cytokininů. Podstatou analýzy bylo zjištění vlivu přidaných cytokininů na metabolismus endogenních cytokininů a tvorbu neaktivních (toxických) metabolitů. Ke stanovení bylo využito ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

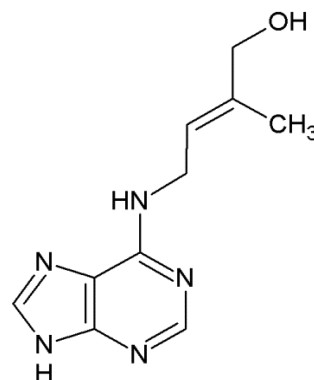
2 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou fytohormony, strukturně N⁶ deriváty adeninu, které se dle navázaného substituentu rozdělují na aromatické a isoprenoidní. Jedná se o organické sloučeniny regulující růstové a vývojové procesy rostlin, které v přítomnosti auxinu stimuluji buněčné dělení. Řadí se mezi tzv. stimulatory (růst podněcující), jež jsou účinné v nízkých koncentracích $10^{-10} - 10^{-15}$ mol/g čerstvé hmoty. (Tarkowski et al., 2004).

Historicky prvním objeveným CK byl 6-furfurylaminopurin - kinetin (Obr. 1), který v 50. letech 20. století objevil profesor Skoog se svými kolegy v autoklávované DNA izolované ze sledího spermatu. V rostlinách byl jako první objeven *trans*-zeatin (Obr. 2), izolovaný z nezralého endospermu kukuřice v 60. letech 20. století. Armstrong a Skoog poté definovali CK jako látku podporující buněčné dělení v přítomnosti auxinu a vykonávající funkce růstových regulátorů, stejně jako kinetin (Skoog et al., 1970).



Obr. 1, Struktura kinetinu



Obr. 2, Struktura *trans*-zeatinu

Hlavní funkcí CK je stimulace buněčného dělení v přítomnosti auxinů. Mezi další funkce CK patří inhibice tvorby kořenů a stimulace tvorby výhonků, růst postranních pupenů, oddálení senescence, zvyšující odolnost vůči stresům, hromadění chlorofylu a podpory přeměny etioplastů na chloroplasty a otevírání průduchů u některých druhů rostlin (Davies, 2010).

2.1 Biosyntéza

2.1.1 Isoprenoidní cytokininy

Biosyntéza isoprenoidních CK probíhá degradací tRNA nebo isopentenylací volných nukleotidů adeninu. Prvním objeveným substrátem pro biosyntézu iP a iPR byl dimethylallyldifosfát (DMAPP) a AMP u *Dictyostelium discoideum* (Taya et al., 1978). Při této reakci byl primárním produktem iPRMP. Reakci katalyzovala isopentenyltransferasa (IPT). Později bylo zjištěno, že IPT může jako isoprenoidní akceptor využívat AMP i ADP (Ihara et al., 1984).

Gen kódující IPT byl poprvé objeven u *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi et al., 1984; Barry et al., 1984). Jednalo se o gen *tmr*. Později byl tento gen doplněn ještě o jeden, *tzs*. *tmr* je zakódována v T-DNA Ti-plazmidu, *tzs* je lokalizován v oblasti virulence. Po infekci je *tmr* začleněna do genomu hostitelské rostliny, *tzs* zůstává v bakterii.

Geny kódující rostlinné IPT byly poprvé objeveny u *Arabidopsis thaliana* (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001). Genom *Arabidopsis* obsahuje 9 IPT genů (*AtIPT1* až *AtIPT9*), které jsou podobné genům *tmr* a *tzs*. Tyto geny můžeme rozdělit do dvou skupin, na tRNA-IPT, geny kódující enzym modifikující tRNA (*AtIPT2* a *AtIPT9*), a ostatní geny (*AtIPT1*, *AtIPT3* až *AtIPT8*), pro biosyntézu CK *de novo*, IPT. tRNA-IPT a IPT jsou strukturně příbuzné.

2.1.2 Aromatické cytokininy

Přítomnost aromatických CK byla objevena u některých rostlin, např. topol (Strnad, 1997) nebo *Arabidopsis* (Tarkowská et al., 2003). Nejvyšší aktivitu mezi těmito CK má metatopolin. V rostlinách se vyskytují ve formě volných bazí, nukleotidů, nukleosidů a glukosidů (Strnad, 1997). Část metabolické dráhy by tedy měla být shodná s isoprenoidními CK. Enzymy katalyzující biosyntézu a jednotlivé přeměny mezi mT, oT a BAP však nebyly doposud popsány. Vliv AtIPT transferáz isoprenoidních cytokininů na aromatické CK nebyl prozatím zkoumán.

2.2 Metabolismus

Metabolická dráha CK byla nejprve popsána na základě pozorování exogenně vpravených radioaktivně značených cytokininů do rostliny. Takto značené CK jsou po aplikaci rychle distribuovány mezi příslušné nukleotidy, nukleosidy a báze. Následně jsou metabolizovány

na produkty degradace nebo cukerné konjugáty (Letham, 1994). Metabolismus CK můžeme rozdělit na dva typy:

1. substituce na purinovém jádře
2. reakce probíhající na postranním řetězci

Modifikace adeninu jsou shodné s metabolickými drahami purinů. Doposud však nebyl objeven enzym s úplnou specifitou pro cytokininy (Davies, 2010).

Naopak pro úpravu postranních řetězců se zdají být enzymy pro cytokininy specifické. (Davies, 2010).

2.2.1 Cukerné konjugáty

K *N*-glykosylaci CK dochází na 3, 7 a 9 pozici purinového zbytku. Modifikace 7- a 9- pozice CK inaktivuje. Tvorbu 7- a 9-glukosidů katalyzuje glukosyltransferasa (ES 2.4.1.118) pomocí UDP nebo TDP glukosy. Tvorba 7-glukosidů probíhá přednostně, u tZ 10x více, u cZ až 21x více (Entsch et al., 1979). Hodnoty *K_m* pro tZ a UDP-glukosu jsou 150 μM a 190 μM. Biochemická podstata glukosyltransferasy pro modifikaci 3- pozice nebyla doposud popsána. *N*-glukosidy nemohou být hydrolyzovány β-glukosidasou, takže jejich modifikace je nevratnou inaktivací (Davies, 2010).

O-glykosylace izoprenoidního postranního řetězce vede k tvorbě *O*-β-D-glukopyranosyl derivátu tZ a/nebo cZ. Většina zeatin *O*-glukosyltransferas je specifická pro tZ typ CK. Hodnoty *K_m* pro tZ a UDP-glukosu jsou 28 μM a 200 μM při optimálním pH 8,0 (Mok et al., 1994). Gen pro transferasu byl poprvé identifikován v *Phaseolus lunatus* (Martin et al., 1999). cZ specifické glukosyltransferasy, cisZOG1 (Martin et al., 2001) a izoenzym cisZOG2 preferují cZ izomer před tZ (Veach et al., 2003). Enzym využívá cZ a UDP-glukosu, ale nedokáže využít tZ, DHZ, cZR, tZR nebo UDP-xylosu. cisZOG1 *O*-glukosidy jsou hydrolyzovány β-glukosidasou, což vede k uvolnění aktivních bazí (Davies, 2010).

2.3 Degradace

Degradace CK má obrovský význam při regulaci cytokininové aktivity v rostlině. Tato reakce je katalyzována cytokinin oxidasou/dehydrogenasou (CKX). CK a některé jejich metabolity jsou díky CKX štěpeny na adenin a vedlejší postranní řetězec (Obr. 3). Aktivita CKX byla poprvé objevena v roce 1970 a během následujících třiceti let byla popsána u

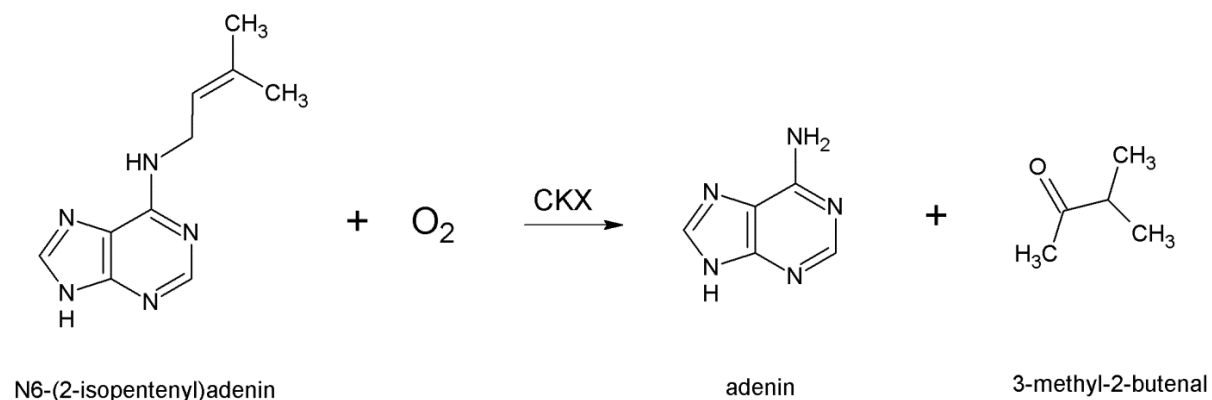
roślin. Jedná se o monomerní enzym o velikosti kolem 60 kD, některé purifikované enzymy mohou být glykosylovány. CKX degraduje báze a nukleosidy cytokininů. Delta-2 dvojná vazba v isoprenoidním postranním řetězci iP a tZ se zdá být důležitá k rozpoznání substrátu, protože redukcí této vazby se poskytuje rezistence k CKX. DHZ cytokininy a jejich metabolity jsou tedy vůči CKX odolné. Některé modifikace na postranním řetězci, např. O-glukosylace, také zvyšují tuto rezistenci vůči CKX (Davies, 2010).

Reakční mechanismus byl popsán jako měď obsahující aminooxidasa. Ta má za úkol katalýzu oxidace biogenních primárních aminů na aldehydy, amoniak a peroxid vodíku přes meziproduct imin. Analýza tohoto reakčního metabolismu CKX však přinesla otázku, zda se opravdu jedná o oxidasu. V CKX izolované z pšenice byla objevena přítomnost FAD obsahující flavoprotein. Tato CKX tedy nevyžaduje ke své funkci přítomnost kyslíku (Obr. 4). CKX se tedy chová spíše jako dehydrogenasa (Galuszka et al., 2001).

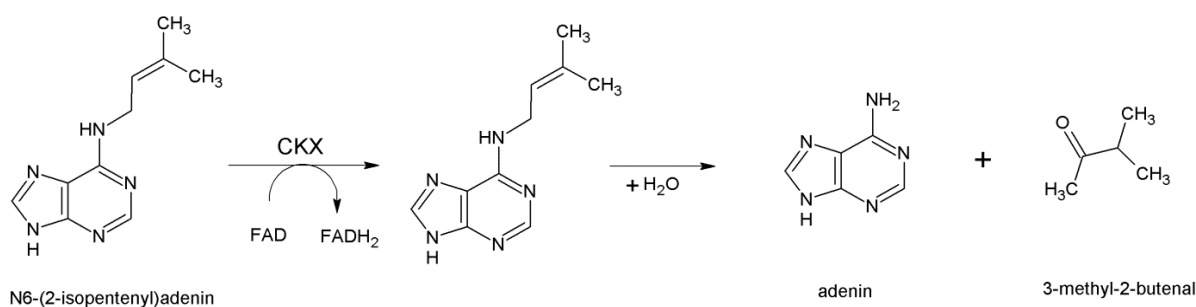
Některé fenolické sloučeniny jsou schopny aktivovat CKX *in vitro*. Tyto látky slouží jako signální molekuly z hostitelských rostlin a geny viru *Agrobacterium* Ti plazmidu. Díky těmto látkám můžeme kontrolovat genovou expresi a degradaci cytokininů (Davies, 2010).

CK typu phenylmočovina jsou středně silnými inhibitory CKX (Kopečný et al., 2010).

V *Arabidopsis* bylo nalezeno sedm genů pro CKX (Bilyeu et al., 2001). Každý z těchto genů vykazoval odlišné modely exprese. Činnost CKX je indukována zvýšeným obsahem cytokininů (Chatfield et al., 1986).



Obr. 3, Mechanismus degradace cytokininu (Davies, 2010).



Obr. 4, Mechanismus degradace cytokininu bez přítomnosti kyslíku (Davies, 2010).

2.4 Stanovení cytokininů

Kvalitativní i kvantitativní analýza CK v rostlinném materiálu vyžaduje spojení efektivního purifikačního postupu a citlivé selektivní analytické koncovky. První chromatografickou metodou použitou k analýze fytohormonů byla tenkovrstvá chromatografie (TLC) (Davey et al., 1979). Kvůli nízké separační účinnosti a citlivosti byla TLC nahrazena instrumentálními metodami jako plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC–MS) (Prinsen et al., 1995b), kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC–MS) (Prinsen et al., 1995a; Prinsen et al., 1995b; Van Rhijn et al., 2001; Novák et al., 2003), radioimunoanalýza (RIA) a ELISA testy (MacDonald et al., 1985; Strnad et al., 1992).

Nejpoužívanější metou se v současné době stala kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) (Zhang et al., 2001; Chiwocha et al., 2003; Bredmose et al., 2005; Ge et al., 2005). Další zlepšení pro stanovení CK vedlo k následnému nahrazení HPLC ultraúčinnou kapalinovou chromatografií (UPLC) (Zhao et al., 2006).

Zavedení UPLC přineslo vyšší separační účinnost, rozlišení, citlivost, rychlost a propustnost vzorků (Nguyen et al., 2006; Wu et al., 2007; Nováková et al., 2009). Rychlá chromatografická separace a nízká koncentrace analytu ve vzorku vyžadovala citlivou a rychlou skenovací metodu, kterou poskytla tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). UPLC-MS/MS byla specifikována pro analýzu rostlinných hormonů (Naito et al., 2007; Arite et al., 2007; Zentella et al., 2007; Hirano et al., 2007; Novák et al., 2008; Kojima et al., 2009; Turečková et al., 2009).

3 Rostlinné tkáňové kultury

Skoog a Miller (1957) dokázali, že diferenciaci orgánů může být manipulována změnami relativních koncentrací auxinů a CK v kultivačním médiu. Rostlinné tkáňové kultury umožňují pěstovat rostliny v umělém prostředí za použití růstových regulátorů – CK a auxinů. Tento proces probíhá ve sterilních podmínkách na speciálních živných médiích a vychází z totipotence rostlinné buňky, která je ovlivněna přidanými fytohormony (Motte, 2013). Užitím této metody dochází k ovlivnění přirozené biosyntézy cytokininů v rostlině (Hutchison et al., 2002; Pan et al., 2008; Jiang et al., 2010). Kromě auxinů a CK lze pro některé aplikace využít i jiných růstových regulátorů, například pyrabactin jako agonista ABA (Park et al., 2009) nebo strigolaktony (Umehara et al., 2008).

V takto pěstovaných rostlinách se vyskytují CK dvojího původu. Exogenní cytokininy, které se do rostliny dostanou z média, na němž je rostlina kultivována a endogenní cytokininy, které se tvoří přímo v rostlině. Jejich hlavní funkcí je ovlivnění rovnováhy mezi tvorbou kořene a prýtu, stupeň apikální dominance a mají také vliv na oddálení senescence (Motte, 2013).

Auxiny přidávané do média stimulují růst rostliny, řídí diferenciaci a prodlužování částí rostliny. Jedná se zpravidla o IAA a jí strukturně příbuzné látky (Davies, 2010).

Volba typu média, želírujících prostředků i typu a koncentrace růstových regulátorů je založena na požadavcích růstových faktorů, jako je množení výhonků, zakořenění, vzhled rostlin nebo aklimatizační podmínky (Aremu et al., 2012a).

Tato metoda je vhodná ke studiu mechanismu regenerační plasticity, testování hormonální citlivosti rostlin a tvorby sterilních linií rostlin (Sugimoto et al., 2013).

3.1 Indukce kalusu

Většina rostlinných pletiv reaguje na přítomnost zvýšené koncentrace cytokininu a auxinu dělením buněk, které vede k tvorbě kalusu. Pro indukci kalusu jsou nejčastěji používány syntetické auxiny (2,4-D a NAA). Jejich účinek je nejspíše způsoben akumulací uvnitř buňky (Meijer et al., 1999) a neschopností je vyloučit (Delbarre et al., 1996). Během počáteční fáze indukce kalusu může být přítomnost cytokininů nutná k udržení růstu. Po vzniku subkultur může dojít k omezení potřeby přítomnosti cytokininů (Meins, 1989). Přítomnost cytokininů koreluje s nárůstem exprese signálních genů cytokininů (Pischke et

al., 2006). Cytokinin TDZ může také indukovat kalusy v různých systémech rostlinných kultur (Murthy et al., 1998), pravděpodobně proto, že kromě své vazby na receptor cytokininů u *Arabidopsis* (Yamada et al., 2001; Spíchal et al., 2004) reguluje také signalizaci auxinů ovlivněním transportu auxinů (Suttle, 1988) a je středně silným inhibitorem CKX, čímž zvyšuje endogenní hladiny přirozených cytokininů.

Kalusy mají různé tvary, barvu a vnitřní strukturu, z čehož lze odvodit, že auxiny zprostředkovaná dediferenciace explantátových buněk není úplná. Stejný explantát může generovat několik typů kalusů odlišné morfogenetické regenerační kapacity. Většina studií ukazuje, že pletivo, inkubační podmínky, světlo a teplota jsou důležité parametry, které určují regenerační schopnosti kalusu (George et al., 2008).

4 Experimentální část

4.1 Materiál

Explantáty (kalusy) konopí setého (*Cannabis sativa* L.) byly pěstovány (Ing. I. Smýkalová, Ph.D., AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk) na MS a IMB4 médiích s různým obsahem přidaných CK (tab. 1). V prvním experimentu byla koncentrace přidaných CK na MS medium 7 $\mu\text{mol/l}$, pro druhý experiment byla tato koncentrace navýšena na 20 $\mu\text{mol/l}$. IMB4 médium obsahovalo konstantní koncentraci 2,9 $\mu\text{mol/l}$ K a 4,44 $\mu\text{mol/l}$ BAP pro oba experimenty.

Tab. 1, Média s přidavkem CK použítá k pěstování explantátů konopí setého připravena v Agritec, Šumperk

médium	přidaný cytokinin
MS ₁ medium	BAP
MS ₂ medium	meta - topolin
MS ₃ medium	BAP + INCYDE
MS ₄ medium	BAP9THP
MS ₅ medium	BAP + BAP9THP
IMB4	K + BAP

4.2 Přístrojová technika a chemikálie

Kulový mlýnek MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany)

Mechanický rotátor Stuart

Centrifuga AvantiTM (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

DEAE-Sephadex A25 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Bond Elut – SCX, 100 mg/1 ml (Varian)

Spe-ed SPE Cartridge C18/18%, 100 mg/ 1 ml (Applied Separation)

Preimunní (PI) a imunoafinitní (IA) kolony s agarózovým gelem Affi-Gel 10 (Bio-Rad Labs, Hercules, USA) s monoklonálními protilátkami anticytokininu NZRD nebo 1G6 (Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého, Olomouc)

Vakuová rotační odparka Rotavapor® R-200 (Buchi Labortechnik AG, Postfach, Switzerland)

Biological thermostat BT120

MicroTubes Brand

Micro Insert 0,1 ml, 28x6 mm, with Spring Bottom, Supelco, USA

Deionizovaná (Milli-Q) H₂O

Bielsky pufr (60 % MetOH + 25 % CHCl₃ + 10 % H₂O + 5 % HCOOH)

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

Methanol, Gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv, Merck

Ethylalkohol pro UV Spektroskopii, 99,8%, Lachner, Česká Republika

Mravenčan amonný, Sigma-Aldrich, USA

Chlorid sodný, Lachner, Česká Republika

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, Lachner, Česká Republika

Hydrogenuhlíčitán sodný, Lachner, Česká Republika

Octan amonný, Sigma-Aldrich, USA

β-glukosidasa (2,31 U/mg), Sigma-Aldrich, USA

Alkalická fosfatasa (±3,5 U/mg), EIA Grade, Invitrogen, USA

Equilibrační směs SCX (50 % MetOH + 2 % HCOOH)

Eluční směs 1 (60 % MetOH + 40 % 4 M NH₃)

Eluční směs 2 (80 % MetOH + 2 % CH₃COOH)

PBS (50 mM NaH₂PO₄ · 2 H₂O (7,8 g/l) + 15 mM NaCl (0,877 g/l); pH 7,2)

50 mM NaHCO₃ (420 mg/100 ml; pH 9,6)

100 mM NH₄COOCH₃ (770 mg/100 ml, pH 5)

4.3 Příprava vzorků

Vzorky kalusu konopí setého byly homogenizovány pod tekutým dusíkem. Každý vzorek rostlinného materiálu rozvážen na příslušné triplikáty po $0,125 \pm 0,005$ g do 2 ml mikrozkušavek. Zhomogenizované zbytky vzorků byly uskladněny při -70 °C.

Přesně navážené vzorky byly extrahovány 1 ml Bieleški pufrem, ke kterým byly přidány vnitřní (interní) standardy cytokininů (10 μ l 10^{-7} M B, 20 μ l 10^{-7} M OG, 20 μ l 10^{-7} M NT) pro kvantitativní stanovení. Další homogenizace byla provedena na kulovém mlýnku (27 Hz; 3 min; 4 °C) a ultrazvuku (5 min; 4 °C). Extrakce vzorků konopí setého proběhla na rotátoru Stuart při 4 °C po dobu 30 minut. Následovala centrifugace (15000 rpm; 10 min; 4 °C), po které byly supernatanty odebrány a sedimenty reextrahovány 1 ml Bieleški pufrem.

Prvním purifikačním krokem cytokininů bylo použití iontoměniče SCX. Po kondicionaci a equilibraci těchto SPE kolon se nanasy spojené supernatanty extrakce a reextrakce. Kolony byly poté promyty Bieleški pufrem a MetOH a následně eluovány 3 ml eluční směsí 1. Takto získané eluáty byly odpařeny na vodnou fázi na vakuové odparce.

Vodné fáze byly zředěny 4 ml 10 mM HCOONH₄ a nanasy na soustavu kolon DEAE Sephadex - C18 (100 mg/1 ml) (Novák et al., 2003), kde došlo k oddělení B a OG frakce od NT frakce. Při promytí DEAE-Sephadex 10 mM HCOONH₄ došlo k uvolnění B a OG frakcí do C18. Po přesunu DEAE-Sephadex na nové C18 kolonky a jejich promytím 1 M HCOONH₄ přešly NT frakce do těchto SPE kolon. Jednotlivé frakce z C18 byly eluovány 4 ml eluční směsí 2 a eluáty odpařeny do sucha na vakuové odparce.

Posledním purifikačním krokem bylo použití imunoafinitní chromatografie (IAC). Tato purifikační metoda je založena na interakci protilátka – antigen za vzniku imunokomplexu (Ab-Ag) (Chase, 1983). Odparky B a OG frakcí byly rozpuštěny v 50 μ l 70% EtOH a 450 μ l PBS. Vzorky byly jednou nanasy na preimunní (PI) a opakovaně na imunoafinitní (IA) kolonky, kde došlo k oddělení OG frakcí, které zůstaly v promývacím roztoku. B frakce byly získány vyeluováním 3 ml MetOH (-20 °C). Eluáty B i OG frakcí byly odpařeny do sucha na vakuové odparce.

Dalším krokem přípravy vzorku bylo enzymatické štěpení OG a NT frakce, β -glukosidasou a alkalickou fosfátasou, za účelem převedení na volné báze. Odparky OG frakcí byly rozpuštěny v 200 μ l 100 mM NH₄COOCH₃ a 50 μ l β -glukosidasy a inkubovány v biologickém termostatu (1 hod; 37 °C; tma). Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 750 μ l PBS a vzorky opakovaně nanasy na IA kolonky. Po promytí PBS byly

OG frakce vyeluovány 3 ml MetOH (-20 °C). Odparky NT frakcí byly rozpuštěny v 20 µl 70% EtOH, 180 µl NaHCO₃ a 50 µl alkalické fosfatázy (AP) a inkubovány (2 hod; 37 °C; tma). Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 250 µl PBS a vzorky naneseny na PI a opakovaně na IA kolonky. Po promytí PBS byly NT frakce vyeluovány 3 ml MetOH (-20 °C). Eluáty opět odpařeny do sucha na vakuové odparce.

4.4 Separace a kvantifikace cytokininových metabolitů metodou UPLC-ESI-MS/MS

Pro kvalitativní a kvantitativní stanovení cytokininů metodou UPLC-MS/MS se vzorky rozpustily ve 30 µl směsi MetOH s 15mM NH₄COOH (poměr 1:9) a převedly se do 2 ml vialek s 0,1 ml mikro-insertem. 15 µl každého vzorku bylo naneseno na reverzní fázi kolony (BEH C18, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm; Waters). Vzorky byly eluovány s 5-ti minutovým lineárním gradientem metanolem a 15mM mravenčanem amonným (pH 4,0) v poměru od 10:90 do 100:0 při průtokové rychlosti 0,5 ml/min a teplotě kolony 40 °C. Poté byla kolona promyta a equilibrována na původní podmínky, za kterých byly retenční časy sledovaných látek v rozmezí skenování píků: 1,0 až 4,2 minut. Eluce byla detekována UV detektorem s diodovým polem (rozsah skenování 210-400 nm s rozlišením 1,2 nm, vzorkovací frekvence 10 spekter/s) a tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS).

MRM analýza byla provedena za následujících podmínek: kapilární napětí 2,51 kV; teplota zdroje/desolvatačního plynu 120/550 °C; průtok desolvatačním plynem 600 l/h; LM/HM rozlišení 12,5; energie iontů 1 0,9 V; energie iontů 2 0,5 V, vstupní, výstupní napětí a napětí násobiče 2,0 V, 2,0 V a 650 eV. Jako kolizní plyn byl použit argon. Doby prodlevy, napětí kužele a kolizní energie pro jednotlivé přechody byly optimalizovány pro maximální citlivost. Doba prodlevy pro každý MRM kanál byla vypočtena na 16 skenovacích bodů na pík, během této doby bylo mezikanálové zpoždění 0,1 s a doba cyklů byla 0,55 – 0,65 s. Měření proběhlo na Acquity UPLCTM System, 2996 PDA detector, XEVO TQ MS (modifikováno Novák et al., 2008: eluce s 5-ti minutovým lineárním gradientem metanolem a mravenčanem amonným v poměru od 10:90 do 100:0 při průtokové rychlosti 0,5 ml/min; retenční časy sledovaných látek v rozmezí skenování píků: 1,0 až 4,2 minut; kapilární napětí 2,51 kV; teplota zdroje/desolvatačního plynu 120/550 °C; průtok desolvatačním plynem 600l/h; energie iontů 1 0,9 V; energie iontů 2 0,5 V).

5 Výsledky

Ve vzorcích bylo izolováno a s využitím UPLC-MS/MS stanoveno 47 metabolitů cytokininů. Zjištěné koncentrační hladiny jsou uvedeny v tabulkách 2 – 5. Vždy byly analyzovány tři technické replikáty, získané výsledky byly statisticky zpracovány.

Tab.2. Hladina cvtokininů a jejich metabolitů v rostlinách [pmol/gFW]

Odrůda 1	tZ	tZOG	tZR	tZROG	tZ9G	tZRS'MP
MS ₁ ,medium: 7 μM BAP	10,977 ± 3,206	2,777 ± 0,694	0,333 ± 0,060	1,686 ± 0,339	<LOD	11,753 ± 9,508
MS ₂ ,medium: 7 μM Meta-Topolin	13,307 ± 2,740	<LOD	0,435 ± 0,066	4,583 ± 0,683	<LOD	14,061 ± 11,158
MS ₃ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	0,537 ± 0,401	1,875 ± 1,281	0,296 ± 0,058	2,512 ± 0,111	<LOD	<LOD
MS ₄ ,medium: 7 μM BAP9THP	1,693 ± 0,437	0,460 ± 0,200	0,401 ± 0,165	2,526 ± 0,448	<LOD	<LOD
MS ₅ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	0,686 ± 0,813	0,449 ± 0,117	0,384 ± 0,118	5,666 ± 1,149	<LOD	1,001 ± 0,368
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	1,619 ± 0,192	1,056 ± 0,310	1,149 ± 0,199	11,198 ± 2,525	<LOD	12,102 ± 3,731
Odrůda 1	cZ	cZOG	cZR	cZROG	cZ9G	cZRS'MP
MS ₁ ,medium: 7 μM BAP	<LOD	0,717 ± 0,035	<LOD	6,386 ± 1,408	<LOD	<LOD
MS ₂ ,medium: 7 μM Meta-Topolin	0,502 ± 0,155	<LOD	<LOD	3,870 ± 1,333	<LOD	<LOD
MS ₃ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	0,266 ± 0,029	1,093 ± 0,371	<LOD	8,987 ± 1,308	2,241 ± 0,800	<LOD
MS ₄ ,medium: 7 μM BAP9THP	0,230 ± 0,030	0,450 ± 0,196	2,066 ± 0,393	4,184 ± 0,385	<LOD	4,460 ± 1,624
MS ₅ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	0,122 ± 0,048	0,460 ± 0,091	1,457 ± 0,316	4,578 ± 0,373	<LOD	2,399 ± 0,927
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	0,108 ± 0,019	0,497 ± 0,195	1,526 ± 0,257	3,982 ± 0,191	0,098 ± 0,051	8,039 ± 1,688
Odrůda 1	DHZ	DHZOG	DHZR	DHZROG	DHZ9G	DHZRS'MP
MS ₁ ,medium: 7 μM BAP	0,079 ± 0,074	1,932 ± 0,212	0,654 ± 0,220	100,843 ± 9,786	<LOD	<LOD
MS ₂ ,medium: 7 μM Meta-Topolin	0,103 ± 0,032	4,410 ± 0,918	1,767 ± 0,479	237,495 ± 22,252	<LOD	<LOD
MS ₃ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	0,234 ± 0,209	5,320 ± 1,604	2,998 ± 1,697	297,708 ± 63,418	<LOD	10,049 ± 1,492
MS ₄ ,medium: 7 μM BAP9THP	0,188 ± 0,036	0,560 ± 0,025	4,439 ± 0,819	104,757 ± 11,760	<LOD	6,349 ± 4,246
MS ₅ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	1,317 ± 0,377	5,645 ± 0,870	26,511 ± 4,508	979,808 ± 77,965	<LOD	56,855 ± 16,903
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	2,253 ± 0,376	11,308 ± 4,655	50,735 ± 8,948	1768,268 ± 490,549	<LOD	96,532 ± 30,134
Odrůda 1	mT	mTOG	mTR	mTROG	mT9G	mTRS'MP
MS ₁ ,medium: 7 μM BAP	6,156 ± 1,021	28,601 ± 15,653	0,879 ± 0,033	5,188 ± 3,756	<LOD	<LOD
MS ₂ ,medium: 7 μM Meta-Topolin	225,110 ± 33,791	1751,132 ± 210,209	66,000 ± 6,972	6879,308 ± 797,832	11,169 ± 9,622	367,677 ± 35,582
MS ₃ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	5,870 ± 0,277	31,424 ± 18,487	0,213 ± 0,133	12,685 ± 4,386	1,529 ± 0,013	1,638 ± 0,286
MS ₄ ,medium: 7 μM BAP9THP	0,837 ± 0,375	3,337 ± 0,702	0,168 ± 0,137	0,838 ± 0,475	0,065 ± 0,017	0,292 ± 0,068
MS ₅ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	<LOD	0,573 ± 0,162	0,189 ± 0,075	3,116 ± 0,586	0,182 ± 0,093	0,236 ± 0,130
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	<LOD	<LOD	0,042 ± 0,017	1,036 ± 0,230	<LOD	0,531 ± 0,439
Odrůda 1	oT	oTOG	oTR	oTROG	oT9G	oTRS'MP
MS ₁ ,medium: 7 μM BAP	3,026 ± 0,381	8,906 ± 1,716	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₂ ,medium: 7 μM Meta-Topolin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₃ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	2,866 ± 1,005	8,550 ± 2,301	0,434 ± 0,056	3,961 ± 0,777	<LOD	<LOD
MS ₄ ,medium: 7 μM BAP9THP	218,643 ± 36,212	89,334 ± 10,872	2,010 ± 0,370	6,375 ± 0,741	<LOD	4,897 ± 1,105
MS ₅ ,medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	47,657 ± 2,993	22,041 ± 1,916	1,230 ± 0,104	5,370 ± 0,471	<LOD	3,008 ± 0,849
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	1,328 ± 0,432	0,798 ± 0,258	0,230 ± 0,057	1,475 ± 0,221	<LOD	1,166 ± 0,499

Tab.3, Hladina cytokininů a jejich metabolitů v rostlinách [pmol/gFW]

Odrůda 1	pT	pTOG	pTR	pTRG	pTRS'MP
MS ₁ medium: 7 μM BAP	<LOD	0,801 ± 0,426	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₂ medium: 7 μM Meta-Topolin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₃ medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	<LOD	0,697 ± 0,136	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₄ medium: 7 μM BAP9THP	0,619 ± 0,201	0,794 ± 0,363	0,102 ± 0,029	2,343 ± 0,933	0,214 ± 0,055
MS ₅ medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	0,392 ± 0,166	1,619 ± 0,454	0,304 ± 0,009	9,638 ± 1,484	0,859 ± 0,441
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	<LOD	<LOD	0,084 ± 0,012	2,896 ± 1,070	0,365 ± 0,138

Odrůda 1	K	KR	K9G	KR5'MP
MS ₁ medium: 7 μM BAP	6,630 ± 5,600	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₂ medium: 7 μM Meta-Topolin	5,427 ± 1,929	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₃ medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	4,876 ± 2,675	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₄ medium: 7 μM BAP9THP	7,051 ± 4,068	0,006 ± 0,002	<LOD	<LOD
MS ₅ medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	2,949 ± 0,756	0,007 ± 0,002	<LOD	<LOD
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	2,334 ± 1,488	0,136 ± 0,002	0,235 ± 0,048	1,118 ± 0,561

Odrůda 1	iP	iPR	iP9G	iPR5'MP
MS ₁ medium: 7 μM BAP	0,627 ± 0,070	5,353 ± 1,759	2,686 ± 0,178	42,977 ± 7,829
MS ₂ medium: 7 μM Meta-Topolin	0,419 ± 0,040	3,475 ± 0,986	0,249 ± 0,198	26,254 ± 7,059
MS ₃ medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	1,323 ± 0,199	9,045 ± 3,226	0,349 ± 0,149	47,858 ± 1,619
MS ₄ medium: 7 μM BAP9THP	0,118 ± 0,036	10,579 ± 1,044	<LOD	26,085 ± 5,680
MS ₅ medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	0,174 ± 0,119	4,346 ± 0,130	<LOD	17,473 ± 6,207
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	0,179 ± 0,059	5,237 ± 0,478	<LOD	31,646 ± 13,762

Odrůda 1	BAP	BAPR	BAP9G	BAPR5'MP
MS ₁ medium: 7 μM BAP	209,699 ± 56,615	10,251 ± 1,552	21,311 ± 19,545	77,856 ± 12,885
MS ₂ medium: 7 μM Meta-Topolin	<LOD	0,018 ± 0,016	24,888 ± 17,150	3,549 ± 2,867
MS ₃ medium: 7 μM BAP + 7 μM INCYDE	334,238 ± 52,586	68,928 ± 24,108	8,469 ± 1,218	549,100 ± 273,659
MS ₄ medium: 7 μM BAP9THP	988,264 ± 97,344	13,774 ± 1,202	0,794 ± 0,485	38,315 ± 4,066
MS ₅ medium: 7 μM BAP + 7 μM BAP9THP	1031,253 ± 177,581	208,538 ± 15,272	1,510 ± 0,855	834,556 ± 115,289
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	36,690 ± 3,732	7,174 ± 0,711	0,802 ± 0,323	33,140 ± 9,897

Tab.4. Hladina cytokininů a jejich metabolitů v rostlinách [pmol/gFW]

Odrůda 2	tZ	tZOG	tZR	tZROG	tZ9G	tZRS'MP
MS ₁ medium: 20 μM BAP	0,237 ± 0,116	2,446 ± 0,276	0,795 ± 0,080	9,276 ± 1,137	<LOD	6,087 ± 3,149
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	0,191 ± 0,023	1,729 ± 0,036	0,615 ± 0,060	6,611 ± 0,656	<LOD	5,147 ± 1,542
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	<LOD	0,418 ± 0,180	<LOD	0,996 ± 0,113	<LOD	3,403 ± 1,263
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	1,168 ± 0,174	4,038 ± 0,930	1,856 ± 0,336	5,385 ± 0,941	<LOD	5,937 ± 0,959
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	<LOD	0,406 ± 0,149	<LOD	2,047 ± 0,025	<LOD	<LOD
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	0,063 ± 0,058	1,885 ± 0,080	0,617 ± 0,115	2,504 ± 0,208	<LOD	0,993 ± 0,801
Odrůda 2	CZ	CZOG	CZR	CZROG	CZ9G	CZRS'MP
MS ₁ medium: 20 μM BAP	0,108 ± 0,030	0,486 ± 0,106	1,117 ± 0,192	8,832 ± 0,191	<LOD	9,951 ± 4,666
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	<LOD	0,307 ± 0,032	1,460 ± 0,328	8,288 ± 1,057	<LOD	3,166 ± 0,262
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	<LOD	0,452 ± 0,134	0,942 ± 0,593	8,315 ± 0,898	<LOD	5,619 ± 1,354
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	<LOD	0,516 ± 0,265	1,220 ± 0,298	5,887 ± 0,834	<LOD	4,423 ± 0,387
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	<LOD	0,443 ± 0,028	2,724 ± 0,473	4,524 ± 0,403	<LOD	5,226 ± 1,085
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	<LOD	0,311 ± 0,067	0,584 ± 0,100	4,780 ± 0,509	<LOD	9,226 ± 4,671
Odrůda 2	DHZ	DHZOG	DHZR	DHZROG	DHZ9G	DHZRS'MP
MS ₁ medium: 20 μM BAP	1,097 ± 0,081	13,126 ± 0,804	14,333 ± 0,485	358,619 ± 40,854	<LOD	19,143 ± 3,303
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	0,539 ± 0,110	9,394 ± 0,897	16,935 ± 2,591	357,046 ± 30,486	<LOD	16,685 ± 4,248
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	<LOD	0,780 ± 0,071	0,169 ± 0,145	20,976 ± 1,311	<LOD	<LOD
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	0,186 ± 0,086	3,316 ± 1,059	5,285 ± 1,015	71,712 ± 10,999	<LOD	5,176 ± 2,304
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	<LOD	0,404 ± 0,035	0,458 ± 0,185	9,343 ± 0,578	<LOD	<LOD
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	<LOD	1,611 ± 0,171	0,103 ± 0,058	28,694 ± 1,386	<LOD	<LOD
Odrůda 2	mT	mTOG	mTR	mTROG	mT9G	mTRS'MP
MS ₁ medium: 20 μM BAP	3,295 ± 0,375	2,972 ± 0,501	1,276 ± 0,235	30,130 ± 0,833	<LOD	2,782 ± 0,681
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	1188,987 ± 32,876	5046,001 ± 201,058	428,675 ± 24,433	6965,161 ± 212,938	10,405 ± 0,645	802,003 ± 95,308
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	0,555 ± 0,351	1,980 ± 1,447	0,822 ± 0,559	10,618 ± 3,073	<LOD	0,536 ± 0,372
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	1,501 ± 0,247	2,847 ± 0,540	<LOD	1,564 ± 0,373	<LOD	<LOD
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	3,799 ± 0,396	52,283 ± 1,599	0,201 ± 0,022	118,426 ± 1,980	<LOD	0,059 ± 0,032
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	0,654 ± 0,540	0,544 ± 0,664	<LOD	1,449 ± 0,275	<LOD	<LOD
Odrůda 2	oT	oTOG	oTR	oTROG	oT9G	oTRS'MP
MS ₁ medium: 20 μM BAP	32,155 ± 3,964	18,499 ± 4,410	1,483 ± 0,264	1,643 ± 0,124	0,849 ± 0,187	5,231 ± 1,799
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	<LOD	<LOD	<LOD	1,636 ± 0,806	<LOD	<LOD
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	1,478 ± 0,299	1,074 ± 0,205	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	191,207 ± 21,751	201,329 ± 36,528	1,555 ± 0,158	1,971 ± 1,197	7,614 ± 1,486	2,358 ± 0,358
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	365,443 ± 41,104	193,287 ± 30,233	1,928 ± 0,487	1,566 ± 0,270	7,094 ± 2,601	1,230 ± 0,517
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	1,937 ± 1,306	0,826 ± 0,566	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tab.5, Hladina cytokininů a jejich metabolitů v rostlinách [pmol/gFW]

Odrůda 2	pT	pT _{OG}	pTR	pTROG	pTR _{5'MP}
MS ₁ medium: 20 μM BAP	3,650 ± 0,070	67,390 ± 7,412	16,240 ± 0,989	123,552 ± 17,330	12,010 ± 1,623
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	1,938 ± 0,169	0,583 ± 0,097	<LOD	<LOD	<LOD
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	1,165 ± 0,081	2,524 ± 0,132	<LOD	6,623 ± 1,174	<LOD
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	1,194 ± 0,331	2,770 ± 0,724	0,369 ± 0,203	5,297 ± 0,602	1,334 ± 0,496
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	1,770 ± 0,220	8,927 ± 1,267	1,916 ± 0,290	12,700 ± 3,448	0,779 ± 0,376
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	1,126 ± 0,144	6,900 ± 0,852	0,167 ± 0,122	13,129 ± 0,892	0,470 ± 0,062
Odrůda 2	K	KR	K9G	KR5'MP	
MS ₁ medium: 20 μM BAP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	24,487 ± 2,775	2,346 ± 0,556	4,391 ± 0,385	1,615 ± 0,985	
Odrůda 2	IP	IPR	IP9G	IPR5'MP	
MS ₁ medium: 20 μM BAP	0,064 ± 0,017	17,129 ± 2,022	<LOD	183,697 ± 33,514	
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	<LOD	4,291 ± 0,420	<LOD	43,238 ± 9,103	
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	<LOD	1,395 ± 0,903	<LOD	5,460 ± 0,948	
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	<LOD	9,049 ± 2,530	<LOD	36,652 ± 6,077	
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	<LOD	6,425 ± 0,486	<LOD	4,746 ± 0,711	
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	<LOD	2,854 ± 0,122	<LOD	5,101 ± 0,208	
Odrůda 2	BAP	BAPR	BAP9G	BAPR5'MP	
MS ₁ medium: 20 μM BAP	81,201,825 ± 9596,405	626,418 ± 52,708	13,903 ± 0,425	4119,420 ± 778,889	
MS ₂ medium: 20 μM Meta-Topolin	<LOD	1,320 ± 0,151	<LOD	10,492 ± 3,200	
MS ₃ medium: 20 μM BAP + 20 μM INCYDE	114,661 ± 22,852	3,111 ± 1,174	3,815 ± 0,259	6,247 ± 2,355	
MS ₄ medium: 20 μM BAP9THP	79851,799 ± 17292,359	17,625 ± 3,445	0,246 ± 0,065	71,002 ± 27,949	
MS ₅ medium: 20 μM BAP + 20 μM BAP9THP	109343,002 ± 41479,079	459,625 ± 47,453	3,393 ± 0,255	368,095 ± 79,136	
IMB4: 2,9 μM K + 4,44 μM BAP	694,075 ± 571,609	9,291 ± 0,712	1,758 ± 0,127	6,816 ± 1,868	

6 Diskuze

Doposud nebyl žádný z pokusů regenerace rostlin konopí nepřímo z kalusů (Obr. 7) či suspenze kultur úspěšný (Feeney et al., 2003). U kalusu a suspenze kultur se objevila tendence tvorby kořenů (Fisse et al., 1981, Hemphill et al., 1978, MacKinnon et al., 2000). Tvorba výhonků však nebyla pozorována. Současný výzkum je tedy zaměřen na hledání efektivního a spolehlivého regeneračního protokolu (Feeney et al., 2003).

Ve vzorcích kalusů pěstovaných na různých kultivačních mediích byly nalezeny významné rozdíly v hladinách jednotlivých cytokininových metabolitů, což je v souladu s již publikovanou literaturou (Aremu et al., 2012a).

BAP je stále jedním z nejúčinnějších CK, který podporuje *in vitro* regeneraci výhonků a rozmnožování rostlinných druhů. Ve snaze řešit různé fyziologické a vývojové problémy spojené s CK obecně a BAP jsou ale testovány i další CK (Aremu et al., 2012a). Strukturní variabilita CK nabízí širokou škálu možností, jak změnit jejich strukturu a tím zvýšit jejich možnosti použití. Rozdíly biologické aktivity stejného CK v různých systémech slouží k rozpoznávání různých modelů a/nebo signalizačních mechanismů, které mohou fungovat v CK závislých fyziologických reakcích. Upozorňují také na možnost tvorby specifických látek, které modulují konkrétní CK-dependentní odpovědi (Doležal et al., 2006, Doležal et al., 2007). Interpretace výsledků biologických zkoušek závisí na povaze testu a použitých rostlinných materiálů.

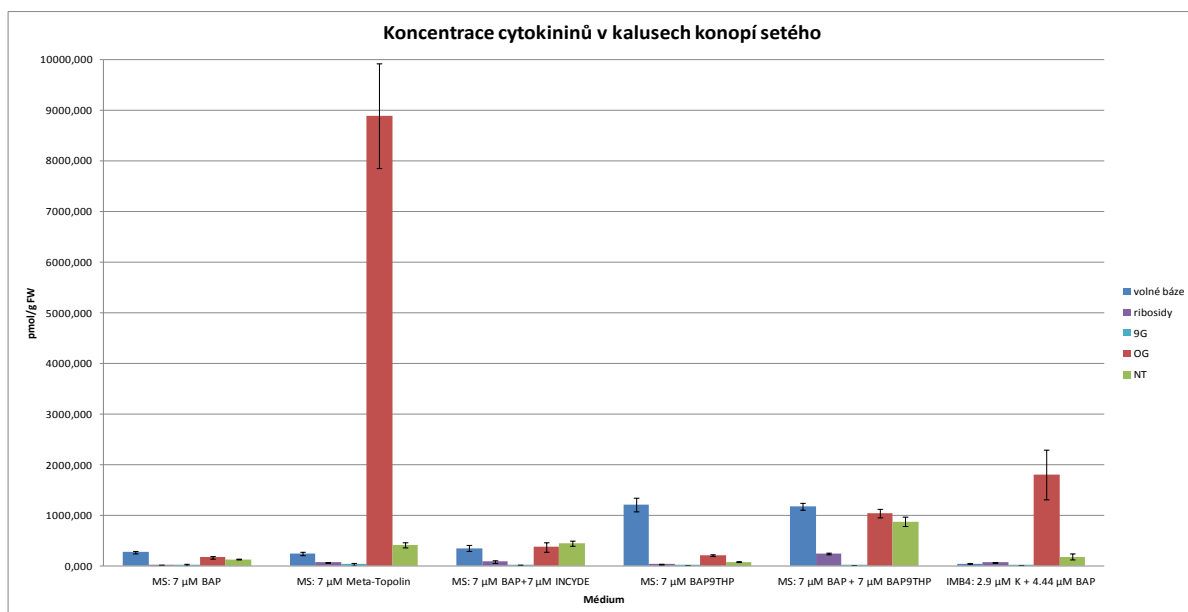
Záměna furfurylové skupiny K řadou dalších postranních řetězců je možná bez výrazné ztráty aktivity CK. BAP, pravděpodobně nejvíce využívaný CK v rostlinných tkáňových kulturách, vděčí za svůj objev právě substituci nahrazující furfurylovou skupinu benzylovou skupinou. V testu tabákového kalusu bylo zjištěno, že BAP je více aktivní než K. Aktivita substituovaných aminopurinových kruhů je také ovlivněna stupněm nasycení. Obecně platí, že aminopuriny s nenasyceným kruhem jsou více aktivní než ty nasycené (Skoog et al., 1967, Skoog a Armstrong, 1970, Matsubara 1980). Tomu odpovídají výsledky obou experimentů, kde v přídávku samotného BAP byly hladiny aktivních cytokininů několikanásobně vyšší než v přídávku kombinace BAP s K (Obr. 5, Obr. 6).

Z důvodů vysokého potenciálu topolinů jako náhrada běžně používaných CK byl zkoumán jejich vliv v různých rostlinných modelech. U *Spathiphyllum floribundum* (Werbrouck et al., 1996) a *Aloe polyphylla* (Bairu et al., 2007) měl mT vyšší účinnost při mikropropagaci než BAP. Naopak u *Rosa hybrida* byla při použití mT pozorována nižší

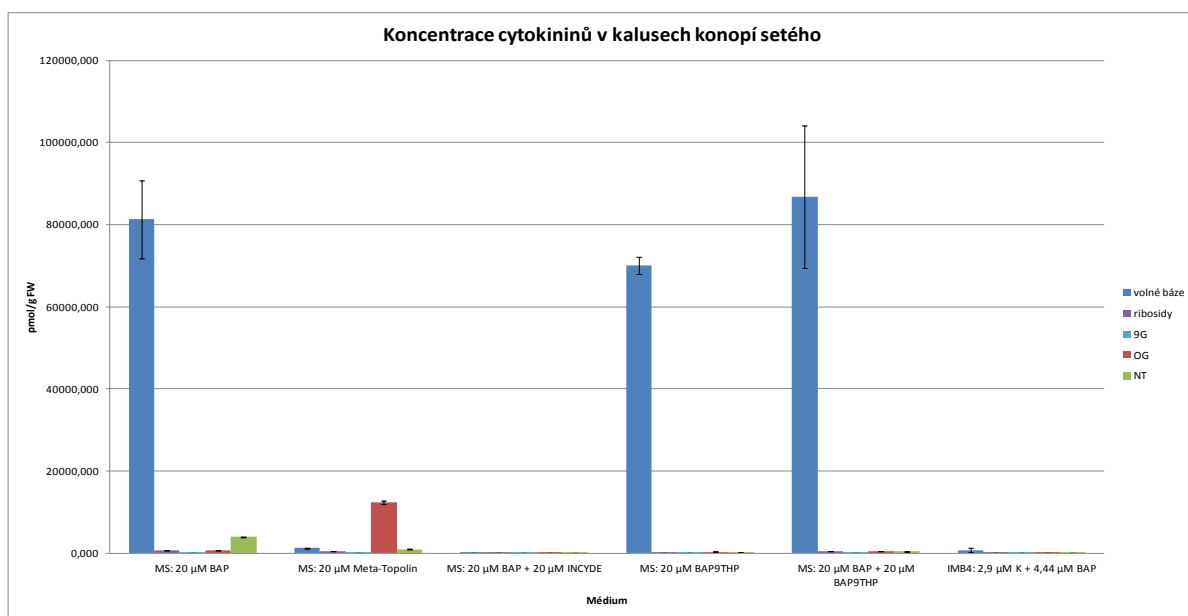
míra množení než u BAP (Bogaert et al., 2006). Zásadními faktory na účinek těchto CK jsou genotyp, koncentrace použitých CK a typ média (Dobranszki et al., 2004, Vinayak et al., 2009, Magyar –Tábori et al., 2010, Wojtania, 2010). Bylo také zjištěno, že přítomnost auxinu, IAA v kultivačním médiu zvyšuje tvorbu 9-glukosidů v rostlinách ošetřených BAP, ošetřených topoliny naopak snižuje. Tvorba O-glukosidů byla pozorována v rostlinách ošetřených topoliny s nízkým obsahem IAA (Aremu et al., 2012a). Tomu odpovídají výsledky experimentů, kde přidavek mT v obou experimentech vedl k vysoké tvorbě neaktivních, avšak přirozeně degradovatelných, O-glukosidů (Obr. 5, Obr. 6).

U CK s halogenovou substitucí je aktivita zvyšující účinek této strukturní změny na isoprenoidních (Clemenceau et al., 1996, Haidoune et al., 1998) a aromatických (Bogaert et al., 2006, Doležal et al., 2006, Doležal et al., 2007) CK dobře zdokumentována. Jednotliví autoři vysvětlují aktivitu zlepšující účinek halogenové substituce různě, například: vysoká elektronegativita a malá velikost halogenů (Crocker et al., 2007), schopnost organických halogenových sloučenin tvořit strukturní motivy přes intermolekulární interakce (Emmerling et al., 2007), snížení citlivosti sloučenin k CKX (Clemenceau et al., 1996, Haidoune et al., 1998) a schopnost vytvářet vodíkovou vazbu s donory elektronů CK receptoru (Doležal et al., 2007). INCYDE je však jen velmi slabým CK a jeho hlavní mechanismus účinku spočívá v inhibici CKX (Zatloukal et al., 2008, Aremu et al., 2012b). Tomu odpovídají výsledky experimentů, kde přidavek INCYDE v obou experimentech zvyšoval poměr endogenních aktivních cytokininů oproti neaktivním (Obr. 5, Obr. 6).

N9-THP skupina CK chrání molekulu proti N9-glykosylaci a způsobuje pomalé uvolňování aktivní volné báze, čímž spouští degradační procesy v mnohem menší míře. Ačkoli metabolické studie s radioaktivně značeným 3MeOBA9THPP ukázaly, že tato skupina může být postupně odstraněna *in vivo*, celkový obsah neaktivních glykosidů je však stále významně nižší než u testů s nechráněnou molekulou (Podlešáková et al., 2012). Tomu odpovídají výsledky experimentů, kdy po přidavku BAP9THP a kombinaci BAP a BAP9THP byl poměr naměřených hladin volných bazí a toxických N-glukosidů nejvyšší ve prospěch volných bazí (Obr. 5, Obr. 6). Nejnižší koncentrace glukosidů, zejména BAP9G, na médiu s přidavkem BAP9THP, dobře koreluje s výsledky *in vitro* experimentů, kdy na tomto médiu při nižší koncentraci BAP9THP vyrostly kořeny, při vyšší koncentraci i prýty (Obr. 8).



Obr. 5, Koncentrace cytokininů v kalusech konopí setého, první experiment



Obr. 6, Koncentrace cytokininů v kalusech konopí setého, druhý experiment



Obr. 7, Kalus konopí setého (Foto: RNDr. M. Griga, CSc.)



Obr. 8, Regenerované rostliny konopí setého (Foto: RNDr. M. Griga, CSc.)

7 Závěr

Cílem bakalářská práce bylo izolovat a kvantifikovat cytokininy a jejich metabolity v explantátech konopí setého, které byly pěstovány na médiích s různým přídatkem cytokininů. Ke stanovení bylo použito ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Na základě porovnání hladin identifikovaných metabolitů byly potvrzeny výsledky *in vitro* testů a jako nejvhodnější médium bylo stanoveno MS medium s přídatkem BAP9THP.

8 Použitá literatura

- Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP, 1984. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 5994-5998
- Aremu AO, Bairu MW, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J, 2012a. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Organ Cult* 108, 1-16
- Aremu AO, Bairu MW, Novák O, Plačková L, Zatloukal M, Doležal K, Finnie JF, Strnad M, Van Staden J, 2012b. Physiological responses and endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured 'Williams' bananas in relation to roscovitine and an inhibitor of cytokinin oxidase/dehydrogenase (INCYDE) treatments. *Planta* 236, 1775–1790
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J, 2007. DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* 51, 1019-1029
- Bairu MW, Stirk WA, Doležal K, Van Staden J, 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue Organ Cult* 90, 15–23
- Barry GF, Rogers SG, Fraley RT, Brand L, 1984. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 4776-4780
- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO, 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol* 125, 378-386
- Bogaert I, Van Cauter S, Werbrouck SPO, Doležal K, 2006. New aromatic cytokinins can make the difference. *Acta Hort* 725, 265–270
- Bredmose N, Kristiansen K, Norbaek R, Christensen LP, Hansen-Moller J, 2005. Changes in concentrations of cytokinins (CKs) in root and axillary bud tissue of miniature rose suggest that local CK biosynthesis and zeatin-type CKs play important roles in axillary bud growth. *J. Plant Growth Regul.* 24, 238-250
- Clemenceau D, Cousseau J, Martin V, Molines H, Wakselman C, Mornet R, Nogue F, Laloue M, 1996. Synthesis and cytokinin activity of two fluoro derivatives of N6-Isopentenyladenine. *J Agr Food Chem* 44, 320–323

- Crocker PJ, Mahadevan A, Wiley JL, Martin BR, Razdan RK, 2007. The role of fluorine substitution in the structure-activity relationships (SAR) of classical cannabinoids. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 1504–1507
- Davey JE, Van Staden J, 1979. Cytokinin Activity in *Lupinus albus* L: Distribution in Seeds. *Plant Physiol* 63, 873-877
- Davies PJ, 2010, *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, Springer Dordrecht Heidelberg London New York
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J, 1996. Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naftalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198, 532-541
- Doležal K, Popa I, Kryštof V, Spíchal L, Fojtíková M, Holub J, Lenobel R, Schmülling T, Strnad M, 2006. Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorg Med Chem* 14, 875–884
- Doležal K, Popa I, Hauserová E, Spíchal L, Chakrabarty K, Novák O, Kryštof V, Voller J, Holub J, Strnad M, 2007. Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorg Med Chem* 15, 3737–3747
- Dobránszki J, Hudak I, Magyar-Tábori K, Jámbor-Benczúr E, Galli Z, Kiss E, 2004. Effects of different cytokinins on the shoot regeneration from apple leaves of ‘Royal Gala’ and ‘M.26’. *Int J Hort Sci* 10, 69–75
- Emmerling F, Orgzall I, Dietzel B, Schulz BW, Reck G, Schulz B, 2007. Structural studies on trifluoromethyl substituted 2, 5-diphenyl-1, 3, 4-oxadiazoles. *J Mol Struct* 832, 124–131
- Entsch B, Parker CW, Letham DS, Summons RE, 1979. Preparation and characterization, using high-performance liquid chromatography, of an enzyme forming glucosides of cytokinins. *Biochim Biophys Acta* 570, 124-139
- Fenney M, Punja ZK, 2003. Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39, 578-585
- Fisse J, Braut F, Cosson L, Paris M, 1981. Étude in vitro des capacités organogénétiques de tissus de *Cannabis sativa* L.; effet de différentes substances de croissance. *Pl. Méd. Phytoth.* 15, 217–223

- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, Sauer P, Jacobsen S, Peč P, 2001. Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur J Biochem* 268, 450-461
- Ge L, Yong JWH, Goh NK, Chia LS, Tan SN, Ong ES, 2005. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 829, 26-34
- George EF, Debergh PC, 2008. Micropropagation: Uses and methods. *Plant propagation by tissue culture* 1, 29-64
- Haidoune MB, Raynaud I, O'Connor N, Richomme P, Mornet R, Laloue M, 1998. Synthesis and cytokinin activity of new zeatin derivatives. *J Agric Food Chem* 46, 1577–1582
- Hemphill JK, Turner JC, Mahlberg PG, 1978. Studies on growth and cannabinoid composition of callus derived from different strains of *Cannabis sativa*. *Lloydia* 41, 453–462
- Hirano K, Nakajima M, Asano K, Nishiyama T, Sakakibara H, Kojima M, Katoh E, Xiang H, Tanahashi T, Hasebe M, Banks JA, Ashikari M, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M, 2007. The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 19, 3058-3079
- Hutchison CE, Kieber JJ, 2002. Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 47-59
- Chatfield JM, Armstrong DJ. 1986. Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great Northern. *Plant Physiol* 80, 493-499
- Chase HL, 1983. Affinity separations utilizing immobilized monoclonal antibodies. *Chemical Engineering, Science* 39, 1099–1125.
- Chiwocha SDS., Abrams SR, Ambrose SJ, Cutler AJ, Loewen M, Ross ARS, Kermode AR, 2003. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* 35, 405-417

- Ihara M, Taya Y, Nishimura S, Tanaka Y, 1984. Purification and some properties of delta 2- isopentenylpyrophosphate:5'AMP delta 2-isopentenyltransferase from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Arch Biochem Biophys* 230, 652-660
- Jiang ZQ, Guo HW, 2010. A comparative genomic analysis of plant hormone related genes in different species. *J Genet Genomics* 37, 219-230
- Kakimoto T, 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* 42, 677-685
- 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 MSprobe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*. 50, 1201-1214
- Kopečný D, Briozzo P, Popelková H, Šebela M, Končítíková R, Spichal L, Nisler J, Madzak C, Frébort I, Laloue M, Houba-Hérin N, 2010. Phenyl- and benzylurea cytokinins as competitive inhibitor of cytokinin oxidase/dehydrogenase: a structural study. *Biochimie* 92, 1052-1062
- Letham DS, 1994. Cytokinins as phytohormones-sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In Mok DWS, Mok MC, eds, *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.57-80
- MacDonald EMS, Morris RO, 1985. Isolation of cytokinins by immunoaffinity chromatography and analysis by high-performance liquid chromatography-radioimmunoassay. *Meth. Enzymol.* 110, 347-358
- MacKinnon L, McDougall G, Aziz N, Millam S, 2000. Progress towards transformation of fibre hemp. *Scottish Crop Research Institute Annual Report 2000/2001*. Invergowrie, Dundee: Scottish Crop Research Institute; 2000, 84–86.
- Magyar-Tábori K, Dobránszki J, Teixeira da Silva J, Bulley S, Hudák I, 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 101, 251–267
- Martin RC, Mok MC, Habben JE, Mok DW, 2001. A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5922-5926
- Martin RC, Mok MC, Mok DW, 1999. Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 284-289

- Matsubara S, 1980. Structure-activity relationships of cytokinins. *Phytochemistry* 19, 2239–2253
- Meijer EA, de Vries SC, Mordhorst AP, 1999. Co-culture with *Daucus carota* static embryos reverses high 2,4-D uptake and release rates of *Arabidopsis thaliana* cultured cells. *Plant Cell Reports* 18, 656-663
- Meins F, 1989. Habituation – heritable variation in the requirement of cultured plant–cells for hormones. *Annual Review of Genetics* 23, 395-408
- Mok DWS, Martin RC, 1994. Cytokinin metabolic enzymes. In Mok DWS, Mok MC, eds, *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.129-137
- Motte H, 2013. Factors controlling shoot regeneration from *Arabidopsis* root explants. Ghent University, Ghent, Belgium
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK, 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 34, 267-275
- Naito T, Yamashino T, Kiba T, Koizumi N, Kojima M, Sakakibara H, Mizuno T, 2007. A link between cytokinin and ASL9 (ASYMMETRIC LEAVES 2 LIKE 9) that belongs to the AS2/LOB (LATERAL ORGAN BOUNDARIES) family genes in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1269-1278
- Nguyen DTT, Guillaume D, Rudaz S, Veuthey JL, 2006. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.* 29, 1836-1848
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Doležal K, Strnad M, 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochem.* 69, 2214-2224
- Novák O, Tarkowski P, Tarkowská D, Doležal K, Lenobel R, Strnad M, 2003. Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography/singlequadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 480, 207-218
- Nováková L, Vlčková H, 2009. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta* 656, 8-35
- Pan X, Welti R, Wang X, 2008. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69, 1773-1781

- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TFF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Shroeder JI, Volkman BF, Cutler SR, 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of start proteins. *Science* 324, 1068-1071
- Pischke MS, Huttlin EL, Hegeman AD, Sussman MR, 2006. A transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture. *Plant Physiology* 150, 1255-1278
- Podlešáková K, Zalabák D, Čudejková M, Plíhal O, Szüčová L, Doležal K, Spíchal L, Strnad M, Galuszka P, 2012. Novel Cytokinin Derivatives Do Not Show Negative Effects on Root Growth and Proliferation in Submicromolar Range. *PLoS ONE* 7(6), e39293
- Prinsen E, Redig P, Strnad M, Galis I, Van Dongen W, Van Onckelen HA, 1995b. Quantifying phytohormones in transformed plants. In: Gartland K, Davey M (Eds.), *Methods in Molecular Biology, Agrobacterium Protocols*. Humann Press Inc., New Jersey, pp. 245-262
- Prinsen E, Redig P, Van Dongen W, Esmans EL, Van Onckelen HA, 1995a. Quantitative-analysis of cytokinins by electrospray tandem mass-spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 948-953
- Skoog F, Armstrong DJ., 1970. Cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol* 21, 359-384
- Skoog F, Hamzi HQ, Szweykowska AM, Leonard NJ, Carraway KL, Fujii T, Helgeson JP, Loeppky RN, 1967. Cytokinins: structure/activity relationships. *Phytochemistry* 6, 1169-1192
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmülling T, 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* 45, 1299-1305
- Strnad M, 1997. The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* 101, 674-688
- Strnad M, Peters W, Beck E, Kamínek M, 1992. Immunodetection and identification of N(6)-(o-hydroxybenzylamino)purine as a naturally-occurring cytokinin in *Populus x canadensis* Moench, cv. Robusta leaves. *Plant Physiol.* 99, 74-80
- Sugimoto K, Meyerowitz EM, 2013. Regeneration in *Arabidopsis* Tissue Culture. *Methods Mol Biol.* 959, 265-75

- Suttle JC, 1988. Disruption of the polar auxin transport-system in cotton seedlings following treatment with the defoliant thidiazuron. *Plant Physiology* 86, 241-245
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T, 2001. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 26405-26410
- Tarkowska D, Dolezal K, Tarkowski P, Åstot C, Holub J, Fuksova K, Schmülling 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. *Physiol Plant* 117, 579-590
- Tarkowski P, Doležal K, Strnad M, 2004. Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy* 98, 834-841
- Taya Y, Tanaka Y, Nishimura S., 1978. 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 271, 545-547
- 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, 390-399
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S, 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455, 195-200
- Van Rhijn JA, Heskamp HH, Davelaar E, Jordi W, Leloux MS, Brinkman UAT, 2001. Quantitative determination of glycosylated and aglycon isoprenoid cytokinins at subpicomolar levels by microcolumn liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 929, 31-42
- Veitch YK, Martin RC, Mok DW, Malbeck J, Vankova R, Mok MC, 2003. O-glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol* 131, 1374-1380
- Vinayak V, Dhawan AK, Gupta VK, 2009. Efficacy of non-purine and purine cytokinins on shoot regeneration in vitro in sugarcane. *Indian J Biotechnol* 8, 227-231
- Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen HA, Debergh PC, 1996. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol Plantarum* 98, 291-297

- Wojtania A, 2010. Effect of meta-topolin on in vitro propagation of *Pelargonium 9 hortorum* and *Pelargonium 9 hederifolium* cultivars. *Acta Soc Bot Pol* 79, 101–106
- Wu N, Clausen AM, 2007. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *J. Sep. Sci.* 30, 1167-1182
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Mixa K, Yamashino T, Mizuno T, 2001. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* 42, 1017-1023
- Zatloukal M, Gemrotová M, Doležal K, Havlíček L, Spíchal L, Strnad M, 2008. Novel potent inhibitor of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 9268–9275
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP, 2007. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3037-3057
- Zhang HB, Horgan KJ, Reynolds PHS, Norris GE, Jameson PE, 2001. Novel cytokinins: the predominant forms in mature buds of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* 112, 127-134
- Zhao XJ, Wang WJ, Wang JS, Yang J, Xu GW, 2006. Urinary profile investigation of metabolites with cis-diol structure from cancer patients based on UPLC–MS and HPLC–MS as well as multivariate statistical analysis. *J. Sep. Sci.* 29, 2444-2451