

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium úlohy cytokininů v pletivových kulturách vybraných odrůd drobného ovoce

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Denisa Balatková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Karel Doležal, Dr., DSc.
Rok:	2021

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

V Olomouci dne:

.....

Poděkování

Tato bakalářská práce byla podpořena interním grantem IGA_PrF_2021_011. Velké díky patří mému školiteli panu Mgr. Karlu Doležalovi, Dr., DSc za jeho odborné vedení mé bakalářské práce, vědecké připomínky, a především za jeho čas, trpělivost a vstřícné jednání. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. za její výpomoc při vypracování experimentální části, a hlavně za její vedení a trpělivost během mé práce v laboratoři. Nakonec děkuji Bc. Janu Skalíkovi za jeho užitečné poznámky a odborné rady.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Denisa Balatková
Název práce:	Studium úlohy cytokininů v pletivových kulturách vybraných odrůd drobného ovoce
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	KCB
Vedoucí práce:	Mgr. Karel Doležal, Dr., DSc.
Rok obhajoby práce:	2021

Abstrakt:

Rubus idaeus (ostružiník maliník) je jedna z nejstarších a nejrozšířenějších bobulových plodin. Pěstuje se za účelem okrasným, ovocným a léčivým. Červená malina je známá svojí vynikající chutí a jejich bobule mají lékařské a dietetické vlastnosti. V biotechnologické firmě Jan Holub s. r. o. se specializují na rozmnožování rostlin metodou *in vitro* mikropropagace a výhonky mnoha odrůd ostružiníku produkované *in vitro* zde vykazují horší kvalitu oproti ostatnímu drobnému ovoci. V teoretické části se bakalářská práce zabývá rostlinnými hormony, především cytokininy, jejich vlastnostmi a analýzou. Cytokininy hrají v rostlinném organismu důležitou roli, a proto se přidávají jako hlavní složky do kultivačních médií. Na jejich množství a poměru k auxinu v kultivačním médiu závisí kvalita regenerace rostlinného materiálu. Experimentální část byla zaměřena na stanovení endogenních hladin cytokininů.

Cytokininy byly purifikovány pomocí SPE purifikace s použitím SPE kolonek OASIS MCX. Hladiny cytokininů byly stanoveny pomocí vysoce-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Původní dvě kultivační média obsahovala cytokininy v aktivní formě (báze). Avšak z našich výsledků i z výsledků jiných autorů vyplývá, že příliš vysoké množství aktivních cytokininů rostlinám škodí. Na základě našich analýz byla navržena média s obsahem nových cytokininových derivátů v jejich chráněné formě, která rostlině více prospívá, jelikož dochází k postupnému uvolňování bází v pletivech, rostlina se lépe adaptuje na čerstvé médium a výhonky vykazují lepší regeneraci.

Klíčová slova:	Cytokininy, <i>in vitro</i> mikropropagace, <i>Rubus idaeus</i> , SPE - purifikace, UHPLC-MS/MS
Počet stran:	53
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Denisa Balatková

Title: Role of cytokinins in tissue cultures of selected berry cultivars

Type of thesis: Bachelor

Department: KCB

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

The year of presentation: 2021

Abstract:

Rubus idaeus (raspberry) is one of the oldest and most widespread berry crops. It is grown for ornamental, fruity and medicinal purposes. Red raspberries are known for their excellent taste and their berries have medical and dietary properties. The biotechnology company Jan Holub s. r. o. specializes in plant propagation by *in vitro* micropropagation and shoots of many blackberry varieties produced *in vitro* in this company show poorer quality than other small fruits. In the theoretical part, the bachelor thesis deals with plant hormones, especially cytokinins, their properties and analysis. Cytokinins play an important role in the plant organism and are therefore added as main components to culture media. The quality of regeneration of plant material depends on their amount and ratio to auxin in the culture medium. The experimental part was focused on the determination of endogenous cytokinin levels.

Cytokinins were purified by SPE purification using OASIS MCX SPE columns. CK levels were determined by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. The original two culture media contained cytokinins in active form (base). However, our results and the results of the other authors show that too high amount of active cytokinins is harmful to plants. Based on our analyzes, media containing new cytokinin derivatives in their protected form have been designed, which benefits the plant more because there is a gradual release of bases in the tissues, the plant adapts better to fresh medium and shoots show better regeneration.

Keywords: Cytokinins, *in vitro* micropropagation, *Rubus idaeus*, SPE - purification, UHPLC-MS/MS

Number of pages: 53

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	10
2.1	Rostlinné hormony.....	10
2.1.1	Objevení rostlinných hormonů.....	11
2.1.2	Vlastnosti, význam a účinky hormonů rostlin.....	12
2.2	Cytokininy	13
2.2.1	Objev	13
2.2.2	Účinky	14
2.2.3	Rozdělení.....	14
2.2.4	Biosyntéza CK.....	19
2.2.5	Aktivita cytokininů.....	22
2.2.6	Topoliny	23
2.2.7	Analýza cytokininů.....	23
2.3	<i>In vitro</i> mikropropagace.....	28
2.4	<i>Rubus Idaeus</i>	29
2.4.1	Tradiční léčivé účinky	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1	Chemikálie.....	31
3.2	Přístroje.....	32
3.3	Rostlinný materiál.....	33
3.4	Navážení rostlinného materiálu	33
3.5	Extrakce a MCX Purifikace	33
3.6	Separace a stanovení.....	34
4	VÝSLEDKY	36
5	DISKUZE.....	44
6	ZÁVĚR.....	46
7	LITERATURA	47
8	SEZNAM ZKRATEK.....	51

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše
2. Osvojení si technik extrakce, purifikace a stanovení cytokininů z rostlinného materiálu, optimalizace metod
3. Extrakce, purifikace a kvantifikace cytokininů ve vzorcích vybraných kultivarů drobného ovoce pěstovaných *in vitro*
4. Navržení médií s obsahem nových cytokininových derivátů na základě analýz
5. Interpretace získaných výsledků

1 ÚVOD

Rostlinné hormony jsou skupinou přirozeně se vyskytujících organických látek, které při velmi nízkých koncentracích ovlivňují v rostlinách všechny významné fyziologické procesy. Mezi tyto ovlivněné procesy patří hlavně růst, diferenciaci a vývoj rostlin, může být ovlivněno například i otevírání průduchů (Procházka *et al.*, 1998). Mezi rostlinné hormony patří (mimo jiné) látky zvané cytokininy (CK) a na jejich studiu je tato práce zaměřena.

Cytokininy hrají důležitou roli v různých procesech vývoje a růstu rostlin (podporují buněčné dělení, bojují proti stárnutí, regulují apikální dominanci a přenáší nutriční signály). Cytokininy byly objeveny F. K. Skoogem, Millerem a spol. (v roce 1955) společně s metodou *in vitro* mikropropagace. Hojně se využívají v rostlinných biotechnologiích a dnes nachází široké uplatnění v tomto moderním průmyslovém odvětví (Davies, 2010).

V biotechnologické firmě Jan Holub s. r. o., specializující se na rozmnožování rostlin metodou *in vitro* mikropropagace, je *Rubus idaeus* neboli ostružiník maliník problémovou rostlinou a oproti ostatnímu drobnému ovoci vykazují výhonky mnoha odrůd ostružiníku produkované *in vitro* menší kvalitu.

Rubus idaeus (jinak také červená malina) se pěstuje pro její vynikající chuť, léčivé a dietetické vlastnosti jejich bobulí a listů. Maliny obsahují velké množství vitamínů, antokyanů a polyfenolických látek. Díky tomu mají vysokou antioxidační aktivitu a používají se pro léčbu a prevenci různých onemocnění (např. kardiovaskulárních, gastrointestinálních, kožních atd.). Maliny také představují metabolické výhody pro lidi s rizikem cukrovky právě vzhledem k mimořádnému množství polyfenolů a vlákniny, které obsahují (Khlebová *et al.*, 2019).

Záměrem této práce je studium vlivu cytokininů na *in vitro* multiplikaci, růst a vývoj mikrovýhonků červené maliny ve fázi mikropropagace. Jedním z úkolů je také vypracování literární rešerše na dané téma.

Díky praktické části mé bakalářské práce jsem si mohla osvojit techniky jako je extrakce a purifikace a stanovit cytokininy z rostlinného materiálu pěstovaného *in vitro*. Na základě analýz mohla být poté navržena média s obsahem již nových cytokininových derivátů. Hlavním cílem této práce je dosáhnout intenzivního množení vysoce kvalitních výhonků *Rubus idaeus* již s novým poměrem a koncentracemi cytokininů. Pro stanovení

aktivního a kvalitního novotvoření výhonků *in vitro* je správná volba cytokininů a jejich koncentrace stěžejním bodem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony jsou skupinou přirozeně se vyskytujících organických látek (endogenní biosyntéza). Jejich univerzální vlastností je, že ovlivňují fyziologické procesy již při velmi nízkých koncentracích (mnohem nižších, než v případě živin nebo vitamínů). Mezi ovlivněné procesy patří například růst, diferenciaci, vývoj rostlin a stomatální pohyb. Rostlinné hormony bývají také označovány jako „fytohormony“ – jedná se o přirozené regulátory růstu (Procházka *et al.*, 1998; Davies, 2010). Látka přirozeně se syntetizující v rostlinách (endogenní) vykazuje regulační aktivitu, která se ověřuje jako účinek aplikace této látky. Aby hormon dosáhl svého účinku, je nutná jeho vazba na specifický receptor nacházející se buď na membráně (přenos signálu dále do buňky je zprostředkován pomocí systémů druhých neboli sekundárních posílů, tzv. „second messenger“) nebo v cytoplazmě (Procházka *et al.*, 1998).

Jako první domněnku o existenci chemických signálů (morfofenů) vyslovil Julius von Sachs, díky nimž mohou jednotlivé orgány mezi sebou vzájemně komunikovat. Proto jsou rostlinné hormony považovány za primární signální molekuly (Procházka *et al.*, 1998).

Went a Thimann v jejich knize „*Fytohormony*“ (rok 1937) definovali hormon jako látku, která se přenáší z jedné části organismu do druhé. Jeho původní použití ve fyziologii rostlin bylo odvozeno od savčího pojmu hormonu. Koncept savčího hormonu zahrnuje lokalizované místo jeho syntézy, transport v krevním řečišti do cílové tkáně a kontrolu fyziologické odpovědi v cílové tkáni prostřednictvím koncentrace hormonu.

Nyní je ale jasné, že rostlinné hormony nesplňují požadavky hormonu v savčím smyslu. Syntéza rostlinných hormonů může být lokalizována (jako je tomu u zvířecích hormonů), ale může se také vyskytovat v širokém rozsahu pletiv nebo buněk uvnitř pletiv (Davies, 2010).

Rostlinné hormony jsou oproti živočišným daleko méně specifické. Každý z fytohormonů ovlivňuje mnoho různých dějů, a naopak ten samý proces může být ovlivněn větším počtem různých látek (Procházka *et al.*, 1998).

Hormony mohou být přepravovány a působit na dálku, ale není tomu tak vždy. Při transportu cytokininů z kořene do listů zde zabraňují stárnutí a udržují metabolickou aktivitu, zatímco produkce ethylenu může způsobit změny již ve stejném pletivu nebo

přímo ve stejné buňce, kde je syntetizován. Transport tedy není základní vlastností rostlinného hormonu (Davies, 2010).

Hormony jsou nezbytné pro normální rozvoj rostlin, protože se podílejí na určování tvaru rostliny, ovlivňují klíčení semen, čas kvetení, stárnutí listů a plodů a mnoho dalších procesů. Bez správné výroby a distribuce rostlinných hormonů by tedy rostliny byly většinou hmoty nediferencovaných buněk. Některé koncentrace a poměr rostlinných hormonů v rostlinné buněčné kultuře mohou způsobit tvorbu různých orgánů, jako jsou kořeny, květy nebo dokonce somatická embrya z nediferencovaných buněk.

Tři rostlinné hormony, a to auxiny, cytokininy a gibereliny jsou považovány za nejpozitivnější regulátory růstu a vývoje, zatímco ABA (kyselina abscisová) a ethylen jsou považovány za inhibitory růstu nebo supresory (Brukhin a Morozová, 2011).

Mezi další objevené fytohormony patří sloučeniny, jako jsou jasmonáty, kyselina salicylová, brassinosteroidy a strigolaktony. Na seznam rostlinných hormonů byly přidány také peptidy (Davies, 2010)

2.1.1 Objevení rostlinných hormonů

Přibližně v letech 1880 až 1893 prováděl Darwin svá původní pozorování fototropismu koleoptil trav, což ho vedlo k předpokladu existence signálu, který byl transportován ze špičky koleoptil směrem dolů do ohybových oblastí. Dále Frits Went (rok 1926) dokázal izolovat chemickou látku difúzí ze špiček koleoptile (kde byla syntetizována) do agarových bloků. Na tyto agarové bloky (obsahující onu izolovanou chemickou látku) byly poté vloženy odřezané špičky koleoptile, které látku rozpoznaly, a došlo ke stimulaci jejich růstu. Asymetrické umístění látky na bloky navodilo ohyb koleoptile na stranu s vyšší koncentrací této látky. To tedy prokázalo existenci chemikálie podporující růst, která se v rostlině pohybuje bazipetálně. Went pro tuto látku použil termín auxin a později byla identifikována jako jednoduchá sloučenina kyselina indol-3-octová, všeobecně známá jako IAA (Davies, 2010). Kyselina indol-3-octová je nejběžnějším typem auxinu nacházejícího se v rostlinách a je produkována převážně ve stonkovém apikálním meristému (SAM), ale může být syntetizována i v kořenech a jiných rostlinných strukturách (Brukhin a Morozová, 2011).

Další linie výzkumu vedly k objevení ostatních hormonů. Výzkum v patogenezi rostlin vedl ke giberelinům (GA; Davies, 2010). Gibereliny jsou známy jako původci choroby rýže zvané *bakanae*. Jejich název je odvozen od houby *Gibberella fujikuroi*, která toto

onemocnění způsobuje. Při této chorobě dochází k etiolizaci, případně až k odumírání rostliny (Procházka *et al.*, 1998).

Snahy o kultivaci pletiv *in vitro* vedly k cytokininům (CK); kontrola abscise a dormance ke kyselině abscisové (ABA) a zkoumání účinků osvětlovacího plynu a kouře na růst a vývoj rostlin k objevení ethylenu (Davies, 2010). Ethylen byl objeven jako aktivní složka svítiplynu, který má vliv na různé procesy u rostlin, především na opad listů (Procházka *et al.*, 1998).

2.1.2 Vlastnosti, význam a účinky hormonů rostlin

Účinky produkované každým hormonem byly zpočátku objasňovány převážně z jeho exogenních aplikací. Ve stále více případech však máme důkazy, že endogenní hormon také plní původně určené role, a objevují se i nové funkce. Tyto novější důkazy pocházejí ze vzájemného vztahu mezi hladinami hormonů a růstem definovaných genotypů nebo mutantů, zejména modelové rostliny *Arabidopsis*, nebo transgenních rostlin. V ostatních případech dosud nebylo přesvědčivě prokázáno, že endogenní hormon funguje stejným způsobem. Povaha, výskyt, transport a účinky hormonu (konkrétně cytokininu) jsou uvedeny níže. Je však třeba zdůraznit, že hormony nepůsobí samy, ale ve vzájemné spolupráci nebo opozici tak, že konečný stav růstu nebo vývoje představuje čistý účinek hormonální rovnováhy (Davies, 2010).

Auxiny pozitivně ovlivňují prodlužování buněk změnou plasticity buněčné stěny, tvorbu pupenů, iniciaci kořenů a také vývoj bočních a adventivních kořenů, iniciaci květů a specifickou syntézu proteinů během tvorby semen. Auxiny mohou také podporovat produkci dalších hormonů. Spolu s jinými hormony, většinou s cytokininy, podporují tvorbu výhonků, stonků, kořenů, květů a plodů. Zajímavostí je, že produkce auxinu je regulována světlem. Koncentrace auxinu se za přítomnosti světla snižuje a ve tmě se naopak zvyšuje (Brukhin a Morozová, 2011).

Cytokininy se spolu s auxiny hojně využívají v rostlinné výrobě, a to konkrétně v rostlinných biotechnologiích, kde se přidávají jako složky do kultivačních médií. Díky řízené regeneraci rostlin můžeme získat viruprostý materiál. Kromě toho, tato řízená regenerace také umožňuje odvození rostlin z transformovaných a haploidních buněk a využití somaklonální variability (Procházka *et al.*, 1998).

CK také mimo jiné ovlivňují buněčné dělení. Podrobná analýza působení auxinu v procesu tvorby pupenů ukázala, že samotný auxin nemůže iniciovat buněčnou proliferaci. Může k tomu dojít pouze v přítomnosti cytokininu, jehož hlavní rolí je právě regulace

buněčné proliferace. Na druhou stranu samotná iniciace buněčné proliferace nevede k iniciaci listů. Může to být souhra těchto dvou hormonů, která způsobí vznik nového pupenu. (Brukhin a Morozová, 2011).

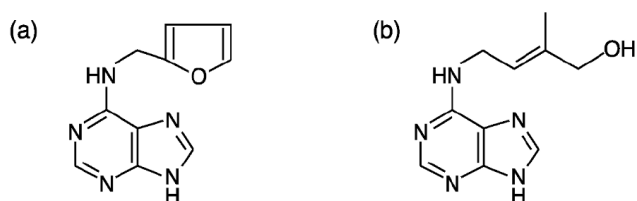
Cytokininy stimulují větvení u okrasných rostlin a v kombinaci s gibereliny se podílejí na tvarování plodů u vybraných odrůd jablek. Vlivem působení CK lze také u obilovin (v raných fázích vývoje) zintenzivnit jejich odnožování. Pokud se do obilovin v době jejich kvetení aplikují CK, má to za následek zvýšení počtu zrn v klasech.

Cytokininy u rostlin mimo jiné prodlužují jejich fotosyntetickou produktivitu, podporují nárůst celkové produkce biomasy a jsou známé také tím, že zvyšují odolnost rostlin ke stresovým podmínkám (Procházka *et al.*, 1998).

2.2 Cytokininy

2.2.1 Objev

Cytokininy jsou deriváty adeninu charakterizované schopností indukovat buněčné dělení v pletivové kultuře za přítomnosti auxinu (Davies, 2010). Nejbohatším zdrojem cytokininů je autoklavovaná spermatická DNA sledě, ze které byl izolován první syntetický CK identifikovaný jako 6-furfurylaminopurin (známý jako kinetin; obr. 1a; Miller *et al.*, 1955). Prvním přirozeně se vyskytujícím (endogenním) cytokininem je *trans*-zeatin (obr. 1b), který byl objeven v nezralém endospermu kukuřice (*Zea mays*), podle které byl název zeatin odvozen (Letham, 1963). Dříve byly CK známy jednoduše jako kininy, když byly poprvé izolovány z kvasinkových buněk (Brukhin a Morozová, 2011).



Obr. 1 Struktura kinetinu (a) a *trans*-zeatinu (b); Převzato z Davies, 2010.

2.2.2 Účinky

- Buněčné dělení – exogenní aplikace CK vyvolávají buněčné dělení v pletivové kultuře za přítomnosti auxinu. To se děje také endogenně působením bakteriálních genů pro biosyntézu auxinu a cytokininu, což vyvolává tvorbu nádorů krčku klíčnicích rostlin („crown gall tumors“). Cytokininy přirozeně plní funkci iniciátoru buněčného dělení díky jejich přítomnosti v pletivech s aktivně se dělícími buňkami (např. plody, špičky výhonků; Davies, 2010).
- Morfogeneze – v pletivové kultuře a krčcích klíčnicích rostlin CK podporují zahájení tvorby výhonků a v mechu indukují tvorbu pupenů (Davies, 2010).
- Růst postranních (laterálních) pupenů – uvolnění postranních pupenů z apikální dominance (Davies, 2010).
- Způsobují expanzi listů a zpomalují jejich stárnutí; u některých druhů mohou zvýšit otevírání průduchů a také mají vliv na vývoj chloroplastů. Aplikace CK totiž vede k nashromáždění chlorofylu a přeměně etioplastů na chloroplasty (Davies, 2010).

Cytokininy působí proti stárnutí, podporují diferenciaci buněk, ale ve specifických případech také dokážou navodit programovanou buněčnou smrt. Jejich obecnou funkcí je, že jsou spouštěči buněčných změn, což je nezbytné pro mnoho rozhodnutí během životního cyklu rostlin, který zahrnuje jak vývojové procesy, tak adaptivní reakce na měnící se abiotické a biotické prostředí (Zürcher a Müller, 2016).

Experimenty na buněčné rostlinné kultuře ukazují, že hlavním faktorem pro regulaci růstu buněk, diferenciaci buněk a iniciaci specifických procesů organogeneze je poměr auxin/cytokinin. Konkrétně zvýšení poměru auxin/cytokinin v kalusu způsobuje tvorbu kořenů, zatímco snížení tohoto poměru má za následek tvorbu výhonků (Brukhin a Morozová, 2011).

2.2.3 Rozdělení

Cytokininy jsou přirozeně se vyskytující adeninové deriváty substituované v poloze N⁶ (Schmülling, 2004). Na základě konfigurace postranního řetězce jsou klasifikovány jako isoprenoidní [N⁶-(Δ^2 – isopentenyl) - adenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ) a dihydrozeatin (DHZ)] nebo aromatické [N⁶-benzyladenin (BA), kinetin (KIN) a topolin]; (Faure *et al.*, 1998). Struktury a názvy přirozeně se vyskytujících cytokininů jsou zobrazeny na obrázku 2.

Obecná struktura cytokininů	R ₁	R ₂	R ₃	Sloučenina	Zkratka	
	H	H	-	<i>N</i> -isopentenyladenin	iP	
	N ₅ -R	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin	iPR	
	N ₇ -G	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-7-glukosid	iP7G	
	N ₉ -G	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin-9-glukosid	iP9G	
	N ₅ -RP	H	-	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin-5'-monofosfát	iPMP	
	H	H	H	<i>trans</i> -zeatin	tZ	
	N ₅ -R	H	H	<i>trans</i> -zeatin ribosid	tZR	
	N ₇ -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid	tZ7G	
	N ₉ -G	H	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid	tZ9G	
	H	G	H	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid	tZOG	
	N ₅ -R	G	H	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid	tZROG	
	N ₅ -RP	H	H	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát	tZMP	
	H	H	H	<i>cis</i> -zeatin	cZ	
	R	H	H	<i>cis</i> -zeatin ribosid	cZR	
	N ₅ -G	H	H	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid	cZ9G	
	H	G	H	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid	cZOG	
	N ₅ -R	G	H	<i>cis</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid	cZROG	
	N ₅ -RP	H	H	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát	cZMP	
		H	H	H	dihydrozeatin	DHZ
		N ₅ -R	H	H	dihydrozeatin ribosid	DHZR
N ₅ -G		H	H	dihydrozeatin-9-glukosid	DHZ9G	
H		G	H	dihydrozeatin <i>O</i> -glukosid	DHZOG	
	N ₅ -R	G	H	dihydrozeatin ribosid <i>O</i> -glukosid	DHZROG	
	N ₅ -RP	H	H	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát	DHZMP	
		H	H	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin	BA
		N ₅ -R	H	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenosin	BAR
N ₅ -G		H	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin-3-glukosid	BA3G	
N ₇ -G		H	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin-7-glukosid	BA7G	
	N ₉ -G	H	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin-9-glukosid	BA9G	
	N ₅ -RP	H	-	<i>N</i> ⁶ -benzyladenosin-5'-monofosfát	BAMP	
		H	H	-	<i>ortho</i> -topolin	oT
		N ₅ -R	H	-	<i>ortho</i> -topolin ribosid	oTR
N ₅ -G		H	-	<i>ortho</i> -topolin-9-glukosid	oT9G	
		H	H	-	<i>meta</i> -topolin	mT
	N ₅ -R	H	-	<i>meta</i> -topolin ribosid	mTR	
	N ₅ -G	H	-	<i>meta</i> -topolin-9-glukosid	mT9G	
		H	H	-	<i>para</i> -topolin	pT
N ₅ -R		H	-	<i>para</i> -topolin ribosid	pTR	
		H	H	-	kinetin	K
		N ₅ -R	H	-	kinetin ribosid	KR
	N ₅ -G	H	-	kinetin-9-glukosid	K9G	

Obr. 2 Struktury, názvy a zkratky isoprenoidních a aromatických cytokininů; H = vodík, R = β -D-ribofuranosyl, G = β -D-glukopyranosyl, RP = β -D-ribofuranosyl-5'-monofosfát; Převzato od Svačinová *et al.*, 2012.

Cytokininy se také vyskytují jako ribosidy, ribotidy a N- a O-glukosidy. Ribosidy vznikají navázáním ribózy do polohy N9 a ve srovnání s volnými bázemi mívají ribosidy většinou sníženou aktivitu. Stejně tak vykazují sníženou aktivitu ribotidy, které vznikají navázáním postranního řetězce na AMP, ADP či ATP účinkem isopentenyltransferázy (Procházka *et al.*, 1998; Kakimoto, 2003).

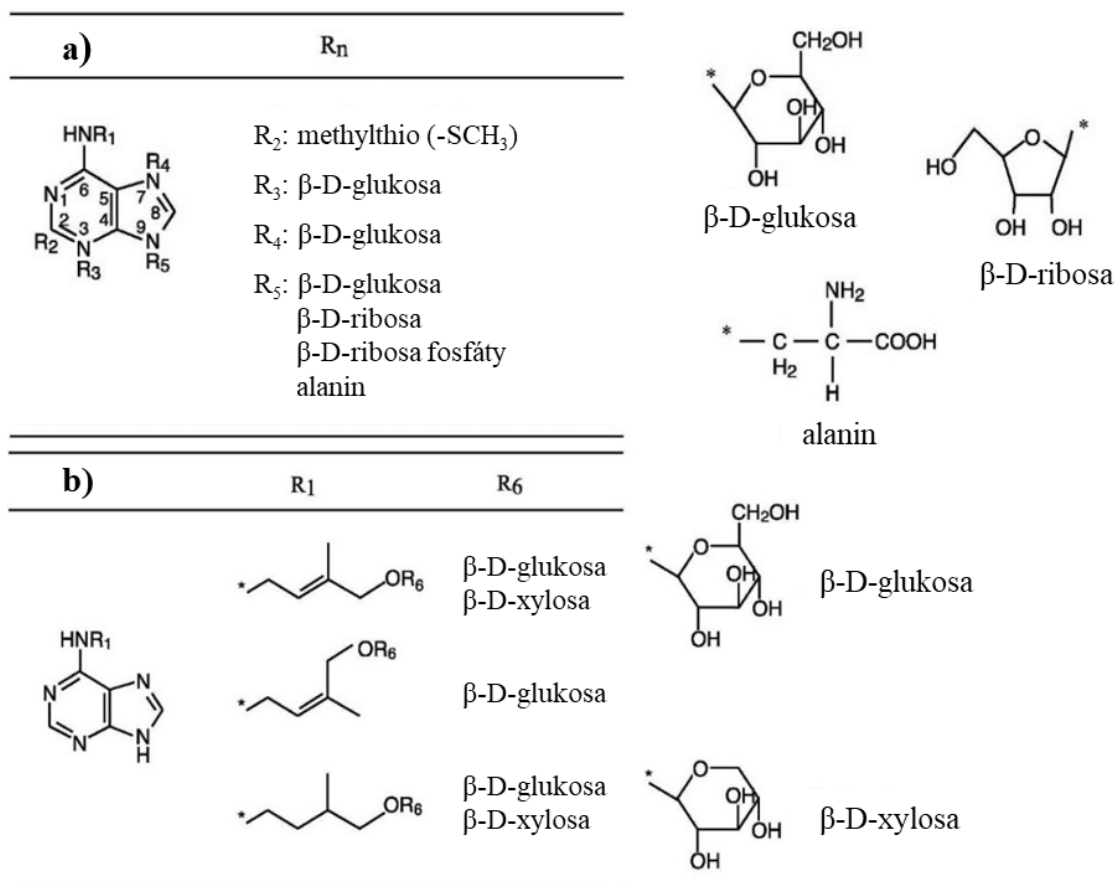
Látky vykazující nejvyšší aktivitu mají jako substituent v poloze N6 isoprenoidní řetězec s dvojnou vazbou (Kamínek, 1992). K velkému snížení či dokonce ztrátě biologické aktivity dochází obměnou adeninového skeletu nebo změnou počtu atomů uhlíku v postranním řetězci (Procházka *et al.*, 1998). Ačkoli bylo identifikováno několik CK, fyziologická funkce jednotlivých druhů není dosud zcela objasněna. Předchozí studie však naznačují, že CK lze rozdělit do tří hlavních skupin: aktivní formy, translokační formy, skladovací a inaktivované formy (Davies, 2010).

Cytokininy lze také glukosylovat za vzniku N-glukosidů (Obr. 3a) a O-glukosidů (Obr. 3b). Obecně je známo, že glykokonjugáty jsou neaktivní a předpokládá se, že hrají určitou roli v homeostáze hormonů. Enzymy podílející se na O-glukosylaci byly identifikovány jako O-glukosyltransferázy a enzymy podílející se na N-glukosylaci jako N-glukosyltransferázy (Hou *et al.*, 2004). O-glukosylace je reverzibilní a O-glukosidy jsou rezistentní na štěpení postranního řetězce v poloze N6 cytokinin oxidázami a jsou stabilní za určitých podmínek. Protože mohou být tyto konjugáty převedeny zpět na aktivní báze cytokininů pomocí β -glukosidáz, bylo navrženo, že představují neaktivní, stabilní zásobní formy hormonu. Při aplikaci vysokých hladin CK do rostliny se jako hlavní konjugát tvoří N7-glukosid. Na rozdíl od O-glukosidů jsou N7- a N9-glukosidy rezistentní na glukosidázy a tato vlastnost spolu s jejich akumulací v rostlině vedla k domněnce, že se N-glukosylace podílí na detoxikaci (Hou *et al.*, 2004).

O-glukosidy jsou formou reverzibilní a N-glukosidy naopak ireverzibilní, jelikož nejsou známy enzymy, které by endogenně štěpily N-glukosidy zpět na volné báze (Spíchal, 2012). Reverzibilní sekvence O-glukosidů umožňuje nepřetržitou dostupnost cytokininů na fyziologicky aktivní úrovni po delší dobu, což vede k vysoké tvorbě výhonků *in vitro* kultur (Amoo *et al.*, 2010).

Mezi časté endogenní modifikace CK tedy patří ribosylace, fosforibosylace, glukosylace (ke které dochází u poloh N7, N9, ale i u polohy N3 purinového kruhu) nebo také tvorba alanylových konjugátů (Spíchal, 2012). N-glukosylové a N-alanylové deriváty jsou metabolicky stabilnější než volné báze (Davies, 2010).

U několika druhů rostlin, jako je topol a *Arabidopsis* byly identifikovány topoliny, které obecně nazýváme aromatické cytokininy, z nichž nejvyšší aktivitu ve většině biotestů vykazuje *meta*-topolin (mT): u rostlinných druhů byly kromě druhů volné báze, nalezeny také nukleosidy, nukleotidy a glukosidy (Procházka *et al.*, 1998; Davies, 2010).



Obr. 3 Cytokininové deriváty konjugované s cukry a aminokyselinami; a) Konjugace s adeninovým kruhem (N-glukosidy a další); b) Konjugace s postranním řetězcem (O-glukosidy); Boční řetězec R₁ je konjugován na místě označeném hvězdičkou; Převzato z Davies, 2010.

2.2.3.1 Cis- a Trans-zeatin

Techniky hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetické rezonance umožnily mnohem lepší strukturní rozlišení zeatinu a přispěly k identifikaci *cis*-zeatin ribosidu (cZR) v extraktech RNA z rostlinných pletiv (Hall *et al.*, 1967). Tay *et al.* (1986) poznamenali, že změření cZR mohlo být výsledkem enzymatického rozpadu tRNA během extrakce.

Na konci 80. let bylo dosaženo významného zlepšení kvantifikace cZ a dalších CK použitím interních standardů označených deuteriem. Tyto vnitřní standardy prokázaly vysoké koncentrace cZ, cZR, *cis*-zeatin-O-glukosidu (cZOG) a *cis*-zeatin ribosidmonofosfátu (cZRMP), které se vyskytují v pletivech rýže (Takagi *et al.*, 1989). Tyto metody také přispěly k identifikaci derivátů cZ jako nejhojnějších CK v pletivech cizrny (*Cicer arietinum*) nebo ve specifických orgánech, jako jsou samčí poupata *Mercurialis* (bažanka; Durand R. a Durand B., 1994). Z analytického hlediska se deriváty tZ a cZ odlišují především pomocí chromatografie (Schäfer *et al.*, 2015).

Některé rostliny obsahují podobné množství *cis*- a *trans*-Z, jiné zase upřednostňují pouze jeden z izomerů. Předpokládá se, že vlastnosti jako jsou specifické podmínky prostředí (např. vodní režim, teplota, dostupnost živin), biotické interakce (např. konkurence mezi rostlinami, tvorba mykorhizy, interakce s nodulujícími bakteriemi) nebo životní styl rostlin (např. pomalý/rychlý růst, roční/trvalé) jsou spojeny s množstvím cZ u konkrétních rostlinných druhů. Je také možné, že vysoké hladiny *cis*-izomerů v mnoha plodinách mohou být výsledkem samotného procesu šlechtění rostlin (Schäfer *et al.*, 2015).

Teprve nedávno bylo prokázáno, že CK hrají důležitou roli v imunitě rostlin. Zvýšené hladiny CK, jako je *trans*-zeatin, vyvolaly rezistenci proti hemi-biotrofním patogenům u různých druhů rostlin (Großkinsky *et al.*, 2013).

Protože aktivní CK mohou být produkovány degradací tRNA, bylo navrženo, že je tato degradace možným zdrojem hormonu. V rostlinné tRNA bylo nalezeno několik různých sloučenin (iPR, cZR, tZR, atd.), z nichž cZR je nejhojnější. V tRNA se vyskytuje větší množství *cis*-izomeru oproti *trans*, a to přibližně v poměru 40:1. Přestože interkonverze mezi cZ a tZ může být katalyzována zeatinizomerázou, výpočty rychlosti obratu tRNA a produkce cytokininů naznačují, že cesta degradace tRNA není hlavním zdrojem cytokininů, alespoň ne tZ (Davies, 2010).

Silva-Navas *et al.*, 2019 zjistili, že cZ má důležitou funkci v reakci rostliny na nedostatek fosfátu (Pi) - cZ během nedostatku Pi v rostlině stimuluje prodlužování buněk, což podporuje růst kořenových vlásků, tím se zvětší celková absorpční plocha rostliny a dojde tak i ke zvýšení hladiny Pi v kořenech.

Jedna studie naznačuje, že CK typu cZ působí jako přechodné zásobní formy, které jsou transportovány do výhonku a převedeny na *trans*-izomery (aktivnější druhy) zeatinizomerázou v přítomnosti světla (Bassil *et al.*, 1993).

2.2.3.2 6-Benzylaminopurin (BAP, BA)

BAP je syntetický CK, který hraje roli při tvorbě kořenů, orgánů a také při dělení buněk (Lakitan, 1996).

Cytokininy také zprostředkovávají tzv. „cytokininovou signalizaci“. Např. v S-fázi buněčného cyklu se zdá být aktivace a synchronizace latentních počátků replikace DNA jedním z hlavních cílů působení cytokininů. V apikálních meristémech výhonků u řady rostlin dochází po přidání benzylaminopurinu (BAP) ke zkrácení velikosti replikonu a také ke zkrácení S-fáze buněčného cyklu (Houssa *et al.*, 1994).

V buňkách tabáku BY-2 (buněčná kultura odvozená z *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2) se po přidání CK v rané S-fázi zvýší mitotická aktivita. Přidání BAP (10^{-7} až 10^{-6} M) vede ke zvýšení mitotického indexu přibližně o 10%, zároveň ale tento přírůstek neovlivní rychlejší výskyt maxima mitotické aktivity. Přidání vyššího množství BAP (10^{-5} M) má také za následek zvýšení mitotického indexu asi o 10%, avšak oproti předchozímu případu, přidání vyššího množství BAP způsobuje dokonce zpoždění výskytu mitotického maxima (Temmerman *et al.*, 2001).

Bylo také popsáno, že isopentenyladenosin a benzylaminopurin indukují v rostlinných buňkách programovanou buněčnou smrt (Mlejnek a Procházka, 2002; Carimi *et al.*, 2003).

2.2.4 Biosyntéza CK

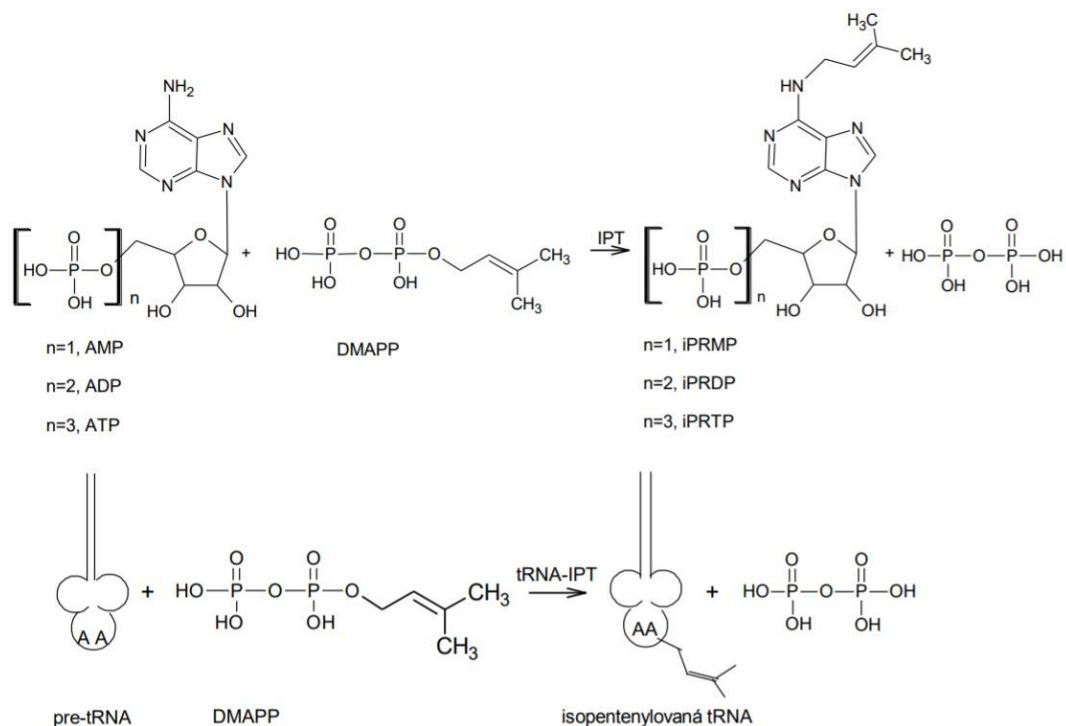
Biosyntéza CK se uskutečňuje například v kořenových špičkách a během vývoje semen biochemickou modifikací adeninu. Jejich transport pak probíhá xylémem od kořenů směrem k výhonkům (Davies, 2010).

Pro biosyntézu isoprenoidních CK (Obr. 5A) byly navrženy dvě možné cesty. Jedna je odvozena od degradace tRNA a druhá od isopentenylace volných adeninových nukleotidů (Obr. 4), která byla jako první zaznamenána u *Dictyostelium discoideum*

(Davies, 2010). Prvním krokem v biosyntéze isoprenoidních CK je N-prenylace adenosin-5-fosfátů (AMP, ADP nebo ATP) na N6-konci pomocí dimethylallyldifosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP). Tato reakce je katalyzována isopentenyltransferázou (IPT) a výsledným primárním produktem je isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát (iPRMP). Dlouhou dobu se myslelo, že DMAPP a AMP jsou jedinými substráty pro biosyntézu CK, ale nyní se zdá jasné, že substrátová specifita IPT se liší v závislosti na původu a druhu (Sakakibara, 2006; Davies, 2010).

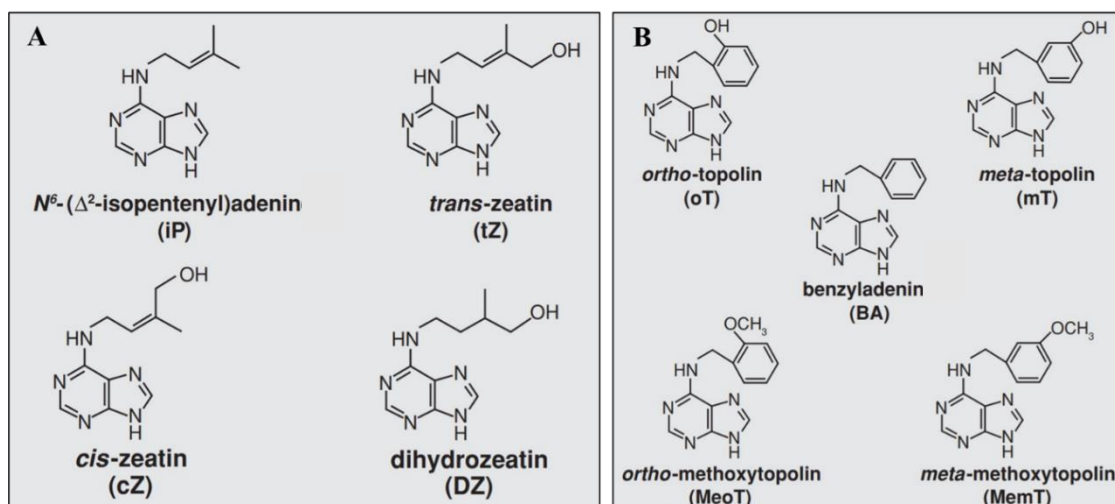
Krátce po objevení CK se předpokládalo, že jejich hlavním zdrojem je tRNA, protože v hydrolyzátech tRNA byly identifikovány isoprenoidní CK (Sakakibara, 2006). Další možnou dráhou biosyntézy isoprenoidních CK je tedy již zmiňovaná degradace tRNA. Zralé molekuly tRNA obsahují mnoho modifikovaných nukleosidů. Některé molekuly tRNA obsahují v místě sousedícím s antikodonem iPR nebo derivátový zbytek. První krok isopentenylace adeninového zbytku je katalyzován pomocí tRNA-IPT (tRNA-isopentenyltransferáza; (Davies, 2010). Geny tRNA-IPT existují v živých organismech všudypřítomně, jelikož byly identifikovány například u *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* a *E. coli*. Protože prenylová část tRNA obsahuje *cis*-hydroxylovanou skupinu, je degradace tRNA zdrojem *cis*-zeatinu. Kromě cZ jsou degradací tRNA produkovány i jiné aktivní cytokininy.

Včasné výpočty rychlostí obratu tRNA vedly k závěru, že degradace tRNA sice nebyla hlavní cestou syntézy CK, avšak cytokininy odvozené touto cestou by neměly být zanedbávány, protože některé druhy rostlin, jako je kukuřice a rýže, obsahují podstatná množství *cis*-zeatinu (Sakakibara, 2006).



Obr. 4 Schéma primární reakce biosyntézy cytokininů katalyzované IPT a tRNA-IPT; Převzato z Davies, 2010.

V případě aromatických CK (Obr. 5B) je alespoň část jejich biosyntetické dráhy sdílena s dráhou isoprenoidních cytokininů. Mechanismy glykosylace aromatických CK a jejich interakce s buněčnou signalizací jsou nejspíše sdíleny s isoprenoidními CK, protože zúčastněné enzymy a receptory rozpoznávají členy obou skupin. Katalytické enzymy používané při biosyntetické reakci a interkonverzi mezi aromatickými cytokininy jako mT, oT a BAP však dosud nebyly identifikovány (Sakakibara, 2006; Davies, 2010).



Obr. 5 Struktury zástupců isoprenoidních (A) a aromatických CK (B); Převzato od Sakakibara, 2006.

2.2.5 Aktivita cytokininů

Biotest s mechem *Funaria hygrometrica* naznačil, že volné báze cytokininů, jako jsou tZ a iP, byly aktivní, zatímco tZR vykazuje velmi nízkou hladinu aktivity. Identifikace genů receptorů cytokininů poskytuje konkrétnější důkazy. V biotestech vykazují nejvyšší aktivitu volné báze, a tudíž jsou považovány za aktivní formy hormonu. Ribosidy a ribotidy jsou obecně méně aktivní než odpovídající volné báze. Jejich metabolickou přeměnou na volnou bázi se tyto sloučeniny mohou stát aktivní (Mok & Mok, 2001; Spíchal, 2004). V klasických CK biotestech vykazuje tZ vyšší aktivitu v porovnání s cZ, který je méně aktivní nebo žádnou aktivitu nevykazuje (Schäfer *et al.*, 2015). Mezi vysoce aktivní CK patří také benzyladenin a kinetin (Großkinsky *et al.*, 2013).

Při reakci na nízkou teplotu nebo jiné faktory prostředí dochází ke vzájemným změnám v místě nahromadění O-glukosidů ve srovnání s volnými bázemi. Tyto změny naznačují, že sacharidové konjugáty (O-glukosidy a N-glukosidy) jsou právem považovány za zásobní a neaktivní formy cytokininů. Tato hypotéza je také podpořena metabolickou stabilitou O-glukosidů vůči enzymu způsobující degradaci cytokininů (cytokinin oxidáza/dehydrogenáza; CKX).

N-glukosylové a N-alanylové deriváty (O-glukosidy, N7- a N9-glukosidy a N9-alanyl) vykazují v cytokininových biotestech buď malou nebo žádnou aktivitu, což naznačuje, že se jedná o neaktivní formy cytokininů (Davies, 2010).

2.2.6 Topoliny

Cytokinin známý jako 6-benzylaminopurin (BAP) je nejčastěji používaným syntetickým cytokininem (spolu s kinetinem) při kulturách *in vitro*. Horgan *et al.* (1993) popsali výskyt *o*-hydroxybenzyladeninu v listech topolu. Podle výskytu v topolu byly deriváty benzyladeninu pojmenovány jako *o*- a *m*-topoliny (nesoucí v poloze *ortho* či *meta* benzenového kruhu hydroxylovou skupinu; Strnad, 1997).

Od objevu topolinů jako přirozeně se vyskytujících aromatických cytokininů se ukázaly být skutečnou alternativou k dlouho sloužícím cytokininům, jako je benzyladenin, zeatin a kinetin v rostlinné pletivové kultuře. Topoliny, zejména *meta*-topolin a jeho deriváty, byly používány pro zahajovací fázi kultury, optimalizaci protokolu a pro potlačení různých *in vitro* vyvolaných fyziologických poruch u mnoha rostlinných druhů. Důkazy z různých studií naznačují rostoucí popularitu a výhody (i když nejsou univerzální pro všechny druhy) topolinů ve srovnání s jinými CK (Aremu *et al.*, 2012). Uvádí se, že topoliny mají vliv na lepší množení výhonků, udržování stability primárních meristémů a na zlepšení schopnosti zakořenění (Amoo *et al.*, 2010).

Kamínek *et al.* (1987) uvádí, že lokalizované akumulaci mT je zabráněno jeho rychlejší translokací v rostlinných pletivech. Metabolity mT a mTR (*meta*-topolin ribosid) jsou snadno odbouratelné. Hydroxylová skupina v postranním řetězci *meta*-topolinů umožňuje tvorbu metabolitů O-glukosidu.

2.2.7 Analýza cytokininů

Hlavní funkcí cytokininů u rostlin je regulace jejich růstu a vývoje. Avšak některé cytokininy (např. kinetin a zeatin) vykazují také významné protistárnoucí, antikarcinogenní a antitrombotické účinky. Mimo to hrají potenciální roli při potlačování růstu nádorů u saveců. Rychlá, specifická a citlivá analýza hladin cytokininů je tedy velice důležitá (Tarkowski *et al.*, 2009).

Vzhledem k tomu, že výtažky z rostlinných pletiv jsou poměrně složité vícesložkové směsi a CK se obvykle vyskytují ve stopových množstvích, jsou pro stanovení jejich endogenních hladin zapotřebí dostatečně citlivé a selektivní analytické metody (Tucker, Roberts, 2000). Pro analýzy jsou upřednostňovány vysoce purifikované vzorky rostlin, bez ohledu na použitou analytickou metodu. Kvantifikace CK byla tradičně prováděna pomocí biotestů a imunotestů. Biotesty jsou sice nezbytné pro izolaci nových sloučenin, avšak jejich nevýhodou je časová náročnost a nepřesnost. Jako citlivá alternativa pro

stanovení hladin CK se dříve používalo technik imunoanalýzy (Morris *et al.*, 1993). Mezi dvě nejběžnější formy cytokininové imunoanalýzy patří radioimunoanalýza (RIA) a enzymová imunoanalýza (ELISA). Dnes se již pro detekci, kvantifikaci a charakterizaci cytokininů v extraktech rostlinného pletiva výhradně používá hlavně kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS; Tarkowski *et al.*, 2009).

Detekce CK v rostlinných pletivech pomocí imunolokalizace nabízí silný nástroj ke studiu distribuce těchto signálních molekul, a to díky vysoce specifickým strukturním požadavkům protilátek na vazbu (Casanova *et al.*, 2004).

Mezi běžné analytické metody patří metody fyzikálně-chemické, jako je vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC; plynová chromatografie (GC) u CK spíše vzácně, jelikož nejsou těkavé) a jako doplňková metoda je v současné době pro analýzy cytokininů používána také kapilární elektroforéza (CE). Hlavní separační metodou používanou pro analýzu a purifikaci proteinů u biologických vzorků je HPLC (Tarkowski *et al.*, 2009).

V každé moderní chemické analýze je klíčovým faktorem příprava vzorku, a to zejména u analytů přítomných ve stopových nebo ultrastopových množstvích ve složitých maticích. Postupy použité pro extrakci CK a přípravu vzorků jsou proto kriticky důležitými kroky v celém analytickém procesu. Na obr. 1 můžeme vidět detailní postupy používané pro extrakci, prekoncentraci a purifikaci cytokininů (Tarkowski *et al.*, 2009).

Analýza CK v rostlinném extraktu je obtížný proces hlavně kvůli nutnosti odlišit studovanou látku od velkého množství nečistot. Vhodná analytická metoda pro stanovení hladin CK v rostlinných pletivech proto vyžaduje spojení efektivního purifikačního postupu s dostatečně citlivou, spolehlivou a selektivní analytickou koncovkou (Tarkowski *et al.*, 2004; Tarkowski *et al.*, 2009).

2.2.7.1 Extrakce a purifikace

Výsledky identifikace a kvantifikace CK extrahovaných z rostlinných pletiv se liší podle použitých typů extrakčních rozpouštědel a postupů. Studovaný rostlinný materiál by měl být po jeho sklizni okamžitě zmrazen nebo extrahován vhodným rozpouštědlem, aby se zabránilo jakékoli světlem indukované, tepelné, oxidativní a enzymatické degradaci CK (např. přeměně cytokininového nukleotidu na jeho ribosid) a aby bylo získáno v dostatečně velkém množství/výtěžku požadované spektrum metabolitů (CK nukleotidy, volné báze, ribosidy, N- a O-glukosidy). Ve vzorku ale bývají kromě studovaného materiálu přítomné i jiné biologické materiály, které často brání izolaci a identifikaci

pikomolárních množství CK (Tarkowski *et al.*, 2004, Tarkowski *et al.*, 2009). Rostlinný materiál bývá obvykle zmrazen v kapalném dusíku a ponechán v Bieleškého rozpouštědle, které obsahuje methanol, chloroform, vodu a kyselinu mravenčí (12:5:2:1, v/v; Bielski, 1964). Také bylo zjištěno, že modifikované Bieleškého rozpouštědlo (methanol-voda-kyselina mravenčí; 15:4:1, v/v) dostatečně potlačilo defosforylaci CK mononukleotidů (Hoyerova *et al.*, 2006).

Pro čištění, extrakci a izolaci mnoha přirozeně se vyskytujících sloučenin se používá extrakce pevnou fází (SPE). Jedna z hlavních výhod SPE spočívá v tom, že vysoké výtěžnosti extrakce lze obvykle dosáhnout vhodným sorbentem a účinným postupem, a to i v situacích, kdy by jiné tradiční extrakční techniky selhaly. Pre-koncentrace CK bývá obvykle dosaženo použitím SPE s tzv. C₁₈ kolonami (Tarkowski *et al.*, 2009). Po pre-koncentraci je možné pokračovat v dalším čištění vzorku, a to pomocí kolon SPE se smíšeným režimem kationtové výměny (MCX = mixed-mode cation exchanger). Čištění CK pomocí MCX SPE je vhodné pro odstranění kontaminantů absorbujících ultrafialové záření s vyšší výtěžností CK (Ge, Yong *et al.*, 2004; Hoyerova *et al.*, 2006).

Jelikož ale mají CK nukleotidy relativně vysokou polaritu, která vede ke špatné retenci kolonami C₁₈ během SPE, je nutno použití aniontoměničového sorbentu jako účinného alternativního kroku k oddělení CK nukleotidů od CK bází a konjugátů cukru. Na základě toho byla vyvinuta účinná dvoustupňová metoda SPE pro pre-koncentraci a čištění CK nukleotidů pomocí kolon Oasis HLB a MAX (Takei *et al.*, 2003; Ge, Yong *et al.*, 2006).

2.2.7.2 Kvantifikace cytokininů

Zásadním krokem pro objasnění role CK v přírodních vědách je vývoj citlivých a spolehlivých analytických metod pro stanovení hladin CK v rostlinných pletivech. Cytokininy vykazují gradace polarity a jsou snadno detekovány UV absorpcí. Proto se jako obzvláště vhodná chromatografická metoda pro jejich analýzu využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC umožňuje rychlou separaci CK s vysokým rozlišením ještě před jejich analýzou pomocí MS, imunotestu nebo biotestu. Nejpoužívanějším postupem pro kvantifikaci CK je MS s izotopovým ředěním, zejména s LC-Elektrosprejová ionizace-MS (LC-ESI-MS; Tarkowski *et al.*, 2009).

Jednou z výhod HPLC/MS oproti jiným technikám je vysoká citlivost a tedy možnost použití velmi malého množství čerstvého materiálu (několik desítek miligramů až gram, v závislosti na druhu pletiva a obsahu endogenních fytohormonů). Při použití

imunoanalytických nebo GC/MS technik toto malé množství nestačí, v tomto případě byly zapotřebí jednotky až desítky gramů čerstvé hmoty. Pro analýzu CK pomocí HPLC/MS je nutná bezchybná chromatografická separace, a to jak z hlediska přirozeného výskytu izomerů, tak z hlediska možnosti eliminace nespecifického „chemického šumu“. Pečlivou chromatografií lze dosáhnout lepšího signálu v detektoru hmotnostního spektrometru (Tarkowski *et al.*, 2004).

2.3 *In vitro* mikropropagace

Mikropropagace je proces vegetativního růstu a množení z rostlinných pletiv nebo semen. Provádí se za aseptických a příznivých podmínek na růstovém médiu pomocí různých technik rostlinných pletivových kultur. Pletivová kultura je založena na konceptu totipotence, což znamená schopnost rostlinných buněk a pletiv vyvinout se ve zcela novou kompletní rostlinu. Díky totipotenci rostlinných buněk obsahují tyto buňky kompletní genetické vlastnosti rostliny, což kromě jiného umožňuje syntetizovat všechny potřebné metabolity. Množství sekundárních metabolitů produkovaných v pletivových kulturách může být dokonce vyšší než v mateřských rostlinách, a proto jsou tyto kultury považovány za účinnou a potenciální alternativu produkce metabolitů (Sidhu, 2010).

Při konvenčním pěstování mnoho rostlin za určitých klimatických podmínek nevyklíčí, nevykvetě, neprodukuje semena a mívají dlouhé období růstu a rozmnožování (Prakash, Staden, 2007). Díky mikropropagaci je zajištěn spolehlivý pravidelný přísun rostlin za použití minimálního prostoru a času.

Mezi výhody mikropropagace léčivých rostlin *in vitro* patří:

- vyšší rychlost množení
- prostředí lze kontrolovat nebo upravovat tak, aby vyhovovalo konkrétním potřebám rostliny
- rostlina je k dispozici po celý rok (bez ohledu na regionální nebo sezónní změny)
- identifikace a produkce klonů s požadovanými vlastnostmi.
- kontrola produkce sekundárních metabolitů
- možnost produkce nových a vylepšených geneticky upravených rostlin
- ochrana ohrožených druhů rostlin
- zachování genetického materiálu pomocí kryokonzervace (Sidhu, 2010)

Během posledních desetiletí byly v různých zemích provedeny četné studie s cílem zlepšit metodu klonální mikropropagace za účelem produkce vysoce kvalitního rostlinného materiálu (konkrétně *Rubus idaeus*). Je známo, že koeficient reprodukce rostlin v kultuře *in vitro* závisí na genotypu, složení živného média, fyzikálních podmínkách kultivace a stabilitě procesu reprodukce při subkultivaci výhonků (Khlebova *et al.*, 2019).

Kultivační médium obsahuje důležité živiny a prvky (sacharózu, makro a mikroživiny, vitamíny, hormony a další organické látky) pro *in vitro* růst rostlinných pletiv a pro jejich úspěšnou kultivaci je volba správného složení média velmi klíčová. Mezi nejvíce

používaná média patří MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Do médií se mimo jiné přidává také agar jako gelující prostředek, který zabraňuje smrti kultivovaných buněk v důsledku ponoření a nedostatku kyslíku v kapalném médiu. Dalším důležitým faktorem je PH kultivačního média (obvykle mezi 5,0-6,0), jelikož ovlivňuje absorpci iontů (Sidhu, 2010).

Klonování *in vitro* zahrnuje několik fází, z nichž hlavní je zavedení explantátů do sterilní kultury, mikropropagace, následuje zakořenění explantátů *in vitro*, a nakonec se regeneranty adaptují na podmínky *ex vitro*. Pro zvýšení efektivity metody je nutné zlepšit a optimalizovat technologii pro všechny výše uvedené kroky.

Khlebova *et al.* (2019) zkoumali vliv fytohormonů na *in vitro* mikropropagaci *Rubus idaeus* a zjistili, že díky přidání BAP do živného média, bez ohledu na koncentraci, se zvýšilo počet výhonků ve srovnání s kontrolními rostlinami pěstovanými na médiích bez BAP. Použití vyšších dávek tohoto cytokininu (2-3 mg/L) vedlo ke snížení rychlosti reprodukce malin. A po přidání ještě o něco vyšší koncentrace BAP (v rozmezí 2,5–3,0 mg/L), byl pozorován anomální vývoj mikrovýhonků (vykazovaly zkroucené listy, zkrácené deformované stonky a orgány měly skelný vzhled).

Jak zmiňuje Khlebová *et al.* (2019) v jejich práci o reprodukci remontantních forem červené maliny, je obecně známo, že výhonky se známkami vitrifikace během *in vitro* reprodukce produkují rostliny, u kterých dojde k zakořenění jen zřídka a zpravidla mohou žít pouze *in vitro*. I při mírném projevu vitrifikace je velmi problematické tyto rostliny přenést do nesterilních podmínek. Zjistili tedy, že přidání menšího množství BAP (1,0 mg/L) do MS média poskytlo intenzivní množení vysoce kvalitních výhonků remontantních červených malin a naopak použití vyšších dávek tohoto cytokininu (2–3 mg/L) pak vedlo ke snížení rychlosti reprodukce odrůdy (Khlebová *et al.*, 2019).

Pro úspěšnou regeneraci a mikropropagaci rostlinného materiálu je tedy klíčová nejen správná volba fytohormonů, ale také jejich koncentrace. Nedostatečné nebo nadměrné množství růstových hormonů totiž může v obou případech způsobit morfologické a fyziologické abnormality (Sidhu, 2010).

2.4 *Rubus idaeus*

Malina (*Rubus idaeus* L.) patří do čeledi Rosaceae. Jedná se o jednu z nejstarších a nejrozšířenějších bobulových plodin, která se pěstuje jak pro její vynikající chuť, tak i pro lékařské a dietetické vlastnosti jejích bobulí. Ovoce *Rubus* obsahuje významné množství vitamínů A a C, antokyanů a polyfenolických látek, a díky tomu vykazují

vysokou antioxidační aktivitu. Malina vstupuje do období tvorby plodů velmi brzy. Následující rok po jarní výsadbě již dává první bobule a po dalším roce se sklizeň výrazně zvýší. Bobule se konzumují čerstvé. Slouží jako cenné suroviny pro potravinářský a cukrářský průmysl, a kromě toho se používají k sušení a zmrazování. Po zmrazení si plody zachovávají svou chuť, aroma a všechny užitečné vlastnosti (Khlebová *et al.*, 2019).

Vzhledem k cennému biochemickému složení bobule se úspěšně používá k prevenci kardiovaskulárních, gastrointestinálních, kožních a jiných onemocnění, a také při nedostatku vitamínů. Kromě toho se ukazuje, že mimořádné množství polyfenolů a vlákniny v červených malinách naznačuje metabolické výhody pro lidi s rizikem cukrovky (Xiao *et al.*, 2017).

2.4.1 Tradiční léčivé účinky

Ovoce je známé pro jeho antiskorbutické a diuretické účinky (jako vynikající nápoj pro zmírnění horečky se doporučuje čerstvý malinový džus s trochou medu). Z malin se také vyrábějí obličejové masky, které jsou vhodné ke zmírnění zarudnutí pokožky. Čaj vyrobený z listů červené maliny se po staletí používal jako lidová medicína k léčbě ran, průjmů, kolikovitých bolestí a při bolesti dělohy. Nálev ze sušených listů maliníku byl podáván těhotným ženám jako tonikum ke zmírnění porodních bolestí a dysmenorey (bolestivá menstruace). Extrakty z listů a kořenů jsou považovány za protizánětlivé, oxytocické (stimulaci děložních kontrakcí) a také se používají jako kloktadlo k léčbě angíny, zánětů úst, zánětů spojivek, drobných ran, popálenin, opařenin, vředů (bércových) a jako obklad k léčbě boláků (Lim T. K., 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- 25% Hydroxid amonný pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- 68% Kyselina dusičná, VWR Chemicals S. A. S. (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Kyselina mravenčí 98% - 100% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí p.a., Honeywell (Seetze, Německo)
- Methanol ($\geq 99,9\%$) gradient grade for liquid chromatography - LiChrosolv, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Redestilovaná voda (Millipore Simplicity™)
- Stabilní izotopově značené interní standardy (IS), (Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého Olomouc, Česká republika):
 - báze (B): $[^{13}\text{C}_5]\text{cZ}$, $[^{13}\text{C}_5]\text{tZ}$, $[^2\text{H}_5]\text{tZR}$, $[^2\text{H}_5]\text{tZ9G}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZ}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZR}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZ9G}$, $[^2\text{H}_6]\text{iP}$, $[^2\text{H}_6]\text{iPR}$, $[^2\text{H}_6]\text{iP9G}$, $[^2\text{H}_7]\text{BAP}$, $[^2\text{H}_7]\text{BAPR}$, $[^2\text{H}_7]\text{BAP9G}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{mT}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{oT}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{pT}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{mTR}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{oTR}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{pTR}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{mT9G}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{oT9G}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{pT9G}$, $[^{15}\text{N}_4]\text{K}$
 - *O*-glukosidy (OG): $[^2\text{H}_5]\text{tZOG}$, $[^2\text{H}_5]\text{tZROG}$, $[^2\text{H}_7]\text{DHZOG}$
 - nukleotidy (NT): $[^2\text{H}_5]\text{tZRMP}$, $[^2\text{H}_3]\text{DHZRMP}$, $[^2\text{H}_6]\text{iPRMP}$, $[^2\text{H}_7]\text{BAPRMP}$

Roztoky:

- 0,35M roztok hydroxidu amonného v 60% methanolu: 150 ml/250 ml methanolu + 93,75 ml/250 ml vody + 6,25 ml/250 ml 25% hydroxidu amonného
- 0,35M roztok hydroxidu amonného: 243,75 ml/250 ml vody + 6,26 ml/250 ml 25% hydroxidu amonného
- 10% methanol (1 ml/10 ml methanolu + 9 ml/10 ml redestilované vody)
- 15 mM mravenčan amonný o pH 3,95 (0,566 ml/l kyseliny mravenčí, pro úpravu pH použít 25% roztok hydroxidu amonného)
- 1M HCOOH: 240,37 ml/250 ml vody + 9,625 ml/250 ml kyseliny mravenčí
- 50% kyselina dusičná: 192,25 ml/250 ml 65% kyseliny dusičné + 57,75 ml/250 ml vody
- Extrakční roztok (modifikovaný Bieleského pufr): 187,5 ml/250 ml methanolu + 12,5 ml/250 ml kyseliny mravenčí + 50 ml/250 ml vody (75 % methanol + 5 % kyselina mravenčí + 20 % redestilovaná voda)

Kolonky pro SPE purifikaci a kapalinovou chromatografi:

- Oasis[®] MCX (30 mg/1 ml), Waters (Milford, MA, USA)
- Pro UHPLC separaci - kolona s reverzní fází Waters UPLC[®] BEH C18 (1,7 µm: 2,1 × 150 mm), Waters (Milford, MA, USA)

3.2 Přístroje

- Analytické váhy Sartorius Weighing Technology (Sartorius, Goettingen, Německo)
- Centrifuga Thermo Scientific[™] Multifuge[™] X1R, Thermo Electron LED GmbH (Osterode am Harz, Německo)
- Kulový mlýnek MM 301, Retsch[®] GmbH & Co. KG (Retsch GmbH, Haan, Německo)
- pH metr CyberScan 500, Oakton[®] (Vernon Hills, IL, USA)
- Purifikační aparatura Visiprep[™] SPE Vacuum Manifold
- Stolní laboratorní rotátor Stuart[®] SB3-BB Scientific – Keison Products (Chelmsford, Velká Británie)
- UHPLC-MS/MS systém – Acquity UPLC[®] I-class systém (Waters, Milford, MA, USA) v zapojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem Xevo[™] TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) vybavený ESI (ionizace elektrosprejem); MassLynx[™] software s TargetLynx[™] programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA) pro zpracování dat
- Ultrazvuková lázeň Transsonic T310, ELMA[®] Schmidbauer GmbH (Singen, Německo)
- Vakuová rotační odparka Trigon-plus[®] RCT1010, Thermo Electron Corporation – k 2006 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Vortex Mixer typ WIZARD, Velp Scientifica (Usmate, MB, Itálie)
- Zařízení na úpravu vody – Millipore Simplicity[™] water purification system, Millipore Corp (Billerica, MA, USA)

3.3 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byly použity mikrovýhonky *Rubus idaeus* odrůd Polka (PL), Zeva (ZV) a Willamet (WL). Materiál byl připraven v biotechnologické firmě Jan Holub s. r. o. Odrůdy byly pěstované na 2 různých kultivačních MS médiích (Murashige & Skoog, 1962). První médium obsahovalo 6-benzylaminopurin a meta-Topolin v koncentraci 1 mg/L a druhý typ média obsahoval 2 mg/L *trans*-Zeatinu. Materiál byl poté kultivován v kultivační místnosti při teplotě 23 °C. Pasáž rostlin se prováděla co 5 týdnů a po dokončení pasážování byly rostliny umístěny pod přímé světlo (plné spektrum, dlouhá perioda – 16 hodin světlo, 8 hodin tma). Nakonec byly celé rostlinky odebrány (za sterilních podmínek ve flowboxu), vloženy do zkumavek Falcon a převezeny. Takto připravený materiál byl skladován v hlubokomrazícím boxu pod tekutým dusíkem při teplotě -70 °C.

3.4 Navážení rostlinného materiálu

Rostlinný materiál (mikrovýhonky odrůd Polka, Zeva a Willamet) byl homogenizován ve třecí misce pod tekutým dusíkem a rozvážen vždy na tři technické replikáty do 2 ml mikrozkuvek Eppendorf. Navážky každého vzorku se pohybovaly kolem 11 mg FW (váha byla přesně zaznamenána).

3.5 Extrakce a MCX Purifikace

Do každé mikrozkuvky s homogenizovaným materiálem byly přidány 3 kuličky (oxid zirkoničitý) pro homogenizaci. Dále bylo do mikrozkuvek přidáno 0,5 ml vychlazeného extrakčního roztoku (modifikovaný Bieleškého pufr) o teplotě -20 °C, ke kterému byly přidány interní standardy o celkovém množství 20 µl (směs cytokininů: 0,25 pmol B (bází); 0,5 pmol OG (O-glukosidů); 0,5 pmol NT (nukleotidů) a 0,25 pmol 7G (7-glukosidů) k ověření kvantifikace hladin endogenních CK.

Takto připravené vzorky v mikrozkuvkách byly vortexovány a homogenizovány v kulovém mlýnku (po dobu 3 minut při 27 Hz). Dále byly vzorky na 3 minuty vloženy do vychlazené ultrazvukové lázně a následně do laboratorního rotátoru (30 minut, 4 °C), kde byly extrahovány. Po extrakci byly vzorky centrifugovány (15 000 rpm, 10 min, 4 °C). Po centrifugaci následovalo odebrání supernatantu z mikrozkuvek Eppendorf a jeho přenesení do nových zkumavek s přidavkem 2,5 ml 1M HCOOH. Nakonec byly vzorky opět vortexovány.

Purifikace probíhala dle MCX purifikačního protokolu (Dobrev a Kamínek, 2002). Pro purifikaci vzorků byla použita extrakce v pevné fázi (SPE) s kolonkami Oasis[®] MCX (30 mg/1 ml). Nejdříve byly aktivovány purifikační kolonky Oasis MCX (založené na kationové výměně) pomocí 1 ml methanolu a 1 ml redestilované vody. Po aktivaci následovalo kondicionování pomocí 1 ml 50% kyseliny dusičné a opětovné promytí 1 ml redestilované vody. Poté byly po 1 ml přidávány vzorky s již předtím přidanou 1M HCOOH (2,5 ml). Jakmile byly do kolonek přidány všechny vzorky, byly zkumavky se zbylým množstvím vzorků doplněny ještě 1 ml 1M HCOOH. Tato směs vzorku s 1M HCOOH byla opět po 1 ml napipetována do kolonek. Nakonec bylo do kolonek napipetován postupně 1 ml redestilované vody a nakonec 1 ml methanolu. Všechny přidané látky, které protekly purifikačními kolonkami skončí v odpadní skleněné nádobě, která se před zahájením eluce vylije a vymyje.

Před samotnou elucí je třeba do vymyté skleněné nádoby vložit stojan se zkumavkami, do kterých budou eluovány CK. Eluce byla nejprve provedena pomocí 1 ml 0,35 M NH₄OH pro NT, a poté 2x1 ml 0,35 M NH₄OH v 60% methanolu pro B a OG. Po dokončení těchto kroků byly zkumavky se vzorky vytaženy a vortexovány. Přečištěné vzorky byly vloženy do odparky, kde došlo k odpaření vzorků do sucha. Nakonec byly vzorky převedeny na kapalnou fázi pomocí 40 µl 10% methanolu pro UHPLC analýzu.

3.6 Separace a stanovení

Identifikace a kvantifikace jednotlivých CK byla provedena pomocí ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografie a následná detekce pomocí hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem vybaveným elektrosprejem (UHPLC – MS/MS). Metoda využívá efektivní separaci na kolonu C18 naplněnou částicemi sub-2-mikronů v kombinaci s MS/MS (pro přesnou kvantifikaci) s použitím záznamu více iontových reakcí (MRM - multiple reaction monitoring) pro měření přirozeně se vyskytujících metabolitů isoprenoidních CK (báze, ribosidy, N-glukosidy, O-glukosidy a nukleotidy; Svačinová *et al.*, 2012).

Separace cytokininových metabolitů probíhala podle Svačinová *et al.* (2012) s pozměněnými separačními podmínkami. Přečištěné vzorky byly tedy rozpuštěny ve 40 µl 10% methanolu a 10 µl každého vzorku bylo nastříknuto na chromatografickou kolonu s reverzní fází Acquity UPLC[®] BEH C18(1,7 µm; 2,1 x 150 mm). Separace probíhala v 17 minutách s využitím tzv. gradientové eluce a došlo tak k rozdělení isoprenoidních a aromatických cytokininových bází, ribosidů, N- a O-glukosidů

a nukleotidů. Gradient se skládal ze 100% methanolu (A) a 15 mM mravenčanu amonného o pH 3, 95 (B) při průtoku 0,4 ml/min. Kolona byla vyhřátá na teplotu 55 °C. Zvýšením průtokové rychlosti a teploty kolony oproti původním podmínkám (Svačinová *et al.*, 2012) došlo ke zkrácení celkové doby analýzy ze 30 min. na 17 min.

Byl použit následující gradient: 0 min, 5:95 (A:B) – 4 min isokratická eluce, 5:95 (A:B) - 10 min lineární gradient, 20:80 (A:B) – 15 min lineární gradient, 50:50 (A:B) - 15.50 min, 99:1 (A:B) – 16.00 min 99:1 (A:B) – 16.50 min, 5:95 (A:B) – 17.00 min, 5:95 (A:B).

Následně byly vzorky detekovány pomocí vysoce selektivní a citlivé tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) s trojitým kvadrupólem (QqQ) a ionizovány elektrosprejem v pozitivním módu ESI+. Optimalizované podmínky pro MRM byly následovné: kapilární napětí 0,75 kV; teplota zdroje/desolvatačního plynu byla 150 °C/600 °C; průtok desolvatačního plynu byl 600 l/h. Ionty byly stanoveny pomocí MRM, kde pak byly sledovány retenční časy separovaných CK ve čtyřech MRM oknech: 6.00 - 10.30 minut, 10.30 – 12.60 minut, 12.60 – 13.80 minut, 13.80 – 15.20 minut. Bylo tak dosaženo zvýšení citlivosti metody (Novák *et al.*, 2008).

Výsledky byly vyhodnocovány pomocí MassLynx softwaru a kvantifikace byla provedena programem TargetLynx. Byl stanoven poměr endogenního cytokininu k příslušnému značenému standardu a dále použit ke kvantifikaci endogenních hladin CK v původním výtěžku podle známého množství přidaného vnitřního standardu (standartní izotopové ředění; Novák *et al.*, 2003).

4 VÝSLEDKY

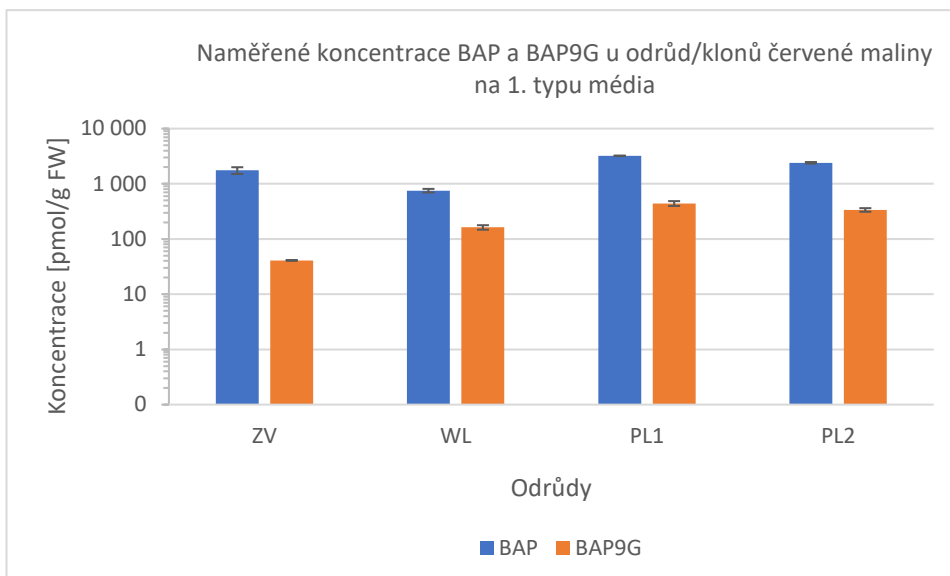
V tomto experimentu jsme zkoumali kvalitativní a kvantitativní obsah cytokininových metabolitů při *in vitro* mikropropagaci tří odrůd maliníku (Polka, Zeva a Willamet). Cytokininu byly extrahovány, rozděleny pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (UHPLC) a následně detekovány MS/MS detektorem. Byly měřeny endogenní hladiny CK v rostlinném materiálu *Rubus idaeus*, konkrétně v jeho mikrovýhoncích odrůd Polka, Zeva a Willamet, pěstovaných na dvou typech kultivačních médiích:

1. médium obsahující 1 mg/L 6-benzylaminopurinu (BAP) a 1 mg/L meta-Topolinu
2. médium obsahující 2 mg/L *trans* – Zeatinu

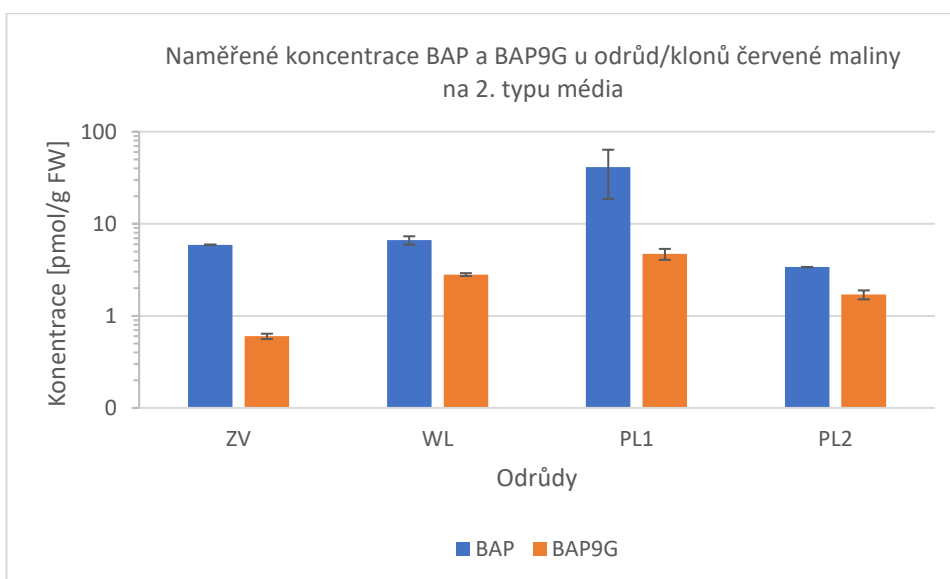
Identifikovány byly následující CK:

- BAP typ – BAP, BAPR, BAP7G, BAP9G, BAPR5'MP
- tZ typ – tZ, tZOG, tZR, tZROG, tZ7G, tZ9G, tZR5'MP
- cZ typ – cZ, cZOG, cZR, cZROG, cZ7G, cZ9G, cZR5'MP
- DHZ typ – DHZ, DHZOG, DHZR, DHZROG, DHZ7G, DHZ9G, DHZR5'MP
- iP typ – iP, iPR, iP7G, iP9G, iPR5'MP
- oT typ – oT, oTR, oT7G, oT9G
- mT typ – mT, mTR, mT7G, mT9G

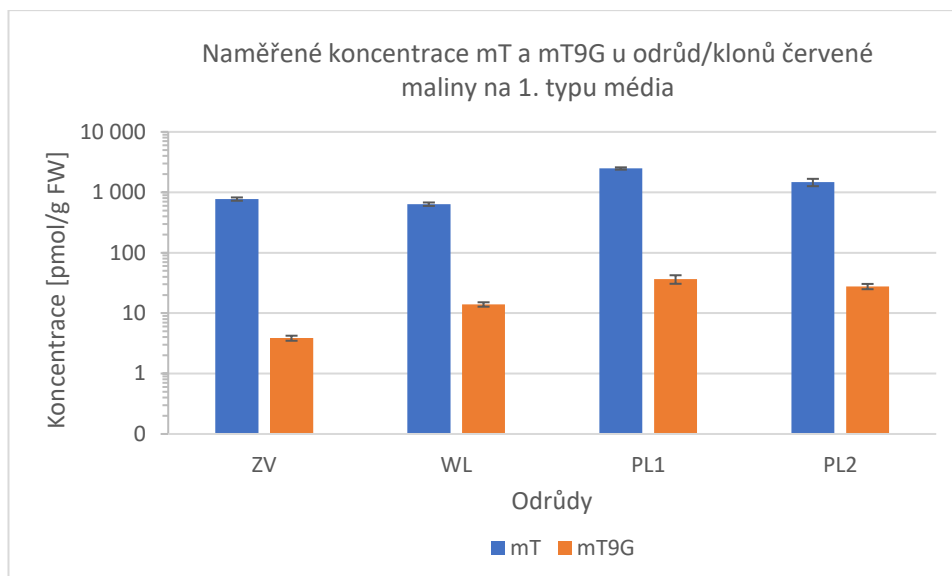
Stanovené hladiny CK jsou znázorněny formou grafů (Obr. 7, 8, 9) a tabulek (Tab. 1, 2, 3, 4 a 5). Naměřené koncentrace cytokininů BAP a BAP9G na 1. typu média můžeme vidět na obr. 7 a naměřené koncentrace cytokininů BAP a BAP9G na 2. typu média na obr. 8.



Obr. 7 Srovnání koncentrace cytokininů BAP a BAP9G detekovaných v mikrovýhoncích *Rubus idaeus* pěstovaných na médiu s obsahem 1 mg BAP + 1 mg mT; Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka (n = 2-3)



Obr. 8 Srovnání koncentrace cytokininů BAP a BAP9G detekovaných v mikrovýhoncích *Rubus idaeus* pěstovaných na médiu s obsahem 2 mg tZ; Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka (n = 2-3)



Obr. 9 Srovnání koncentrace cytokininů mT a mT9G detekovaných v mikrovýhoncích *Rubus idaeus* pěstovaných na médiu s obsahem 1mg BAP + 1 mg mT; Zobrazené hodnoty odpovídají průměru \pm směrodatná odchylka (n = 2-3)

Grafy na obr. č. 7, 8 a 9 znázorňují významný rozdíl mezi koncentrační hladinou aktivních (BAP a mT) a inaktivních (BAP9G a mT9G) CK. Srovnání koncentrace cytokininů mT a mT9G u rostlin pěstovaných na médiu s obsahem 2 mg *trans*-Zeatinu nebylo možno zaznamenat, jelikož hodnoty mT9G se vyskytovaly pod limitem detekce.

Maximální naměřenou hodnotu koncentrace ze všech detekovaných CK vykazoval cytokinin BAP (3 216,64 pmol/g FW). Tuto koncentraci BAP obsahovaly rostliny odrůdy Polka 1 pěstované na 1. typu média (1mg BAP + 1 mg mT). Tak vysoká hladina BAP v rostlinách je způsobena i kultivačním médiem na kterém byly rostliny pěstovány, jehož hlavní složkou byl právě 6-benzylaminopurin.

Z grafů je zřejmé, že obecně nejvyšší naměřené hladiny aktivních CK vykazují právě rostliny odrůdy Polka 1 (PL1). Polka 1 byla považována za nejproblémovější odrůdu, jelikož její rostliny vykazovaly nejhorší růst. Špatný růst byl způsoben (příliš) vysokým obsahem aktivních CK, který u ostatních odrůd/klonů (ZV, WL a PL2) nebyl tak veliký. Tento vysoký obsah aktivních CK způsobuje stres explantátů, zvýšenou aktivitu CK degradačních enzymů a následně naměřený vysoký obsah inaktivovaných metabolitů.

Z těchto grafů je zřejmý velký poměr aktivních/neaktivních CK. Příliš vysoká hladina aktivních cytokininů aktivuje inaktivační enzymy, které syntetizují vyšší hladiny inaktivních metabolitů (např. BAP9G, mT9G atd.). U špatně rostoucích klonů je poměr BAP/BAP9G či mT/mT9G posunut ve směru 9G. Na základě těchto poznatků byla

navržena dvě nová média, ve kterých budou CK ve formě chráněných skupin (THP a ribosidů) a báze se tedy budou uvolňovat postupně (lepší adaptace rostlin na čerstvé médium s obsahem aktivních CK). Všechny ostatní detekované CK a jejich koncentrace je znázorněna formou tabulek 1-5.

Tab. 1 Naměřené endogenní hladiny (ze třech technických replikátů) detekovaných cytokininů odvozených od CK typu BAP v mikrovýhoncích *Rubus idaeus* (mikrovýhonky odrůd Zeva – ZV, Willamet – WL a Polka – PL) pěstovaných na dvou typech kultivačních médií (RB 1-1 a Z); Hodnoty jsou psané ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka; <LOD = pod limitem detekce; Hodnoty jsou psané ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka; <LOD = pod limitem detekce; FW = čerstvá hmotnost

TYP A KONCENTRACE CYTOKININU [pmol/g FW]					
VZORKY	BAPR	BAP7G	BAPR5'MP	BAPR5'MP	
MALINA ZV-RB 1-1	26,75 ± 1,11	<LOD	61,97	± 3,96	
MALINA ZV-Z	<LOD	<LOD		<LOD	
MALINA WL-RB 1-1	39,27 ± 2,50	0,17 ± 0,00	77,46	± 3,07	
MALINA WL-Z	0,11 ± 0,01	<LOD	0,26	± 0,03	
MALINA PL1-RB 1-1	148,20 ± 11,01	0,21 ± 0,01	356,34	± 8,44	
MALINA PL1-Z	0,11 ± 0,04	<LOD		<LOD	
MALINA PL2-RB 1-1	63,81 ± 3,39	0,17 ± 0,01	156,06	± 15,40	
MALINA PL2-Z	<LOD	<LOD		<LOD	

Tab. 2 Naměřené endogenní hladiny (ze třech technických replikátů) detekovaných cytokininů odvozených od CK typu tZ v mikrovýhonicích *Rubus idaeus* (mikrovýhonky odrůd Zeva – ZV, Willamet – WL a Polka – PL) pěstovaných na dvou typech kultivačních médií (RB 1-1 a Z); Hodnoty jsou psané ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka; <LOD = pod limitem detekce; FW = čerstvá hmotnost; koncentrace cytokininů tZ7G a tZ9G není v tabulce znázorněna, jelikož se její hodnoty pohybovaly pod limitem detekce

VZORKY	TYP A KONCENTRACE CYTOKININU [pmol/g FW]							tZRS'MP
	tZ	tZOG	tZR	tZROG	tZ7G	tZ9G	tZRS'MP	
MALINA ZV-RB 1-1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MALINA ZV-Z	125,61 ±	11,59 ±	57,09 ±	3,92 ±	5,19 ±	0,45 ±	6,65 ±	1,87 ±
MALINA WL-RB 1-1	1,28 ±	0,08 ±	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MALINA WL-Z	184,28 ±	10,64 ±	133,11 ±	6,99 ±	7,44 ±	0,10 ±	21,55 ±	5,59 ±
MALINA PL1-RB 1-1	4,48 ±	0,33 ±	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MALINA PL1-Z	406,53 ±	41,15 ±	297,89 ±	24,40 ±	11,63 ±	0,87 ±	20,85 ±	5,39 ±
MALINA PL2-RB 1-1	6,34 ±	1,33 ±	1,43 ±	0,01 ±	0,13 ±	0,02 ±	0,06 ±	<LOD
MALINA PL2-Z	822,47 ±	83,05 ±	328,94 ±	2,00 ±	25,27 ±	2,57 ±	30,49 ±	12,77 ±

Tab. 3 Naměřené endogenní hladiny (ze třech technických replikátů) detekovaných cytokininů odvozených od CK typu cZ v mikrovýhonicích *Rubus idaeus* (mikrovýhonky odrůd Zeva – ZV, Willamet – WL a Polka – PL) pěstovaných na dvou typech kultivačních médií (RB 1-1 a Z); Hodnoty jsou psané ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka; <LOD = pod limitem detekce; FW = čerstvá hmotnost; koncentrace cytokininů cZ7G a cZ9G není v tabulce znázorněna, jelikož se její hodnoty pohybovaly pod limitem detekce

VZORKY	TYP A KONCENTRACE CYTOKININU [pmol/g FW]									
	cZ	cZOG	cZR	cZROG	cZRS MP	cZ	cZOG	cZR	cZROG	cZRS MP
MALINA ZV-RB 1-1	0,51 ± 0,01	11,71 ± 1,78	1,09 ± 0,09	50,19 ± 6,44	1,90 ± 0,20	1,04 ± 0,11	15,97 ± 1,58	3,19 ± 0,14	85,00 ± 7,74	2,40 ± 0,06
MALINA WL-RB 1-1	1,35 ± 0,18	15,59 ± 0,53	2,91 ± 0,29	64,43 ± 3,49	<LOD	0,79 ± 0,05	16,93 ± 0,82	2,51 ± 0,14	82,83 ± 3,36	1,84 ± 0,08
MALINA PL1-RB 1-1	0,57 ± 0,14	7,71 ± 0,11	2,06 ± 0,62	34,38 ± 1,78	± 0,16	0,58 ± 0,10	10,93 ± 1,23	1,29 ± 0,09	49,66 ± 5,17	2,33 ± 0,07
MALINA PL1-Z	<LOD	10,03 ± 0,43	2,37 ± 0,26	75,45 ± 9,33	± 0,04	0,58 ± 0,10	10,93 ± 1,23	1,29 ± 0,09	49,66 ± 5,17	2,33 ± 0,07
MALINA PL2-RB 1-1	0,58 ± 0,10	10,93 ± 1,23	1,29 ± 0,09	49,66 ± 5,17	± 0,07	0,58 ± 0,10	10,93 ± 1,23	1,29 ± 0,09	49,66 ± 5,17	2,33 ± 0,07
MALINA PL2-Z	<LOD	10,33 ± 0,65	1,63 ± 0,03	69,50 ± 4,83	± 0,32	0,58 ± 0,10	10,93 ± 1,23	1,29 ± 0,09	49,66 ± 5,17	2,33 ± 0,07

Tab. 4 Naměřené endogenní hladiny (ze třech technických replikátů) detekovaných cytokininů odvozených od CK typu oT v mikrovýhoncích *Rubus idaeus* (mikrovýhonky odrůd Zeva – ZV, Willamet – WL a Polka - PL) pěstovaných na dvou typech kultivačních médií (RB 1-1 a Z); Hodnoty jsou psané ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka; <LOD = pod limitem detekce; FW = čerstvá hmotnost

TYP A KONCENTRACE CYTOKININU [pmol/g FW]						
VZORKY	oT			oTR		
MALINA ZV-RB 1-1	7,62	±	0,90	0,97	±	0,05
MALINA ZV-Z	<LOD			0,20	±	0,02
MALINA WL-RB 1-1	9,54	±	0,32	2,22	±	0,30
MALINA WL-Z	<LOD			0,23	±	0,03
MALINA PL1-RB 1-1	21,83	±	3,17	2,53	±	0,32
MALINA PL1-Z	<LOD			0,16	±	0,01
MALINA PL2-RB 1-1	12,66	±	0,57	1,01	±	0,10
MALINA PL2-Z	<LOD			0,19	±	0,02

Tab. 5 Naměřená endogenní hladina (ze třech technických replikátů) detekovaného cytokininu mTR v mikrovýhoncích *Rubus idaeus* (mikrovýhonky odrůd Zeva – ZV, Willamet – WL a Polka – PL) pěstovaných na dvou typech kultivačních médií (RB 1-1 a Z); Hodnoty jsou psané ve tvaru: průměrná hodnota ± směrodatná odchylka; <LOD = pod limitem detekce; FW = čerstvá hmotnost; koncentrace cytokininu mT7G není v tabulce znázorněna, jelikož se její hodnoty pohybovaly pod limitem detekce;

TYP A KONCENTRACE CYTOKININU [pmol/g FW]			
VZORKY	mTR		
MALINA ZV-RB 1-1	328,88	±	18,96
MALINA ZV-Z	0,51	±	0,07
MALINA WL-RB 1-1	397,39	±	21,99
MALINA WL-Z	1,71	±	0,20
MALINA PL1-RB 1-1	587,27	±	57,19
MALINA PL1-Z	0,97	±	0,18
MALINA PL2-RB 1-1	368,02	±	22,24
MALINA PL2-Z	0,52	±	0,05

U každého vzorku byla provedena tři technická opakování. Ve většině případů byly však průměr a směrodatná odchylka těchto replikátů vypočítány pouze ze dvou hodnot namísto měřených tří, jelikož třetí hodnota byla vyloučena jako odlehlá. Tento stav může vzniknout z různých příčin, například špatná ionizace vzorku či jeho nedostatečná homogenizace. Statistické vyhodnocení (signifikance rozdílů) tedy bohužel nebylo možné, kvůli nedostatečnému počtu hodnot.

5 DISKUZE

Nízké množení výhonků, morfologické abnormality, špatná četnost zakořenění a vysoké náklady na produkci patří mezi faktory zpochybňující mikropropagaci *Rubus idaeus*. Většinu těchto problémů lze zmírnit použitím vhodného typu a koncentrace regulátoru (regulátorů) růstu rostlin (zejména cytokininů) při vývoji účinných protokolů pro mikropropagaci (Amoo *et al.*, 2010). V této studii jsme zkoumali účinky různých cytokininů na produkci mikrovýhonků z explantátů výhonků červené maliny.

Endogenní analýzy fytohormonů ukázaly, že v případě odrůd Polka se v rostlinách vyskytovaly o hodně vyšší koncentrace CK z médií, ale zároveň se tvořil i 9-glukosid (inaktivní forma CK), a to u rostlin rostoucích jak na jednom, tak i na druhém médiu. U klonů (Polka), které vykazují horší růst, byla změřena zhruba dvojnásobná koncentrace BAP z média, ale zároveň i 10násobná koncentrace 9-glukosidu.

Touto problematikou se zabývali např. Bairu *et al.* (2011), kde zkoumali vliv endogenních CK na mikropropagaci *Harpagophytum procumbens* (Čertův dráp), u kterého se často vyskytovala nekroza špiček výhonků. Při srovnání kontrolních (zdravých) vzorků rostlin s těmi nekrotickými zjistili, že nekrotické vzorky poskytly více 9-glukosidů ve srovnání s jejich kontrolními protějšky. Abnormality v pletivové kultuře, která byla ošetřena BAP byly často spojeny s relativně vysokou úrovní metabolitu BAP9G (6-benzylaminopurin-9-glukosid; Werbrouck *et al.*, 1995; Bairu *et al.*, 2007). Tento metabolit, který je výsledkem glukosylace adeninového kruhu v poloze N9 je inaktivní, a není snadno přeměnitelný na jiné použitelné formy CK (Sakakibara, 2006).

Špatně vyvinuté anatomické struktury a nekrózu špiček výhonků u *H. procumbens* lze přičíst špatnému transportu CK právě v kulturách ošetřených BAP. Avšak rostliny ošetřené mTR vykazovaly snížený výskyt nekrózy. Rostliny ošetřené topoliny (mT a mTR) konzistentně poskytovaly vyšší množství jak aktivních forem (volné báze a ribosidy), tak zásobních forem (O-glukosidy) ve srovnání s jejich protějšky ošetřenými BAP (Bairu *et al.*, 2011) a také vyšší počet kvalitních explantátů. Tyto poznatky nám byly nápomocné k vytvoření nového kultivačního média, jehož hlavní složkou budou právě ribosidy jako chráněné formy CK (ve stejné koncentraci jako volné báze v původním médiu), které ve zmiňovaném experimentu projevily na rostliny pozitivnější účinek oproti volným bázím.

Na základě našich výsledků endogenních analýz fytohormonů byla navržena optimalizovaná kultivační média pro vybrané odrůdy pro *Rubus idaeus*. Rostliny dobře

rostoucí na médiu obsahující BAP a mT vykazují vyšší poměr aktivních ku inaktivním metabolitů. Tento poměr (BAP/BAP9G) nám pomohl k návrhu nového kultivačního média, které bude obsahovat chráněné formy CK, a to 9-ribosidy případně 9-tetrahydropyranyl deriváty. BAP9G je totiž zodpovědný za inhibici zakořeňování (Malá *et al.*, 2009), a proto je výhodné přidat do média CK ve chráněné formě (THP), aby k 9-glukosidaci nedocházelo, nebo jen v mnohem menší kvantitě. Rostliny rostoucí na druhém typu média (obsahující tZ) také vykazovaly větší množství aktivních CK vzhledem k inaktivním, a tak nově navržené médium již bude místo tZ obsahovat jeho ribosid jako chráněnou formu CK. Původní média obsahující báze posloužily jako negativní kontrola.

Tetrahydropyranyl (THP) je považován za užitečnou chránící skupinu. Má několik výhod (nízké náklady, snadná manipulace a zavedení, dobrá rozpustnost). Lze jej snadně odstranit, což je výhodné v případě, kdy funkční skupina, kterou chrání, vyžaduje manipulaci (Sharma *et al.*, 2017).

Plíhal *et al.* v roce 2013 při studiu vlivu různých cytokininových derivátů na hydroponicky pěstované sazenice kukuřice zjistili, že substituce tetrahydropyranyl a tetrahydrofuranlyl na atomu N9 adeninového zbytku pomohly k intenzivnějšímu akropetálnímu transportu modifikovaného cytokininu. V důsledku toho došlo ke změnám v distribuci aktivních cytokininů spolu s postupnou metabolickou přeměnou modifikovaného cytokininu na jeho volnou formu. Tyto změny zabraňují inhibici růstu kořenů, která omezuje využití cytokininů v mikropropagačních technikách. Zmiňované N9-substituované deriváty aromatických CK mají tedy velký potenciál jako alternativní sloučeniny pro zlepšení regeneračních technik rostlin *in vitro*.

Z výsledků našich i předchozích autorů vyplývá, že příliš vysoká hladina aktivních CK (bází) rostlinám škodí, rostliny jsou stresovány a spouštějí inaktivační metabolismy, jako např. glukosylaci. Pokud se do média přidají CK ve chráněné formě, dojde k postupnému uvolňování bází v pletivech, rostlina se bude lépe přizpůsobovat na čerstvé médium, a tudíž je větší šance na její přežití a kvalitu jejich výhonků.

6 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo stanovení endogenních hladin CK v mikrovýhoncích červené maliny (*Rubus idaeus*) ve fázi mikropropagace *in vitro* pěstovaných na dvou různých typech kultivačních médií. Osvojila jsem si techniky extrakce, purifikace a následné stanovení cytokininů z rostlinného materiálu. Cytokiny byly purifikovány podle purifikačního MCX protokolu s kolonami OASIS MCX a poté detekovány metodou UHPLC-MS/MS.

Na základě našich poznatků byly navrženy dva nové typy médií. Jedno obsahující CK ve formě ribosidů a druhé obsahující deriváty THP (tetrahydropyranyl). Zjistili jsme, že pokud médium obsahuje CK ve formě ochráněné proti N⁹-glukosylaci, rostlina se lépe přizpůsobuje, nespouští své CK deaktivující mechanismy a tím pádem je výsledný rostlinný materiál kvalitnější.

Rubus idaeus se pěstuje jako okrasná, ovocná a léčivá rostlina. Zajištění dostatečné produkce geneticky stabilního rostlinného materiálu je stěžejní pro jejich komerční pěstování (Welander *et al.*, 2014).

Cytokiny hrají v rostlinném organismu důležitou roli. Také na jejich množství a poměru k auxinu v kultivačním médiu závisí kvalita regenerace rostlinného materiálu. Optimalizace metod pěstování vybraných kultivarů drobného ovoce *in vitro* na médiích obsahujících nové cytokininové deriváty by mohla pomoci k dosažení kvalitnějších výhonků *Rubus idaeus* a zároveň pomoci i při dalších výzkumech rostlinných hormonů či jiných látek v odrůdách drobného ovoce nejen ve firmě Jan Holub s.r.o.

7 LITERATURA

Amoo S. O., Finnie J. F. a Van Staden J. (2011): The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regulation* **63**(2), 197-206.

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 (PCTOC)* **108**(1), 1-16.

Bairu M. W., Novák O., Doležal K., Van Staden J. (2011): Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *Plant Growth Regulation* **63**(2), 105-114.

Bairu M. W., Stirk W. A., 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.

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 Physiol* **102**, 867-872.

Bieleski R. L. (1964): The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* **9**(4), 431-442.

Brukhin V., Morozová N. (2011): Plant Growth and Development – Basic Knowledge and Current Views. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena* **6**(2), 1-53.

Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F. (2003): Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**, 413-421.

Casanova E., Valdés A. E., Fernández B., Moysset L., Trillas M. I. (2004): Levels and immunolocalization of endogenous cytokinins in thidiazuron-induced shoot organogenesis in carnation. *Journal of Plant Physiology* **161**(1), 95-104.

Damanik R. I., Lumbangaol L. D., Rahmawaty N., Sipayung R. (2019): Effect of benzyl amino purin (BAP) and gibberellin acid (GA 3) to chlorophyll and antioxidant enzymes of soybean (*Glycine max* (L) Merrill.) genotypes in response to inundation conditions. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **260**, 012153.

Davies P. J. (2010): *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. 3rd ed., Springer, Dordrecht, Netherlands, 802 stran.

Dobrev P. I., 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.

Durand R., Durand B. (1994): Cytokinins and reproductive organogenesis in *Mercurialis*. In: Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function (Mok DWS, Mok MC, eds.), *Boca Raton, FL: CRC Press*, s. 295–304.

Faure J. D., Vittorioso P., Santoni V., Fraisier V., Prinsen E., Barlier I., Van Onckelen H., Caboche M., Bellini C. (1998): The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation. *Development* **125**(5), 909–918.

Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N., Yang X. H., Ong E. S. (2004): Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **1048**(1), 119-126.

Ge L., Yong J. W. H., Tan S. N., Yang X. H., Ong E. S. (2006): Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **1133**(1-2), 322-331.

- Großkinsky D., Edelsbrunner K., Pfeifhofer H., Van Der Graaff E., Roitsch T. (2013): Cis - and trans-zeatin differentially modulate plant immunity. *Plant Signaling & Behavior* **8**(7), e24798.
- Hall R. H., Csonka L., David H., McLennan B. (1967): Cytokinins in the soluble RNA of plant tissues. *Science* **156**(3771), 69–71.
- Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G., Wareing P. F. (1973): A new cytokinin from populus robusta. *Tetrahedron Letters* **14**(30), 2827-2828.
- Hou B., Lim E.-K., Higgins G. S., Bowles D. J., (2004): N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry* **279**(46), 47822-47832.
- Houssa C., Bernier G., Pieltain A., Kinet J. M., Jacqmard A. (1994): Activation of latent DNA-replication origins – a universal effect of cytokinins. *Planta* **193**, 247-250.
- Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P., Kocábek T., Šolcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006): Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry* **67**(11), 1151-1159.
- Kakimoto, T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**(3), 233–239.
- Kamínek M., (1992): Progress in cytokinin research. *Trends in Biotechnology* **10**, 159-164.
- Khlebová L. P., Titová A. M., Pirogová A. V. (2019): Biotechnological approaches to the reproduction of remontant forms of red raspberry. *Ukrainian Journal of Ecology* **9**(3), 402-405.
- Lakitan B. (1996): *Physiology of plant growth and development (In Indonesian)* (Jakarta: Grafindo Persada), 217 stran.
- Lim T. K., *Rubus idaeus* (2012): *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 555-569.
- Malá J., Máchová P., Cvrčková H., Karady M., Novák O., Mikulík J., Hauserová E., Greplová J., Strnad M., Doležal K. (2009): Micropropagation of Wild Service Tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins During Organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**(4), 341-348.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1955): Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**(5), 1392-1392.
- Mlejnek P. Procházka S. (2002): Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* **215**, 158-166.
- Mok D. W. S., & Mok M. C. (2001): Cytokinin metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**(39), 89–118.
- Morris R. O., Blevins D. G., Dietrich J. T., Durley R. C., Gelvin S. B., Gray J., Hommes N. G., Kamínek M., Mathews L. J., Meilan R., Reinbott T. M., Sayavedra-Soto L. (1993): Cytokinins in Plant Pathogenic Bacteria and Developing Cereal Grains. *Functional Plant Biology* **20**(5), 621-637.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**(3), 473-497.
- 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.

- 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.
- Plíhal O., Szüčová L., Galuszka P. (2013): N9-substituted aromatic cytokinins with negligible side effects on root development are an emerging tool for in vitro culturing. *Plant Signaling & Behavior* **8**(6), e24392.
- Prakash S., Van Staden J. (2007): Micropropagation of *Hoslundia opposita* Vahl — a valuable medicinal plant. *South African Journal of Botany* **73**(1), 60-63.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., Šantrůček J., Nátr L., Tesařová M., Havel L., Sladký Z., Gloser J., Prášil I., Vyskot B., (1998): *Fyziologie rostlin.*, vyd. 1., Academia, Praha, Česká republika, 484 stran.
- Sakakibara H. (2006): CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**(1), 431-449.
- Sharma A., Ramos-Tomillero I., El-Faham A., Nicolas E., Rodriguez H., De La Torre B. G., Albericio F. (2017): Understanding Tetrahydropyranyl as a Protecting Group in Peptide Chemistry. *ChemistryOpen* **6**(2), 168-177.
- Schäfer M., Brütting Ch., Meza-Canales I. D., Großkinsky D. K., Vanková R., Baldwin I. T., Meldau S. (2015): The role of cis – zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *Journal of Experimental Botany* **66**(16), 4873-4884.
- Schmülling T. (2004): Cytokinin. In: Encyclopedia of Biological Chemistry (W. J. Lennarz, M. D. Lane, eds.), *Academic Press/Elsevier Science*, New York, s. 1–6.
- Sidhu Y. (2010): *In Vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. *The Plymouth Student Scientist* **4**(1), 432-449.
- Silva-Navas J., Conesa C. M., Saez A., Navarro-Neila S., Garcia-Mina J. M., Zamarreño A. M., Baigorri R., Swarup R., Pozo J. C. (2019): Role of cis-zeatin in root responses to phosphate starvation. *New Phytologist* **224**(1), 242-257
- Spíchal L. (2012): Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**(4), 267–284.
- Spíchal L., Raková N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., 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 Cell Physiology* **45**, 1299-1305.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**(4), 674-688.
- Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012): A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**(1), 17.
- Takagi M., Yokota T., Murofushi N., Saka H., Takahashi N. (1989): Quantitative changes of free-base, riboside, ribotide and glucoside cytokinins in developing rice grains. *Plant Growth Regulation* **8**(4), 349-364.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2003): A method for separation and determination of cytokinin nucleotides from plant tissues. *Journal of Plant Research* **116**(3), 265-269.
- Tarkowski P., Doležal K., Strnad M. (2004): Analytické metody studia cytokininů. *Chemické Listy* **98**, 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.

Temmerman W., Ritsema T., Simon-Mateo C., Van Montagu M., Mironov V., Inze D., Goethals K., Holsters M. (2001): The *fas* locus of the phytopathogen *Rhodococcus fascians* affects mitosis of tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett* **492**, 127-132.

Tucker G. A., Roberts J. A. (2000): *Plant Hormone Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 199 stran.

Welander M., Persson J., Asp H., Zhu L. H. (2014): Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* **179**, 227-232.

Werbrouck S. P. O., Van Der Jeugt B., Dewitte W., Prinsen E., Van Onckelen H. A., Debergh P. C. (1995): The metabolism of benzyladenine in *S. floribundum* 'Schott Petite' in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Report* **14**, 662–665.

Xiao D., Huang Y., Park E., Edirisinghe I., Burton-Freeman B. (2017): Red raspberries and insulin action: understanding the role of red raspberry consumption on postprandial metabolic indices. *FASEB Journal, Bethesda* **31**(1), 973-979.

Zürcher E., Müller B. (2016): *Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function—Advances and New Insights*. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, s. 1-38.

8 SEZNAM ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
B	cytokininové báze
BA (BAP)	benzyladenin (benzylaminopurin)
BAPRMP	benzylaminopurin ribosid-5'-monofosfát
BY-2	buněčná kultura odvozená z <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bright Yellow-2
C18	oktadecylová fáze vázaná na nosiči
CE	kapilární elektroforéza
CK	cytokininy
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ7G</i>	<i>cis</i> -zeatin-7-glukosid
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZR5'MP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>cZRMP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosidmonofosfát
<i>cZROG</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
DHZ	dihydrozeatin
DHZ7G	dihydrozeatin-7-glukosid
DHZ9G	dihydrozeatin-9-glukosid
DHZOG	dihydrozeatin <i>O</i> -glukosid
DHZR	dihydrozeatin ribosid
DHZR5'MP	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát
DHZRMP	dihydrozeatin ribosid-5'-monofosfát
DHZROG	dihydrozeatin ribosid- <i>O</i> -glukosid
DMAPP	dimethylalylidifosfát
ESI	ionizace elektrosprejem
FW	hmotnost čerstvé hmoty
GA	gibereliny

GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
HLB	hydrofilně-lipofilně vyvážený sorbent
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HPLC	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
IAA	kyselina indol-3-octová
iP	isopentenyladenin
iP7G	isopentenyladenin-7-glukosid
iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid
iPR	isopentenyladin ribosid
iPR5'MP	isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát
iPRMP	isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát
iPRMP	isopentenyladenin ribosid-5'-monofosfát
IPT	isopentenyltransferáza
IS	interní standard
KIN	kinetin
LC-ESI-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s elektrosprejovou ionizací a s hmotnostní spektrometrií
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
MAX	směsná fáze kombinující aniontově výměnné a reverzní fáze sorbentu
MCX	kombinace kationtově-výměnného nosiče s reverzní fází
MRM	selektivní záznam více iontových reakcí
mT	<i>meta</i> -topolin
mT7G	<i>meta</i> -topolin-7-glukosid
mT9G	<i>meta</i> -topolin-9-glukosid
mTR	<i>meta</i> -topolin ribosid
NT	cytokininové nukleotidy
OG	cytokininové <i>O</i> -glukosidy
oT	<i>ortho</i> -topolin
oT7G	<i>ortho</i> -topolin-7-glukosid
oT9G	<i>ortho</i> -topolin-7-glukosid
oTR	<i>ortho</i> -topolin ribosid

Pi	fosfát
PL	odrůda <i>Rubus idaeus</i> zvaná Polka
<i>pT</i>	<i>para</i> -topolin
<i>pTR</i>	<i>para</i> -topolin ribosid
QqQ	trojitý kvadrupól
RIA	radioimunoanalýza
SAM	stonkový apikální meristém
SPE	extrakce tuhou fází
SPE	extrakce tuhou fází
THP	tetrahydropyranyl
tRNA	transportní ribonukleová kyselina
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyltransferáza
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin-7-glukosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukosid
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>tZR5'MP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
<i>tZROG</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid <i>O</i> -glukosid
UHPLC	ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie
UHPLC-MS/MS	ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
WL	odrůda <i>Rubus idaeus</i> zvaná Willamet
ZV	odrůda <i>Rubus idaeus</i> zvaná Zeva