



## Détermination des teneurs en phytohormones endogènes des organes caulinaires et racinaires des hybrides de bananier (*Musa sp.*).

Mazinga Kwey Michel<sup>1</sup>, Mario Godoy Jara <sup>2</sup>, Baboy Longanza Louis <sup>3&4</sup>, Useni Sikuzani Yannick <sup>4\*</sup>, Van Koninckxloo Michel<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de culture *in vitro* des plantes, Département de phytotechnie, Faculté des sciences agronomiques, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, RD Congo. E-mail : [michelmaz2003@yahoo.fr](mailto:michelmaz2003@yahoo.fr). Tél : +243970648542.

<sup>2</sup> Haute Ecole Provinciale du Hainaut Occidentale-Condorcet et laboratoire de culture *in vitro* du centre de Recherches « Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la Province de Hainaut » (CARAH asbl), rue Paul Pastur 11, 7800 ATH/Belgique,

<sup>3</sup> Collaborateur Scientifique au Service d'Écologie du Paysage et Systèmes de Production Végétale, à l'Université Libre de Bruxelles, Avenue F.D. Roosevelt 50, CP 169 B-1050 Bruxelles, Belgique

<sup>4</sup> Département de phytotechnie, Faculté des sciences agronomiques, Université de Lubumbashi B.P 1825 Lubumbashi, RD Congo

<sup>5</sup> Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la Province de Hainaut (CARAH asbl) et Inspection générale de l'enseignement supérieur de la Province de Hainaut. , rue Paul Pastur 11, 7800 ATH/Belgique.

\*Auteur correspondant : [yannickuseni@gmail.com](mailto:yannickuseni@gmail.com); Tel : +243813666582

Original submitted in on 14<sup>th</sup> September 2012. Published online at [www.m.elewa.org](http://www.m.elewa.org) on 31<sup>st</sup> October 2012.

### RESUME

**Objectifs :** Le présent travail a été initié en vue de vérifier par HPLC-MS/MS la présence mais aussi la quantité endogène de l'auxine (AIA) et les cytokinines (métatopoline et zéatine) dans les tissus végétaux de vitroplants des hybrides de bananier.

**Méthodologie et résultats :** Pour l'analyse des phytohormones, on a utilisé un Acquity Ultra performance LC (HPLC) de Waters couplé à un TQ Detector Acquity. Les résultats ont montré la présence de la zéatine dans les tissus végétaux de *Musa spp.* En outre, la teneur en métatopoline varie suivant les cultivars.

**Conclusion et application de la recherche :** la connaissance de la teneur endogène en phytohormones permettra d'élaborer un milieu de culture spécifique aux cultivars et la mise en place d'une balance hormonale adéquate pour la multiplication *in vitro* des plantes.

**Mots clés :** bananier, phytohormones, hybride, cultivars, vitroplants

### ABSTRACT

**Determination of endogenous phytohormones levels of stems and root organs of hybrid banana (*Musa sp.*).**

**Objectives:** This work was initiated to verify by HPLC-MS/MS the presence and the amount of endogenous auxin (IAA) and cytokinins (metatopolin and zeatin) in the plant tissues of banana cultivars vitroplants.

**Methods and results:** For analysis of phytohormones, Acquity Ultra Performance LC (HPLC) coupled to a Waters TQ Detector Acquity was used. The results showed the presence of zeatin in plant tissues of *Musa* spp. Furthermore, the metatopoline content varied with cultivars.

**Conclusion and application of research:** the knowledge of the endogenous phytohormone content will help to develop a specific culture medium for cultivars and the establishment of a proper hormonal balance for the *in vitro* multiplication of plants

**Keywords:** banana, phytohormones, hybrid, cultivars, vitroplants

## INTRODUCTION

Les cytokinines et les auxines sont connues pour leur rôle principal dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire végétale. Elles ont des effets stimulateurs et inhibiteurs au cours de différents processus de développement parmi lesquels ; l'inhibition de l'induction racinaire, du bourgeonnement, et même de la sénescence. L'auxine est la première hormone identifiée chez les végétaux, elle interagit avec les cytokinines dans l'initiation de racines, de la dominance apicale, de la formation de méristèmes, avec l'acide gibbérellique dans l'élongation de la tige (Ross et Neill, 2001) et de l'induction de la parthénocarpie (Vivian-Smith et Koltunow, 1999). Elle interagit aussi avec de l'acide abscissique et de l'éthylène qui affectent l'abscission des feuilles, des fleurs et fruits, la régulation de l'ouverture du stomate, l'initiation florale, la sénescence végétale ainsi que la maturation (Eckert et Kaldenhoff, 2000 ; Swarup *et al.*, 2002) L'interaction des phytohormones joue un rôle capital dans la réponse des végétaux aux stress environnementaux et la résistance aux maladies (Xiong, 2002 ; Anderson, 2004). Les cytokinines naturelles sont dérivées de la purine et sont classées selon la configuration de leur chaîne N6-coté comme cytokinines isoprénoides ou aromatiques (Werbrouck, 2010). Avant, seules les cytokinines ayant une chaîne latérale isoprénoides ont été jugées composés endogènes. Actuellement, on a découvert plusieurs cytokinines naturelles aromatiques ayant un potentiel d'application prometteuse dans la micropropagation des espèces végétales. Le choix de type de cytokinines et de concentration exogène en est une étape décisive dans la culture de tissus des espèces difficiles à multiplier *in vitro*. Ce qui résoudrait les difficultés rencontrées dans

la culture *in vitro* de FHIA-01 et d'autres espèces végétales pour lesquelles l'application de la N 6-Benzylaminopurine (BA) n'est pas efficace. Par ailleurs, chaque espèce végétale peut avoir ses exigences en ce qui concerne le type et la concentration de phytohormones exogènes. Le choix d'une cytokinine, de sa concentration (balance hormonale ; cytokinine/auxine) reste un facteur limitant du succès et de l'échec dans les systèmes de micropropagation d'une espèce végétale (Werbrouck, 2010). Bogaert *et al.* (2006) ont démontré comment la MemTR donne un bon résultat en micropropagation par apport à la BA. Dans un milieu contenant 1-2  $\mu$ M MemTR, les explants de *Pétunia* chimère produisent un nombre considérable de nouvelles pousses chimères, avec seulement un petit nombre de vitrovariants. Alors que la même concentration de la BA produit assez de vitrovariants non chimères. Le choix de metatopoline (mT) a permis la multiplication de FHIA-01 de bananier alors qu'avec la même concentration de BA, les explants de FHIA-01 n'ont produit aucune pousse. La concentration de 10 SM MemTR + 10 SM BA a permis d'améliorer le taux de multiplication de FHIA-01 et produit un nombre moyen acceptable de racines ; par contre, à la même concentration dans le milieu de culture la BA seule, inhibe la multiplication mais active une induction précoce et massive des racines. La BA est la plus connue et a été isolée et identifiée dans les feuilles matures de peuplier (Horgan *et al.*, 1973 ; Horgan *et al.*, 1975). Elle a été également isolée des fruits de *Zantedeschia ethiopica* par Chaves das Neves et Pais (1980). Les études menées par Ernst *et al.* (1983) sur une culture cellulaire d'Anis leur ont permis d'identifier et d'isoler la BAR. Tout comme les expériences réalisées par Nandi *et al.* (1989a,b) sur les tissus

de la couronne biliaire de la tomate ont permis si bien d'identifier la BA mais aussi les deux glycosides. Jones *et al.* (1996) ont travaillé sur l'amélioration des méthodes d'extraction et d'analyse qui leur ont permis d'identifier la BA, mT et oT chez le palmier à huile (*Elaeis guinéensis*). La mT (méta-topoline), par « typologie » on sous entend « peuplier » en Tchèque, a été isolé à partir des feuilles du peuplier par (Strnad, 1997) ; De la pomme de terre (Baroja-Fernandez *et al.*, 2002). Baroja-Fernandez *et al.* (2002) ont du identifier la BA, mT, et oT. Alors que des dérivés méthoxy ; oT et mT (MéoT, MemT) et leurs 9-ribosides (MemTR, MéoTR) sont isolés dans les feuilles du peuplier et

chez *Arabidopsis thaliana*. La BAR et BAG ont été quant à elles, détectées chez le *Cocos nucifera* dans les inflorescences immatures, mais la BAR a été détectée dans toutes les parties (Saenz *et al.*, 2003). Aucune étude de ce genre n'a été réalisée sur le bananier plus particulièrement sur l'hybride FHIA-01 élucidant la compréhension des phytohormones endogènes, afin d'élaborer un protocole de milieu de culture *in vitro* adaptée. Le but de cette étude est de vérifier par HPLC-MS/MS la présence mais aussi la quantité de l'auxine (AIA) et les cytokinines (mT exogène et zéatine endogène) dans les tissus végétaux de vitroplants des hybrides de bananier.

## MATERIELS ET METHODES

**Matériel biologique et Produits chimiques :** Les vitroplants enracinés des hybrides FHIA-01 (AAAB), FHIA-17 (AAAA), FHIA-23 (AAAA) et ayant 90 jours d'acclimatation en chambre de culture Binder du laboratoire du CARAH de l'H.E.P.H-Condorcet à ATH en Belgique ont été utilisés comme matériel biologique. Les vitroplants mesuraient en moyenne 29cm de hauteur. Les trois cultivars ont été initiés au laboratoire du Centre de transit d'INIBAP à K.U.Leuven. Cependant, les phases de prolifération, d'enracinement *in vitro* et d'acclimatation ont été réalisées au laboratoire du CARAH à l'H.E.P.H-Condorcet à ATH en Belgique. Les phytohormones BA, mT, Z, AIA et AIB ont été utilisés comme produits chimiques.

**Protocole d'extraction :** Les vitroplants étaient préalablement lavés à l'eau ultra-pure. Les feuilles, tiges et racines du bananier ont été prélevés tout en évitant de prendre les parties abîmées ou vieilles feuilles (El Harti *et al.*, 2001a ; 2001b). Ces parties sont coupées successivement à l'aide des ciseaux. Le pilon et le mortier ont été nettoyés à l'eau UP, puis à l'azote liquide. Par la suite, les tranches des tissus végétaux de différentes parties de vitroplants de bananier étaient ensemble broyées dans le pilon à l'aide de l'azote liquide jusqu'à obtenir de la poudre.

1,5 g de poudre a été pesé et dans laquelle a été ajouté 1 ml de solution de l'AIB (0,05 mg/l) comme standard interne et 6,5 ml de méthanol Bieleski : méthanol/eau/acide formique (mélange d'acides 75 : 20 : 5 v/v). Une extraction au froid à 28°C de température était réalisée dans ce mélange, pendant 12 h. Une centrifugation en deux temps de 15 minutes chacun et à 1960 r a été réalisée et le surnageant a été

recupéré. Les deux surnageants (2 x 7, 5 ml) obtenus l'un après la première centrifugation et l'autre prélevé après la seconde centrifugation sont mélangés par un flux doux d'azote jusqu'à obtenir 3 ml d'aliquote. Les 3 ml de mélange sont laissés pendant 30 minutes à une température ambiante. Par la suite, on a prélevé 1 ml d'aliquote qui a constitué la solution de départ pour l'analyse par HPLC en tandem (MS/MS). Enfin, le 1 ml d'aliquote est mélangé à sec par un flux d'azote doux puis reconstitué dans 900 µl UP, 100 µl d'acide nitrique et 1 µl d'acide formique. La même procédure a été respectée pour l'extraction tout comme l'analyse HPLC en tandem (MS/MS) des substances indoliques (auxine) que pour les cytokinines. Mais dans le cas des cytokinines quelques modifications étaient intervenues. Le standard interne pour les cytokinines est la BAP toujours à la même concentration soit, 0,05mg/l.

**Analyse de vitroplants à la fin de l'acclimatation :** Lors des différentes phases en culture *in vitro*, le milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962) a été enrichi des phytohormones 10µM mT, 10µM MemTR et 1µM AIA lors de la phase de prolifération. Pendant la phase de prolifération en culture *in vitro*, l'ensemble de culture a été placée durant les 15 premiers jours à l'obscurité pour un séjour total de 45 jours en phase de prolifération. Pour la phase d'enracinement les phytohormones 10µM mT et 1µM AIA ont été additionnées au milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). Cette phase a duré également 45 jours. Toutes les parties : feuilles, tige et racines de 4 vitroplants de chaque cultivar (cv) ont été récoltés. Le contenu d'AIA a été analysé dans FHIA-01 et FHIA-23, le contenu de cytokinines dans les trois cv. La méthodologie utilisée

dans cette étude est celle expérimentée pour le plant de tabac (*Nicotiana tabacum*) par Giannarelli *et al.* (2010), avec des légères modifications apportées dans ce cas du bananier.

**Analyse des cytokinines par HPLC (MS/MS) :** Un Acquity Ultra performance LC (HPLC) de Waters couplé à un TQ Detector Acquity a été utilisé. Les conditions expérimentales du Spectrométrie de masse qui ont prévalu sont entre autre : Pression de gaz Q2 : Torr ; Résolution Q1 et Q3 : 1 uma ; Temps de cycle 120 ms (4 transition avec un temps de séjour de 25 ms) ; Tension du capillaire de 3.0 KV ; Débit de gaine

de gaz de 55 ml/min, débit auxiliaire de gaz de 20 ml/min, température de gaz auxiliaire 400°C. Air est utilisé comme gaine et gaz auxiliaire. Une colonne Symmetry C18 Waters (2.1 x 50 mm, 5 µm diamètre des particules) est utilisée. Débit de gradient de séparation chromatographique est de 0,4 ml/min comme suit : 90 % éluant A (98/2 Eau/Méthanol 0,1 % Acide formique) et 10 % éluant B (98/2 Eau/Méthanol 0,1 % Acide formique). Volume injecté est de 10 µl. Les valeurs des paramètres expérimentaux et le rapport m/z sont dans le tableau 1 ci-dessous.

## RESULTATS

**Vitroplants à la fin de l'acclimatation :** Les résultats relatifs à la concentration en auxine de vitroplants des hybrides FHIA-01 et FHIA-23 sont repris dans le tableau 1. Aucun de deux hybrides n'a montré une concentration significativement élevée par rapport à l'autre ( $P=0,069$ ). Le Tableau 2 présente les résultats relatifs aux concentrations moyennes de cytokinines endogènes (métatopoline et Zéatine) des différents échantillons des hybrides de FHIA (FHIA-01, FHIA-17

et FHIA-23). Il y a un effet significatif ( $P < 0,05$ ) des traitements sur les concentrations endogènes de métatopoline et des effets similaires ( $P > 0,05$ ) sur les concentrations de zéatine) de vitroplants de bananier. L'hybride FHIA-23 a enregistré une concentration élevée en métatopoline comparativement aux hybrides FHIA-01 et FHIA-17. Tous les hybrides de bananiers ont présenté des concentrations élevées en métatopoline qu'en zéatine (figure 1)

**Tableau 1 :** Les concentrations moyennes de l'auxine [AIA] des hybrides FHIA-01 et FHIA-23 analysés par HPLC-MS/MS.

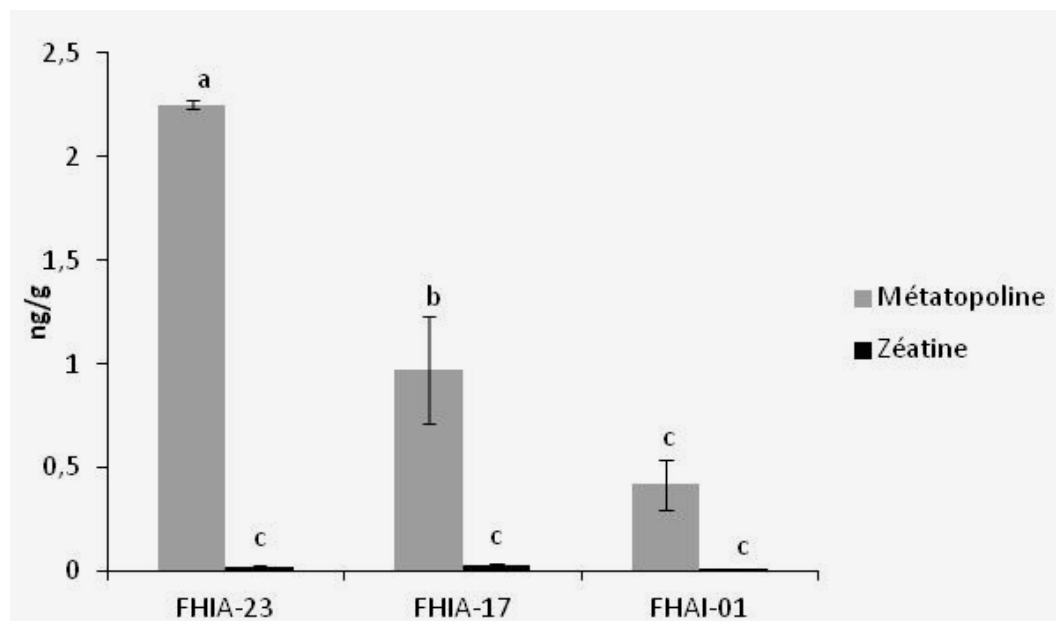
| Cultivars | Plante | Conc/échantillon<br>ng/g | Conc.moyenne<br>ng/g |
|-----------|--------|--------------------------|----------------------|
| FHIA-01   | 1      | 0,28                     | 3,8*                 |
|           | 2      | 0,37                     |                      |
|           | 3      | 0,48                     |                      |
|           | 4      | 0,40                     |                      |
| FHIA-23   | 1      | 0,31                     | 3,5*                 |
|           | 2      | 0,35                     |                      |
|           | 3      | 0,37                     |                      |
|           | 4      | 0,37                     |                      |

**Tableau 2 :** Les concentrations moyennes de cytokinines (métatopoline et Zéatine) des différents échantillons des hybrides de FHIA (FHIA-01, FHIA-17 et FHIA-23) analysés par HPLC-MS/MS.

### Concentrations en phytohormones (ng/g)

| Echantillons (traitements) <i>ex-vitro</i> | Métatopoline | Zéatine       |
|--|--------------|---------------|
| FHIA-1                                     | 0,42±0,12 c  | 0,01 ± 0,005c |
| FHIA-23                                    | 2,25±0,02a   | 0,02 ± 0,01c  |
| FHIA-17                                    | 0,97±0,26b   | 0,03 ± 0,008c |

PPDS = 0,296. Moyenne ± Ecart-type. Dans la colonne, les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas différentes après le test de Newman-Keuls au seuil 5%.



**Figure 1** : Comparaison de la concentration en (ng/g) de cytokinines : zéatine par apport à la métatopoline chez les vitroplants des hybrides de la FHIA issus de l'acclimatation. Les barres erreurs sont les Ecart-type. Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas différentes après le test de Newman-Keuls au seuil 5%.

## DISCUSSIONS

Aucun de deux hybrides n'a montré une concentration en auxine significativement élevée par rapport à l'autre. Pour les vitroplants issus du milieu *ex-vitro*, le traitement FHIA-23 dont les vitroplants ont été récoltés après 90 jours d'acclimatation en chambre de culture Binder, ont enregistré une concentration élevée en métatopoline comparativement aux traitements FHIA-01 et FHIA-17 bien que tous soient issus des mêmes conditions de culture. Les résultats similaires ont été signalés par Baroja-Fernandez *et al.* (2002) qui ont enregistré des différences significatives des concentrations en cytokinines chez trois cultivars de Pomme de terre. De façon générale, la concentration en cytokinine de chaque cultivar peut être influencée par des facteurs externes tels que le stress hydrique, les facteurs affectant généralement la croissance de la culture (Atsky *et al.*, 1996 ; Letham et Palni, 1983 ). Ceci dit, la concentration élevée de métatopoline chez FHIA-23 peut provenir du métabolite de  $10\mu\text{M}$  MemTR contenant dans le milieu de culture lors de la phase de prolifération d'une part. D'autre part, nous pensons que cette concentration élevée en métatopoline du traitement FHIA-23 proviendrait du milieu de culture d'enracinement ( $10\mu\text{M}$  mT). La différence des concentrations de métatopoline entre les traitements FHIA-23, FHIA-01 et FHIA-17 peut être due également

à la capacité de chacun de ses génotypes à exporter les cytokinines lors de son passage dans différentes phases de culture *in vitro*, et à emmagasiner jusqu' à l'acclimatation en serre. La concentration de cytokinines dans la plante est contrôlée par leur biosynthèse, la conjugaison et la déconjugaison entre les actifs et les formes inactives, leur dégradation à des formes inactives, et par le transport à d'autres parties de la plante et cloisonnement dans les organelles cellulaires différents (Auer, 1997). Une large gamme de cytokinines conjuguées a été identifiée dans de nombreuses plantes supérieures. Ces différentes formes de cytokinines ont été liées à divers processus de croissance et de développement. Par ailleurs, leur fonction biologique dans les cellules est loin d'être élucidée complètement (Auer, 1997). Une nette augmentation de la concentration en cytokinine chez les vitroplants de la pomme de terre a été enregistrée montrant une baisse 10 jours après le transfert de ceux-ci en milieu *ex-vitro* (Baroja-Fernandez *et al.*, 2002). Il existe donc une corrélation entre le taux de survie et les niveaux de cytokinine (Pospis ilova *et al.*, 1993 ; Pospis ilova *et al.*, 1998 ; Pospis ilova *et al.*, 1999). La caractéristique la plus frappante des résultats de notre étude est la concentration élevée de mT et la présence de la zéatine endogène dans la

plupart de nos échantillons. D'après certains auteurs, la cytokinine mT a la même activité biologique que la zéatine (Kamínek *et al.*, 1987 ; Holub *et al.*, 1998). Les cytokinines aromatiques, le topoline à bases libres, en particulier, la cytokinine méta-topoline, est la plus active biologiquement (Holub *et al.*, 1998). La zéatine endogène joue un rôle plus actif dans la régulation du taux de cytokinines dans la plante (Martin *et al.*, 2001 ; Stirk *et al.*, 2004). Alternativement, l'isomère (zéatine) peut être un moyen de désintoxication parce qu'il a un niveau inférieur de l'activité biologique que les transisomères (Van Staden et Drewes, 1991). Cela peut également expliquer pourquoi dans les

microalgues il n'y a pas de N-glucosides qui sont considérés comme de produits de désactivation biologiquement inactifs (Letham et Palni, 1983). Ce qui peut être considéré comme une preuve réelle de la présence de métabolites de métatopoline chez les vitroplants de bananier. La présence de BAP et de son dérivé méta et ortho-topoline ainsi que leurs métabolites dans les tissus végétaux a été rapporté dans un petit nombre d'espèces végétales (Strnad *et al.*, 1992 ; Strnad *et al.*, 1994 ; Strnad *et al.*, 1997). Cette étude est la première sur les cytokinines (mT, zéatine) dans le bananier et dans les tissus végétaux des hybrides de la FHIA.

## CONCLUSION

Dans cette étude, la concentration en cytokinine mT exogène emmagasinée par les vitroplants de bananier est différente chez les trois hybrides. Celle de vitroplants de l'hybride FHIA-23 est nettement supérieure par rapport à celles de deux autres hybrides. La concentration en cytokinine exogène est influencée par le génotype. Par ailleurs, les vitroplants de trois

hybrides de bananier utilisés dans cette étude ont de la zéatine endogène. Pour la multiplication *in vitro* de bananiers, la connaissance de la teneur endogène en phytohormones permettra d'élaborer d'une part un milieu de culture spécifique aux cultivars et la mise en place d'une balance hormonale adéquate d'autre part.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la CUD (Commission Universitaire au Développement) et le CARAH asbl (Centre pour l'agronomie et l'agro-industrie de la province de Hainaut) en Belgique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R. & Kazan K., 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3460–3479.
- Atsky J.C., Pospíšilová J., Kamínek M., Gaudinová A., Pulkrábek J. & Zahradník J., 1996. Seasonal changes in sugar beet photosynthesis as affected by exogenous cytokinin N6-(m-hydroxybenzyl) adenosine. *Biol. Plant.* 38: 511–518.
- Auer C. A., 1997. Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. *Plant Growth Regul.* 23:17–32.
- Baroja-Fernandez E., Aguirreola H., Martinkova J., Hanus J. & Strnad M., 2001. Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 217–227.
- Bogaert I., Van Cauter S., Werbrouck S.P.O. & Dolezal K., 2006. New aromatic cytokinins can make the difference. *Acta Hort.* 725: 265–270.
- Chaves das Neves H.J. and Paiss M.S.S., 1980b. A new cytokinin from the fruits of *Zantedeschia aethiopica*. *Tetrahedron* 21: 4390–4398.
- El Harti A., Saghi M., Molina J.A.E. & Teller G., 2001a. Production d'une substance rhizogène à effet similaire à celui de l'acide indole acétique par le ver de terre *Lumbricus terrestris*. *Can. J. Zool.*, 79: 1911-1920.
- El Harti A., Saghi M., Molina J.A.E. & Teller G., 2001b. Production de composés indoliques rhizogènes par le ver de terre *Lumbricus terrestris*. *Can. J. Zool.*, 79: 1921-1932.
- Ernst D., Schaffer W. & Oesterhelt D., 1983. Isolation and identification of a new, naturally occurring cytokinin (6-benzylaminopurine riboside) from anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). *Planta* 159: 222–225.
- Eckert M., Kaldenhoff R., 2001. Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. *J. Exp. Bot.* 51: 1435–1442.

- Giannarelli S., Muscatello B., Bogani P., Spiriti M.M., Buiatti M. & Fuoco R., 2010. Comparative determination of some phytohormones in wild-type and genetically modified plants by gas chromatography–mass spectrometry and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 398: 60–68.
- Horgan R., Hewett E.W., Horgan J.M., Purse J. & Wareing P.F., 1975. A new cytokinin from *Populus × robusta*. *Phytochemistry* 14: 1005–1008.
- Horgan, R., Hewett E.W., Purse J.G. & Wareing P.F. 1973. A new cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron* 30: 2827–2828.
- Holub H., Hanus J., Hanke D.E. & Strnad M., 1998. Biological activity of cytokinins derived from *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Reg.* 26: 109–115.
- Jones L.H., Martinková H., Strnad M. & Hanke D.E., 1996. Occurrence of aromatic cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J. Plant Growth Regul.* 15: 39–49.
- Kamínek M., Vanek T. & Motyka V., 1987. Cytokinin activities of N benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Plant Growth Reg.* 6: 113–120.
- Letham D.S., Palni L.M.S., 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 163–197.
- Martin R. C., Mok M. C., Habben J. E. & Mok D. W. S., 2001. A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5922–6.
- Murashige T. et Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473–492.
- Nandi S.K., Letham D.S., Palni L.M.S., Wong O.C. & Summons R.E., 1989a. 6- benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Science* 61:189–196.
- Nandi S.K., Palni L.M.S., Letham D.S. & Wong O.C., 1989b. Identification of cytokinins in primary crown gall tumors in tomato. *Plant Cell Environ.* 12:273–283.
- Pospíš ilova J., Synkova H., Haisel D., Atsky J.C., Wilhelmova N. & rámek F.S., 1999. Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration on acclimation of tobacco plantlets to ex vitro conditions. *J. Exp. Bot.* 50:119–126.
- Pospíš ilova J., N. Wilhelmová, H. Synková, atskyJ.C., Krebs D., Ticha I., Hanac kova B. & Snopek J., 1998. Acclimation of tobacco plantlets to ex vitro conditions as affected by application of abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 49: 863–869.
- Pospíš ilova J., atskyJ.C., Synkova H., Machác kova I. & Solárova I., 1993. Gas exchange and *in vivo* chlorophyll fluorescence in potato and tobacco plantlets *in vitro* as affected by various concentrations of 6-benzylaminopurine. *Photosynthetica* 29: 1–12.
- Ross J., O'Neill D., 2001. New interactions between classical plant hormones, *Trends Plant Sci.* 6: 2–4.
- Sáenz L., Jones L.H., Oropeza C., Vlácil D. & Strnad M., 2003. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Growth Regulation* 39: 205–215.
- Stirk W.A., Nova'k,O., Strnad M. & van Staden J., 2004. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyta. *J. Phycol.* 40: 88–95.
- Strnad M., Hanus J., VaneT.k., Kamínek M., Ballantine J. & Fussell B., 1997. *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus canadensis* Moench., cv. Robusta). *Phytochemistry* 45:213–218.
- Strnad, M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant* 101:674–688.
- Strnad M., Peters W., Hanus J. & Beck E., 1994. Ortho-topolin-9-glucoside, an aromatic cytokinin from *Populus canadensis* Moench., cv. Robusta leaves. *Phytochemistry* 37: 1059–1062.
- Strnad M, Peters W., Beck E. & Kamínek M., 1992. Immunodetection and identification of N6-(*o*-hydroxybenzylamino)purine as naturally occurring cytokinin in *Populus canadensis* cv Robusta leaves. *Plant Physiol.* 99:74–80.
- Strnad M., Veres K., HanusJ. & Siglerova V., 1992. Immunological methods for quantification and identification of cytokinins, in: M. Kamínek, D.W.S. Mok, E. Zazřimalová (Eds.), Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants, SPB Academic Publishers, The Hague, pp. 473–476.
- Stirk W. A., Nova'k,O., Strnad M. & van Staden J., 2004. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the chlorophyta. *J. Phycol.* 40: 88–95.

- Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T. & Bennett M., 2002. Auxin cross-talk: integration of signaling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology*, 49: 411-426.
- Tarkowska D., Dolez K., Tarkowski P., Stolt C.A., Holub J., Fuksova K., Schmülling T., Sandberg G. & Strnad M., 2003. Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus3canadensis* leaves by LC-(1)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* 117: 579–590.
- Van Staden J. & Drewes F. E., 1991. The biological activity of cytokinin derivatives in the soybean callus bioassay. *Plant Growth Regul.* 10:109–15.
- Vivian-Smith A., Koltunow A.M., 1999. Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarp in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 121: 437–451.
- Werbrouck S., 2010. Merits and Drawbacks of New Aromatic Cytokinins in Plant Tissue Culture Proc. IVth IS on Acclim. and Establ. of Micropropagated Plants. *J. Prakash Acta Hort.* 865: 103-108.
- Xiong L., Schumaker K.S. & Zhu J.K., 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: 165–183.