

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Vliv látky TDZ-C2-OMe na vývoj rostlin za
standardních a stresových podmínek

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Schenkova Kristýna
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kristýna Schenková
Název práce	Vliv látky TDZ-C2-OMe na vývoj rostlin za standardních a stresových podmínek
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na stres rostlin, jeho rozdělení, adaptace rostlin vůči stresu a konkrétní popis stresu suchem, stresu salinního a osmotického. Dále práce poskytuje stručný přehled látek, které potlačují stres, jako například cytokiny, gibbereliny, kyselina salicylová, brassinosteroidy a např. paclobutrazol. V rámci experimentální části práce byl testován derivát močoviny, látka TDZ-C2-OMe, a jeho vliv na vývoj rostlin pšenice seté v optimálních a stresových podmínkách. Antistresové vlastnosti TDZ-C2-OMe byly zjišťovány na rostlinách pěstovaných pod vlivem sucha a salinního stresu. Testovaná látka byla aplikována na různé rostlinné orgány – listy, kořeny a semena a následně byl hodnocen fenotyp rostlin, množství chlorofylu a karotenoidů v listech, vzcházení rostlin a míra přežití rostlin. Účinky testované látky na vývoj kořene rostlin byly srovnány s účinky cytokininu thidiazuronu.

Klíčová slova	deriváty močoviny, salinní stres, thidiazuron, potlačení stresu, senescence, rostlinné hormony
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kristýna Schenková
Title of thesis	The effect of the compound TDZ-C2-OMe on plant development in standard and stress conditions
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The theoretical part of this bachelor thesis focuses on plant stress, plant adaptation to stress and specific description of drought, salt and osmotic stresses. The thesis also provides a brief overview of the substances, which enhance plant stress tolerance, such as cytokinins, gibberellins, salicylic acid, brassinosteroids and paclobutrazol. In the experimental part the work the effect of urea derivative - TDZ-C2-OMe, on development of wheat under optimal and stress conditions was tested. The antistress properties of TDZ-C2-OMe were investigated on plants grown in drought or salinity. The tested substance was applied to various organs – leaves, roots and seeds, and then the plant phenotype, quantity of chlorophyll and carotenoids in the leaves, seeds germination and plant survival rate were evaluated. The effect of the compound tested on plant root system was compared with the effect of the cytokinin thidiazuron.</p>
Keywords	urea derivatives, salt stress, thidiazuron, stress suppression, senescence, plant hormones
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Jaroslavu Nislerovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Humplíkovi, Ph.D. a Ing. Agátě Dvorské za spolupráci při získávání cenných dat v experimentální části práce.

Obsah:

Teoretická část	11
1 Úvod	12
1.1 Stres rostlin.....	13
1.1.1 Dělení stresu	13
1.2 Stres suchem.....	14
1.3 Salinní stres.....	15
1.3.1 Vztah rostlin k soli	15
1.3.2 Dopad soli na rostlinu.....	15
1.4 Osmotický stres	16
1.5 Adaptace rostlin vůči salinnímu stresu	17
1.6 Uplatnění lidského faktoru při boji se stresem rostlin	17
1.7 Látky potlačující stres – jejich význam, použití.....	17
1.7.1 Cytokininy.....	18
1.7.1.1 Vlastnosti CK.....	18
1.7.1.2 Transport CK.....	19
1.7.1.3 Receptory cytokininů	19
1.7.1.4 Senescence.....	20
1.7.1.5 Thidiazuron.....	22
1.7.2 Gibereliny	23
1.7.3 Kyselina salicylová	24
1.7.4 Brassinosteroidy.....	25
1.7.5 Paclobutrazol	26
1.7.6 Testovaná látka TDZ-C2-OMe.....	27
Experimentální část	28
2 Použitý materiál a přístroje	29
2.1 Chemikálie.....	29
2.2 Pomůcky.....	29
2.3 Přístrojová technika	29

2.4	Biologický materiál.....	30
3	Metody.....	31
3.1	Hodnocení fenotypu nadzemní části rostlin a stanovení celkového chlorofylu a karotenoidů v listech.....	31
3.2	Kořenový test.....	32
3.3	Stres suchem.....	33
3.4	Stanovení míry přežití a čerstvé hmotnosti rostlin.....	33
3.5	Aplikace salinního stresu	34
3.6	Vzcházení rostlin	34
4	Výsledky	37
4.1	Vliv TDZ-C2-OMe na vývoj pšenice za standardních podmínek.....	37
4.2	Vliv TDZ-C2-OMe na vývoj pšenice pěstované za sucha.....	41
4.3	Vliv TDZ-C2-OMe na vývoj pšenice při působení salinního stresu	44
4.4	Vliv TDZ-C2-OMe na vzcházení pšenice pěstované při salinním stresu	45
5	Diskuze.....	48
6	Závěr	50

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
AHK	histidinkinasa; <i>Arabidopsis</i>
ahk	gen pro AHK; <i>Arabidopsis</i>
ARR	regulátor odpovědi; <i>Arabidopsis</i>
AtPUP	purinový transportér
BA	brassinosteroidy
BAP	6-benzylaminopurin
BIN2	brassinosteroid-intensive 2
CAT	katalasa
CK	cytokininy
CRE	cytokininový receptor; <i>Arabidopsis</i>
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DELLA	protein, transkripční faktor regulující negativně gibereliny
FsGASA4	rodina genu GASA kódující GA ₃ ; <i>Arabidopsis</i>
FW	čerstvá hmotnost
GA	gibereliny
GA ₃	kyselina giberelová
GASA4	gen kódující GA ₃ ; <i>Arabidopsis</i>
CHASE	doména (cyclases/histidine kinases associated sensor extracellular)
iP	N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)adenin
IPT	isopentenyltransferasa
JA	kyselina jasmonová
LED	dioda vyzařující světlo
oresara 4-1	mutace v genetickém místě ore 4-1 kontrolující senescenci; <i>Arabidopsis</i>
PAR	fotosynteticky aktivní radiace
PBZ	paclobutrazol
PCD	programovaná buněčná smrt
POX	peroxidasa
RGB	červené-zelené-modré zobrazování
Rubisco	enzym ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa
SA	kyselina salicylová
SARK::IPT	gen pro biosyntézu isopentenyltransferasy v transgenních rostlinách tabáku
SOD	superoxid dismutasa
TDZ	thidiazuron

<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
Z	zeatin

Cíle práce

1. Zpracování literární rešerše na téma - abiotický stres působící na rostliny, se zaměřením na stres suchem a salinní stres. Vypracování přehledu látek, které zvyšují toleranci rostlin vůči stresu.
2. Zjištění účinků látky TDZ-C2-OMe na vývoj rostliny pšenice seté pěstované za standardních podmínek.
3. Porovnání účinku cytokininu thidiazuronu s účinkem látky TDZ-C2-OMe na kořeny rostlin za standardních podmínek.
4. Zaznamenání účinků látky TDZ-C2-OMe na vývoj rostliny pšenice při stresu suchem a dále při salinním stresu.
5. Prokázání pozitivního vlivu testované látky na vzcházení rostlin při salinním a osmotickém stresu.

Teoretická část

1 Úvod

Na světě neexistuje jediný organismus, který by byl nezávislý na svém okolním prostředí. Jsme ovlivňováni organickými i anorganickými látkami, které se vyskytují v naší těsné blízkosti. S tímto problémem se musí vypořádat především zemědělci při běžném polním pěstování hospodářsky významných plodin. Rostlinám nemůžeme zařídit ideální podmínky pro pěstování, jelikož jsou vystavovány změnám klimatických podmínek, variabilitou ve složení půdního roztoku, obsahem vody v půdním roztoku a dalšími fyzikálními a chemickými jevy. Dále na ně mohou působit různé organismy, mezi které nejčastěji patří člověk, patogeny, houby a plísňe.

Jelikož jsou rostliny ukotveny v půdě kořenovým systémem na jednom místě, nemohou před nepříznivými podmínkami utéct. Vytvořily si tedy různé obranné mechanismy, mezi které patří regenerace a částečná adaptace rostlin vůči stresoru. Dokáží si ve svém těle syntetizovat látky, které zamezují poškození rostliny. Mezi takové látky patří některé rostlinné hormony jako cytokininy, gibbereliny, kyselina salicylová atd. Existují také syntetické látky, které se v zemědělství používají k oddálení senescence rostlin. Další látky s podobnými účinky jsou neustále v hledáčku vědců, jelikož zvýšení odolnosti rostlin vůči stresu je jedním z klíčových mechanismů, které by vedli ke zvýšení produkce našich plodin.

Během méj bakalářské práce jsem se zabývala protistresovými účinky látky TDZ-C2-OMe, která byla syntetizována v Laboratoři růstových regulátorů UP & ÚEB, AV ČR. Zde byly zjištěny i její silné anti-senescenční vlastnosti. V předložené bakalářské práci popisují vliv této látky na vývoj rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a huseničku rolním (*Arabidopsis thaliana* L.) za standardních podmínek a při působení abiotických stresů.

Prvním experimentálním cílem méj práce bylo, popsat fenotyp rostlin, které byly ošetřené testovanou látkou a pěstované v optimálních podmínkách. Při experimentech jsem si všimla výrazného zbarvení ošetřených rostlin, a proto jsem stanovila množství celkového chlorofylu a karotenoidů v prvních dvou listech semenáčků pšenice. Fenotyp rostlin ošetřených látkou TDZ-C2-OMe, byl také porovnán s fenotypem rostlin ošetřených cytokininem thidiazuronem (TDZ).

Druhým cílem méj práce bylo, popsat pozitivní vliv látky TDZ-C2-OMe na vývoj rostlin pšenice, které byly vystaveny stresu suchem či salinnímu stresu. Abych mohla experimenty kvantifikovat, počítala jsem kolik ošetřených rostlin, přežije určitou periodu sucha oproti kontrolním rostlinám. U těchto rostlin jsem také zaznamenala jejich průměrnou hmotnost. Popsala jsem také vývoj rostlin pšenice, které byly vystaveny salinnímu stresu.

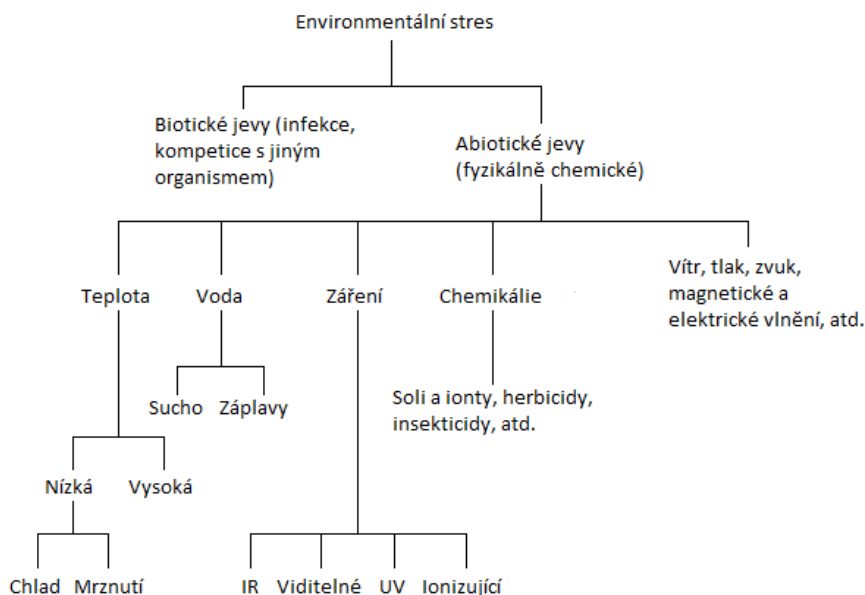
Třetím a posledním cílem méj práce, bylo zjistit vliv zmíněné látky na vzcházení mladých rostlinek pšenice při působení salinního a osmotického stresu.

1.1 Stres rostlin

Definice stresu se mohou lišit. Tento pojem může být vyjádřen jednoduše, jako soubor vnějších podmínek, které limitují produkci zemědělských plodin (Grime, 1979).

1.1.1 Dělení stresu

Environmentální stresy lze rozdělit do dvou základních skupin, a to na biotický stres (biologický faktor) a na abiotický stres (fyzikálně-chemický faktor). Biotickým stresem rozumíme napadení a poškození rostliny patogenem, např. bakterií, houbou, plísní nebo jiným organismem. Mezi abiotické stresy řadíme působení vysoké a nízké teploty, vodní deficit nebo naopak záplavy, různé typy ionizujícího záření, chemické působení solí, herbicidů, insekticidů, anebo také magnetické a elektrické působení (Levitt, 1972). Z globálního hlediska patří mezi nejčastější typy stresů limitujících růst a produkci zemědělských plodin, právě sucho a salinita. Problémem je i častá kombinace několika stresů zároveň, kdy mezi typickou kombinací patří právě salinita a sucho. Faktor, který zapříčiňuje vyvolání stresu, se obecně nazývá stresor.



Obr. 1: Rozdělení environmentálního stresu.

Převzato a upraveno z knihy Levitt, J. *Responses of plants to environmental stresses*. New York-London: Academic press, 1972, s. 11. ISBN 0-12-445560-3.

1.2 Stres suchem

V minulosti bylo pro zemědělství určující množství okolní vody, z toho důvodu se toto odvětví rozvíjelo především v okolí velkých toků řek (Araus a kol., 1997c, 1999b). Důvodem byla dostatečná závlaha pro pěstované plodiny, jelikož sucho bylo, a také v dnešní době je, hlavním limitujícím faktorem v zemědělství.

V rostlinách se voda uplatňuje především v biochemických procesech, jako je fotosyntéza a dýchání, dále jako rozpouštědlo minerálních látek, při transportu hormonů a jiných látek z kořenů do nadzemní části rostliny (review Pospíšilová, 2003b).

Sucho bývá způsobeno dlouhodobými vysokými teplotami, převažujícím výparem nad srážkami nebo v oblastech srážkového stínu (Monteith, 1995). Další možností je působení současně vysokých koncentrací solí, které znemožňují rostlinám přijmout vodu z půdy (El-Hendway a kol., 2005), a dochází tak k sekundárnímu stresu osmotickému, o kterém bude zmínka v jiné kapitole.

Důležitá pro rostliny je schopnost a možnost využití vody. Tyto vlastnosti jsou většinou závislé na genetické predispozici jednotlivých druhů rostlin. Rostliny, které mají v genotypu zakódovaný růst delších kořenů, mají mnohem větší výhodu a možnost přežití než rostliny, které mají kořeny krátké, protože nemohou čerpat vodu z větších hloubek půdy. Další vlastností může být větší odolnost rostlin vůči suchu při růstu a schopnost osmoregulace (Richards, 1996a; Araus a kol., 1998).

Rostliny mohou reagovat na sucho i okamžitě, a to např. svinováním listů, uzavřením průduchů (Pospíšilová a kol., 2000), pozastavením biochemických procesů a snížením asimilace chlorofylu v listech (Tardy a kol., 1998). Uzavřením průduchů rostlina předchází velkým ztrátám vody prostřednictvím transpirace, a tím po nějakou dobu udrží vyšší hladinu vody v rostlinném těle. Díky tomu nedochází v časných stádiích k poškození fotosyntetického aparátu.

Sucho má dopad především na nadzemní část rostliny, kdy listy u stresovaných rostlin jsou menší a jsou ve vzpřímené pozici, aby zmenšily plochu pro dopad slunečných paprsků (Araus a kol., 1986). Dalším dopadem může být zrychlení senescence listů, zpomalení procesu fotosyntézy a znemožnění asimilace chlorofylu (Munné-Bosch a Alegre, 2004). Plodiny rostoucí v krajinách s nedostatkem vody jsou obecně menšího vzrůstu, mají menší výnos, případně úplně usychají a hynou.

1.3 Salinní stres

Salinní stres postihuje 50 % orné půdy po celém světě (Flowers a Yeo, 1995) a zásadně ovlivňuje výnosnost zemědělsky významných plodin (Pitman a Läuchli, 2002). Svým extrémním dopadem na rostliny se řadí mezi jeden z nejhorších abiotických stresů vůbec. Salinní stres bývá nejčastěji v přírodě způsoben sodnými ionty, tedy chloridem sodným.

1.3.1 Vztah rostlin k soli

Rostliny můžeme rozdělit do několika základních skupin podle toho, při jaké koncentraci solí dokáží růst, a to na fakultativní a obligátní halofyty a na glykofyty. Termínem halofyty se označuje skupina rostlin, která dokáže růst v podmínkách, kde je vysoká koncentrace solí. Ty můžeme dále rozdělit na extrémní euhalofyty a mírné oligohalofyty (Takada, 1954). Jako fakultativní halofyty označujeme ty rostliny, které rostou za standardních podmínek bez soli, ale dokáží růst i při její zvýšené koncentraci (Ungar a kol., 1969). Oproti tomu obligátní halofyty nedokáží růst bez vysokých koncentrací solí a hynou při nízkých nebo nulových solných koncentracích (Weissenböck, 1969). Halofyty obvykle rostou při koncentracích okolo 2-6 % chloridu sodného, ale jsou i druhy, které preferují daleko vyšší koncentrace, a to např. 20 %. Tyto rostliny jsou si schopny akumulovat do pletiv vysoká množství soli. Například v listech rostliny *Nitraria Schoberi* L. byl po dehydrataci zjištěn obsah chloridu sodného 14 % z celkové sušiny, což představuje 57 % veškerých obsažených solí (Strogonov, 1964).

Běžně pěstované plodiny můžeme také rozdělit do skupin, a to podle toho, jak moc je sůl jejich limitujícím faktorem. Do první skupiny se zařazují luštěniny (hrách, čočka, sója), pro které je vyšší množství soli naprosto nepřijatelné a ihned hynou. Další skupinu tvoří naše běžné polní plodiny (pšenice, ječmen, kukuřice), pro které není zvýšení koncentrace soli ideální, ale nějakou dobu to pro ně není limitujícím faktorem. Poslední skupinu tvoří např. slunečnice, cukrová řepa a píce, pro které není dlouhodobější zvýšení koncentrace soli limitující (Maianu a kol., 1965).

1.3.2 Dopad soli na rostlinu

Vysoké koncentrace solí mají často fatální dopad na rostlinu, jelikož jsou pro rostlinu toxické (Bernstein, 1964). V první fázi můžeme pozorovat projevy ve změně fenotypu, kdy dochází k pozastavení růstu prýtu, k zástavě buněčného dělení (Strogonov, 1964), k vadnutí listů

a s tím spojenému snížení turgoru (Kovalskaia, 1958), a také ke žloutnutí okrajových částí listů. V další fázi poté dochází k nekróze listů (Ehlig a Bernstein, 1958) a obvykle k usmrcení celé rostliny (Kovalskaia, 1958).

Při vniknutí soli do buněk dochází ke změně a k narušení běžného iontového zastoupení v buňce a ke zvýšení vodního potenciálu buňky, což zamezuje kvalitnímu transportu rostlinných hormonů do listů a ostatních periferních částí rostlin (O'Leary, 1970). Pokud dojde k poškození apikálního meristému solí, toto poškození je již nevratné.

Mezi prvotní změny na molekulární a buněčné úrovni patří utlumení nebo úplné zastavení metabolických drah. Biochemické procesy, jako jsou fotosyntéza a dýchání, jsou blokovány a téměř pozastaveny. Aktivita některých enzymů může být zrušena, zatímco jiné enzymy jsou naopak aktivovány, což vede k nerovnovážným procesům v rostlinách. Dále dochází k ovlivnění metabolismu karbohydrátů (Bhardway, 1959) a syntézy chlorofylu a karotenoidů (Kim, 1958). Syntéza proteinů je snížena a naopak dochází k hydrolýze již dříve vytvořených proteinů, tím pádem dochází k akumulaci aminokyselin v rostlinách. Některé z aminokyselin - threonin, fenylalanin, leucin, isoleucin, prolin, lysin, glutamová kyselina, aspartová kyselina, serin a valin působí v buňce při vyšším množství toxicky. Na tento problém poukázal ruský vědec Strogonov (1964).

Poškození rostlin solí může být umocněno dalšími environmentálními jevy. Toxicita se zvyšuje s působením teploty v rozmezí od 0 °C do 33 °C (Kaho, 1926). Dalším vlivem může být to, zda rostlinu pěstujeme ve stínu nebo na světle. Obecně je známo, že světlo podporuje poškozování rostliny při stresu, zatímco rostlina ve stínu je schopná stresu lépe čelit. To je způsobeno snížením transpirace, což vede ke zvýšení akumulace solí v pletivech (Strogonov, 1964).

1.4 Osmotický stres

Vysoká koncentrace solí v půdním roztoku však nemusí způsobovat pouze salinní stres, ale také zapříčiňuje stres osmotický. Podstatou osmotického stresu je snížení vodního potenciálu v okolí kořenů rostliny. Rostlina se poté snaží vyrovnat hladiny koncentrací na vnitřní i vnější straně kořenů, čehož docílí vypuzováním vody z rostlinného těla do okolního prostředí. Takovému jevu se někdy říká „fyziologické sucho“, protože rostlina má ztížený příjem vody z okolí, kterou potřebuje ke svému růstu (El-Hendway a kol., 2005).

1.5 Adaptační rostlin vůči salinnímu stresu

Rostliny jsou schopny se do určité míry bránit proti salinnímu i osmotickému stresu. Dokáží si nějaké koncentrace solí v sobě naakumulovat, aniž by jim samotným to ubližovalo, tudíž poté snesou vyšší koncentrace solí v okolním prostředí. Pro rostliny je snazší přijímat rozpuštěnou molekulu chloridu sodného než samotné ionty a mnohem častější je toxické poškození rostlin Cl^- ionty než Na^+ ionty (Tagawa a Ishizaka, 1963).

Dále si rostliny vyvinuly 3 metody zbavování se nadměrného množství soli v pletivech, a to 1.) pasivním vylučováním solí z těla, 2.) aktivním vypuzováním solí z těla a 3.) zředěním vysokých koncentrací solí vodou.

Další možností může být geneticky daná vlastnost malého příjmu sodných kationtů a selektivní příjem a transport draselných, vápenatých a jiných kationtů (Schachtman a Munns, 1992).

1.6 Uplatnění lidského faktoru při boji se stresem rostlin

Rostliny, na které po dobu růstu a vývoje negativně působí environmentální prostředí, mají obecně výrazněji sníženou produkci a výnos. Tento globální problém je proto nutné řešit vývojem nových technologických postupů, které by zvýšily produkci zemědělsky významných plodin (Tester a Langridge, 2010).

Nejčastější cestou, kterou se zemědělci snaží předcházet menším výnosům a vzrůstu plodiny, je jejich genetické upravení. Geneticky modifikovaná rostlina může lépe reagovat na určitý typ stresu. Ovšem, jak je uvedeno výše, během vývoje rostliny dochází k prolínání několika různých typů stresů, což daný problém zcela neřeší.

Další možností může být zkoumání přirozených adaptačních procesů rostlin, které si samy vyvinuly na ochranu před těmito limitujícími faktory, které by mohly lidem pomoci při vyvíjení nových metod a technologií při pěstování. S tímto problémem souvisí podrobná znalost průběhu jednotlivých procesů, jakým způsobem dané stresy poškozují organismy, jak jim jiné rostliny dokáží čelit, nebo jestli je rostlina schopná vytvořit i jiné biochemické dráhy, které stres neovlivní (Levitt, 1972).

1.7 Látky potlačující stres – jejich význam, použití

V minulosti bylo zjištěno, že některé přirozeně se vyskytující rostlinné hormony, jako jsou gibereliny, cytokininy, brassinosteroidy a další látky, zmíněné níže, fungují do určité míry jako

protektiva, při působení stresových podmínek (Bartoli a kol., 2013). V dnešní době, kdy stres rapidně ovlivňuje výnosy plodin (Mickelbart a kol., 2015), se lidé čím dál tím víc zabývají vývojem nových protektivních látek, které by mohly pomoci čelit těmto globálním problémům. V experimentální části bakalářské práce je popsáno testování látky TDZ-C2-OMe, která vykazuje protektivní účinky vůči salinnímu stresu a stresu suchem na rostlinách pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.), čehož by se dalo využít do budoucna při velkoplošném pěstování hospodářsky významných plodin. Jelikož je látka příbuzná cytokininu TDZ, popisují zde nejdříve cytokininy.

1.7.1 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou rostlinné hormony, které jsou odvozeny od N⁶ substituovaných derivátů purinu adeninu. Prvním identifikovaným cytokininem byl kinetin, který dostal název podle své funkce podporovat cytokinezi. Kinetin byl získán v 50. letech Millerem a Skoogem, kteří objevili pozitivní účinky autoklávované DNA spermatu sledů na proliferaci buněk tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), načež prokázali, že aktivní látkou ve spermatu byl kinetin (Amasino, 2005). První izolovaný cytokinin z rostliny byl získán z endospermu kukuřice a získal svůj název zeatin odvozením od latinského názvu kukuřice - *Zea mays* L. (Letham, 1973).

Cytokininy můžeme rozdělit na syntetické a přirozeně se vyskytující a dále podle povahy jejich postranního řetězce na isoprenoidní, aromatické a deriváty furfuralu. Typickými příklady CK s isoprenoidním řetězcem jsou zeatin (Z), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), N⁶-(Δ^2 -isopentenyl-amino)purin (iP) a jejich deriváty. Mezi CK s aromatickým kruhem se řadí 6-benzylaminopurin (BAP), kinetin, topolin a opět jejich deriváty (Strnad, 1997). Nejznámějšími zástupci CK odvozených od furfuralu jsou kinetin a kinetin ribosid (Barciszewski a kol., 2007).

1.7.1.1 Vlastnosti CK

Cytokininy i s dalšími rostlinnými hormony hrají významnou roli ve správném vývoji a výstavbě rostlinného těla. Mají příznivý účinek na buněčné dělení, vývoj semen a chloroplastů, ovlivňují růst a vývoj kořenové části a prýtu, apikální dominanci, kvetení, oddalují senescenci listů, podílí se na obranných mechanismech rostlin při působení nepříznivých stresových podmínek (Mok, 1994; Argueso a kol., 2012; Hwang a kol., 2012). Další vlastností je schopnost redukovat počet průduchů a tím zpomalit proces transpirace (Todorov a kol., 1998).

1.7.1.2 Transport CK

Dříve se předpokládalo, že jsou cytokininy syntetizovány pouze v kořenové části rostliny a poté jsou postupně transportovány cévními svazky do zbytku rostlinného těla, ale podle pozdějších studií bylo dokázáno, že jsou cytokininy syntetizovány v celé rostlině, a to včetně vzdušných pletiv (Sakakibara, 2006; Hirose a kol., 2008; Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). Ovšem to neznámá, že cytokininy nejsou schopny se v rostlině transportovat. V rostlinném těle byly popsány dva základní typy přenosů na krátkou a dlouhou vzdálenost. Přenos na dlouhou vzdálenost zajišťuje cytokinin *tZ*-ribosid, který probíhá cévními svazky. Transport na kratší vzdálenosti je zajišťován floémovými svazky a je zprostředkován iP (Kudo a kol., 2010). Další typ přenosu cytokininů zajišťují purinové transportéry AtPUP1 a AtPUP2, které byly lokalizovány v plazmatické membráně a v membráně endoplazmatického retikula rostliny *Arabidopsis* (Gillissen a kol., 2000; Burkle a kol., 2003).

Podobným způsobem dochází k transportu všech rostlinných hormonů, ale pouze za ideálních podmínek. Jeden z nežádoucích účinků salinního stresu v rostlinách je blokáda transportu hormonů, které poté přímo ovlivňují děje v rostlinách, podmiňující existenci rostlin. Z toho důvodu dochází často k úhynu celé rostliny (O'Leary, 1970).

1.7.1.3 Receptory cytokininů

Receptory AHK2, AHK3 a AHK4 je komplex tří histidin kinázových CK receptorů lokalizovaných v modelové rostlině *Arabidopsis* (Inoue a kol., 2001; Suzuki a kol., 2001b; Ueguchi a kol., 2001a; Yamada a kol., 2001). Všechny tři receptory patří do jedné receptorové CRE rodiny a mají několik shodných typických znaků - jejich domény jsou zakotvené v membránách, mají podobnou strukturu, na povrchu membrány je ukotvena část receptoru pro výdej informací a signálů z buňky do okolí a na vnitřní straně membrány dochází k příjmu signálů z okolí. Na extra-cytosolární straně se nachází doména CHASE, která hraje důležitou roli při navázání cytokininu (Anantharaman a Aravind, 2001; Heyl a kol., 2007). Poté navazuje přenašečová doména a přijímačová histidin kinasa umístěná na cytosolární straně membrány obsahující C-terminální doménu, která zajišťuje správnou funkci enzymů (Heyl a Schmölling, 2003).

Každý z receptorů má své specifické vlastnosti, ale často je nutná jejich spolupráce. Pouze receptor AHK3 je schopný v některém případě pracovat samostatně, a to při udržení funkčnosti chloroplastů v listech pěstovaných ve tmě. Receptor AHK3 hraje důležitou roli v oddálení senescence listů u *Arabidopsis*, tato funkce byla prokázána sérií experimentů publikována v roce 2006, kdy byl inaktivován receptor AHK3, čímž byla zrychlena

senescence. Funkčně se jedná o receptor, který způsobuje fosforylaci a aktivaci ARR2 (Kim a kol., 2006) a ARR typu - B, kde typ - B ARR pouze reguluje celkový proces. Tato vlastnost receptoru je však závislá na koncentraci CK v organismech. Při příliš vysoké koncentraci dochází k opačnému účinku na senescenci.

Receptor AHK2 byl lokalizován převážně v nadzemní části rostliny, jako AHK3 (Ueguchi a kol., 2001; Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004). Podporuje především funkce receptoru AHK3 a uplatňuje se v procesu stárnutí rostliny a ve vývoji orgánů. Při mutaci (*ahk2*) nedošlo k žádné fenotypické změně rostliny (Riefler a kol., 2006).

Receptor AHK4 je aktivovaný volnými CK bázemi a často ho lokalizujeme v apikální části kořene nebo v proliferaujících buňkách prýtu (Mähönen a kol., 2000; Inoue a kol., 2001; Ueguchi a kol., 2001; Higuchi a kol., 2004; f a kol., 2004). Jeho funkce se uplatňuje při prodlužování kořene za standardních podmínek i za tmy (Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004; Riefler a kol., 2006), při vývoji embrya a při regeneraci výhonku (Mähönen a kol., 2000; Inoue a kol., 2001; Franco-Zorilla a kol., 2002). Dále se zapojuje při kvetení a při změnách ve výživě (Werner a Schmölling, 2009). Tento receptor byl lokalizován jako první, a to v roce 2001.

1.7.1.4 Senescence

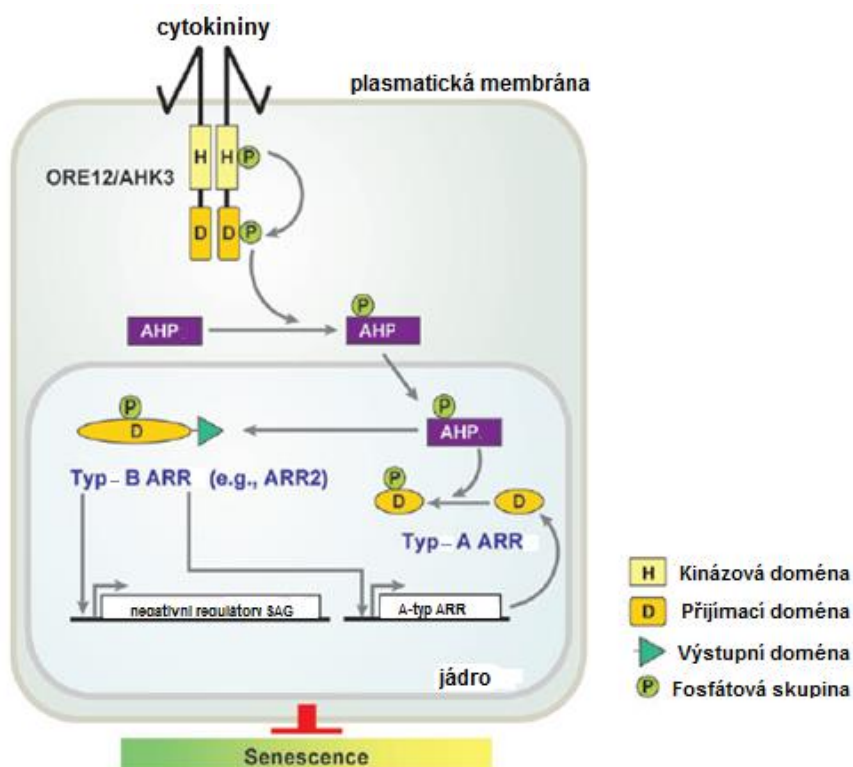
V návaznosti na informace o receptoru AHK3, navazuje kapitola o senescenci jako takové, jelikož bylo využito senescence při experimentech v druhé části práce, při hodnocení poškození rostlin.

Senescence je projev rostlin způsobený vysokým stářím rostliny, případně vlivy z okolního prostředí. Může zasáhnout rostlinu v rozsahu buněk, tkání i celých orgánů, kdy často vede ke smrti celé rostliny.

Nejčastěji dochází k senescenci listů rostliny, která zahrnuje programovanou buněčnou smrt (PCD). Programovaná buněčná smrt je geneticky řízená odpověď na nepříznivé podmínky, které mohou pocházet jak z okolního prostředí, tak z vnitřního prostředí rostliny a projevuje se sebezničením vlastní buňky. V první řadě k ní dochází v buňkách mezofylu a poté se šíří do všech okolních buněk, což se projevuje postupným rozpadem buněčných struktur. Dojde k rozpadu chloroplastů a ke změnám ve struktuře grana. Opakem můžou být mitochondrie a jádro, které jsou narušeny až při poslední fázi senescence (Cao a kol., 2003). Dalšími typickými projevy jsou rozvolnění chromatinu, snížení anabolismu a zmenšení vakuol. Na venek se senescence projevuje žloutnutím listů, což souvisí s rozpadem chloroplastů a degradací chlorofylu, enzymů (Rubisco) a proteinů (Brouquisse a kol., 2001;

Breeze a kol., 2004; Buchanan-Wollaston a kol., 2005). Tento proces je velmi specifický a hormonálně a geneticky regulovaný (Lim a kol., 2007).

Není přesně známo, jak je senescence zahájena a jak je rozpoznán věk organismu, tedy kdy je vhodné ji zahájit. Senescence může být vyvolána nadměrným množstvím sacharidů v rostlině, kde rychlost jejich metabolismu podporuje proces stárnutí, snižuje proces fotosyntézy a může mít tedy vliv i na regulaci tohoto procesu, jak bylo dříve dokázáno na kvasinkách a na některých modelových savčích organismech (Ewbank a kol., 1997; Kimura a kol., 1997). Další možností může být mutace *oresara 4-1* (*ore 4-1*), která má vliv na oddálení procesu stárnutí, ale pouze v případě stárnutí závislém na věku organismu. Bylo prokázáno, že tato mutace nemá vliv na senescenci indukovanou mutacemi a nedostatkem světla (Woo a kol., 2002).



Obr. 2: Hypotetické schéma pro funkci ORE12/AHK3 při kontrole cytokininů na vliv na senescenci listů *Arabidopsis*. Fosforylace ARR2 je zprostředkována ORE12/AHK3. Fosforylovaný ARR2 vyvolává indukci cytokininových regulujících genů, které mají vliv na zpomalení a oddálení senescence. Ve výsledku tzn., že tato cytokininová signální dráha je specifická pro kontrolu listové senescence. Převzato a upraveno ze článku Lim, P. O.; Kim, H. J.; Nam, H. G. 2007. Leaf Senescence. *Plant Biology* 58: 115-36.

Senescence, jak je výše zmíněno, může být způsobena vysokým stářím organismu, anebo také působením okolního prostředí. Dohromady je známo okolo 43 genů, které se zapojují při senescenci rostlin a shodných 28 genů, které zprostředkovávají odpovědi organismu na stresy, což prokazuje propojenost těchto různých procesů. Tyto informace byly zjištěny při zkoumání jednotlivých signálních drah fytohormonů, které hrají významnou roli v regulaci obou procesů.

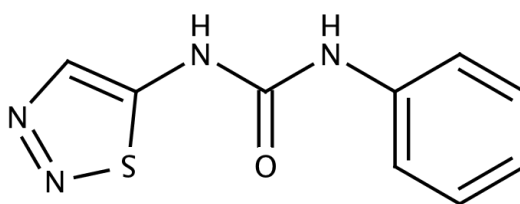
Aby se oddálila senescence, využívalo se určité vlastnosti CK, kdy se CK endogenně aplikovaly na rostliny. Zjistilo se, že efekt na rostliny může být jak pozitivní, tak negativní (Tetley a Thimann, 1974).

Konkrétním genem, který ovlivňuje oddálení senescence rostlin, je gen pro IPT, který byl poprvé izolován ve fazolu. Transgenní rostliny tabáku, které obsahovaly gen SARK::IPT, vykazovaly pozdější senescenci a oddálení celkového žloutnutí listů (Rivero a kol., 2007).

Stresy mají významný vliv na pozměnění funkčnosti jednotlivých genů, které ovlivňují jejich biosyntézu a degradaci (Ha a kol., 2012).

1.7.1.5 Thidiazuron

Již v minulosti se podařilo syntetizovat několik látek odvozených od močoviny s cytokininovou aktivitou, které se liší svojí strukturou odvozenou od adeninu. Mezi takové látky řadíme thidiazuron (TDZ), který se přirozeně nevyskytuje v rostlinách.



Obr. 3: Strukturální vzorec thidiazuronu

Staženo 25. 12. 2015

z <http://www.glenham.com/static/media/structures/large/51707-55-2.png>

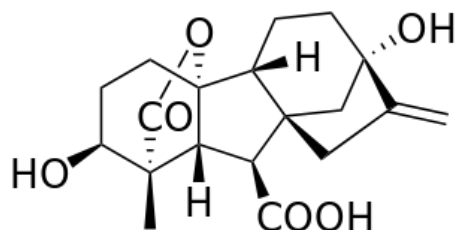
Thidiazuron (fenyl-N'-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)močovina) je syntetická sloučenina odvozená od fenylmočoviny. V této molekule se vyskytují dvě významné funkční skupiny, a to fenyl a thiadiazol. Tyto skupiny odpovídají za vysokou biologickou aktivitu TDZ, což potvrdilo testování látek odvozených od TDZ s jinými funkčními skupinami, než uvedenými (Mok a kol., 1982). Látka byla poprvé použita při sklizni tobolek bavlníku, kde navodila abscisi listů bavlníku (Arndt a kol., 1976), což umožnilo lepší sběr tobolek.

Přestože jsou některé účinky TDZ na rostlinu podobné nebo shodné s účinky cytokininů a auxinů, chemická struktura látky, není příliš podobná ani jedné ze zmíněných skupin rostlinných hormonů. Mezi jeho hlavní vlastnosti patří regulace morfologie tkáňových kultur a v dnešní době se vědci pokouší lépe využít jeho vlastností v oblasti regenerace rostlinných tkání. TDZ je atraktivní pro vědce z hlediska nízké koncentrační účinnosti na rostliny, kdy byly v minulosti zaznamenány pozitivní účinky již při koncentraci 10 pM (Preece a kol., 1991) a po jeho užití, v relativně krátké době, dochází k regeneraci pletiv (Visser a kol., 1992; Hutchinson a Saxena, 1996a). Tyto zmíněné vlastnosti odlišují TDZ od ostatních přirozeně se vyskytujících i syntetických látek odvozených od cytokininů. Dalšími známými a významnými vlastnostmi TDZ je schopnost zpomalení degradace chlorofylu (You a kol., 1992) a zvýšení jeho množství u ošetřených rostlin, což bylo prokázáno experimenty na pelargoniích (Visser a kol., 1995). Pozitivní účinky vykazuje TDZ i na vzcházení rostlin (Babiker a kol., 1992) a klíčení hlíz bramboru (Ji a Wang, 1988). Mezi další účinky thidiazuronu patří větvení trichomů a větší výskyt stomat na generativních rostlinných orgánech (Venglat a Sawhney, 1994).

Sledované morfologické změny rostlin ošetřených TDZ, mohou být způsobeny rozdílnou kinetikou jednotlivých enzymů v těle rostlin. Prokázáno však bylo i to, že díky TDZ dochází ke stimulaci vzniku enzymů, jako například – peroxidázy, katalázy (Wang a kol., 1991a), k syntéze nitrátoreduktázy (Kulaeva a kol., 1982), zvýšení množství ATP, ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxygenasy (Chernyad'ev a kol., 1987; Chernyad'ev a Kozlovskikh, 1990). Dále může docházet k syntéze cytokinin oxidasy/dehydrogenasy, což je enzym, který nevratně inaktivuje všechny přirozeně se vyskytující cytokininy v rostlinách. To může být způsobeno i tím, že TDZ sám inhibuje aktivitu cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (Hare a kol., 1994; Chatfield a Armstrong, 1986).

1.7.2 Gibereliny

První zmínka o giberelinech (GA) byla v Japonsku, kdy japonský vědec studoval rostliny rýže (*Oryza sativa* L.), která byla napadena houbou *Gibberella fujikuroi*. Napadená rostlina měla atypický vzhled – nebyla zelená, měla protažený tvar a neprodukovala semena, což bylo způsobeno právě gibereliny, které byly z houby následně izolovány. Později se podařilo objevit další druhy GA, a to i v běžných rostlinách. V dnešní době je známo více než 130 odlišných druhů GA, ale ne každý vykazuje biologickou aktivitu v rostlinách a slouží pouze jako prekurzory pro aktivní formy GA nebo jako jejich metabolity (MacAdam, 2009).



Obr. 4: Chemická struktura prvního izolovaného giberelinu.

Staženo 25. 12. 2015

z https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ed/Gibberellin_A1.svg

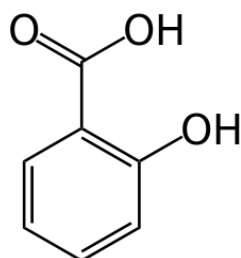
Z chemického hlediska se jedná o přírodní diterpenoidy, jejichž hlavním účinkem na rostlinu je podpora buněčného dělení a elongace. Dále podporují kvetení a germinaci semen (Sun a Gubler, 2004) a fungují v rostlině jako antioxidanty (Wigoda a kol., 2006). Gibereliny se uplatňují i jako protektiva před abiotickými i biotickými stresy. Konkrétně hrají roli při ochraně rostliny proti napadením patogenem (Berrocal-Lobo a kol., 2002) a zprostředkovávají odpověď při stresu způsobeném vysokou teplotou (Ko a kol., 2007). Při vysoké koncentraci solí se také uplatňují gibereliny, a to především skrze proteiny DELLA. Tyto proteiny zmírňují inhibici růstu způsobenou vysokou salinitou (Achard a kol., 2006). Dále bylo prokázáno, že při ztrátě mutace DELLA proteinů, dochází ke zvyšování koncentrace kyseliny salicylové (SA), díky jejímž biochemickým dráhám rostlina lépe odolává napadením patogenů (Robert-Seilaniantz a kol., 2007; Navarro a kol., 2008). Při exogenní aplikaci GA₃ je rostlina schopna zvrátit inhibiční účinek stresorů při klíčení semen a dokáže ovlivňovat hladinu SA v pletivech, která napomáhá ochraně rostliny.

1.7.3 Kyselina salicylová

O kyselině salicylové se v posledních letech objevilo spoustu nových informací týkajících se jejich funkcí při působení stresů na rostliny. Při interakci s gibereliny dochází k nadměrné expresi GASA4 genu v rostlině *Arabidopsis*, což zlepšuje toleranci vůči soli a oxidačnímu a tepelnému namáhání. Tento proces probíhá prostřednictvím zvýšení biosyntézy SA (Horvath a kol., 2007). Gibereliny také regulují hladinu kyseliny salicylové v rostlinách a také upravují poměr hladin mezi kyselinou jasmonovou a salicylovou (Navarro a kol., 2008).

Dalším důkazem, že je rostlina závislá na určitých koncentracích kyseliny salicylové a potlačuje tím abiotické stresy, je experiment, kdy byly na rostlinu aplikovány tři rostlinné hormony. Na semena transgenní rostliny *FsGASA4* byla aplikována kyselina salicylová, jasmonová a abscisová (ABA). Došlo ke změně množství jednotlivých hormonů v rostlině oproti neošetřeným rostlinám, a to až k dvojnásobnému nárůstu kyseliny salicylové v rostlině,

mírnému nárůstu ABA a mírnému poklesu JA (Alonso-Ramírez a kol., 2009). Výsledkem byla lepší odolnost ošetřených rostlin vůči oxidativnímu stresu, salinnímu stresu a stresu způsobeném vysokými teplotami. Tím se prokázala domněnka, že některé stresované rostliny jsou závislé na množství SA (Horvath a kol., 2007).



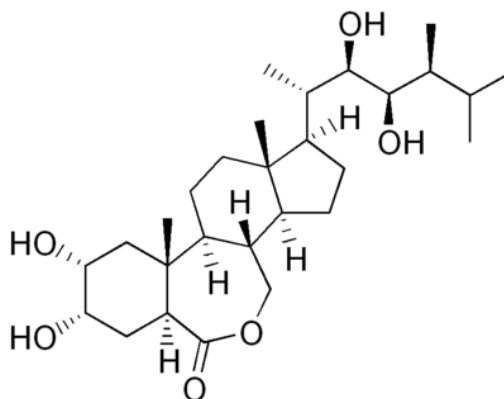
Obr. 5: Strukturální vzorec kyseliny salicylové.

Staženo 25. 12. 2015

z <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8e/Salicylic-acid-skeletal.svg/220px-Salicylic-acid-skeletal.svg.png>

1.7.4 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy jsou rostlinné steroidní hormony (Chung a Choe, 2013), které byly poprvé objeveny a izolovány v roce 1979 z pylu řepky (*Brassica napus* L.). Konkrétně se jednalo o brassinolid (Grove a kol., 1979). Přirozeně se BA vyskytují v reprodukčních orgánech některých rostlin a ovlivňují opad listů a plodů, dlouhivý růst buněk a senescenci (Choe, 2006; Clouse a Sasse, 1998). Ovlivňují biosyntézu ethylenu, aktivují protonové pumpy, syntézu aminokyselin a proteinů, regulují genovou expresi, podílí se na vývoji cévních svazků a podporují růst pylové láčky (Sasse, 2003). Dále se uplatňují při obranných reakcích rostlin na stresové podmínky zapříčiněných vysokými a nízkými teplotami (Wilén a kol., 1995), vysokou salinitou a tím spojeným osmotickým stresem (Sairam, 1994; Ali a kol., 2007), suchem, těžkými kovy a útoky patogenů (Hayat a kol., 2007).



Obr. 6: Struktura prvního izolovaného brassinosteroidu.

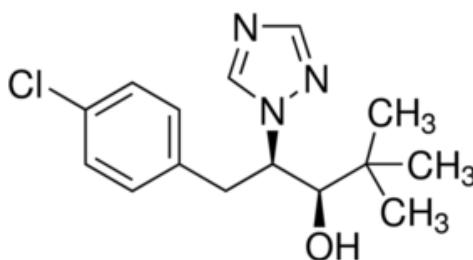
Staženo 25. 12. 2015 z

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/54/Brassinolide.png/400px-Brassinolide.png>

Brassinosteroidy mají propojené signální dráhy i s dalšími rostlinnými hormony a díky tomu získaly svoji funkci protektiv vůči stresu. Příkladem rostlinných hormonů, které ovlivňují, jsou kyselina abscisová, ethylen a kyselina jasmonová (Chung a Choe, 2014). Co se týká vztahu s kyselinou abscisovou, mají na rostlinu opačný efekt - působí tedy antagonisticky, a díky tomu se rostlina dokáže bránit vůči salinnímu stresu. Interakce rostlinných hormonů, aktivuje více antioxidantních komplexů a enzymů, které vychytávají volné radikály, dále podporuje růst rostliny a chrání fotosyntetický aparát (Ali a kol., 2008). Hlavní roli v potlačení salinního stresu má BIN2 protein, což bylo dokázáno inhibicí tohoto proteinu lithiem (Klein a Melton, 1996; Stambolic a kol., 1996) a bikininem (De Rybel a kol., 2009), kdy ošetřené rostliny zežloutly a následně uhynuly.

1.7.5 Paclobutrazol

Paclobutrazol (PBZ) je další látkou, která pomáhá rostlinám čelit vysoké salinitě. Z chemického hlediska se jedná o triazol, který byl popsán Heddenem a Graebem v roce 1985.



Obr. 7: Chemická struktura paclobutrazolu.

Staženo 25. 12. 2015

z http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure6/188/mfcd01678673.eps/_jcr_content/renditions/mfcd01678673-medium.png

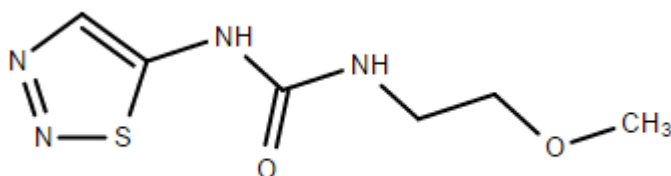
Paclobutrazol napadá isoprenoidní dráhu (Kamounsis a Chronopoulon-Sereli, 1999) a ovlivňuje hladiny fytohormonů v rostlině. Příkladem skupiny fytohormonů, kterým PBZ přímo blokuje syntetickou dráhu, jsou gibereliny, což zpomaluje a narušuje růst a vývoj rostliny (Mehouchi a kol., 1996). Jeho další funkce spočívá v regulaci hladin dalších fytohormonů, konkrétně podporuje nárůst hladin cytokininů a kyseliny abscisové a naopak snížení hladiny ethylenu (Asar-Boamah a Fletcher, 1986; Fletcher a Hofstra, 1988; Mackay a kol., 1990). Hajihashemi a Kiarostami testovali danou látku na rostlinách pšenice, kdy jedna z nich byla tolerantní vůči salinnímu stresu a druhá byla citlivá. Při aplikaci látky došlo k výrazným změnám na fenotypu obou rostlin. U obou kultivarů došlo ke zmenšení jejich

výšky a délky a se vzrůstající koncentrací soli docházelo ke větší inhibici kořenové části rostliny, ke zmenšení hmotnosti výhonků a procentuálního obsahu vody. Dále se u rostliny citlivé k soli naakumulovalo v listech více Na^+ iontů, které přispívají k ochraně vůči stresu a také velikost 6. listu byla větší než u tolerantní rostliny. U obou druhů, se zvyšující se koncentrací chloridu sodného, zvyšoval obsah biogenních prvků – P, K^+ a N. Ve výsledku má tedy paclobutrazol pozitivní účinky, jako ochrana před salinním stresem u obou kultivarů a zvyšuje odolnost citlivých plodin vůči soli (Hajihashemi a Kiarostami, 2007).

Dalším pozitivním účinkem na rostliny, je znásobení počtu molekul, které zachytávají volné radikály v buňkách, a tím přispívají k detoxikaci organismu (Kopyra a Gwozdz, 2003). Rostliny po ošetření PBZ mají silnější listy, větší chloroplasty a více chlorofylu (Kishorekumar a kol., 2007). Paclobutrazol také aktivuje některé enzymy, jako jsou superoxid dismutasa (SOD), katalasa (CAT) a peroxidasa (POX), které jsou při salinním stresu u neošetřených rostlin inhibovány (Manivannan a kol., 2008).

1.7.6 Testovaná látka TDZ-C2-OMe

Tato látka byla syntetizovaná laboratoří růstových regulátorů v Olomouci, a jak už název napovídá, látka má společnou základní strukturu s thidiazuronem.



Obr. 8: Struktura TDZ-C2-OMe nakreslená v programu Chemspider.

Co se týká biologické aktivity, tato látka vykazuje podobné pozitivní účinky na rostlinu jako cytokininy, což bylo prokázáno experimenty uvedenými ve druhé části této práce. Oproti cytokininům mají určitou výhodu, a to, že nepůsobí inhibičně na kořenovou část rostliny. Inhibice je způsobená aktivací dráhy CRE1/AHK4, která byla lokalizovaná v *Arabidopsis*. Tato dráha bývá aktivována cytokininy, ale testovaná látka ji neaktivuje. Podrobnější informace o účincích látky na rostliny jsou uvedeny ve druhé části práce.

Experimentální část

2 Použitý materiál a přístroje

2.1 Chemikálie

- testovaná látka: TDZ-C2-OMe (Laboratoř růstových regulátorů UP & ÚEB, AV ČR)
- TDZ (Sigma-Aldrich, Německo)
- MS (Murashige & Skoog médium, MES, sacharóza, agar): sacharóza 0,1 %, fytagel 6 g/l a testované látky – TDZ, TDZ-C2-OMe 100 nM koncentrace/dimethylsulfoxid 0,01 %, destilovaná voda.
- ethanol 70 % (v/v) + silwet 0,01 % (v/v), dimethylsulfoxid 0,01 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- chlorid sodný ≥ 99.5 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hoaglandův roztok (Fe EDTA 5 ml/l, zásobní roztok Hoagland s mikrobiogenními prvky 100 ml/l, destilovaná voda)

2.2 Pomůcky

- automatické pipety pro objem 1-10 μ l, 10-100 μ l a 100-1000 μ l, špičky
- 96 jamková deska, mikrozkušavky, stojan na mikrozkušavky, zkumavky, čtvercové Petriho misky CELLSTAR® (120x120)x17, Petriho misky \varnothing 100 mm
- chemická lžička, navažovací lodičky, skleněné tyčinky, magnetické míchadlo
- odměrný válec, kádinky
- plastové nádoby pro pěstování pšenice
- sadbovače TEKU JP 3050/160 T
- hydroponní tácy 1st generation (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic)
- hydroponická nádoba (Araponics, Česká republika)
- stříčka, rozprašovač, nůžky, injekční stříkačka, pinzeta, sázecí kolík
- substrát (Substrat 2, Klassmann Deilman, Geeste, Německo)
- perlit

2.3 Přístrojová technika

- laboratorní vodní lázeň (CSV-T-66EM)
- spektrofotometr (Synergy H4 Hybrid Reader)

- laboratorní celoplastová digestoř LK 1901 Plastic / 1200
- analytické váhy, předvážky
- fotoaparát Canon EOS 450D
- fytokomora (PlantScreen™)
- pásový dopravník sadbovačů (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika)

2.4 Biologický materiál

- pšenice setá (*Triticum aestivum* L. kultivaru Hereward)
- pšenice setá (*T. aestivum* L. kultivaru Etana; Deutsche Saatveredelung AG, Lippstadt, Německo)
- huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L. wild type Col-0)

3 Metody

3.1 Hodnocení fenotypu nadzemní části rostlin a stanovení celkového chlorofylu a karotenoidů v listech

Bylo naváženo 25 g semen pšenice seté kultivaru Hereward, která byla opláchnuta stříčkou se 70 % ethanolem a po dobu 2 minut byla za stálého míchání omývána. Poté se ethanol odlil a semena se proplachovala v kádince pod proudem tekoucí vody po dobu 40 minut. Po promytí byla přebytečná voda vylita z kádinky a namočená semena byla připravena na vysetí.

Pro výsev bylo připraveno 8 plastových nádob s perlitem, přičemž v každé nádobě bylo přesně 60 g perlitu. Před výsevem bylo odváženo 5 g promytých semen pšenice, která byla následně rovnoměrně rozmístěna po povrchu perlitu do každé z plastových nádob. Poté bylo do jednotlivých nádob nalito 250 ml předem připraveného Hoaglandova roztoku. Rostliny se následně přemístily do fytokomory, kde byly podmínky nastaveny tak, aby napodobovaly podmínky dlouhého dne (16 hodin den, 8 hodin noc; $130 \mu\text{M}$ fotonů PAR $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), kdy teplota v noci byla $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota ve dne $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Relativní vlhkost v komoře činila 60 %. Rostliny byly ponechány růst v těchto podmínkách po dobu 29 dní.

Po 7 dnech od vysetí byla aplikována testovaná látka TDZ-C2-OMe postřikem na list. Látka byla naředěna v rozprašovači na výslednou koncentraci $10 \mu\text{M}$ v destilované vodě a pro lepší ulpívání látky na listy rostlin byl přidán detergent silwet v 0,01 % koncentraci.

Během růstu rostlin, byly každý týden (dny 14, 21 a 28) ustříženy nadzemní části rostlin ($n=15$) a byla změřena jejich velikost. Po uplynutí 29 dní byly odstříhnuty další celé nadzemní části z kontrolních i ošetřených rostlin ($n=15$), které měly stejnou velikost listů. Z každé rostliny byly ustříženy první a druhé listy. Z těch byly ustříženy špičky o velikosti cca 5 cm o přesné váze 25 mg. Odstřížené části listů o této přesné váze byly umístěny do zkumavek (15 ml) vždy s 10 ml 70 % ethanolu. Následně byly zkumavky vloženy do vodní lázně s přednastavenými $80 \text{ }^\circ\text{C}$, kde došlo k luhování rostlinných barviv po dobu 1 hodiny. Po celkovém odbarvení listů se zkumavky vyjmuly z lázně a jejich obsah se protřepal, kvůli rovnoměrnému rozprostření barviv v roztoku ve zkumavkách. Vzorky ze všech zkumavek ($100 \mu\text{l}$) byly pipetovány do 96 jamkové destičky. Následně byly spektra jednotlivých vzorků proměřeny na spektrofotometru v rozmezí 300-750 nm. Pro výpočet celkového obsahu chlorofylu byly měřeny absorbance roztoků při vlnových délkách 646 nm a 663 nm. Pro výpočet obsahu karotenoidů byla měřena absorbance roztoků při vlnové délce 470 nm. Hodnoty obsahu barviv byly přepočítávány podle metody Lichtenthalera a Welburna (1983).

3.2 Kořenový test

Experiment byl prováděn na rostlině *Arabidopsis* - wild type Col-0, jehož semena byla nejdříve vysterilizovaná po povrchu pomocí 70 % ethanolu. Následně byla opláchnuta destilovanou vodou. Poté byla semena vyseta do svislých destiček, která obsahovala polotekuté Murashige-Skoog médium obsahující sacharózu o koncentraci 0,1 %, 6 g/l fytagelu a testované látky – TDZ nebo TDZ-C2-OMe o 100 nM koncentraci. U kontrolních vzorků bylo přidáno místo látek 0,01 % DMSO. Následující 4 dny od vysetí byly destičky ponechány ve tmě při 4 °C a poté byly umístěny do růstové komory. Podmínky v komoře byly nastaveny tak, aby napodobovaly podmínky dlouhého dne (16 hodin den, 8 hodin noc; 130 μM fotonů PAR $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Teplota přes den byla nastavena na 22 °C a přes noc na 20 °C. Relativní vlhkost činila 60 %. Rostliny byly takto ponechány růst po dobu 14 dní. Po uplynutí dané doby byly sazenice vyfotografovány a byla vyhodnocena délka jejich kořenů pomocí programu Scion Image Software (Scion Corp., Frederick, MD, USA).

Při vyhodnocování dat bylo proměřeno vždy minimálně 40 rostlin od každé testované látky a experiment se opakoval dvakrát. Výsledky byly následně zaznamenány ve formě grafů.

Druhou metodou k otestování účinků na kořeny rostlin byla metoda využívající hydroponické pěstování. Na experiment se použila sterilizovaná semena pšenice seté kultivaru Hereward, která byla vyseta do jednotlivých jamek v hydroponické nádobě (Araponics, Česká republika), kde byla každá jamka vyplněna polotekutým Murashige-Skoog médiem obsahujícím sacharózu o koncentraci 0,1 % a 6 g/l fytagelu. Polotekuté médium bylo do jamek aplikováno pomocí plastové injekční stříkačky, vždy po okraj a semeno bylo zasazeno sterilní pinzetou do média. Hydroponická nádoba byla naplněna po okraj Hoaglandovým roztokem, který obsahoval testované látky TDZ nebo TDZ-C2-OMe o 100 nM koncentraci. U kontrolních rostlin bylo přidáno do Hoaglandova roztoku DMSO v koncentraci 0,01 %.

Dva týdny od vysetí byl pravítkem změřen nejdelší kořen vždy od 50 rostlin a výsledky byly zaznamenány ve formě grafů a fotografií (fotoaparát Canon EOS 450D).

3.3 Stres suchem

Na vahách bylo odváženo přesně 30 g semen pšenice seté kultivaru Hereward. Semena byla umístěna do kádinky, kde se pomocí stříčky promyla a sterilizovala 70 % ethanolem a poté byla 45 minut namáčena v proudu destilované vody. V průběhu promývání byly připraveny plastové nádoby naplněné 45 g perlitu a následně byly zality 200 ml Hoaglandova roztoku. Následně se rovnoměrně po povrchu nádoby vyselo vždy 6 g promytých semen pšenice, která se poté umístila do fytokomory. Zde byly pěstovány po dobu 18 dní při ideálních podmínkách, kdy komora byla nastavena tak, aby napodobovala podmínky dlouhého dne (16 hodin den, 8 hodin noc; 130 μM fotonů $\text{PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Teplota přes den činila 22 °C a přes noc 20 °C. Relativní vlhkost byla nastavena na 60 %.

Během pěstování byly rostliny zalévány každý druhý den destilovanou vodou, kdy bylo množství vody doplňováno podle váhy celé nádoby se substrátem a rostlinou vždy na 300 g. Po 19 dnech od vysazení byly na rostliny aplikovány látky (TDZ, TDZ-C2-OMe) formou postřiku na listy. Testované látky byly aplikovány vždy 1x, a to v 10 μM koncentraci, zatímco na kontrolní rostliny bylo aplikováno stejné množství destilované vody. Do roztoku v rozprašovači byl přidán ve všech případech detergent silwet v 0,01 % koncentraci, pro lepší ulpívání testovaných látek na listech. Od 20. dne byly rostliny vystaveny stresu suchem, kdy přestaly být zalévány po dobu 5 dní. Po uplynulé době byly pořízeny fotografie fotoaparátem Canon EOS 450D. Následně byly rostliny ponechány ve stresových podmínkách po dobu 2-5 dní, kdy byly rostliny opět vyfotografovány a byl zaznamenán rozdíl v poškození rostlin ošetřených a neošetřených látkou. Po celkových 10 dnech od zahájení stresu byly rostliny znovu zality 150 ml destilované vody a po 24 hodinách od znovu zalití byly rostliny opět vyfotografovány.

3.4 Stanovení míry přežití a čerstvé hmotnosti rostlin

Rostliny byly pěstovány a ošetřeny látkou TDZ-C2-OMe stejně jak je popsáno výše. Rostliny byly pěstovány po dobu 40 dní. Posledních 20 dnů nebyly zalévány. Nadzemní části rostlin byly zváženy na analytických vahách. Počet zvážených rostlin byl 100. Výsledky byly zaznamenány do grafů. V jiném experimentu stejně provedeném byly rostliny po 40 dnech zality a po dalších 24 h bylo spočítáno, kolik rostlin přežilo.

3.5 Aplikace salinního stresu

Bylo naváženo 30 g semen pšenice seté kultivaru Hereward, která byla povrchově vysterilizována 70 % ethanolem a následně promyta destilovanou vodou. Během promývání byly přichystány 4 plastové nádoby vždy s obsahem 45 g perlitu, které byly naplněny 250 ml Hoaglandova roztoku. U kontrolních rostlin bylo k Hoaglandovu roztoku přidáno DMSO o koncentraci 0,01 % a v případě testované látky TDZ-C2-OMe o 100 nM koncentraci. Následně bylo odváženo 6 g semen na každou plastovou nádobu a semena byla rovnoměrně rozeseta po povrchu perlitu. Poté byly rostliny umístěny do fytokomory, kdy podmínky v komoře byly nastaveny tak, aby napodobovaly podmínky dlouhého dne (16 hodin den, 8 hodin noc; $130 \mu\text{M}$ fotonů PAR $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Teplota přes den byla 22 °C a přes noc 20 °C. Relativní vlhkost činila 60 %. Rostliny byly pěstovány v těchto podmínkách po dobu 25 dní. Během růstu rostliny byla doplňována destilovaná voda vždy na konečnou hmotnost 300 g.

Po 7 dnech od vysetí byly rostliny ovlivněny roztokem chloridu sodného v 75 mM koncentraci. Následující dny byla opět udržována hladina vody a doplňována na celkovou váhu 300 g.

Po 25 dnech od vysetí byla pořízena první fotografie fotoaparátem Canon EOS 450D, zachycující rozdíl ve fenotypu ošetřených rostlin oproti kontrole. Po dalších 5 dnech, tj. po 30 dnech od vysetí rostlin, byly pořízeny nové fotografie, pro zachycení vývoje působení salinního stresu na zbarvení listů.

3.6 Vzcházení rostlin

Bylo naváženo 100 g semen pšenice kultivaru Etana (Deutsche Saatveredelung AG, Lippstadt, Německo), která se umístila do kádinky se 100 ml namáčecí směsi na 3 hodiny. Namáčecí směs obsahovala vždy určitou koncentraci testované látky TDZ-C2-OMe, podle tabulky tab. 1 viz níže, roztok DMSO v konečné koncentraci 0,01 %, ve kterém byla látka rozpuštěna a destilovanou vodou, kdy byl roztok doplněn destilovanou vodou vždy na konečný objem 100 ml. Po tří hodinovém máčení byla semena scezena a zbylý objem namáčecího roztoku byl odměřen odměrným válcem a zaznamenán do tabulky tab. 2, pro každou koncentraci zvlášť. Po odlití vody byla semena rovnoměrně rozprostřena na Petriho misky a nechala se vysušit v digestoři po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinovém sušení semen, bylo možné semena vyset do substrátu. Sadbovače (TEKU JP 3050/160 T) byly naplněny substrátem (Substrat 2, Klassmann Deilman, Geeste, Německo) a následně bylo odstříženo 5 sloupců, takže výsledný počet výsevních buněk klesl na 110. Do každé buňky bylo vyseto 1 semeno. Semena byla standardizovaně vysévána

do hloubky 1 cm pod povrchem substrátu. Připravené sadbovače byly vloženy do hydroponického insertu a spolu s ním do měřících táců pro systém PlantScreen (Photon Systems Instruments, Czech Republic). Tácy byly umístěny do fytokomory, kde byly zalaty 1 l roztoku obsahující chlorid sodný o koncentraci 200 mM pro stresovanou variantu a destilovanou vodou pro variantu kontrolní. Po celou dobu průběhu experimentu byly tácy zalévány stejným objemem destilované vody, tak aby obsah vody ve všech tácech zůstal stejný.

Každý tác byl automaticky fotografován RGB kamerou každé 4 hodiny v růstové komoře PlantScreen™ s použitím pásového dopravníku sadbovačů (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika), kde byly udržovány konstantní podmínky s použitím LED osvětlení. Podmínky v komoře byly nastaveny tak, aby napodobovaly podmínky dlouhého dne (16 h den, 8 hodin noc; 750 μmol fotonů $\text{PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) s teplotami přes den 22 °C a přes noc 20 °C. Relativní vlhkost v komoře činila 60 %.

Výhodou fenotypizačního zařízení je kombinace několika různých metod, které nedestruktivně sledují růst, morfologii a fyziologii studovaných rostlin. Jednotlivé použité metody, využívané při fenotypizaci, jsou běžně v praxi využívány, jedná se např. o metody využívající viditelné nebo fluorescenční zobrazování. Během růstu a vývoje rostlin dochází k průběžnému fotografování rostlin, kdy fotografie jsou zaznamenávány a ukládány do softwaru. Příkladem takové metody, která byla využita i při tomto experimentu, je RGB metoda. RGB kamera využívá zobrazování rostlin v červené, zelené a modré škále barev. Pomocí této metody můžeme snímat postupný růst nadzemní části rostlin, vyhodnocovat biomasu nadzemní části rostlin, proměřit velikost jednotlivých listů, určit počet odnoží, změřit přesnou délku stonku, zaznamenat stavbu květenství atd. Výhodou této metody je neinvazivnost, rychlost, přesnost a schopnost proměřit velká množství rostlin (Humplík a kol., 2015).

Tab. 1: Rozpis jednotlivých koncentrací testované látky a soli, použité při výsadbě sadbovačů.

TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe
kontrola	10 nM	50 nM	100 nM	500 nM	1 μM
0,01 % DMSO	0,01 % DMSO	0,01 % DMSO	0,01 % DMSO	0,01 % DMSO	0,01 % DMSO
0 mM NaCl	0 mM NaCl	0 mM NaCl	0 mM NaCl	0 mM NaCl	0 mM NaCl
200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl

Tab. 2: Objem přebytečné namáček směsi po 3 hodinách namáčení semen.

TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe	TDZ-C2-OMe
Kontrola	10 nM	50 nM	100 nM	500 nM	1 μM
63,5 ml	63,5 ml	65 ml	63,5 ml	65,5 ml	64 ml

4 Výsledky

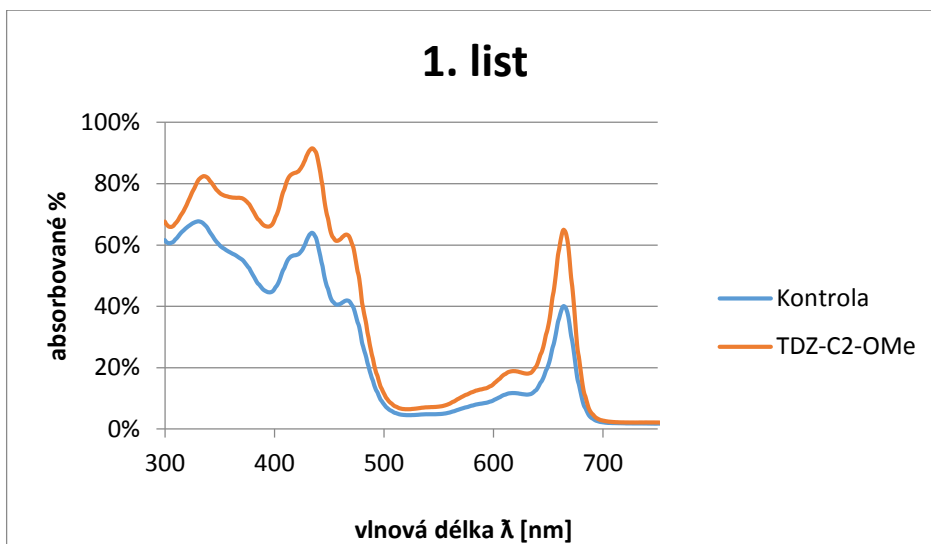
4.1 Vliv TDZ-C2-OMe na vývoj pšenice za standardních podmínek

První experimenty byly zacíleny na pozorování fenotypu (především velikosti) nadzemních částí rostlin pšenice seté ošetřených testovanou látkou. Během těchto měření, které byly provedeny každý týden, nebyly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly ve velikostech nadzemních částí ošetřených a kontrolních rostlin. Tohoto výsledku bylo dosaženo po aplikaci látky v 10 μM koncentraci sprejem na celé rostliny. Žádný vliv na velikost nadzemní části nebyl pozorován ani v případě, že látka byla k rostlinám přidána ve formě závlivy, a to až do koncentrace 100 nM. Pokud byly rostliny zality roztokem látky o koncentraci 1 μM , docházelo již k výrazné retardaci růstu. Tato koncentrace nebyla v dalších experimentech se zaléváním používána. Při sprejování obdrží rostliny daleko nižší dávky látky a proto ani koncentrace 10 μM nevedla k jejich retardaci.

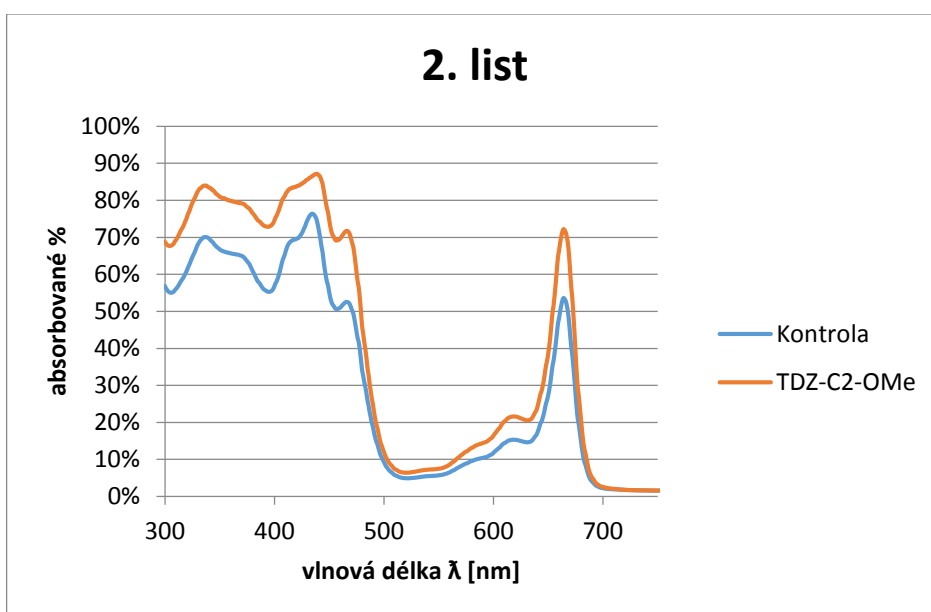
Při těchto experimentech byly zaznamenány výraznější barvy ošetřených rostlin, z tohoto důvodu byl měřen obsah fotosyntetických barviv v listech.

Nejprve byla změřena absorpční spektra extraktů z 1. a 2. listu kontrolní a ošetřené rostliny pšenice seté staré 29 dní (obr. 10 a 11). Grafy jsou vytvořeny zprůměrováním hodnot naměřených z pěti listů. Již z těchto grafů je zřejmé, že ošetřené rostliny obsahují více látek, schopných absorbovat viditelné světlo. Dále v tabulce č. 3 je prezentováno množství celkového chlorofylu a karotenoidů, které bylo spočteno s použitím spektrofotometrických dat. Rozdíl mezi ošetřenými a kontrolními rostlinami je vyjádřen i procentuálně ve sloupci u testované látky TDZ-C2-OMe. Všechny hodnoty jsou statisticky významné s hodnotou $P < 0,001$. První listy ošetřených rostlin obsahují téměř o 60 % více chlorofylu než kontrola. Druhé listy ošetřených rostlin pak mají asi o 37 % více chlorofylu než kontrolní rostliny.

Ze spektrálních dat byl spočítán také obsah karotenoidů (tab. 3), kde u stejných rostlin ošetřených látkou TDZ-C2-OMe byl zaznamenán jejich nárůst, a to konkrétně u listu č. 1 o 39,4 % a u druhého listu o 32 %.



Obr. 10: Absorpční spektrum extraktu 1. listu z kontrolní a ošetřené rostliny pšenice seté. Rostliny byly pěstovány za standardních podmínek po dobu 29 dní, kdy po týdnu od vysetí byla aplikována testovaná látka TDZ-C2-OMe jednorázovým postřikem na listy v 10 μ M koncentraci.



Obr. 11 : Absorpční spektrum extraktu 2. listu z kontrolní a ošetřené rostliny pšenice seté. Rostliny byly pěstovány za standardních podmínek po dobu 29 dní, kdy po týdnu od vysetí byla aplikována testovaná látka TDZ-C2-OMe jednorázovým postřikem na listy v 10 μ M koncentraci.

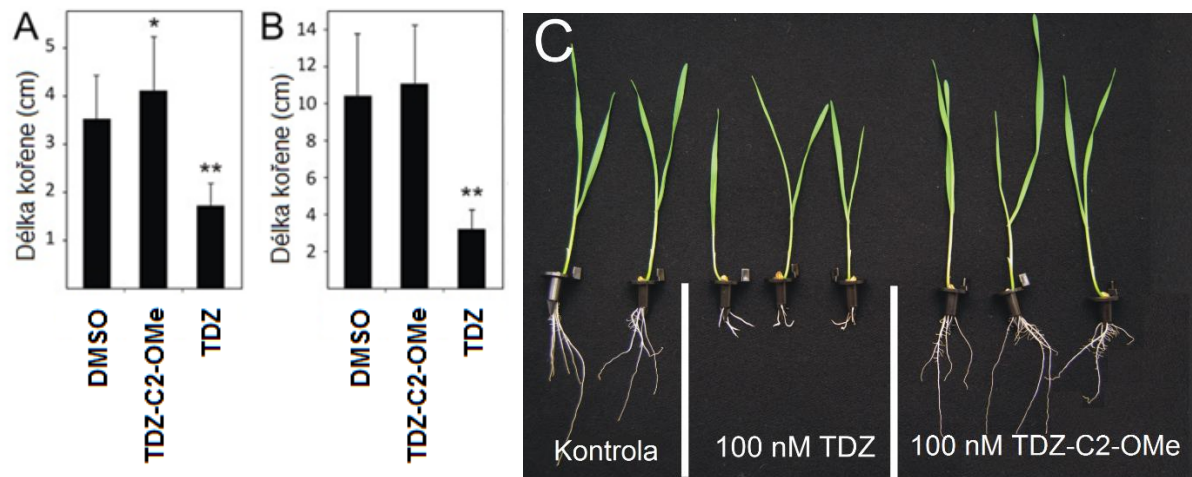
Tab. 3: Množství celkového chlorofylu a karotenoidů u 1. a 2. listu rostlin pšenice seté ošetřené látkou TDZ-C2-OMe.

	Kontrolní rostliny		Rostliny ošetřené TDZ-C2-OMe			
	První list	Druhý list	První list		Druhý list	
	μM/g FW	μM/g FW	μM/g FW	% z kontroly	μM/g FW	% z kontroly
Celkový chlorofyl	787.9 ± 27.1	1200.6 ± 111.3	1258.0 ± 43.3	159.6	1653.3 ± 68.0	137.7
Karotenoidy	0.246 ± 0.031	0.327 ± 0.035	0.343 ± 0.011	139.4	0.442 ± 0.012	132.0

Následně bylo zkoumáno, jaký vliv má aplikace látky TDZ-C2-OMe na vývoj kořene *Arabidopsis* a pšenice seté. Účinek testované látky byl porovnán s účinkem cytokininu TDZ. Na obrázku 9 jsou dva grafy (A, B) a fotografie (C), které znázorňují účinek látek. Při experimentech byly látky aplikovány v roztoku ke kořenům rostlin v koncentraci 100 nM.

Kontrolní rostliny *Arabidopsis* měly kořeny asi 3,5 cm dlouhé. Rostliny ošetřené TDZ-C2-OMe měly kořeny asi 4,1 cm dlouhé. Aplikace TDZ způsobila inhibici růstu kořenů, a to o více než 50 % ve srovnání s kontrolními rostlinami (1,2 cm). Z výsledku je patrné, že testovaná látka TDZ-C2-OMe neinhibuje růst kořenů dvouděložné rostliny *Arabidopsis* (graf A).

Podobného výsledku bylo dosaženo i v experimentu s pšenicí setou (graf B, obr. C). Kontrolní i ošetřené rostliny látkou TDZ-C2-OMe měly v průměru kořeny dlouhé mezi 10 a 11 cm. Kořeny pšenice, která rostla v přítomnosti 100 nM TDZ, měly délku jen kolem 3 cm. Z výsledků je zřejmé, že látka TDZ-C2-OMe neinhibuje růst kořene ani jednoděložné pšenice.



Obr. 9: Srovnání délky hlavního kořene *Arabidopsis* (A) a pšenice seté (B) po ošetření 100 nM roztokem TDZ a TDZ-C2-OMe. Obrázek C je fotografie celých rostlin pšenice pěstovaných hydroponicky ve zmíněných roztocích. Chybové úsečky v grafech vyjadřují hodnotu směrodatných odchylek ($n=50$). Hvězdičky označují statisticky významná data oproti kontrolním rostlinám, kdy podle vyhodnocení studentova *T*-testu jsou dvěma hvězdičkami označeny hodnoty kde $P < 0,001$ a jednou hvězdičkou $P < 0,05$.

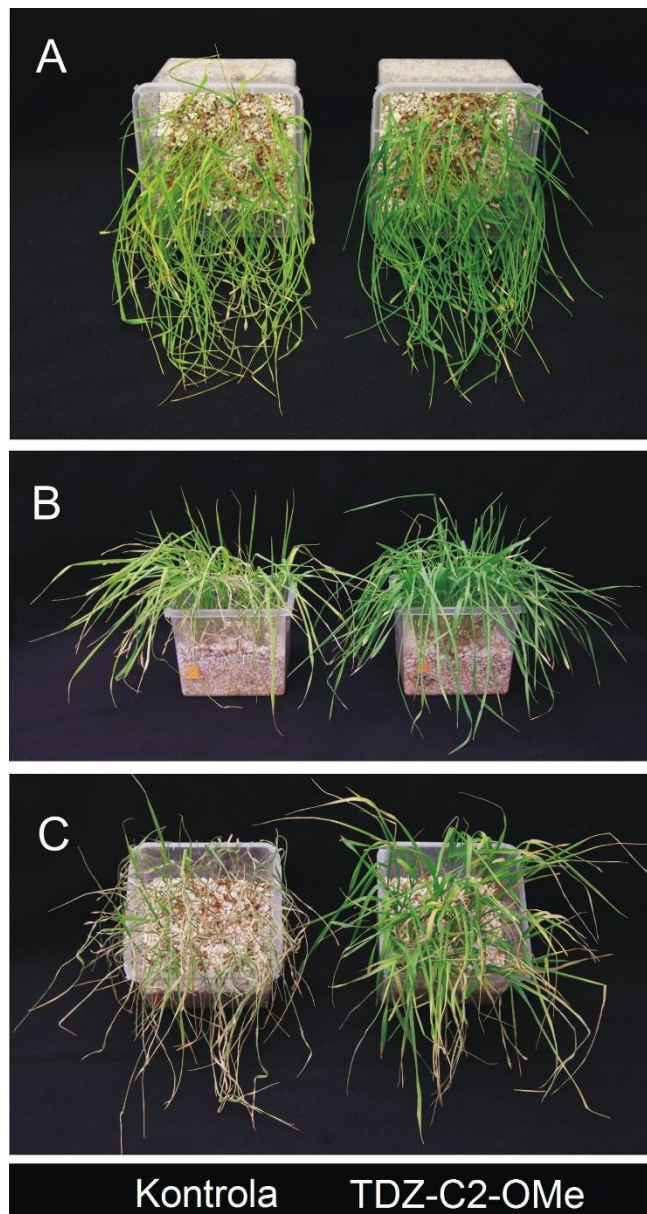
4.2 Vliv TDZ-C2-OMe na vývoj pšenice pěstované za sucha

V tomto experimentu se sledoval fenotyp rostlin, které byly vystaveny krátkodobému suchu, a zároveň byly ošetřeny testovanou látkou. Látka byla aplikována jednorázovým sprejováním na listy pšenice po týdnu od vysetí, kdy koncentrace TDZ-C2-OMe byla 10 μM . Pro lepší ulpívání látky na listech rostlin, byl přidán detergent silwet v 0,01 % koncentraci.

Bylo zjištěno, že látka TDZ-C2-OMe oproti kontrole výrazně zpomaluje žloutnutí a usychání listů stresované pšenice. Výsledky jsou patrné z následujících fotografií. Na snímku A (obr. 12), jsou zaznamenány rostliny pšenice pěstované po dobu 14 dní za standardních podmínek a poté vystaveny stresu suchem po dobu následujících 7 dní. Ošetřené rostliny v pravém květináči jsou zelenější než rostliny kontrolní v levém květináči.

Na snímku B (obr. 12), jsou rostliny pšenice pěstované taktéž 14 dní za standardních podmínek, ale stres suchem působil 8 dní a 24 h před pořízením snímku byly rostliny znovu zality destilovanou vodou – 100 ml. Ze snímku je opět patrné, že ošetřené rostliny jsou zelenější a v lepší formě než kontrolní rostliny.

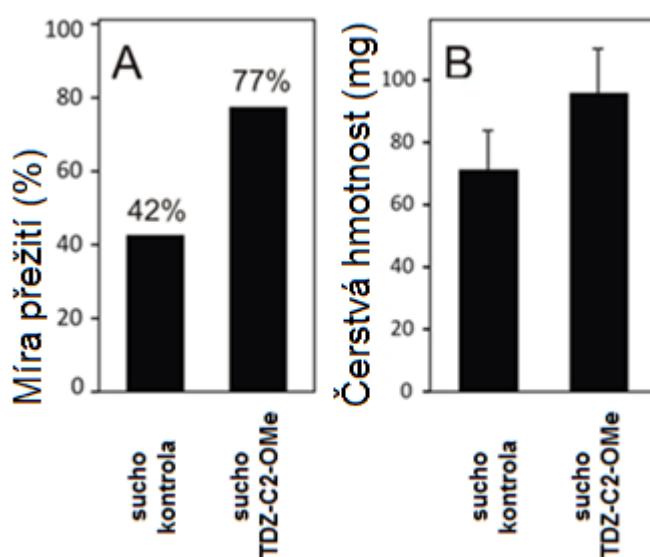
Na snímku C (obr. 12), jsou rostliny pšenice pěstované opět 14 dní za standardních podmínek, ale stres suchem působil 10 dní a 24 h před pořízením snímku byly rostliny znovu zality 100 ml destilované vody. Ze snímku je zřejmé, že ošetřených rostlin přežilo mnohem více, než rostlin kontrolních. Tímto experimentem byly potvrzeny předešlé výsledky, kdy se testovaná látka osvědčila při zvyšování tolerance rostlin pšenice vůči suchu a tím pádem k prodloužení délky života stresovaných rostlin.



Obr. 12: Rostliny pšenice ošetřené látkou TDZ-C2-OMe v 10 μ M koncentraci jednorázovým postřikem na listy (levý sloupec). Na snímku A jsou rostliny pšenice pěstované 14 dní za standardních podmínek a poté vystaveny týdennímu stresu suchem. Na snímku B jsou rostliny pšenice pěstované 14 dní za standardních podmínek a vystaveny stresu suchem 8 dní, kdy 24 h před pořízením snímku byly rostliny znovu zalaty destilovanou vodou – 100 ml. Na snímku C jsou rostliny pšenice pěstované 14 dní za standardních podmínek a vystaveny desetidennímu stresu suchem, kdy 24 h před pořízením snímku rostliny byly znovu zalaty 100 ml destilované vody.

Po prokázání, že látka TDZ-C2-OMe zvyšuje odolnost pšenice vůči suchu, byly provedeny další experimenty, kdy byl kvantifikován počet přeživších rostlin ošetřených, oproti rostlinám neošetřeným, při déle trvajícím stresu suchem. Byly napěstovány tácy s pšenící, kdy byla vždy polovina rostlin na tácu postříkána 10 μ M roztokem testované látky. Pšenice rostla po dobu 40 dní, z toho posledních 20 dní bez zalévání.

Z experimentů bylo zjištěno, že z rostlin, ošetřených látkou TDZ-C2-OMe, se vzchopilo o 35 % více, než tomu bylo u rostlin kontrolních (obr. 13-A). Dále bylo zjištěno, že rostliny na jednom tácu se lišily také svojí čerstvou hmotností. Ošetřené rostliny měly v průměru asi o 20 mg větší váhu (obr. 13-B), přestože byly pěstované na stejném tácu, tudíž měly i stejný přístup k vodě.



Obr. 13: Graf A vyjadřuje míru přežití rostlin pšenice 40 dní starých, které byly vystaveny 20 dnům sucha. Graf B znázorňuje rozdíly mezi čerstvou hmotností rostlin neošetřených a ošetřených látkou TDZ-C2-OMe. Stres suchem trval posledních 20 dní. Celkový počet hodnocených rostlin při každém experimentu se pohyboval mezi 100-120. Naměřené hodnoty jsou statisticky významné při $P < 0,05$.

4.3 Vliv TDZ-C2-OMe na vývoj pšenice při působení salinního stresu

V tomto experimentu byl hodnocen především rozdíl v rychlosti žloutnutí listů mezi ošetřenými a kontrolními rostlinami při salinním stresu. Chlorid sodný byl aplikován v zálivce po 7 dnech od vysetí v 75 mM koncentraci. Postup degradace nadzemních částí rostlin pšenice seté byl sledován během 30 dní od vysetí. Látka TDZ-C2-OMe byla aplikována jednorázově do zálivky v den výsevu o koncentraci 100 nM. Dvacátý pátý den od vysetí byl viditelný rozdíl především mezi prvními a druhými listy rostlin. První list u kontroly byl zcela hnědý a suchý, druhý list byl z poloviny žlutý a povadlý. Na rozdíl od ošetřených rostlin, kde první list byl celý žlutý a druhý sytě zelený (obr. 14 A, B). Po 30 dnech od vysetí, tedy po 5 dnech od předchozí dokumentace, byl u kontrolní rostliny 1. list hnědý suchý, 2. list z poloviny suchý a zbytek žlutý, třetí list byl už také nažloutlý. U kontroly byl první list také suchý, druhý žlutý a třetí zcela zelený. Hlavní rozdíl byl zaznamenán po 30 dnech tedy u 2. a 3. listu. Z výsledků je patrné, že testovaná látka zvyšuje odolnost rostlin proti abiotickému salinnímu stresu, oproti kontrolním rostlinám. Pravděpodobně, by se tedy osvědčila jako protektivum vůči soli a také proti osmotickému stresu.

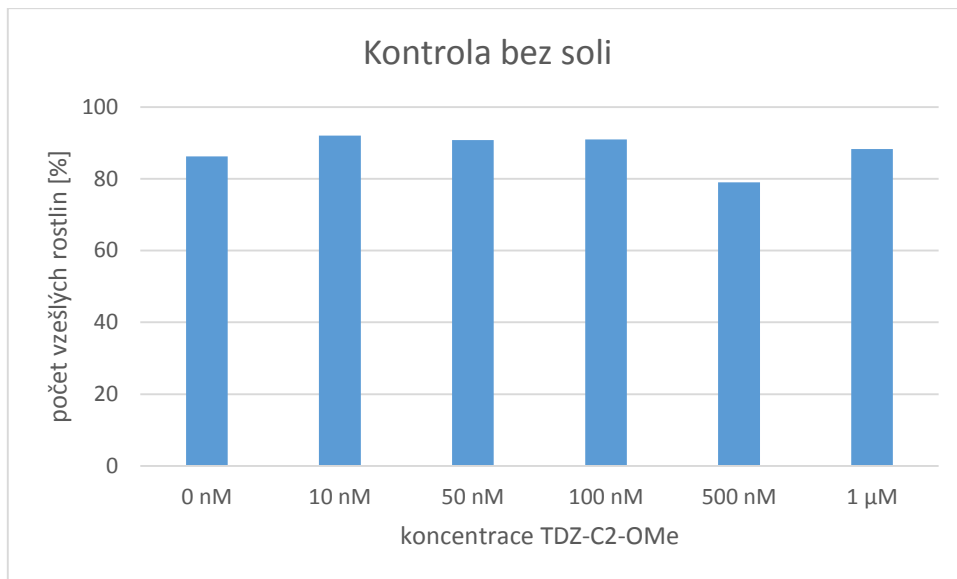


Obr. 14: Na snímcích jsou zachyceny rozdíly mezi kontrolními rostlinami pšenice a rostlinami pšenice ošetřenými látkou TDZ-C2-OMe (vpravo) při salinním stresu. Testovaná látka byla aplikována do zálivky o 100 nM koncentraci a chlorid sodný byl aplikován po 7 dnech v 75 mM koncentraci. Na snímku A, B jsou rostliny 25 dní staré, kde na snímku B jsou zachyceny pouze nadzemní části rostlin pšenice. Na obrázku C jsou rostliny pšenice staré 30 dní.

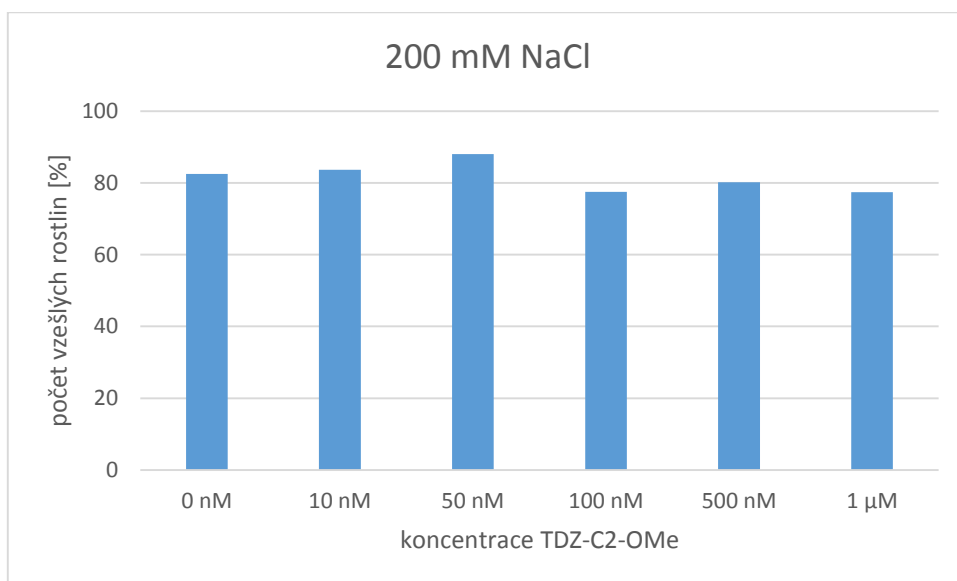
4.4 Vliv TDZ-C2-OMe na vzcházení pšenice pěstované při salinním stresu

V posledním experimentu byla testována schopnost látky TDZ-C2-OMe podpořit vzcházení rostlin pšenice kultivaru Etana při působení salinního stresu. Látka byla aplikovaná v několika koncentracích od 10 nM po 1 μ M, kde semena namořená v roztoku o všech koncentracích byla testována za standardních podmínek a po přidání chloridu sodného v 200 mM koncentraci. Výsledkem byly grafy, které zachycovaly koncentrační závislosti látek na vzcházení rostlin u kontrolních rostlin bez soli a se solí. Na prvních dvou grafech (obr. 15, 16), jsou zaznamenána výsledná data celkově vzešlých rostlin. V případě pěstování rostlin za standardních podmínek (bez přidání soli), se zaznamenal vyšší počet vzešlých rostlin ošetřených látkou, než u kontrolních neošetřených rostlin. Vyšší počet vzešlých rostlin byl zaznamenán u všech koncentrací, kromě jedné, a to 500 nM. Po přidání soli do zálivky, se vyšší počet vzešlých rostlin zaznamenal, oproti kontrole, pouze u ošetřených rostlin látkou v 10 nM a v 50 nM koncentraci. Tento výsledek byl pravděpodobně způsoben velkou odolností pšenice seté na sůl, proto by bylo vhodné do budoucna ještě látku otestovat na dalších jiných plodinách. V grafech (obr. 17, 18) jsou vynesena hrubá data v závislosti vzešlých rostlin na časové jednotce, kdy hodnoty v grafu na obrázku 17, odpovídají hodnotám v grafu na obrázku 15 a hodnoty v grafu na obrázku 16, odpovídají hodnotám v grafu na obrázku 18. Při zaměření se na obr. 18, na kterém jsou v grafu znázorněna hrubá data vzcházení rostlin pšenice při salinním stresu, lze vidět, že kontrolní rostliny vzcházely o něco později a v menším množství během prvních dní, oproti všem ostatním ošetřeným rostlinám, což z obr. 16, zabývajícím se salinním stresem, nevyplývá.

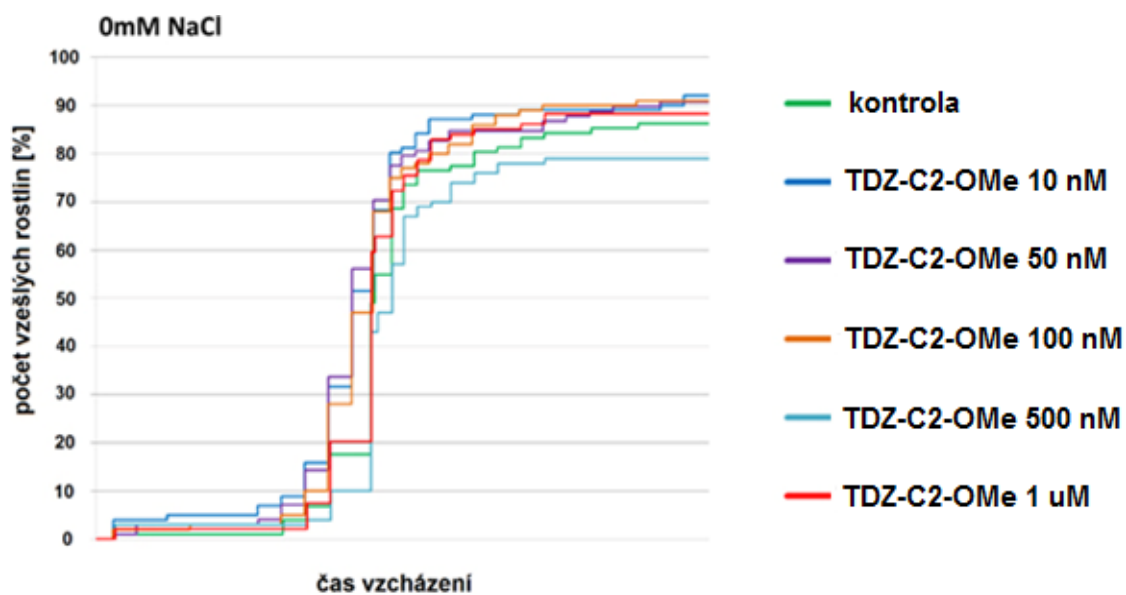
Díky těmto experimentům bylo možné zhodnotit efekt studované látky na vzcházení rostlin během prvních 7 dní od vysetí. Tácy s rostlinami ve fytokomoře byly snímány RGB kamerou každé 4 hodiny. V provedených experimentech byly jednotlivé koncentrace aplikovány na 110 rostlin. Grafy na obrázcích 15 a 16, byly zpracovány v programu Excel a data v grafech na obrázcích 17 a 18, byla zpracována v programu pro analýzu obrazu, který byl vytvořen RNDr. Tomášem Fůrstem, Ph.D. v programovacím prostředí MatLab, v rámci Univerzity Palackého v Olomouci. Tento program doposud nebyl veřejně publikován.



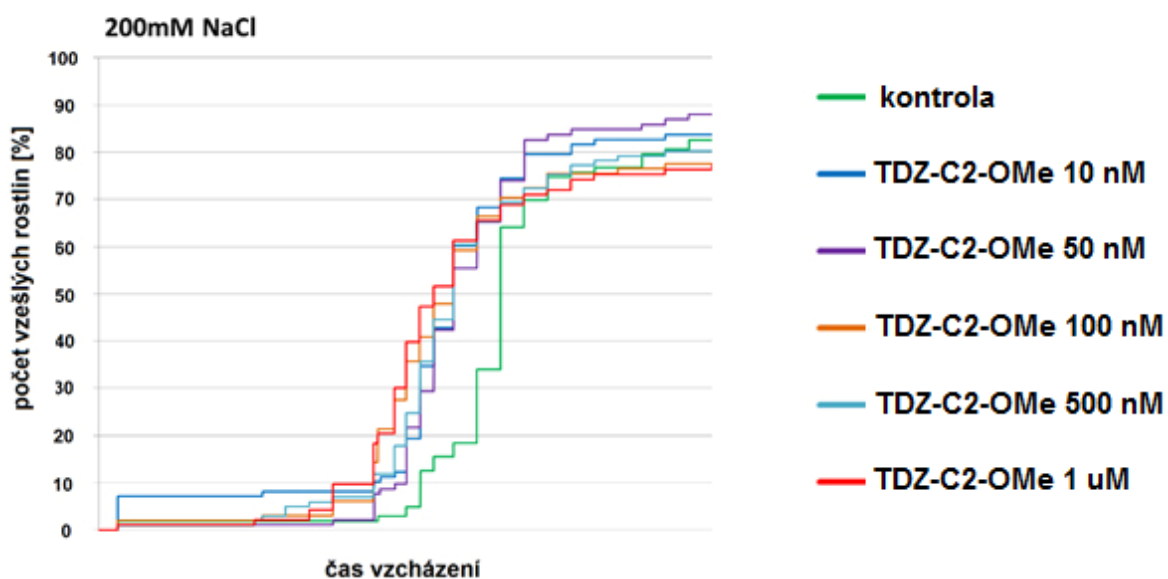
Obr. 15: Graf zachycující rozdíly mezi vzcházením rostlin pšenice kultivaru *Etana* bez použití látky TDZ-C2-OMe a po použití látky v různých koncentracích.



Obr. 16: Graf zachycující rozdíly mezi vzcházením rostlin pšenice kultivaru *Etana* bez použití látky TDZ-C2-OMe a po použití látky v různých koncentracích při působení salinního stresu. Chlorid sodný byl aplikován do zálivky v koncentraci 200 mM.



Obr. 17: Na obrázku je graf, kde jsou zachycena hrubá naměřená data, která zachycují počet vzešlých rostlin pšenice kultivaru Etana za jednotku času po aplikaci látky TDZ-C2-OMe v různých koncentracích za standardních podmínek.



Obr. 18: Na obrázku je graf, kde jsou zachycena hrubá naměřená data, která zachycují počet vzešlých rostlin pšenice kultivaru Etana za jednotku času, při aplikaci látky TDZ-C2-OMe v různých koncentracích po aplikaci chloridu sodného do zálivky o 200 mM koncentraci.

5 Diskuze

Je známo, že senescence může být oddálena přirozeně se vyskytujícími rostlinnými hormony, které se běžně vyskytují v rostlinném těle. Mezi zástupce, s největšími anti-senescenčními vlastnostmi, se řadí především cytokininy (Fletcher a Osborne, 1965). Dřívější práce, které prokázaly pozitivní účinky cytokininů na oddálení listové senescence, zmiňují konkrétně *meta*-topolin a BAP. Látky byly testovány na rostlině *Arabidopsis*, vždy v koncentraci 100 μ M. Obě látky způsobovaly oddálení procesu senescence oproti kontrolním, neošetřeným rostlinám (Holub a kol., 1998). Zvýšený obsah celkového chlorofylu a karotenoidů v listech po exogenní aplikaci cytokininů, byl již také prokázán. Tyto výsledky byly publikovány Todorovem v roce 1998. Pozitivní výsledky byly také zaznamenány při zvýšení endogenní hladiny cytokininů, a to konkrétně v transgenních rostlinách tabáku, kde byl vložen gen pro isopentenyltransferasu, která je odpovědná za biosyntézu cytokininu *trans*-zeatinu (Rivero a kol., 2007). Proces suchem indukované listové senescence byl takto oddálen až o dva týdny.

Oproti těmto pozitivním účinkům cytokininů na rostliny, při stresu suchem, byly zaznamenány i účinky, kdy některé cytokininy ovlivňovaly otevírání a zavírání průduchů. Určité cytokininy způsobují jejich otevření i při suchu, což má na rostlinu fatální dopad a dochází k většímu poškození, případně k jejímu úhynu. Úzkou spojitost s procesy otevírání a zavírání průduchů vykazuje i kyselina abscisová, která reguluje uzavírání průduchů, čímž ovlivňuje ztrátu vody výparem, a také koriguje hladinu endogenních cytokininů v rostlinných pletivech (Pospíšilová, 2003b). Gibereliny a polyaminy také zpomalují senescenci, ovšem až v milimolární koncentraci oproti cytokininům (Jordi a kol., 1995; Wei-yu a kol., 1990).

Z výsledků, které jsou součástí této práce, vyplývá, že testovaná látka TDZ-C2-OMe, oddaluje degradaci chlorofylu a zvyšuje jeho obsah v listech pšenice v nižší koncentraci než cytokininy BAP a *meta*-topolin. Dále je známo, že cytokininy mají inhibičními účinky na kořeny rostlin (Werner a kol., 2003), zatímco při testování látky TDZ-C2-OMe tyto účinky nebyly zaznamenány. V případě cytokininů bylo zjištěno, že dochází k aktivaci cytokininového receptoru CRE1/AHK4 v *Arabidopsis* (Riefler a kol., 2006), který je odpovědný za inhibici kořenů. Látka TDZ-C2-OMe neaktivuje tento receptor, a proto nedochází k inhibici kořenů. Tento experiment, na prokázání aktivace receptoru CRE1/AHK4, byl proveden mým vedoucím práce, který jej uvádí ve svém doposud nepublikovaném článku (Nisler a kol., manuskript v přípravě). Netečnost látky TDZ-C2-OMe k růstu prýtu i kořene pšenice, je obrovskou výhodou této látky oproti cytokininům a látka má tak veliký potenciál, aby mohla být používána v zemědělství.

Při vývoji rostlin je důležitou součástí proces germinace semen a s tím související proces vzcházení rostlin. Semenáčky jsou hodně náchylné k působení abiotických stresů, což se projevuje především v zemědělství. V předešlých experimentech, zabývajících se tímto tématem, byl zaznamenán pozitivní účinek extraktu z rostliny *Ulva lactuca* L. na vzcházení rostlin při působení salinního stresu. Tento extrakt z *U. lactuca* L. obecně zmírňoval nežádoucí účinky působení chloridu sodného na rostliny pšenice (Ibrahim a kol., 2014). Látka, která je odpovědná za tyto protektivní účinky, ovšem není známá.

6 Závěr

Předmětem předložené bakalářské práce bylo otestování biologické aktivity látky TDZ-C2-OMe na rostlinách pšenice seté za standardních a stresových podmínek, a dále také porovnání vlivu této látky s vlivem cytokininu thidiazuronu, co se týká účinků na kořeny rostlin.

Bylo zjištěno, že testovaná látka TDZ-C2-OMe nemá negativní vliv na vývoj pšenice, ba naopak, že zvyšuje obsah fotosyntetických barviv v rostlinách pšenice a že zpomaluje senescenci listů za stresových podmínek. Dále byl prokázán pozitivní vliv na vzcházení semenáčků pšenice za standardních i stresových podmínek. Z dosažených výsledků vyplývá, že by bylo možné využít tuto látku v zemědělství, jako možné protektivum vůči environmentálním stresům, které na rostliny působí při běžném polním pěstování.

Do budoucna je v plánu komplexně otestovat látku TDZ-C2-OMe na kukuřici, u které byl v posledních týdnech prováděn doposud pouze jeden test v jednom opakování, a to na vzcházení rostlin. Dosažené výsledky byly pozitivní a byly zaznamenány větší účinky látky na vzcházení rostlin kukuřice, oproti otestované pšenici. Důvodem by pravděpodobně mohl být rozdíl ve vztahu pšenice a kukuřice k vysokým koncentracím solí.

Dále by bylo zajímavé otestovat látku na sóji, která se řadí mezi luštěniny a je hojně pěstovaná ve světě. Luštěniny, jak je zmíněno v teoretické části, jsou obecně citlivější k salinnímu stresu než obilniny, takže by teoreticky mohl být zaznamenán ještě větší pozitivní vliv TDZ-C2-OMe, než v případě pšenice.

Seznam použité literatury

- Achard, P.; Cheng, H.; De Grauwe, L.; Decat, J.; Schoutteten, H.; Moritz, T.; Van der Straeten, D.; Peng, J. R.; Harberd, N. P.** 2006. *Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals*. *Science*, **311**: 91-94.
- Ali, B.; Hayat, S.; Ahmad, A.** 2007. *28-homobrassinolide ameliorates the saline stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.)*. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 217-223.
- Ali, B.; Hayat, S.; Fariduddin, Q.; Ahmad, A.** 2008. *24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in Brassica juncea*. *Chemosphere*, **72**: 1387-1392.
- Alonso-Ramírez, A.; Rodríguez, D.; Reyes, D.; Jiménez, J. A.; Nicolás, G.; López-Climent, M.; Gómez-Cadenas, A.; Nicolás, C.** 2009. *Evidence for a Role of Gibberellins in Salicylic Acid-Modulated Early Plant Responses to Abiotic Stress in Arabidopsis Seeds*. *Journal of Plant Physiology*, **150**: 1336-1344.
- Amasino, R.** 2005. *1955: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone*. *Journal of Plant Physiology*, **138**: 1177-1184.
- Anantharaman, V.; Aravind, L.** 2001. *The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors*. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**: 579-582.
- Araus, J. L.; Alegre, L.; Tapia, L.; Calafell, R.** 1986. *Relationship between leaf structure and gas exchange in wheat leaves at different insertion levels*. *Journal of Experimental Botany*, **37**: 1323-1333.
- Araus, J. L.; Amaro, T.; Casadesús, J.; Asbati, A.; Nachit, M. M.** 1998. *Relationships between ash content, carbon isotope discrimination and yield in durum wheat*. *Austr. Journal of Plant Physiology*, **25**: 835-842.
- Araus, J. L.; Buxó, R.; Febrero, A.; Camalich, M. D.; Martín, D.; Rodríguez-Ariza, M. O.; Molina, F.; Romagosa, I.** 1997c. *Changes in carbon isotope discrimination in grain cereals from different regions of the Western Mediterranean Basin during the past seven*

millennia. Palaeoenvironmental evidence of a differential change in aridity during the late Holocene. Global Change Biology, **3**: 107-118.

Araus, J. L.; Febrero, A.; Català, M.; Molist, M.; Voltas, J.; Romagosa, I. 1999b. *Crop water availability in early agriculture: evidence from carbon isotope discrimination of seeds from a tenth millennium BP site on the Euphrates.* Global Change Biology, **5**: 233-244.

Argueso, C. T.; Ferreira, F. J.; Hutchison, C. E.; To, J. P. C.; Epple, P.; Mathews, D. E.; Schaller, G. E.; Dangl, J. L.; Kieber, J. J. 2012. *Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity.* PLoS Genetics, **8**: e1002448.

Arndt, F.; Rusch, R.; Stilfried, H. V. 1976. *SN 49537, a new cotton defoliant.* Journal of Plant Physiology, **57**: 99.

Asar-Boamah, N.; Fletcher, R. 1986. *Protection of bean seedlings against heath and chilling injury by triadimefon.* Physiologia Plantarum, **67**: 353-358.

Babiker, A. G. T.; Parker, C.; Suttle, J. C. 1992. *Induction of Striga seed germination by TDZ.* Weed Research, **32**: 243-248.

Barciszewski J.; Massino F.; Clark B. F. 2007. *Kinetin – a multiactive molecule.* International Journal of Biological Macromolecules, **40**: 182-192.

Bartoli, C. G.; Casalongué, C. A.; Simontacchi, M.; Marquez-Garcia, B.; Foyer, C. H. 2013. *Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress.* Environmental and Experimental Botany, **94**: 73-88.

Bernstein, L. 1964. *Effects of salinity on mineral composition and growth of plants.* Coloquim of Plant Analysis and Fertilizer Problems, **4**: 25-45.

Berrocal-Lobo, M.; Segura, A.; Moreno, M.; López, G.; García-Olmedo, F.; Molina, A. 2002. *Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection.* Journal of Plant Physiology, **128**: 951-961.

Bhardway, S. N. 1959. *Physiological studies on salt-tolerance in crop plants. VI. Effect of NaCl and Na₂CO₃ on grain quality in wheat.* Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B, Biological Sciences, **29**: 168-173.

Brouquisse, R.; Evrard, A.; Rolin, D.; Raymond, P.; Roby, C. 2001. *Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips. Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties.* Journal of Plant Physiology, **125**: 1485-1498.

Burkle, L.; Cedzich, A.; Dopke, C.; Stransky, H.; Okumoto, S.; Gillissen, B.; Kuhn, C.; Frommer, W. B. 2003. *Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis.* The Plant Journal, **34**: 13-26.

Cao, J.; Jiang, F.; Sodmergen Cui, K. M. 2003. *Time-course of programmed cell death during leaf senescence in Eucommia ulmoides.* Journal of Plant Research, **162**: 7-12.

Clouse, S. D.; Sasse, J. M. 1998. *Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **49**: 427-451.

Colebrook, E. H.; Thomas, S. G.; Phillips, A. L.; Hedden, P. 2014. *The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress.* Journal of Experimental Biology, **217**: 67-75.

De Rybel, B.; Audenaert, D.; Vert, G.; Rozhon, W.; Mayerhofer, J.; Peelman, F.; Coutuer, S.; Denayer, T.; Jansen, L.; Nguyen, L.; Vanhoutte, I.; Beemster, G. T.; Vleminckx, K.; Jonak, C.; Chory, J.; Inzé, D.; Russinova, E.; Beeckman, T. 2009. *Chemical inhibition of a subset of Arabidopsis thaliana GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling.* Chemistry & Biology, **16**: 594-604.

Diaz-Vivancos, P.; Faize, M.; Barba-Espin, G.; Faize, L.; Petri, C.; Hernández, J. A.; Burgos, L. 2013. *Ectopic expression of cytosolic superoxide dismutase and ascorbate peroxidase leads to salt stress tolerance in transgenic plums.* Plant Biotechnology Journal, **11**: 976-985.

Ehlig, C. F.; Bernstein, L. 1958. *Salt tolerance of strawberries.* Proceedings of the American Society for Horticultural Science, **72**: 198-206.

El-Hendway, S. E.; Hu, Y.; Schmidhalter, U. 2005. *Growth, ion content, gas exchange and water relation of wheat genotypes differing in salt-tolerants*. Australian Journal of Agricultural Research, **56**: 123-134.

Ewbank, J. J.; Barnes, T. M.; Lakowski, B.; Lussier, M.; Bussey, H.; Hekimi, S. 1997. *Structural and functional conservation of the Caenorhabditis elegans timing gene clk-1*. Science, **275**: 980-983.

Fletcher, R. A.; Osborne, D. J. 1965. *Regulation of protein and nucleic acid synthesis by gibberellin during leaf senescence*. Nature, **207**: 1176.

Fletcher, R.; Hofstra, G. 1988. *Triazol as potential plant protectants*. In: *Sterol Synthesis Inhibitors in Plant Protection*. Eds. Berg, D. and M. Plempel Cambridge, Ellis Horwood Ltd. pp: 321-331.

Flowers, T. J.; Yeo, A. R. 1995. *Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?* Australian Journal of Plant Physiology, **22**: 875-884.

Franco-Zorrilla, J. M.; Martin, A. C.; Solano, R.; Rubio, V.; Leyva, A.; Paz-Ares, J. 2002. *Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in Arabidopsis*. The Plant Journal, **32**: 353-360.

Gillissen, B.; Burkle, L.; Andre, B.; Kuhn, C.; Rentsch, D.; Brandl, B.; Frommer, W. B. 2000. *A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis*. The Plant Cell, **12**: 291-300.

Grime, J. P. *Plant strategies and vegetation processes*. Chichester-Brisbane-New York-Toronto: John Wiley and sons, Ltd., 1979, s. 21. **ISBN 0471996955**.

Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen, J. D., Jr.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Cook, J. C. 1979. *Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen*. Nature, **225**: 1065-1066.

Hajhashemi, S.; Kiarostami, K. 2007. *Effects of Paclobutrazol and Salt Stress on Growth and Ionic Contents in Two Cultivar of Wheat*. Pakistan Journal of Biological Sciences, **10**: 41-48.

- Ha, S.; Vankova, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; Tran, L. S.** 2012. *Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses*. Trends in Plant Science, **17(3)**: 172-179.
- Hare, P. D.; Staden, J.; Van Staden, J.** 1994. *Inhibitory effect of TDZ on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus*. Plant and Cell Physiology, **35**: 1121-1125.
- Hayat, S.; Ali, B.; Hasan, S.A.; Ahmad, A.** 2007. *Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in Brassica juncea*. Environmental and Experimental Botany, **60**: 33-41.
- Hedden, P.; Graebe, J. E.** 1985. *Inhibition of Gibberellin biosynthesis by paclobutrazolin cell free homogenates of Cucurbita maxima endosperm and Malus purnila embryos*. Journal of Plant Growth Regulation, **4**: 111-122.
- Heyl, A.; Schmülling, T.** 2003. *Cytokinin signal perception and transduction*. Current Opinion in Plant Biology, **6**: 480-488.
- Heyl, A.; Wulfetange, K.; Pils, B.; Nielsen, N.; Romanov, G. A.; Schmülling, T.** 2007. *Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain*. BMC Evolutionary Biology, **7**: 62.
- Higuchi, M.; Pischke, M. S.; Mähönen, A. P.; Miyawaki, K.; Hashimoto, Y.; Seki, M.; Kobayashi, M.; Shinozaki, K.; Kato, T.; Tabata, S.; Helariutta, Y.; Sussman, M. R.; Kakimoto, T.** 2004. *In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **101**: 8821-8826.
- Hirose, N.; Takei, K.; Kuroha, T.; Kamada-Nobusada, T.; Hayashi, H.; Sakakibara, H.** 2008. *Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation*. Journal of Experimental Botany, **59**: 75-83.
- Holub, J.; Hanuš, J.; Hanke, D. E.; Strnad, M.** 1998. *Biological activity of cytokinins derived from ortho- and meta-hydroxybenzyladenine*. Plant Growth Regulation, **26**: 109-115.
- Horvath, E.; Szalai, G.; Janda, T.** 2007. *Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling*. Journal of Plant Growth Regulation, **26**: 290-300.

Humplík, J. F.; Lazár, D.; Husičková, A.; Spíchal, L. 2015. *Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses – a review.* Plant Methods, **11**: 29.

Hutchinson, M. J.; Saxena, P. K. 1996a. *Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes TDZ-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey) tissue cultures.* Plant Cell Reports, **15**: 512-515.

Hwang, I.; Sheen, J.; Müller, B. 2012. *Cytokinin signaling networks.* Annual Review of Plant Biology, **63**: 353-380.

Chatfield, J. M.; Armstrong, D. J. 1986. *Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great Northern.* Journal of Plant Physiology, **80**: 493-499.

Chernyad'ev, I. I.; Kozlovskikh, A. L. 1990. *Effects of 6-benzylaminopurine, TDZ, and cartolin on activity of photosynthetic enzymes and ATP content in leaves of perennial grasses.* Soy. Journal of Plant Physiology, **37**: 251-256.

Chernyad'ev, I. I.; Obratsov, A. S.; Kozlovskikh, A. L.; Doman, N. G. 1987. *Cytokinins as regulators of photosynthesis, respiration and productivity of some perennial grasses.* Prikladnaia Biohimiia i Mikrobioliia, **23**: 647-656.

Choe, S. 2006. *Brassinosteroid biosynthesis and inactivation.* Physiologia Plantarum, **126**: 539-548.

Chung, Y.; Choe, S. 2013. *The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in Arabidopsis.* Critical Reviews in Plant Sciences, **32**: 396-410.

Chung, Y.; Kwon, S. I.; Choe, S. 2014. *Antagonistic Regulation of Arabidopsis Growth by Brassinosteroids and Abiotic Stresses.* Molecules and Cells, **37(11)**: 795-803.

Ibrahim, W. M.; Ali, R. M.; Hemida, K. A.; Sayed, M. A. 2014. *Role of *Ulva lactuca* Extract in Alleviation of Salinity Stress on Wheat Seedlings.* The Scientific World Journal, **ID 847290**: 1-11.

Inoue, T.; Higuchi, M.; Hashimoto, Y.; Seki, M.; Kobayashi, M.; Kato, T.; Tabata, S.; Shinozaki, K.; and Kakimoto, T. 2001. *Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis*. *Nature*, **409**: 1060-1063.

Ji, Z. L.; Wang, S. Y. 1988. *Reduction of abscisic acid content and induction of sprouting in potato, Solanum tuberosum L., by TDZ*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **7**: 37-44.

Jordi, W.; Stopen, G. M.; Kelepouris, K.; van der Krieken, W. M. 1995. *Gibberellin-Induced Delay of Leaf Senescence of Alstroemeria Cut Flowering Stems is Not Caused by an Increase in the Endogenous Cytokinin Content*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **14**: 121-127.

Kaho, H. 1926. *Über den Einfluss der Temperatur auf die koagulierende Wirkung einiger Alkalisalze auf das Pflanzenplasma*. VIII. *Biochemische Zeitschrift*, **167**: 182-194.

Kamada-Nobusada, T.; Sakakibara, H. 2009. *Molecular basis for cytokinin biosynthesis*. *Phytochemistry*, **70**: 444-449.

Kamounsis, A. P.; Chronopoulou-Sereli, A. G. 1999. *Paclobutrazol affects growth and flower bud production in gardenia under different light regimes*. *Horticultural Science*, **34**: 674-675.

Kim, C. M. 1958. *Effect of saline and alkaline salts on the growth and internal components of selected vegetable plants*. *Physiologia Plantarum*, **11**: 441-450.

Kim, H. J.; Ryu, H.; Hong, S. H.; Woo, H. R.; Lim, P. O.; Lee, I. C.; Sheen, J.; Nam, H. G.; Hwang, I. 2006. *Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **103**: 814-819.

Kimura, K. D.; Tissenbaum, H. A.; Liu, Y.; Ruvkun, G. 1997. *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. *Science*, **277**: 942-946.

Kishorekumar, A.; Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Sankar, B.; Somasundaram, R.; Panneerselvam, R. 2007. *Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through*

antioxidants and free radical scavenging enzymes in Arachis hypogaea L. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **60**: 229-235.

Klein, P. S.; Melton, D. A. 1996. *A molecular mechanism for the effect of lithium on development.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **93**: 8455-8459.

Ko, C. B.; Woo, Y. M.; Lee, D. J.; Lee, M. C.; Kim, C. S. 2007. *Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the GASA4 gene.* Plant Physiology and Biochemistry, **45**: 722-728.

Kopyra, M.; Gwozdz, E. A. 2003. *Nitric Oxide Stimulates Seeds Germination and Counteracts the Inhibitory Effect of Heavy Metals and Salinity on Root Growth of Lupinus luteus.* Biology Letters, **40**: 61-69.

Kovalskaia, E. M. 1958. *Change in salt resistance of plants during ontogenesis.* Fiziologiya Rastenii, **5**: 437-446.

Kudo, T.; Kiba, T.; Sakakibara, H. 2010. *Metabolism and long-distance translocation of cytokinins.* Journal of Integrative Plant Biology, **52**: 53-60.

Kulaeva, O. N.; Baskakov, Y. A.; Borisova, N. N.; Kuznetsov, V. V.; Tsibulya, L. V.; Shapovalov, A. A. 1982. *Investigations of cytokinin properties of the defoliant DROP and the herbicide DPX-4189.* Journal of Plant Physiology, **29**: 266-273.

Kun, Y.; Jianrong, W.; Qing, M.; Dan, Y.; Jiaru L. 2009. *Senescence of aerial parts is impeded by exogenous gibberlic acid in herbaceous perennial Paris polyphylla.* Journal of Plant Physiology, **166**: 819-830.

Letham, D.S. 1973. *Cytokinins from Zea mays.* Phytochemistry, **12**: 2445-2455.

Levitt, J. *Responses of plants to environmental stresses.* New York and London: Academic Press, INC., 1972, s. 9-11. **ISBN 0124455603.**

Lichtenthaler, H. K.; Welburn, A. R. 1983. *Determinations of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf extracts in different solvents.* Biochemical Society transactions, **603**: 591-592.

Lim, P. O.; Kim, H. J.; Nam, H. G. 2007. *Leaf Senescence*. Journal of Plant Biology, **58**: 115-136.

MacAdam, J. W. *Structure and function of plants*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. **ISBN 978-0-8138-2718-6**.

Mackay, C.; Hall, C.; Hofstra, G.; Fletcher, R. 1990. *Uniconazole-induced changes abscisic acid, total amino acids and proline in Phaseolus vulgaris*. Pesticide Biochemistry and Physiology, **37**: 74-82.

Mähönen, A. P.; Bonke, M.; Kauppinen, L.; Riikonen, M.; Benfey, P. N.; Helariutta, Y. 2000. *A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root*. Genes & Development, **14**: 2938-2943.

Maianu, A.; Aksenova, I.; Albescu, I. 1965. *Tolerance to salinity of the main chloride plants on meadow soils with chloride salinization*. Bucharest Institute of Central Cercet Agrochemistry Section and Pedology, **33**: 357-373.

Manivannan, P.; Jaleel, C. A.; Kishorekumar, A.; Sankar, B.; Somasundaram, R.; Pannerselvam, R. 2008. *Protection of Vigna unguiculata (L.) Walp. plants from salt stress by paclobutrazol*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **61**: 315-318.

Mehouchi, J.; Tadeo, F. R.; Zaragoza, S.; Promo-Millo, E.; Talon, M. 1996. *Effect of gibberellic acid and paclobutrazol on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of citrus rootstock seedlings*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, **71**: 747-504.

Mickelbart, M. V.; Hasegawa, P. M.; Bailey-Serres, J. 2015. *Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability*. Nature Reviews Genetics, **16**: 237-251.

Mok, M. C. 1994. *Cytokinins and plant development: an overview*. In Cytokinins: chemistry, activity and function Mok, D. W. S.; Mok, M. C.; eds. Boca Raton, FL: CRC, pp. 167-178.

Mok, M. C.; Mok, D. W. S.; Armstrong, D. J.; Shaw, G. 1982. *Cytokinin activity of Nphenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (TDZ)*. Phytochemistry, **21**: 1509-1511.

Monteith, J. L. 1995. *A reinterpretation of stomatal responses to humidity*. Plant, Cell and Environment, **18**: 357-364.

Munné-Bosch, S.; Alegre, L. 2004. *Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress*. Func. Journal of Plant Biology, **31**: 203-216.

Navarro, L.; Bari, R.; Achard, P.; Lison, P.; Nemri, A.; Harberd, N. P.; Jones, J. D. G. 2008. *DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling*. Current Biology, **18**: 650-655.

Nishimura, C.; Ohashi, Y.; Sato, S.; Kato, T.; Tabata, S.; Ueguchi, C. 2004. *Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis*. The Plant Cell, **16(6)**: 1365-1377.

Nisler, J.; Zatloukal, M.; Koprna, R.; Dobrušková, J.; Šmehilová, M.; Tarkowská, D.; Novák, O.; Mikulík, J.; Galuszka, P.; Strnad, M.; Spíchal, L. 2016. *Novel urea compounds delay senescence and increase stress tolerance of wheat with unique efficiency*. Manuskript v přípravě.

O'Leary, J. W. 1970. *The influence of ground water salinization on plant growth*. The Arid Lands Resources Newsletter, **34**: 4-7.

Pitman, M. G.; Läuchli, A. 2002. *Global impacts of salinity and agricultural ecosystems*. In *salinity: Environment-plant-molecules*. Läuchli, A.; Lüttge, U. Eds. Kluwer Academic, Dodrecht, pp: 3-20.

Pospíšilová, J. 2003b. *Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress*. Biologia Plantarum, **46**: 491-506.

Pospíšilová, J.; Synková, H.; Rulcová, J. 2000. *Cytokinins and water stress*. Biologia Plantarum, **43**: 321-328.

Preece, J. E.; Huetteman, C. A.; Ashby, W. C.; Roth, P. L. 1991. *Micro- and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules*. Journal of the American Society Horticultural Science, **116**: 142-148.

- Riefler, M.; Novak, O.; Strnad, M.; Schmülling, T.** 2006. *Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism*. The Plant Cell, **18**: 40-54.
- Richards, R. A.** 1996a. *Defining selection criteria to improve yield under drought*. Journal of Plant Growth Regulation, **20**: 57-166.
- Rivero, R. M.; Kojima, M.; Gepstein, A.; Sakakibara, H.; Mittler, R.; Gepstein, S.; Blumwald, E.** 2007. *Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **104(49)**: 19631-19636.
- Robert-Seilaniantz, A.; Navarro, L.; Bari, R.; Jones, J. D.** 2007. *Pathological hormone imbalances*. Current Opinion in Plant Biology, **10**: 372-379.
- Sairam, R. K.** 1994. *Effect of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture stress condition of two wheat varieties*. Journal of Plant Growth Regulation, **14**: 173-181.
- Sakakibara, H.** 2006. *Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation*. Annual Review of Plant Biology, **57**: 431-449.
- Sasse, J. M.** 2003. *Physiological actions of brassinosteroids: an update*. Journal of Plant Growth Regulation, **22**: 276-288.
- Schachtman, D. P.; Munns, R.** 1992. *Sodium accumulation in leaf of Triticum species that differ in salt-tolerant*. Australian Journal of Plant Physiology, **19**: 331-340.
- Stambolic, V.; Ruel, L.; Woodgett, J. R.** 1996. *Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells*. Current Biology, **6**: 1664-1668.
- Strnanantad, M.** 1997. *The aromatic cytokinins*. Physiologia Plantarum, **101**: 674- 688.
- Strogonov, B. P.** 1964. *Physiological basis of salt tolerance of plants*. Acad. Sci. USSR., Davey and Co. New York. **ISBN 0706505247**.

Sun, T. P.; Gubler, F. 2004. *Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants*. Annual Review of Plant Biology, **55**: 197-223.

Suzuki, T.; Miwa, K.; Ishikawa, K.; Yamada, H.; Aiba, H.; Mizuno, T. 2001. *The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins*. Plant and Cell Physiology, **42**: 107-113.

Tagawa, T.; Ishizaka, N. 1963. *The osmotic pressure of Egyptian desert plants in relation to waer supply*. Egyptian University Bulletin Faculty of Science, **7**: 1-35.

Takada, H. 1954. *Ion accumulation and osmotic value of plants, with special reference to strand plants*. Journal of the Institute of Polytechnics, Osaka City University Series D, Biology, **5**: 81-96.

Tardy, F.; Créach, A.; Havaux, M. 1998. *Photosynthetic pigment concentration, organization and interconversions in a pale green Syrian landrace of barley (Hordeum vulgare L. Tadmor) adapted to harsh climatic conditions*. Plant Cell and Environment, **21**: 479-489.

Tester, M.; Langridge, P. 2010. *Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World*. Science, **327**: 818-822.

Tetley, R. M.; Thimann, K. V. 1974. *The Metabolism of Oat Leaves during Senescence: I. Respiration, Carbohydrate Metabolism, and the Action of Cytokinins*. Plant Physiology, **54(3)**: 294-303.

Todorov, D.; Alexieva, V. V.; Karanov, E. 1998. *Effect of Putrescine, 4-PU-30, and Abscisic Acid on Maize Plants Grown under Normal, Drought, and Rewatering Conditions*. Journal of Plant Growth Regulation, **17(4)**: 197-203.

Ueguchi, C.; Koizumi, H.; Suzuki, T.; Mizuno, T. 2001a. *Novel family of sensor histidine kinase genes in Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell Physiology, **42**: 231-235.

Ueguchi, C.; Sato, S.; Kato, T.; Tabata, T. 2001b. *The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell Physiology, **42**: 751-755.

Ungar, I. A.; Hogan, W.; McClelland, M. 1969. *Plant communities of saline soils at Lincoln, Nebraska*. The American Midland Naturalist Journal, **82**: 564-577.

Venglat, S. P.; Sawhney, V. K. 1994. *Ectopic formation of trichomes and stomata in floral organs of Arabidopsis thaliana induced by TDZ*. Canadian Journal of Botany, **72**: 671-677.

Visser, C.; Fletcher, R. A.; Saxena, P. K. 1995. *TDZ stimulates expansion and greening in cucumber cotyledons*. Physiology and Molecular Biology of Plants, **1**: 21-26.

Visser, C.; Qureshi, J. A.; Gill, R.; Saxena, P. K. 1992. *Morphoregulatory role of TDZ. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures*. Journal of Plant Physiology, **99**: 1704-1707.

Wang, S. Y.; Jiao, H. J.; Faust, M. 1991a. *Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during TDZ-induced bud break of apple*. Physiologia Plantarum, **82**: 231-236.

Weissenböck, G. 1969. *The effect of the salt content of the soil upon the morphology and ion accumulation of halophytes*. Flora (Jena), **B158**: 369-389.

Wei-yu, H.; Ya-lai, W.; Lin-jiang, Y. 1990. *The relationship between polyamines and senescence of detached wheat leaves*. Acta Botanica Sinica, **32**: 125-132.

Werner, T.; Motyka, V.; Laucou, V.; Smets, R.; Van Onckelen, H.; Schmülling, T. 2003. *Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity*. The Plant Cell, **15**: 2532-2550.

Werner, T.; Schmülling, T. 2009. *Cytokinin action in plant development*. Current Opinion in Plant Biology, **12**: 527-538.

Wigoda, N.; Ben-Nissan, G.; Granot, D.; Schwartz, A.; Weiss, D. 2006. *The gibberellin-induced, cysteine-rich protein GIP2 from Petunia hybrida exhibits in planta antioxidant activity*. The Plant Journal, **48**: 796-805.

Wilén, R.W.; Sacco, M.; Gusta, L.V.; Krishna, P. 1995. *Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (Bromus inermis) cell cultures.* Physiologia Plantarum, **95**: 195-202.

Woo, H. R.; Goh, C. H.; Park, J. H.; Teyssendier, B.; Kim, J. H.; Park, Y. I.; Nam, H. G. 2002. *Extended leaf longevity in the ore4-1 mutant of Arabidopsis with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene.* The Plant Journal, **31**: 331-340.

Yamada, H.; Suzuki, T.; Terada, K.; Takei, K.; Ishikawa, K.; Miwa, K.; Mizuno, T. 2001. *The AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane.* Plant and Cell Physiology, **42**: 1017-1023.

You, S. P.; Liang, S. H.; Xu, L. G., Li, F. Y. 1992. *The effect of TDZ on senescence and some physiological processes in detached leaves of barley.* Journal of Hangzhou University, **19**: 352-353.

Zacarias, L.; Reid, S. M. 1990. *Role of growth regulators in the senescence of Arabidopsis thaliana leaves.* Journal of Plant Physiology, **80**: 549-554.