

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Cytokininové deriváty a jejich vliv na buněčné membrány během
indukované senescence**



Vypracovala: Bc. Elisabeth Hypišová

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Zuzana Kučerová, Ph. D.

Olomouc 2024

Ze srdce děkuji paní Mgr. Zuzaně Kučerové, Ph.D. za to, že si mě vzala pod křídla, rovněž za ochotu, věnovaný čas a cenné rady během realizace této práce. Bez Vás bych to nedokázala! Taktéž patří obrovské díky panu Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za to, že mi pomohl najít tu správnou vedoucí práce, také za pomoc při snímkování pomocí konfokálního mikroskopu a měření obsahu MDA metodou HPLC. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit své díky za poskytnutou podporu během mého studia svým rodičům, babičce a manželovi. Víím, že jsem byla na zabití... hlavně ten poslední měsíc stál za to.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Elisabeth Hypiusevová

Název práce: Cytokininové deriváty a jejich vliv na buněčné membrány během indukované senescence

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra biofyziky

Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Kučerová, Ph. D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: Cytokininy, pšenice, *Triticum aestivum*, senescence, fluorescence, fotosyntéza

Počet stran: 73

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Abstrakt:

Senescence je charakteristická postupným zhoršováním funkčních vlastností rostlin, které zahrnuje i snižování obsahu fotosyntetických pigmentů a fotosyntetické aktivity či zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku s tím související oxidativní poškození a ztrátu funkce včetně integrity buněčných membrán. Cytokininy jsou multifunkční fytohormony, které jsou zapojeny v řízení všech životně důležitých funkcí rostlin, a to včetně reakce na biotické a abiotické stresy a senescence. Senescenci lze účinně potlačit exogenní aplikací cytokininů a jejich derivátů. V této práci byl porovnáván vliv cytokininů benzylaminopurinu (BAP), *trans*-zeatinu (tZ), thidiazuronu (TDZ), a jejich derivátů 6-(3-hydroxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurinu (OH) a 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močoviny (MTU) na změny indukované senescencí u primárních listů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Registana) inkubovaných ve tmě po dobu šesti dnů, a to včetně změn týkajících se stability buněčných membrán. Bylo zjištěno, že všechny použité látky byly schopné senescenci oddálit, lišily se ale mírou antisenescenčního účinku. Jako nejúčinnější v oddálení sledovaných změn způsobených senescencí se ukázal být cytokinin TDZ a cytokininový derivát MTU. Obě látky efektivně potlačily pokles obsahu fotosyntetických pigmentů, inhibici funkce PSII (F_v/F_m), produkci reaktivních forem kyslíku a s tím související poškození buněčných membrán.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Elisabeth Hypiúsová

Title of thesis: Cytokinin derivatives and their effect on cell membranes during induced senescence

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Biophysics

Supervisor: Mgr. Zuzana Kučerová, Ph. D.

The year of defence: 2024

Key words: Cytokinins, wheat, *Triticum aestivum*, senescence, fluorescence, photosynthesis

Number of pages: 73

Number of attachments: 0

Language: Czech

Summary:

Senescence is characterized by a gradual deterioration of plant functional properties, which includes a decrease in photosynthetic pigments and photosynthetic activity or an increase in the production of reactive oxygen species and the associated oxidative damage and loss of function and integrity of cell membranes. Cytokinins are multifunctional phytohormones that are involved in the control of all vital plant functions, including responses to biotic and abiotic stresses and senescence. Senescence can be effectively suppressed by exogenous application of cytokinins and their derivatives. In this work, the effect of the cytokinins benzylaminopurine (BAP), trans-zeatin (tZ), thidiazuron (TDZ), and their derivatives 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurine (OH) and 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)urea (MTU) on senescence-induced changes in primary leaves of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Registana) incubated in the dark for six days, including changes related to cell membrane stability. It was found that all the substances used were able to delay senescence but differed in the degree of antisenesescence effect. The cytokinin TDZ and the cytokinin derivative MTU proved to be the most effective in delaying the observed senescence-induced changes. Both substances effectively suppressed the decrease in photosynthetic pigment content, inhibition of PSII function (F_v/F_m), production of reactive oxygen species and associated damage to cell membranes.

Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abcisová
ACN	antokyany
ALA	kyselina δ -aminolevulová
APH	histidin fosfotransferáza
Asp	aspartát, aspartátový
BAP	N ⁶ -benzylaminopurin
CCG	geny účastníci se degradace chlorofylu
CK	Cytokinin, cytokininový
CKX	cytokinin oxidázy/dehydrogenázy
DMSO	dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
dpo	den po oddělení
ER	endoplazmatické retikulum
F ₀	minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _m	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F' _m	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na světlo
F _t	fluorescence v čase t při aktinickém světle
F _v /F _m	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
$\Phi_{f,D}$	kvantový výtěžek konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení
Φ_{NPQ}	kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení
Φ_P	aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII vzorků adaptovaných na světlo
GA	gibereliny
GLU	β -glukosidázy
GluTR	glutamyl-tRNA reduktázy
GPC	obsah proteinů v zrně
GSA-AT	glutamyl-tRNA syntetázy
His	histidin, histidinový
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> , vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPT	isopentenyl transferázy
JA	kyselina jasmonová

LOG	LONELY GUY cytokinin nukleosid 5'-monofosfát fosforibohydrolázy
MDA	malondialdehyd
MeO	3-methoxy-6-benzylaminopurin-9-arabinosid
mT	<i>meta</i> -tropolin
MTU	1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thidiazol-5yl)močovina
NCC	nefluorescentní chlorofylové katabolity
OH	6-(3-hydroxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurin
PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> , fotosynteticky aktivní záření
PCD	programovaná buněčná smrt
pFCC	fluorescentní chlorofylový katabolit
POR	protochlorofylidu
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
RCC	červený chlorofylový katabolit
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
RubisCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa
SA	kyselina salicylová
SL	strigolaktony
TDZ	thidiazuron, N-fenyl-N'-(1,2,3-thidiazol-5-yl)močovina
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
ZOG	zeatin <i>O</i> -glukosyltransferázy

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	3
3 Přehled problematiky.....	4
3.1 Senescence.....	4
3.1.1 Listová senescence.....	4
3.1.1.1 Degradace chlorofylu.....	5
3.1.1.2 Integrita buněk a buněčné membrány.....	6
3.1.2 Regulátory listové senescence.....	7
3.1.2.1 Vnitřní faktory.....	8
3.1.2.2 Enviromentální faktory.....	9
3.1.2.3 Rostlinné hormony.....	10
3.2 Cytokininy.....	12
3.2.1 Struktura a biologická aktivita cytokininů.....	12
3.2.2 Biosyntéza a metabolismus cytokininů.....	13
3.2.3 Cytokininový signaling.....	14
3.2.4 Vliv cytokininů na chloroplasty a chlorofyl.....	15
3.2.5 Cytokininy a fotosyntéza.....	17
3.2.6 Interakce cytokininů a jiných signálů.....	20
3.2.6.1 Cytokininy a auxiny.....	20
3.2.6.2 Cytokininy a etylén.....	21
3.2.6.3 Cytokininy a další fytohormony.....	22
3.2.6.4 Cytokininy a další environmentální vlivy.....	22
3.2.6.5 Cytokininy a vliv patogenů.....	23
3.2.7 Cytokininy v zemědělství.....	23
3.2.7.1 Deriváty cytokininů a další látky s podobným účinkem..	24
4 Materiál a metody.....	27
4.1 Rostlinný materiál.....	27
4.2 Použité metody.....	28
4.2.1 Stanovení obsahu pigmentů.....	28
4.2.2 Chlorofylová fluorescence.....	28
4.2.3 Ion leakage.....	29

4.2.4 Konfokální mikroskopie.....	30
4.2.5 Stanovení obsahu MDA.....	31
4.3 Grafické zpracování dat.....	31
4.4 Statistické zpracování dat.....	32
5 Výsledky a diskuse.....	33
5.1 Obsah fotosyntetických pigmentů.....	33
5.2 Funkce PSII.....	36
5.3 Konfokální mikroskopie.....	45
5.4 Ion leakage.....	47
5.5 Stanovení obsahu MDA.....	49
6 Závěr.....	52
7 Seznam použité literatury.....	53

1 Úvod

Země je dynamická planeta, která se skládá z jednotlivých zemských sfér. Na povrchu Země se vyskytuje hydrosféra v podobě souvislého oceánu kapalné vody, který zabírá přibližně 71 % zemského povrchu. Na velmi úzkém pásu rozhraní mezi litosférou a atmosférou, která je převážně tvořena dusíkem a kyslíkem, což jsou plyny vytvářející směs obvykle nazývanou jako vzduch, se nachází biosféra, jejíž činností došlo k přeměně části litosféry na půdní obal Země, tzv. pedosféru neboli živý obal Země, který je tvořen živými organismy. Zemská biosféra je rozdělena do množství biomů, osídlených vždy typickými organismy, např. flórou a faunou. Před asi 1,8 - 1,3 miliardami lety vznikla eukaryota, do nichž řadíme i dnešní mnohobuněčné skupiny, jako jsou rostliny nebo živočichové.

Rostliny, podobně jako všechny živé organismy, po dosažení dospělosti stárnou. Díky svému přisedlému způsobu života musí dobře hospodařit se živinami, stavební složky nevykonných, a tudíž nepotřebných orgánů recyklují. Recyklace probíhá v závěrečné fázi vývoje – senescenci, která je geneticky programovaná a dochází při ní k řízené degradaci a přesunu živin z odbourávaných makromolekul starého orgánu, zejména listu, do nových orgánů, ať už mladých listů, květů, semen nebo zásobních orgánů.

Senescence je řízena mnoha faktory, jsou to např. růstové hormony, zejména cytokininy (CK), dále vnější stresové podmínky, které ji mohou vyvolávat nezávisle na stáří rostliny. Na její iniciaci se mohou také podílet reaktivní formy kyslíku (ROS), které vznikají během metabolických procesů a jejichž koncentrace v buňce narůstá s věkem rostlinného organismu či právě působením stresových faktorů.

CK jsou rostlinné hormony, tzv. fytohormony, které mimo jiné podporují dělení rostlinných buněk zvané cytokineze, a tím u rostlin hrají důležitou roli v mnoha vývojových procesech. Nezbytné jsou pro podporu aktivního růstu a diferenciaci rostlinných buněk. Účastní se klíčení semen, vývoje kořene a prýtu (zejména vodivých pletiv), řídí senescenci listů, velikost semen a odpověď na změny vnějšího prostředí nebo také stres. Jejich funkce je často spojena s funkcí ostatních fytohormonů, zejména auxinu nebo ethyleny. Zatímco např. ethylen je považován za promotor senescence, CK ji mohou za určitých podmínek oddálit. Působením CK v rámci senescence je možné např. zpomalit pokles obsahu chlorofylu. Naproti tomu působení CK v kombinaci s vysokou ozářeností či ve vysokých koncentracích může senescenci urychlit.

Tato diplomová práce se zabývá srovnáním vlivu CK 6-benzylaminopurinu (BAP), trans-zeatinu (tZ), thidiazuronu (TDZ) a cytokininových derivátů 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurin (OH a 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl) močovina (MTU) na senescenci u listových segmentů primárních listů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Registana). Rozdíly v průběhu senescence byly sledovány na základě obsahu chlorofylu *a+b*, parametrů chlorofylové fluorescence, celistvosti membrán za pomoci metody *ion leakage*, vizualizace chloroplastů a celkového obsahu ROS za pomoci konfokálního mikroskopu a obsahu malondialdehydu (MDA).

2 Cíle práce

- Vypracovat přehled problematiky vlivu cytokininů (CK) na senescenci zaměřený na srovnání vlivu různých typů CK a jejich derivátů se zaměřením na posouzení vlivu CK na buněčné membrány během indukované senescence.
- Zvládnout metodiku pěstování a navození indukované senescence listů modelových rostlin pšenice.
- Zvládnout metodiku stanovení obsahu chlorofylů analyticky a pomocí chlorofylmetru SPAD a také metodiku měření chlorofylové fluorescenční indukce pomocí přístroje FluorCam včetně analýzy dat, vyhodnocování parametrů a zpracování obrázků. Stanovit míru poškození buněčných membrán, konkrétně metodou *ion leakage* a stanovením obsahu lipidových aldehydů (konkrétně malondialdehydu (MDA)). Provést měření obsahu chlorofylu a chlorofylové fluorescenční indukce u oddělených listů pšenice během indukované senescence pod vlivem různých CK derivátů.
- Zpracovat výsledky experimentů a zhodnotit vliv CK derivátů na buněčné membrány během indukované senescence.

3 Přehled problematiky

3.1 Senescence

Programovaná buněčná smrt (PCD) má fyziologickou funkci a je nevyhnutelná pro normální fungování rostliny. PCD a senescence jsou častokrát zaměňované nebo je senescence považována za část PCD, protože jejich procesy se mohou prolínat. Senescence nemusí být nevyhnutelně stádiem PCD, protože ji lze oddálit nebo dokonce odvrátit. Za určitých okolností může ale představovat preliminární stádium PCD (Duca et al., 2014).

Senescence je komplexní přísně regulovaný buněčný stav, při kterém dochází k zastavení dělení, degeneraci a následnému rozkladu buněk (Noodén, 1988b). U rostlin rozeznáváme dva typy senescence, a sice mitotickou a post-mitotickou. U každé buňky probíhá několik mitotických dělení produkujících dceřiné buňky. Když se dělení buněk zastaví, jde o mitotickou senescenci. Příkladem tohoto typu senescence je zastavení dělení nediferenciálních buněk v apikálním meristému, ze kterých se pak formují orgány. Post-mitotická senescence je senescence orgánů, květů a listů, které už jsou diferencované a nedochází u nich k dělení (Gan, 2003).

3.1.1 Listová senescence

Listová senescence je považována za poslední stádium vývoje listu (Lim et al., 2007). Probíhá na úrovni orgánu. Jde o přirozený fyziologický proces, při kterém jsou rozložené biomolekuly (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny) ze senescentních listů transportovány do rostoucích a zásobních orgánů rostliny (Gregersen et al., 2008). Během senescence dochází ke změnám v buněčné struktuře, v metabolismu i v expresi genů (Lim et al., 2007). Tento proces je ovlivněn věkem a vývojovým stádiem rostliny, ale také vnitřními signály nebo vnějšími faktory (Miao et al., 2004).

V důsledku různých faktorů se může měnit doba nástupu senescence, její intenzita i míra progresu. Její postup se dá rozdělit do tří fází, iniciace, reorganizace a terminace. Iniciace senescence je výsledkem interakce vnějších (též environmentálních) a vnitřních signálů na úrovni buňky nebo orgánu. Senescence může být spuštěna vystavením biotickému nebo abiotickému stresu, jako je např. sucho, extrémní teploty, stín, patogeneze (Lim et al., 2007). Senescence je iniciována koordinovanou sítí signálů zprostředkovanou hormony, cukry, reaktivními formami kyslíku a vápníkem. Na molekulární úrovni

(genové, transkripční, post-transkripční, post-translační) se iniciace rovněž účastní obrovské množství genů, které aktivují sekvenci událostí směřujících k senescenci (Breeze et al., 2011; Li et al., 2020). Ve fázi reorganizace dochází k degradaci makromolekul a mobilizaci získaných živin. Degradace proteinů je zprostředkována nukleárními a plastidovými proteázami, které rozkládají makromolekuly na produkty vhodné k transportu (Diaz-Mendoza et al., 2016). Vlivem rostoucího obsahu reaktivních forem kyslíku (ROS) se zvyšuje množství antioxidantů. Příkladem mohou být antokyany (ACN), což jsou pigmenty s antioxidační aktivitou. Fungují jako *scavengers* ROS a jejich obsah je zvyšován zejména při stresu vysokým světlem, ale také při jiných stresech, ať už biotických či abiotických (Diaz-Mendoza et al., 2016). V terminální fázi senescence se rozpadají vakuoly, ze kterých se uvolňují proteázy do cytoplazmy, která se smršťuje. Vlivem rozpadajících se vakuol dochází k okyselení cytoplazmy. Následně dochází k degradaci samotné cytoplazmy, fragmentaci DNA a následnému rozkladu membrán, čímž se nevratně poškozuje buněčná integrita (Li et al., 2020).

3.1.1.1 Degradace chlorofylu

Probíhající strukturní změny doprovázející degradaci makromolekul v buňce jsou vysoce organizované. První rozloženou částí buňky jsou chloroplasty. Chloroplasty obsahují asi 70 % všech proteinů zelených listů. Proto je jejich rozklad potřebný pro získání a transport dusíku a uhlíku (Mayta et al., 2019). Protože volný chlorofyl a jeho katabolity mohou způsobit zaplavení buňky ROS, které je následované předčasnou buněčnou smrtí, je organizovaná degradace chlorofylu a chlorofyl-asociovaných proteinů nezbytná pro hladký průběh senescence jako takové (Mur et al., 2010). Degradace chlorofylu je příčinou žloutnutí listů (Lim et al., 2007).

Molekula chlorofylu je tvořena čtyřmi pyrrolovými kruhy, v jejichž středu je atom hořčíku. U suchozemských rostlin jsou pro fotosyntézu známy dva typy chlorofylu, a to chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Chlorofyl *b* má ve své molekule na pozici C7 formylovou skupinu místo metylové skupiny u chlorofylu *a* (Chen, 2014). K počátečnímu katabolismu chlorofylu dochází v chloroplastu, kde je chlorofyl *b* konvertován chlorofyl *b* reduktázami na 7-hydroxymetyl chlorofyl *a* (Horie et al., 2009). Ten je následně redukován pomocí chlorofyl-*a*-reduktázy na chlorofyl *a*. Degradace chlorofylu *a* je podmíněná odstraněním centrální molekuly hořčíku za vzniku feofytinu *a*, který je následně hydrolyzován na feoforbid. Otevřením pyrrolického kruhu prostřednictvím oxygenázy pak vzniká červený chlorofylový katabolit (RCC, *red chlorophyll catabolite*).

Ten je redukován na primární fluorescentní chlorofylový katabolit (pFCC, *primary fluorescent chlorophyll catabolite*) a případně hydroxylován na hydroxy-pFCC. Tyto katabolity jsou vypuštěny do cytosolu, kde mohou podléhat dalším modifikacím. Následně jsou transportovány do vakuoly. Ve vakuole s nízkým pH jsou pak různě modifikované FCC proměněny na nefluorescentní chlorofylové katabolity (NCC). Ty působí jako antioxidanty, které udržují integritu senescentních buněk (Müller et al., 2007).

3.1.1.2 Integrita buněk a buněčné membrány

Protože buňky potřebují pro postup listové senescence zůstat funkční, rozklad intracelulárních organel probíhá postupně, přičemž jádro jako místo exprese genů a mitochondrie pro produkci energie se rozkládají v posledních stádiích senescence. Jako první prochází strukturními změnami chloroplast. Dochází k degradaci a proteolýze proteinů chloroplastu, jako například ribulóza-1,5-bifosfát-karboxylázy, na aminokyseliny (Breeze et al., 2011).

Nejrůznější studie u rozdílných druhů rostlin ukazují, že jedny z genů *up-regulovaných* v průběhu senescence jsou proteázy účastníci se degradace proteinů. V rostlinných genomech bylo identifikováno více než 800 různých proteáz, ze kterých jsou se senescencí nejčastěji asociované serin a cystein proteázy (Li et al., 2020). Martínez et al. (2007) ve své publikaci uvádí, že z důvodu inhibice proteázové aktivity, post-translačních modifikací proteáz nebo účasti proteáz u jiných vývojových procesů zatím nejsou zcela známy všechny proteázy účastníci se rozkladu proteinů, organel a buněk u senescentních listů.

Kvůli fotosyntetickému aparátu, který pro svou funkci vyžaduje přítomnost kyslíku, jsou chloroplasty významným zdrojem ROS. Pro správnou funkci fotosyntézy se v chloroplastech nachází komplexní redoxní síť a pro ochranu integrity chloroplastů zároveň rozsáhlý antioxidační systém. Ve studii z roku 2006 (Austin et al., 2006) bylo demonstrováno, že antioxidační a redoxní systémy jsou propojené a mohou regulovat stabilitu chloroplastů jako odpověď na vnější signál. Při degradaci chloroplastů byl pozorován úbytek membránového systému thylakoidů, kde probíhá fotosyntéza, uvolnění sloupců gran, zvětšení intra-thylakoidního prostoru, a následně vznik lipidových plastoglobulí, které obsahují zbytky fotosyntetických molekul. Ke stejným poznatkům došel i Thomas et al. (2003). Katabolity chloroplastů jsou následně transportovány ATP-dependentním systémem do vakuol (Prins et al., 2008).

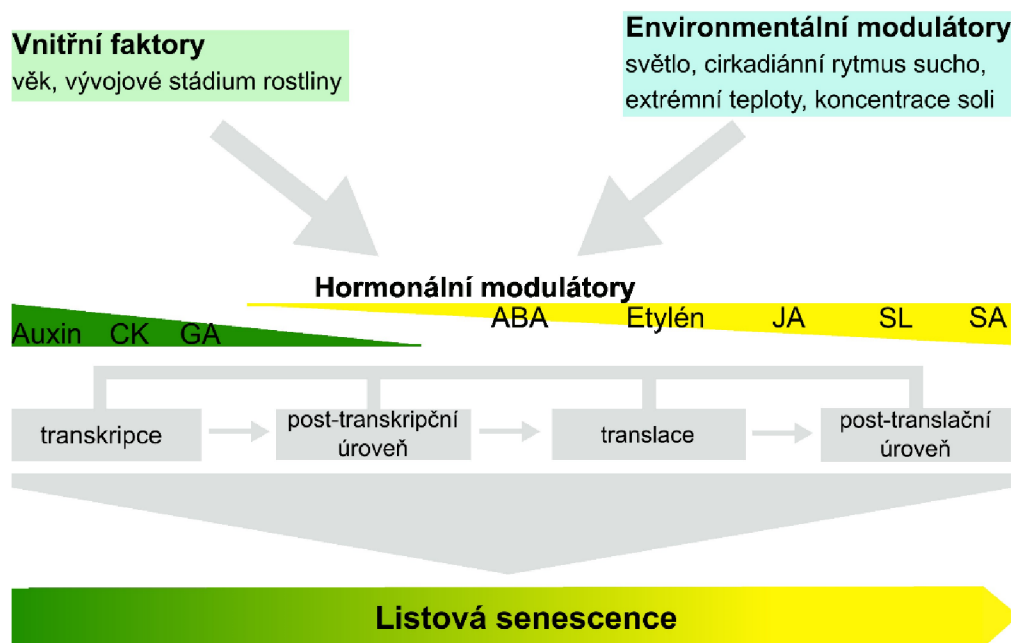
Katabolismus lipidů je dalším projevem buněčné senescence. Rozklad začíná lipolytickou reakcí, kterou se z membránových lipidů uvolní mastné kyseliny, které jsou satureovány pomocí acyl-CoA a následně transportovány do peroxisomu. Zde probíhá β -oxidace, které se účastní ROS jakožto meziprodukty, čímž jsou mastné kyseliny degradovány (Gerhardt, 1992). Z toho důvodu je během listové senescence pozorováno i snížení obsahu mastných kyselin až o 80 % suché váhy (Yang a Ohlrogge, 2009). Celý proces je spojen se ztrátou funkce všech biologických membrán a změnami v uspořádání lipidové dvojvrstvy membrán, čímž dochází ke zvýšení propustnosti membrán, ztrátě iontových gradientů a snížené funkci důležitých membránových proteinů, jako např. iontových pump (Brown et al., 1991).

3.1.2 Regulátory listové senescence

Listová senescence je regulována prostřednictvím signálních drah ovlivněných vnitřními přirozenými faktory (věkem a vývojovým stádiem rostliny), environmentálními vlivy, ale i koncentrací hormonů.

Signální dráhy jsou regulovány molekulárně na transkripční, post-transkripční, translační i post-translační úrovni. Ve studiích, kterými se zabýval Chen et al. (2017); Gao et al. (2016) a Qiu et al. (2015) byly identifikovány *downstream* transkripční faktory signálních cest etylénu, kyseliny abscisové, kyseliny jasmonové a světla, které působí jako regulátory nástupu listové senescence. Tyto transkripční faktory přímo indukují expresi genů účastnících se degradace chlorofylu (CCG, *chlorophyll catabolite genes*). Zkoumáním těchto poznatků bylo objeveno na 6500 genů zapojených do signálních drah spojených se senescencí u *Arabidopsis thaliana* L. (Breeze et al., 2011). U *Triticum aestivum* L. byly pozorovány tisíce genů asociovaných se senescencí, ale i tak není stále zcela známa celá regulační síť genů zapojených do regulace senescence (Sultana et al., 2021).

Různé faktory ovlivňují rychlost nástupu a progresu listové senescence prostřednictvím různých signálních molekul. Jsou faktory (Obr. 1), které indukují či urychlují listovou senescenci a takové, které senescenci oddalují (Gan, 2003; Guo et al., 2021). V této diplomové práci se zaměříme na vybrané důležité faktory ovlivňující listovou senescenci, ale důraz bude kladen na fytohormony, specificky na cytokininy (CK).



Obr. 1: Regulace listové senescence. CK – cytokininy, GA – kyselina gibberelová, ABA – kyselina abscisová, JA – kyselina jasmonová, SL – strigolaktony, SA – kyselina salicylová (vytvořeno podle Guo et al., 2021 a Zhang et al., 2021).

3.1.2.1 Vnitřní faktory

V optimálních podmínkách je listová senescence řízená výhradně stářím listu. Noodén a Penney (2001) ve svém výzkumu *Arabidopsis thaliana* L. porovnávali životnost listů rostlin standardního genotypu, rostlin s prodlouženým reprodukčním růstem (pozdní kvetení) a rostlin s narušeným reprodukčním růstem (sterilní). Zjistili, že nástup senescence u jednotlivých listů byl identický u všech variant rostlin. Po dosáhnutí plné expanze listu se míra fotosyntetické kapacity časem začíná snižovat (Batt a Woolhouse, 1975; Hensel et al., 1993) a když klesne pod určitou úroveň, je indukována listová senescence (Lim et al., 2007).

Se stárnutím a listovou senescencí je úzce spojen také cirkadiánní rytmus. Ve studii z roku 2016 (Kim et al.) bylo dokázáno, že cirkadiánní rytmus je u mladších listů kratší (přibližně 22,6 hod.) než u starších listů (asi 24 hod.) pocházejících ze stejné rostliny *Arabidopsis thaliana* L. V posledních letech bylo popsáno několik genů (např. *TOC1*, *ELF3*, *LUX*, *PRR9*) esenciálních pro řízení cirkadiánního rytmu a stárnutí, které se přímo nebo nepřímo zapojují do regulace signálních drah listové senescence (Kim et al., 2016; Kim et al., 2018; Woo et al., 2019). Doposud ovšem není známo, jestli jsou změny v cirkadiánním rytmu příčinou nebo následkem senescence (Guo et al., 2021).

Dalšími vnitřními faktory zapojenými do iniciace a regulace senescence jsou ROS, které byly původně považovány pouze za toxické meziprodukty metabolismu u rostlin.

V současnosti je ale již známá jejich funkce v signální transdukci u různých procesů rostlin, včetně listové senescence (Gepstein a Glick, 2013). Signalizace pomocí ROS je dynamický děj umožněný v důsledku jejich rychlé tvorby a rozpadu v buňkách. ROS signalizace u listové senescence probíhá v interakci se signálními dráhami fytohormonů i environmentálních faktorů (Mittler et al., 2011).

3.1.2.2 Enviromentální faktory

Listová senescence není regulována jen vnitřními faktory, ale může být ovlivněna i množstvím environmentálních faktorů, kdy každý stresový faktor může indukovat nebo podpořit listovou nebo celkovou senescenci rostliny. Environmentální stresové faktory ovlivňující senescenci zahrnují například množství světla, teplotu, dostupnost vody, UV záření, koncentrace sacharidů v živném médiu, obsah solí či výskyt patogenů (Lim et al., 2007; Sultana et al., 2021). Obecně platí, že vliv stresu na rostlinu závisí na délce jeho trvání či intenzitě jeho působení.

Kritickou úlohu v regulaci listové senescence, ale i v růstu rostliny jako takové, sehraává světlo. Zkrácení fotoperiody zpravidla vede k podpoření senescence spojené s degradací chlorofylu, snížením fotosyntetické aktivity, zvýšením oxidativního stresu a s peroxidací lipidů (Janečková et al., 2018). Změny intenzity světla, kvalita osvětlení, ale i barevné spektrum osvětlení ovlivňuje listovou senescenci. Causin et al. (2006) ve své studii poukazuje na indukci listové senescence u pšenice seté při nedostatku světla. Na druhou stranu ale také došel k závěru, že modré světlo může nástup listové senescence u zastíněných listů oddálit.

Dalším důležitým environmentálním faktorem ovlivňujícím přežití, růst i listovou senescenci rostliny je dostupnost vody. Dlouhodobé mírné působení sucha může být kompenzováno regulačními a opravnými mechanismy rostliny, případně aklimatizací na změnu prostředí. Působení sucha ve vyšší intenzitě má ale za následek urychlení listové senescence (Munné-Bosch a Alegre, 2004).

Změny v teplotách, zejména na podzim, mají velký vliv na urychlení nebo oddálení listové senescence. Experimentálním zvyšováním a snižováním teploty bylo dokázáno, že zvýšení teploty významně oddaluje listovou senescenci, kdežto snížení teploty listovou senescenci naopak urychluje. Nesmíme ale opomenout, že veškeré účinky úzce souvisí s druhem zkoumané rostliny (Fu et al., 2018). U listů pšenice bylo pozorováno při snižování teploty také snížení fotosyntetické aktivity spojené s poškozením fotosyntetického aparátu (Xu et al., 1995).

Jedním z dalších faktorů ovlivňující růst a vývoj rostlin je zvýšená koncentrace soli v půdě, která může urychlovat indukci listové senescence. Negativní vliv na rostliny má taktéž nadměrná koncentrace a akumulace ROS, při níž dochází ke vzniku oxidativního stresu. Následně dochází ke spuštění signální dráhy pro odstranění ROS a listovou senescenci (Yang a Guo, 2018).

3.1.2.3 Rostlinné hormony

Fytohormony u listové senescence zprostředkovávají nebo ovlivňují různé vnitřní a environmentální signály prostřednictvím komplexních signálních drah. Fytohormony jsou zapojeny do řízení všech stádií senescence. Jejich vliv na oddálení nebo urychlení listové senescence se může lišit.

Kyselina salicylová (SA, z anglického *salicylic acid*) je fenolová signální molekula, která hraje úlohu v odpovědi na různý stres, a to hlavně v odpovědi na patogenezí (Gan, 2003; Lim et al., 2007). Během senescence se SA v listech hromadí, v případě *Arabidopsis thaliana* L. je její koncentrace v senescentních listech až čtyřikrát vyšší. Zvýšená koncentrace SA způsobuje *up-regulaci* genů asociovaných se senescencí. Z tohoto důvodu také exogenně aplikovaná SA urychluje listovou senescenci (Gan, 2003; Morris et al., 2000).

Strigolaktony (SL) se účastní různých fyziologických procesů rostlin, jako je např. stimulace klíčení semen, vývoj kořenů či větvení výhonků, ale mají také vliv na listovou senescenci. Experimenty na rostlinách necitlivých k přítomnosti SL odhalily u těchto rostlin oddálení listové senescence oproti rostlinám standardního genotypu, což ukazuje urychlení listové senescence vlivem SL. Rovněž byl pozorován dramatický nástup listové senescence po aplikaci SL v přítomnosti etylénu, což naznačuje synergistické působení těchto dvou fytohormonů v listové senescenci (Ueda a Kusaba, 2015).

Plynný fytohormon etylén neovlivňuje listovou senescenci pouze v synergii se SL. Experimentálním potlačením biosyntézy etylénu bylo pozorováno oddálení listové senescence u rajčat. Jiné studie ukázaly, že exogenní aplikací etylénu dochází k urychlení senescence, a naopak inhibitory etylénu listovou senescenci oddalují. Na druhou stranu, zvýšené koncentrace etylénu v brzkém růstovém stádiu rostliny nepodporují nástup listové senescence. Z toho vyplývá, že etylénem indukovaná senescence je závislá na stáří rostliny (Guo et al., 2021).

Kyselina jasmonová (JA) je lipidový fytohormon hrající úlohu ve vývoji rostlin. Studie, kterou se zabýval Zhao et al. (2020) demonstrovala, že přídavek fyziologické koncentrace

JA způsobil u *Arabidopsis thaliana* L. předčasnou senescenci, ale u mutantních rostlin s narušenou signální dráhou JA k předčasné senescenci nedošlo. To poukazuje na důležitost signální dráhy JA pro urychlení listové senescence. V této nedávne studii byl pozorován rychlejší nástup listové senescence u listů pšenice prostřednictvím podpoření biosyntézy JA interakcí transkripčních faktorů *LOX3* a *WRKY42-B*. Obecně se transkripční faktory jakožto proteiny spolupodílejí na iniciaci transkripce (přepis dědičné informace z DNA do RNA).

Kromě listové senescence se kyselina abscisová (ABA) účastní regulace vývojových procesů rostliny, růstu výhonků a kořenů, a odpovědi na biotický i abiotický stres (Lee a Luan, 2012). ABA podporuje rozpad a inhibuje syntézu chlorofylu, a urychluje listovou senescenci (Noodén, 1988a; Weaver et al., 1998). V prostředí s vysokým obsahem soli, v suchu a extrémních teplotách, ale i v případě přirozené senescence se v listech zvyšuje koncentrace ABA, která spouští expresi genů asociovaných se senescencí. ABA je tedy důležitým faktorem regulace listové senescence, která spojuje environmentální signály a vývojové stádium rostliny (Guo et al., 2021).

Gibereliny (GA) jsou rostlinné hormony hrající roli v růstu a vývoji rostlin. V průběhu listové senescence se jejich obsah v listu snižuje. Ve studii od Chen et al. (2014) bylo demonstrováno, že zatímco přidání exogenních GA oddaluje listovou senescenci, aplikace inhibitorů GA senescenci urychluje.

Auxiny ovlivňují morfogenezi rostlin a růst buněk. Exogenní aplikace auxinů inhibuje expresi genů spojených se senescencí. V pokročilejších vývojových stádiích rostlin se biosyntéza endogenních auxinů zvyšuje. Tím je zpomalen postup listové senescence, jehož účelem může být zabezpečení dostatečně dlouhé doby pro recyklaci nutrientů před usmrcením buňky (Guo et al., 2021).

CK jsou fytohormony esenciální pro růst a vývoj rostlin (Perilli et al., 2010). Rovněž sehrávají úlohu v odpovědi na stres (Ha et al., 2012). V průběhu listové senescence se koncentrace CK časem snižuje a je známo, že CK listovou senescenci oddalují např. udržením obsahu chlorofylu (Richmond a Lang, 1957).

Regulace listové senescence, interakce fytohormonů s environmentálními faktory a s jinými hormony je komplexní síť molekulárních mechanismů, signálních drah, biochemických i biofyzikálních změn. Proto bude práce nadále zaměřena pouze na CK, jejich interakce a vliv na listovou senescenci (Perilli et al., 2010).

3.2 Cytokininy

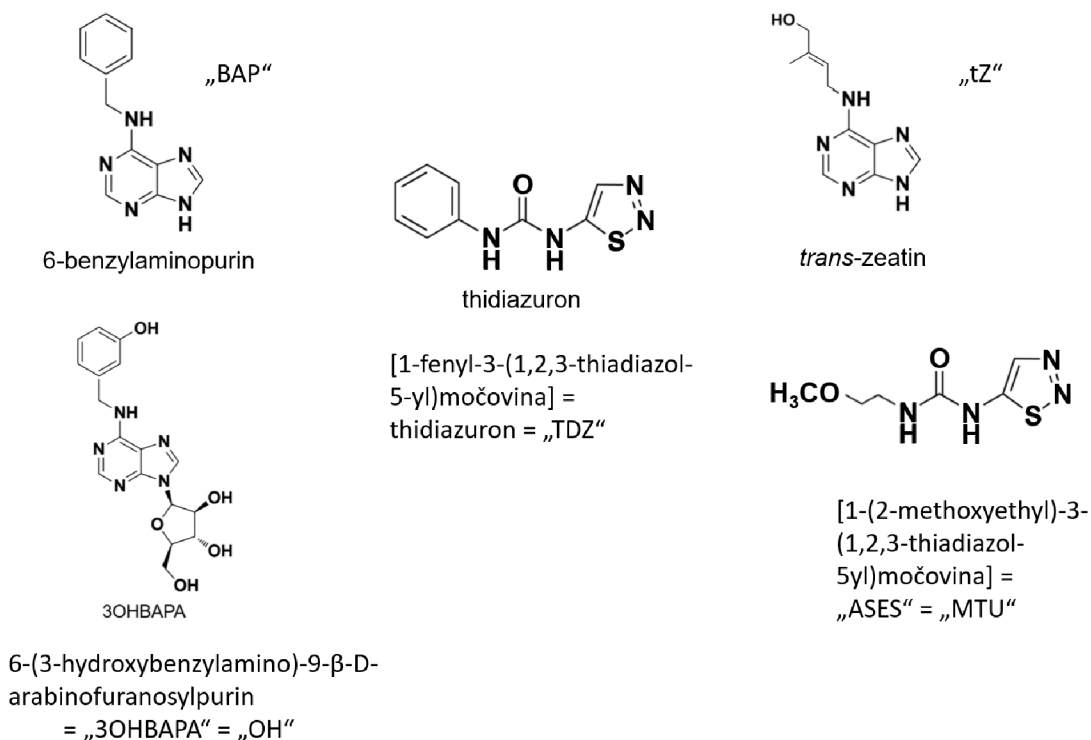
Již před více než 100 lety byly objeveny látky, které jsou schopny indukovat cytokinezi v rostlinných pletivech. Proto byly tyto substance pojmenovány CK. V roce 1955 byla ze sledího spermatu izolována aktivní látka, kinetin, která působila jako aktivátor buněčné proliferace u tabáku (Stetler a Laetsch, 1965). Během studie z roku 1973 (Letham) byl identifikován první přirozeně se vyskytující rostlinný CK, zeatin, který je predominantním CK v kokosovém mléku.

Mimo cytokineze se CK účastní různých vývojových procesů rostliny, jako např. formování orgánů, regulace aktivity meristému kořenů a výhonků, větvení výhonků a kořenů nebo regulace apikální dominance, ale i listové senescence. Na listovou senescenci působí negativně. Také jsou schopny podpořit zachování chlorofylu a chloroplastů, a zmírnit oxidaci lipidů (Liu et al., 2016; Vylíčilová et al., 2016).

3.2.1 Struktura a biologická aktivita cytokininů

CK jsou třídou fytohormonů s nízkou molekulární hmotností. Přirozené CK jsou deriváty adeninu s různými substitucemi v N⁶ pozici adeninového kruhu. Dle toho, zda mají na N⁶ pozici isoprenoidní nebo aromatický řetězec, je dělíme na isoprenoidní a aromatické CK. Isoprenoidní i aromatické CK jsou přirozeně se vyskytující fytohormony. Mezi běžně se vyskytující isoprenoidní CK patří 6-(2-isopentenyl) adenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*) a dihydrozeatin. Aromatické CK jsou více specifické pro některé druhy rostlin. Mezi přirozeně se vyskytující aromatické CK můžeme zařadit *ortho*-topolin, *meta*-topolin (a jeho *methoxy* deriváty) a 6-benzylaminopurin. (Kieber a Schaller, 2014). Bylo pozorováno, že různé CK mají odlišnou aktivitu. Bioaktivní funkce je přitom vázána více na volné báze (aktivní formy) např. iP a *tZ*, oproti jejich ribosidům nebo ribotidům (Hai et al., 2020). *tZ* a iP jsou považovány za biologicky aktivnější než *cZ*. *tZ* je aktivní u všech vyšších rostlin, kdežto *cZ* je sice přítomný u všech rostlin, ale aktivní je jen u některých rostlinných druhů (např. Sakakibara, 2006). I u rostlin *Arabidopsis thaliana* L. je aktivita *cZ* limitovaná. Nedávná studie u kukuřice ovšem ukazuje na indukci různých procesů pomocí *tZ* a *cZ* v podmínkách s vysokým obsahem dusičnanů. V těchto podmínkách se *cZ* účastní kontroly přechodu mezi vývojovými stádii listů, kdežto *tZ* kontroluje změny v rychlosti expanze vyvolané vysokým obsahem dusičnanů (Lacuesta et al., 2018). To poukazuje na další potenciálně neznámé funkce *cZ*.

Rozdílná aktivita jednotlivých CK v různých aspektech rostlinného vývoje může být vysvětlena jejich různou afinitou k CK receptorům (Yonekura-Sakakibara et al., 2004). Pro měření realizovaná v této práci byly využity CK a jejich deriváty. Konkrétně se jednalo o: CK 6-benzylaminopurin (BAP), *trans*-zeatin (tZ), thidiazuron (TDZ) a CK deriváty 6-(3-hydroxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurin (OH) a [1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močovina] (MTU). Struktury výše zmiňovaných látek je vyobrazena na Obr. 2.



Obr. 2: Struktura cytokininů a jejich derivátů (6-benzylaminopurin (BAP); *trans*-zeatin (tZ); thidiazuron (TDZ); 6-(3-hydroxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurin (OH; 3OHBAPA); [1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močovina] (MTU; ASES)).

3.2.2 Biosyntéza a metabolismus cytokininů

V metabolismu CK je zapojena celá řada enzymů. Isopentenyl transferázy (IPT) zabezpečují biosyntézu, LONELY GUY CK nukleosid 5'-monofosfát fosforibohydrolázy (LOG enzymy) aktivaci, zeatin *O*-glukosyltransferázy (ZOG) reverzibilní inaktivaci, β-glukosidázy (GLU) reaktivaci a cytokinin oxidázy/dehydrogenázy (CKX) degradaci CK (Kurakawa et al., 2007; Song et al., 2012).

Biosyntéza CK je několika-krokový proces vyžadující expresi různých genů. Existují dvě potenciální cesty biosyntézy CK, modifikace tRNA isopentenylovým řetězcem a *de novo* syntéza (Shoab et al., 2019). Primárním zdrojem CK je ovšem *de novo* biosyntéza (Takei et al., 2001). První krok *de novo* syntézy CK je zprostředkován IPT

(Sakakibara, 2006; Taya et al., 1978). Substráty pro dráhu syntézy CK byly poprvé identifikovány u plísně *Dictyostelium discoideum*. Později bylo přijato, že podobně probíhá syntéza i u vyšších rostlin. N-prenylací N⁶ pozice AMP, ADP nebo ATP s DMAPP pomocí IPT vzniká primární produkt isopentenyladenin-ribosid-5'-monofosfát/difosfát/trifosfát. Ten je následně konvertován na CK postupnou hydroxylací bočního řetězce cytochrom P450 monooxygenázou kódovanou *CYP735A1* a *CYP735A2* (Kieber a Schaller, 2014). CK ribotidy, neaktivní formy CK, jsou konvertovány na aktivní otevřené formy prostřednictvím LOG enzymů (Kurakawa et al., 2007).

Množství a variabilita IPT genů odpovědných za produkci IPT proteinů se u různých rostlin liší. U rostlin *Arabidopsis thaliana* L. je známo 9 genů (*AtIPT1* až *AtIPT9*) pro IPT, kdy *AtIPT1*, *AtIPT3* a *AtIPT4* až *AtIPT8* kódují ATP/ADP IPT, zatímco *AtIPT2* a *AtIPT9* kódují tRNA IPT. (Ha et al., 2012). U kukuřice bylo identifikováno 11 genů, přičemž tRNA-IPT geny *ZmIPT1* a *ZmIPT10* byly exprimovány ve všech orgánech. Expres ostatních byla místně nebo časově specifická (Vyroubalová et al., 2009). U pšenice bylo popsáno 6 různých IPT genů (*TaIPT1* až *TaIPT6*), ze kterých tři jsou exprimovány v reprodukčním stádiu rostliny (Song et al., 2012).

Aktivní forma CK může být deaktivována O-glykosylací prostřednictvím ZOG. Opětovná aktivace CK O-glykosidů probíhá deglykosylací pomocí GLU. Protože *de novo* biosyntéza CK je pomalý proces, je pravděpodobné, že reverzibilní inaktivace a následná aktivace CK má významnou roli v kontrole celkového obsahu CK v rostlině. Nicméně i ireverzibilní deaktivace CK má důležitou úlohu v regulaci množství metabolitů CK a jejich distribuci v rostlině (Werner et al., 2006). Degradace CK je zprostředkována CKX, které N-glykosylací nevratně odstraňují nenasycené isoprenylové řetězce z N⁷ a N⁹ pozice purinu. Konjugáty glykosylu jsou neaktivní a nejsou schopny vázat se na CK receptory (Spíchal et al., 2004). Isoprenoidní CK iP a tZ jsou rozkládány pomocí CKX, ale některé aromatické CK jako např. kinetin nebo BAP jsou vůči CKX rezistentní (Zalabák et al., 2014).

3.2.3 Cytokininový signaling

CK receptory jsou hybridní sensorové histidin kinázy, které přijímají signál z okolí ve formě fosforylové skupiny. Jako první nasedají CK na konzervované akceptorové místo receptorů a tím spouštějí celou kaskádu fosforylací. Tím jsou His zbytky akceptorového místa autofosforylovány a fosfátová skupina se přesune na přijímačovou Asp doménu.

Následně je fosforylová skupina odevzdána histidin fosfotransferázám (APH, *authentic histidine phosphotransferases*), které signál přenesou nukleárním regulátorům odpovědi typu-B s aspartátovou doménou. Tyto regulátory spouštějí primární transkripci cílových genů pro odpověď na CK nacházející se v jádru buňky (To a Kieber, 2008). Signální dráha CK spočívá v His-Asp fosforylaci, která připomíná dvousložkový fosforylační systém u bakterií (Schaller et al., 2011; To a Kieber, 2008). Na rozdíl od bakteriálního systému, u signální transdukce CK dochází ke čtyřem za sebou následujících fosforylačních kroků, u kterých se střídají histidinové (His) a aspartátové (Asp) zbytky. Primárně jsou CK receptory umístěny v membráně endoplazmatického retikula (ER), proto se předpokládá, že signální transdukce probíhá v lumenu ER. His kinázové receptory byly detekovány i v cytoplazmatické membráně a jejich účast na signální transdukci CK byla potvrzena studií od Antoniadi et al. (2020).

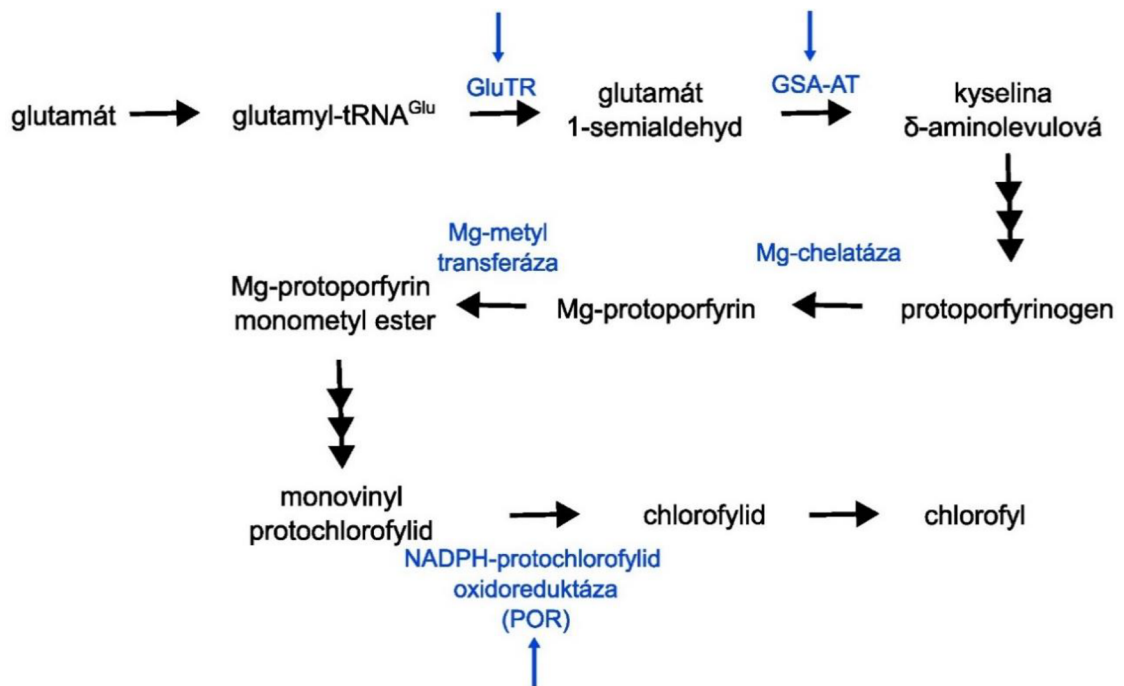
Přenos signálu v dráze odpovědi na přítomnost CK je regulován dvěma typy regulátorů odpovědi. Jak již bylo zmíněno, pozitivní regulace spouštějící transkripci genů je zajištěna regulátory odpovědi typu-B (Mason et al., 2005), které zabezpečují nejen aktivaci transkripce cílových genů, ale regulují i transkripci regulátorů odpovědi typu-A (Hwang a Sheen, 2001). Regulátory odpovědi typu-A negativně regulují signální transdukci CK. Na rozdíl od regulátorů odpovědi typu-B je jejich exprese vázaná na přítomnost CK (Muller a Sheen, 2007). Bylo pozorováno, že mutace regulátorů typu-A indukuje transkripci cílových genů pro odpověď na CK a naopak, jejich nadměrná exprese transkripci snižuje (Lee et al., 2007; To et al., 2004).

3.2.4 Vliv cytokininů na chloroplasty a chlorofyl

Diferenciace chloroplastů z proplastidů byla zjištěna u kinetinem ošetřených rostlin tabáku již v roce 1965 (Vasil a Hildebrandt). Následně mnoho studií potvrdilo zrychlenou diferenciaci u etiolovaných rostlin různých druhů (Cortleven a Schmölling, 2015). U etiolovaných rostlin *Arabidopsis thaliana* L. ošetřených exogenně aplikovanými CK byla na rozdíl od neošetřených rostlin pozorována přítomnost thylakoidních struktur a chybějící prolamelární tělesa (Chory et al., 1994). Pozdější studie konzistentně prokázaly, že CK podporují tvorbu thylakoidních membrán (Cortleven a Schmölling, 2015). Endogenní CK jsou potřebné pro tvorbu chloroplastů se správnou strukturou. Při jejich nedostatku je obsah škrobu nízký a sloupce gran jsou řídké, kdežto při jejich nadbytku dochází k nadměrnému stohování gran a obsah škrobu je vysoký (Werner et al., 2008; Criado et al., 2009).

Richmond a Lang (1957) jako jedni z prvních prokázali, že působení CK vede k větší retenci chlorofylu a bílkovin v oddělených listech *Xanthium pennsylvanicum* L. Tento CK efekt byl od té doby prokázán u mnoha dalších druhů rostlin (Rulcová a Pospíšilová, 2001; Vlčková et al., 2006; Wu et al., 2012; Vyličilová et al., 2016), dokonce bylo pozorováno opětovné zazelenání žloutnoucích listů (Dyer a Osborne, 1971).

Dále bylo v roce 1957 poprvé pozorováno, že ošetření CK vede k retenci obsahu chlorofylu a proteinů u listů *Xanthium pennsylvanicum* (Richmond a Lang, 1957). Tento efekt byl pozorován u mnoha dalších druhů rostlin, a dokonce byl využit i k opětovnému zezelenání už žloutnoucích listů (Dyer a Osborne, 1971). Studie od Sugiura (1963) ukázala, že kinetin je schopen stimulovat biosyntézu chlorofylu v oddělených listech rostliny *Phaseolus vulgaris*. Později byla popsána akumulace chlorofylu i u jiných druhů rostlin po aplikaci CK během proměny etioplastu v chloroplast (Kuroda et al., 2001). Snížené množství chlorofylu bylo pozorováno u rostlin s deficiencí CK a rostlin s nefunkční částí CK signální dráhy, které rostly na světle (Riefler et al., 2006; Werner et al., 2008). Bylo prokázáno, že lag fáze, která nastává při biosyntéze chlorofylu, nenastala po ošetření CK u rostlin okurky. Místo toho se znovu začala produkovat kyselina δ -aminolevulová (ALA), což je počáteční krok biosyntézy chlorofylu (Fletcher et al., 1973). To se děje prostřednictvím stimulace aktivity glutamyl-tRNA reduktázy (GluTR) a glutamyl-tRNA syntetázy (GSA-AT), které se přímo účastní biosyntézy ALA (Masuda et al., 1995). Podobná reakce byla pozorována po aplikaci CK na rostliny ječmene rostoucí ve tmě, kdy se obsah ALA prudce zvýšil po vystavení rostlin světlu se v důsledku zvýšení aktivity enzymů účastnících se syntézy ALA (Yaronskaya et al., 2006). CK mají také vliv na tvorbu protochlorofylid (POR) a zvyšují množství POR na mRNA. Jejich expresí vzniká NADPH-protochlorofylid oxidoreduktáza účastnící se redukce protochlorofylidu na chlorofylid (Banerji a Laloraya, 1967; Kuroda et al., 2001). Biosyntéza chlorofylu a vliv CK na její jednotlivé kroky je vyobrazen na Obr. 3.



Obr. 3: Schéma biosyntézy chlorofylu a účasti cytokininů. Enzymy účastníci se biosyntézy jsou znázorněny modře, kde GluTR je glutamyl-tRNA reduktáza a GSA-AT je glutamyl-tRNA reduktáza. Modré šipky znázorňují experimentálně potvrzený vliv cytokininů na syntézu chlorofylu (vytvořeno podle Cortleven a Schmilling, 2015).

Bylo prokázáno, že parametry chlorofylové fluorescence qP (koeficient fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu ve stavu přizpůsobeném světlu) a F_v/F_m (maximální kvantový výtěžek fotochemických procesů PSII ve stavu přizpůsobeném tmě) se během senescence v listech inkubovaných v CK udržují (Vlčková et al., 2006). Jedním z mechanismů, kterými exogenně aplikované CK udržují fotosyntetickou aktivitu, je jejich vliv na klíčový enzym metabolismu uhlíku, ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa (RubisCO). CK jsou schopny zpomalit pokles obsahu a aktivity RubisCO (Weidhase et al., 1987; Abdelghani et al., 1991; Chernyad'ev a Monakhova, 2003) a stimulovat *de novo* syntézu RubisCO (Lerbs et al., 1984; Kusnetsov et al., 1994). CK také indukují aktivitu některých enzymů antioxidačního systému, které snižují pravděpodobnost vzniku ROS nebo je převádějí do méně reaktivních či nereaktivních forem. Tím je docíleno uchování funkčnosti fotosyntetického aparátu (Liu a Huang, 2002; Dertinger et al., 2003).

3.2.5 Cytokiny a fotosyntéza

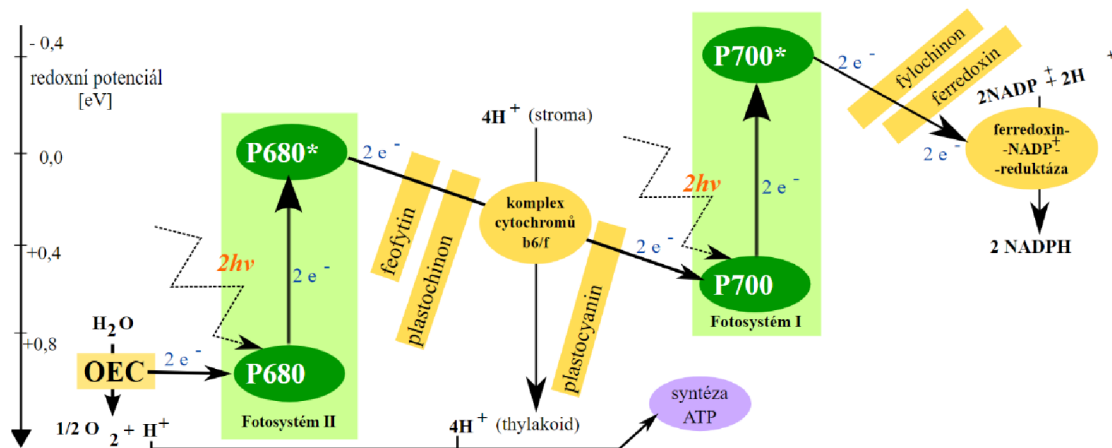
Samozřejmě nesmíme opomenout kapitolu věnovanou fotosyntéze, jakožto biologickému ději, při němž je absorbovaná energie slunečního záření přeměněna v energii chemických vazeb organických látek. V první fázi fotosyntézy, která se nazývá světelná nebo primární, je světelná energie absorbovaná fotosyntetickými pigmenty užita k vytvoření

ATP a redukovaných forem redukujících agens (ekvivalentů) – ferredoxinu a NADPH. Fotosystém II (PSII) obsahuje reakční centra P680. Pohlcením světla se P680 excituje na P680*. Následně je vymrštěn elektron, který velmi rychle přejde na feofytin *a* a poté zredukuje plastochinon na plastochinol, ze kterého přejde na komplex cytochromů b₆/f. PSII vytváří silné oxidační činidlo, které je schopno oxidovat vodu, a současně slabé redukční činidlo, které redukuje slabé oxidační činidlo z fotosystému I (PSI). V této fázi se také uvolňuje kyslík. Produkty světelné fáze (Obr. 4) jsou použity k tvorbě organických látek v druhé fázi fotosyntézy, která se obvykle nazývá sekundární, syntetická nebo temnostní (Evans et al., 2017).

Většinou se pod pojmem fotosyntéza rozumí fotosyntetická asimilace oxidu uhličitého, neboť nejvíce energie je použito k redukcí CO₂ a k syntéze asimilátů sacharidového typu. Energie uložená v chemických vazbách monosacharidů je pohotově dostupná pro ostatní procesy primárního metabolismu. V sacharidech se energie transportuje z chloroplastů do cytoplazmy a dále do těch buněk, pletiv a orgánů, které vůbec nejsou schopny fotosyntetizovat (např. kořeny, zásobní pletiva) nebo je míra této schopnosti jejich potřebě nedostačující (např. velmi mladé vyvíjející se listy). Na delší vzdálenosti (např. z listu do kořene) jsou sacharidy transportovány ve formě sacharózy (disacharid) a několika oligosacharidů. Ve formě ATP se energie z těchto látek opět získává v procesech souborně označovaných jako dýchání neboli respirace. V zásobních polysacharidech může být energie uložena řadu let (Field et al., 1989).

Při fotosyntetické asimilaci CO₂ se však nejen ukládá energie do relativně stabilních chemických vazeb, ale zvyšuje se množství organicky vázaného uhlíku a vznikají uhlíkaté řetězce pro syntézu dalších organických látek. Produkty světelné fáze fotosyntézy (ATP, redukovaný ferredoxin a NADPH) se však využívají v chloroplastu bezprostředně také k asimilaci anorganicky vázaného N a S a k syntéze mastných kyselin. Tyto procesy jsou pro život rostliny neméně důležité, vzniklé produkty (aminokyseliny a mastné kyseliny) však nepředstavují pohotově použitelný a transportovatelný zdroj energie (Eberhard et al. 2008).

Fotosyntéza probíhá v zelených částech rostliny, především v buňkách listového mezofylu, ve funkčně specializovaných plastidech (chloroplastech) (Stirbet et al., 2020).



Obr. 4: Z-schéma světelné fáze fotosyntézy: přenos elektronů získaných fotolýzou vody elektronovými přenašeči za pomoci energie získané fotosystémy I a II absorpcí světla (vytvořeno dle Fleming et al., 1994).

Světlo a CK se navzájem u rostlin ovlivňují v mnohých aspektech tím, že signální dráhy CK a světla sdílejí množství meziproductů na různých úrovních. Světlo představuje důležitý faktor v kontrole obsahu endogenních CK tím, že se účastní regulace jejich biosyntézy, degradace i transportu. Vliv světla na listovou senescenci je tedy úzce provázán s obsahem endogenních CK regulovaných světlem. Nedávná studie ukazuje, že světlo může částečně kompenzovat nefunkční signální dráhu CK způsobenou ztrátou funkce CK receptorů (Janečková et al., 2018).

Ke studiu působení CK na fotosyntetické procesy je využíváno např. chlorofylové fluorescenční indukce. Pomocí této metody lze také sledovat a porovnávat antisenescenční účinek jednotlivých CK a jejich derivátů (např. Vlčková et al., 2006; Vyličilová et al., 2016; Janečková et al., 2018; Kučerová et al., 2020; Nisler et al., 2023). CK mají výrazně zpomalující účinek na senescenci tím, že inhibují či zpomalují změny, ke kterým během ní dochází, a to včetně snížení fotosyntetické aktivity. Při hodnocení účinku CK na fotosyntetické parametry je důležitý také světelný faktor. Obecně platí, že nedostatek světla (nebo zkrácení doby světelné expozice) může způsobit pokles obsahu chlorofylu nebo snížení F_v/F_m (Ananieva et al., 2008) a světlo vysoké intenzity může způsobit nadměrnou excitaci fotosyntetického aparátu a následné fotooxidativní poškození (Vlčková et al., 2006). Tento efekt pozorovali Vlčková et al. (2006) u oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.). U listů inkubovaných ve tmě a ošetřených *meta*-tropolinem (mT) došlo ke zpomalení strukturálních změn, které senescenci provázejí (zpomalení celkové degradace složek chloroplastu, akumulace plastoglobulí a peroxidace lipidů), i parametrů fotosyntetické funkce (rychlost asimilace

CO₂, F_v/F_m). Zatímco exogenní aplikace mT zpomalila změny senescence v oddělených listech pšenice inkubovaných ve tmě, v podmínkách kontinuálního světla (o intenzitě 100 μmol fotonů m⁻²·s⁻¹) se ochranný účinek mT změnil na škodlivý několik dní po oddělení listů. Zdá se, že aplikace mT zpočátku indukovala produkci a akumulaci asimilátů v oddělených listech na světle, ale tato akumulace paradoxně vedla ke zhoršení fotosyntetické funkce prostřednictvím retrogradní inhibice v pozdějších fázích indukované senescence (4. a 6. den po oddělení). Zpětná inhibice stromálních reakcí pravděpodobně způsobila omezenou dostupnost NADP⁺, konečného akceptoru elektronů ve fotosyntetickém elektronovém transportu, jak by se dalo očekávat na základě zvýšení excitačního tlaku u PSII (parametr 1 - qP). Naproti tomu fotochemie fotosystému II (PSII) byla 4. den po oddělení stále účinná (hodnota parametru F_v/F_m byla přibližně 0,5). Mohlo tedy dojít k nerovnováze mezi produkcí a poptávkou po elektronech, což pravděpodobně vedlo k přeexcitování PSII (o čemž svědčí zvýšení 1 - qP) a následné produkci reaktivních forem kyslíku (Vlčková et al., 2006; Fang et al., 2012).

Kučerová et al. (2020) ve své studii popisuje stav, kdy u segmentů inkubovaných ve tmě nenastal po ošetření CK nebo jejich deriváty žádný senescenci urychlující efekt. Aplikované látky do určité míry zpomalily průběh indukované senescence ve tmě (Vlčková a kol. 2006, Nisler a kol. 2018). Z hlediska zpomalení degradace fotosyntetických pigmentů a zachování funkce PSII (udržení parametru F_v/F_m i dalších sledovaných parametrů chlorofylové fluorescenční indukce) se u *T. aestivum* nejlépe osvědčil derivát OH.

3.2.6 Interakce cytokininů a jiných signálů

Množství vnitřních nebo vnějších faktorů ovlivňujících rostlinu je různé, ale nikdy na ni nepůsobí jen jeden. Z tohoto důvodu je signální dráha listové senescence tvořena komplexní sítí signálů a procesů. Signální dráhy, které jsou spouštěny různými faktory, se vzájemně překrývají nebo spolu interagují. Na základě výsledků různých transkripčních studií byly identifikovány signální dráhy ovlivňující CK i cíle signální dráhy CK.

3.2.6.1 Cytokininy a auxiny

Jedny z detekovaných genů byly geny pro signální dráhy auxinů. Je známo, že auxiny a CK fungují antagonisticky nebo synergisticky v různých buňkách, pletivech i orgánech. Už v roce 1956 bylo demonstrováno, že relativní poměr auxinů a CK má vliv na

organogenezi, ale i syntézu, vnímání a transport potřebných metabolitů (Miller et al., 1956). Auxiny mají vliv na regulaci obsahu CK pomocí regulace exprese *IPT*. Geny *IPT* jsou zodpovědné za biosyntézu CK, tj. vlivem působení auxinů byla zvýšena biosyntéza CK. *Up*-regulace genů *IPT5* a *IPT7*, zprostředkovaná geny *SHY2/IAA3*, byla pozorována 4 hodiny po ošetření exogenními auxiny (Brenner et al., 2012). Na druhou stranu byly pozorovány i opačné interakce mezi auxiny a CK. V experimentech, kterými se zabýval El-Showk et al. (2013), byla významně snižená exprese genu *CYP735A* pro biosyntézu CK u *Arabidopsis thaliana* L. už hodinu po aplikaci auxinů. Tento fenomén byl potvrzen i přímým měřením biosyntézy CK po aplikaci auxinů. Auxiny sehrávají úlohu i v degradaci CK, a to prostřednictvím regulace genů *CKX*. Ze sedmi *CKX* genů u *Arabidopsis thaliana* L. byla po ošetření exogenními auxiny pozorována *down*-regulace *CKX2*, *CKX4* a *CKX7*, ale zároveň *up*-regulace *CKX1* a *CKX6*. Kromě vlivu auxinů na CK byla pozorována také regulace biosyntézy a transportu auxinů pomocí CK, kdy bylo pozorováno zvýšení biosyntézy auxinů v mladých listech, růstovém vrcholu a v kořenovém systému po exogenní aplikaci různých CK. Bylo také zjištěno, že CK regulují koncentraci auxinů zvýšením produkce anebo stability proteinu *IAA17* zodpovědného za ukládání a uchovávání auxinů. Aplikace CK rovněž vedla ke snížení exprese efluxových transportérů auxinů v kořenovém systému. Studie taktéž demonstrovala transport auxinů do apikálních částí po dekapitaci rostlin hrášku zprostředkovaný CK (El-Showk et al. 2013).

3.2.6.2 Cytokininy a etylén

Ve studiích od Cary et al. (1995) a Penmetsa et al. (2008) bylo pozorováno, že aplikace CK na rostliny rostoucí ve tmě vyvolala efekt typický pro etylén. U rostlin rezistentních vůči etylénu byla pozorována i rezistence k CK v různých částech rostlin. Rovněž bylo detekováno snížení účinku CK po jejich aplikaci současně s inhibitory biosyntézy nebo signální dráhy etylénu (Cary et al., 1995). V dalších studiích (Chae et al., 2003) byly identifikovány mutace *eto1*, *eto2* a *eto3* u genů z ACS skupiny u rostlin *Arabidopsis thaliana* L., které jsou zodpovědné za nadměrnou produkci etylénu a efekt typický pro etylén po aplikaci CK pozorovaný v předchozí studii. Tyto geny kódují enzymy, které spouštějí biosyntézu etylénu. Na základě výsledků Woeste et al. (1999) bylo zjištěno, že CK mají vliv na post-transkripční modifikaci genů ze skupiny ACS, čímž aktivují nebo zvyšují jejich funkci.

3.2.6.3 Cytokininy a další fytohormony

CK interagují i s dalšími fytohormony. Ošetření exogenními GA významně snižuje expresi *ARR1*, regulátoru odpovědi typu-B CK signální dráhy. Bylo zjištěno, že snížení koncentrace GA 5 dní po klíčení zvyšuje expresi *ARR1* a následně cílového genu *SHY2*, čím se indukují cytokineze (El-Showk et al., 2013).

CK interagují i se signální dráhou SL. Bylo zjištěno, že u rostlin se sníženou citlivostí ke SL je redukována rovněž senzitivita k CK. Experimenty na rostlinách s nedostatkem nebo necitlivostí k SL ukázaly zvýšenou expresi *IPT*, což naznačuje antagonistické působení CK a SL. CK mohou také zastavit nebo zpomalit biosyntézu SL tím, že negativně regulují auxiny, které spouštějí transkripci *MAX4*, genu pro syntézu SL (Bainbridge et al., 2005).

ABA je klíčový fytohormon v odpovědi na environmentální stresové faktory, především v odpovědi na dehydrataci (Umezawa et al., 2010). Nishiyama et al. (2011) ve své studii popisuje interakce mezi signálními dráhami CK a ABA. Snížení obsahu CK vede k hypersenzitivitě k ABA a naopak, zvýšení obsahu CK vede ke snížení citlivosti k ABA. Zároveň byla hypersenzitivita k ABA způsobená nízkým obsahem CK asociována se zvýšenou tolerancí vůči environmentálním stresům. Vlivem aplikace exogenní ABA dochází také ke snížení obsahu endogenních CK a *down*-regulaci genů metabolismu CK.

3.2.6.4 Cytokininy a další environmentální vlivy

Fytohormony jsou asociovány také s listovou senescencí způsobenou suchem. U rostlin vystavených stresu suchem je přímo ovlivněn endogenní obsah CK a ABA. V závislosti na koncentraci ABA a CK je následně regulována exprese genů, čím je regulován postup listové senescence (Munné-Bosch a Alegre, 2004). CK mohou mít vliv také na toleranci vůči suchu. Bylo prokázáno, že tolerance vůči suchu koreluje nejen se zvýšenou hladinou ABA, ale i CK a dalších fytohormonů (Pavlović et al., 2018).

CK mají pozitivní účinek také při stresu vysokou teplotou. Exogenní aplikace CK na rostliny vystavené vysoké teplotě pomáhá zvyšovat termotoleranci a stabilitu buněčných membrán, a udržovat fotosyntetickou aktivitu a vyšší obsah chlorofylu (Veerasingam et al., 2007; Jespersen et al., 2015).

CK také udržují fotosyntetickou aktivitu a obsah chlorofylu, a podporují růst biomasy u rostlin *Salvia officinalis* vystavených prostředí s vysokým obsahem solí. Díky tomu CK zvyšují toleranci vůči stresu zasolením a oddalují tak listovou senescenci

(Wu et al., 2014). Vysoký obsah solí způsobuje oxidativní stres, který může být zmírněn působením určitých CK (Ma et al., 2016).

3.2.6.5 Cytokininy a vliv patogenů

CK hrají roli také při napadení rostlin patogeny, přičemž vliv patogenů na obsah endogenních CK není vždy stejný. U rostlin *Phaseolus vulgaris* inokulovaných virem mozaiky jetele bílého se obsah aktivních CK snížil. Naopak, u pšenice inokulované houbovým onemocněním byl pozorován výrazný nárůst v koncentraci CK. Z toho vyplývá, že odlišné patogeny mají různý efekt na produkci CK. Po aplikaci exogenních CK se citlivost vůči patogenům mění také, např. u rostlin *Phaseolus vulgaris* infikovaných virem mozaiky jetele bílého bylo po exogenní aplikaci CK pozorováno snížení replikace viru. Ta byla navíc spojená s aktivací obranných mechanismů proti patogenům (Argueso et al., 2009).

3.2.7 Cytokininy v zemědělství

U zemědělsky významných rostlin (např. pšenice a ječmen) je listová senescence důležitým faktorem ovlivňujícím výnosy a obsah proteinů v zrně (Sultana et al., 2021). Obsah proteinů v zrně (GPC, z anglického *grain protein content*) pšenice je jedním z hlavních ukazatelů kvality zrna. Z tohoto důvodu se celá řada studií zaměřuje na sledování vlivu listové senescence na GPC. GPC u pšenice silně závisí na transportu a remobilizaci dusíku (Pleijel et al., 1999). Protože množství dusíku, které rostlina přijme z hnojiv je nízké (pouze 30 až 40 %), zvyšuje se úroveň kontaminace prostředí dusíkem. Z tohoto důvodu se začaly hledat strategie na zvýšení GPC, které nedodávají dusík rostlinám exogenně (Sultana et al., 2021). Jednou z možností je aplikace CK a jejich derivátů, které umožňují oddálení listové senescence i v polních podmínkách, a tím i zvýšení výnosů obilnin (Distelfeld et al., 2014; Koprna et al., 2016; Nisler et al., 2023). Rostliny, jejichž kořenový systém sahá hlouběji a umožňuje přijímat vodu i ze spodních vrstev půdy, se vyznačují efektivnějším přijímáním dusíku, lepší fotosyntetickou aktivitou a oddálenou senescencí. Tyto rostliny se tedy vyznačují *stay-green* fenotypem. *Stay-green* rostlina se vyznačuje prodloužením období, ve kterém má zelené listy, a to až do doby tvorby zrna. S tím souvisí lepší hromadění biomasy, zvýšení GPC a vyšší výnosy (Christopher et al., 2008; Gaju et al., 2011). Stejně výsledky byly získány u rostlin zimní pšenice, kde bylo oddálení senescence a udržování obsahu chlorofylu přínosem pro prodloužení fáze tvorby zrna, výsledkem čehož byly vyšší výnosy

(Górny a Garczyński, 2002). Na druhou stranu byl zaznamenán i opačný trend ve výnosech asociovaný se *stay-green* fenotypem, který měl za následek snížení obsahu chlorofylu v listech pozorovaných rostlin (Kichey et al., 2007). Je známo 5 skupin *stay-green* fenotypů, které se liší na základě toho, do jaké míry je u nich senescence ovlivněna a jaká je doba jejího nástupu. Těchto pět skupin se liší na tzv. funkční (typ A a B) a nefunkční *stay-greens* na základě toho, zda je u nich ovlivněna i fotosyntetická aktivita. U typu A je nástup senescence oddálen, ale senescence následně postupuje normální rychlostí, kdežto u typu B není oddálen nástup senescence, ale její progres je pomalejší. Mezi nefunkční *stay-green* fenotypy patří typ C (kosmetický – je udržován pouze obsah chlorofylu, bez vlivu na fotosyntetickou aktivitu), typ D (pseudo-zelený) a typ E (hyperzelený) (Latif et al., 2020).

Stay-green fenotyp může být výsledkem změn v hormonálních mechanismech a signálních drahách etylénu a CK (Thomas a Ougham, 2014). Protože jsou CK schopny udržovat obsah chlorofylu a zachovávat fotosyntetickou aktivitu, byla na jejich využití v bioinženýrství směřována pozornost s cílem vytvořit *stay-green* mutanty. Už v roce 1995 byl sestrojen *stay-green* mutant rostliny tabáku, u které byl gen pro IPT spojen s promotorem genu *SAG12*, který je asociován se senescencí, čímž byla zajištěna autoregulovaná produkce endogenních CK zároveň se spuštěním senescence. Udržení obsahu endogenních CK pak mělo za následek oddálení senescence, a tedy i *stay-green* fenotyp (Gan a Amasino, 1995). U *Arabidopsis thaliana* L. byly sestrojeny *stay-green* rostliny díky mutacím zabezpečujícím nepřetržitou expresi genu pro CK receptory nebo nadměrnou expresi regulátoru odpovědi typu-B (Kim et al., 2006; Kim et al., 2012).

3.2.7.1 Deriváty cytokininů a další látky s podobným účinkem

Nejvíce prozkoumané a využívané přirozené CK jsou kinetín a BAP. Při experimentální aplikaci BAP na sazenice ječmene bylo pozorováno zvýšení GPC až o 57 % (Jameson a Song, 2016; Koprna et al., 2021). Nevýhodou aplikace CK na rostliny je negativní ovlivnění i dalších důležitých procesů, jako je např. organogeneze nebo vývoj kořenového systému (Koprna et al., 2016). Z tohoto důvodu jsou syntetizovány nové látky odvozené od CK, které tyto negativní účinky postrádají a mají další lepší vlastnosti. Příkladem derivát odvozeného od BAP, 2-chloro-6-(3-methoxybenzylamino)purinu (2-Cl-3MeO-BAP). Při aplikaci 2-Cl-3MeO-BAP na volně rostoucí rostliny ječmene bylo dosaženo zvýšení výnosu o 7 %. Na druhou stranu, u volně rostoucí zimní pšenice nebylo pozorováno statisticky významné zvýšení výnosu zrna (Koprna et al., 2016). Syntetický

derivát kinetinu 6-furfurylamino-9-(2-chloroethyl)purin zase vykazuje o 31 % vyšší aktivitu při použití v polních podmínkách než kinetin a zároveň nemá negativní účinky na kořenový systém (Mik et al., 2011).

Dalšími látkami s účinky podobnými CK jsou deriváty močoviny jako je např. thidiazuron (TDZ). Jedná se o syntetický CK odvozený od močoviny s velmi silnými CK účinky. TDZ také zvyšuje koncentraci endogenních CK, a to prostřednictvím inhibice CKX účastnících se degradace CK. Vysoká aktivita TDZ je pravděpodobně způsobená vysokou afinitou k CK receptorům (Ahmad a Faisal, 2018). Ve výzkumu vlivu TDZ na GPC byl testován vliv aplikace TDZ společně s paklobutrazolem a askorbátem, která měla za následek zlepšení stability membrán a zvýšení obsahu chlorofylu a fotosyntetické aktivity. Studie se ale nezabývala vlivem jednotlivých látek samostatně (Dwivedi et al., 2018). V rámci studie, kterou prováděl Nisler et al. (2018) byly syntetizovány nové deriváty odvozené od TDZ a kinetinu. Jednou z nejúčinnějších látek s nejvyšším potenciálem pro praktické využití se ukázala být 1-(2-methoxy-ethyl)-3-1,2,3-thiadiazol-5-yl močovina (MTU). MTU měl výrazný antisenescentní efekt u rostlin pšenice a zároveň neinhiboval vývoj kořenového systému, což je často pozorovaný negativní efekt aplikace exogenních CK (Nisler et al., 2018). V nedávné studii (Nisler et al., 2023) autoři navíc zjistili, že MTU inhibuje listovou senescenci podpořením stability fotosystému I (PSI) a udržováním cyklického elektronového transportu. MTU byl také schopen oddálit senescenci nejen u rostlin rostoucích v optimálních podmínkách, ale i v podmínkách stresových (u rostlin stresovaných suchem). Účinky MTU byly potvrzeny u ječmene a pšenice i v rámci polních experimentů a pozorováno bylo rovněž zvýšení GPC (Nisler et al., 2023).

Přestože již bylo syntetizováno velké množství různých CK a jejich derivátů s různými účinky v rostlinném organismu, existuje jen omezené množství informací o jejich biologické aktivitě nebo mechanismu účinku. Nově připravené sloučeniny jsou obvykle testovány pomocí standardních CK biologických testů, které poskytují pouze základní informace o vztahu struktury a účinku těchto látek. K odhalení mechanismů jejich účinku a důkladnému zhodnocení jejich potenciálu pro praktické využití je zapotřebí podrobnějších experimentů. Z hlediska antisenescentní aktivity se obvykle zkoumá pouze schopnost sloučenin udržet obsah chlorofylu v senescentních listech. Proto víme jen málo o jejich účinku na fotosyntetický aparát a funkci a případně o dalších procesech ovlivněných senescencí. Hlavním cílem této práce bylo zhodnotit účinek CK,

6-benzylaminopurinu (BAP), *trans*-zeatinu (tZ), thidiazuronu (TDZ), a jejich derivátů, 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (OH) a 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močoviny (MTU) na změny indukované senescencí u primárních listů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Registrana) starých 7 dní, a to včetně změn týkajících se stability buněčných membrán.

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

K jednotlivým měřením byly použity primární listy pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Registana) staré 7 dní. Rostliny byly pěstovány v perlitu ve fytokomoře s definovanými podmínkami (světelný režim 16h PAR o intenzitě 100 $\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/8\text{h tma}$; 21°C; 60% RH, zavlažováno Hoaglandovým roztokem).

Na základě relativního obsahu chlorofylu měřeného pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonsko) byly vybrány listy tak, aby jejich relativní obsah chlorofylu byl v rozmezí 38,5 - 42,9. Následně byly z listů odděleny segmenty o délce 4 cm od špičky listu. Tyto segmenty byly umístěny řezem do jamky 96-jamkové desky (Obr. 5) s 200 μl daného roztoku. Použit byl 0,02% dimethylsulfoxid (DMSO; který je používán jako rozpouštědlo pro cytokininy (CK), dále CK 6-benzylaminopurin (BAP), *trans*-zeatin (tZ), thidiazuron (TDZ) a CK deriváty 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurin (OH) a 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močovina (MTU). V případě CK a jejich derivátů se jednalo o roztoky o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěné v 0,02% DMSO. Takto připravené vzorky byly umístěny na 6 dní zpět do fytokomory zabalené v igelitovém sáčku a obalené černou plastovou fólií připevněnou izolepou, abychom zabránili průniku PAR, ale aby byly zároveň dodrženy stejné pěstební podmínky jako při růstu rostlin. Vzorky byly tímto způsobem připravovány ve třech po sobě jdoucích dnech vzhledem k časové náročnosti jednotlivých experimentů. Spolu s rostlinami sloužícími k přípravě vzorků byly vysety i rostliny kontrolní, z nichž byly stejným způsobem odděleny listové segmenty, které ale byly měřeny bezprostředně po oddělení a nebyly ošetřeny žádnou z výše zmíněných sloučenin. Ve většině experimentů byly tyto kontrolní (čerstvě oddělené) listy použity k porovnání výsledků s daty naměřenými u ošetřených senescentních listů.



Obr. 5: Rozmístění segmentů v 96-jamkové destičce ponořených do 200 μl 0,02% dimethylsulfoxidu (DMSO), cytokininů 6-benzylaminopurinu (BAP), trans-zeatinu (tZ), thidiazuronu (TDZ) a cytokininových derivátů 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (OH) a 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močoviny (MTU) o koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

4.2 Použité metody

V rámci jednotlivých měření byl stanovován obsah chlorofylu $a+b$, parametry chlorofylové fluorescence, celistvost membrán za pomoci metody *ion leakage*. Dále byly pomocí konfokálního mikroskopu pozorovány chloroplasty a vizualizovány reaktivní formy kyslíku (ROS). Stanoven byl také obsah malondialdehydu (MDA).

4.2.1 Stanovení obsahu pigmentů

Ze zmrazených segmentů listů byl připraven acetonový extrakt tak, že byl daný segment homogenizován v třecí misce spolu se špetkou MgCO_3 a 2x 750 μl 80% acetonu. Následovala centrifugace s definovanými podmínkami (4°C; 6000g; 10 min), po jejím dokončení byl slit supernatant do skleněných zkumavek se stupnicí a změřena absorbance na spektrofotometru při vlnových délkách 470; 646,8; 663,2 a 750 nm v jednocentimetrové kyvetě. U některých vzorků bylo třeba supernatant zředit tak, aby absorbance při vlnové délce 663,2 nm byla v rozmezí 0,4 – 0,8. Příprava extraktu probíhala ve tmě (resp. při velmi slabém zeleném světle). Pro výpočet celkového obsahu chlorofylu a a b v extraktu byly použity rovnice podle Lichtenthalera (1987). Vypočtené hodnoty obsahu pigmentů byly dále přepočteny na plochu jednotlivých segmentů.

4.2.2 Chlorofylová fluorescence

Listové segmenty byly nejdříve proměřeny svrchní stranou listu ke zdroji světla pomocí PEA metru (Hansatech, Anglie; Iexc 40 %; 2s). Čerstvá kontrola byla adaptována cca 30 minut na tmu před započítáním samotného měření. Po doměření byly listy vyskládány na podložku, na koncích přelepeny izolepou a změřeny pomocí zobrazovacího fluorescenčního systému FluorCam FC800-O (PSI, Drásov, ČR) s následujícím

nastavením: senzitivita 6%, aktinické světlo $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, saturační světlo $4500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v místě vzorků. Následně byly listy po jednom zváženy, obkresleny a umístěny do mikrozkušavek, prudce zmrazeny v tekutém dusíku a následně uloženy do hlubokomrazícího boxu. Takto připravené vzorky byly použity pro stanovení fotosyntetických pigmentů.

Během měření byly získány parametry F_0 (minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu), F_M (maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu), F_t (fluorescence v čase t při aktinickém světle) a $F_{M'}$ (maximální fluorescence vzorku adaptovaného na světlo). Parametry $F_{M'}$ a F_t byly měřeny během 6 min působení aktinického PAR. Poslední z naměřených hodnot (po 6 min. PAR, tzv. *steady-state* hodnoty) pak byly použity k následujícím výpočtům:

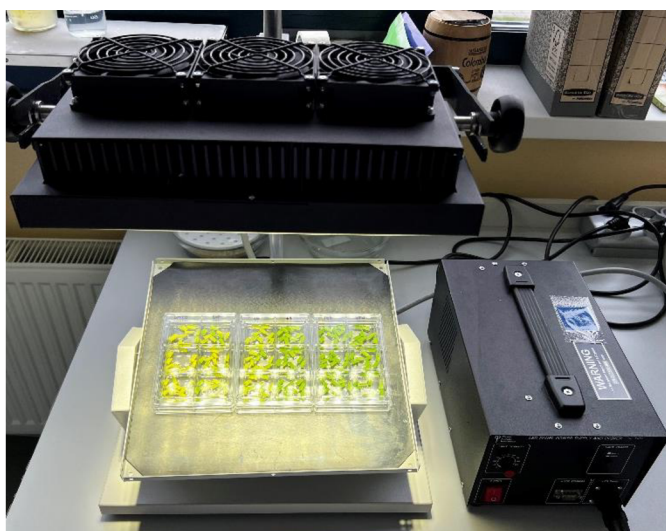
1. maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (F_v/F_m),
 $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$
2. aktuálního kvantového výtěžku fotochemie PSII vzorků adaptovaných na světlo (Φ_P), $(F'_m - F_t)/F'_m = \Phi_P$
3. kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení (Φ_f, D), $F_t/F_m = \Phi_f, D$
4. kvantového výtěžku regulačního nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}),
 $F_t/F_{M'} - F_t/F_m = \Phi_{NPQ}$.

4.2.3 Ion leakage

Metoda *ion leakage* využívá měření konduktivity roztoku, ve kterém jsou ponořeny listové segmenty. Nejdříve byla změřena konduktivita deionizované vody (dH_2O), tato hodnota se stala výchozí pro všechny varianty měřených vzorků. Z listových segmentů, které byly po dobu 6 dnů umístěny ve tmě a ošetřeny jednotlivými látkami byly odděleny segmenty o délce 1 cm, které byly umístěny do jamky 6-jamkové desky s 3,5 ml dH_2O (vždy po 3 jamkách pro každou z látek) (Obr. 6). Takto připravené vzorky byly umístěny na kývačku a vystaveny vysokému světle (LED panel, PSI, Drásov, ČR), přičemž ozáření v místě vzorků byla $600 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Obr. 7). Každou hodinu byl roztok z jamky odebrán do zkumavky, byla změřena jeho relativní konduktivita konduktometrem GMH 3430 (Greisinger, Germany) a poté byl roztok navrácen zpět do příslušné jamky. Měření bylo prováděno po 1, 2, 3, 4, 5, 22 a 30 hodinách od vystavení listových segmentů vysokému světle.



Obr. 6: Rozmístění 1 cm segmentů oddělených z listů inkubovaných ve tmě po dobu 6 dnů v roztocích DMSO, BAP, OH, tZ, TDZ a MeO v 6-jamkové destičce a ponořených do 3500 μ l deionizované vody.



Obr. 7: Uspořádání experimentu během měření metodou ion leakage. Segmenty oddělené z listů pšenice byly inkubovány ve tmě po dobu 6 dnů v roztocích DMSO, BAP, OH, tZ, TDZ a MeO v 6-jamkové destičce a ponořených do 3500 μ l deionizované vody a následně umístěny na kývačku pod vysoké světlo (LED panel, PSI, Drásov, ČR; ozáření v místě vzorků 600 μ mol fotonů $m^{-2} \cdot s^{-1}$).

4.2.4 Konfokální mikroskopie

Z listových segmentů ošetřených jednotlivými látkami byla oddělena 1 cm dlouhá část (přibližně ze středu segmentu), která byla umístěna do mikrozkušavky s 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetátem (DCF; o koncentraci 5 μ mol.l⁻¹). Takto připravený preparát byl vložen do exsikátoru propojeného s vývěvou, kde byl inkubován cca 30 minut (5 minut byl odčerpáván vzduch pomocí vývěvy; zbylých 25 minut byla vývěva vypnuta za stálého uzavření exsikátoru). Následně byl vzorek přenesen na podložní sklíčko, zakápnut dH₂O a překryt krycím sklíčkem. Preparát byl poté vložen do konfokálního mikroskopu.

Emise DCF byla buzena laserem při 488 nm a následně detekována v zelené oblasti. Emise chlorofylů se budila laserem při 638 nm a byla detekována v červené oblasti. Výrobce přesné vlnové délky pro detekci neuvádí.

4.2.5 Stanovení obsahu MDA

Prvním krokem přípravy vzorků byla homogenizace zmrazených segmentů listu v 2x 750 μl ultračisté H_2O , následovala centrifugace s definovanými podmínkami (4°C ; 6000g; 10 min). Když byla centrifugace dokončena, bylo odebráno 100 μl supernatantu do čisté mikrozkušavky a k tomuto objemu přidáno 20 μl NaOH. Takto připravený vzorek byl zahříván při 60°C po dobu 30 min. Po uplynutí 30 min bylo do zkumavky přidáno 60 μl HClO_4 a opět následovala centrifugace, tentokrát s rozdílnými definovanými podmínkami (4°C ; 16000g; 10 min). Následně bylo smícháno 100 μl supernatantu s 1 μl 50 mmol.l^{-1} 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) v nové mikrozkušavce. Tato směs byla důkladně promíchána a na 30 min. umístěna do tmy za pokojové teploty. Posledním krokem bylo přepipetování 10 μl vzorku do vialky a podrobení vysokoúčinné kapalinové chromatografické analýze (HPLC).

HPLC (*high performance liquid chromatography*) patří mezi nejrozšířenější metody analýzy složek vzorku unášených chromatografickou kolonou kapalnou mobilní fází. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a vody (v čistotě určené pro HPLC) v poměru 3:2. Pomocí kolony Symetry C18 (4,6 x 75 mm, velikost částic 3,5 μm) byla provedena izokratická separace sloučenin s celkovým časem analýzy 15 min, kdy nástřikový objem činil 10 μl . Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 0,3 ml/min, teplota kolony byla udržována na 25°C a na vzorkách byla udržována teplota 8°C . Pomocí detektoru s diodovým polem v rozsahu vlnových délek 200-400 nm byly detekovány aldehydy (v našem případě MDA při vlnové délce 310 nm).

4.3 Grafické zpracování dat

Ke grafickému zpracování získaných dat byl použit program Microsoft Office 2021 (Excel; USA). Byly použity mediány a chybové úsečky značící horní a dolní kvartil. Protože se součet mediánů parametrů chlorofylové fluorescenční indukce ΦP , $\Phi\text{f,D}$ a ΦNPQ v některých případech nerovnal jedné, byly v tomto případě použity průměry hodnot pro lepší znázornění vzájemných vztahů mezi parametry na základě vzorce $\Phi\text{P} + \Phi\text{f,D} + \Phi\text{NPQ} = 1$ (Lazár 2015).

4.4 Statistické zpracování dat

Ke zjištění statisticky významných rozdílů mezi parametry naměřenými u listů inkubovaných v DMSO a jednotlivých CK nebo CK derivátech byl v programu Microsoft Office 2021 (Excel; USA) proveden Studentův t-test. Statisticky významné rozdíly mezi DMSO a dalšími látkami jsou označeny symbolem (*) ($P < 0,05$).

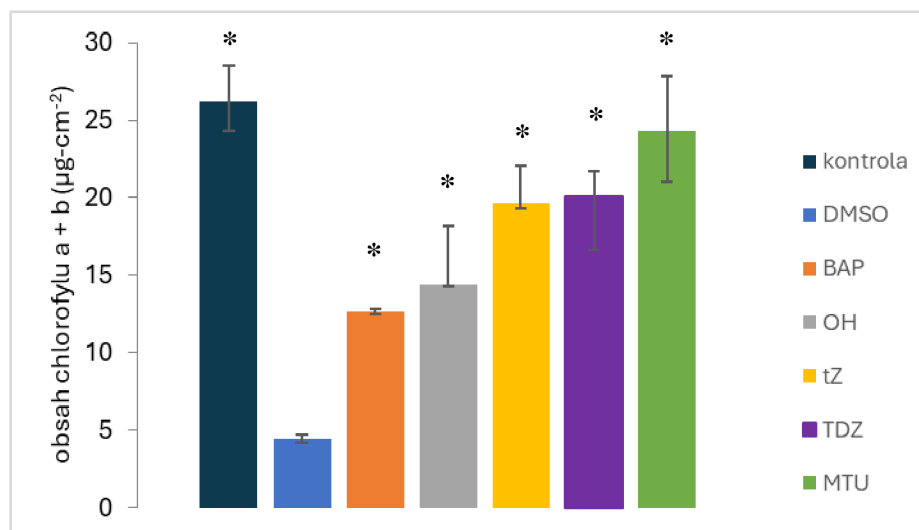
5 Výsledky a diskuse

V následujících podkapitolách je práce věnována výsledkům získaným během prováděných experimentů na oddělených primárních listech pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Registana) a jejich diskusi. Výsledky jsou zpracovány v přehledných obrázcích s detailním popisem pozorovaného jevu dle jednotlivých metod. V obrázcích jsou vždy uvedena data získaná u listů inkubovaných ve tmě a v dimethylsulfoxidu (DMSO), cytokininech (CK) 6-benzylaminopurinu (BAP), trans-zeatinu (tZ) a thidiazuronu (TDZ) a CK derivátech 6-(3-hydroxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurinu (OH) a 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močoviny (MTU). Pokud to povaha daného experimentu umožňovala, jsou rovněž uvedena data získaná u čerstvě oddělených listů (kontrola).

Pomocí Studentova t-testu byly hodnoceny statisticky významné rozdíly mezi listy ošetřenými jednotlivými roztoky CK, jejich deriváty a roztokem DMSO a také mezi DMSO a čerstvou kontrolou. Soubory dat, jejichž hodnota P byla menší než 0,05 (n = 5) byly považovány za statisticky rozdílné, v grafech jsou pak označeny symbolem hvězdičky (*).

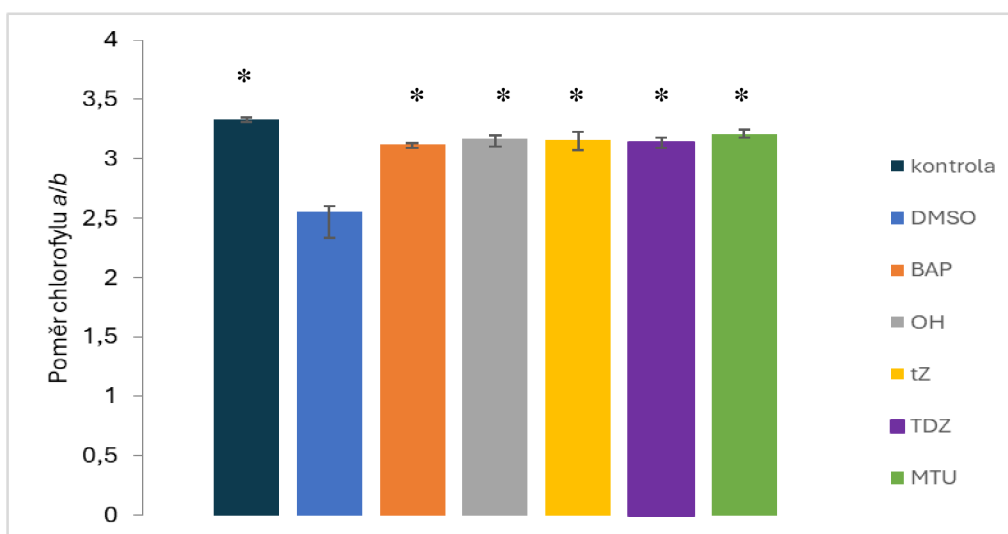
5.1 Obsah fotosyntetických pigmentů

U listů *T. aestivum* inkubovaných v DMSO došlo vlivem indukované senescence k poklesu obsahu chlorofylu *a+b* o přibližně 82 % (Obr. 8) oproti kontrole z čerstvě odděleného listu. V porovnání s listy ošetřenými DMSO byl u všech ostatních listů ošetřených CK a jejich derivátů obsah chlorofylu *a+b* vyšší. Největší obsah chlorofylu *a+b* je pozorovatelný v listech ošetřených CK derivátem MTU, kde byl obsah chlorofylu *a+b* téměř srovnatelný s kontrolou z čerstvě odděleného listu (oproti DMSO byl vyšší až o 75%). Nejnižší obsah chlorofylu *a+b* byl pozorován u CK BAP, který byl oproti DMSO vyšší o pouhých cca 31%.



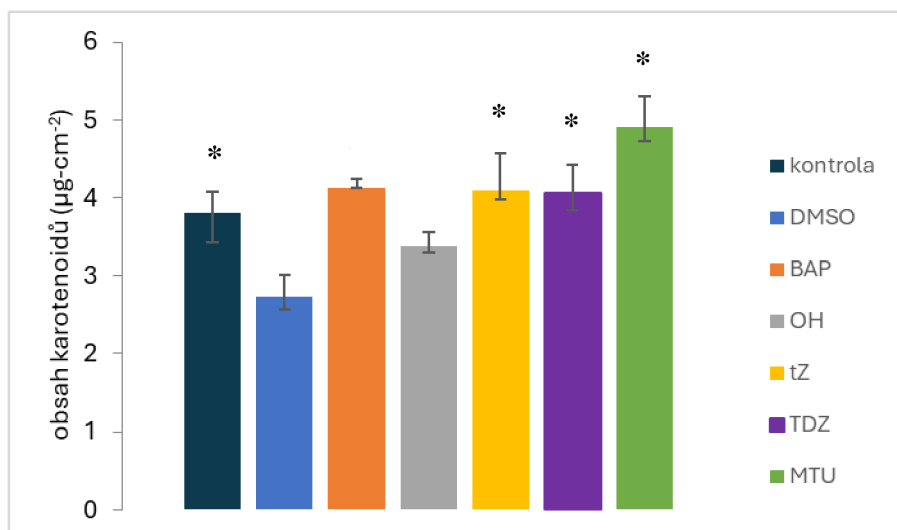
Obr. 8: Obsah chlorofylu *a+b* v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 µmol.l⁻¹ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Data jsou uvedena ve formě mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě prvního a třetího kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).

U listů ošetřených CK a jejich deriváty a taktéž u kontroly byl poměr chlorofylu *a/b* vyšší než u DMSO o 24 % (Obr. 9). Poměr chlorofylu *a/b* u listů ošetřených CK a jejich deriváty dosahuje podobných hodnot.



Obr. 9: Poměr chlorofylu *a/b* v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 µmol.l⁻¹ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).

Karotenoidy vyobrazené na Obr. 10 nabývají nejnižších hodnot u vzorků ošetřených DMSO a nejvyšších u MTU. Rozdíl činí cca 59 %. Je záhodno podotknout, že oproti listům inkubovaným v DMSO byl vyšší obsah karotenoidů naměřen i u variant BAP, tZ a TDZ.



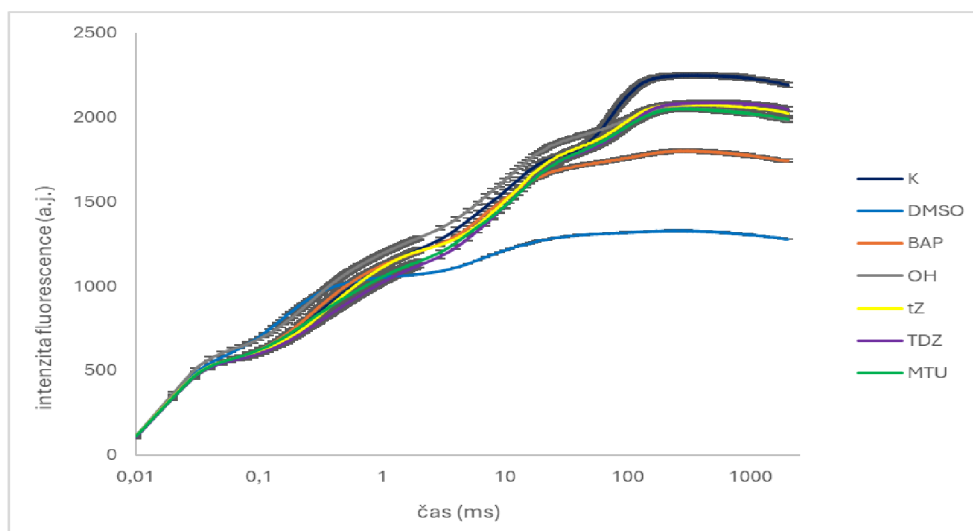
Obr. 10: Obsah karotenoidů v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 µmol.l⁻¹ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).

Je všeobecně známo, že exogenní aplikace CK i některých jejich derivátů má za následek potlačení poklesu obsahu chlorofylu *a* a *b* indukované senescencí (např. Vlčková et al., 2006; Vylíčilová et al., 2016; Nisler et al., 2018; Kučerová et al., 2020; Nisler et al., 2023; Zemková, 2024). Tento antisenesescenční účinek byl potvrzen i v této diplomové práci. V rámci stanovování obsahu fotosyntetických pigmentů bylo dosaženo velmi podobných výsledků jako v práci Nisler et al. (2018), kde je uvedeno, že MTU (o koncentraci 100 µmol.l⁻¹) je u listů *Arabidopsis thaliana* L. schopné zachovat významně vyšší obsah chlorofylu *a+b* oproti listům ošetřeným DMSO (až o 96 %). V našem případě nebyl MTU tak efektivní, což je ale možné vysvětlit rozdílnými inkubačními podmínkami (včetně koncentrace použitého MTU) a jiným rostlinným druhem. Vlivem CK a jejich derivátů na obsah fotosyntetických pigmentů se ve své bakalářské práci zabývala i Zemková (2024), kde byly použity oddělené listy *H. vulgare* inkubované ve tmě a ve stejných CK a jejich derivátech, které byly použity i v této diplomové práci. V případě listů inkubovaných v DMSO došlo k výraznému poklesu obsahu chlorofylu *a+b*, který byl ale vlivem ošetření CK a jejich deriváty zpomalen. Zatímco u listů *H. vulgare* byly nejefektivnější CK mT a tZ, z Obr. 8 je patrné, že u *T. aestivum* (cv. Registana) je nejúčinnější CK derivát MTU. Tyto rozdíly mohou být opět způsobeny rozdílnou koncentrací použitých roztoků a v neposlední řadě druhem zkoumané rostliny. Účinku derivátu OH se věnovala ve své studii i Kučerová et al. (2020), kde část experimentů proběhla na sedmidenních listových segmentech *T. aestivum* (cv. Aranka) uchovávaných v tmě po dobu 6 dnů. Pozorována byla vysoká

antisenescenční aktivita CK derivátu OH, což ukazuje na rozdílné působení použitých látek nejen u různých rostlinných druhů, ale i u různých odrůd, protože v případě odrůdy Registana, CK derivát OH tak efektivní nebyl (Obr.8).

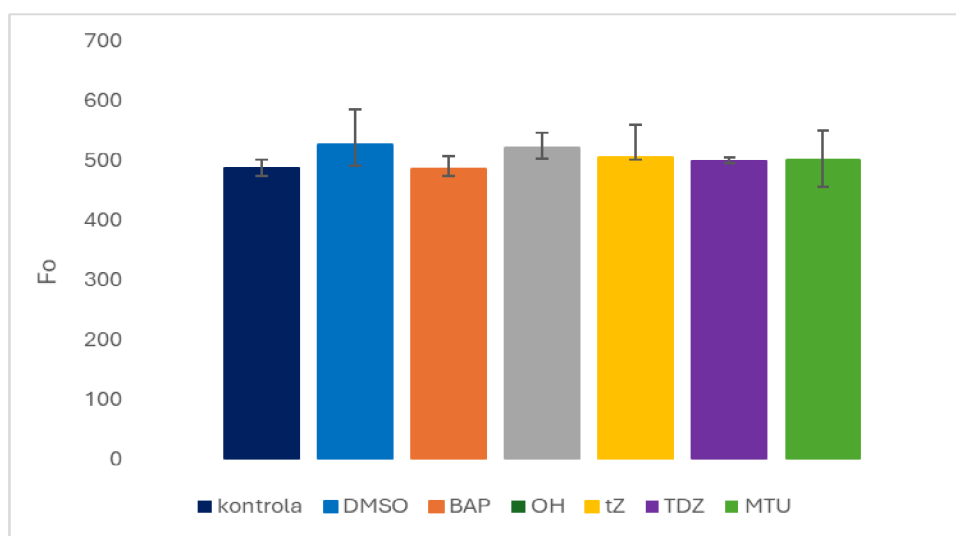
5.2 Funkce PSII

Jako první byly měřeny křivky velmi rychlé fluorescenční indukce O-J-I-P (Obr. 11), ze kterých byly vyhodnoceny parametry maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_m), minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_0) a následně vypočítány parametry maximálního kvantového výtěžku (F_v/F_m), počátečního nárůstu O-J chlorofylové fluorescence ($dV/dt)_0$ a relativní variabilní chlorofylové fluorescence V_J , které změřené křivky popisují.



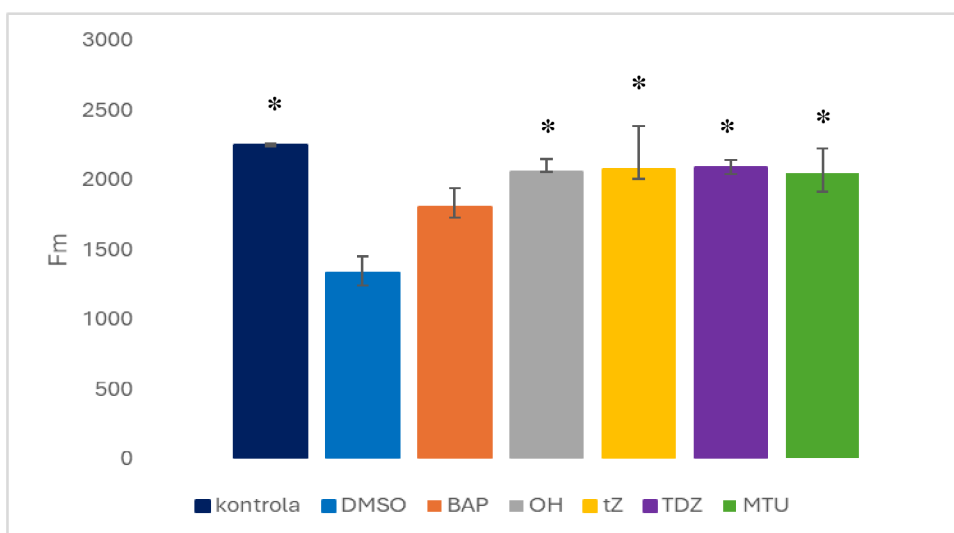
Obr. 11: Křivky velmi rychlé fluorescenční indukce O-J-I-P v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů.

Hodnota F_0 se zjišťuje ozářením předem zatemněné rostliny velmi nízkou intenzitou záření, při které dochází k excitaci molekul chlorofylu PSII, avšak neuskutečňuje se přenos této energie na Q_A , a tedy ani nedochází k necyklickému transportu elektronů. F_0 proto představuje základní fluorescenci neovlivněnou kapacitou ostatních elektronových přenašečů v tylakoidní membráně (Lazár 2015). F_0 je u všech variant srovnatelná s DMSO, a to včetně čerstvě oddělených listů (Obr. 12). Nedošlo zde ke vzniku žádných statisticky významných rozdílů. Vlivem indukované senescence tedy nedošlo k žádným změnám v tomto parametru.



Obr. 12: Minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).

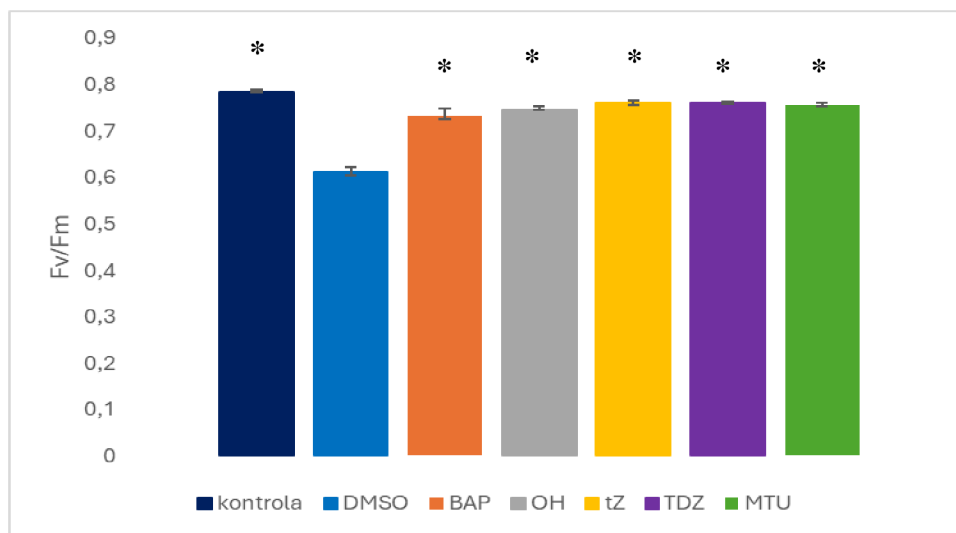
F_m je měřena krátce po náhlém ozáření předem zatemněné rostliny dostatečně silným světelným pulzem, který způsobí uzavření všech reakčních center PSII, následně zahlcení fotochemické deexcitační cesty (tj. veškerý plastochinon v redukovaném stavu), a tudíž dochází k prudkému nárůstu fluorescence na maximální hodnotu F_m . V tomto stavu jsou všechna reakční centra PSII „uzavřena“ a nepřijímají další excitační energii (Lazár 2015). F_m se vlivem indukované senescence výrazně snížila ve vzorku inkubovaného v DMSO (Obr. 13). Pokles byl zaznamenán i u dalších CK a jejich derivátů, přičemž nejvýraznější byl ve variantě BAP (F_m byla srovnatelná s DMSO). OH, tZ, TDZ a MTU nabývaly navzájem srovnatelných hodnot F_m a nejvíce se svými výsledky přibližují kontrole.



Obr. 13: Maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).“

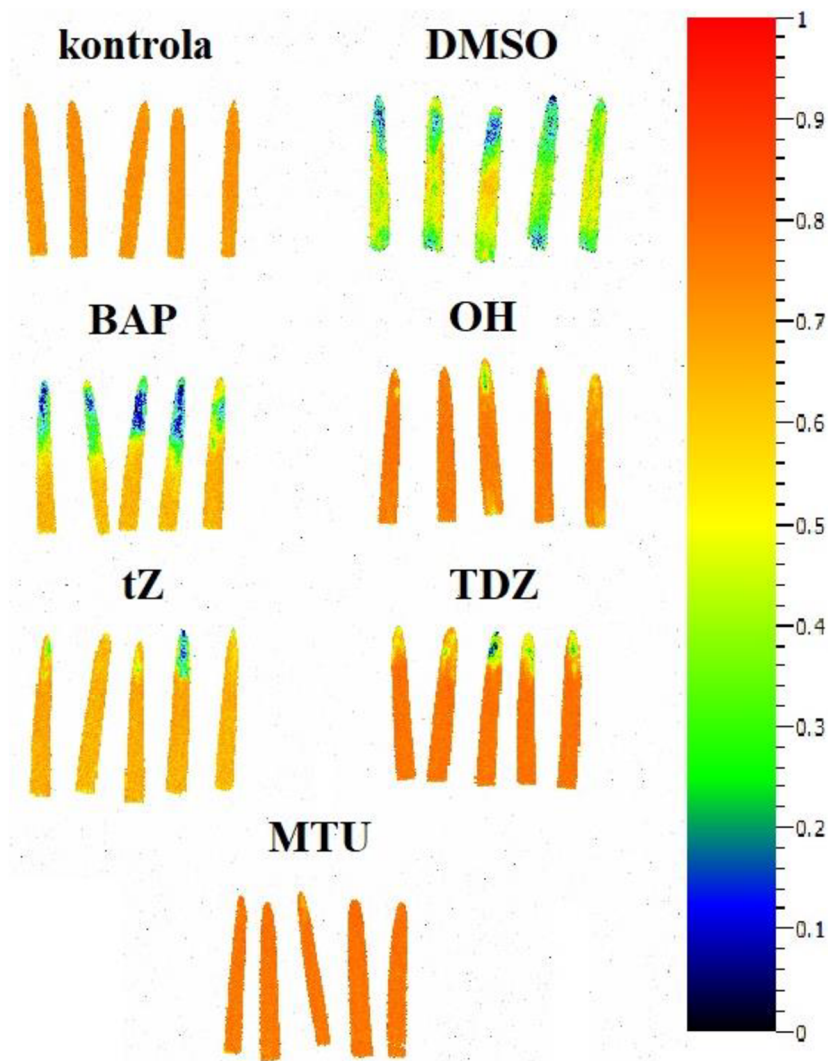
Při indukované senescenci dochází ke spuštění obranných mechanismů, které jsou energeticky náročné. Tyto obranné mechanismy jsou doprovázeny inhibicí fotosyntézy, která vede z dlouhodobého hlediska ke snížení kondice rostlinného materiálu, jak zmiňují Gómez-Gómez et al. (1999) a Göhre et al. (2012) ve svých publikacích. Ale pokud je na rostlinný materiál aplikován „ten správný“ CK derivát, jsme schopni obranné mechanismy zpomalit, případně jim téměř zabránit. Účinek CK a jejich derivátů na udržení fotosyntetické aktivity (konkrétně na PSII) během senescence je všeobecně známý. Jedním ze široce používaných parametrů chlorofylové fluorescence odrážející účinnost fotochemie PSII je maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (F_v/F_m). F_v/F_m , který závisí na předchozích dvou parametrech (F_0 a F_m), je obecným indikátorem snížení funkce nebo poškození PSII. Pokud je fotosyntetický aparát rostlin nebo celá rostlina vystavena působení některého stresu, dochází k ovlivnění funkce PSII, což se projeví snížením hodnoty F_v/F_m (např. Fang et al. 2012; Romero-Muñoz et al. 2024).

Jediný výrazný pokles parametru F_v/F_m byl v této diplomové práci zaznamenán u varianty DMSO (Obr. 14). U ostatních variant CK a jejich derivátů je pokles parametru F_v/F_m pouze mírný a jeho hodnoty jsou podobné těm získaným u kontrol z čerstvě odděleného listu.



Obr. 14: Maximální kvantový výtěžek vzorku během indukované senescence v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).

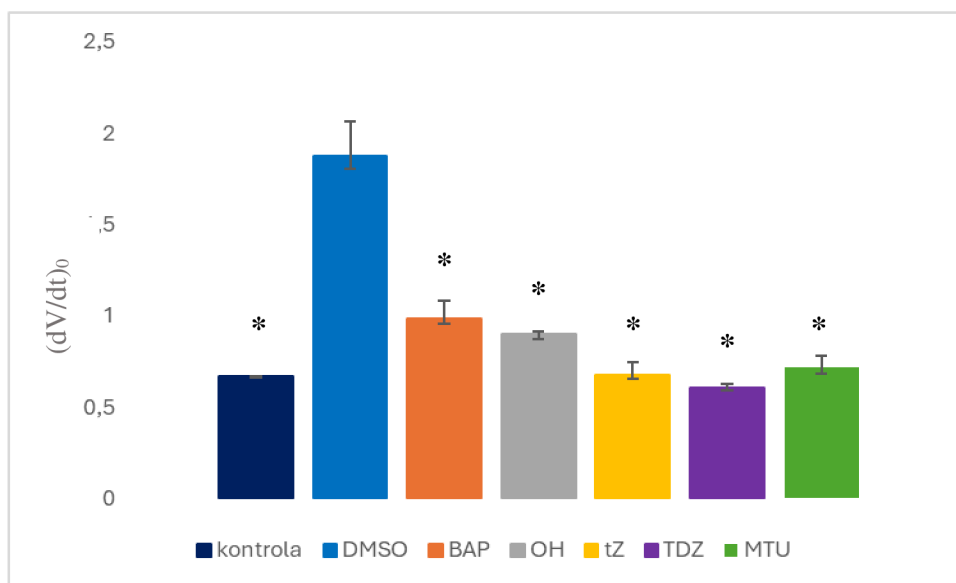
Udržení parametru F_v/F_m u listů inkubovaných v roztocích CK a jejich derivátů potvrzuje antisenescenční účinek těchto látek na změny funkce PSII, který byl již několikrát popsán. Např. Vlčková et al. (2006), popisuje antisenescenční vliv *meta*-tropolinu (*mT*) v oddělených listech *T. aestivum* (cv. Hereward). Bylo zjištěno, že aplikací *mT* na listové segmenty (inkubované ve tmě) dochází ke zpomalení změn vyvolaných indukovanou senescencí. Zatímco u listů ošetřených *mT* byl F_v/F_m udržen na stejné hodnotě i 6. dpo jako v den oddělení, u listů inkubovaných v DMSO došlo k velmi výraznému poklesu F_v/F_m (Vlčková et al., 2006). O antisenescenčních účincích BAP a OH se zmiňuje i Kučerová (2021) ve své disertační práci, kde popisuje u oddělených listů *T. aestivum* podobné působení látek BAP a OH jakých bylo dosaženo i v této diplomové práci, s tím rozdílem, že bylo využito odrůdy Aranka. V neposlední řadě je potřeba zmínit také bakalářskou práci Zemkové (2024), kde byl sledován vliv CK a jejich derivátů na parametr F_v/F_m u listů *H. vulgare* inkubovaných ve tmě. Zemková (2024) získala výsledky velmi podobné těm, které jsou prezentované na Obr. 14. U listů inkubovaných došlo vlivem indukované senescence opět ke snížení F_v/F_m , i když v bakalářské práci Zemkové (2024) byl tento pokles výraznější než na Obr. 14. Tento rozdíl může být způsoben mj. jiným druhem použitých rostlin. U listů ošetřených OH, tZ, TDZ, BAP i MTU poklesl F_v/F_m vlivem indukované senescence jen mírně, podobně jako v Obr.14. Ačkoliv se parametr F_v/F_m naměřený pomocí PEA metru jeví jako srovnatelný u všech variant CK a jejich derivátů (Obr. 14), při použití imagingu tohoto parametru je patrné (Obr. 15), že tomu tak není. Vizualizace F_v/F_m pomocí zobrazovacího přístroje FluorCam umožňuje zobrazit heterogenitu v hodnotách parametru v ploše listu. Kontrola dosahuje téměř maximálních hodnot parametru F_v/F_m . U vzorků inkubovaných v DMSO došlo k výraznému snížení hodnot měřeného parametru. Listové segmenty ošetřené BAP dosahují v části, která je blíže řezu vyšších hodnot než ve špičkách, kde F_v/F_m nižší než u varianty DMSO. Varianty OH a TDZ jsou vzájemně srovnatelné, pouze ve špičkách segmentů se nacházejí malé oblasti s nižší hodnotou F_v/F_m , obecně ale listy ošetřené těmito látkami dosahují vyšších hodnot než v případě DMSO. Varianta tZ taktéž dosahuje vyšších hodnot F_v/F_m než DMSO. Listy inkubované v MTU mají nejvyšší hodnoty F_v/F_m ze všech variant, jsou srovnatelné s čerstvě oddělenou kontrolou.



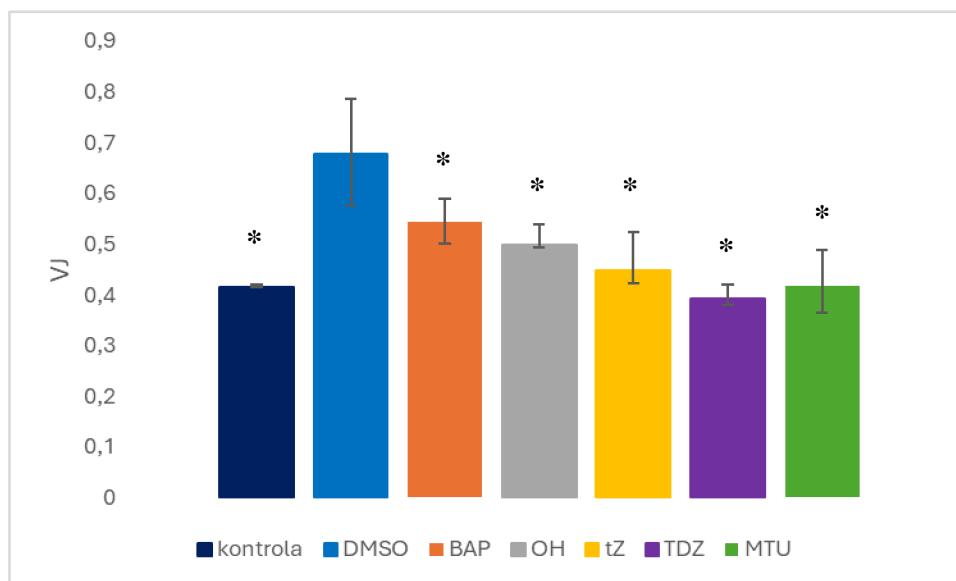
Obr. 15: Imaging maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU.

Imaging parametru F_v/F_m byl použit i v disertační práci Kučerové (2021), kde bylo dosaženo velmi podobných výsledků s tím rozdílem, že měření byla prováděna na *T. aestivum* (cv. Aranka) za použití roztoků DMSO, BAP a OH. Rozložení parametru F_v/F_m bylo téměř totožné jako v Obr. 15. V bakalářské práci Zemkové (2024) je použit imaging parametru F_v/F_m u listových segmentů *H. vulgare*, které byly inkubovány v roztocích tZ, TDZ, BAP, OH a MTU. U listů *H. vulgare* ale není patrná tak výrazná heterogenita F_v/F_m v ploše listu jako v Obr. 15. Nicméně Zemková ve své bakalářské práci používala listy segmentů bez špičky, což může být (kromě použití jiného rostlinného druhu) také příčinou pozorovaných rozdílů.

Křivky O-J-I-P byly měřeny za účelem sledování rychlosti dodávky excitace do reakčního centra PSII, redukce primárního akceptoru elektronů PSII (Q_A) a následného transportu elektronů za Q_A během prvních milisekund po osvětlení listů adaptovaných na tmu (Strasser et al., 2000). V listech pšenice jarní ošetřených DMSO jsou parametry $(dV/dt)_0$ a V_J výrazně vyšší než u čerstvé kontroly (Obr. 16 a 17), což vypovídá o změnách v dodávkách excitací. Tento nárůst vznikl vlivem indukované senescence a naznačuje zrychlení dodávky excitace do PSII i redukce Q_A spolu s inhibicí elektronového transportu za Q_A (Strasser et al., 2000). U listů ošetřených BAP a OH byl taktéž zaznamenán mírný nárůst těchto parametrů v porovnání s DMSO, ale u zbylých látek (tZ, TDZ a MTU) byly hodnoty $(dV/dt)_0$ a V_J srovnatelné s kontrolou. Je patrné, že látky tZ, TDZ a MTU úspěšně potlačily změny v dodávkách excitací do PSII způsobené indukovanou senescencí.



Obr. 16: Počáteční nárůst O-J chlorofylové fluorescence v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).

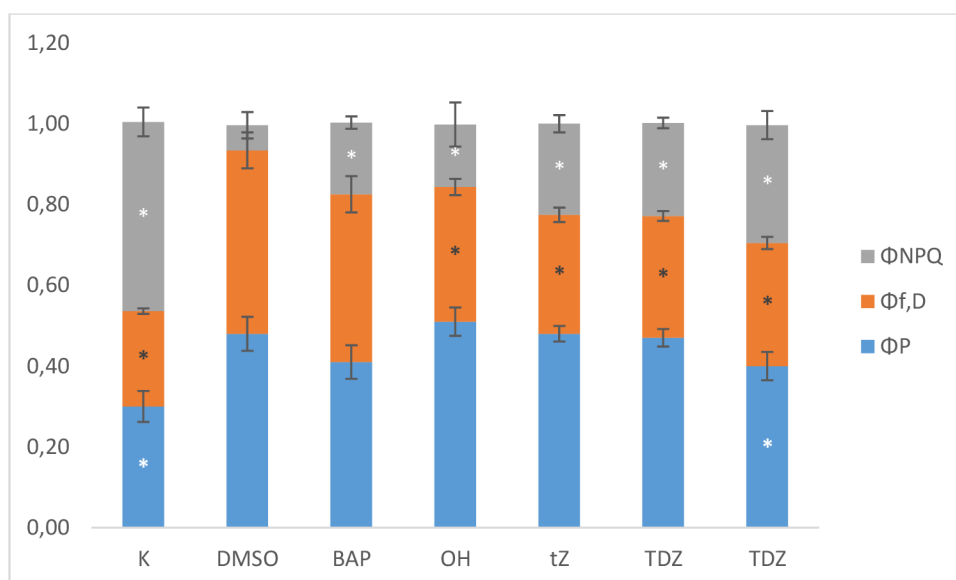


Obr. 17: Relativní variabilní chlorofylová fluorescence v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$).

K podobným poznatkům dospěla ve své disertační práci i Kučerová (2021), s tím rozdílem, že měření bylo prováděno na oddělených listech pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) a *Arabidopsis thaliana* L. (Col-0). Listy *Arabidopsis thaliana* L. inkubované v DMSO se ale za daných podmínek lišily svým chováním, kdy parametr $(dV/dt)_0$ výrazně poklesl a V_j se zvýšil na maximální hodnotu (=1), což naznačuje silné poškození PSII, taktéž minimální dodání excitací do PSII a zároveň vysoké míry inhibice přenosu elektronů z Q_A . Ale u pšenice došlo k téměř totožným výsledkům u listů inkubovaných v DMSO jako v této diplomové práci (Obr. 16 a 17). U varianty BAP došlo také ke zvýšení parametru V_j , ale u hodnoty parametru $(dV/dt)_0$ se v obou pracích mírně lišily. Hodnoty v Obr. 16 byly sice zvýšené, ale téměř srovnatelné s hodnotami naměřenými u DMSO. Hodnoty obou parametrů naměřené u listů inkubovaných v derivátu OH byly vzájemně srovnatelné. Drobné rozdíly v získaných datech byly nejspíše způsobeny odlišnou odrůdou *T. aestivum*, kdy měření v této diplomové práci probíhala na listech pšenice odrůdy Registana a Kučerová (2021) ve své disertační práci využila odrůdu Aranka, která je v laboratorních podmínkách častěji používána.

Vyhodnoceny byly také další parametry vypovídající o funkci fotosyntetického aparátu měřených vzorků. Konkrétně se jedná o hodnoty aktuálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (Φ_P), nefotochemické zhášení regulované světlem (Φ_{NPQ}) a

nefotochemické zhášení neregulované světlem (Φ_f,D) (Obr. 18). V případě Φ_P byly u listů inkubovaných v DMSO naměřeny vyšší hodnoty než u čerstvě oddělených kontrolních listů. U listů ošetřených roztoky CK a jejich derivátů byly hodnoty Φ_P srovnatelné s DMSO, s výjimkou varianty tZ, kde byl Φ_P mírně nižší. V případě Φ_{NPQ} byly u listů inkubovaných v DMSO naměřeny výrazně nižší hodnoty než u čerstvě oddělených kontrolních listů. U listů ošetřených roztoky CK a jejich derivátů byly hodnoty Φ_{NPQ} vyšší než u DMSO. V případě parametru Φ_f,D byly hodnoty naměřené u listů inkubovaných v DMSO výrazně vyšší než u u čerstvě oddělených kontrolních listů. Zatímco u listů ošetřených BAP bylo Φ_f,D srovnatelné s DMSO, u listů inkubovaných v ostatních CK a jejich derivátech bylo mírně nižší (Obr. 18).



Obr. 18: Parametry aktuálního kvantového výtěžku PSII (Φ_P), nefotochemického zhášení neregulovaného světlem (Φ_f,D) a nefotochemického zhášení regulovaného světlem (Φ_{NPQ}) v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* a během indukované senescence 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO ($P < 0,05$). Pro grafické znázornění bylo využito vztahu $\Phi_P + \Phi_f, D + \Phi_{NPQ} = 1$.

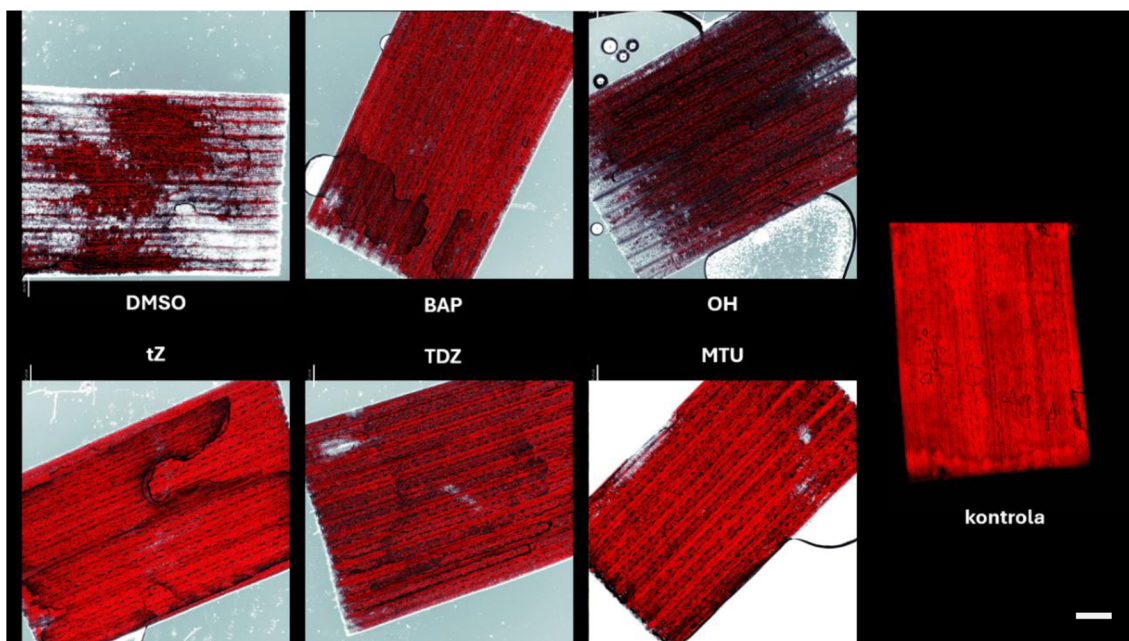
V případě Φ_P dochází obvykle vlivem indukované senescence ke snížení tohoto parametru (např. Kučerová 2015; Kučerová et al., 2020; Zemková 2024). Na Obr. 18 je ale patrné, že u listů inkubovaných v DMSO je hodnota Φ_P vyšší než u čerstvě oddělených kontrolních listů. Nicméně o poškození PSII u varianty DMSO, ke kterému zpravidla během senescence dochází (doplnit citaci), svědčí výrazně vyšší hodnota parametru Φ_f,D v porovnání s čerstvě oddělenými listy, která zároveň souvisí s výrazně nižším Φ_{NPQ} u varianty DMSO než u kontrolních listů. Prostřednictvím vyššího Φ_{NPQ} jsou listy schopny efektivněji zhášet přebytečnou energii, která zpravidla vede

k oxidativnímu poškození (a tím i k nárůstu Φ_f, D ; např. Kučerová et al., 2020). Aplikace CK a jejich derivátů (s výjimkou BAP, který byl srovnatelný s DMSO) nárůst Φ_f, D potlačila, což svědčí o jejich antisenescenčním účinku, který byl již dříve pozorován (např. Kučerová 2015; Kučerová et al., 2020; Zemková 2024). U listů inkubovaných v OH, tZ, TDZ a MTU je zároveň patrné zvýšení hodnoty Φ_{NPQ} podobně jako je tomu u kontrolních listů (Obr. 18).

5.3 Konfokální mikroskopie

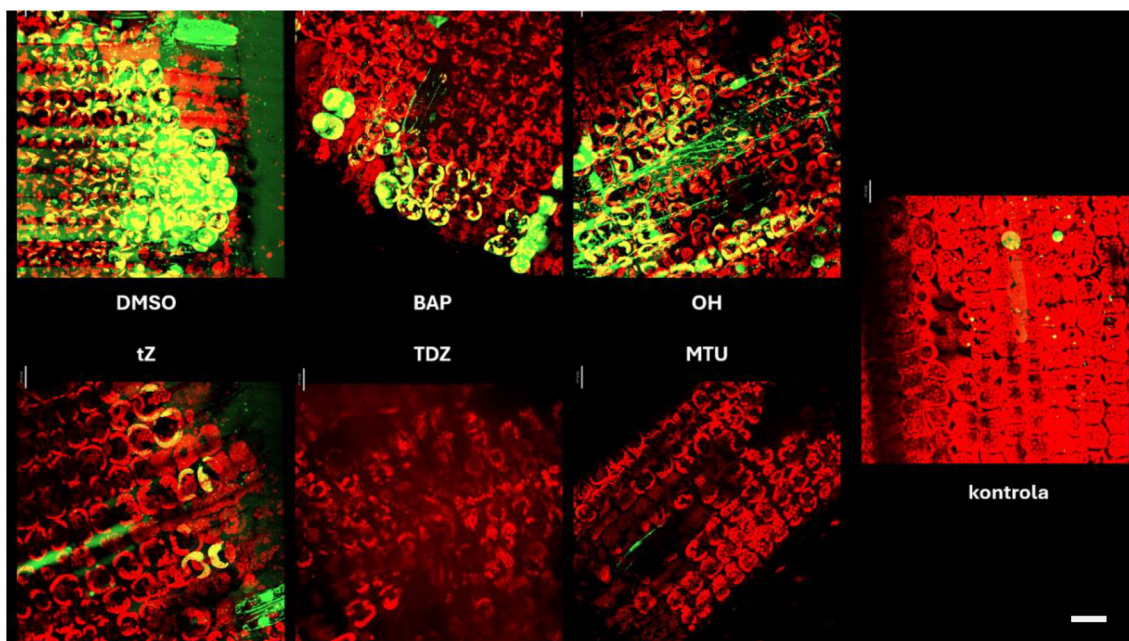
ROS mohou vznikat při běžných metabolických procesech, zejména při fotosyntéze a dýchání, kromě toho jsou ROS využívány jako signální molekuly v reakcích na stresové faktory (Karlsson et al., 2005; Yoshinaga et al., 2005). ROS mohou být generovány v chloroplastech, mitochondriích a jaderné oblasti svěřacích buněk průduchů (Samuilov et al., 2008) a dají se detekovat pomocí konfokálního mikroskopu (Li a kol., 2007). DCF slouží k vizualizaci ROS (Kristiansen et al., 2009).

Jako první byly pořízeny snímky využívající autofluorescence chlorofylu (Obr. 19), kde jsou na první pohled viditelné výrazné rozdíly mezi DMSO, jednotlivými CK a jejich deriváty a segmentem odděleným z čerstvé kontroly. Segment kontroly plně autofluoreskuje bez zjevných poškození či vakancí v preparátu. V segmentu inkubovaném v DMSO lze pozorovat oblasti, kde ve značné míře zcela chybí chloroplasty. Lze říct, že senescence je již v pokročilém stádiu. Chloroplasty ve většině vzorku zcela chybí. U vzorku inkubovaného v BAP jsou v periférii pozorovaného segmentu opět patrné oblasti, kde chybějí chloroplasty, ale ne v takové míře jako tomu bylo u DMSO. Vzorek ošetřený OH vykazuje také ztráty chloroplastů ve větší míře, a to ještě výraznější než u BAP, ale v porovnání s DMSO je segment lépe zachovalý. Vzorek inkubovaný v tZ je ve velmi dobré kondici (vizuálně srovnatelný s kontrolou). U vzorků TDZ a MTU pozorujeme nahodile rozmístěné oblasti (např. uprostřed pozorovaného segmentu), kde chybí chloroplasty. Tyto oblasti nejspíš vznikly z důvodu mechanického poškození při přípravě vzorků před umístěním do mikroskopu.



Obr. 19: Snímky z konfokálního mikroskopu části segmentu čerstvě oddělených listů (kontrola) *T. aestivum* (cv. Registana) a 6. den po oddělení a následné inkubaci v tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Měřítka o velikosti 527,47 μm , zvětšení 10x. Při zaznamenávání snímku bylo využito autofluorescence chlorofylu.

U čerstvé konroly nebyla pozorována žádná fluorescence DCF sloužícího k vizualizaci ROS (Obr. 20). Zelenožluté kapičky, které jsou na snímku viditelné, jsou pouze ulpělé zbytky na krycím sklíčku z inkubačního roztoku. Ve vzorku DMSO vidíme nejvyšší fluorescenci DCF. Důvodem je, že vzorek inkubovaný v DMSO je již v pokročilém stádiu senescence, kde dochází vlivem rozkladných procesů k tvorbě ROS. Oproti tomu ve variantě BAP většina DCF fluoreskovala převážně v chloroplastech vyskytujících se na řezu. Dále je také viditelná žíla, u které došlo vlivem kapilárních jevů k nasátí DCF. Následuje OH, kde se byla pozorovatelná vyšší míra fluorescence, ale zároveň nižší než u DMSO. Ve vzorku inkubovaném v tZ došlo taktéž k fluorescenci DCF, ale zdaleka ne v takové míře jako u DMSO. U vzorků TDZ a MTU nepozorujeme žádnou fluorescenci DCF.



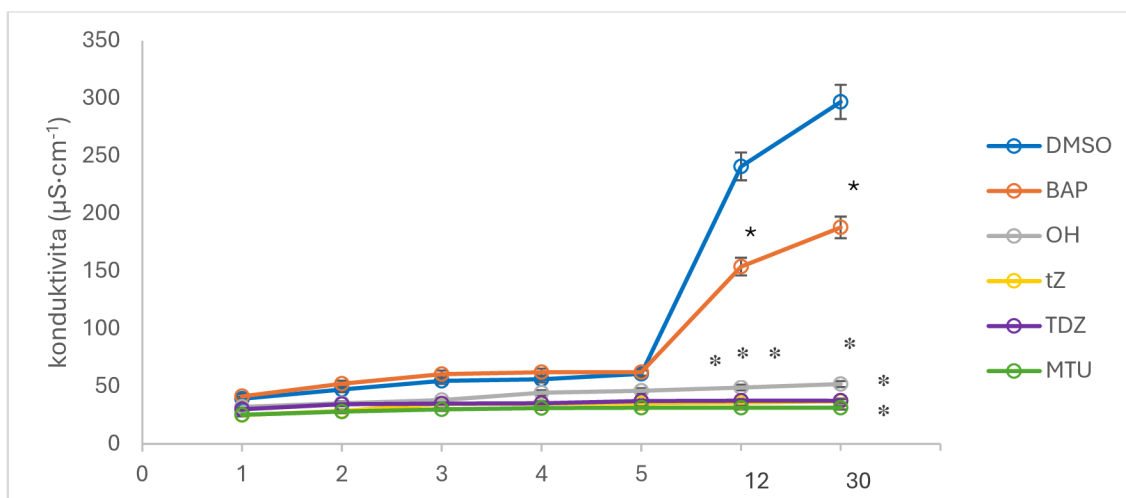
Obr. 20: *In vivo* imaging reaktivních forem kyslíku čerstvě oddělených listů (kontrola) *T. aestivum* (cv. Registana) 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Oddělený preparát byl inkubován v exsíkátoru po dobu 30 min v DCF za sníženého tlaku. Měřítka o velikosti 26,35 μm , zvětšení 40x. Při fotografování bylo využito autofluorescence chlorofylu.

Kučerová (2021) ve své disertační práci pozorovala autofluorescenci u oddělených listů *T. aestivum* inkubovaných v DMSO, BAP a OH. Ve své práci použila odrůdu Aranka, která ale vykazuje částečně odlišné vlastnosti než odrůda Registana použitá v této práci. Autofluorescence u listů pšenice Aranka při inkubaci v DMSO byla srovnatelná s Registanou, ale u listů inkubovaných v BAP a OH bylo dosaženo opačných výsledků, kdy listů Aranky byly chloroplasty zachovalejší při inkubaci v OH než v BAP, v případě listů pšenice Registana je tomu naopak.

5.4 Ion leakage

Pro stanovení míry propustnosti membrán měřených vzorků byla využita metoda *ion leakage*, kde bylo měření prováděno až po dobu 30 hodin, aby došlo k dostatečnému poškození membrán. Konduktivita roztoku byla měřena po 1, 2, 3, 4, 5, 12 a 30 hodinách od počátku působení světelného záření. Vystavení listů světelnému záření o vysoké intenzitě má zpravidla za následek silné oxidativní poškození a s tím související poškození buněčných membrán. Konduktivita měřeného roztoku narůstá s časem až do jeho postupného ustálení (Kocheva et al., 2014). Tento jev je možné pozorovat na Obr. 21, kde konduktivita měřeného roztoku narůstá dobou, po kterou jsou listové segmenty vystaveny vysokému světlu.

U listů ošetřených DMSO začíná konduktivita roztoku strmě narůstat po 5 hodinách od počátku měření. Tento jev vypovídá o fatálním poškození buněčných membrán a „vylití“ obsahu buňky do deionizované vody, ve které byly vzorky inkubovány po celou dobu probíhajícího měření. Podobný jev je pozorovatelný i u listů inkubovaných v BAP, kde taktéž po 5 hodinách dochází k prudkému nárůstu konduktivity roztoku. Působení DMSO a BAP v kombinaci s nadměrným světelným ozářením má za následek nadměrnou excitaci fotosyntetického aparátu a s tím související oxidativní poškození (Vlčková et al., 2006; Prokopová et al., 2010). V souvislosti s daty získanými během měření chlorofylové fluorescence (kapitola 5.2 Funkce PSII) a konfokální mikroskopie (Obr. 20) víme, že listy inkubované v DMSO mají poškozený fotosyntetický aparát již vlivem samotné senescence. U vzorku inkubovaného v OH dochází k pozvolnému úniku iontů do okolí. Podobný trend sledujeme i u varianty tZ a TDZ. Vzorek inkubovaný v MTU vykazuje nejlepší výsledky, ionty unikají v minimálním množství. U vzorků OH, tZ, TDZ a MTU došlo k ochraně buněčných membrán před následky indukované senescence v kombinaci se stresem vysokým světlem.



Obr. 21: Konduktivita deionizované vody, ve které jsou umístěny listové segmenty *T. aestivum* (cv. Registana) 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 μmol.l⁻¹ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Jsou uvedeny mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO (P < 0,05).

Zemková ve své bakalářské práci prováděla měření na rostlinách *H. vulgare* pěstovaných za mírně odlišných podmínek, ale dospěla k podobným výsledkům jako v této diplomové práci. V případě varianty DMSO došlo po 5 hodinách k velmi výraznému zvýšení konduktivity měřeného roztoku stejně jako při měřeních prováděných v rámci této práce. Taktéž BAP po 5 hodinách vykazoval značně vyšší hodnoty konduktivity. U roztoků tZ,

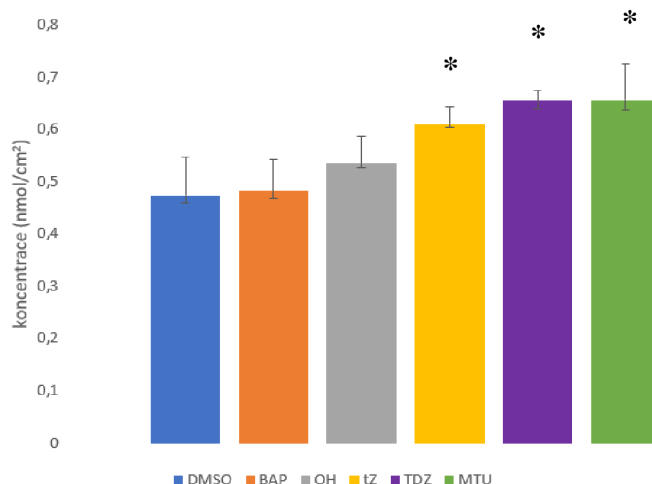
TDZ, MTU a OH nabývala konduktivita roztoku navzájem podobných hodnot a také podobného trendu jako u *T. aestivum* (cv. Registana).

5.5 Stanovení obsahu MDA

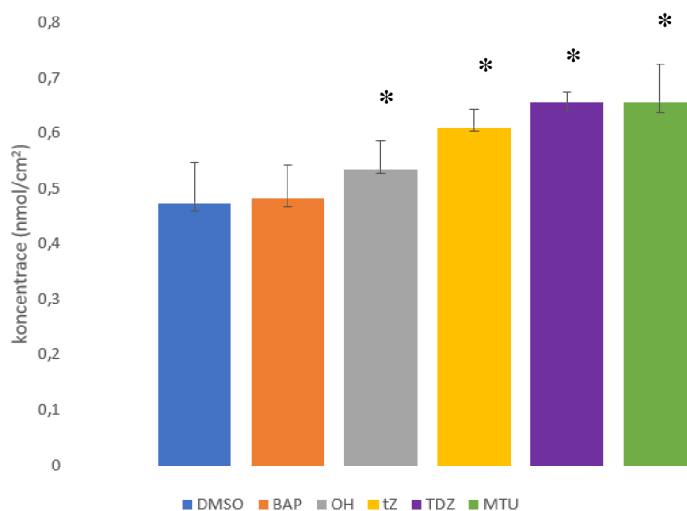
V organismech se během běžných metabolických procesů tvoří reaktivní formy kyslíku (ROS). Za normálních podmínek je jejich produkce a koncentrace regulována pomocí antioxidantů. Ovšem za stresových podmínek je kapacita regulačních mechanismů zpravidla překročena a koncentrace ROS v buňkách a organismu roste. Koncentrace malondialdehydu (MDA) do značné míry koreluje s mírou oxidativního poškození membrán, proto se obsah MDA často používá jako marker tohoto poškození (Prasad et al., 2016).

Vzhledem k tomu, že se během senescence může měnit plocha i hmotnost listového segmentu (např. závislost na rozdílných inkubačních podmínkách), byly použity oba přepočty (vztažené k hmotnosti a ploše) ke zjištění obsahu MDA v měřeném vzorku. Zároveň bylo i ověřeno, zda jsou výsledné hodnoty obsahu MDA ovlivněny senescencí či nikoliv.

Nejnižší obsah MDA vztažený na plochu i hmotnost byl naměřen u DMSO (Obr. 22 a 23). U variant BAP a OH je obsah MDA vztažený k hmotnosti srovnatelný s DMSO. Obsah MDA vztažený na hmotnost je pak srovnatelný u listů inkubovaných v BAP a DMSO. U vzorků variant tZ, TDZ a MTU je množství MDA vztažené na hmotnost vyšší než u DMSO, přičemž u TDZ je nejvyšší. U obsahu MDA vztaženého na plochu je MDA vyšší u vzorků inkubovaných v OH, tZ, TDZ a MTU, kde právě u TDZ a MTU nabývá nejvyšších hodnot.



Obr. 22: Obsah MDA vztažený na hmotnost během indukované senescence v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 µmol.l⁻¹ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO (P < 0,05).



Obr. 23: Obsah MDA vztažený na plochu během indukované senescence v čerstvě oddělených listech *T. aestivum* 6. den po oddělení a následné inkubaci ve tmě (21 °C) v roztocích 0,02% DMSO a 10 µmol.l⁻¹ OH, TDZ, tZ, BAP, MTU. Vykreslení mediánů naměřených hodnot a odchylek v podobě kvartilů. Symbolem (*) jsou označeny významné statistické rozdíly mezi vybraným vzorkem a DMSO (P < 0,05).

Výsledky jsou v rozporu s výše zmíněnou teorií, kdy by měl být nejvyšší obsah MDA u listů ošetřených DMSO a případně BAP a nejnižší u variant TDZ a MTU. Tento předpoklad vychází mj. ze snímků z konfokálního mikroskopu (Obr. 20), kde fluorescence DCF signalizující přítomnost ROS byla nejvyšší u listů inkubovaných v DMSO a nejnižší u MTU. Je vysoce pravděpodobné, že u listů inkubovaných v DMSO byla jejich funkčnost poškozena natolik, že již nedocházelo k produkci MDA v takové

míře jako u listů, které nebyly v tak pokročilé fázi senescence. Můžeme se domnívat, že je tomu tak i u ostatních listů inkubovaných v CK a jejich derivátech.

K podobným výsledkům dospěla i Zemková (2024) ve své bakalářské práci, kde byl měřen obsah MDA v segmentech *H. vulgare* inkubovaných ve tmě ve stejných CK a jejich derivátech, jako byly použity v této práci. U listů inkubovaných v DMSO byly také zaznamenány nižší hodnoty obsahu MDA oproti listům inkubovaným v některých CK a jejich derivátech. Nejvyšší hodnoty obsahu MDA byly stejně jako v této práci naměřeny u varianty MTU. Zemková také vyhodnotila výsledky obsahu MDA u čerstvé kontroly, což se v této práci nestalo. Dokázala díky tomu dobře popsat, zda docházelo při jejím měření k peroxidaci lipidů či nikoliv. Došla k závěru, že u žádné varianty pěstované ve tmě nebyl zaznamenán nárůst obsahu MDA, nedocházelo tedy k peroxidaci lipidů ve větší míře (Vlčková et al., 2006).

Pokud jsou oddělené listové segmenty inkubovány ve tmě v roztocích v CK BAP, tZ a TDZ a jejich derivátech OH a MTU, může dojít v některých případech ke zpomalení senescence, a to včetně zpomalení či inhibice změn týkajících se buněčných membrán. U látek BAP a OH bylo zjištěno, že zpomalují průběh senescence, ale ne v takové míře jako je tomu při použití na jiných rostlinných druzích. tZ nedosahoval nejhorsích, ale ani nejlepších výsledků, byl schopen oddálit senescenci, ale ne tak účinně jako např. TDZ či MTU. U TDZ a MTU je možné konstatovat, že tyto látky nejvíce zpomalují průběh senescence u oddělených listů *T. aestivum* (cv. Registana) a vykazují největší ochranný účinek na buněčné membrány. Obecně platí, že všechny použité CK a jejich deriváty vykazovaly antisenesescenční účinky, lišily se ale svou efektivitou.

Je také důležité zmínit, že účinky popsané v této práci jsou specifické pro měření prováděná na pšenici jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Registana).. Pro každý rostlinný druh, ale i odrůdu (jak je ukázáno v této diplomové práci) jsou pro oddálení senescence vhodnější jiné látky., Např. u *Triticum aestivum* L. cv. Aranka, dochází k největšímu potlačení senescence látkou OH (Kučerová et al., 2020), která ale v případě *Triticum aestivum* L. cv. Registana nedosahovala nejlepších výsledků. Pro budoucí experimenty by bylo vhodné zjištěné vlastnosti otestovat i v externích podmínkách, které zahrnují nejruznější vlivy biotického a abiotického stresu.

6 Závěr

Je všeobecně známo, že senescence listů rostlin může být do jisté míry potlačena exogenní aplikací cytokininů (CK). Zároveň je také důležité zmínit i opačný případ, kdy za určitých podmínek mohou mít aplikované látky negativní účinek a senescenci urychlit. CK mohou mít také nežádoucí efekt na vývoj kořenového systému. V návaznosti na výše zmíněné poznatky existují snahy o přípravu a následnou aplikaci sloučenin na bázi CK (CK derivátů), které tyto negativní účinky postrádají a mají další vylepšené vlastnosti. Oddálení senescence je důležité hned z několika důvodů, kdy nejčastějším z nich je delší životnost rostliny a s tím související vyšší výnos.

Hlavním cílem této práce bylo zhodnotit a porovnat účinek CK, 6-benzylaminopurinu (BAP), *trans*-zeatinu (tZ), thidiazuronu (TDZ), a jejich derivátů 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (OH) a 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)močoviny (MTU) na změny indukované senescencí u primárních listů pšenice jarní (*Triticum aestivum* L. cv. Registana), a to včetně změn týkajících se stability buněčných membrán. Z použitých látek se nejvíce osvědčily TDZ a MTU, které byly v oddálení senescence nejúčinnější. Nejméně se osvědčily látky BAP a OH, kde u vzorků, které jimi byly ošetřeny došlo obecně k největší míře senescence, viditelné již pouhým okem. Látka tZ se pohybovala svými antisenescenčními vlastnostmi někde na pomezí, kdy nebyly po jejím použití pozorovány žádné extrémy, ať už v negativním či pozitivním smyslu. Nicméně je důležité zmínit, že všechny použité látky byly schopné senescenci oddálit, lišily se však svou efektivitou. Při hodnocení vlivu CK a jejich derivátů na buněčné membrány pomocí metody *ion leakage* a konfokálního mikroskopu, bylo zjištěno, že látky TDZ a MTU byly v zachování integrity a funkce buněčných membrán během indukované senescence nejúčinnější.

7 Seznam použité literatury

- Abdelghani MO, Suty L, Chen JN, Renaudin JP, de la Serve BT (1991) Cytokinins modulate the steady-state levels of light-dependent and light-independent proteins and mRNAs in tobacco cell suspensions. *Plant Science* 77(1): 29-40. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90178-B](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90178-B).
- Ahmad N, Faisal M (2018) *Name Reactions: Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. 1st ed., Springer Singapore. Singapore, 491 stran. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3>
- Ananieva EA, Gillaspay GE, Ely A, Burnette RN, Erickson FL (2008) Interaction of the WD40 Domain of a Myoinositol Polyphosphate 5-Phosphatase with SnRK1 Links Inositol, Sugar, and Stress Signaling. *Plant Physiology* 148(4): 1868-1882. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130575>
- Antoniadi I, Novák O, Gelová Z (2020) Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature Communications* 11: 4284. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17700-9>
- Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ (2009) Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment* 32(9): 1147-1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01940.x>
- Austin JR, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18(7): 1693-1703. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039859>
- Bainbridge K, Sorefan K, Ward S, Leyser O (2005) Hormonally controlled expression of the Arabidopsis MAX4 shoot branching regulatory gene. *The Plant Journal* 44(4): 569-580. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02548.x>
- Banerji D, Laloraya MM (1967) Chlorophyll Formation In Isolated Pumpkin Cotyledons In The Presence Of Kinetin And Chloramfenicol. *Plant And Cell Physiology* 8: 263-268. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a079259>
- Batt BT, Woolhouse HW (1975) Changing Activities During Senescence And Sites Of Synthesis Of Photosynthetic Enzymes In Leaves Of The Labiate, *Perilla frutescens* L. *Britt. Journal of Experimental Botany* 26(93): 569-579. <http://jxb.oxfordjournals.org/>
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim YS, Penfold CA, Jenkins D, Zhang C, Morris K, Jenner C, Jackson S, Thomas B, Tabrett A, Legaie R, Moore JD, Wild DL, Buchanan-Wollaston V (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* 23(3): 873-894. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083345>
- Brenner WG, Ramireddy E, Heyl A, Schmülling T (2012) Gene regulation by cytokinin in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 3(8): 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00008>
- Brown J H, Paliyath G, Thompson JE (1991) Chapter Four - Physiological Mechanisms of Plant Senescence. In: *Plant Physiology* (Steward FC ed.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, U.S.A., 227-275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-668610-4.50011-2>
- Cary AJ, Liu W, Howell SH (1995) Cytokinin Action Is Coupled To Ethylene In Its Effects On The Inhibition Of Root And Hypocotyl Elongation In Arabidopsis thaliana Seedlings. *Plant Physiology* 107: 1075-1082. <https://academic.oup.com/plphys/article/107/4/1075/6069069>
- Causin, HF, Jauregui RN, Barneix AJ (2006) The effect of light spectral quality on leaf senescence and oxidative stress in wheat. *Plant Science* 171(1): 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.009>

- Chae HS, Faure F, Kieber JJ (2003) The *eto1*, *eto2*, and *eto3* Mutations and Cytokinin Treatment Increase Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis* by Increasing the Stability of ACS Protein. *The Plant Cell* 15(2): 545-559. <https://doi.org/10.1105/tpc.006882>
- Chen J, Zhu X, Ren J, Qiu K, Li Z, Xie Z, Gao J, Zhou X, Kuai B (2017) Suppressor of overexpression of CO 1 negatively regulates dark-induced leaf degreening and senescence by directly repressing pheophytinase and other senescence-associated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 173(3): 1881-1891. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01457>
- Chen M (2014) Chlorophyll modifications and their spectral extension in oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* 83: 317-340. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-162943>
- Chen M, Maodzeka A, Zhou L, Ali E, Wang Z, Jiang L (2014) Removal of DELLA repression promotes leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Science* 219-220: 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.11.016>
- Chernyad'ev II, Monakhova OF (2003) Effects of Cytokinin Preparations on the Pools of Pigments and Proteins of Wheat Cultivars Differing in Their Tolerance to Water Stress. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39: 524-531. <https://doi.org/10.1023/A:1025413122702>
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M (1994) A Role For Cytokinins In De-Etiolation In *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 104: 339-347. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.339>
- Christopher JT, Manschadi AM, Hammer GL, Borrell AK (2008) Developmental and physiological traits associated with high yield and stay-green phenotype in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 59(4): 354-364. <https://doi.org/10.1071/AR07193>
- Cortleven A, Schmülling T (2015) Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* 66(16): 4999-5013. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv132>
- Criado MV, Caputo C, Roberts IN, Castro MA, Barneix AJ (2009) Cytokinin-induced changes of nitrogen remobilization and chloroplast ultrastructure in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* 166(16): 1775-1785. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.05.007>
- Del Duca S, Serafini-Fracassini D, Cai G (2014) Senescence and programmed cell death in plants: Polyamine action mediated by transglutaminase. *Frontiers in Plant Science* 5(120): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00120>
- Dertinger U, Schaz U, Schulze ED (2003) Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum* 119: 19-29. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00095.x>
- Diaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, Santamaria ME, González-Melendi P, Martínez M, Diaz I (2016) Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology* 39(3): 329-338. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0015>
- Distelfeld A, Awni R, Fischer AM (2014) Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* 65(14): 3783-3798. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert477>
- Dwivedi SK, Arora A, Singh VP, Singh GP (2018) Induction of water deficit tolerance in wheat due to exogenous application of plant growth regulators: membrane stability, water relations and photosynthesis. *Photosynthetica* 56(2): 478-486. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0695-2>
- Dyer TA, Osborne DJ (1971) Leaf Nucleic Acids: II. Metabolism During Senescence And The Effect Of Kinetin. *Journal of Experimental Botany* 22(72): 552-560. <http://jxb.oxfordjournals.org/>
- Eberhard S, Finazzi G, Wollman FA (2008) The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics* 42: 463-515. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452>

- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* 140(7): 1373-1383. <https://doi.org/10.1242/dev.086371>
- Evans JR, Morgan PB, von Caemmerer S (2017) Light Quality Affects Chloroplast Electron Transport Rates Estimated from Chl Fluorescence Measurements. *Plant and Cell Physiology* 58(10): 1652-1660. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx103>
- Fang JJ, Ma WY, Zhao XQ, He X, Li B, Tong YP, Li ZS (2012) Lower Canopy Temperature is Associated with Higher Cytokinin Concentration in the Flag Leaf of Wheat. *Crop Science* 52: 2743-2756. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0163>
- Feng L, Leaf H (2002) Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *Journal of Controlled Release* 78(1-3): 259-266. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00494-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00494-1)
- Field CB, Ball JT, Berry JA (1989) Photosynthesis: principles and field techniques. In: *Plant Physiological Ecology* (Percy RW, Ehleringer JR, Mooney HA, Rundel PW ed.) Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2221-1_11
- Fleming GR, van Grondelle R (1994) The Primary Steps of Photosynthesis. *Physics Today* 47(2): 48-55. <https://doi.org/10.1063/1.881413>
- Fletcher RA, Teo C, Ali A (1973) Stimulation of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by benzyladenine. *Canadian Journal of Botany* 5: 937-939. <https://doi.org/10.1139/b73-117>
- Fu YH, Piao S, Delpierre N, Hao F, Hänninen H, Liu Y, Sun W, Janssens IA, Campioli M (2018) Larger temperature response of autumn leaf senescence than spring leaf-out phenology. *Global Change Biology* 24(5): 2159-2168. <https://doi.org/10.1111/gcb.14021>
- Gaju O, Allard V, Martre P, Snape JW, Heumez E, LeGouis J, Moreau D, Bogard M, Griffiths S, Orford S, Hubbart S, Foulkes MJ (2011) Identification of traits to improve the nitrogen-use efficiency of wheat genotypes. *Field Crops Research* 123(2): 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.05.010>
- Gan S (2003) Mitotic And Postmitotic Senescence In Plants. *Science of Aging Knowledge Environment* 2003(38): 1-10. <https://doi.org/10.1126/sageke.2003.38.re7>
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition Of Leaf Senescence By Autoregulated Production of Cytokinin. *Science* 270: 1986-1988. <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1986>
- Gao S, Gao J, Zhu X, Song Y, Li Z, Ren G, Zhou X, Kuai B (2016) ABF2, ABF3, And ABF4 Promote ABA-Mediated Chlorophyll Degradation And Leaf Senescence By Transcriptional Activation Of Chlorophyll Catabolic Genes And Senescence-Associated Genes In Arabidopsis. *Molecular Plant* 9(9): 1272-1285. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.006>
- Gepstein S, Glick BR (2013) Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Molecular Biology* 82(6): 623-633. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0038-z>
- Gerhardt B (1992) Fatty acid degradation in plants. *Progress in Lipid Research* 31(4): 417-446. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(92\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0163-7827(92)90004-3)
- Göhre V, Jones AME, Sklenář J, Robatzek S, Weber APM (2012) Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1083-1092. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-11-0301>
- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 18: 277-284. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00451.x>
- Górny, A G, Garczyński S (2002) Genotypic and nutrition-dependent variation in water use efficiency and photosynthetic activity of leaves in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics* 43(2): 145-160. <https://doi.org/10.1007/BF03194628>

- Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K (2008) Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* 10: 37-49. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00114.x>
- Guo Y, Ren G, Zhang K, Li Z, Miao Y, Guo H (2021) Leaf senescence: progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture* 1(5): 1-25. <https://doi.org/10.1186/s43897-021-00006-9>
- Ha S, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science* 17(3): 172179. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.12.005>
- Hai NN, Chuong NN, Tu NHC, Kisiala A, Hoang XLT, Thao NP (2020) Role and regulation of cytokinins in plant response to drought stress. *Plants* 9(422): 1-19. <https://doi.org/10.3390/plants9040422>
- Hensel L, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB (1993) Developmental and Age-Related Processes That Influence the Longevity and Senescence of Photosynthetic Tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 5: 553-564. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.5.553>
- Horie Y, Ito H, Kusaba M, Tanaka R, Tanaka A (2009) Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 284(26): 17449-17456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008912>
- Hwang I, Sheen, J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389. <https://doi.org/10.1038/35096500>
- Jameson PE, Song J (2016) Cytokinin: A key driver of seed yield. *Journal of Experimental Botany* 67(3): 593-606. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv461>
- Janečková H, Husičková A, Ferretti U, Prčina M, Pilařová E, Plačková L, Pospíšil P, Doležal K, Špundová M (2018) The interplay between cytokinins and light during senescence in detached *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell and Environment* 41(8): 1870-1885. <https://doi.org/10.1111/pce.13329>
- Jespersen D, Yu J, Huang B (2015) Metabolite responses to exogenous application of nitrogen, cytokinin, and ethylene inhibitors in relation to heat-induced senescence in creeping bentgrass. *Public Library of Science* 10(3): 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123744>
- Karlsson M, Melzer M, Prokhorenko I, Johansson T, Wingsle G (2005) Hydrogen peroxide and expression of hipI-superoxide dismutase are associated with the development of secondary cell walls in *Zinnia elegans*. *Journal of Experimental Botany* 56: 2085-2093. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri207>
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J (2007) In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* 102: 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.01.002>
- Kieber JJ, Schaller GE (2014) Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, Vol. 2014, No. 12, Chapel Hill, U.S.A. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Kim H, Kim Y, Yeom M, Lim J, Nam HG (2016) Age-associated circadian period changes in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany* 67(9): 2665-2673. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw097>
- Kim HJ, Park JH, Kim J, Kim JJ, Hong S, Kim J, Kim JH, Woo HR, Hyeon C, Lim PO, Nam HG, Hwang D (2018) Time-evolving genetic networks reveal a nac troika that negatively regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(21): 4930-4939. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721523115>

- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(3): 814-819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505150103>
- Kim K, Ryu H, Cho YH, Scacchi E, Sabatini S, Hwang I (2012) Cytokinin-facilitated proteolysis of *Arabidopsis* Response Regulator 2 attenuates signaling output in two-component circuitry. *The Plant Journal* 69(6): 934-945. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04843.x>
- Kocheva KV, Georgiev GI, Kochev VK (2014) An improvement of the diffusion model for assessment of drought stress in plant tissues. *Physiologia Plantarum* 150(1): 88-94. <https://doi.org/10.1111/ppl.12074>
- Koprna R, De Diego N, Dundáková L, Spíchal L (2016) Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 24(3): 484-492. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.12.022>
- Koprna R, Humplik JF, Špišek Z, Bryksová M, Zatloukal M, Mik V, Novák O, Nisler J, Doležal K (2021) Improvement of tillering and grain yield by application of cytokinin derivatives in wheat and barley. *Agronomy* 11: 1-15. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11010067>
- Kristiansen KA, Jensen PE, Møller IM, Schulz A (2009) Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H2DCFDA and confocal laser microscopy. *Physiologia Plantarum* 136: 369-383. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01243.x>
- Kučerová Z, Rác M, Mikulík J, Plíhal O, Pospíšil P, Bryksová M, Sedlářová M, Doležal K, Špundová M (2020) The Anti-Senescence Activity of Cytokinin Arabinosides in Wheat and *Arabidopsis* Is Negatively Correlated with Ethylene Production. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 8109 <https://doi.org/10.3390/ijms21218109>
- Kučerová Z. (2015) Vliv derivátů cytokininů odvozených od močoviny na změny fotosyntetických parametrů během indukované senescence. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika
- Kučerová Z. (2021) Biological Activity of Substances with Strong Antisenescence Effect. Disertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445: 652-655. <https://doi.org/10.1038/nature05504>
- Kuroda H, Masuda T, Fusada N, Ohta H, Takamiya KI (2001) Cytokinin-Induced Transcriptional Activation Of NADPH-protochlorophyllide Oxidoreductase Gene In Cucumber. *Journal of Plant Research* 114: 1-7. <https://doi.org/10.1007/PL00013963>
- Kusnetsov VV, Oelmüller R, Sarwat MI (1994) Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels. *Planta* 194: 318-327. <https://doi.org/10.1007/BF00197531>
- Lacuesta M, Saiz-Fernández I, Podlešáková K, Miranda-Apodaca J, Novák O, Doležal K, De Diego N (2018) The trans and cis zeatin isomers play different roles in regulating growth inhibition induced by high nitrate concentrations in maize. *Plant Growth Regulation* 85: 199-209. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0383-7>
- Latif S, Wang L, Khan J, Ali Z, Sehgal SK, Ali Babar M, Wang J, Quraishi UM (2020) Deciphering the role of stay-green trait to mitigate terminal heat stress in bread wheat. *Agronomy* 10: 1-23. <https://doi.org/10.3390/agronomy10071001>
- Lazár D (2015) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* 175: 131-147. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.10.021>

- Lee DJ, Jin-Young P, Ku SJ, Ha YM, Kim S, Kim MD, Oh MH, Kim J (2007) Genome-wide expression profiling of *Arabidopsis* Response Regulator 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 115-137. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0177-2>
- Lee SC, Luan S (2012) ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell and Environment* 35: 53-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02426.x>
- Lerbs S, Lerbs W, Klyachko NL (1984) Gene expression in cytokinin-and light-mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 162: 289-298. <https://doi.org/10.1007/BF00396739>
- Letham DS (1973) Cytokinins from *Zea Mays*. *Phytochemistry* 12: 2445-2455. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80453-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80453-4)
- Li B, Xing D, Zhang L (2007) Involvement of NADPH oxidase in sulfur dioxide-induced oxidative stress in plant cells. *Photochemistry and Photobiology* 6: 628-634. <https://doi.org/10.1039/B618041H>
- Li Z, Zhang Y, Zou D, Zhao Y, Wang HL, Zhang Y, Xia X, Luo J, Guo H, Zhang Z (2020) LSD 3.0: A comprehensive resource for the leaf senescence research community. *Nucleic Acids Research* 48: 1069-1075. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz898>
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58: 115-136. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316>
- Liu L, Li H, Zeng H, Cai Q, Zhou X, Yin C (2016) Exogenous Jasmonic Acid And Cytokinin Antagonistically Regulate Rice Flag Leaf Senescence By Mediating Chlorophyll Degradation, Membrane Deterioration, And Senescence-Associated Genes Expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 35: 366-376. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9539-0>
- Ma X, Zhang J, Huang B (2016) Cytokinin-mitigation of salt-induced leaf senescence in perennial ryegrass involving the activation of antioxidant systems and ionic balance. *Environmental and Experimental Botany* 125: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.01.002>
- Martínez DE, Bartoli CG, Grbic V, Guaiamet JJ (2007) Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany* 58(5): 1099-1107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl270>
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE (2005) Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 3007-3018. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035451>
- Masuda T, Ohta H, Shioi Y, Tsuji H, Takamiya KI (1995) Stimulation Of Glutamyl-tRNA Reductase Activity By Benzyladenine In Greening Cucumber Cotyledons. *Plant Cell Physiology* 36(7): 1237-1243. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067009>
- Mayta ML, Hajirezaei MR, Carrillo N, Lodeyro AF (2019) Leaf senescence: the chloroplast connection comes of age. *Plants* 8(495): 1-18. <https://doi.org/10.3390/plants8110495>
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 55: 853-867. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2142-1>

- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad M, Spichal L (2011) N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* 72: 821-831. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.002>
- Miller CO, Skoog F, Okumura FS, von Saltza MH, Strong FM (1956) Isolation, Structure And Synthesis Of Kinetin, A Substance Promoting Cell Division. *Journal of the American Chemical Society* 78: 1375-1380. <https://doi.org/10.1021/ja01588a032>
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, van Breusegem F (2011) ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science* 16: 300-309. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007>
- Morris K, Soheila AHM, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* 23(5): 677-685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00836.x>
- Muller B, Sheen J (2007) Advances In Cytokinin Signaling. *Science* 318(5847): 68-69. <https://doi.org/10.1126/science.1147314>
- Müller T, Ulrich M, Ongania KH, Kräutler B (2007) Colorless tetrapyrrolic chlorophyll catabolites found in ripening fruit are effective antioxidants. *Angewandte Chemie - International Edition* 46: 8699-8702. <https://doi.org/10.1002/anie.200703587>
- Munné-Bosch S, Alegre L (2004) Die and let live: Leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31(3): 203-216. <https://doi.org/10.1071/FP03236>
- Mur LAJ, Aubry S, Mondhe M, Kingston-Smith A, Gallagher J, Timms-Taravella E, James C, Papp I, Hörtensteiner S, Thomas H, Ougham H (2010) Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 188(1): 161-174. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03377.x>
- Nishiyama R, Watanabe Y, Fujita Y, Le DT, Kojima M, Werner T, Vankova R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Kakimoto T, Sakakibara H, Schmölling T, Tran LSP (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell* 23: 2169-2183. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087395>
- Nisler J, Kučerová Z, Koprna R, Sobotka R, Slivková J, Rossall S, Špundová M, Husičková A, Pilný J, Tarkowská D, Novák O, Škrabišová M, Strnad M (2023) Urea derivative MTU improves stress tolerance and yield in wheat by promoting cyclic electron flow around PSI. *Frontiers in Plant Science* 14: 1131326. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1131326>
- Nisler J, Zatloukal M, Sobotka R, Pilný J, Zdvihalová B, Novák O, Strnad M, Spichal L (2018) New urea derivatives are effective anti-senescence compounds acting most likely via a cytokinin-independent mechanism. *Frontiers in Plant Science* 9: 1225. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01225>
- Noodén LD (1988a) *Abscisic Acid, Auxin, and Other Regulators of Senescence*. Academic Press, San Diego, U.S.A. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-520920-5.50016-x>
- Noodén LD, Penney JP (2001) Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany* 52: 2151-2159. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2151>
- Noodén LD (1988b) *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press, San Diego, U.S.A. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-520920-5.50007-9>
- Pavlović I, Petřík I, Tarkowská D, Lepeduš H, Vujčić Bok V, Radić Brkanac S, Novák O, Salopek-Sondi B (2018) Correlations between phytohormones and drought tolerance in selected brassica

- crops: Chinese cabbage, white cabbage and kale. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2866): 1-23. <https://doi.org/10.3390/ijms19102866>
- Penmetsa RV, Uribe P, Anderson J, Lichtenzveig J, Gish JC, Nam YW, Engstrom E, Xu K, Sckisel G, Pereira M, Baek JM, Lopez-Meyer M, Long SR, Harrison MJ, Singh KB, Kiss GB, Cook DR (2008) The Medicago truncatula ortholog of *Arabidopsis* EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *The Plant Journal* 55: 580-595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03531.x>
- Perilli S, Moubayidin L, Sabatini S (2010) The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.018>
- Pleijel H, Mortensen L, Fuhrer J, Ojanpera K, Danielsson H (1999) Grain protein accumulation in relation to grain yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in open-top chambers with different concentrations of ozone, carbon dioxide and water availability. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 72: 265-270. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(98\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(98)00185-6)
- Prasad A, Ferretti U, Sedlářová M, Pospíšil P (2016) Singlet oxygen production in *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress. *Scientific Reports* 6: 20094. <https://doi.org/10.1038/srep20094>
- Prins A, Van Heerden PDR, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH (2008) Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: A model for dynamic interactions with ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1935-1950. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern086>
- Prokopová J, Mieslerová B, Hlaváčková V, Hlavinka J, Lebeda A, Nauš J, Špundová M (2010) Changes in photosynthesis of *Lycopersicon* spp. plants induced by tomato powdery mildew infection in combination with heat shock pre-treatment. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.01.001>
- Qiu K, Li Z, Yang Z, Chen J, Wu S, Zhu X, Gao S, Gao J, Ren G, Kuai B, Zhou X (2015) EIN3 and ORE1 Accelerate Degreening During Ethylene-Mediated Leaf Senescence By Directly Activating Chlorophyll Catabolic Genes In *Arabidopsis*. *Public Library of Science Genetics* 11(7): 1005399. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005399>
- Richmond AE, Lang A (1957) Effect Of Kinetin On Protein Content And Survival Of Detached Xanthium Leaves. *Science* 125(3249): 650-651. <https://doi.org/10.1126/science.125.3249.650.b>
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmülling T (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptors mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell* 18: 40-54. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037796>
- Romero-Muñoz M, Gálvez A, del Amor F (2022) The use of hydromulching increases yield and quality of artichoke (*Cynara cardunculus* var. scolymus) by improving soil physicochemical and biological properties. *Journal of Experimental Botany* 69(13): 2214-2224. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1676535/v1>
- Romero-Muñoz M, Gálvez A, Martínez-Melgarejo PA, del Amor FM, Albacete A, López-Marín J (2024) The use of hydromulching increases yield and quality of drought-stressed artichokes (*Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* L. (Heigi)) by improving soil properties and plant hormone homeostasis. *Plant Stress* 11: 100308. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100308>
- Rulcová J, Pospíšilová J (2001) Effect of Benzylaminopurine on Rehydration of Bean Plants after Water Stress. *Biologia Plantarum* 44: 75-81. <https://doi.org/10.1023/A:1017922421606>
- Sakakibara H (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>

- Samuilov VD, Kiselevsky DB, Shestak AA, Nesov AV, Vasil'ev LA (2008) Reactive oxygen species in programmed death of pea guard cells. *Biochemistry Moscow* 73: 1076-1084. <https://doi.org/10.1134/S0006297908100039>
- Schaller GE, Shiu SH, Armitage JP (2011) Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Current Biology* 21: 320-330. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.045>
- Shoaib M, Yang W, Shan Q, Sajjad M, Zhang A (2019) Genome-wide identification and expression analysis of new cytokinin metabolic genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Open access peer-reviewed scientific mega journal* 7: 6300. <https://doi.org/10.7717/peerj.6300>
- Song J, Jiang L, Jameson PE (2012) Co-ordinate regulation of cytokinin gene family members during flag leaf and reproductive development in wheat. *BMC Plant Biology* 12(78): 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-78>
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmülling T (2004) Two Cytokinin Receptors Of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 And AHK3, Differ In Their Ligand Specificity In A Bacterial Assay. *Plant Cell Physiology* 45(9): 1299-1305. <https://academic.oup.com/pcp/article/45/9/1299/1857633>
- Stetler DA, Laetsch WM (1965) Kinetin-Induced Chloroplast Maturation In Cultures Of Tobacco Tissue. *Science* 149: 1387-1388. <https://doi.org/10.1126/science.149.3690.1387>
- Stirbet A, Lazár D, Guo Y (2020) Photosynthesis: basics, history and modelling. *Annals of Botany* 126(4): 511-537. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz171>
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2000) Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In: *Papageorgiou*, Vol 19, (Govindjee GC ed.). Springer, Dordrecht, Germany, 445-483. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
- Sugiura M (1963) Promotion Of Chlorophyll Synthesis By Kinetin. *The Botanical Society of Japan* 76: 309-310. <https://doi.org/10.15281/jplantres1887.76.309>
- Sultana N, Islam S, Juhasz A, Ma W (2021) Wheat leaf senescence and its regulatory gene network. *The Crop Journal* 9: 703-717. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.01.004>
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001) Identification Of Genes Encoding Adenylate Isopentenyl transferase, A Cytokinin Biosynthesis Enzyme, In *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 276(28): 26405-26410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102130200>
- Taya Y, Tanaka Y, Nishimura S (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 271(5645): 545-547. <https://doi.org/10.1038/271545a0>
- Thomas H, Ougham HJ (2014) The stay-green trait. *Journal of Experimental Botany*, 65(14): 3889-3900. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru037>
- Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD (2003) Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany* 54(385): 1127-1132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg133>
- To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, Deruère J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell* 16: 658-671. <https://doi.org/10.1105/tpc.018978>
- To JPC, Kieber JJ (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science* 13(2): 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.005>
- Ueda H, Kusaba M (2015) Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 169: 138-147. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00325>

- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: Sensing, signaling and transport. *Plant and Cell Physiology* 51(11): 1821-1839. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq156>
- Veerasamy M, He Y, Huang B (2007) Leaf Senescence And Protein Metabolism In Creeping Bentgrass Exposed To Heat Stress And Treated With Cytokinins. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132(4): 467-472. <https://doi.org/10.21273/JASHS.132.4.467>
- Vimla V, Hildebrandt AC (1965) Growth and tissue formation from single, isolated tobacco cells in microculture. *Science* 147: 1454-1455. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1454>
- Vlčková A, Špundová M, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nauš J (2006) Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126: 257-267. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00593.x>
- Vyličilová H, Husičková A, Spíchal L, Srovnal J, Doležal K, Plíhal O, Plíhalová L (2016) C2-substituted aromatic cytokinin sugar conjugates delay the onset of senescence by maintaining the activity of the photosynthetic apparatus. *Phytochemistry* 122: 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.12.001>
- Vyroubalová Š, Václavíková K, Turečková V, Novák O, Šmehilová M, Hluska T, Ohnoutková L, Frébort I, Galuszka P (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiology* 151: 433-447. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142489>
- Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37: 455-469. <https://doi.org/10.1023/A:1005934428906>
- Weidhase RA, Lehmann J, Kramell H, Sembdner G, Parthier B (1987) Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methyl ester, and counteraction by cytokinin. *Physiologia Plantarum* 69: 161-166. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb01961.x>
- Werner T, Holst K, Pörs Y, Guivarc'h A, Mustroph A, Chriqui D, Grimm B, Schmölling T (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany* 59(10): 2659-2672. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern134>
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmölling T (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* 8: 371-381. <https://doi.org/10.1055/s-2006-923928>
- Woeste KE, Vogel JP, Kieber JJ (1999) Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Physiologia Plantarum* 105: 478-484. <https://doi.org/10.1023/a:1005934428906>
- Woo HR, Kim HJ, Lim PO, Nam HG (2019) Leaf Senescence: Systems And Dynamics Aspects. *Annual Review of Plant Biology* 70: 347-376. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718>
- Wu X, He J, Chen J, Yang S, Zha D (2014) Alleviation of exogenous 6-benzyladenine on two genotypes of eggplant (*Solanum melongena* Mill.) growth under salt stress. *Protoplasma* 251: 169-176. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0535-6>
- Xu Q, Paulsen AQ, Guikema JA, Paulsen GM (1995) Functional and ultrastructural injury to photosynthesis in wheat by high temperature during maturation. *Environmental and Experimental Botany* 35(1): 43-54. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(94\)00030-9](https://doi.org/10.1016/0098-8472(94)00030-9)
- Yang Y, Guo Y (2018) Unraveling salt stress signaling in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 60(9): 796-804. <https://doi.org/10.1111/jipb.12689>

- Yang Z, Ohlrogge JB (2009) Turnover of fatty acids during natural senescence of *Arabidopsis*, brachypodium, and switchgrass and in *Arabidopsis* β -oxidation mutants. *Plant Physiology* 150: 1981-1989. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140491>
- Yaronskaya E, Vershilovskaya I, Poers Y, Alawady AE, Averina N, Grimm B (2006) Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta* 224: 700-709. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0249-5>
- Yonekura-Sakakibara K, Kojima M, Yamaya T, Sakakibara H (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiology* 134: 1654-1661. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037176>
- Yoshinaga K, Arimura S, Niwa Y, Tsutsumi N, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2005) Mitochondrial behavior in the early stages of ROS stress leading to cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 96: 337-342. <https://doi.org/10.1093/aob/mci181>
- Zalabák D, Galuszka P, Mrízová K, Podlešáková K, Gu R, Frébortová J (2014) Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.11.020>
- Zemková N. (2024) Srovnání působení různých antisenescenčních látek na fotosyntetický aparát listů ječmene vystavených světlu. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika
- Zhang YM, Guo P, Xia X, Guo H, Li Z (2021) Multiple Layers Of Regulation On Leaf Senescence: New Advances And Perspectives. *Frontiers in Plant Science* 12(788996): 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.788996>
- Zhao MM, Zhang XW, Liu YW, Li K, Tan Q, Zhou S, Wang G, Zhou CJ (2020) A WRKY transcription factor, TaWRKY42-B, facilitates initiation of leaf senescence by promoting jasmonic acid biosynthesis. *BMC Plant Biology* 20(444): 1-22. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02650-7>