

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Srovnání působení různých antisenescenčních látek na fotosyntetický
aparát listů ječmene vystavených světlu**



Vypracovala:

Nikola Zemková

Studijní obor:

Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.

Rok obhajoby:

2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Nikola Zemková
Název práce:	Srovnání působení různých antisenescenčních látek na fotosyntetický aparát listů ječmene vystavených světlu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra biofyziky
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024

Abstrakt:

Listová senescence je přirozenou součástí životního cyklu rostlin, lze ji však oddálit vnější aplikací cytokininů nebo jejich derivátů. Důležitým faktorem ovlivňujícím nástup a průběh senescence je světlo. V závislosti na jeho intenzitě, světelné periodě i spektrálním charakteru dokáže chránit fotosyntetický aparát před změnami souvisejícími se senescencí, nebo naopak působit jeho poškození. Při současném vystavení rostliny cytokininům a světlu se jejich účinky vzájemně ovlivňují. V této práci byl porovnáván vliv sedmi různých antisenescenčních látek na indukovanou senescenci u oddělených listů ječmene vystavených dvěma odlišným světelným zdrojům s rozdílnými světelnými spektry – LED světlu a zářivkovému světlu. Dále bylo také provedeno srovnání senescence indukované tmou s postupem indukované senescence na světle. Stav listů byl posuzován dle změny barvy, měřením obsahu fotosyntetických pigmentů spektrofotometricky, měřením parametrů chlorofylové fluorescenční indukce, měřením obsahu malondialdehydu a ve vybraných případech byla navíc zjišťována míra poškození biologických membrán metodou „ion-leakage“. U segmentů inkubovaných v kontrolním roztoku byl zaznamenán ochranný efekt zářivkového světla, zatímco u vzorků na LED světle došlo dokonce k urychlení senescence oproti segmentům ve tmě. U některých variant ošetřených antisenescenčními látkami a vystavených zářivkám bylo pozorováno urychlení senescence oproti segmentům v kontrolním roztoku. Na LED světle nedošlo k urychlujícímu efektu u žádné ze sledovaných látek. Listové segmenty inkubované na LED světle vykazovaly v menší míře znaky typické pro průběh senescence na světle – zvýšení poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* a nárůst obsahu malondialdehydu. Výrazné poškození segmentů v kontrolním roztoku a ochranný efekt všech antisenescenčních látek naopak ukazují na podobnost s postupem senescence ve tmě.

Klíčová slova:	Senescence, cytokininy, ječmen, fluorescenční parametry, světlo
Počet stran:	66
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Nikola Zemková
Title of thesis: Comparison of the effect of different antisenesescence compounds on the photosynthetic apparatus of barely leaves exposed to light
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Biophysics
Supervisor: Doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of defense: 2024

Abstract:

Leaf senescence is a natural part of the plant life cycle, however it can be delayed by exogenous application of cytokinins or their derivatives. An important factor affecting the onset and progress of senescence is light. Depending on its intensity, light period and spectral character, it can protect the photosynthetic apparatus from changes related to senescence, or, on the contrary, cause its damage. When the plant is simultaneously exposed to cytokinins and light, their effects influence each other. The effect of seven different anti-senesescence substances on induced senescence in detached barley leaves exposed to two different light sources with different light spectra – LED light and fluorescent light – was compared in this work. Furthermore, a comparison of dark-induced senescence with the process of induced senescence in the light was also made. The condition of the leaves was assessed according to the change in color, by measuring the content of photosynthetic pigments spectrophotometrically, by measuring the parameters of chlorophyll fluorescence induction, by measuring the content of malondialdehyde, and in selected cases, the degree of damage to biological membranes was also determined by the "ion-leakage" method. In the segments incubated in the control solution, a protective effect of fluorescent light was noted, while in the samples under LED light senescence was even accelerated compared to the segments in the dark. In some variants treated with anti-senesescence substances and exposed to fluorescent light was observed acceleration of senescence compared to segments in the control solution. On the contrary, LED light did not have an accelerating effect for any of the monitored substances. Leaf segments incubated in LED light showed, to a lesser extent, signs typical of senescence in the light – an increase in the ratio of chlorophyll *a* to chlorophyll *b* and an increase in malondialdehyde content. Significant damage to the segments in the control solution and the protective effect of all anti-senesescence substances, on the contrary, indicate a similarity with the senescence process in the dark.

Key words: Senescence, cytokinins, barley, fluorescence parameters, light
Number of pages: 66
Number of attachments: 0
Language: Czech

Děkuji paní doc. RNDr. Martině Špundové, Ph.D. za ochotu, věnovaný čas a cenné rady během realizace této práce. Za veškerou pomoc a rady při realizaci experimentů děkuji Mgr. Zuzaně Kučerové, Ph.D., a Pavle Ocvirkové. Rovněž děkuji Mgr. Marku Rácovi, Ph.D., za provedení měření obsahu malondialdehydu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit své díky za poskytnutou podporu během mého studia svým rodičům, spolužákům a manželovi.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	2
3. Přehled problematiky.....	3
2.1 Fungování rostlin a změny v průběhu senescence.....	3
2.1.1 Vliv světla na senescenci.....	7
2.2 Cytokininy a jejich využití.....	10
2.2.1 Cytokininy a světlo.....	13
2.3 Shrnutí.....	15
4. Materiál a metody.....	17
4.1 Rostlinný materiál.....	17
4.2 Použité metody.....	17
4.3 Jednotlivé experimenty.....	19
4.3.1 Experiment 1.....	19
4.3.2 Experiment 2.....	19
4.3.3 Experiment 3.....	19
4.4 Statistické a grafické zpracování dat.....	20
5. Výsledky.....	22
5.1 Experiment 1.....	22
5.2 Experiment 2.....	29
5.3 Experiment 3.....	37
6. Diskuze.....	50
7. Závěr.....	56
8. Seznam použité literatury.....	57

Seznam zkratek

AHK	<i>Arabidopsis histidine kinase</i> , histidinová kináza u huseníčku
ARR2	<i>Arabidopsis response regulator 2</i> , transkripční faktor u huseníčku
ASES	1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thidiazol-5yl)močovina
BAP	N ⁶ -benzylaminopurin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
F ₀	minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _m	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F' _m	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na červené aktinické světlo
F _t	fluorescence v čase t při aktinickém světle
F _v	variabilní fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _v /F _m	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
Φ _{f,D}	kvantový výtěžek konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení
Φ _{NPQ}	kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení
Φ _p	aktuální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
HK	histidinová kináza
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> , vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MDA	malondialdehyd
MeO	3-methoxy-6-benzylaminopurin-9-arabinosid
mT	<i>meta</i> -topolin
OH	3-hydroxy-6-benzylaminopurin-9-arabinosid
PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> , fotosynteticky aktivní záření
phyA	fytochrom A
phyB	fytochrom B

PIF	<i>phytochrome-interacting factor</i> , transkripční faktor interagující s fytochromem
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
SAG	<i>senescence associated genes</i> , geny související se senescencí
TDZ	N-fenyl-N'-(1,2,3-thidiazol-5yl)močovina
tZ	<i>trans-zeatin</i>
UR21	fenylmočovinový derivát

1. Úvod

Prakticky všechny živé organismy na Zemi podléhají v průběhu času postupnému vývoji a střídání životních fází, které končí úmrtím. Nejinak je tomu u rostlin – organismů, které, ačkoliv tvoří velkou část živé přírody na naší planetě, často přehlízíme a považujeme jen za nehybné pozadí v bouřlivém přírodním dění okolo nás. I v rostlinných tělech ale dochází během času k významným proměnám. Rostlina prochází za svůj život několika vývojovými fázemi od embryonální přes vegetativní a generativní, až po stárnutí a následnou smrt. Poslední fázi vývoje rostliny nazýváme senescence a může nastupovat a probíhat různou rychlostí v jednotlivých částech rostlinného těla. Tato závěrečná fáze života je doprovázena poklesem obsahu fotosyntetických pigmentů, inhibicí fotosyntézy, rozpadem chloroplastů a v pokročilém stadiu taky oxidativním poškozením makromolekul a narušením buněčných membrán. Celý proces je řízen geneticky a nastupuje v důsledku stáří rostliny nebo při vystavení stresovým podmínkám. U listů můžeme proces senescence pozorovat pouhým okem jako postupnou změnu barvy ze zelené na žlutou.

Ukazuje se, že klíč k oddálení nástupu senescence a jejího zpomalení (tedy prodloužení života rostliny nebo jejích částí) by mohla představovat skupina rostlinných hormonů nazývaných cytokinininy. Kromě přirozeně se vyskytujících cytokininů máme dnes k dispozici také jejich deriváty, které by mohly působit proti senescenci ještě efektivněji a bez nežádoucích účinků jako je inhibice růstu kořene. Jisté potíže může ovšem působit odlišný účinek těchto látek za různých světelných podmínek.

V této práci byl srovnáván účinek sedmi antisenesescenčních látek (včetně přirozených cytokininů i nedávno syntetizovaných močovinnových derivátů) na indukovanou senescenci u oddělených listových segmentů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos) při vystavení různým světelným podmínkám – LED světlu, zářivkovému světlu a tmě. Stav listů byl posuzován pomocí vizuálního zhodnocení barvy listů, měření obsahu fotosyntetických pigmentů, měření parametrů chlorofylové fluorescence, určení obsahu malondialdehydu a ve vybraných případech také stanovení míry poškození biologických membrán metodou „ion-leakage“.

2. Cíle práce

1. Vypracovat přehled problematiky vlivu cytokininů na senescenci zaměřený na vliv světelných podmínek a současného působení světla a cytokininů.
2. Zvládnout metodiky pěstování ječmene jarního ve fytokomoře, stanovení obsahu chlorofylu chlorofylmetrem (SPAD-502) a stanovení obsahu chlorofylů a celkových karotenoidů spektrofotometricky, měření chlorofylové fluorescenční indukce pomocí přístroje FluorCam (PSI, Drásov, ČR) včetně analýzy dat, vyhodnocování parametrů a zpracování obrázků, stanovení míry poškození biologických membrán pomocí „ion-leakage“ a seznámit se s metodou stanovení obsahu malondialdehydu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.
3. Provést měření fluorescenčních parametrů odrážejících funkci fotosystému II pomocí přístroje FluorCam (PSI, Drásov, ČR) v listech ječmene inkubovaných na LED světle, zářivkovém světle a ve tmě pod vlivem různých typů cytokininů a jejich derivátů, u vybraných variant stanovit obsah fotosyntetických pigmentů spektrofotometricky, míru poškození biologických membrán metodou „ion-leakage“ a míru lipidové peroxidace pomocí měření obsahu malondialdehydu.
4. Srovnat působení různých typů cytokininů a jejich derivátů na fotosyntetický aparát listů ječmene vystavených světlu a srovnat působení dvou odlišných světelných zdrojů (LED světla a zářivkového světla) s rozdílnými světelnými spektry na indukovanou senescenci listů ječmene. Srovnat postup indukované senescence u listových segmentů inkubovaných na světle a ve tmě.
5. Sepsat bakalářskou práci.

3. Přehled řešené problematiky

3.1 Fungování rostlin a změny v průběhu senescence

Živé organismy zpravidla procházejí během svého života různými vývojovými fázemi, mění se v průběhu času, až jednoho dne dospějí ke smrti. Rostlinný život může být dlouhý jen několik týdnů nebo i tisíce let a během něj mohou odumírat (a případně později zase dorůstat) jen některé části rostlinného těla. Před samotnou smrtí nastává poslední vývojová fáze, kterou nazýváme senescence. Jedná se o vysoce organizovaný proces, kdy dochází k postupné degradaci a odumírání organel, buněk i celých částí rostliny. V životním cyklu rostlin je častá listová senescence. Při té jsou zásobní látky transportovány z postižených listů do jiných částí rostliny, aby mohly být znovu využity. Výraznou doprovodnou změnou je pokles obsahu chlorofylu, což se projeví žloutnutím listů. V buňkách během senescence nastávají strukturální změny a dochází k inhibici fotosyntetických procesů, v pokročilém stadiu senescence pak dochází k oxidativnímu poškození lipidových molekul a narušení biologických membrán (Špundová a kol. 2003). Nástup a průběh senescence je řízen geneticky a bývá vyvolán stářím rostliny (případně daného orgánu) nebo stresem. Vliv mají také vnější faktory jako je intenzita a spektrum světla, světelná perioda, množství vody, teplota nebo přítomnost toxických látek.

Pro fungování fotosyntézy musí být v rostlině přítomny fotosyntetické pigmenty. Nejdůležitějším z nich je chlorofyl, který dodává listům typické zelené zbarvení, jelikož pohlcuje zejména červenou a modrou složku světla. Vůbec nejdůležitějším typem je chlorofyl *a*, který je součástí reakčních center fotosystémů. Fotosystémy I a II jsou komplexní struktury uložené v membránách chloroplastů a jsou nezbytné pro fungování světelné fáze fotosyntézy. Fotosystém II (PSII) se účastní zachytávání světelného záření a takto získanou energii potom využívá k rozdělení náboje v reakčních centrech a zahájení elektronového transportu v lineárním transportním řetězci. Fotosystém I (PSI) taktéž zachytává světelnou energii a účastní se lineárního transportního řetězce elektronů. Chlorofyl *b* a další pigmenty jsou součástí světlosběrných komplexů, jejichž funkcí je zachytávání světelné energie a její předávání reakčním centrům. Rozpad chlorofylu bývá jednou z prvních změn při nástupu senescence. Chlorofyly *a* a *b* mohou degradovat různou rychlostí podle toho, jestli dochází ve větší míře k narušení a rozpadu světlosběrných komplexů nebo reakčních center. Sledováním změn poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* tedy můžeme získat informace o tom, které struktury se rozpadají přednostně (Špundová a kol. 2003). U mutantních rostlin, kterým chyběl chlorofyl *b*, bylo pozorováno během indukované senescence ve tmě větší poškození funkce PSII a naopak lepší zachování funkce PSI než u rostlin bez této mutace. To značí, že v případě rostlin

s deficiencí ve světlosběrných komplexech (jako je tomu u rostlin se sníženým obsahem chlorofylu *b*) dochází ve větší míře i k poškození reakčních center (Janečková a kol. 2019).

Další skupinou fotosyntetických pigmentů jsou karotenoidy, které můžeme dále rozdělit na karoteny a xantofyly. Ty se také účastní zachycování světelné energie. V chloroplastech jsou přítomny také kvůli jejich schopnosti chránit fotosyntetický aparát před fotopoškozením. Degradace fotosyntetických pigmentů je jednou z prvních známek senescence, přičemž chlorofyl ubývá rychleji než karotenoidy (Špundová a kol. 2005), což se navenek projeví změnou barvy listu ze zelené na žlutou. Když degradují i karotenoidy, v listu již nejsou přítomna žádná barviva a začne být průsvitný. V některých případech může docházet v průběhu senescence k hromadění ochranných antokyanů v listech. Ty potom mají za následek růžovo-fialové zbarvení listů (Danilova a kol. 2023).

Jednou z vlastností chlorofylu je fluorescence. Jde o jev, kdy po absorbování světelné energie molekulou pigmentu dojde k emisi části záření zpět do okolí. Emitované záření má větší vlnovou délku (a tedy i menší energii) než přijaté záření, které vyvolalo excitaci molekuly chlorofylu. Energie získaná absorpcí fotosynteticky aktivního záření je v rostlinné buňce částečně využita na fungování fotochemických procesů a zbytek energie se ztrácí ve formě fluorescence a tepla. Měřením fluorescence chlorofylu při definovaném ozáření můžeme získat informace o využití přijaté energie, a tím o stavu fotosyntetického aparátu a fungování fotochemie. Pokud se sníží množství energie využitě na fotochemické procesy, pak poroste emise fluorescence a naopak. U rostlinného vzorku adaptovaného na tmu dochází při náhlém osvětlení ke strmému nárůstu intenzity fluorescence, která následně postupně klesá. Po stanovení minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_0) a maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_m) můžeme určit poměr variabilní fluorescence (F_v) a maximální fluorescence $\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$. Tomuto poměru říkáme maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II, u zdravých nestresovaných rostlin dosahuje hodnoty kolem 0,8 a jeho pokles indikuje poškození ve funkci fotosystému II (Lazár 2015). U oddělených listů ječmene ve tmě byl pozorován pokles F_v/F_m z 0,8 na 0,55 během 5 dní (Špundová a kol. 2003). S využitím aktinického světla a saturačních světelných pulzů jsme schopni určit další parametry a jejich průběhy v čase jako je průběh aktuálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Φ_p), průběh kvantového výtěžku regulačního nefotochemického zhášení fluorescence (Φ_{NPQ}) a průběh kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení ($\Phi_{f,D}$). Průběh Φ_p nám dává informaci o tom, jaké množství energie zachycené PSII je využito na fungování fotochemických procesů, tedy odráží stav funkce PSII. Při vystavení rostliny

aktinickému světlu (po adaptaci na tmu) dochází postupně k adaptaci na konkrétní intenzitu světla, až se parametr Φ_p ustálí na maximální hodnotě, která u zdravých rostlin dosahuje hodnoty kolem 0,8. V průběhu senescence dochází k poškození fotosyntetického aparátu a parametr Φ_p dosahuje nižší maximální hodnoty. Samotná adaptace na danou intenzitu světla bývá v případě poškození fotosyntetického aparátu pomalejší. Průběh Φ_{NPQ} vyjadřuje míru regulované disipace absorbované energie na teplo. Po vystavení listu adaptovaného na tmu aktinickému světlu dojde nejprve k prudkému nárůstu Φ_{NPQ} , jelikož se rostlina zhášením zbavuje přebytečné energie, aby nedošlo k poškození fotosyntetického aparátu. Poté nastává snížení Φ_{NPQ} , jak se rostlina adaptuje na danou intenzitu světla a začíná využívat přijatou energii k fungování fotochemických procesů. Při opětovném vystavení tmě po ukončení světelných pulsů aktinického světla není potřeba se zbavovat energie v takové míře a u zdravé rostliny se parametr Φ_{NPQ} ustálí kolem hodnoty 0,05. Při senescenci dochází k degradaci fotosyntetického aparátu a je tak využito méně energie pro fungování fotochemie. Aby přebytečná energie nepůsobila v buňce větší poškození, je cíleně přeměňována na teplo a parametr Φ_{NPQ} narůstá. Při výraznějším poškození fotosyntetického aparátu již nefunguje ani nefotochemické zhášení a parametr Φ_{NPQ} tak klesá. Průběh $\Phi_{f,D}$ ukazuje, jaká část pohlcené energie je ztracena fluorescencí a konstitutivní tepelnou disipací. U listu adaptovaného na tmu dochází po vystavení aktinickému světlu k prudkému poklesu $\Phi_{f,D}$ z maximální hodnoty kolem 0,8 na hodnotu asi 0,3. Po ukončení ozařování aktinickým světlem a opětovnému vystavení tmě se $\Phi_{f,D}$ ustálí na hodnotě kolem 0,2. Poškození fotosyntetického aparátu má za následek nižší spotřebu energie na fotochemické procesy, více energie se tedy ztrácí fluorescencí a $\Phi_{f,D}$ narůstá. Zároveň můžeme při poškození fotosyntetického aparátu pozorovat zpomalení poklesu po spuštění aktinického světla (Lazár 2015).

Kromě funkčních změn lze během listové senescence zaznamenat také změny struktury buněčných organel. Při degradaci chloroplastů během indukované senescence v oddělených listech ječmene bylo zaznamenáno kromě snižování obsahu chlorofylu 5. den po oddělení narušení uspořádání gran asi ve čtvrtině chloroplastů a hromadění plastoglobulí v chloroplastech. Při inkubaci listů na světle docházelo k hromadění škrobových zrn, pravděpodobně v důsledku přetrvávání fotosyntetických procesů a hromadění asimilátů, které nebylo možné přesunout do jiných částí rostliny. Zároveň se změnil tvar chloroplastů z eliptického na sférický a došlo k narušení uspořádání thylakoidů, což může souviset s výskytem reaktivních forem kyslíku a peroxidací membránových lipidů (Špundová a kol. 2003). Podobné změny struktury – přeměna tvaru chloroplastů na více sférický, narušení

organizace thylakoidních membrán, akumulace plastoglobulí a na světle hromadění škobových zrn v chloroplastech – byly zaznamenány i u oddělených listů pšenice (Vlčková a kol. 2006).

V rostlinných buňkách běžně vznikají jako produkt chemických procesů reaktivní formy kyslíku (ROS), které za normálních podmínek rychle eliminuje systém antioxidantů. Tím se udržuje obsah ROS v buňkách dostatečně nízký, aby nepůsobil poškození makromolekul. Vyčerpání antioxidantů nebo nadměrná produkce ROS vede k oxidativnímu stresu, při kterém dochází k poškození DNA, proteinů a lipidů. Narušení lipidů potom může vést až k rozpadu buněčných membrán. Jako vedlejší produkt peroxidace lipidů vzniká malondialdehyd (MDA). Zvýšená koncentrace ROS zároveň slouží rostlině jako buněčná signalizace stresu a hraje také roli při obraně před patogeny (Pandhair a Sekhon 2006). Produkce ROS v tylakoidech je odlišná během různých stádií života rostliny. U listů ječmene byl pozorován nárůst produkce superoxidového aniontu a peroxidu vodíku postupně během vývoje, u obou dosáhl vrcholu po nástupu senescence, a poté začal klesat. Oproti tomu singletový kyslík byl v buňkách bez větších výkyvů kontinuálně produkován v malých množstvích po celý život rostliny (Jajić a kol. 2015). Nadměrná produkce ROS a oxidativní poškození jsou typické zejména pro pozdní fázi senescence. V důsledku peroxidace membránových lipidů může docházet ke strukturálním změnám a rozpadu chloroplastů (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006). U listů poškozených v důsledku změn spojených se senescencí byl naměřen zvýšený obsah MDA i větší aktivita antioxidantů (Causin a kol. 2006).

Antioxidanty lze rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Mezi neenzymatické antioxidanty řadíme askorbát nebo karotenoidy, z enzymatických antioxidantů najdeme v rostlinách superoxid dismutázu nebo askorbát peroxidázu (Pandhair a Sekhon 2006). U rostlin fazole pěstovaných na 16hodinové světelné periodě byl zaznamenán vzrůst obsahu β -karotenu na více než dvojnásobek během prvních 13 dnů života rostliny. Následně na konci života listů obsah β -karotenu poklesl. U rostlin stresovaných kontinuálním ozářením během života pomalu narůstal obsah β -karotenu, který rostlina potřebuje na obranu proti fotopoškození, přičemž prvních 10 dní byl obsah výrazně vyšší než u nestresovaných rostlin (Procházková a Wilhelmová 2004). Kromě systému antioxidantů může být jistou formou ochrany proti oxidativnímu stresu způsobenému fotopoškozením degradace světlosběrných komplexů PSII, která sníží množství absorbované světelné energie.

Proces senescence je vysoce organizovaný a řídí ho velké množství genů, včetně skupiny SAG (senescence-associated genes), kam patří SAG12 nebo SAG13. Spuštění exprese těchto genů závisí na vnitřních i vnějších faktorech. Při inkubaci listů huseníčku ve tmě bylo pozorováno zvýšení exprese některých genů souvisejících se senescencí včetně SAG12

(Kozuka a kol. 2023, Eckstein a kol. 2021) nebo SAG13 (Eckstein a kol. 2021) oproti jejich aktivitě při vystavení světlu. Hlavním promotorem pro spuštění exprese genů skupiny SAG je gen označovaný jako ORE1. Jeho zvýšená exprese vede k aktivaci genů spojených s degradací chlorofylu a dalšími změnami doprovázejícími proces senescence (Liebsch a Keech 2016).

3.1.1 Vliv světla na senescenci

Jako světlo označujeme viditelnou část spektra elektromagnetického záření. Rostliny jsou schopny určitou oblast elektromagnetického záření zachytávat a využívat ve fotosyntéze. Tuto část elektromagnetického spektra označujeme jako fotosynteticky aktivní záření (PAR) a zahrnuje vlnové délky přibližně od 400 do 700 nm.

Pro rostliny je PAR životně důležité, jelikož je nezbytné k fungování fotosyntézy. PAR má do jisté míry ochranný efekt před změnami souvisejícími se senescencí. Při vystavení oddělených listových segmentů ječmene kontinuálnímu světlu o nízké intenzitě ($90 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bylo pozorováno zachování vyššího obsahu chlorofylu i karotenoidů než u segmentů vystavených tmě. Zároveň na světle pomaleji klesal poměr obsahu chlorofylu ku karotenoidům, zatímco po inkubaci ve tmě byl tento poměr výrazně snížený (Špundová a kol. 2005). Kromě pomalejší degradace fotosyntetických pigmentů bylo při inkubaci na světle zaznamenáno také lepší zachování funkce PSII než při inkubaci ve tmě. U oddělených listů ječmene ve tmě byl pozorován pokles F_v/F_m z hodnoty 0,8 na 0,55 během 5 dní, zejména v důsledku výrazného poklesu F_m . Při inkubaci na kontinuálním bílém světle zůstaly po 5 dnech hodnoty F_v/F_m téměř nezměněny (Špundová a kol. 2003). To značí velmi dobré zachování funkce PSII při vystavení oddělených listů světlu oproti jejich inkubaci ve tmě. Pro indukovanou senescenci u oddělených listů na světle je typické hromadění škrobových zrn, které indikuje zachování funkce fotosyntetických procesů a ukládání asimilátů v chloroplastech (Špundová a kol. 2003). Nevhodná světelná perioda nebo intenzita mohou ovšem naopak působit rostlině poškození. Procházková a Wilhelmová (2004) pozorovaly při ozařování rostlin fazole kontinuálním světlem o intenzitě $220 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dřívější nástup senescence a kratší životnost děložních lístků než u rostlin pěstovaných na 16hodinové světelné periodě. U kontinuálně ozařovaných rostlin navíc nebyl patrný přesný moment nástupu senescence, obsah chlorofylu se držel během života rostliny na podobných hodnotách, poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* pomalu narůstal během celého života, stejně jako obsah β -karotenu. Rostliny pěstované na světelné periodě zvyšovaly obsah chlorofylu i β -karotenu postupně během života a ke konci života nastal prudký pokles obsahu těchto pigmentů, poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* na konci životnosti prudce narostl (Procházková a Wilhelmová, 2004). Během

indukované senescence u listových segmentů ječmene inkubovaných ve tmě byl zaznamenán podobný pokles chlorofylu *a* a *b* a neměnil se tedy poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*. U listových segmentů inkubovaných na kontinuálním světle ubýval chlorofyl *b* rychleji než chlorofyl *a* a narostl tak poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* (Špundová a kol. 2003). Takový nárůst značí, že světlosběrné komplexy ubývají rychleji než reakční centra, což může být forma ochrany fotosyntetického aparátu před fotopoškozením. U listových segmentů inkubovaných na kontinuálním bílém světle byla také zaznamenána změna tvaru chloroplastů z eliptického na více sférický, narušení uspořádání thylakoidů a vysoká míra peroxidace lipidů (Špundová a kol. 2003). Tyto změny patrně souvisí s oxidativním poškozením. Urychlující účinky světla na senescenci by tedy mohly mít původ v přeexcitování fotosyntetického aparátu a následné zvýšené produkci ROS.

Průběh senescence závisí také na světelném spektru. Vliv světelného spektra na postup senescence u oddělených listů pšenice sledovali Causin a kol. (2006). K dosažení odlišných světelných podmínek byly využity světelné filtry a vzorky byly umístěny ve stejném skleníku, kde byly rostliny pěstovány. Listy vystavené bílému a modrému světlu vykazovaly vyšší míru zachování chlorofylu než listy vystavené světlu červenému a zelenému. Efekt byl stejný bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost vzdálené červené složky světla. Z těchto výsledků je možné usuzovat na určitý ochranný efekt modré složky světla (350-450 nm) před změnami souvisejícími se senescencí (Causin a kol. 2006). Podobné výsledky získal ve své diplomové práci také Běčák (2016) při využití světla o intenzitě asi $95 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a světelném režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Modré světlo mělo u oddělených listů pšenice výraznější účinek na zpomalení senescence z hlediska degradace chlorofylu i karotenoidů, zachování poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* a poměru chlorofylu ku karotenoidům i funkce fotosyntetického aparátu než světlo červené. Modré světlo dokázalo zpomalit senescenci dokonce ve větší míře než světlo bílé. Listy inkubované na bílém světlé vykazovaly první 4 dny po oddělení podobné výsledky jako listy vystavené modrému světlé, poté byl postup senescence rychlejší na bílém světlé (Běčák 2016).

Kromě světlosběrných komplexů, které mají za úkol zachytávat energii elektromagnetického záření, je rostlina vybavena ještě sadou fotoreceptorů, které slouží k získávání informací o charakteru dopadajícího záření a hrají roli v signalizaci. K zachytávání různých vlnových délek světla slouží rostlině několik druhů chromoproteinů. Receptory pro červené světlo kolem 600-700 nm nazýváme fytochromy. Po absorpci záření s vlnovou délkou kolem 660 nm podstupují fytochromy konformační změnu a přemění se na formu absorbující světlo vzdálené červené oblasti spektra kolem 730 nm. Ozářením vzdáleným červeným světlem

(nebo samovolně časem) se pak vrací zpět na předchozí konformaci absorbující červené světlo. Dále v zelených listech najdeme receptory pro modré a UV-A světlo kolem 320-500 nm, které nazýváme kryptochromy. Po aktivaci fytochromů nebo kryptochromů zářením o příslušné vlnové délce dochází k modulaci transkripčních faktorů a případně následné aktivaci příslušných genů v jádře buňky (Briggs a Olney 2001, Sakuraba 2021). Různá světelná spektra mají za následek aktivaci exprese odlišných genů (Banaš a kol. 2011). Světlo je pro rostliny natolik důležité, že své listy natačejí směrem ke zdroji záření. Této schopnosti říkáme fototropismus a umožňují ji další receptory přítomné v rostlinném těle reagující na modrou část světelného spektra, které získávají informace o směru dopadajícího záření, zvané fototropiny (Briggs a Olney 2001, Sakuraba 2021).

Fotoreceptory mají podíl na řízení senescence pomocí spuštění signálních drah a následné exprese příslušných genů. Huseníček obsahuje několik typů fytochromů. Fytochrom A (phyA) je při vystavení rostliny světlu přítomný jen v malé míře, jelikož na světle se rozkládá. Ve tmě naopak tento typ fytochromu převládá. Hlavním receptorem pro červené světlo je za běžných světelných podmínek fytochrom B (phyB). Po aktivaci jsou fytochromy schopné reagovat s transkripčními faktory označovanými jako PIF (Phytochrome-interacting factor). PIF proteiny jsou zapojeny do regulace genů spojených s produkcí ethylenu a spuštěním procesu senescence (Liebsch a Keech 2016). Ke spuštění senescence vyvolané nedostatkem světla je nezbytná přítomnost PIF4 a PIF5. Pokud nejsou PIF4 a PIF5 degradovány, zahájí přímou expresi genů EIN3, ABI5 a EEL, což vede k produkci dvou hormonů urychlujících senescenci – ethylenu a kyseliny abscisové. Společně PIF4, PIF5, EIN3, ABI5 a EEL ovlivňují hlavní regulátor senescence ORE1 (Sakuraba a kol. 2014). Expese tohoto genu potom vede k aktivaci mnoha hlavních genů skupiny SAG. Při dostatku světla je aktivován phyB, který degraduje PIF4 a PIF5, a tím zamezuje spuštění signální dráhy pro expresi genů souvisejících se senescencí. Při zastínění není aktivován phyB, ale k potlačení spuštění senescence přispívá phyA, který se v těchto podmínkách stává převládajícím typem fytochromu. Za tmy není aktivován phyA ani phyB, tedy PIF nejsou degradovány a mohou aktivovat expresi transkripčních faktorů vedoucí ke spuštění senescence (Liebsch a Keech, 2016).

Fytochromy nejsou jedinými fotoreceptory, které mají vliv na průběh senescence, určitou roli hrají také fototropiny a kryptochromy. Rostlina huseníček obsahuje dva různé fototropiny označované phot1 a phot2. U mutantů těchto rostlin s chybějícími oběma fototropiny bylo pozorováno zpomalení průběhu senescence ve tmě z hlediska zachování funkce PSII, obsahu fotosyntetických pigmentů i nižšího nárůstu poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* oproti rostlinám bez této mutace. Oba fototropiny ovšem regulují senescenci

odlišně. Pokud rostlině chyběl phot2, zůstával déle zachován obsah fotosyntetických pigmentů než u variant s přítomným phot2. V případě nepřítomnosti phot1 byla zaznamenána nižší aktivace genů souvisejících se senescencí než u rostlin bez této mutace. Mechanismus působení fototropinů na senescenci ovšem není znám, dle autorů mohlo být urychlení senescence částečně způsobeno samotným deficitem fototropinů při inkubaci ve tmě nebo vlivem fototropinů na expresi některých genů (Eckstein a kol. 2021). Podobná situace nastává i u kryptochromů. Při inkubaci listů na slabém modrém světle bylo zaznamenáno zpomalení senescence oproti listům inkubovaným ve tmě. Tento efekt přetrvával i po inaktivaci fytochromů světlem vzdálené červené oblasti a nenastal u mutantů s chybějícími kryptochromy (Kozuka a kol. 2023). Zpomalující efekt modrého světla na senescenci tak zřejmě závisí na kryptochromech. I zde je efekt odlišný podle daného typu kryptochromu. V rostlině huseniček jsou přítomny kryptochromy s označením cry1 a cry 2. Pokud nebyl v rostlině přítomnem cry2, došlo k rychlejší degradaci chlorofylu i zhoršení funkce PSII oproti rostlinám, kterým chyběly oba kryptochromy nebo jen cry1. Červené světlo nemělo na průběh senescence u mutantních rostlin žádný efekt oproti „wild-type“ rostlinám (Kozuka a kol. 2023).

3.2 Cytokininy a jejich využití

Pro mnoho vývojových procesů v rostlině je nezbytná skupina fytohormonů, které nazýváme cytokininy. Ty zajišťují fungování buněčného dělení neboli cytokinezi, mají vliv na růst rostliny a její jednotlivé vývojové fáze, jsou zapojeny v řízení metabolismu chlorofylu a regulují expresi mnoha genů souvisejících s fotosyntézou (Spíchal 2012, Hudeček a kol. 2023).

Cytokininy jsou známé svou schopností oddalovat nástup senescence u rostlin. Jejich ochranný efekt na fotosyntetický aparát je výsledkem regulace mnoha dějů včetně upregulace komponent PSII, Calvinova cyklu a ve vzácnějších případech PSI. Kromě toho mají cytokininy vliv na zachování obsahu chlorofylu, jelikož regulují jeho metabolismus – snižují katabolismus chlorofylu a zároveň zvyšují jeho syntézu (Hudeček a kol. 2023). Vnější aplikace těchto látek tedy dokáže prodloužit životnost rostlin nebo jejich částí. Účinek ovšem není vždy jednoznačný a závisí na mnoha faktorech. Stejná látka může působit odlišně v závislosti na druhu rostliny, na který ji aplikujeme (Kučerová a kol. 2020). Také je působení cytokininů silně ovlivněno světelnými podmínkami (Vlčková a kol. 2006, Causin a kol. 2006, Melkovičová 2012) a samotnou koncentrací použitého roztoku cytokininů (Melkovičová 2012, Kučerová 2015). Další vlastností cytokininů je i schopnost v některých případech oddálit nástup infekce (Prokopová a kol. 2010).

Z chemického hlediska jsou cytokininy deriváty adeninu. V přírodě se běžně vyskytují cytokininy dvojího typu – s isoprenoidním nebo aromatickým řetězcem (Spíchal 2012). Mezi isoprenoidní cytokininy řadíme zeatin, který má dva různé izomery. Jako biologicky aktivnější se uvádí *trans*-zeatin, ovšem u listů inkubovaných ve tmě dochází ke snížení množství *trans*-zeatinu a naopak narůstá koncentrace *cis*-zeatinu, což může značit jeho určitou funkci v ochraně listů před stresem (Janečková a kol. 2018). K aromatickým cytokininům patří 6-benzylaminopurin (BAP) nebo topolin, taktéž se vyskytující ve dvou izomerech jako *meta*-topolin a *ortho*-topolin. Podobnou aktivitu jako cytokininy vykazují také synteticky připravené deriváty. Ty jsou nejčastěji odvozené od močoviny jako thidiazuron (TDZ) nebo 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)močovina (ASES) (Nisler a kol. 2018). Další skupinou derivátů jsou arabinosidy, kam řadíme 3-methoxy-6-benzylaminopurin-9-arabinosid (MeO) a 3-hydroxy-6-benzylaminopurin-9-arabinosid (OH) (Bryksová a kol. 2020, Kučerová a kol. 2020).

Cytokininy ovlivňují proces senescence regulací exprese genů v buněčném jádře. Samotná molekula cytokininu ale nemůže do buněčného jádra projít. Aby mohl cytokinin působit na geny lokalizované v jádře, musí se navázat na receptor. Cytokininové receptory obsahují histidinovou kinázu (HK), která se spojením s cytokininem aktivuje (fosforyluje). Fosfátová skupina je pak signální dráhou dále přenášena. Pokud je fosforylován transkripční faktor, dokáže vstoupit do jádra, navázat se na specifické místo v DNA a spustit transkripci konkrétního genu (Zwack a Rashotte 2013). Bez cytokininových receptorů nemůže signální dráha fungovat. Rostlina huseníček obsahuje několik histidinových kináz schopných interagovat s cytokininy. U listů mutantní rostliny s chybějícím AHK3 receptorem byla pozorována odlišná reakce na ošetření tZ při vystavení světlu než u „wild-type“ rostliny. V případě „wild-type“ rostlin nastalo u listů ošetřených tZ zpomalení senescence a potlačení hromadění ochranných antokyanů, ale zároveň došlo ke zhoršení funkce PSII. U mutantů bez AHK3 nedošlo vlivem aplikace tZ k potlačení hromadění antokyanů a pokles funkce PSII nebyl tak výrazný jako v případě „wild-type“ rostlin (Danilova a kol. 2023). Každý receptor má navíc v buňce mírně odlišnou roli. Rostliny s chybějícím AHK3 mívají během senescence obecně nižší obsah chlorofylu a vyšší koncentraci tZ, u rostlin bez AHK4 zase dochází ve větší míře k peroxidaci lipidů než u rostlin, které tento receptor nepostrádají (Janečková a kol. 2018). Podobně jako nepřítomnost cytokininových receptorů vede i absence transkripčních faktorů v buňce k nefunkčnosti cytokininové signální dráhy. U listů huseníčku s chybějícím transkripčním faktorem ARR2 (*Arabidopsis response regulator 2*) byla pozorována při inkubaci na světle rychlejší degradace fotosyntetických pigmentů než u listů rostlin s přítomným ARR2.

Zároveň u takto mutovaných rostlin nemělo ošetření tZ vliv na zpomalení procesu rozpadu chlorofylu (Danilova a kol. 2023).

Významné využití nacházejí cytokininy při vývoji netoxických růstových regulátorů. Mohou u hospodářských plodin pomoci proti senescenci indukované stresem (suchem, nízkou teplotou, vysokou salinitou půdy), která vede ke ztrátám na úrodě. Využití přirozených cytokininů v tomto směru ovšem není vhodné kvůli jejich negativnímu působení na vývoj kořenů u jimi ošetřených rostlin (Werner a kol. 2003). Jedním ze syntetizovaných derivátů, který účinně zpomaluje procesy související se senescencí a zároveň nemá negativní vliv na vývoj kořenů, je ASES (Nisler a kol. 2018). Ukazuje se, že ASES má jen velmi malou cytokininovou aktivitu a jeho ochranný efekt tedy není výsledkem zvýšené hladiny endogenních cytokininů v rostlině. Místo toho ochraňuje funkci PSII a také PSI včetně stimulace cyklického toku elektronů, čímž umožňuje zachovat funkci fotosyntetického aparátu a předcházet oxidativnímu poškození (Nisler a kol. 2023). Díky tomuto rozdílnému funkčnímu mechanismu oproti ostatním cytokininům není při ošetření ASES poškozen vývoj kořene a výnosy ječmene a pšenice byly při aplikaci už během raných stádií vývoje až o 5-8 % vyšší než u neošetřených rostlin. Zároveň rostliny ošetřené ASES vykazovaly vyšší odolnost proti stresu způsobenému suchem a zvýšenou salinitou půdy (Nisler a kol. 2018, Nisler a kol. 2023).

Dalšími deriváty, jejichž ochranný účinek proti senescenci je jiný než u běžných cytokininů, jsou poměrně nově syntetizované arabinosidy MeO a OH. Podobně jako ASES jen velmi málo interagují s cytokininovou signální dráhou. Jejich účinek spočívá v aktivaci mechanismů spojených s reakcí na patogeny. Ihned po aplikaci nastává v rostlině nárůst koncentrace kyseliny jasmonové a ethylenu, což značí stresovou reakci. Zároveň se dočasně zvýší koncentrace ROS a sníží se exprese některých genů souvisejících s fotosyntézou. Při dlouhodobější aplikaci byl ovšem pozorován pozitivní efekt na funkci PSII a oddálení nástupu senescence (Bryksová a kol. 2020). Navíc byl u obou látek pozorován ochranný efekt proti oxidativnímu poškození způsobenému světlem o vysoké intenzitě nebo peroxidem vodíku (Kučerová a kol. 2020).

Jistým problémem při použití vnější aplikace cytokininů na zpomalení nástupu senescence je, že v některých případech stimulují produkci ethylenu v rostlině. Etylen působí proti cytokininům, a naopak průběh senescence urychluje. Lepších výsledků je proto dosaženo při použití látky, která nevyvolává nadměrnou produkci ethylenu. U listů pšenice ošetřených OH nebyla zaznamenána stimulace produkce ethylenu, ale při použití MeO byla pozorována jeho zvýšená produkce. Výraznějšího potlačení změn souvisejících se senescencí bylo tedy u pšenice dosaženo při aplikaci OH. Opačně reagoval huseníček, který při ošetření OH

produkoval více ethylenu, ale aplikace MeO tuto produkci nestimulovala. Větší životnost pak měly listy ošetřené MeO (Kučerová a kol. 2020).

Cytokininy nehrají v rostlinných organismech pouze jednu roli. Ukazuje se, že by mohly mít mimo jiné význam také v obraně rostliny proti infekcím. Při napadení listů salátu infekcí padlí a jejich následném ošetření vnější aplikací cytokininů, bylo pozorováno nejen zpomalení postupu infekce, ale také návrat funkce fotosyntetických procesů poškozených v důsledku napadení tímto patogenem (Prokopová a kol. 2010). U pšenice a huseníčku byl také pozorován ochranný efekt OH a MeO proti některým plísním (Bryksová a kol. 2020).

Celkový účinek cytokininů na změny spojené se senescencí je výrazně ovlivněn jejich koncentrací v použitém roztoku. Zpomalující efekt na senescenci s rostoucí koncentrací stoupá až do určité „optimální koncentrace“, kdy jsou účinky konkrétního cytokininu nejvýraznější. Při použití vyšších koncentrací, než je tato optimální, zpomalující účinek na senescenci opět klesá a za určitých podmínek se může objevit dokonce urychlení senescence (Melkovičová 2012, Kučerová 2015). Při dlouhodobém vystavení zdravé rostliny nepřirozeně vysokým hladinám cytokininů dochází k poškozením, která se mohou podobat reakci na patogen. Výrazné zvýšení hladiny endogenních cytokininů (dosaženo aktivací příslušného genu) u rostlin tabáku způsobilo zvýšení produkce stresových hormonů, docházelo k inhibici fotosyntézy, formování lézí, hojně nastávala buněčná smrt a v chloroplastech rostl obsah peroxidu vodíku, v jehož důsledku docházelo k oxidativnímu poškození (Novák a kol. 2013). Poškození fotosyntetických parametrů (podobně jako při napadení infekcí, ale v menší míře) bylo pozorováno i při vnější aplikaci cytokininů na zdravé rostliny salátu (Prokopová a kol. 2010).

3.2.1 Cytokininy a světlo

Jak již bylo uvedeno, světlo může mít na průběh senescence dvojí účinek – v určitých případech dokáže chránit fotosyntetický aparát a zachovávat jeho funkci (Špundová a kol. 2003, Špundová a kol. 2005), při nevhodné intenzitě nebo světelné periodě má naopak destruktivní účinky (Špundová a kol. 2003, Procházková a Wilhelmová 2004). Také bylo ukázáno, že aplikace cytokininů nebo jejich derivátů obvykle postup senescence zpomaluje (např. Bryksová a kol. 2020, Niesler a kol. 2023). Pokud je rostlina vystavena zároveň působení PAR i cytokininům, jejich účinky se vzájemně ovlivňují. Bylo pozorováno, že samotná hladina endogenních cytokininů u oddělených listů huseníčku se měnila dle světelných podmínek, jimž byly vystaveny (Janečková a kol. 2018). Také byl zaznamenán nárůst cytokininového

signalingu v noci (Luklová a kol. 2022). Aktivita cytokininů je tedy zřejmě napojena na cirkadiánní rytmus rostliny.

Antisenescenční látky, které výrazně zpomalují průběh senescence ve tmě, mohou mít při vystavení jimi ošetřených listů určitým světelným podmínkám naopak urychlující efekt na změny související se senescencí. Děje se tak zejména při použití vyšších koncentrací těchto látek v kombinaci s vysokou intenzitou světla, jak popisuje ve své bakalářské práci Melkovičová (2012). Urychlující vliv na senescenci se projevil u mT v roztoku o koncentraci $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ v kombinaci s kontinuálním i periodickým světlem o intenzitě $370 \pm 40 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, dále také po 6 dnech od oddělení segmentů při koncentraci mT 10^{-4}M a kontinuálním světle (Melkovičová 2012). U stejné látky pozorovala urychlující efekt na senescenci také Vlčková a kol. (2006). Aplikace mT při inkubaci oddělených listů ve tmě měla na indukovanou senescenci výrazný zpomalující efekt – potlačila degradaci chlorofylu, pomohla zachovat účinnost PSII, omezila změny tvaru a struktury chloroplastů a značně snížila míru peroxidace lipidů. Ovšem při vystavení takto ošetřených listů kontinuálnímu světle o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ byl ochranný efekt mT patrný pouze první dva dny, poté následoval prudký pokles maximálního kvantového výtěžku PSII, což značí výrazné narušení fotosyntetických procesů, tvar chloroplastů se změnil na sférický a přesunuly se dále od okrajů buňky, v chloroplastech se vytvořila škrobová zrna a ve velké míře docházelo k peroxidaci lipidů (Vlčková a kol. 2006). Charakter zmíněných změn naznačuje, že urychlující efekt na senescenci by mohl mít původ ve zvýšené produkci ROS a následném oxidativním poškození. Danilova a kol. (2023) pozorovali při ošetření listů roztokem tZ o koncentraci $5 \mu\text{M}$ a inkubaci na světle potlačení hromadění ochranných antokyanů. To bylo doprovázeno zhoršením funkce PSII oproti neošetřeným listům a zvýšenou produkcí superoxidového radikálu (Danilova a kol. 2023).

Kromě mT a tZ byl v menší míře pozorován urychlující efekt na senescenci také u BAP o koncentraci $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$, a to 6. den po oddělení na intenzivním periodickém světle a 9. den po oddělení na kontinuálním světle o intenzitě $70 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Melkovičová 2012), dále u derivátu označovaného jako UR21 při koncentraci 10^{-4}M na světle o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $300 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Kučerová 2015).

I při ošetření cytokininy hraje důležitou roli spektrální charakter světla, kterému jsou vzorky vystaveny. U listů ošetřených BAP bylo pozorováno značné zpomalení degradace chlorofylu při inkubaci na zeleném, modrém i bílém světle. Vliv BAP na zpomalení degradace proteinů byl ovšem zaznamenán pouze při inkubaci na bílém a modrém světle, tedy když byla přítomna modrá složka spektra. I zde byly znaky senescence spojeny se změnami v oxidativním

metabolismu. U listů, které vykazovaly větší míru poškození, byla naměřena zvýšená hladina MDA a aktivita enzymatických antioxidantů (Causin a kol. 2006). V práci Běčáka (2016) byl zaznamenán značně rychlejší postup senescence u listů inkubovaných na červeném světle oproti listům inkubovaným na světle modrém nebo bílém. Při ošetření vzorků mT vykazovaly nejvýraznější zpomalující účinek této látky na senescenci listy vystavené červenému světlu (Běčák 2016).

Působení cytokininů je propojeno s fotoreceptory. U mutantních rostlin huseníčku bez fytochromu D nebyl detekován žádný rozdíl v aktivitě cytokininové signalizace mezi dnem a nocí. Také byl u těchto rostlin naměřen nižší obsah peroxidu vodíku než u mutantních rostlin s jiným chybějícím typem fytochromu, a jeho množství nekolísalo mezi dnem a nocí. Pokud nebyl v rostlině přítomen některý jiný typ fytochromu než fytochrom D, byly pozorovány rozdíly v cytokininové aktivitě mezi dnem a nocí a 20-30% rozdíl v obsahu peroxidu vodíku mezi dnem a nocí (Luklová a kol. 2022).

3.3 Shrnutí

Zkoumání rostlinné senescence a fytohormonů zapojených do tohoto procesu nám pomáhá nejenom lépe porozumět rostlinným organismům, které tvoří podstatnou a nedílnou součást biosféry naší planety, ale má i praktické výsledky v podobě zvyšování výnosu hospodářských plodin a jejich ochrany před stresem i patogeny. Průběh indukované senescence u oddělených listů ve tmě je již poměrně dobře zdokumentován (Špundová a kol. 2003, Špundová a kol. 2005, Vlčková a kol. 2006). Podobně je prozkoumán i vliv vnější aplikace cytokininů, případně jejich derivátů, na průběh senescence ve tmě (Vlčková a kol. 2006, Janečková a kol. 2019, Kučerová a kol. 2020). V přirozeném prostředí jsou ovšem rostliny obvykle vystaveny konkrétním světelným podmínkám, které mají vliv na nástup i průběh senescence. Obecně dokáže světlo do určité míry chránit fotosyntetický aparát listů a zpomalovat tak průběh senescence (Špundová a kol. 2003, Špundová a kol. 2005, Causin a kol. 2006), za některých podmínek ale dochází na světle naopak k ještě většímu poškození, pravděpodobně v důsledku oxidativního stresu (Procházková a Wilhelmová 2004). Pokud jsou zapojeny vlivy světla zároveň s aplikací cytokininů, je situace ještě komplikovanější. Postup senescence závisí na koncentraci použité antisenescenční látky (Melkovičová 2012, Kučerová 2015), rostlinném druhu (Kučerová a kol. 2020), intenzitě světla a světelné periodě (Melkovičová 2012) i vlnové délce světla (Causin a kol. 2006, Běčák 2016). Jelikož důsledky použití kombinace vnější aplikace cytokininů a různých druhů světla dosud nejsou dostatečně

prozkoumány, zabývá se tato práce právě srovnáním indukované senescence u listových segmentů ječmene ošetřených sedmi různými antisenescenčními látkami pod vlivem dvou odlišných světelných zdrojů s rozdílnými spektry. Senescence probíhající na světle byla dále srovnávána se senescencí u listových segmentů inkubovaných ve tmě.

4. Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Všechny experimenty byly prováděny na primárních listech ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos). Semena v květináčích s perlitem byla umístěna do fytokomory s teplotou 21 °C a relativní vlhkostí vzduchu 60 %. Rostliny byly pěstovány v režimu 16 hodin světlo o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 8 hodin tma. Po 8 dnech byly pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko) vybrány listy s podobnou koncentrací chlorofylu (lišící se vzájemně maximálně o 5 %). Tyto listy byly odděleny od rostliny a 2 cm od špičky listu byly skalpelem odřezány segmenty o délce 4 cm. Jednotlivými metodami (viz níže) bylo vždy změřeno 6 čerstvých listů (kontrola) a 6 listových segmentů dané varianty (inkubované v jednom z roztoků) po 6 dnech po oddělení. Listové segmenty byly umístěny do Petriho misek s 25 ml jednotlivých roztoků o koncentraci 10^{-4} M tak, aby všechny segmenty plavaly a nepřekrývaly se. Každá miska byla překryta průhledným víkem, aby se zabránilo přílišnému odpařování roztoků a případnému vyschnutí vzorků. Bylo použito celkem 7 látek, konkrétně *meta*-topolin (mT), *trans*-zeatin (tZ), N-fenyl-N'-(1,2,3-thidiazol-5yl)močovina (TDZ), N⁶-benzylaminopurin (BAP), 1-(2-methoxyethyl)-3-(1,2,3-thidiazol-5yl)močovina (ASES), 3-methoxy-6-benzylaminopurin-9-arabinosid (MeO) a 3-hydroxy-6-benzylaminopurin-9-arabinosid (OH). Každé látce bylo vystaveno 10 listových segmentů. Jako kontrolní byl použit 0,2% roztok dimethylsulfoxidu (DMSO). Dále byly segmenty vystaveny konkrétním podmínkám dle jednotlivých experimentů (viz dále).

4.2 Použité metody

Po 6 dnech inkubace byly listové segmenty podrobeny měření parametrů chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam (PSI, Drásov, ČR). Vzorky byly zatemněny na dobu 20 minut, vyskládány na černou podložku a přes oba řezy přelepeny lepicí páskou tak, aby během měření nedocházelo k jejich pohybu. Samotné měření probíhalo v režimu 10 minut ozáření červeným aktinickým světlem o intenzitě $230 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a následně 10 minut relaxace ve tmě. Byly zjišťovány následující parametry:

- minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu F_0
- maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu F_m
- maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II F_v/F_m .

Dále byla měřena fluorescence v čase t při aktinickém světle (F_t) a maximální fluorescence vzorku adaptovaného na červené aktinické světlo o intenzitě $230 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (F'_m). Těch bylo využito k určení:

- aktuálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II $\Phi_p = \frac{F'_m - F_t}{F_m}$
- kvantového výtěžku regulovaného nefotochemického zhášení $\Phi_{\text{NPQ}} = \frac{F_t}{F'_m} - \frac{F_t}{F_m}$.
- kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení $\Phi_{\text{f,D}} = \frac{F_t}{F_m}$

Po ukončení měření byly jednotlivé podložky se vzorky vyfotografovány a segmenty obkresleny na průhlednou fólii pro pozdější stanovení jejich plochy potřebné pro výpočet obsahu pigmentů a malondialdehydu (viz dále). Vzorky byly poté zamrazeny v tekutém dusíku a následně umístěny do mrazničky s teplotou $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do doby, než byly dále analyzovány.

V části zamrazených vzorků byl spektrofotometricky určován obsah chlorofylů a karotenoidů. Listové segmenty byly rozetřeny v třecí misce se špetkou uhličitanu hořečnatého. Dále bylo přidáno $1500 \mu\text{l}$ 80% acetonu a vzorky byly centrifugovány 10 minut při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a 3600 g . Supernatant byl poté zředěn 80% acetonem podle potřeby a na dvoupraprskovém absorpčním spektrofotometru UV/VIS 550 (Unicam, Cambridge, UK) byla změřena jeho absorbance ve vybraných vlnových délkách. Jako reference byl použit 80% aceton. Naměřené hodnoty absorbance pro vlnové délky 470 nm , $646,8 \text{ nm}$, $663,2 \text{ nm}$ a 750 nm pak byly použity pro výpočty obsahu chlorofylu a , chlorofylu b , karotenoidů, poměru chlorofylu a/b a poměru obsahu chlorofylu a karotenoidů podle vztahů od Lichtenthalera (1987).

Pro měření obsahu MDA v listech byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Segmenty byly homogenizovány v $1500 \mu\text{l}$ deionizované vody a centrifugovány 10 minut při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a 6000 g . Poté bylo odebráno $100 \mu\text{l}$ supernatantu a k němu přidáno $20 \mu\text{l}$ 6M NaOH. Následně byl vzorek zahříván na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Po přidání $60 \mu\text{l}$ 35% HClO_4 následovala opět centrifugace při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a $16\,000 \text{ g}$ po dobu 10 minut. Z takto připraveného vzorku bylo odebráno $100 \mu\text{l}$ a přidán $1 \mu\text{l}$ 50mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH). Po půl hodině ve tmě byly ze vzorků separovány jednotlivé sloučeniny na chromatografu Alliance e 2695 HPLC System (Waters Corporation, Milford MA, USA) s využitím kolony Astra c18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, velikost částic $3,0 \mu\text{m}$) (Chromeservis, Praha, ČR) a nástřikovým objemem $10 \mu\text{l}$. Pomocí detektoru 2998 Photodiode Array Detector (Waters Corporation, Milford MA, USA) byla naměřena absorbance při 310 nm . Ze získaného chromatogramu byla určena „plocha píku“ odpovídajícího MDA. Koncentrace MDA byla poté

počítána pomocí regresní rovnice pro MDA "plocha píku" = $(1240,5 \cdot c_n) - 6265$, kde c_n je koncentrace nástřiku v pmol.

4.3 Jednotlivé experimenty

4.3.1 Experiment 1

Vzorky připravené podle popisu v kapitole Rostlinný materiál byly umístěny do Algaetronu (PSI, Drásov, ČR) na kontinuální bílé LED světlo složené ze tří barev (modrá, zelená a červená, každá složka o intenzitě asi $80 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) o celkové intenzitě $240 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Světelné spektrum je uvedeno na Obr. 1A. Jednotlivé varianty byly během 3. dne inkubace vyměněny mezi oběma používanými Algaetrony, aby byly eliminovány rozdíly způsobené případnými nestejnými podmínkami v jednotlivých Algaetronech. Po 6 dnech inkubace byly přístrojem FluorCam (PSI, Drásov, ČR) změřeny fluorescenční parametry u 6 segmentů z každé varianty (roztoku). Pak byly segmenty zamrazeny a později vždy 3 segmenty použity pro spektrofotometrické stanovení obsahu pigmentů a 3 segmenty ke stanovení obsahu MDA.

4.3.2 Experiment 2

Listové segmenty v roztocích byly umístěny na kontinuální bílé světlo zářivek o intenzitě kolem $250 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (světelné spektrum na Obr. 1B). Měření fluorescenčních parametrů probíhalo opět po 6 dnech inkubace a vzorky byly bezprostředně po měření zamrazeny. Později byl spektrofotometricky stanoven obsah pigmentů a metodou HPLC obsah MDA (použity vždy 3 segmenty na variantu).

Oproti Experimentu 1 byla navíc použita metoda „ion-leakage“ ke stanovení míry poškození buněčných membrán. Měření probíhalo po 7 dnech inkubace. Listové segmenty byly zkráceny o 0,5 cm od obou řezů a umístěny do 3 ml deionizované vody. V té byla měřena měrná vodivost po 30 minutách od vložení segmentů a po 3 hodinách a 5 hodinách, kdy byly vzorky umístěny na bílém světle o intenzitě $1000 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

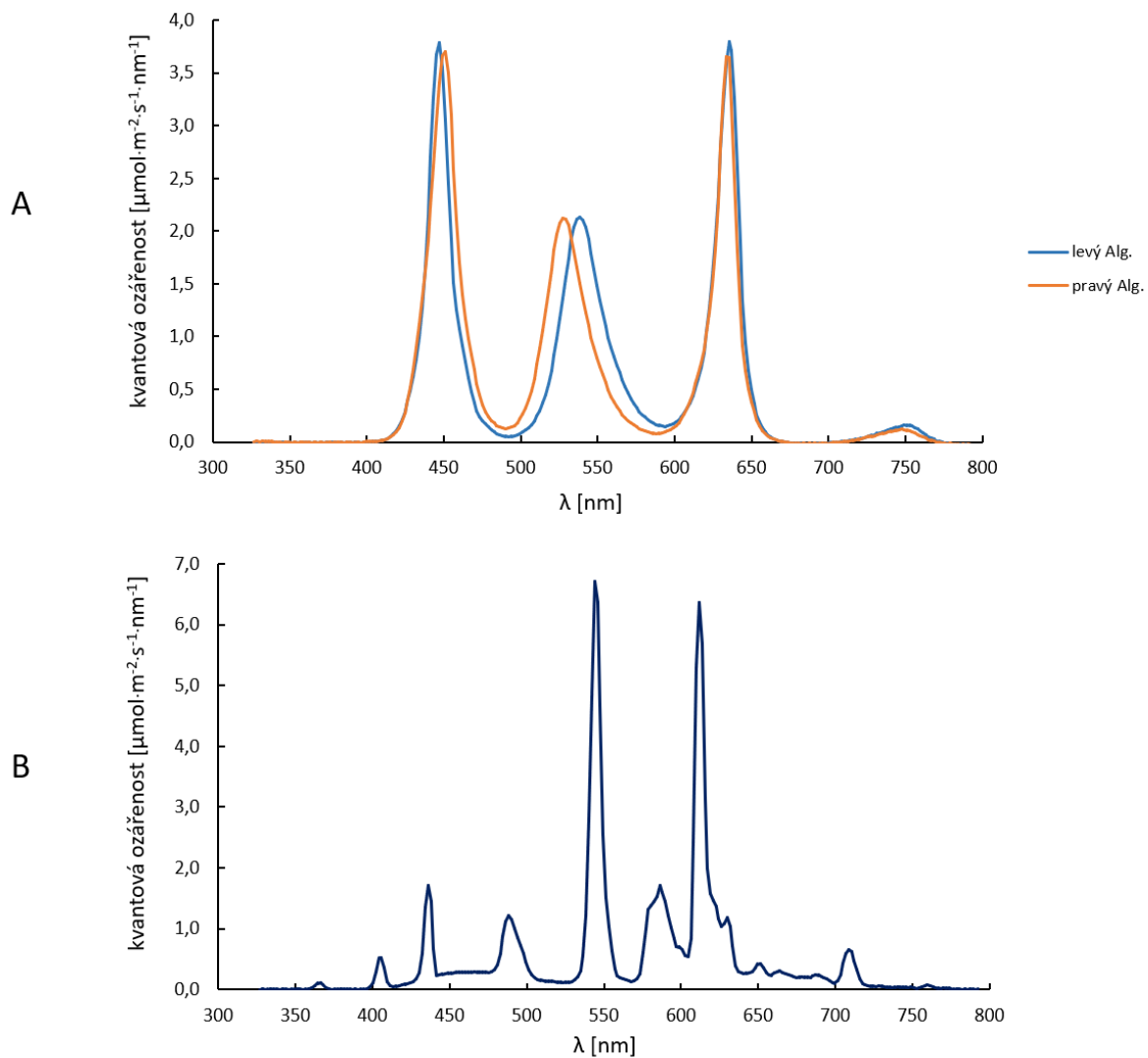
4.3.3 Experiment 3

Závěrečný experiment byl proveden pro srovnání změn měřených parametrů po 6 dnech inkubace segmentů ve tmě a na světle. Byl připraven dvojnásobný počet vzorků a polovina z každé varianty byla umístěna na kontinuální bílé světlo zářivek (Obr. 1B), obdobně jako v Experimentu 2. Druhá část inkubovaných segmentů byla zakryta černou fólií a umístěna do

komory vedle první části vzorků, tedy inkubace probíhala ve tmě, ale jinak za stejných podmínek jako u vzorků na světle. Po 6 dnech proběhlo měření obdobně jako v předchozích případech. Fluorescenční parametry byly změřeny pomocí přístroje FluorCam (PSI, Drásov, ČR) a následně ze zmrazených vzorků bylo určeno množství chlorofylu a karotenoidů a obsah MDA.

4.4 Statistické a grafické zpracování dat

Data byla zpracována v programu Microsoft Excel. U fluorescenčních parametrů byly použity mediány, chybové úsečky vyjadřují horní a dolní kvartil. U koncentrace fotosyntetických pigmentů, obsahu MDA a měrné vodivosti byl použit aritmetický průměr a směrodatné odchytky, měrná vodivost je vyjádřena také v % hodnot naměřených na začátku experimentu pro eliminaci vlivu nestejně velikosti či hmotnosti listových segmentů. Pro zjištění statistické významnosti rozdílů mezi parametry naměřenými v listech inkubovaných v jednotlivých roztocích vůči listům v kontrolním roztoku (DMSO) byl použit nepárový t-test. Statisticky významné rozdíly jsou značeny 1-3 hvězdičkami, kdy více hvězdiček znamená vyšší statistickou významnost. K určení plochy listových segmentů byl využit program ImageJ.



Obř. 1: Spektra světěl, kterým byly během inkubace v roztocích vystaveny listové segmenty. Bílé LED světlo dvou Algaetronů (PSI, Drásov, ČR) (A) bylo použito v Experimentu 1, bílé zářivkové světlo (B) bylo použito v Experimentech 2 a 3.

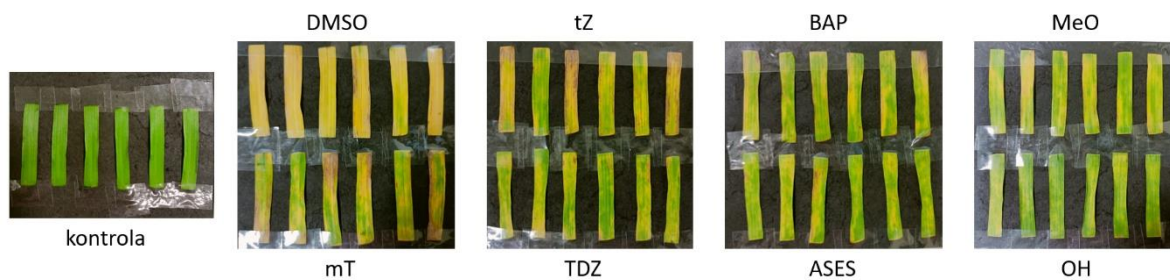
5. Výsledky

V rámci této práce bylo studováno působení různých typů cytokininů a jejich derivátů na fotosyntetický aparát v oddělených listech ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos) inkubovaných na světle a ve tmě. K tomuto účelu bylo použito postupů popsaných v kapitole 4 Materiál a metody. Pro určení poklesu obsahu fotosyntetických pigmentů bylo použito spektrofotometrické měření obsahu chlorofylů a karotenoidů. Míra poškození funkce PSII byla určována pomocí měření parametrů chlorofylové fluorescence, kdy byly konkrétně sledovány parametry F_0 , F_m , F_v/F_m a průběhy Φ_p , $\Phi_{f,D}$ a Φ_{NPQ} . Dále byl měřen metodou HPLC obsah MDA, který odráží míru peroxidace lipidů v důsledku oxidativního poškození. V Experimentu 2 bylo navíc zjišťováno poškození biologických membrán metodou „ion-leakage“.

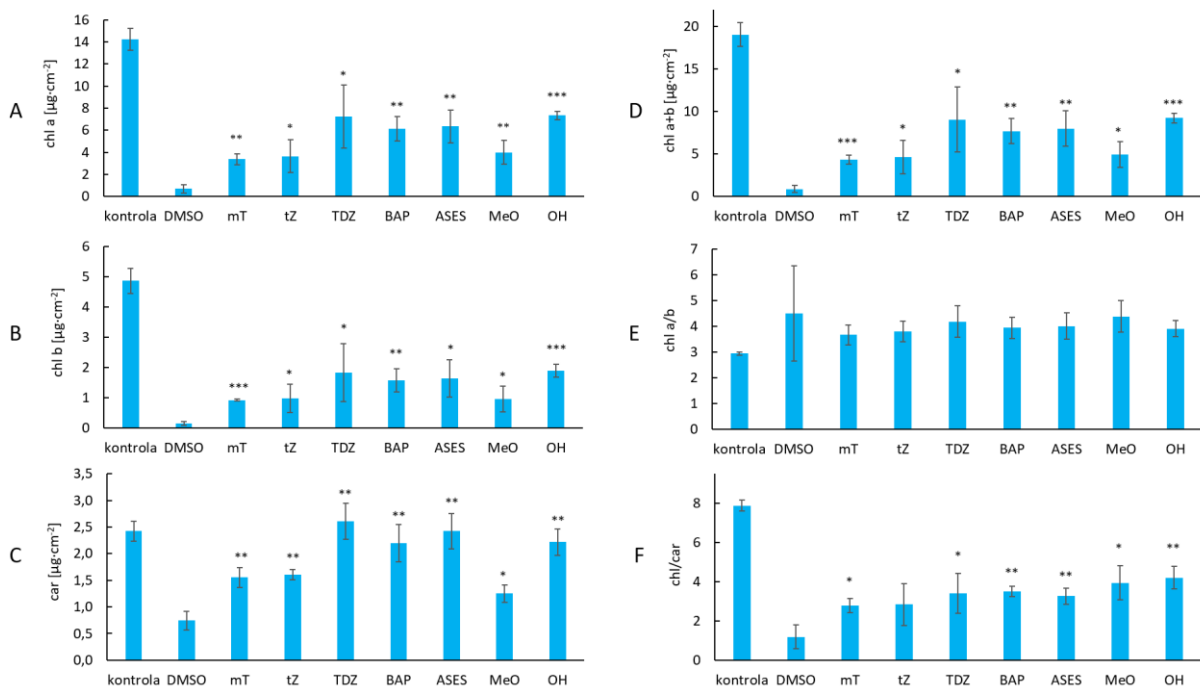
5.1 Experiment 1

U segmentů inkubovaných 6 dní v DMSO došlo v důsledku degradace chlorofylu k viditelné změně (zežloutnutí listů) oproti kontrole (Obr. 2). Na první pohled je zřejmé, že všechny použité látky měly určitý ochranný efekt proti těmto změnám. Nejlépe zachovány se jeví segmenty inkubované v OH, dále také v MeO, BAP, TDZ a ASES. O něco menší byl efekt u tZ a mT, ale stále byla barva listů zachována výrazně lépe než u DMSO. Tyto viditelné změny byly potvrzeny spektrofotometrickým měřením obsahu fotosyntetických pigmentů (Obr. 3). Opět je zřejmé největší poškození u segmentů inkubovaných v DMSO, kde vidíme výrazný pokles v množství chlorofylu *a*, chlorofylu *b* i karotenoidů. Zřetelný pokles v obsahu pigmentů nastal také u listů inkubovaných v mT, tZ, a oproti předpokladům dle viditelné barvy listů také v MeO. Změny obsahu byly ve všech látkách pro chlorofyl *a* a *b* podobné. Nejlépe byl obsah fotosyntetických pigmentů zachován dle očekávání u listů inkubovaných v OH, a ochranný efekt se potvrdil také u TDZ, BAP a ASES. U všech variant se projevil mírný nárůst v poměru chlorofylu *a/b*, což je známkou rychlejší degradace světlosběrných komplexů vůči reakčním centrům fotosystému II. Zároveň nebyl zjištěn signifikantní rozdíl u segmentů ošetřených cytokininem oproti DMSO. V poměru chlorofylu ku karotenoidům dosahují všechny použité látky vyšší hodnoty oproti DMSO, což naznačuje pomalejší degradaci chlorofylů vůči karotenoidům.

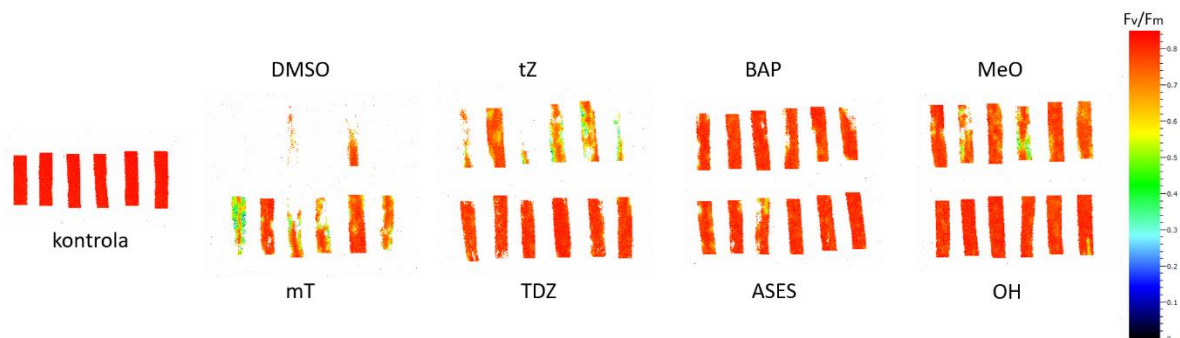
Obdobné výsledky jsou patrné ze zobrazení F_v/F_m (Obr. 4). U segmentů inkubovaných v DMSO je funkce PSII poškozena natolik, že na imagingu není většina plochy listových segmentů vůbec viditelná. Ochranný efekt byl nejvýraznější u OH, a dále u BAP, ASES a TDZ. Mírné zhoršení funkce oproti kontrole nastalo v listech inkubovaných v MeO, větší poškození lze vidět v případě přirozeně se vyskytujících cytokininů tZ a mT.



Obr. 2: Fotografie listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na bílém LED světle v roztoku 0,2% DMSO a v $10^{-4}M$ roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, bezprostředně po měření parametrů chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty fotografované v den oddělení.



Obr. 3: Změny obsahu fotosyntetických pigmentů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na bílém LED světle v roztoku 0,2% DMSO a v $10^{-4}M$ roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola představuje stav v den oddělení. (A) obsah chlorofylu *a*, (B) obsah chlorofylu *b*, (C) obsah karotenoidů, (D) celkový obsah chlorofylu *a* a *b*, (E) poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*, (F) poměr obsahu chlorofylu a karotenoidů. Uvedeny jsou aritmetické průměry a směrodatná odchylka ($n = 3$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).



Obr. 4: Zobrazení maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na bílém LED světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty měřené bezprostředně po oddělení.

Energie absorbovaná chlorofylem je částečně zpětně vyzařena do okolí v podobě fluorescence. Měřením tohoto fluorescenčního záření můžeme získat informace o přenosu energie v rostlině a fungování PSII. Určením minimální a maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (parametry F_0 a F_m) zjišťujeme míru degradace nebo poškození funkce světlosběrných komplexů. Parametr F_v/F_m , který určíme jako poměr okamžité hodnoty fluorescence zmenšené o F_0 a maximální hodnoty fluorescence, ukazuje fungování fotochemie PSII. Dle získaných výsledků (Obr. 5) nastalo největší poškození funkce PSII u segmentů inkubovaných v DMSO, kde došlo ke snížení F_v/F_m asi o 15 % oproti kontrole, dále také ke snížení F_0 přibližně o 80 % a F_m přibližně o 85 % oproti kontrole. U TDZ, BAP, ASES a OH došlo ke snížení F_v/F_m oproti kontrole přibližně jen o 5 %. Z výsledků je patrné, že všechny látky měly ochranný efekt proti změnám souvisejícím se senescencí. Ve sledovaných látkách nastalo snížení F_0 přibližně o 40 % a F_m přibližně o 55 % oproti kontrole. V případě parametru F_v/F_m (Obr. 5C) se jeví u tZ větší poškození než u DMSO (i když rozdíl oproti DMSO nebyl statisticky významný), ale je třeba si uvědomit, že přístroj FluorCam (PSI, Drásov, ČR) vyhodnocuje hodnoty měřených parametrů pouze z funkčních částí listových segmentů, v prezentovaných hodnotách se tedy nezohledňuje rozsah částí listových segmentů s „nulovou“ funkcí (resp. nedetekovatelnou chlorofylovou fluorescencí). Z předchozích výsledků (Obr. 4) je vidět, že listy inkubované v DMSO byly z velké části poškozeny natolik, že přístroj již nezaznamenal žádný signál, a výsledná hodnota je tak určena pouze ze zbytku fungujících částí listů.

Průběh Φ_p ukazuje, kolik energie zachycené fotosystémem II je využito na fungování fotochemie. V čase po spuštění aktinického světla dochází postupně k adaptaci na danou intenzitu světla (rostlina se při náhlém osvětlení o vyšší intenzitě nejprve velkého množství energie zbavuje zhášením, aby předešla případnému přexcitování fotosyntetického aparátu) a

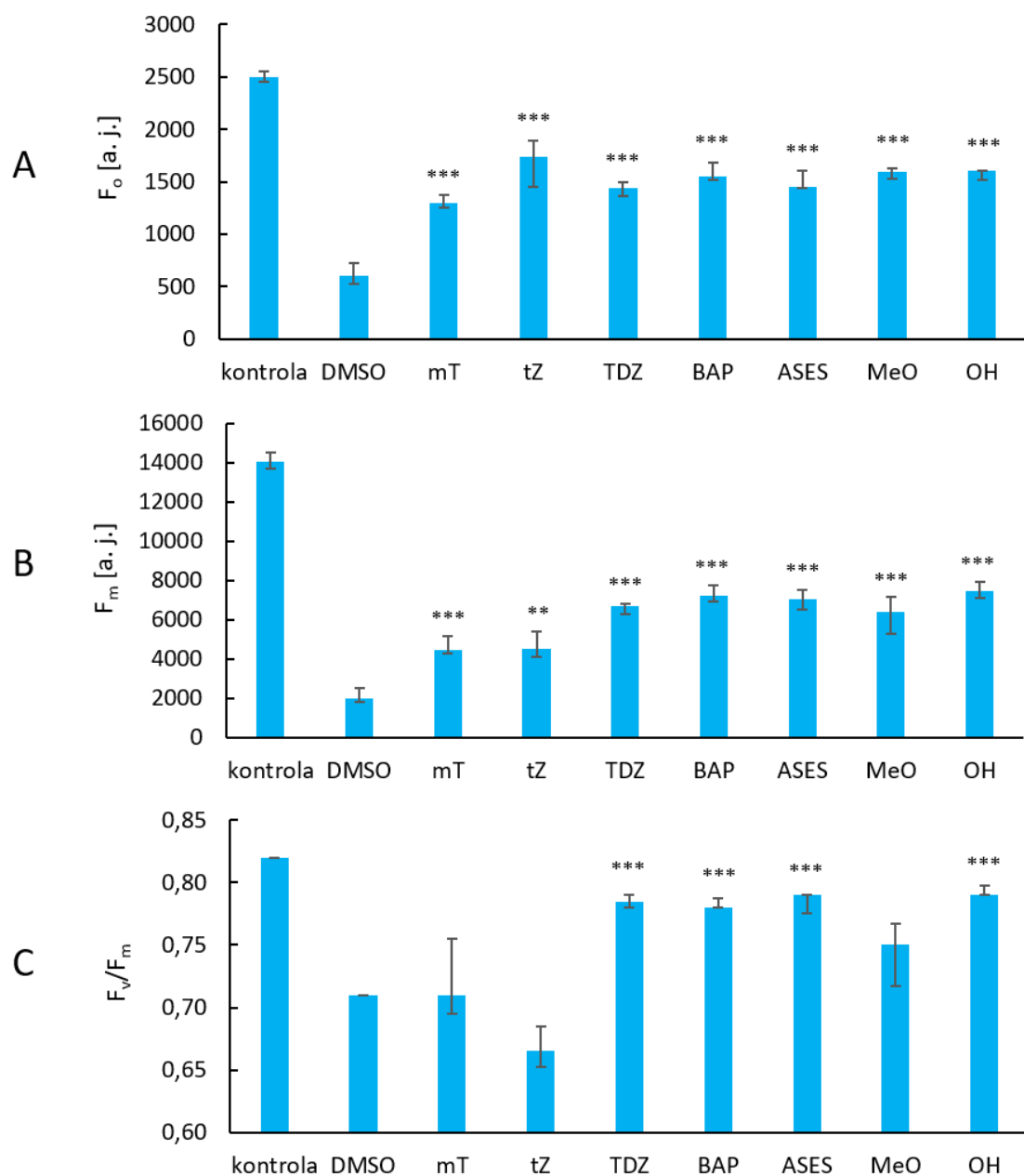
následnému ustálení na maximální světelné hodnotě. Ve tmě obvykle dosahuje Φ_p u zdravých listů hodnoty kolem 0,8. V případě poškození fotosyntetického aparátu nastává pomalejší adaptace po spuštění aktinického světla a celkově Φ_p dosahuje nižší hodnoty ve tmě i na světle, jak je vidět u variant inkubovaných v DMSO, tZ, mT a MeO (Obr. 6A). U variant inkubovaných v OH, TDZ, BAP a ASES vidíme rychlejší nárůst ve světelné části než u kontroly (inkubace segmentů v látkách probíhala na světle o vyšší intenzitě než pěstování rostlin, tedy sledované segmenty byly aklimované na vyšší dávky světla než kontrolní segmenty) a v temnostní fázi dosahují prakticky stejné maximální hodnoty jako kontrola.

Graf Φ_{NPQ} ukazuje průběh regulovaného nefotochemického zhášení, tedy kolik absorbované energie bylo přeměněno na teplo. Při mírnějším zhoršení funkce PSII tento parametr nejprve narůstá, jelikož klesá využití absorbované energie na fotochemii a nevyužitá energie by mohla buňku více poškodit, je tedy potřeba ji zhášet. Při větším poškození fotosyntetického aparátu již přestává fungovat i nefotochemické zhášení. Po spuštění aktinického světla zaznamenáme u zdravého listu prudký nárůst tohoto parametru a následuje postupné snížení, jak se rostlina adaptuje na danou intenzitu světla. V temnostní fázi měření po vypnutí aktinického světla není taková potřeba se zbavovat přebytečné energie a Φ_{NPQ} se ustálí kolem hodnoty 0,05. Průběh Φ_{NPQ} u sledovaných listových segmentů je znázorněn na obrázku 6B. U listů inkubovaných v DMSO, tZ, mT a MeO není patrný pokles nefotochemického zhášení během adaptace na světle v prvních dvou minutách měření (Obr. 6B). Lepší stav funkce Φ_{NPQ} ukazují výsledky u segmentů inkubovaných v OH, TDZ, BAP a ASES, u kterých je tento pokles přítomen, i když samotný nárůst Φ_{NPQ} bezprostředně po spuštění aktinického světla je výrazně nižší oproti kontrole. To je z části způsobeno intenzitou použitého aktinického světla, jelikož kontrolní segmenty byly pěstovány na světle o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, zatímco inkubace v roztocích probíhala na více než dvojnásobné intenzitě světla. Inkubované segmenty tak byly lépe adaptovány na větší dávky záření. V temnostní části měření byl pokles Φ_{NPQ} obdobný u všech variant.

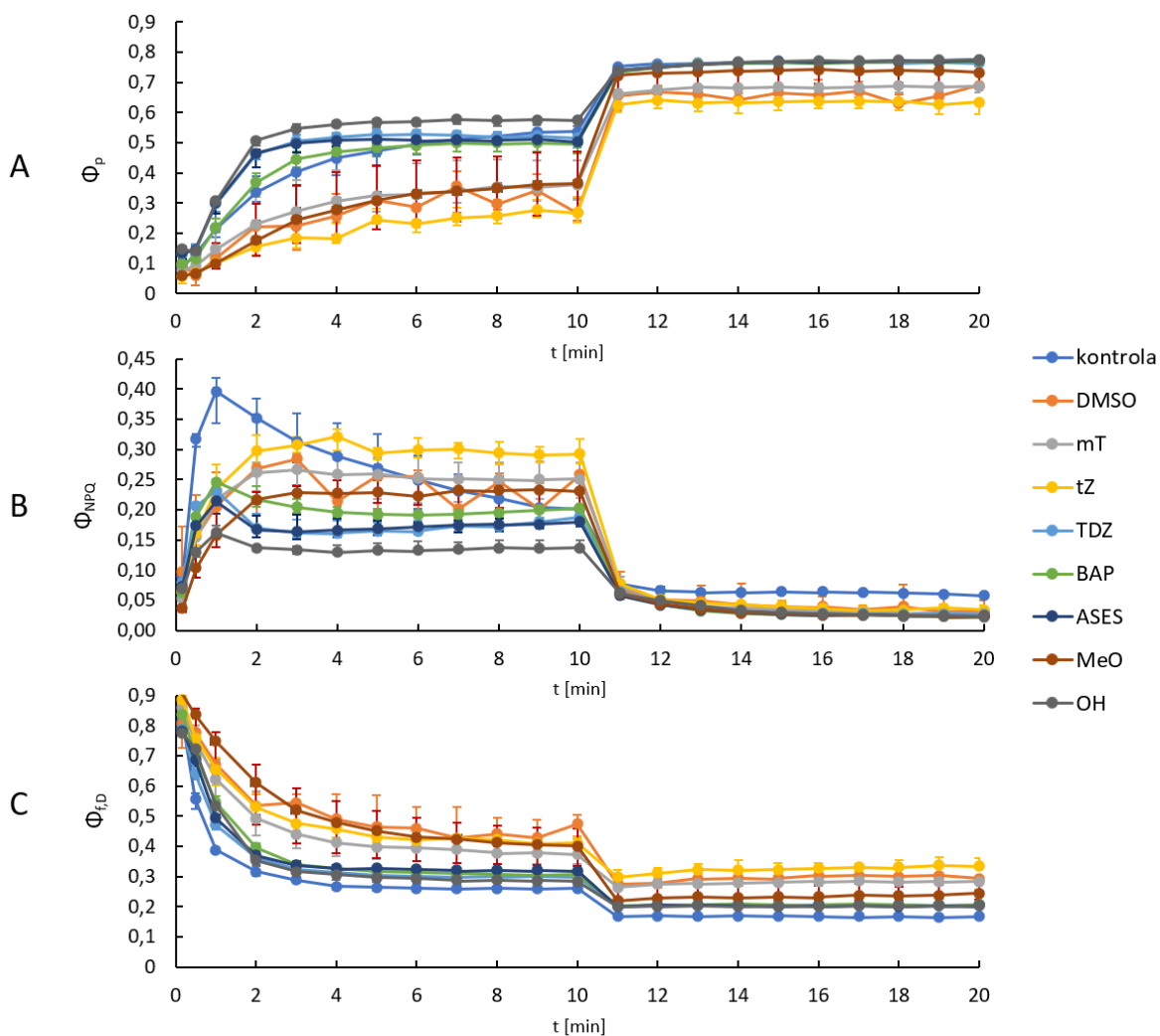
Průběh $\Phi_{f,D}$ ukazuje, kolik energie je ztraceno fluorescencí a konstitutivní tepelnou disipací. U zdravého listu pozorujeme po spuštění aktinického světla prudký pokles z maximální hodnoty kolem 0,8 na hodnotu asi 0,3, kde se $\Phi_{f,D}$ ustálí. V temnostní fázi je u nepoškozeného listu tento parametr ustálen kolem hodnoty 0,2. Při poškození fotosyntetického aparátu je využíváno méně energie na fungování fotochemie a více se jí tedy ztratí fluorescencí a konstitutivní tepelnou disipací, což se projeví zpomalením poklesu $\Phi_{f,D}$ po spuštění aktinického světla a obecně nárůstem $\Phi_{f,D}$. U průběhu $\Phi_{f,D}$ sledovaných segmentů (Obr. 6C)

vidíme zpomalení poklesu ve světelné části měření u DMSO, tZ, mT a MeO, které mají zároveň vyšší hodnoty v temnostní fázi měření. OH, TDZ, BAP a ASES vykazují jen mírné zvýšení oproti kontrole.

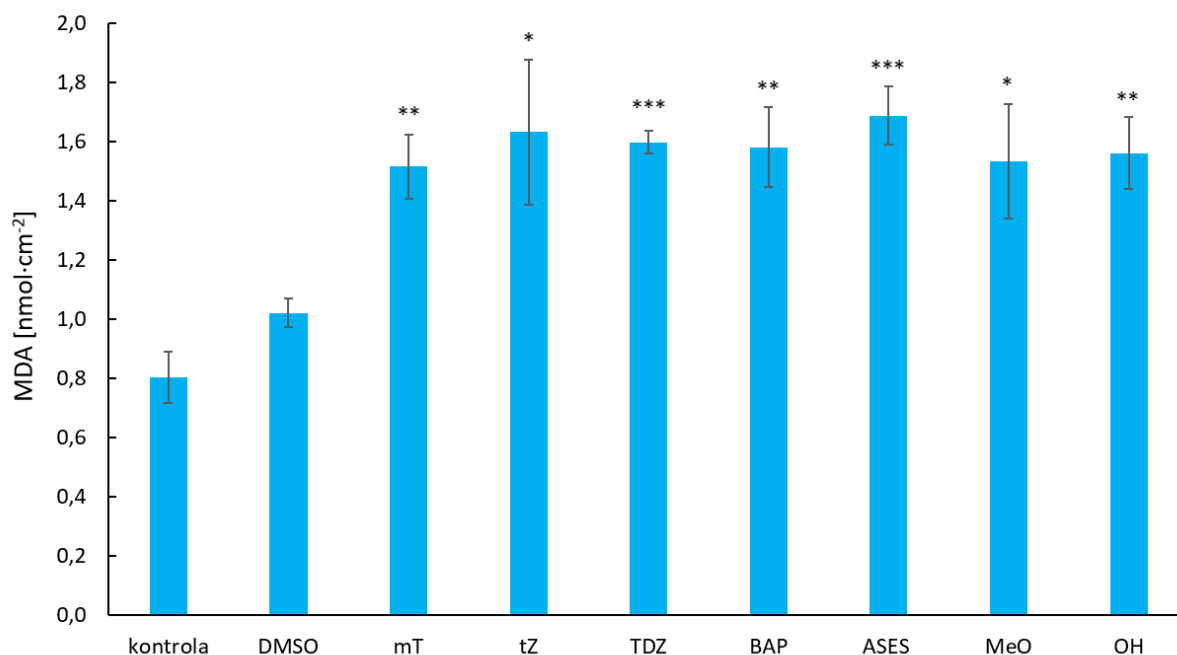
MDA se v rostlinných buňkách vyskytuje přirozeně jako vedlejší produkt některých chemických procesů. Ve větší míře vzniká při oxidativním stresu jako produkt peroxidace lipidových membrán. Při velmi výrazném poškození buněk již nemusí probíhat ani tyto reakce a obsah MDA může být relativně nízký. Obsah MDA v listech inkubovaných v DMSO se mírně zvýšil oproti kontrole (asi o 35 %), což naznačuje zvýšenou peroxidaci lipidů, pravděpodobně v důsledku poškození oxidativním stresem (Obr. 7). Ve všech sledovaných látkách však narostlo množství MDA asi na dvojnásobek oproti kontrole. Poškození reaktivními formami kyslíku se tedy jeví větší v jednotlivých roztocích oproti DMSO. Je však vysoce pravděpodobné, že funkčnost listů inkubovaných v DMSO byla poškozena natolik, že již nedocházelo ani ke zvýšené produkci MDA.



Obr. 5: Změny fluorescenčních parametrů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na bílém LED světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení segmentů. (A) minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_0), (B) maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_m), (C) maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m). Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily ($n = 6$ u všech variant kromě DMSO, u DMSO $n = 5$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).



Obr. 6: Průběh aktuálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Φ_p) (A), kvantového výtěžku regulovaného nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}) (B) a kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení ($\Phi_{f,D}$) (C) po spuštění aktinického světla (prvních 10 minut) a během relaxace ve tmě (11.-20. minuta) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na bílém LED světle v roztoku 0,2% DMSO a v $10^{-4}M$ roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení. Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily (n = 6 u všech variant kromě DMSO, u DMSO n = 5).



Obr. 7: Koncentrace MDA u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na bílém LED světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola představuje stav v den oddělení. Uvedeny jsou aritmetické průměry a směrodatná odchylka ($n = 3$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

Ze získaných výsledků vyplývá, že u segmentů inkubovaných na LED světle nenastalo v žádné ze sledovaných látek urychlení senescence oproti DMSO. Roztoky cytokininů a jejich derivátů měly v různé míře ochranný efekt na udržení obsahu fotosyntetických pigmentů i funkce PSII.

5.2 Experiment 2

Segmenty inkubované 6 dní v DMSO na zářivkovém světle vykazovaly změnu barvy oproti kontrole (Obr. 8). V důsledku degradace chlorofylu došlo k zesvětlení a místy zežloutnutí listů, změny ale nejsou tak výrazné jako v Experimentu 1. Dle viditelných změn se největší poškození oproti kontrole jeví u segmentů inkubovaných v mT a BAP, o něco méně také v OH. Na rozdíl od Experimentu 1, kde byla na první pohled nejvýraznější změna barvy oproti kontrole u segmentů inkubovaných v DMSO, se zde jeví změny barvy oproti kontrole ve všech sledovaných látkách podobné nebo dokonce větší než u DMSO.

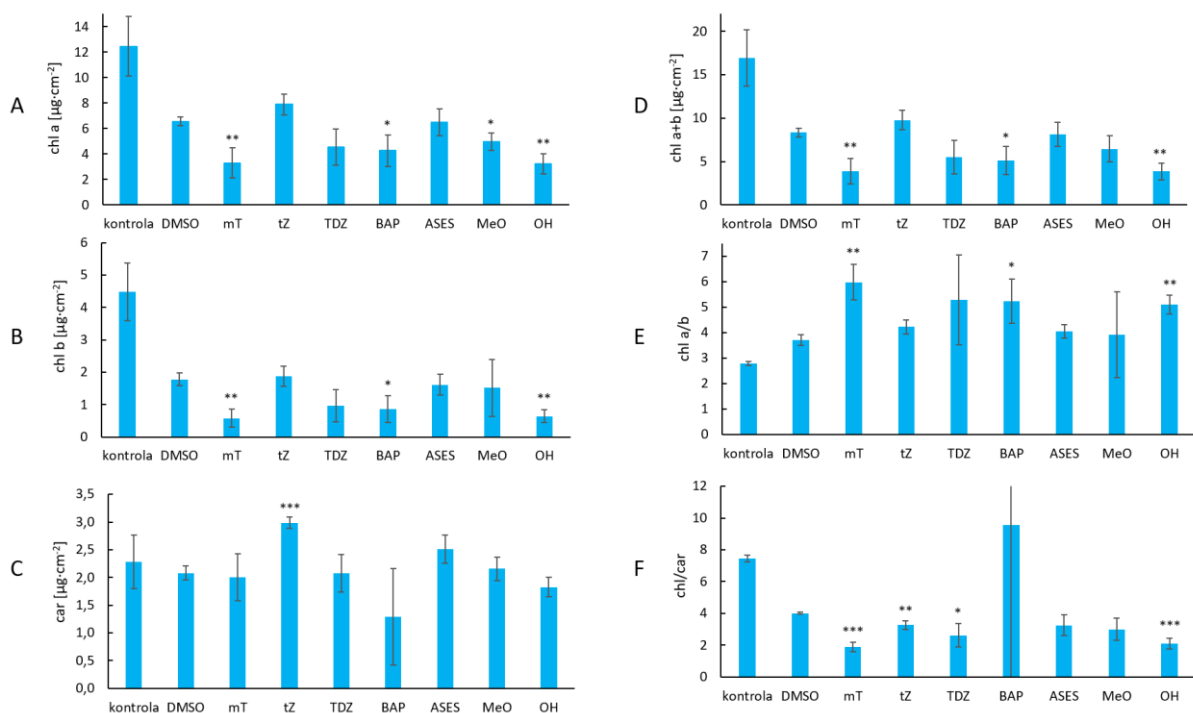
Měření obsahu fotosyntetických pigmentů ukazuje větší míru zachování chlorofylů i karotenoidů v DMSO oproti Experimentu 1. Obsah chlorofylu u listových segmentů inkubovaných v DMSO klesl přibližně o 50 % oproti kontrole (Obr. 9D), zatímco v Experimentu 1 nastal pokles u varianty DMSO o asi 90 % oproti kontrole (Obr. 3D). Větší

degradaci fotosyntetických pigmentů než u DMSO vykazují segmenty inkubované v mT, TDZ, BAP, MeO a OH. Nejlépe je množství chlorofylu zachováno u varianty inkubované v tZ, která vykazuje také nárůst obsahu karotenoidů. U segmentů inkubovaných v mT je patrný nárůst poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* asi na dvojnásobek oproti kontrole. U ostatních variant tento poměr v menší míře narostl také, statisticky významný byl nárůst asi o 65 % oproti kontrole u variant inkubovaných v BAP a OH. Takový výsledek naznačuje, že v těchto případech rychleji ubývaly světlosběrné komplexy, než degradovala reakční centra PSII. U DMSO se nárůst také mírně projevil, ale všechny sledované látky tento efekt zvýšily.

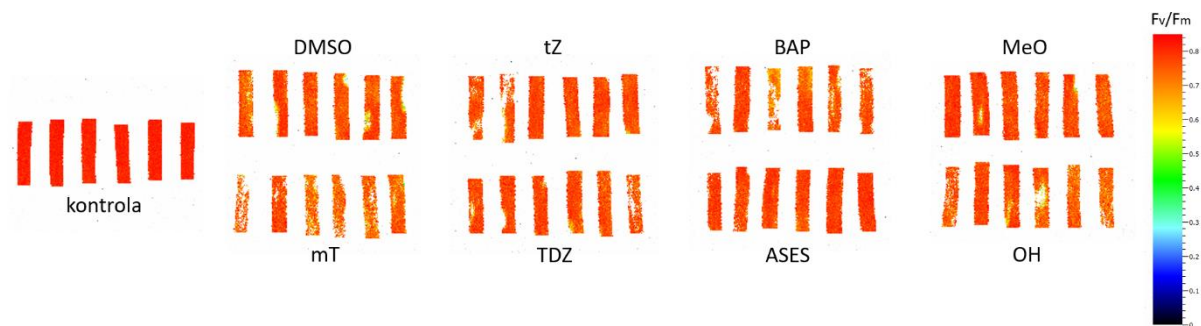
Zobrazení parametru F_v/F_m opět ukazuje relativně dobré zachování funkčnosti segmentů inkubovaných v DMSO oproti Experimentu 1 (Obr. 10). Funkce PSII byla dobře zachována u všech variant, nejvýraznější poškození oproti kontrole se jeví u segmentů inkubovaných v mT, BAP a OH.



Obr. 8: Fotografie listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v $10^{-4}M$ roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, bezprostředně po měření parametrů chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty fotografované v den oddělení.



Obř. 9: Změny obsahu fotosyntetických pigmentů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4}M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola představuje stav v den oddělení. (A) obsah chlorofylu *a*, (B) obsah chlorofylu *b*, (C) obsah karotenoidů, (D) celkový obsah chlorofylu *a* a *b*, (E) poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*, (F) poměr obsahu chlorofylu a karotenoidů. Uvedeny jsou aritmetické průměry a směrodatná odchylka ($n = 3$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

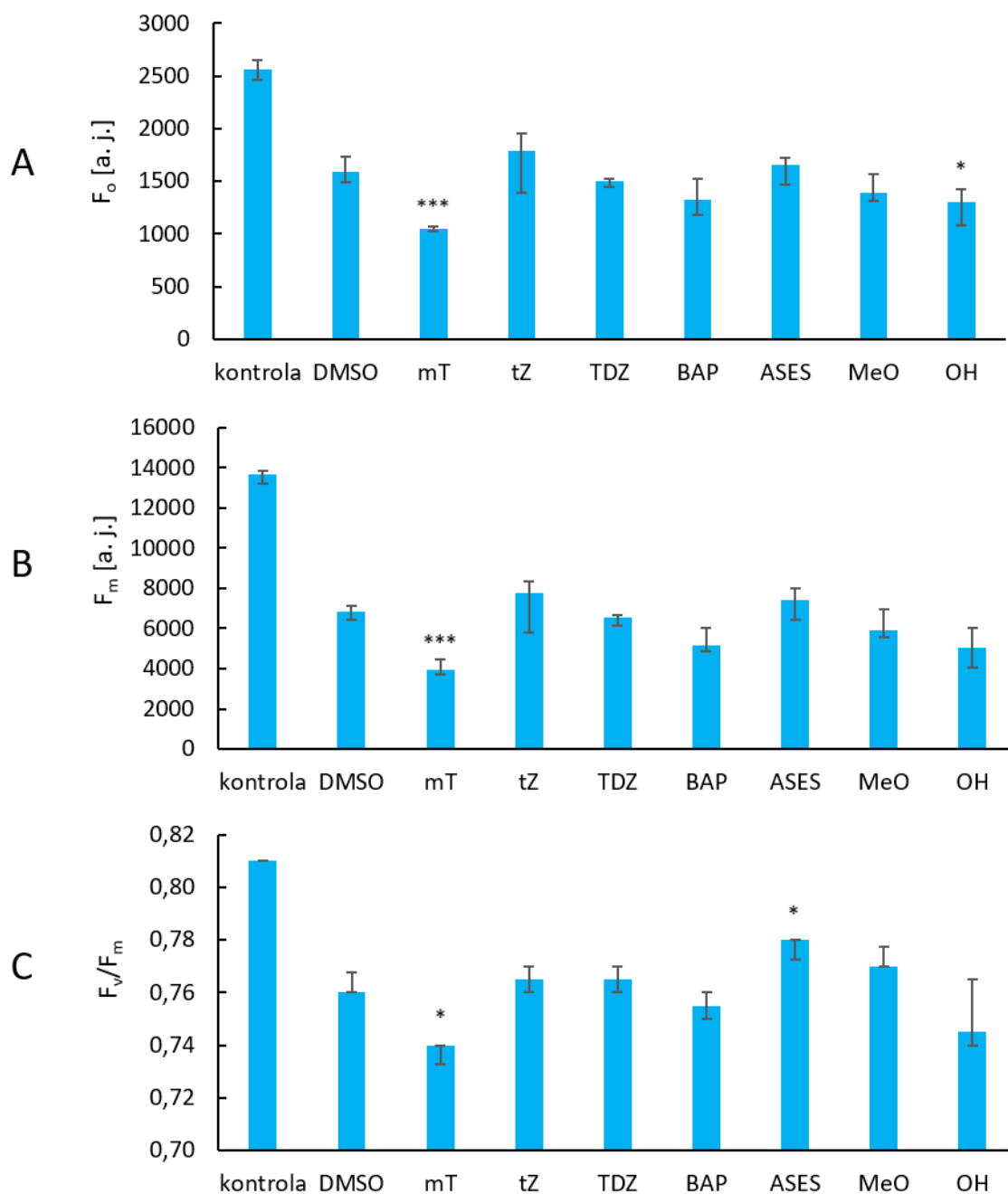


Obř. 10: Zobrazení maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4}M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty měřené bezprostředně po oddělení.

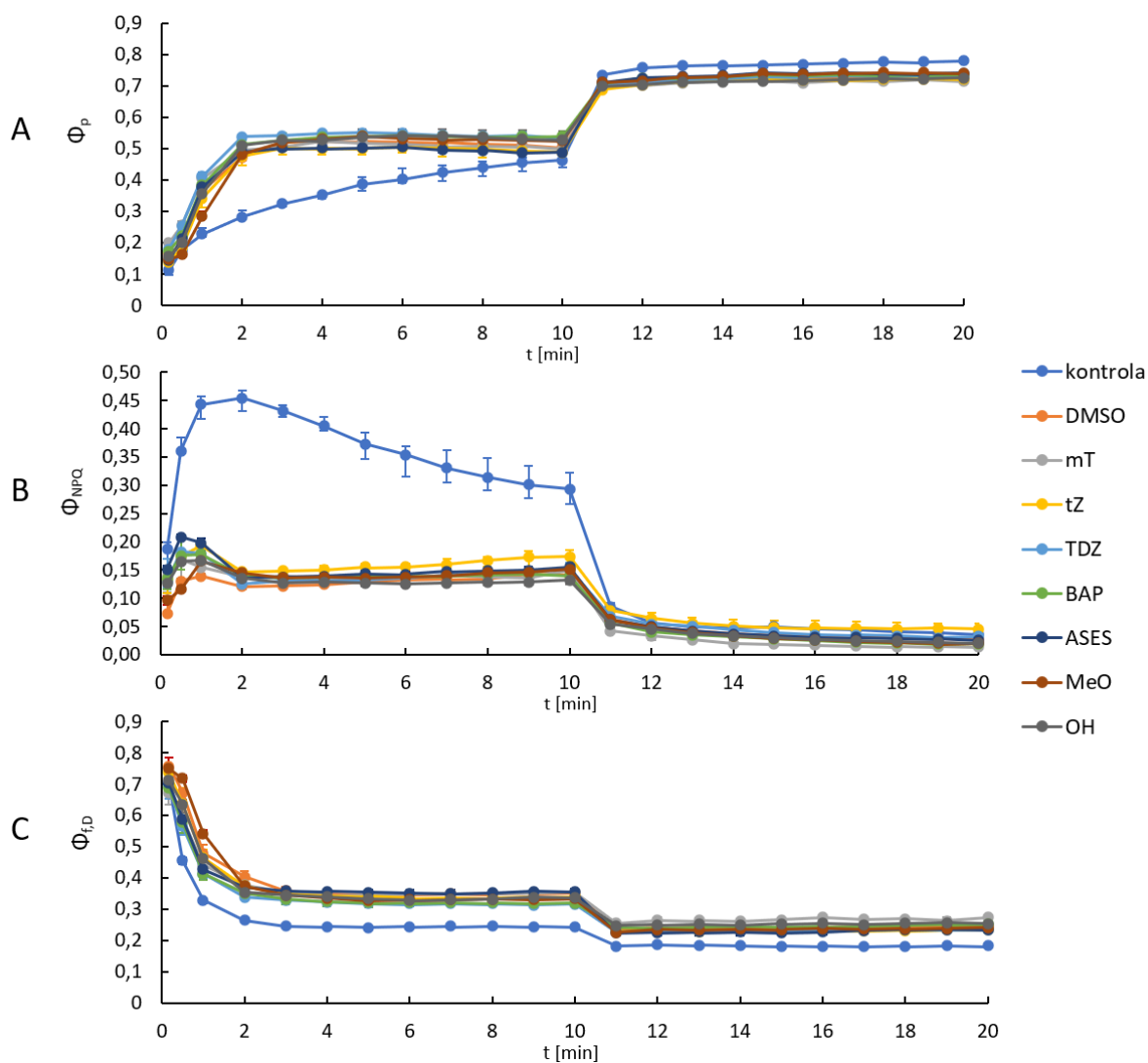
Měření parametrů chlorofylové fluorescence F_0 , F_m a F_v/F_m ukázalo největší zhoršení stavu u varianty inkubované v mT (Obr. 11). Větší poškození oproti DMSO vykazují i segmenty inkubované v BAP a OH. Průběh Φ_p vykazuje velmi podobnou situaci pro všechny varianty (Obr. 12A), ovšem odlišnou od kontroly, což mohlo být způsobeno rozdílnou intenzitou světla, na kterém byly pěstovány rostliny, oproti intenzitě světla, na kterém probíhala inkubace listových segmentů v roztocích. V grafu Φ_{NPQ} je také patrná odlišná situace od kontroly, ale jinak podobná pro všechny varianty (Obr. 12B). Ve všech případech je po mírném prvotním nárůstu patrný pokles parametru v prvních dvou minutách. Nejmenší maximální hodnoty dosáhl nárůst u varianty inkubované v DMSO. Průběh $\Phi_{f,D}$ vykazuje menší pokles v čase pro všechny varianty oproti kontrole (Obr. 12C). V temnostní fázi měření dosahuje nejvyšších hodnot varianta inkubovaná v mT.

Nárůst obsahu MDA asi o 35 % oproti kontrole ukazuje na oxidativní poškození u segmentů inkubovaných v DMSO (Obr. 13). Ještě větší navýšení obsahu MDA, asi o 65 % oproti kontrole, bylo zaznamenáno u variant inkubovaných v mT, BAP, ASES, MeO a OH, nicméně rozdíl oproti DMSO nebyl signifikantní. Naopak prakticky žádnou zvýšenou produkci MDA nevykazují varianty inkubované v tZ a TDZ, takže obsah MDA byl v těchto případech signifikantně nižší než u variant inkubovaných v DMSO.

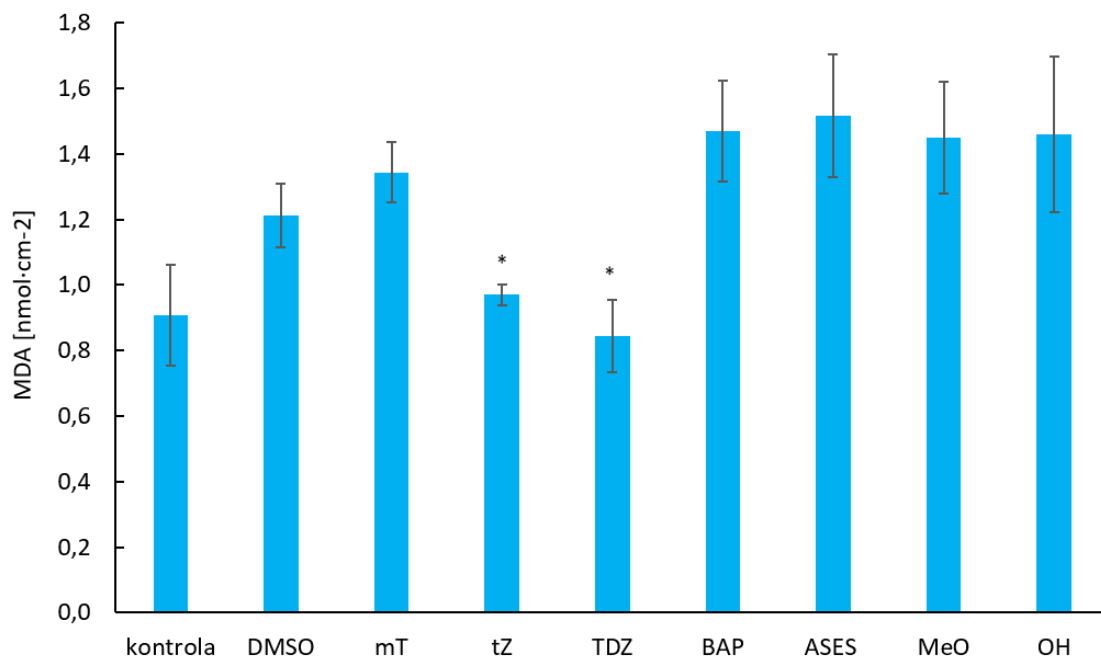
Pro měření „ion-leakage“ byly listové segmenty umístěny po jednom do malého množství deionizované vody a vystaveny světlu o vysoké intenzitě. Bezprostředně po vložení segmentů a následně po 3 a 5 hodinách vystavení světlu byla měřena měrná elektrická vodivost vody, ve které byly jednotlivé listy máčeny. Měrná vodivost narůstala v důsledku poškození buněk a následnému „vylití“ iontů do měřené vody. Nejvýraznější poškození biologických membrán bylo zaznamenáno u variant inkubovaných v BAP a OH, ostatní varianty dosahují podobných hodnot jako DMSO (Obr. 14). O něco nižší poškození oproti DMSO se jeví u segmentů inkubovaných v mT a ASES.



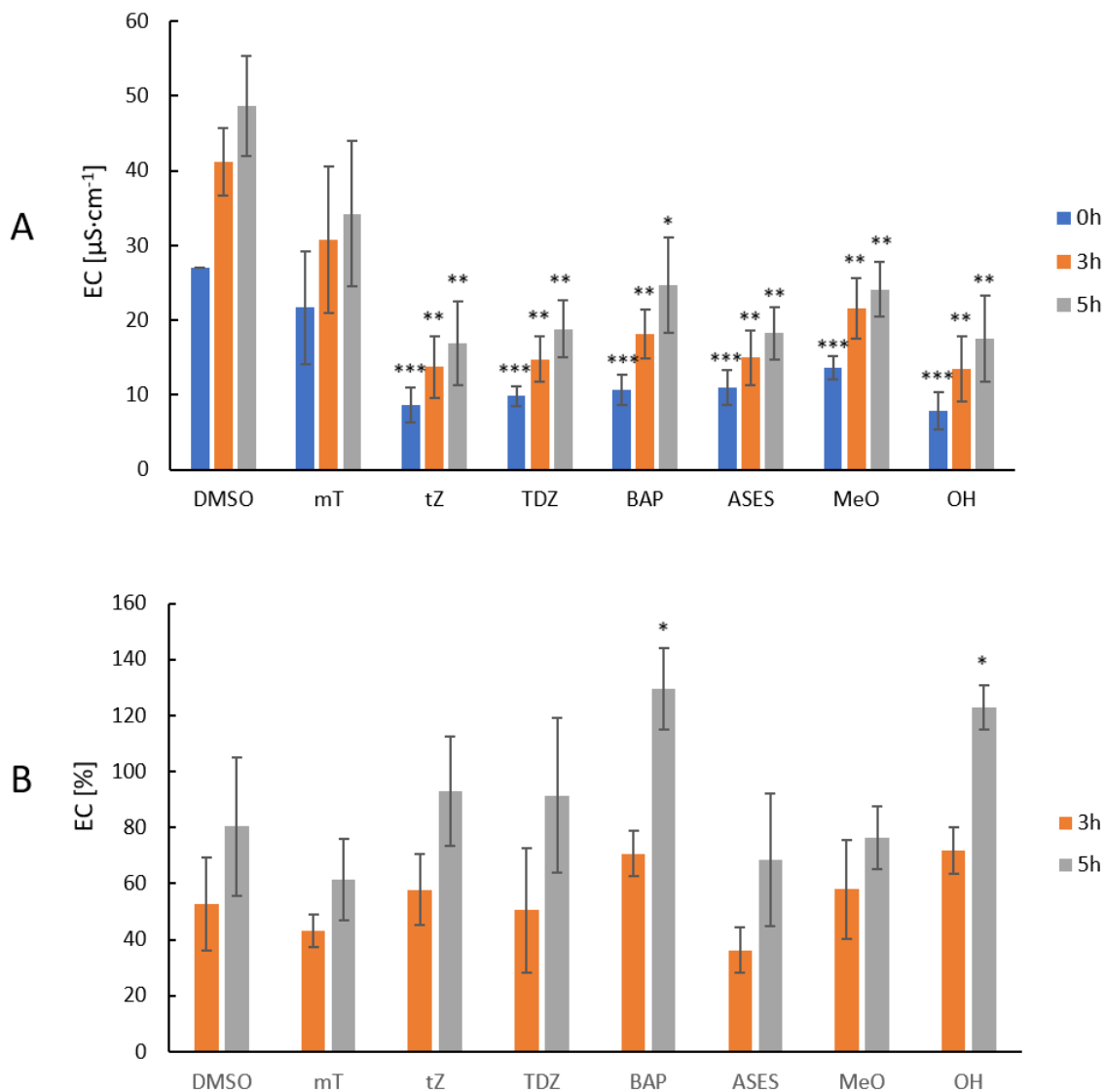
Obr. 11: Změny fluorescenčních parametrů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení segmentů. (A) minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_0), (B) maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_m), (C) maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m). Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily ($n = 6$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).



Obr. 12: Průběh aktuálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Φ_p) (A), kvantového výtěžku regulovaného nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}) (B) a kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení ($\Phi_{f,D}$) (C) po spuštění aktinického světla (prvních 10 minut) a během relaxace ve tmě (11.-20. minuta) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení. Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily (n = 6).



Obř. 13: Koncentrace MDA u listov3ch segment3ch je3mene jarn3ho po 6 dnech inkubace na z3r3vkov3m sv3tle v roztoku 0,2% DMSO a v 10⁻⁴M roztoc3ch mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola pŕedstavuje stav v den odd3len3. Uvedeny jsou aritmetick3e pŕ3m3ery a sm3erodatn3a odchylka (n = 3). Hv3zdi3cky ozna3uj3 statisticky v3znamn3 rozd3l oproti DMSO (* P < 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001).



Obr. 14: Měrná vodivost deionizované vody po máčení listových segmentů měřená ihned po vložení segmentů, po 3 hodinách vystavení světlu o vysoké intenzitě a po 5 hodinách vystavení světlu o vysoké intenzitě. Segmenty ječmene jarního byly 7 dní inkubovány na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4}M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Uvedeny jsou aritmetické průměry a směrodatné odchylky (A) a procenta nárůstu oproti výchozímu stavu (B) ($n = 3$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

Uvedené výsledky ukazují mírný urychlující efekt na senescenci při inkubaci v některých látkách na zářivkovém světle. Tento efekt se projevil u segmentů inkubovaných v mT, BAP a OH sníženým obsahem fotosyntetických pigmentů i zhoršenou funkcí fotosyntetického aparátu. Urychlení degradace fotosyntetických pigmentů nastalo i u TDZ a MeO.

Srovnajme nyní výsledky Experimentu 2 (získané po inkubaci segmentů na zářivkovém světle) s výsledky Experimentu 1 (po inkubaci segmentů na LED světle). V Experimentu 1 bylo patrné nejvýraznější poškození u segmentů inkubovaných v DMSO a u žádné z použitých látek jsme tak nezaznamenali urychlující efekt na senescenci. V Experimentu 2 jsme urychlující efekt na senescenci oproti DMSO zaznamenali u několika použitých látek, navíc samotné segmenty inkubované v DMSO byly mnohem lépe zachovány než v Experimentu 1. Můžeme usuzovat, že použitá spektrální složení světla měla vliv na procesy probíhající v oddělených listech a na efekt jednotlivých cytokininů a jejich derivátů.

5.3 Experiment 3

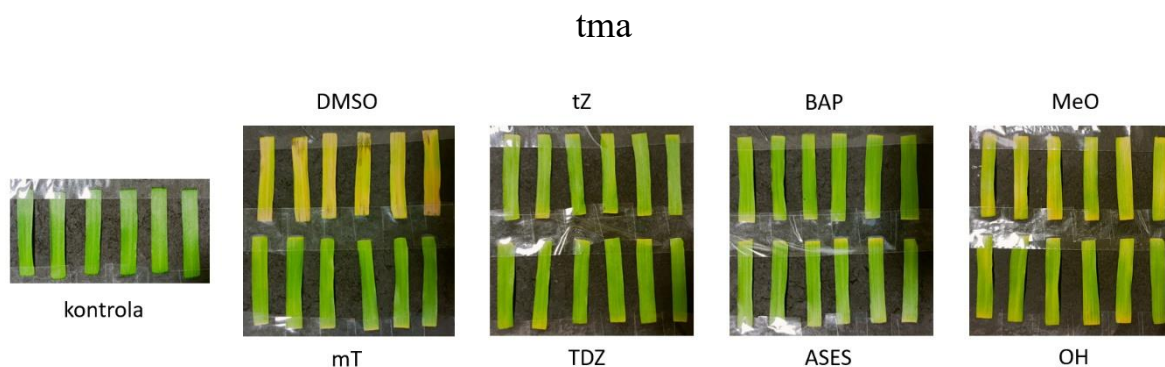
Po zjištění, že procesy v oddělených listech probíhají různě za použití rozdílných světelných spekter, se nabízela také otázka srovnání změn u listů vystavených během inkubace světle a tmě. K tomuto účelu bylo použito zářivkové světlo (stejně jako v Experimentu 2) a tmy bylo dosaženo zabalením vzorků do černé folie.

Během inkubace ve tmě došlo u segmentů vystavených DMSO k výrazné změně barvy oproti kontrole (Obr. 15). Rozdíl barvy oproti kontrole je patrný také u MeO a mírněji u OH. Ostatní listy se vizuálně jeví relativně dobře zachovány. Odlišná je situace u listů vystavených během inkubace světle (Obr. 16). Segmenty inkubované v DMSO vypadají nejlépe zachovány. K výrazné změně barvy oproti kontrole došlo u varianty inkubované v BAP, mírné zežloutnutí je patrné i u všech ostatních variant. Roztok mT během inkubace na světle vyschnul, proto nemůžeme tuto variantu srovnávat.

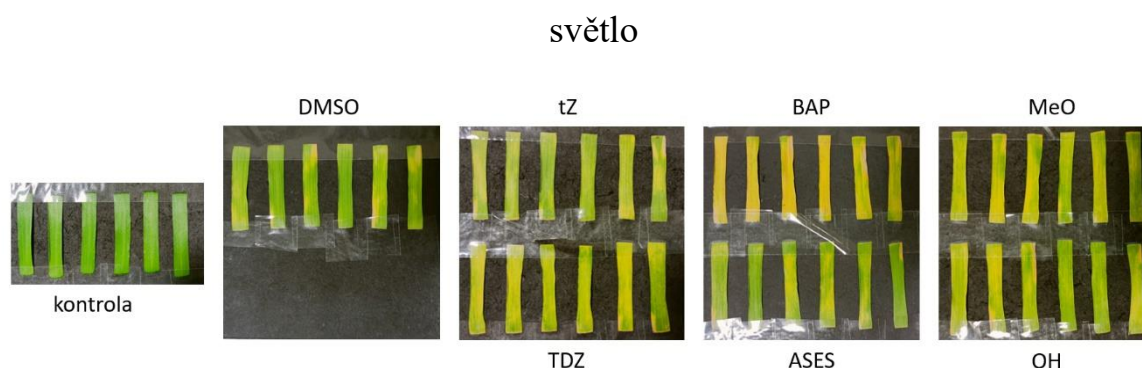
Měření obsahu fotosyntetických pigmentů ukazuje v případě vystavení tmě největší úbytek chlorofylu u segmentů inkubovaných v DMSO, a to asi o 80 % oproti kontrole (Obr. 17). Zároveň u této varianty klesl asi o 20 % oproti kontrole poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*, tedy zřejmě ubývala rychleji reakční centra oproti světlosběrným komplexům (opačný efekt než byl pozorován na světle). Všechny varianty ošetřené cytokininy vykazují lepší zachování fotosyntetických pigmentů než segmenty inkubované v DMSO. Výrazná degradace pigmentů, přibližně o 70 %, se projevila u listů inkubovaných v MeO, v menší míře pak v OH. Velmi dobře byl obsah fotosyntetických pigmentů zachován u segmentů inkubovaných v mT a tZ. U vzorků vystavených světle byl pokles obsahu pigmentů u varianty inkubované v DMSO výrazně menší než ve tmě (Obr. 18), obsah chlorofylu klesl jen asi o 30 % oproti kontrole (Obr. 18D). Nejméně chlorofylu bylo zachováno u segmentů inkubovaných v BAP, kde nastal pokles o přibližně 80 % oproti kontrole, a zároveň zde signifikantně vzrostl poměr chlorofylu

a ku *b*. Podobná situace, ale v menší míře, se jeví u listů vystavených MeO. Všechny varianty ošetřené cytokininů vykazují vyšší míru degradace chlorofylu než segmenty vystavené DMSO, i když signifikantní rozdíl oproti DMSO byl zjištěn pouze v případě segmentů ošetřených BAP.

Zobrazení F_v/F_m indikuje v případě vzorků inkubovaných ve tmě jen velmi slabou aktivitu PSII u varianty vystavené DMSO (Obr. 19). U všech vzorků vystavených roztokům cytokininů je fotochemie zachována lépe než u segmentů inkubovaných v DMSO. Špatný stav PSII je vidět u varianty inkubované v MeO, zhoršení oproti kontrole se projevuje i u segmentů vystavených OH, mírně v mT. Ostatní varianty vykazují velmi dobré zachování funkce PSII. Měření variant vystavených světlu ukazuje dobře zachovaný stav u segmentů inkubovaných v DMSO (Obr. 20). Výrazné poškození je vidět u listů inkubovaných v BAP. Ostatní světelné varianty vypadají z hlediska funkce PSII relativně dobře zachovány, nejlépe se jeví stav listů inkubovaných v ASES.

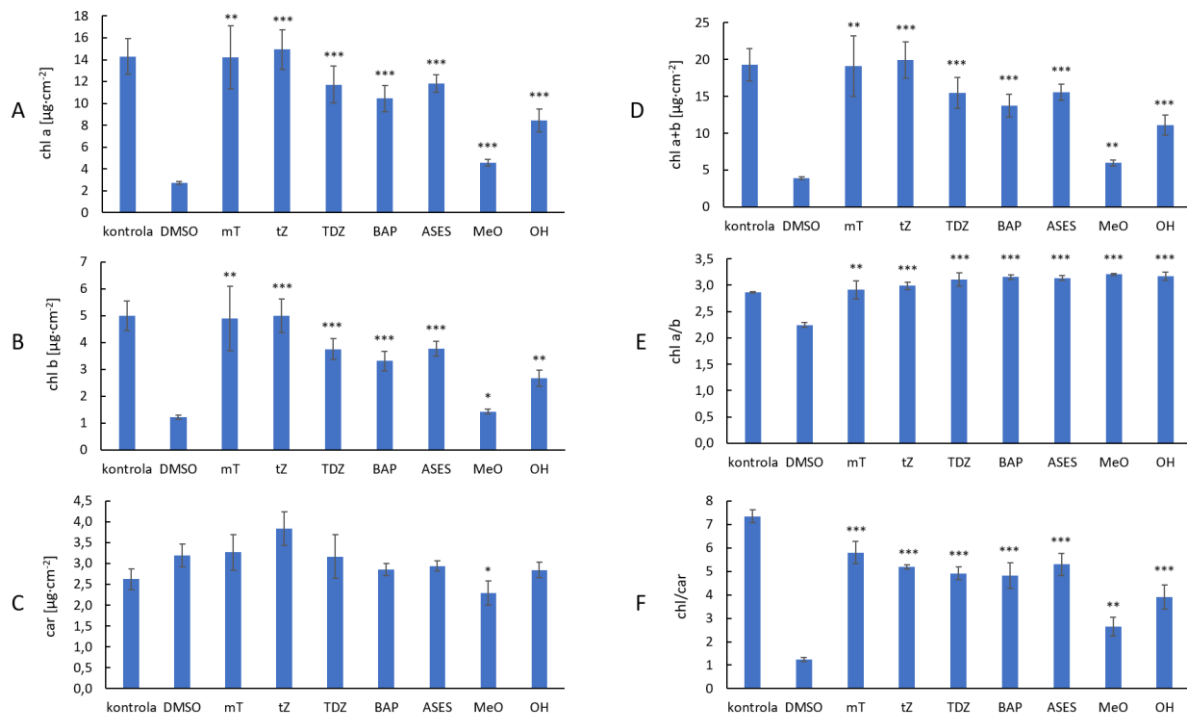


Obr. 15: Fotografie listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, bezprostředně po měření parametrů chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty fotografované v den oddělení.



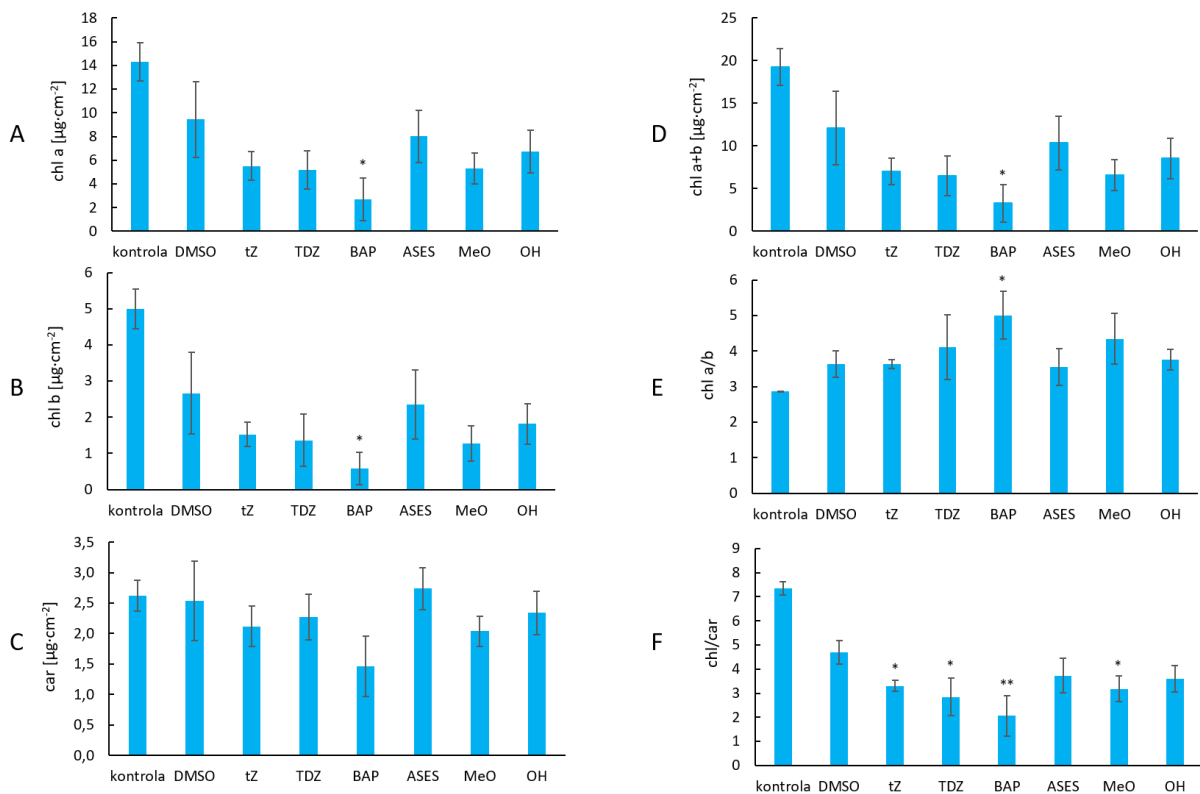
Obr. 16: Fotografie listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, bezprostředně po měření parametrů chlorofylové fluorescence pomocí přístroje FluorCam. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty fotografované v den oddělení.

tma

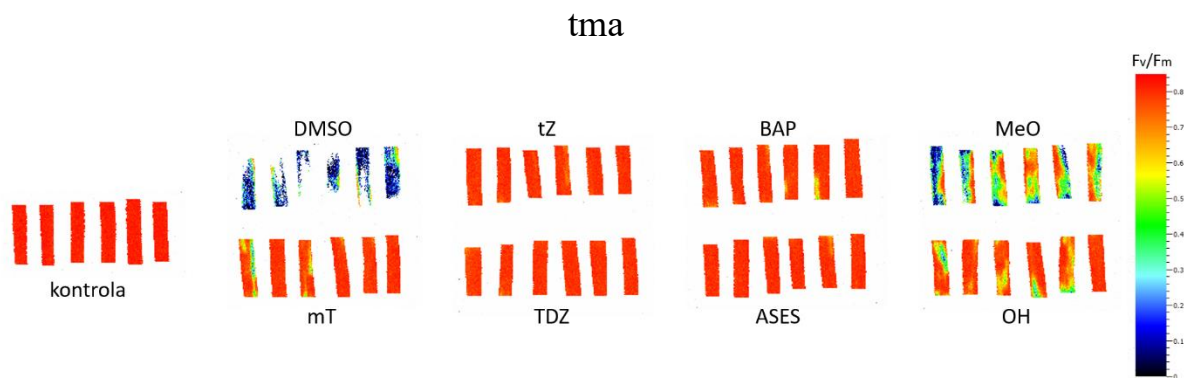


Obř. 17: Změny obsahu fotosyntetických pigmentů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4}M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola představuje stav v den oddělení. (A) obsah chlorofylu *a*, (B) obsah chlorofylu *b*, (C) obsah karotenoidů, (D) celkový obsah chlorofylu *a* a *b*, (E) poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*, (F) poměr obsahu chlorofylu a karotenoidů. Uvedeny jsou aritmetické průměry a směrodatná odchylka ($n = 3$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

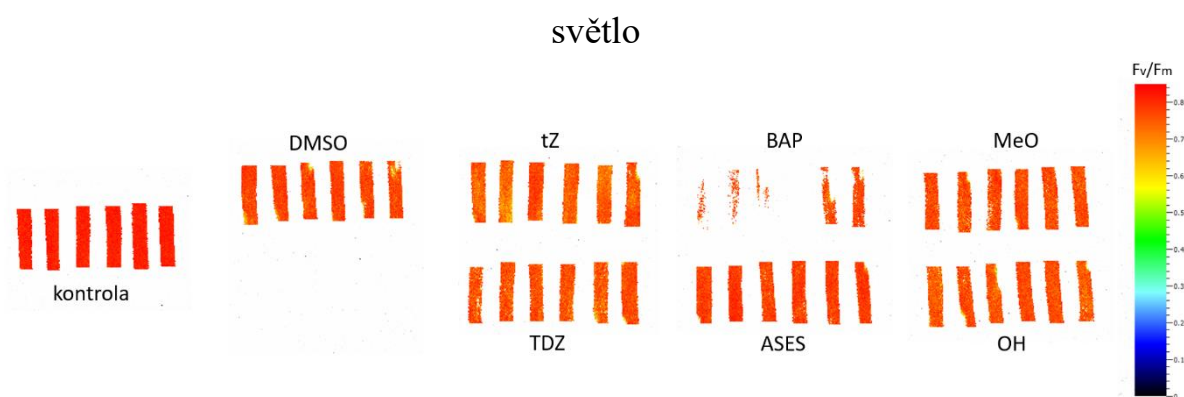
světlo



Obr. 18: Změny obsahu fotosyntetických pigmentů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4}M roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola představuje stav v den oddělení. (A) obsah chlorofylu *a*, (B) obsah chlorofylu *b*, (C) obsah karotenoidů, (D) celkový obsah chlorofylu *a* a *b*, (E) poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*, (F) poměr obsahu chlorofylu *a* a karotenoidů. Uvedeny jsou aritmetické průměry a směrodatná odchylka ($n = 3$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).



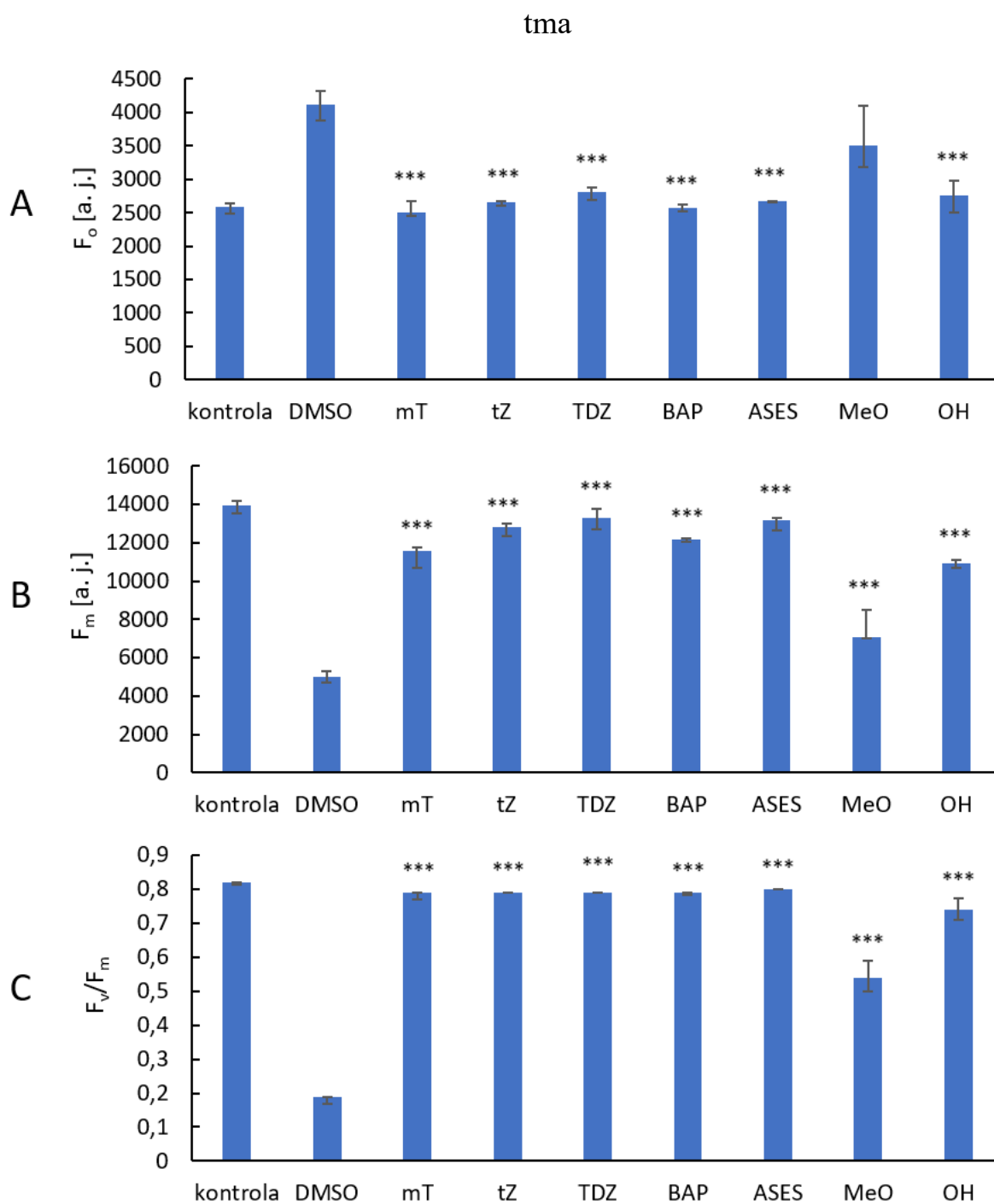
Obr. 19: Zobrazení maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty měřené bezprostředně po oddělení.



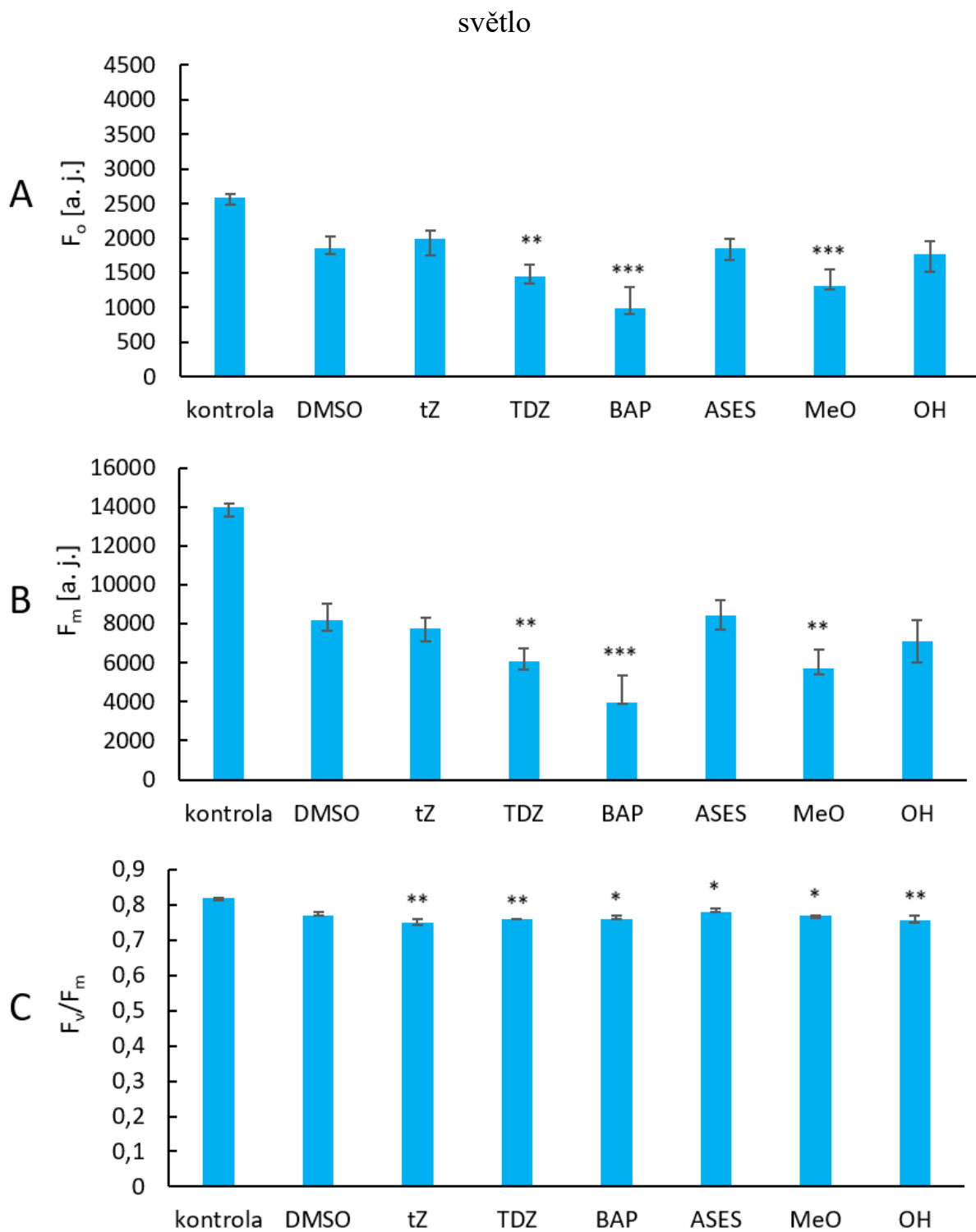
Obr. 20: Zobrazení maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Vlevo jsou zobrazeny kontrolní segmenty měřené bezprostředně po oddělení.

U měření parametrů chlorofylové fluorescence je v případě listů vystavených tmě patrný zhoršený stav funkce PSII u segmentů inkubovaných v DMSO (Obr. 21). Došlo k nárůstu F_0 (na světle vždy zaznamenán pokles F_0) a zároveň poklesu F_m , což vedlo také ke snížení F_v/F_m . Zhoršení stavu oproti kontrole se projevilo i u segmentů inkubovaných v MeO. Ostatní sledované roztoky vykazují dobré zachování stavu PSII. Měření světelné varianty ukázalo výrazně lepší zachování segmentů inkubovaných v DMSO oproti situaci v listech vystavených tmě (Obr. 22). U žádné varianty ošetřené cytokininy a vystavené světlu nedošlo k výraznému poklesu F_v/F_m , tedy ve všech případech byla dobře zachována funkce PSII.

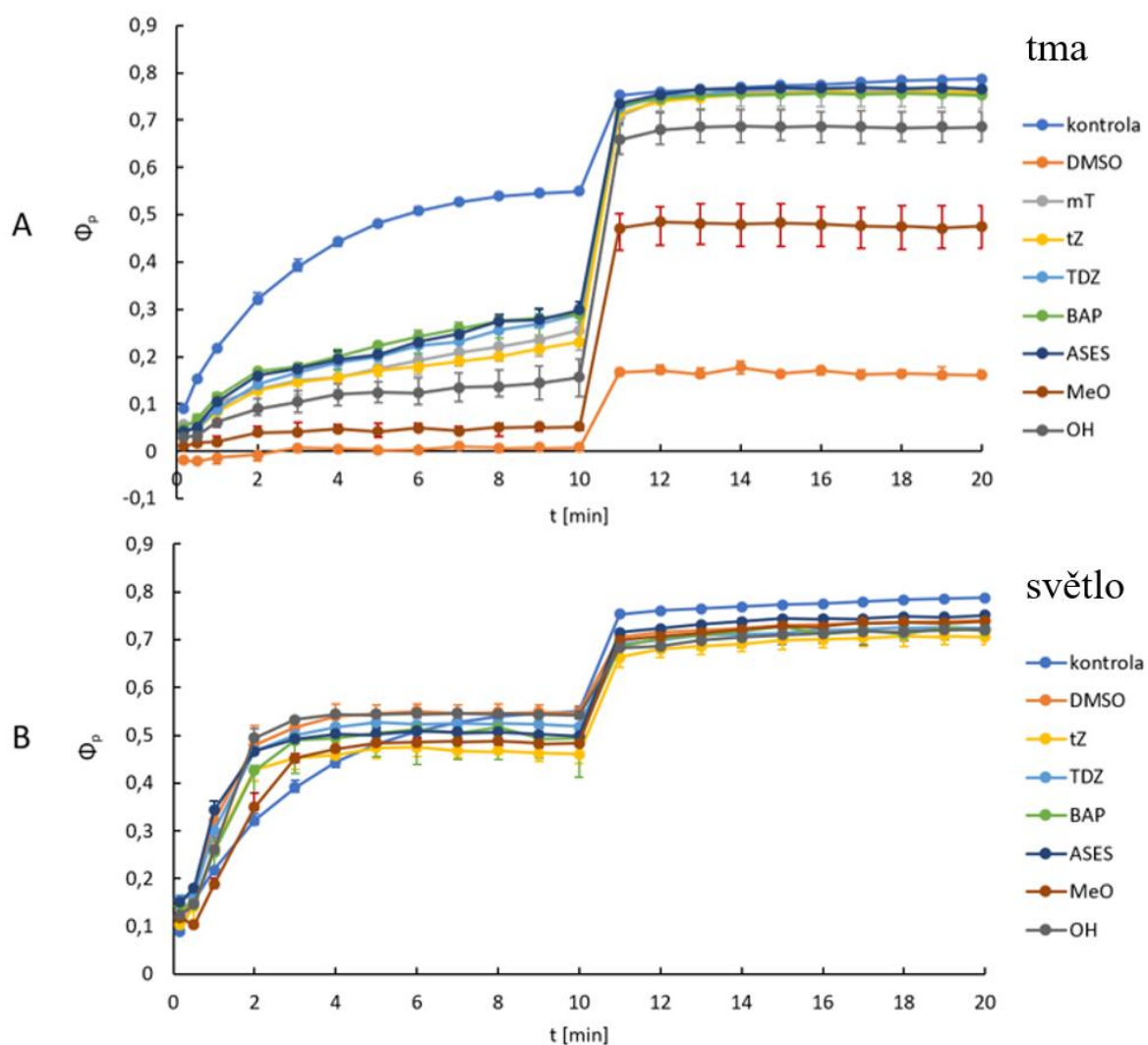
Graf průběhu Φ_p pro variantu vystavenou tmě (Obr. 23A) ukazuje velmi špatný stav fungování fotochemie u segmentů inkubovaných v DMSO, a to jak ve světelné fázi měření, tak i během relaxace ve tmě. Výrazné zhoršení stavu je vidět u segmentů inkubovaných v MeO, o něco méně také v OH. Segmenty inkubované v ostatních sledovaných látkách vykazují relativně dobré zachování fungování fotochemie. U vzorků vystavených během inkubace světlu nejsou rozdíly v průběhu Φ_p u jednotlivých látek příliš patrné (Obr. 23B). U všech variant je přítomné urychlení nárůstu parametru v prvních minutách světelné fáze oproti kontrole, způsobené patrně rozdílností intenzity světla během pěstování rostlin a během inkubace. Průběh Φ_{NPQ} u vzorků vystavených tmě (Obr. 24A) má znatelně zpomalený nárůst do saturačního stadia u všech variant. Největší zpomalení nastalo u segmentů inkubovaných v DMSO, kde se navíc parametr během temnostní fáze měření nevrací k nižším hodnotám. Průběh Φ_{NPQ} měřený u vzorků vystavených světlu (Obr. 24B) naznačuje opět podobný stav u všech sledovaných variant (rozdílný od kontroly). Nejvyššího nárůstu v první minutě dosahuje varianta inkubovaná v ASES, nejmenší nárůst je patrný pro segmenty inkubované v MeO. Pro vzorky vystavené tmě je u průběhu $\Phi_{f,D}$ (Obr. 25A) viditelný výrazně zpomalený pokles ve světelné fázi měření u segmentů inkubovaných v DMSO, během relaxace ve tmě nedochází k návratu na nižší hodnotu. Zhoršení stavu je patrné také u segmentů inkubovaných v MeO. Ostatní varianty mají průběhy vzájemně podobné, mírně horší stav vykazuje OH. Nejlépe zachovány se jeví listy inkubované v TDZ, ASES a mT. Vzorky vystavené během inkubace světlu vykazují jen malé rozdíly v průběhu $\Phi_{f,D}$ (Obr. 25B). Mírné zhoršení stavu je patrné u segmentů inkubovaných v MeO, které vykazují zpomalený pokles během prvních minut světelné části měření.



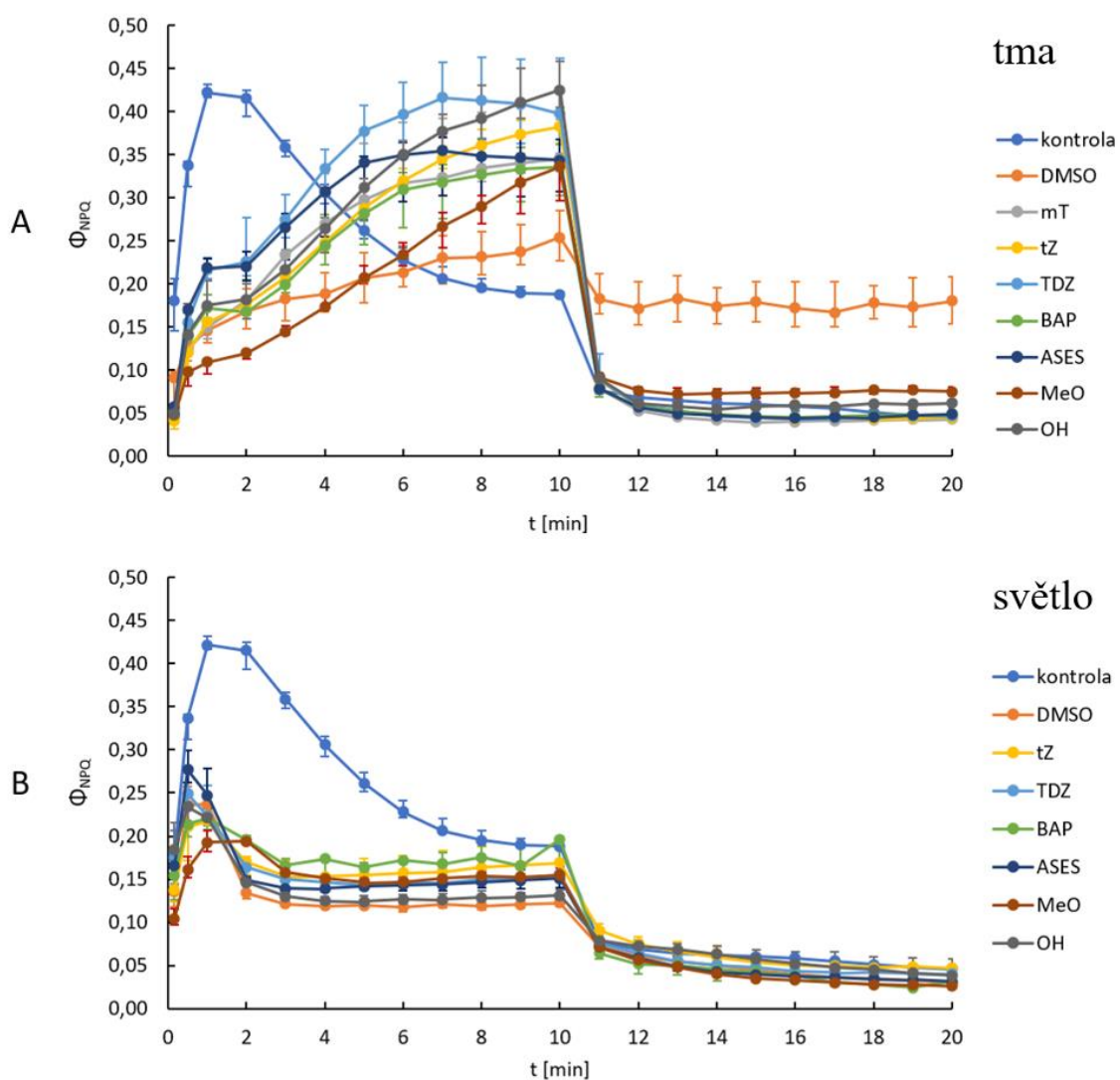
Obr. 21: Změny fluorescenčních parametrů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení segmentů. (A) minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmě (F_0), (B) maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmě (F_m), (C) maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m). Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily ($n = 6$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).



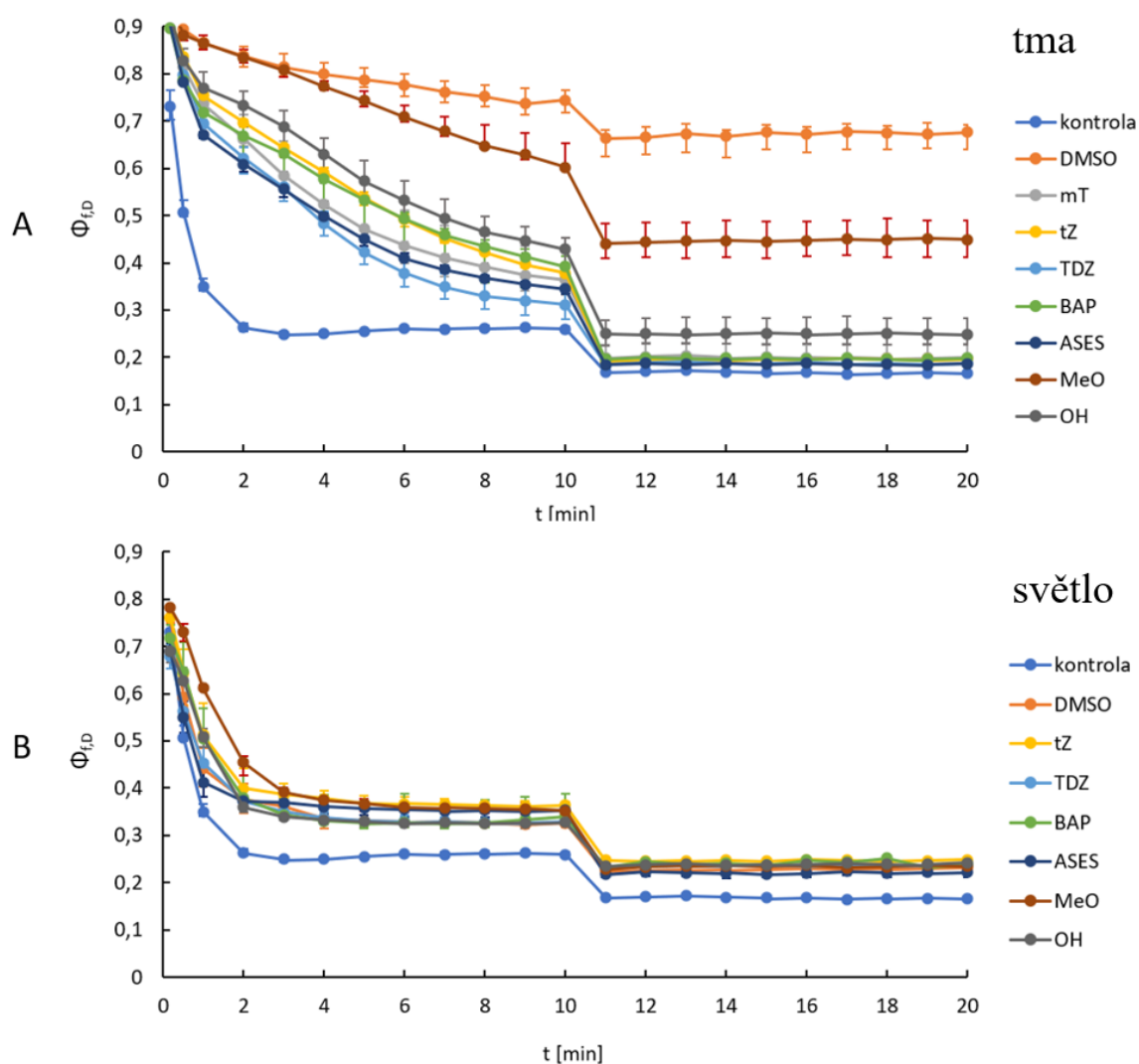
Obr. 22: Změny fluorescenčních parametrů u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení segmentů. (A) minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_0), (B) maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu (F_m), (C) maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m). Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily ($n = 6$ u všech variant kromě BAP, u BAP $n = 5$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).



Obr. 23: Průběh aktuálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Φ_p) po spuštění aktinického světla (prvních 10 minut) a během relaxace ve tmě (11.-20. minuta) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace (A) ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, (B) na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení. Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily ($n = 6$, v grafu (B) u BAP $n = 5$).



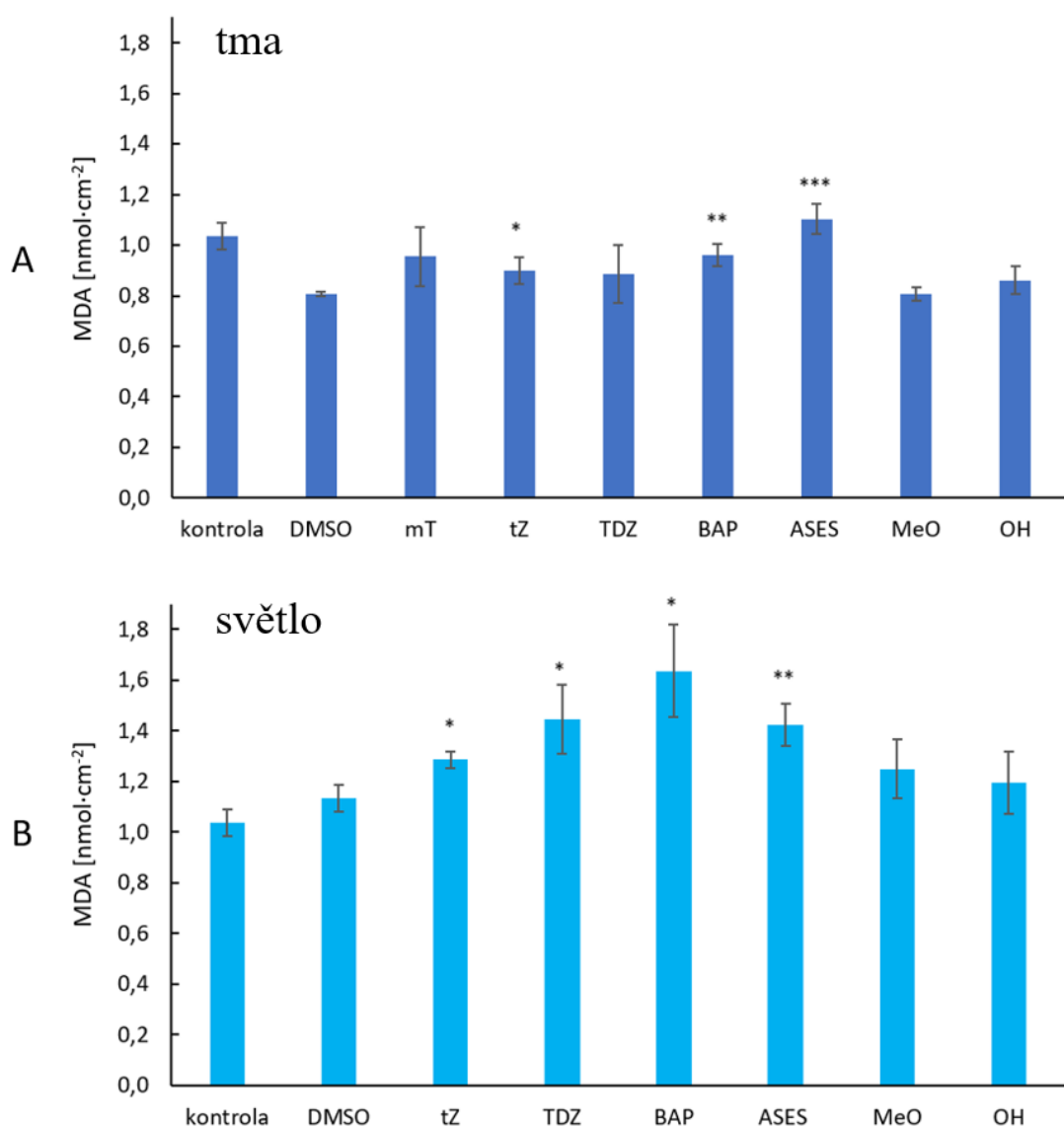
Obr. 24: Průběh kvantového výtěžku regulovaného nefotochemického zhášení (Φ_{NPQ}) po spuštění aktinického světla (prvních 10 minut) a během relaxace ve tmě (11.-20. minuta) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace (A) ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v $10^{-4}M$ roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, (B) na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v $10^{-4}M$ roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení. Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily ($n = 6$, v grafu (B) u BAP $n = 5$).



Obr. 25: Průběh kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení ($\Phi_{f,D}$) po spuštění aktinického světla (prvních 10 minut) a během relaxace ve tmě (11.-20. minuta) u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace (A) ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, (B) na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola byla měřena ihned po oddělení. Uvedeny jsou mediány a horní a dolní kvartily ($n = 6$, v grafu (B) u BAP $n = 5$).

U listů vystavených během senescence tmě byl u segmentů inkubovaných v DMSO mírně snížený obsah MDA oproti kontrole (Obr. 26A), pravděpodobně v důsledku velkého poškození (v segmentech již neprobíhaly procesy vedoucí k tvorbě MDA). Všechny sledované varianty vykazují větší obsah MDA oproti segmentům inkubovaným v DMSO, ale oproti kontrole se objevilo jen velmi mírné navýšení u listů inkubovaných v ASES. Senescence ve tmě tedy pravděpodobně nevedla ke zvýšené produkci ROS a následné peroxidaci lipidů. Měření listů vystavených během inkubace světlu ukazuje nárůst obsahu MDA oproti kontrole ve všech případech (Obr. 26B). Nejmenší nárůst je u segmentů inkubovaných v DMSO (jen asi 15 %). Výrazně se zvýšil obsah MDA v listech inkubovaných v BAP, a to asi o 70 %, dále přibližně o 50 % v TDZ a ASES. Nejmenší zvýšení oproti DMSO je přítomné u segmentů inkubovaných v OH. U listů vystavených během senescence světlu tedy probíhal oxidativní stres v mnohem větší míře než u segmentů ve tmě.

Ze získaných výsledků vyplývá, že ve tmě došlo během 6 dní k velmi výraznému poškození segmentů inkubovaných v DMSO, zatímco segmenty inkubované v DMSO na světle byly relativně dobře zachovány. To ukazuje na určitý ochranný efekt světla proti senescenci, který je znám z literatury (Špundová a kol. 2003, Špundová a kol. 2005, Causin a kol. 2006). Všechny varianty ošetřené cytokininy a inkubované ve tmě vykazovaly mnohem lepší stav oproti segmentům inkubovaným ve tmě v DMSO. V rámci sledovaných látek bylo nejnižší zachování obsahu fotosyntetických pigmentů i funkce PSII zjištěno u MeO, horší stav byl patrný také u OH. Na světle byl zaznamenán urychlující efekt na senescenci z hlediska zachování obsahu chlorofylu u všech variant ošetřených cytokininy. V největším rozsahu se urychlující efekt projevil u segmentů ošetřených BAP. Nejlépe z variant ošetřených cytokininy byl zachován stav listů inkubovaných v ASES. Měření obsahu MDA ukázalo větší míru oxidativního stresu u segmentů inkubovaných na světle oproti situaci ve tmě.



Obr. 26: Množství MDA u listových segmentů ječmene jarního po 6 dnech inkubace (A) ve tmě v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích mT, tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH, (B) na zářivkovém světle v roztoku 0,2% DMSO a v 10^{-4} M roztocích tZ, TDZ, BAP, ASES, MeO a OH. Kontrola představuje stav v den oddělení. Uvedeny jsou aritmetické průměry a směrodatná odchylka ($n = 3$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl oproti DMSO (* $P < 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

6. Diskuze

Během procesu senescence dochází u listů k mnoha změnám, mezi něž se řadí pokles obsahu fotosyntetických pigmentů (např. Špundová a kol. 2003, Procházková a Wilhelmová 2004). Může se měnit poměr obsahu chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* (Špundová a kol. 2003, Procházková a Wilhelmová 2004), pokud světlosběrné komplexy a reakční centra degradují různou rychlostí, nebo poměr obsahu chlorofylu ku karotenoidům (Špundová a kol. 2005), pokud různé pigmenty degradují různě rychle, případně narůstá koncentrace některého pigmentu. Při senescenci také dochází ke změnám parametrů chlorofylové fluorescence F_0 (minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu) a F_m (maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu). Se snížením či zvýšením těchto dvou parametrů se mění také maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (F_v/F_m), který během senescence klesá, což značí inhibici funkce PSII (Špundová a kol. 2003, Procházková a Wilhelmová 2004, Vlčková a kol. 2006). Také můžeme pozorovat změny v průběhu aktuálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (Φ_p), který ukazuje, kolik absorbované energie je využito na fungování fotochemických procesů. Po vystavení rostliny adaptované na tmu aktinickému světlu dochází postupně k adaptaci na konkrétní intenzitu světla, dokud se parametr Φ_p neustálí na maximální hodnotě kolem 0,8 (v případě zdravých rostlin). Během senescence dochází k poškození fotosyntetického aparátu a parametr Φ_p dosahuje nižší maximální hodnoty a adaptace na danou intenzitu světla bývá pomalejší. Průběh kvantového výtěžku regulačního nefotochemického zhášení fluorescence (Φ_{NPQ}) ukazuje, kolik přijaté energie bylo regulovaně přeměno na teplo. Při vystavení listu adaptovaného na tmu aktinickému světlu dochází nejprve k prudkému nárůstu Φ_{NPQ} , jelikož se rostlina zhášením zbavuje přebytečné energie, čímž se brání proti poškození fotosyntetického aparátu. Jak se rostlina postupně adaptuje na danou intenzitu světla a začíná využívat přijatou energii k fungování fotochemických procesů, nastává opět snížení Φ_{NPQ} . Po ukončení světelných pulsů aktinického světla a opětovném vystavení tmě již není třeba se zbavovat tolik energie a v případě zdravé rostliny se parametr Φ_{NPQ} ustálí kolem hodnoty 0,05. Při degradaci fotosyntetického aparátu během senescence je využíváno méně energie na fungování fotochemie a je cíleně přeměňována na teplo, aby nepůsobila větší poškození, což pozorujeme jako nárůst parametru Φ_{NPQ} . Pokud je fotosyntetický aparát poškozen výrazně, nefunguje již ani nefotochemické zhášení a parametr Φ_{NPQ} klesá. Zbytek energie přijaté anténami PSII je ztraceno v podobě fluorescence a konstitutivní tepelné disipace, což zobrazuje průběh kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického

zhášení ($\Phi_{f,D}$). V případě zdravého listu adaptovaného na tmu nastává po vystavení aktinickému světlu prudký pokles $\Phi_{f,D}$ z maximální hodnoty kolem 0,8 na hodnotu asi 0,3. Po opětovném vystavení tmě po ukončení ozařování aktinickým světlem se $\Phi_{f,D}$ ustálí na hodnotě kolem 0,2. Při poškození fotosyntetického aparátu je spotřebováno méně energie na fotochemické procesy a více se jí tedy ztrácí fluorescencí a tepelnou disipací, což pozorujeme jako nárůst $\Phi_{f,D}$. Také v případě poškození fotosyntetického aparátu pozorujeme zpomalení poklesu po spuštění aktinického světla. Podstatný vliv na průběh senescence má výskyt ROS. Vlivem ROS dochází k poškození biologických membrán v důsledku peroxidace lipidů (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006) a následně ke zvýšení koncentrace produktů těchto procesů jako je MDA (Jajíc a kol. 2015). Tyto změny lze do určité míry zpomalit vnější aplikací cytokininů (např. Vlčková a kol. 2006, Melkovičová 2012, Kučerová a kol. 2020). Určitý ochranný efekt proti změnám spojeným se senescencí má i světlo (Špundová a kol. 2003, Špundová a kol. 2005, Causin a kol. 2006), v některých případech může ale na světle dojít naopak k urychlení těchto procesů, pravděpodobně v důsledku oxidativního stresu (Procházková a Wilhelmová 2004). Při vystavení rostliny vnější aplikaci cytokininů i konkrétním světelným podmínkám dochází ke vzájemnému ovlivňování efektů světla a cytokininů, které může vyústit v urychlení změn spojených se senescencí (Melkovičová 2012).

V této práci byl porovnáván vliv LED světla, zářivkového světla a tmy na změny způsobené indukovanou senescencí u listových segmentů ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos) ošetřených sedmi různými antisenesescenčními látkami. Jako kontrolní byl použit 0,2% roztok DMSO. Byly hodnoceny viditelné změny listových segmentů, obsah fotosyntetických pigmentů, parametry chlorofylové fluorescence (F_0 , F_m , F_v/F_m) včetně zobrazení F_v/F_m v ploše listových segmentů a průběhy Φ_p , Φ_{NPQ} , $\Phi_{f,D}$, změny obsahu MDA a ve vybraných případech měření „ion-leakage“, které odráží míru poškození biologických membrán.

Segmenty inkubované v DMSO ve tmě vykazovaly po 6 dnech pokročilé stadium senescence, což odpovídá literatuře (Špundová a kol. 2003). Nastal výrazný pokles obsahu chlorofylu oproti kontrole, přičemž klesl poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* (Obr. 17E), což je opačný trend, než byl pozorován na světle (Obr. 3E, 9E, 18E). Ve tmě tedy degradovala reakční centra rychleji než světlosběrné komplexy. Také došlo k výraznému zhoršení funkce PSII, který vykazoval jen velmi slabou aktivitu, a k nárůstu F_0 (Obr. 21A), které na světle vždy kleslo (Obr. 5A, 11A, 22A). Zářivkové světlo mělo u segmentů inkubovaných v DMSO určitý zpomalující efekt na senescenci. Z hlediska zachování fotosyntetických pigmentů i funkce PSII

vykazovaly segmenty inkubované na zářivkovém světle podstatně lepší stav než segmenty inkubované ve tmě. Určitý ochranný efekt světla proti senescenci je znám z literatury (Špundová a kol. 2005, Vlčková a kol. 2006). Oproti očekávání segmenty inkubované v DMSO a vystavené LED světlu vykazovaly ještě větší poškození než segmenty inkubované ve tmě. Nastal výrazný pokles obsahu chlorofylu i karotenoidů (Obr. 3) a funkce PSII byla v některých částech listů již nedetekovatelná (Obr. 4). Stav listových segmentů inkubovaných v DMSO a vystavených LED světlu se tedy více podobal segmentům inkubovaným v DMSO ve tmě než na zářivkovém světle. Tyto rozdíly by mohly být způsobeny některou konkrétní spektrální oblastí elektromagnetického záření, která byla obsažena jen v jednom z použitých spekter a ve druhém chyběla. Odlišný průběh senescence při vystavení různým vlnovým délkám světla byl již dříve pozorován, zejména byl zaznamenán ochranný efekt modré složky světla kolem 350-450 nm (Causin a kol. 2006, Běčák 2016, Kozuka 2023). Větší poškození u segmentů vystavených LED světlu oproti segmentům inkubovaným na zářivkovém světle by tedy mohla vysvětlovat absence vlnových délek kolem 350-410 nm v použitém LED spektru (Obr. 1). Jelikož v této oblasti absorbují světlo také kryptochromy, mohlo by příčinou rozdílů být spuštění určité signální dráhy v důsledku aktivace kryptochromů při inkubaci na zářivkovém světle. Takové vysvětlení by odpovídalo práci Kozuky a kol. (2023), kteří ukázali, že ochranný efekt modrého světla proti změnám souvisejícím se senescencí u huseníčku závisí na kryptochromech (Kozuka a kol. 2023). Dalším rozdílem v použitých světelných spektrech je přítomnost vlnových délek kolem 750 nm u LED světla, které nejsou součástí světla zářivkového. Causin a kol. (2006) ale nepozorovali žádné změny v průběhu senescence při inkubaci vzorků na různých barvách světla po odfiltrování vzdálené červené oblasti nad 700 nm (Causin a kol. 2006). Zářivkové světlo dále v menší míře obsahuje červenou složku o vlnových délkách 650-700 nm, zatímco v LED spektru není přítomno žádné světlo o vlnových délkách 670-700 nm. I v tomto případě by mohlo jít o efekt způsobený fotoreceptory, jelikož se jedná o oblast, ve které absorbují fytochromy. V literatuře se ovšem uvádí spíše urychlující efekt červeného světla na senescenci (Causin a kol. 2006, Běčák 2006).

U segmentů inkubovaných ve tmě a ošetřených cytokininy nebo jejich deriváty nenastal u žádné z variant urychlující efekt na senescenci. Všechny použité látky do určité míry zpomalily průběh indukované senescence ve tmě, což je dobře popsáno v literatuře (Vlčková a kol. 2006, Nisler a kol. 2018). Nejmenší zpomalující efekt z hlediska obsahu fotosyntetických pigmentů i zachování funkce PSII se projevil u MeO, kde také došlo k nárůstu F_0 jako u varianty DMSO ve tmě (Obr. 21A). Segmenty ošetřené OH vykazovaly lepší zachování celkového stavu než segmenty ošetřené MeO. V literatuře je podobná situace popsána u pšenice, kde byl taktéž

ochranný efekt OH větší než u MeO, zatímco u huseníčku nastala opačná situace (Kučerová a kol. 2020). U žádné varianty ve tmě nebyl zaznamenán nárůst obsahu MDA, zřejmě tedy nedocházelo ve větší míře k peroxidaci lipidů, což také odpovídá literatuře (Vlčková a kol. 2006). Ve tmě zůstal zachován u všech variant ošetřených antisenescenčními látkami poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*, není tak tedy patrná preference degradace reakčních center ani světlosběrných komplexů.

Při inkubaci na zářivkovém světle byl v Experimentu 2 pozorován urychlující efekt na senescenci u BAP, OH a mT z hlediska degradace fotosyntetických pigmentů i změn fluorescenčních parametrů odrážejících zhoršení fungování PSII. Rychlejší degradace chlorofylu než u varianty DMSO se objevila také u TDZ a MeO. V Experimentu 3 se potvrdil urychlující efekt v největší míře u BAP, kde došlo k výraznější degradaci chlorofylu i poškození PSII než u varianty DMSO. Urychlující efekt mT nemohl být potvrzen, jelikož tato varianta nemohla být z důvodu vyschnutí vzorku během inkubace změřena. Zrychlená degradace chlorofylu se projevila u všech variant ošetřených cytokininy a inkubovaných na zářivkovém světle. Urychlující efekt na senescenci u cytokininů v kombinaci s vyšší dávkou světla byl u mT (Vlčková a kol. 2006, Melkovičová 2012), tZ (Danilova a kol. 2023) a BAP (Melkovičová 2012) již dříve pozorován. Nejlépe zachovaný stav PSII i obsahu fotosyntetických pigmentů oproti DMSO byl v Experimentu 3 pozorován u segmentů ošetřených ASES. Vyšší účinnost z hlediska ochrany fotosyntetického aparátu u ASES oproti dalším antisenescenčním látkám byla zaznamenána již dříve a může být způsobena odlišným mechanismem působení této látky (Nisler a kol. 2018, Nisler a kol. 2023). U všech variant na zářivkovém světle v obou experimentech došlo k nárůstu poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b*, na světle tedy rychleji degradovaly světlosběrné komplexy než reakční centra, což může být forma ochrany před fotopoškozením. Tento nárůst byl nejpatrnější u variant, kde se projevil urychlující efekt látek na senescenci, zejména u listů ošetřených BAP (Obr. 18E) a v Experimentu 2 také OH a mT (Obr. 9E). Na světle se projevilo oxidativní poškození, které nebylo pozorováno u segmentů ve tmě. Zvýšený oxidativní stres a následná peroxidace lipidů při inkubaci na světle byla dříve pozorována u listových segmentů ošetřených mT (Vlčková a kol. 2006) a při ošetření tZ a vystavení světlu byla zaznamenána zvýšená produkce superoxidového radikálu (Danilova a kol. 2023). Zvýšená peroxidace lipidů oproti DMSO byla přítomna u všech variant Experimentu 3, nejvýrazněji u segmentů ošetřených BAP (Obr. 26B). V Experimentu 2 nastalo zvýšení obsahu MDA u variant inkubovaných v mT, BAP, ASES, MeO a OH, ale segmenty inkubované v tZ a TDZ neprojevily žádný nárůst obsahu MDA oproti kontrole (Obr. 13).

Stav listových segmentů inkubovaných na LED světle se v mnohém neshoduje se stavem segmentů vystavených zářivkovému světlu. U všech variant ošetřených cytokininy na LED světle se projevil mírný nárůst poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* oproti kontrole (ale menší než u DMSO, Obr. 3E), což značí mírně rychlejší úbytek světlosběrných komplexů oproti reakčním centrům. Takovéto změny byly zaznamenány i na zářivkovém světle, ovšem v podstatně větší míře (Obr. 9E, 18E). Při inkubaci ve tmě tento poměr naopak klesl (Obr. 17E). Zároveň byl na LED světle u všech látek zaznamenán nárůst obsahu MDA (Obr. 7), což ukazuje na oxidativní poškození, které je typické při inkubaci na světle. U žádné z variant ošetřených cytokininy a inkubovaných na LED světle nenastal urychlující efekt na senescenci. Takový stav odpovídá spíše situaci pozorované po inkubaci ve tmě. Nejlépe zachovaný stav fotosyntetického aparátu i obsah fotosyntetických pigmentů na LED světle byl pozorován u segmentů ošetřených OH. Na zářivkovém světle byl u této látky naopak zaznamenán urychlující efekt na senescenci.

Ošetření mT mělo na LED světle určitý ochranný efekt proti změnám souvisejícím se senescencí oproti segmentům inkubovaným v DMSO, zatímco při vystavení světlu zářivkovému došlo vždy u segmentů inkubovaných v mT k urychlujícímu efektu na senescenci oproti segmentům vystaveným DMSO. Celkový pokrok změn souvisejících se senescencí byl ovšem po 6 dnech u segmentů ošetřených mT vzájemně podobný po vystavení oběma typům světla. Běčák (2016) pozoroval po ošetření mT o stejné koncentraci jako v našich experimentech (10^{-4} M) nejvýraznější potlačení senescence u listů vystavených červenému světlu, celkový stav listů ošetřených mT byl ale podobný pro všechny sledované světelné varianty (Běčák 2016). Situace na LED světle tak v mnohém odpovídá pozorováním Běčáka (2016) při inkubaci listů na světle červeném. V našem experimentu nebyly ve složení použitého LED světla přítomny vlnové délky 670-700 nm, zatímco ve světle zářivek byly obsaženy všechny vlnové délky červené složky světla (Obr. 1). Pokud byl tedy efekt mT zesílen přítomností červené složky, není jasné, proč tento efekt nenastal i na zářivkovém světle. Zda byly odlišnosti v postupu indukované senescence na světle způsobeny právě tímto rozdílem v použitých spektrech by bylo možné v budoucnu zjistit použitím vhodných filtrů.

Podobně u segmentů ošetřených BAP nastal negativní efekt při inkubaci na zářivkovém světle oproti segmentům ošetřených DMSO, zatímco na LED světle se projevilo zpomalení senescence oproti segmentům inkubovaným v DMSO. Celkový stav listových segmentů ošetřených BAP se jeví o něco lépe zachován po inkubaci na LED světle než na zářivkách. Causin a kol. (2006) zaznamenali ve všech případech zpomalení postupu senescence po ošetření BAP při vystavení různým světelným spektrálními oblastem (bílé, modré, červené a zelené

světlo). Pokud byla přítomna modrá složka světla (kolem 350-450 nm), bylo zpomalení patrné ve více parametrech (Causin a kol. 2006). Této situaci by odpovídalo pozorování po inkubaci na LED světle. Jelikož ve spektru LED světla chyběly vlnové délky 350-410 nm, mohla by za tento efekt zodpovídat spektrální oblast 420-450 nm. V případě zářivkového světla byly v menší míře přítomny vlnové délky kolem 370 nm a 410 nm, ale zde se ochranný efekt modrého světla neprojevil. Zastoupení světla o vlnových délkách 350-430 nm bylo ovšem i v případě zářivek velmi nízké, což může být důvodem neprojevení ochranného efektu modré složky světla.

Vystavení listových segmentů dvěma odlišným světelným spektrům mělo za následek rozdílný postup senescence, a to jak při inkubaci v kontrolním roztoku, tak i u variant ošetřených antisenescenčními látkami. V případě segmentů inkubovaných v DMSO byl zaznamenán ochranný efekt světla při vystavení zářivkám, naopak na LED světle došlo dokonce k urychlení senescence oproti segmentům vystaveným tmě. Zářivkové světlo v kombinaci s vnější aplikací cytokininů vedlo ve všech případech v určité míře k urychlení senescence. Naopak na LED světle nebyl pozorován žádný urychlující efekt na změny spojené se senescencí u žádné z variant. Není jasné, které konkrétní spektrální oblasti byly příčinou těchto rozdílů, ani zda byly následkem přímého působení světla na fotosyntetický aparát nebo přes signální dráhu fotoreceptorů. Lepší porozumění těmto nejasnostem by nám mohly poskytnout další pokusy za použití světelných filtrů.

7. Závěr

Elektromagnetické záření je pro život na naší planetě zásadní. Rostliny jej využívají nejen jako zdroj energie, kdy v procesu fotosyntézy přeměňují energii PAR na energii chemickou, ale také pomocí soustavy fotoreceptorů získávají informace o dopadajícím záření a mohou pak na něj reagovat. Jednou z důležitých charakteristik PAR je vlnová délka.

V této práci byl porovnáván vliv dvou různých světelných zdrojů s rozdílnými světelnými spektry na indukovanou senescenci u oddělených listových segmentů ječmene při ošetření sedmi různými antisenescenčními látkami. V případě segmentů inkubovaných v kontrolním roztoku DMSO byl pozorován ochranný efekt zářivkového světla proti změnám spojeným se senescencí, zatímco po vystavení LED světlu bylo zaznamenáno rozsáhlé poškození listových segmentů. Poškození segmentů inkubovaných v DMSO na LED světle bylo dokonce pokročilejší než u segmentů ve tmě. Po vystavení listových segmentů ošetřených cytokininy zářivkovému světlu byl zaznamenán u všech variant v určitém rozsahu urychlující efekt na senescenci, v největší míře bylo urychlení senescence pozorováno u segmentů ošetřených BAP. Naopak inkubace na LED světle nevedla u žádné z variant ke zhoršení stavu oproti segmentům v DMSO. V některých charakteristikách jako je výrazné zhoršení stavu listů v DMSO a ochranný efekt všech antisenescenčních látek byly listy vystavené LED světlu podobnější spíše segmentům inkubovaným ve tmě než na světle zářivek. Některé znaky byly ale společné pro segmenty vystavené oběma typům světla jako nárůst poměru chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* (i když tento nárůst byl mnohem výraznější na zářivkovém světle než u LED světla) nebo zvýšení koncentrace MDA značící oxidativní poškození biologických membrán. Obě tyto charakteristiky jsou typické pro senescenci probíhající za světla.

Charakter světelného spektra výrazně ovlivnil proces indukované senescence. Které spektrální oblasti elektromagnetického záření byly příčinou těchto rozdílů a zda bylo účinků dosaženo přímým působením na fotosyntetický aparát nebo přes aktivaci fotoreceptorů, nebylo odhaleno a zůstává zde tak prostor k dalšímu výzkumu.

8. Seznam použité literatury

- Banaś A. K., Łabuz J., Sztatelman O., Gabryś H., Fiedor L. (2011) Expression of enzymes involved in chlorophyll catabolism in Arabidopsis is light controlled. *Plant Physiology* **157**, 1497-1504.
- Běčák P. (2016) *Vliv exogenní aplikace cytokininů na fotosyntetický aparát oddělených listů ječmene a pšenice*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Briggs W. R., Olney M. A. (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiology* **125**, 85-88.
- Bryksová M., Dabravolski S., Kučerová Z., Zavadil Kokáš F., Špundová M., Plíhalová L., Takáč T., Grúz J., Hudeček M., Hloušková V., Koprna R., Novák O., Strnad M., Plíhal O., Doležal K. (2020) Aromatic cytokinin arabinosides promote PAMP-like responses and positively regulate leaf longevity. *ACS Chemical Biology* **15**, 1949–1963.
- Causin H. F., Jauregui R. N., Barneix A. J. (2006) The effect of light spectral quality on leaf senescence and oxidative stress in wheat. *Plant Science* **171**, 24-33.
- Danilova M. N., Kudryakova N. V., Doroshenko A. S., Daminova A. G., Oelmüller R., Kusnetsov V. V. (2023) Versatile effect of cytokinin on detached senescing leaves of Arabidopsis in the light. *Plant Growth Regulation* **99**, 313-322.
- Eckstein A., Grzyb J., Hermanowicz P., Zgłobicki P., Łabuz J., Strzałka W., Dziga D., Banaś A. K. (2021) Arabidopsis phototropins participate in the regulation of dark-induced leaf senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 1836.
- Hudeček M., Nožková V., Plíhalová L., Plíhal O. (2023) Plant hormone cytokinin at the crossroads of stress priming and control of photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, **13**, 1103088.
- Jajić I., Sarna T., Szewczyk G., Strzałka K. (2015) Changes in production of reactive oxygen species in illuminated thylakoids isolated during development and senescence of barley. *Journal of Plant Physiology* **184**, 49-56.
- 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 & Environment* **41**, 1870-1885.
- Janečková H., Husičková A., Lazár D., Ferretti U., Pospíšil P., Špundová M. (2019) Exogenous application of cytokinin during dark senescence eliminates the acceleration of photosystem II impairment caused by chlorophyll b deficiency in barley. *Plant Physiology and Biochemistry* **136**, 43-51.
- Kozuka T., Oka Y., Kohzuma K., Kusaba M. (2023) Cryptochromes suppress leaf senescence in response to blue light in Arabidopsis. *Plant Physiology* **191**, 2506-2518.
- 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., 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.
- Lazár D. (2015) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* **175**, 131-147.
- Liebsch D., Keech O. (2016) Dark-induced leaf senescence: new insights into a complex light-dependent regulatory pathway. *New Phytologist* **212**, 563-570.
- Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Luklová M., Novák J., Kopecká R., Kameniarová M., Gibasová V., Brzobohatý B., Černý M. (2022) Phytochromes and their role in diurnal variations of ROS metabolism and plant proteome. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 14134.
- Melkovičová H. (2012) *Koncentrační závislost účinků cytokininů na indukovanou senescenci rostlin*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Nisler J., Zatloukal M., Sobotka R., Pilný J., Zdvihalová B., Novák O., Strnad M., Spíchal L. (2018) New urea derivatives are effective anti-senescence compounds acting most likely via a cytokinin-independent mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1225.
- 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.
- Novák J., Pavlů J., Novák O., Nožková-Hlaváčková V., Špundová M., Hlavinka J., Koukalová Š., Skalák J., Černý M., Brzobohatý B. (2013) High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of Botany* **112**, 41-55.
- Pandhair V., Sekhon B. S. (2006) Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **15**, 71-78.
- Procházková D., Wilhelmová N. (2004) Changes in antioxidative protection in bean cotyledons during natural and continuous irradiation-accelerated senescence. *Biologia Plantarum* **48**, 33-39.
- Prokopová J., Špundová M., Sedlářová M., Husičková A., Novotný R., Doležal K., Nauš J., Lebeda A. (2010) Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 716-723.
- Sakuraba Y. (2021) Light-mediated regulation of leaf senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 3291.
- Sakuraba Y., Jeong J., Kang M., Kim J., Paek N., Choi G. (2014) Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature communications*, 5, 4636.
- Spíchal L. (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**, 267-284.

- Špundová M., Popelková H., Ilík P., Skotnica J., Novotný R., Nauš J. (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1051-1058.
- Špundová M., Strzałka K., Nauš J. (2005) Xanthophyll cycle activity in detached barley leaves senescing under dark and light. *Photosynthetica* **43**, 117-124.
- 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.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmölling T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Zwack P. J., Rashotte A. M. (2013) Cytokinin inhibition of leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior*, **8**:7, e24737.