

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2015

Bc. Maroš Prčina

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum



**Vliv cytokininů a světla na obsah
malondialdehydu během senescence listů
*Arabidopsis thaliana***

Diplomová práce

Bc. Maroš Prčina

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce:
Mgr. Alexandra Husičková, PhD.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Mrg. Alexandry Husičkové, PhD. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci, 9. července 2015

.....
podpis

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Maroš Prčina

Název práce: Vliv cytokininů a světla na obsah malondialdehydu během senescence
listů *Arabidopsis thaliana*

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra biofyziky, PřF UP Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Alexandra Husičková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Shrnutí

Tak jako vliv cytokininů patří mezi nejvýznamnější endogenní faktory regulující nástup a průběh senescence, tak i vliv světla patří mezi nejvýznamnější exogenní faktory. Z dosavadních výsledků studia vlivu cytokininů a světla na senescenci plyne, že oba faktory působí aditivně, přičemž existuje hypotéza o existenci hranice signálního výstupu obou faktorů a překlenutí této hranice vyvolávající změnu charakteru jejich vlivu na senescenci z regulace negativní na pozitivní.

Ve své diplomové práci jsem pro ověření výše zmíněných faktů kultivoval listy rostlin *Arabidopsis thaliana*, u nichž byla jejich oddělením uměle navozená senescence, a analyzoval jsem u těchto listů míru oxidativního poškození. Listy byly kultivovány v roztocích s různými koncentracemi cytokininu (*meta*-topolinu, *mT* nebo benzyladeninu, BA) a současně při různých intenzitách světla (tma, pěstební intenzita a vysoká intenzita světla). V experimentech byly použity rostliny různých genotypů včetně mutantů *pga22*, u nichž lze 17- β -estradiolem indukovat zvýšení biosyntézy cytokininů. Vedle těchto mutantů byli testováni dvojími *ahk*-mutanti s vyřazenou funkcí dvou ze tří (dosud známých) receptorů zodpovědných za vnímání cytokininů, jež patří mezi *Arabidopsis* histidinkinasy (AHK). To umožnilo prozkoumání úlohy jednotlivých AHK receptorů. Pro analýzu oxidativního poškození byly použity dvě metody: První metodou byla běžně používaná analýza TBARS - produktů reakce s kyselinou thiobarbiturovou. Druhou metodou bylo nově testované stanovení obsahu malondialdehydu (MDA) pomocí HPLC s využitím DNPH reagentu. Pro možnost podrobnější analýzy a rozšíření kontextu byly také analyzovány výsledky Mgr. Melkovičové: obsah chlorofylu a maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m); experimenty byly vedeny souběžně a za stejných podmínek.

Výsledky ověřily a potvrdily výše zmíněná dosavadní zjištění jiných autorů a hypotézu o zvratu pozitivního vlivu cytokininů a světla na senescenci při překročení hranice jejich nadměrného aditivního vlivu. Ohledně rolí jednotlivých známých AHK receptorů jsem zjistil, že během senescence oddělených listů *Arabidopsis* má na regulaci oxidativního poškození ze tří známých receptorů nejvýznamnější vliv AHK4 (CRE1 / WOL1), menší vliv má pak AHK2 a nejméně významný vliv má AHK3 receptor. Pořadí v síle ovlivnění udržení obsahu chlorofylu je u těchto tří receptorů překvapivě právě opačné. Nečekaným výsledkem této práce je zjištění, že 17- β -estradiol, tedy lidský hormon použitý pro cílenou indukci rostlin *pga22*, má fyziologické účinky (v rámci sledovaných parametrů) na listy rostlin, jež na rozdíl od *pga22* nebyly geneticky modifikovány pro účel indukce estradiolem.

Klíčová slova: senescence, cytokinin, světlo, oxidativní poškození, malondialdehyd (MDA), *Arabidopsis*, AHK2, AHK3, AHK4 / WOL1 / CRE1, *ahk*- dvojití mutanti, pga22

Summary

As the effect of phytohormones cytokinins is one of the most important endogenous factors regulating onset and ongoing of senescence, so is the effect of light amongst the most important exogenous factors. Current research in senescence shows, that the effect of cytokinins and light on senescence has additive character. There is also a hypothesis that the output signal of the two factors may have certain threshold, which turns the effect of cytokinins and light from protective against senescence into speeding up the senescence.

To prove the above mentioned facts and hypothesis, I detached *Arabidopsis thaliana* leaves, hence induced an artificial senescence, which was consequently studied. The leaves were cultivated and analysed for the level of damage, caused by oxidative stress. The cultivation was conducted under diverse conditions which combined application of differently concentrated cytokinins (*meta*-topolin, *mT* or benzyladenin, BA) in cultivating solution, and three distinct light conditions (dark, growth light intensity and high light intensity). I used several plant genotypes, including *pga22* mutants with 17- β -estradiol-inducible overexpression of *IPT*, thus overproducing endogenous cytokinins. To assess specific roles of three so far known cytokinine receptors (belonging to *Arabidopsis* Histidin Kinase family), I used three distinct *ahk*- double-mutants with nonsense mutations in two genes encoding AHK receptors. I analysed an oxidative damage in the senescent leaves of the mutants. Firstly I used the common TBARS analysis of products reacting with thiobarbituric acid. Secondly, I tested new method - HPLC analysis of malondialdehyde (MDA) content, using DNPH as a reagent. For more complex conclusions, I also assessed results of the colleague of mine, Helena Melkovičová. She analysed relative chlorophyll content and maximum quantum yield of photochemistry of photosystem II (F_v/F_m), whereas our experiments had been conducted under the same experimental conditions and plants.

The results confirmed formerly proposed hypothesis: cytokinins and light act in an additive manner, and that if their signal output crosses the threshold, their senescence-protective effect turns into senescence accelerating. The most interesting result emerges from comparing the results of all three *ahk*- double-mutants: The conclusion, that the highest impact in regulating the oxidative stress has the AHK4 (CRE1 / WOL1) receptor, the lowest has the AHK3, whereas AHK2 is inbetween the other two receptors. In contrary, a degree of the regulatory effect on the chlorophyll content is just opposite, with AHK3 having the strongest and AHK4 the weakest effect. Beside this, I found out the surprising conclusion, that the human hormone 17- β -estradiol acts not only as an inductor for (in this way) genetically modified *pga22*, but that the hormone has a noticeable effect on plant physiology as well.

**Key words: senescence, cytokinin, light, oxidative damage, malondialdehyde (MDA),
Arabidopsis, AHK2, AHK3, AHK4 / WOL1 / CRE1, *ahk*- double-mutants, pga22**

Poděkování

Děkuji všem členům katedry biofyziky za jejich přístup otevřený spolupráci a spoluutváření příjemné pracovní atmosféry. Jmenovitě děkuji Mgr. Alexandře Husíčkové, Ph.D. za největší díl upřímné a obětavé pomoci, kolegyni Mgr. Ursule Ferretti za zásadní pomoc obsluhou HPLC a optimalizací metodiky, Mgr. Heleně Melkovičové za vzájemnost sdílení výsledků v rámci Experimentu 2, RNDr. Martině Špundové, Ph.D. za konzultace, technickým pracovnícím Ivetě Kobřilové a Pavle Ocvirkové za pomoc během pěstování a sklizení rostlin, a také kolegyním badatelkám Renatě Štaffové a Barboře Kubíčkové za pomoc při měření během Experimentu 1. Můj dík patří i všem mým blízkým, kteří mne na mnoha úrovních podporovali.

Za poskytnutí semen mutanta *pga22* děkuji také panu Jianru Zuo (Nam- Hai Chua) z The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, New York 10021.

Poděkování patří i materiální podpoře grantu č. LP10204: Udržitelný rozvoj výzkumu Centrum regionu Haná z Národního programu udržitelnosti I, MŠMT.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1 ÚVOD..... | 1 |
| 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 2 |
| 2.1 SENESCENCE..... | 2 |
| 2.1.1 Senescence - součást života rostlin..... | 2 |
| 2.1.2 Senescenční syndrom aneb: Co se děje v senescentních listech? | 3 |
| 2.1.3 Regulace senescence..... | 5 |
| 2.1.3.1 Vnější a vnitřní faktory regulující senescenci..... | 5 |
| 2.1.3.2 Hormonální regulace senescence..... | 6 |
| 2.1.3.3 Genetická regulace..... | 8 |
| 2.2 CYTOKININY..... | 9 |
| 2.2.1 Klasifikace a nejdůležitější cytokininy..... | 9 |
| 2.2.2 Biosyntéza cytokininů..... | 10 |
| 2.2.3 Percepce a transdukce signálu cytokininů..... | 12 |
| 2.2.4 Interakce cytokininů a dalších faktorů..... | 15 |
| 2.2.4.1 Cytokininy a hladina cukrů..... | 15 |
| 2.2.4.2 Cytokininy a charakter pletiva..... | 16 |
| 2.2.4.3 Vliv dusíku..... | 17 |
| 2.3 VLIV SVĚTLA A CYTOKININŮ NA SENESCENCI..... | 19 |
| 2.3.1 Vliv světla na senescenci..... | 19 |
| 2.3.1.1 Vliv zatmění..... | 19 |
| 2.3.1.2 Vliv nízké intenzity osvětlení..... | 20 |
| 2.3.1.3 Vliv vysoké intenzity osvětlení..... | 21 |
| 2.3.1.4 Podobnost působení světla a cytokininů | 22 |
| 2.3.1.5 Interakce světla a cytokininů..... | 23 |
| 2.4 ROSTLINY SE ZMĚNĚNÝM VNÍMÁNÍM NEBO OBSAHEM CYTOKININŮ..... | 25 |
| 2.4.1 Mutantní rostliny <i>pga22</i> | 25 |
| 2.4.2 AHK receptory zajišťují percepci cytokininů..... | 26 |
| 2.4.2.1 Lokalizace AHK receptorů..... | 26 |
| 2.4.2.2 Ligandová specifita AHK receptorů..... | 28 |
| 2.4.2.3 Některé funkce specifické pro AHK receptorů..... | 28 |
| 2.4.2.3.1 Regulace buněčného dělení a diferenciaci..... | 28 |
| 2.4.2.3.2 Ovlivnění hladiny cytokininů v důsledku narušené signalizace..... | 28 |
| 2.4.2.3.3 Role AHK3 v regulaci senescence..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.4.2.3.4 Zpomalení odbourávání chlorofylu během senescence zprostředkovává AHK3..... | 30 |
| 2.4.2.3.5 Význam AHK receptorů při reakcích na vodní stres..... | 31 |
| 2.4.2.3.6 Deetiolizaci reguluje AHK3 společně s AHK2 nebo AHK4..... | 31 |
| 2.4.2.3.7 Inhibici klíčení tmou a FR-světlem ovlivňuje zejména AHK4..... | 31 |
| 2.4.3 Charakterizace rostlin s mutacemi v AHK receptorech:..... | 32 |
| 2.4.3.1 Rostliny s mutací v jednom AHK genu..... | 32 |
| 2.4.3.1.1 Mutant <i>ahk2</i> | 32 |
| 2.4.3.1.2 Mutant <i>ahk3</i> | 32 |
| 2.4.3.1.3 Mutant <i>ahk4</i> | 32 |
| 2.4.3.2 Rostliny s mutací ve dvou AHK genech..... | 33 |
| 2.4.3.2.1 Mutant <i>ahk2ahk3</i> | 33 |
| 2.4.3.2.2 Mutanti <i>ahk2-lahk4-1</i> a <i>ahk3-lahk4-1</i> | 34 |
| 2.4.3.3 Rostliny s mutací ve třech AHK genech | 34 |
| 2.4.4 Cytokiny působí zřejmě i mimo dosud známé AHK receptory..... | 35 |
| 2.5 OXIDATIVNÍ STRES..... | 37 |
| 2.5.1 Oxidativní stres a senescence..... | 37 |
| 2.5.2 Vliv cytokininů na oxidativní stres..... | 38 |
| 2.5.3 Měření oxidativního poškození..... | 39 |
| 2.5.3.1 Vznik malondialdehydu..... | 39 |
| 2.5.3.2 Malondialdehyd: struktura a reaktivita..... | 41 |
| 2.5.3.3 Metody stanovení malondialdehydu..... | 42 |
| 2.5.3.3.1 Metoda TBARS..... | 42 |
| 2.5.3.3.2 Stanovení MDA pomocí DNPH..... | 43 |
| 3 CÍLE PRÁCE..... | 44 |
| 4 MATERIÁL A METODIKA..... | 45 |
| 4.1 Rostlinný materiál..... | 45 |
| 4.2 Metodika Experimentu 1..... | 45 |
| 4.2.1 Exp.1: Metodika pěstování rostlin..... | 45 |
| 4.2.2 Exp.1: Indukce syntézy cytokininů u rostlin <i>pga22</i> | 45 |
| 4.2.3 Exp.1: Metodika oddělování listů a jejich kultivace..... | 45 |
| 4.2.4 Exp.1: Sklizení senescentních listů a měření fotosyntetických parametrů..... | 46 |
| 4.2.5 Exp.1: Izolace TBARS a stanovení peroxidace lipidů | 46 |
| 4.3 METODIKA EXPERIMENTU 2..... | 47 |
| 4.3.1 Exp.2: Metodika pěstování rostlin..... | 47 |
| 4.3.2 Exp.2: Indukce syntézy cytokininů u rostlin <i>pga22</i> , | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.3.3 Exp.2: Metodika oddělování listů a jejich kultivace..... | 47 |
| 4.3.4 Exp.2: Sklizení senescentních listů..... | 47 |
| 4.3.5 Exp.2: Izolace a stanovení obsahu malondialdehydu ve vzorku..... | 48 |
| 4.3.6 Exp.2: Měření fotosyntetických parametrů..... | 48 |
| 5 VÝSLEDKY..... | 50 |
| 5.1 Experiment 1 | 50 |
| 5.1.1 Obsah TBARS naměřený v Exp.1 | 50 |
| 5.1.2 Fotosyntetické parametry naměřené v Exp.1..... | 51 |
| 5.2 Experiment 2 | 54 |
| 5.2.1 Výsledky genotypů WT a mutanta <i>pga22</i> | 54 |
| 5.2.1.1 Senescence listů <i>pga22</i> kultivovaných ve tmě..... | 54 |
| 5.2.1.1.1 Obsah malondialdehydu u listů <i>pga22</i> kultivovaných ve tmě..... | 54 |
| 5.2.1.1.2 Fotosyntetické parametry u listů <i>pga22</i> kultivovaných ve tmě..... | 55 |
| 5.2.1.2 Senescence listů <i>pga22</i> kultivovaných na pěstebním světle..... | 57 |
| 5.2.1.2.1 Obsah malondialdehydu u listů <i>pga22</i> na pěstebním světle..... | 57 |
| 5.2.1.2.2 Fotosyntetické parametry u listů <i>pga22</i> na pěstebním světle..... | 58 |
| 5.2.1.3 Senescence listů <i>pga22</i> kultivovaných na vysoké intenzitě světla..... | 58 |
| 5.2.1.3.1 Obsah malondialdehydu u listů <i>pga22</i> na světle o vysoké intenzitě..... | 58 |
| 5.2.1.3.2 Fotosyntetické parametry u listů <i>pga22</i> na světle o vysoké intenzitě..... | 60 |
| 5.2.2 Srovnání dvojitých <i>ahk</i> - mutantů s wild-type..... | 61 |
| 5.2.2.1 Senescentní listy dvojitých <i>ahk</i> - mutantů kultivované ve tmě..... | 61 |
| 5.2.2.1.1 Obsah MDA u listů dvojitých <i>ahk</i> - mutantů kultivovaných ve tmě..... | 61 |
| 5.2.2.1.2 Fotosyntetické parametry u listů dvojitých <i>ahk</i> - mutantů ve tmě..... | 62 |
| 5.2.2.2 Senescentní listy dvojitých <i>ahk</i> - mutantů při pěstební intenzitě světla..... | 63 |
| 5.2.2.2.1 Obsah MDA u listů dvojitých <i>ahk</i> - mutantů na pěstební intenzitě světla..... | 63 |
| 5.2.2.2.2 Fotosyntetické parametry u listů dvojitých <i>ahk</i> - mutantů na pěstebním světle..... | 64 |
| 5.2.2.2.3 Obsah MDA u listů dvojitých <i>ahk</i> - mutantů na světle o vysoké intenzitě..... | 65 |
| 5.2.2.2.4 Fotosyntetické parametry u listů dvojitých <i>ahk</i> - mutantů na světle o vysoké intenzitě..... | 66 |
| 6 DISKUSE..... | 67 |
| 6.1 Úvod do diskuze..... | 67 |
| 6.2 Vliv estradiolu na listy WT rostlin..... | 67 |
| 6.3 Potvrzení hypotézy o prahové koncentraci působení cytokininů..... | 68 |
| 6.4 Podobné účinky světla a cytokininů..... | 69 |
| 6.5 Aditivní účinek světla a cytokininů..... | 70 |

| | |
|---|-----|
| 6.6 Světlo ovlivňuje aktivitu CKX | 71 |
| 6.7 Podobnosti a odlišnosti vlivu světla a cytokininů na oxidativní poškození a obsah chlorofylu..... | 72 |
| 6.8 Role AHK receptorů..... | 74 |
| 6.8.1 Interpretace výsledků experimentů s mutantem <i>ahk2ahk3</i> | 74 |
| 6.8.2 Interpretace výsledků experimentů s mutantem <i>ahk2ahk4</i> | 75 |
| 6.8.3 Interpretace výsledků experimentů s mutantem <i>ahk3ahk4</i> | 75 |
| 6.8.4 Srovnání úloh AHK při spolupůsobení cytokininů a světla..... | 76 |
| 7 ZÁVĚR..... | 82 |
| 8 LITERATURA..... | 83 |
| 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 91 |
| 10 PŘÍLOHY..... | 93 |
| 10.1 Grafy | 94 |
| 10.2 Fotografie..... | 108 |

1 ÚVOD

Senescence, tedy poslední fáze života organismu nebo jeho části je pro člověka významná z mnoha důvodů. Budeme-li se soustředit na senescenci rostlinnou, můžeme díky pochopení mechanismů, regulujících senescenci, vyvinout metodiky, jak získat více času pro produktivní fázi života rostlin, kterým vděčíme za svůj život. Vždyť bez rostlin jako primárních producentů by nebyl možný ani život člověka, ani život na Zemi vůbec (nebo alespoň ne v té formě, jak jej známe). Zamyslíme-li se také nad současným vývojem biotechnologických přístupů, můžeme snadno nabýt dojmu, že se jedná o další ruku, držící pilku, kterou si naše civilizace podřezává větve, na niž sedí. Modifikace rostliny genem pro rezistenci k herbicidům vede k nadužívání těchto herbicidů a zamořování životního prostředí nebezpečnými látkami, jakým např. glyfosát bezesporu je. Vnesení genu rezistence např. vůči hmyzímu parazitu může znít neškodně, nicméně je to jen otázka času, kdy přírodní výběr umožní parazitujícímu organismu překonat námi vytvořenou bariéru. Tyto popsané metody jsou metodami boje, boje proti konkurenčním rostlinám, boje proti parazitům, boje proti přírodě, jíž jsme součástí. Je snadné si domyslet, že právě tento rozpor přivádí naši civilizaci krůček po krůčku blíže k apokalypse. S uvědoměním si těchto faktů se zdá být cesta zvyšování výnosů jinými, než-li výše popsanými agresivními metodami, snesitelnější a méně riziková. I pokud by zkoumání vlivu cytokininů a světla na senescenci rostlin nakonec nevedlo k biotechnologické modifikaci zemědělských plodin, je takový výzkum zajímavý svým odkrýváním dalších dílků do skládačky pochopení fungování rostlinného organismu. Anebo i samotná radost z poznání by možná mohla stačit – vědění přinášející nadsled je přeci pro naši kulturu naprosto zásadní. Navíc má zvyšování efektivity zemědělské produkce dnes obrovské rezervy, které nespočívají tolik ve složitých a finančně náročných biotechnologických úpravách organismů, ale zejména v absurdnosti plýtvání a přílišné orientaci zemědělství na extrémně náročnou živočišnou výrobu – vždyť 30 – 50% celosvětové potravinové produkce skončí nevyužita! Vždyť plodiny, kterými jsou krmeny hospodářská zvířata by mohla sloužit k nakrmení miliónů hladovějících! Proto věřím, že ač je moje diplomová práce pouze maličkým dílkem veliké komplexnosti naší vědy a kultury, poslouží k rozvoji takového poznání, jež povede k nalezení trvale udržitelného, soucitného a ušlechtilého místa naší civilizace v rámci biosféry Země, jíž jsme součástí.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 SENESCENCE

2.1.1 Senescence - součást života rostlin

Všeobecný význam slova *senescence* (z lat. *senescere* = stárnout) je proces biologického stárnutí organismu. Někdy jsou však pojmy *stárnutí* a *senescence* rozlišovány – kdy *stárnutí* vyjadřuje změny organismu spojené s jeho vývojem v čase, zatímco *senescence* označuje konkrétně proces stárnutí, při němž dochází ke zhoršování stavu organismu. U rostlin se pak výrazu *senescence* užívá specificky pro popis geneticky řízeného stárnutí rostliny. Howard Thomas ve svém *review* trefně poznamenává, že stárnutí senescenci zahrnuje, avšak není limitováno nebo definováno terminální fází senescence nebo smrti rostliny (Thomas, 2012).

Senescence je strategická a taktická odpověď na sezónní a/nebo nepředvídatelný stres, jímž může být např. změna délky dne, zaplavení, sucho, zvýšená intenzita světla, tma, limitující množství živin, nemoci.

K senescenci však dochází také v souladu s životním plánem rostliny a nastává i za optimálních podmínek, v prostředí s dostatkem nutrientů a bez biotického či abiotického stresu (Gan a Amasino, 1997). To znamená, že tento proces je součástí přirozeného vývoje rostliny a je geneticky řízený. Zároveň to napovídá, že se jedná o jev v daných souvislostech žádoucí. Senescence je totiž evoluční výhoda, taktická odpověď na nepředvídatelné stresové podmínky a strategická reakce na stresovou zátěž, způsobenou sezónně se měnícími faktory prostředí. Senescence může být spuštěna jako genetický program již u jednotlivých buněk a dochází díky ní pak k programované buněčné smrti (PCD = Programmed Cell Death). Takováto buněčná sebevražda může být programovou součástí vývoje a tím umožnit růst a diferenciaci dalších buněk, a správný vývoj tkáně. Případně může být PCD odpovědí na stresové podmínky, kupříkladu u patogenní infekce může dojít k hypersenzitivní reakci, kdy u skupiny buněk v okolí infekce dojde k PCD, a tím se fyzicky zabrání šíření patogenu do zdravých částí organismu.

Jak jednotlivé buňky, tak i vybrané celé orgány mohou podléhat senescenci, mluvíme proto o senescenci polykarpické a jako příklad se nabízí podzimní opad listů stromů, který je adaptací na chladnou sezónu. Výsledkem je minimalizace stresu a škod způsobených chladem. Polykarpické senescenci však podléhají různé orgány, nikoli pouze listy. K senescenci dochází u pletiv tvořených specializovanými buněčnými typy (např. trichomy, tracheidy, cévní elementy),

u děložních a okvětních listů, k senescenci (resp. dozrávání) dochází také u plodů a u celých prýtů některých víceletých rostlin.

Senescence může být také konečnou etapou života celého organismu bez ohledu na to, do jaké míry se podmínky prostředí blíží optimálním. Tak je tomu u monokarpických rostlin. Došlo-li k oplození a dozrání semen, rostlina umožnila existenci svých potomků a splnila svůj životní program (Taiz a Zeiger, *kap.16*, 2003), svým zánikem může uvolnit životní prostor další generaci.

Výše zmíněné příklady ukazují, že senescence není pouze proces degenerativní, ale také recyklační. Rostlina se prostřednictvím senescence zbavuje nadbytečných orgánů a do značné míry je recykluje – translokují živiny ze senescenčního orgánu do jiných částí organismu: do jiných listů, které se právě vyvíjejí, do květů či plodů nebo do zásobních orgánů. Senescence je tedy způsob, jak rostlinný organismus efektivně využívá vlastních energetických kapacit během svého vývoje. Tento způsob využívání nutrientů usnadňuje vypořádání se s nepříznivými podmínkami a naplnění životního programu rostliny (Taiz a Zeiger, *kap.16*, 2003).

2.1.2 Senescenční syndrom aneb: Co se děje v senescentních listech?

Jelikož je senescence geneticky naprogramovaná, lze vyzorovat poměrně jasný vzorec jevů, které se dějí v buňkách senescenčních rostlinných orgánů. Tyto jevy jsou souhrnně označovány jako *senescenční syndrom*.

První změny lze pozorovat **u chloroplastů**. Z fyziologického pohledu, aktivita elektronového transportu vázaného na tylakoidní membrány ve fotosystémech I a II, se během senescence kontinuálně snižuje (Lu a Zhang, 1998) avšak složení a fluidita tylakoidní membrány se zpočátku nemění. Ztráta maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m), která reflektuje funkční integritu fotosystému II, může být použita jako parametr popisující pokročilost senescence. Zásadními změnami v chloroplastech jsou rychlé odbourávání stromatálních enzymů a proteinů v tylakoidech (Martínez a kol., 2008). Hensel a kol. (1993) dokonce zjistili, že pokles exprese genů kódujících proteiny fotosyntetického aparátu, a tím i pokles fotosyntézy, předchází nárůstu exprese genů souvisejících se senescencí (*SAG*, Senescence Associated Genes). Později jsou odbourávány také nukleové kyseliny a membránové lipidy. Katabolismus chloroplastů je zásadní, jelikož chloroplasty mohou obsahovat více než 50% veškerých listových lipidů a až 70% všech listových proteinů. Jejich odbourání je proto zásadní z hlediska recyklace nutrientů (Davies a Gan, 2012). Zajímavé také je, že pokles fotosyntézy na počátku senescence je spojen spíše s degradací membránových proteinových komplexů, než-li s rozkladem celého

membránového systému (Zimmermann a Zentgraf, 2005). To koreluje s faktem, že senescence je do značné míry reverzibilní proces (Thomas a kol., 2003).

Senescenční syndrom ovlivňuje samozřejmě také **cytoplazmu**, přičemž Dochází ke zmenšování jejího objemu a k odbourávání ribozomů (Bleecker a Patterson, 1997).

Nutné je podotknout, že zmíněné autolytické procesy se zpočátku netýkají mitochondrií ani jádra, u nichž dochází k degenerativním změnám teprve na konci senescence (DeCecco a kol., 2011). Podobně se degradace netýká ani cévních svazků, které jsou taktéž funkční až do pozdních stádií senescence (Gan a Amasino, 1997). Funkce **mitochondrií** je udržována až do pozdních stádií senescence rostlin. Jejich význam v senescenci rostlin je jedním z aspektů odlišnosti rostlinné a živočišné buňky: u rostlin se na řízení senescence podílejí chloroplasty, zatímco u živočišných buněk takto slouží mitochondrie. Funkčnost mitochondrií je během senescence udržována, aby umožnily efektivní využití energie z buněčných struktur, jež jsou degradovány (Gan a Amasino, 1997).

Výsledkem katabolismu jsou jednoduché cukry, nukleosidy a aminokyseliny, jež mohou být floémem snadno transportovány do jiných potřebných částí rostlinného organismu, kde poslouží jako substráty anabolických procesů či energetického metabolismu (Taiz a Zeiger, *kap.16*, 2003). Aby však byla zajištěna funkčnost redistribuce energie uchované v senescentním orgánu, musí být logicky katabolické procesy provázeny také procesy syntetickými. Právě proto musí jádro zůstat, alespoň v počátečních fázích senescence, funkční. To potvrzují také studie ukazující, že přeměna listu v senescentní list, který je zdrojem nutrientů, je spojena s globálními změnami genové exprese (Hensel a kol., 1993; Buchanan-Wollaston a kol., 2005). To se týká genů, kódujících hydrolytické enzymy (proteasy, nukleasy, lipasy, enzymy podílející se na katabolismu chlorofylu a.j.), genů kódujících enzymy spojené s konverzí, remobilizací a transportem produktů katabolismu, například glutamin-synthetasa, která zabudovává amoniak do struktury glutaminu a umožňuje tak recyklaci dusíku, anebo transaminasy, které umožňují transport dusíku v jeho nejběžnějších mobilních formách, tedy glutaminu a asparaginu (Hortensteiner a Feller, 2002). Další geny, jež jsou upregulovány v době senescence kódují enzymy, podílející se na biosyntéze karotenoidů a antokyanů. A také geny, zodpovědné za biosyntetické dráhy hormonů, pozitivně regulujících senescenci (etylén) a geny, kódující transkripční faktory, důležité pro expresi genů, zajišťujících biosyntézu všech výše zmíněných molekul (Thomas, 2012). Je samozřejmé, že mnoho metabolických drah, které jsou součástí senescenčního syndromu nejsou aktivní pouze v průběhu senescence, ale uplatňují se, alespoň do jisté míry, i v jiných fázích života (Bleecker a Patterson, 1997).

2.1.3 Regulace senescence

2.1.3.1 Vnější a vnitřní faktory regulující senescenci

Senescence je pro rostlinu natolik zásadní proces, až není divu, že je ovlivňována mnoha nejrůznějšími faktory a složitě řízena. Senescenci mohou spustit a ovlivňovat mnohé environmentální vlivy. Důležitý vliv má světlo, jeho intenzita a fotoperioda. Velký význam mají nejrůznější abiotické stresové faktory: dostupnost vody, živin a světla. V neposlední řadě má význam také biotický stres (Jibran a kol., 2013). Tyto environmentální faktory ovlivňující senescenci působí s největší pravděpodobností skrze signální dráhy využívané vnitřní regulací senescence, tedy prostřednictvím hormonů a jejich signálních drah (Zhang a Zhou, 2012).

Jelikož je světlo zásadním faktorem ovlivňujícím senescenci a zároveň stěžejní sledovanou proměnnou v praktické části této práce, budu vlivu světla na senescenci věnovat samostatnou kapitolu (kap.2.3.1).

I přes významnost vlivu environmentálního stresu na senescenci, může k senescenci docházet i za ideálních podmínek, jelikož je to vývojový program, závislý, kromě výše zmíněných vnějších faktorů, také na věku rostliny (Wu a kol., 2012). U *Arabidopsis* bylo pozorováno, že se senescence začala projevovat u listů starých 35 dnů. Exogenní vliv etylénu způsobil indukci senescence už od 25. dne. Tyto výsledky ukazují, že kolem 25. dne listy přecházejí z juvenilní do dospělé fáze. Od té doby již může za určitých podmínek započít senescence listu, např. vlivem exogenní aplikace etylénu. Do té doby jsou listy k senescenci nekompetentní, jelikož jsou limitovány některým ze svých endogenních regulačních faktorů. List je tedy citlivý vůči faktorům vyvolávajícím senescenci pouze v jisté době života a tento koncept je nazýván „okno senescence“ (Thomas, 2012).

Propojenost faktů, že senescence je geneticky naprogramovaná a zároveň významně ovlivňována environmentálními faktory, lze dobře pochopit díky ideji, že stáří listu (ve významu senescence) je přímo úměrné jeho funkčnosti. Funkčnost lze definovat jako schopnost listu provádět fotosyntézu a zásobovat asimiláty tzv. *sinkové* části rostlinného organismu, což jsou zpravidla reproduktivní orgány, mladé rostoucí listy, zásobní orgány a.j.) (Wu a kol., 2012). Navíc je průvodním jevem senescence akumulace reaktivních kyslíkových látek (ROS, Reactive Oxygene Species) a změny v metabolismu cukrů (viz dále), což ukazuje, že vnitřní regulace senescence je spojena s vrcholem funkčnosti a stářím listu.

Velmi zásadní je, že nástup a průběh senescence je kontrolován integrovaným komplexem signálních drah, odpovídajících jak na vnitřní vývojové tak i na environmentální faktory (Jibran a kol., 2013).

2.1.3.2 Hormonální regulace senescence

Klíčovou roli v regulaci senescence hrají samozřejmě rostlinné hormony, ba dokonce do jisté míry všechny skupiny fytohormonů. Bylo prokázáno, že pozitivně regulační vliv na senescenci mají fytohormony etylén, kyselina abscisová (ABA), kyselina jasmonová (JA), kyselina salicylová (SA) a brassinosteroidy. Tyto molekuly jsou buď pozitivními modulátory senescence a/nebo indukují expresi *SAG* (Jibrán a kol., 2013). Zásadními hormony regulujícími senescenci jsou cytokininy. Jelikož jsou předmětem zájmu praktické části méj diplomové práce, budu jim věnovat více pozornosti v samostatné kapitole (viz kap. 2.2).

Auxiny jsou skupina fytohormonů, nepostradatelných pro růst a vývoj rostlin. Řídí široké spektrum procesů od vývoje embrya, přes diferenciaci cévních svazků, vývin kořenového a vzrostného vrcholu, apikální dominanci, větvení, tropismus a kvetení. Mezi významné biologicky aktivní auxiny patří kyselina indolactová (IAA, Indol Acetic Acid) a indolmásečná (IBA, Indol Butyric Acid). Funkce auxinů souvisí s aktivací auxinem silně indukibilního genu *SAUR36* (Small Auxin Upregulated RNA = malá auxinem upregulovaná RNA), jehož zvýšená exprese byla zaznamenána v senescentních listech (Khan a kol., 2014). Ačkoliv jsou auxiny považovány za pozitivní regulátory senescence, následující zmíněná studie ukazuje překvapivě opačný vliv auxinu na senescenci listů, u nichž byla senescence spuštěna zatemněním. Ví se, že na syntéze auxinů se podílejí enzymy *YUCCA* (monooxygenasy obsahující flavin), a mutantní rostliny *yuc6-ID* overexprimující gen *YUCCA6*, měly zvýšené množství IAA a zároveň se u nich zpozdil nástup senescence. S tím také koreluje snížená exprese *SAG12*, genu uznávaného jako marker senescence. Tento efekt potvrzuje i studie na rostlinách s mutantním *ARF2* (Auxin Responsive Factor 2), na auxin reagujícím transkripčním faktorem a represorem auxinové signalizace. U těchto mutantů korelovala se zvýšenou citlivostí na auxin i zpožděná senescence (Lim a kol., 2010).

Kyselina salicylová (SA) je známá zejména díky své účasti v rostlinných obranných mechanismech vůči fytopatogenům, jež jsou uplatňovány prostřednictvím indukce hypersenzitivní reakce. Rostliny se zvýšeným množstvím SA jsou typické výrazně zakrslým fenotypem a jsou těžce poškozené nadměrnými projevy hypersenzitivní reakce (Khan a kol., 2014). Naopak rostliny s narušenou biosyntézou nebo signalizací SA vykazují morfologicky zdravý fenotyp, zároveň ale zvýšenou citlivostí k biotrofičným patogenům. Je u nich ale také vidět vliv SA na senescenci: u těchto rostlin bylo pozorováno snížení exprese mnoha *SAG*, spojené se zpožděním nástupu senescence (Morris a kol., 2000).

Nedávná studie také ukazuje jisté propojení senescence, kyseliny salicylové a světla. Totiž u mutantů *saul1* (Senescence-Associated Ubiquitin Ligase 1), u nichž dochází k aktivaci předčasné

senescence vlivem nízké intenzity osvětlení, bylo zjištěno, že za nízké intenzity osvětlení nad-exprimují transkripční faktory, které pozitivně regulují senescenci. Přičemž se zjistilo, že tento fenotyp je závislý na signální dráze kyseliny salicylové (Vogelmann a kol., 2012).

Jasmonáty jsou pro rostliny důležitými molekulami, hrají roli v buněčné signalizaci, odpovědích na biotický i abiotický stres, a při vývojových procesech, od embryogeneze a klíčení semene, přes vývoj květu, až po dozrávání plodu. Co se týká vlivu jasmonátů na senescenci, ukázalo se, že u senescenčních listů se zvyšuje biosyntéza jasmonátů. Metyl-jasmonová kyselina, těkavý derivát kyseliny jasmonové (JA), indukuje senescenci listů u mnoha druhů rostlin, prostřednictvím aktivace exprese genů, zodpovědných za rozklad chlorofylu a také indukuje degradaci RuBisCO Aktivasy (Aktivasa Ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxygenasy). Zatím se však jasmonáty nedají považovat za klíčové v regulaci senescence, jelikož u většiny rostlin s mutacemi v genech pro biosyntézu a signalizaci JA se neprojeví významné rozdíly v postupu senescence, byly-li porovnány s WT rostlinami (Khan a kol., 2014).

Kyselina abscisová (ABA, Abscisic Acid) je hormonem, podílejícím se na řízení vývojových procesů, jako je dormance semen, přechod z embryonálního růstu na růst vegetativní, a zajišťuje syntézu zásobních proteinů a lipidů. Krom toho reguluje schopnost rostlin adaptovat se na environmentální stres. ABA taktéž ovlivňuje senescenci, přičemž funguje jako pozitivní regulátor senescence. Tento fakt je znám díky studiím vlivu její exogenní aplikace i jejími zvýšenými endogenními hodnotami v průběhu senescence. Taktéž celogenomová expresní analýza potvrdila, že geny spojené s biosyntézou a signalizací ABA jsou během senescence upregulovány (Khan a kol., 2014). Je možné, že ABA řídí senescenci vznikající jako reakce na stresové podmínky, jelikož byl zaznamenán nárůst její koncentrace při některých stresových faktorech, tedy při vodním stresu (nedostatek vláhy, zasolení substrátu) a při stresu vyvolaném nízkými teplotami. O těchto faktorech je známo, že indukují nástup senescence (Zimmermann a Zentgraf, 2005).

Etylén (neboli ethen) reguluje mnoho různých pochodů v rostlinném organismu, včetně vývojových procesů: klíčení semene, růst kořenových vlásků, kvetení, dozrávání a opad plodů. Reguluje také odpovědi na stresové vjemy a senescenci. Navíc má velmi zvláštní postavení: jeho malé rozměry, plynná povaha a s ní spojená těkavost totiž umožňuje etylénu synchronizovat pochody mezi jednotlivými rostlinami v rámci populace (Khan a kol., 2014).

Co se však týká významu etylénu na regulaci senescence, je známo, že u listů rostlin indukuje senescenci pouze dosáhnou-li určitého věku. Autoři Jing a kol. (2005) však zjistili, že etylén je schopen senescenci regulovat, jak pozitivně, tak i negativně, v závislosti na délce jeho

působení, a že jeho vliv na indukci senescence je ovlivňován alespoň osmi regulačními *OLD* geny (Onset of Death, nástup smrti listů).

2.1.3.3 Genetická regulace

Ačkoliv některé signální dráhy fytohormonů necílí své působení skrze regulaci genové exprese, je většina efektů působení fytohormonů spojena buď s kontrolou množství nebo aktivity transkripčních faktorů, ať už aktivátorů či represorů (Dhamasiri a kol., 2013). Navíc změny v množství každého hormonu v průběhu života rostliny jsou zprostředkovány zejména různou mírou exprese genů, kódujících biosyntetické dráhy těchto hormonů. Je jasné, že regulace senescence prostřednictvím hormonů je úzce propojena s regulací genetickou.

Pozoruhodné je množství genů, jež se nějakým způsobem uplatňují při senescenci. Práce autorů Guo a kol. (2004) ukazuje analýzu transkriptomu v listech *Arabidopsis*; zjistili, že v průběhu senescence je ve zvýšené míře exprimováno (z celkových 25 498 genů) až 2491 genů, mnohé další jsou naopak *downregulovány* (Gan a kol., *kap. 10.1.2.*, 2007). Tyto geny se podle toho řadí do dvou skupin: senescencí negativně regulované geny (*SDG* = Senescence Down-regulated Genes) a se senescencí asociované geny (*SAG* = Senescence-Associated Genes) (Taiz a Zeiger, *kap.16*, 2003).

Dohromady bylo mezi *SAG* geny identifikováno více než 100 transkripčních faktorů, patřících do mnoha rodin (NAC, WRKY, MYB, C2-H2 zinc-finger, bZIP a AP2/EREBP). Ačkoliv jen u nemnoha z těchto transkripčních faktorů byla prokázána funkce spojená přímo se senescencí, přesto jistá zjištění nasvědčují, že se tyto geny nějakým způsobem na započetí, průběhu či koordinaci senescence podílejí (Besseau a kol., 2012).

2.2 CYTOKININY

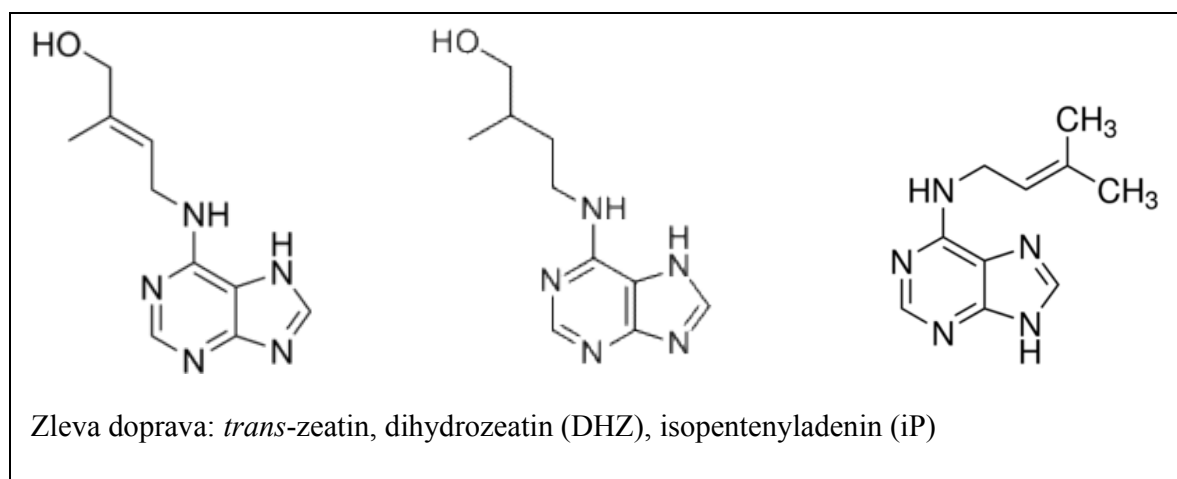
Cytokininy (CK) jsou rozsáhlou skupinou fytohormonů. Kromě přirozeně se vyskytujících cytokininů byly laboratorně připraveny také syntetické látky s cytokininovou aktivitou.

Cytokininy hrají zásadní roli v širokém spektru vývojových procesů, jako je např. zakládání meristému vzrostného vrcholu, vývoj cévních svazků, fotomorfogeneze, vývoj semen, gravitropismus (Khan a kol., 2014). Již po celá desetiletí je známa také jejich schopnost oddálit senescenci. Pokles hladiny cytokininů je totiž spojen jak s nástupem, tak i průběhem senescence (Singh a kol., 1992), přičemž jak jejich exogenní aplikace, tak i endogenně zvýšený obsah dokáže senescenci oddálit nebo zpomalit (Gan a Amasino, 1997). Jako hlavní inhibitory senescence působí cytokininy prostřednictvím regulace genové exprese, potlačují expresi *SAG* (genů spojených se senescencí) a jsou zaznamenány také případy, kdy vliv cytokininů dokázal senescenci dokonce zvrátit (Gan a Amasino, 1997).

2.2.1 Klasifikace a nejdůležitější cytokininy

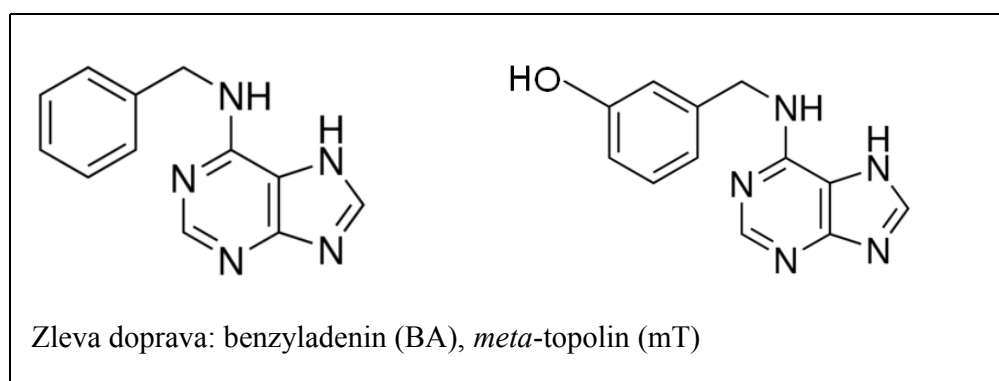
Společným rysem přirozených i syntetických cytokininů je chemická povaha – většina cytokininů patří mezi N^6 -deriváty adeninu. Jejich klasifikace je založena na konfiguraci postranního řetězce v pozici N^6 . Na základě struktury postranního řetězce se dělí do dvou základních skupin: na cytokininy izoprenoidní a aromatické. Jsou ale známy také deriváty fenyльмоčoviny, jež mají podobné účinky jako cytokininy a při klasifikaci jsou uváděny jako samostatná skupina. Izoprenoidní formy cytokininů jsou v rostlinách hojnější, než formy aromatické, proto jsou více zkoumány (Aremu a kol., 2012). Mezi izoprenoidní cytokininy patří zeatin, prekurzor jeho syntézy isopentenyladenin (iP, neboli také i^6Ade) a derivát zeatinu dihydrozeatin (DHZ) (viz Obr. č.1).

Obrázek č.1 číslo: Strukturní vzorce některých důležitých izoprenoidních cytokininů



Zeatin je považován za základní přírodní cytokinin. Tvoří *cis/trans* izomery, přičemž poslední studie postupně ukázaly, že oba izomery se v rostlinách vyskytují hojně a mají vysokou aktivitu, s rozdíly mezi různými druhy (Murai, 2014). Jelikož byl však *trans*-zeatin dlouho považován za všeobecně fyziologicky efektivnější, je stále jeho aktivita akceptována jako měřítko aktivity pro ostatní látky, řazené do skupiny cytokininů. Aromatické cytokininy byly dlouho pokládány za pouhé artefakty syntézy a byly připravovány uměle. Dnes už je známo, že mezi endogenními cytokininy jsou i aromatické, například benzyladenin (BA) a vysoce fyziologicky aktivní *meta*-topolin (mT) (Strnad a kol., 1997) (viz Obr. č.2); pro více informací, viz např. Frébort a kol. (2011).

Obrázek č.2: Strukturní vzorce některých důležitých aromatických cytokininů



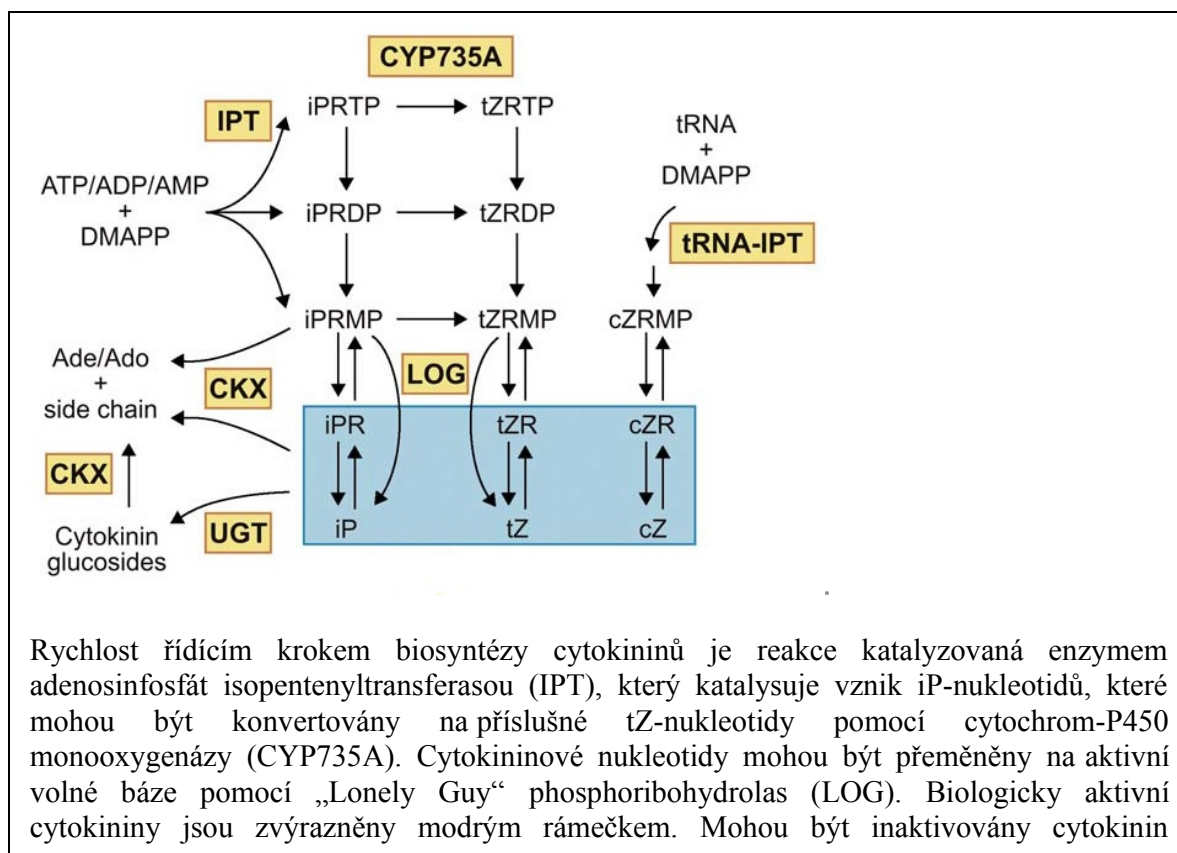
2.2.2 Biosyntéza cytokininů

Nejvýznamnější místo produkce cytokininů se nachází v kořenovém apikálním meristému, odkud jsou transportní formy cytokininů (ribozidy a ribotidy) rozváděny xylémem do nadzemních částí rostliny. Přesto nelze opomenout, že jsou cytokininy syntetizovány nejen v meristému kořenových špiček, ale ve všech pletivech, kde dochází k dělení buněk, tedy i v embryích, mladých listech a plodech (Taiz a Zeiger, *kap. 21*, 2003).

Biosyntézu cytokininů lze rozdělit na dva odlišné způsoby. Jeden z nich je degradace tRNA, přičemž je to jediný prokázaný způsob biosyntézy *cis*-zeatinu (Miyawaki a kol., 2006). Významná je *de novo* biosyntéza isoprenoidních cytokininů, která začíná klíčovým krokem: transferem isoprenové skupiny na adenosinfosfát (AMP, ADP nebo ATP). Tento krok je katalyzován enzymem adenosinfosfát isopentenyltransferasou (IPT). Důležitost této reakce spočívá zejména v tom, že je to krok, limitující rychlost celé *de novo* biosyntézy cytokininů (Kakimoto, 2001). Podobně jako IPT funguje také enzym tRNA-IPT, katalyzující transfer isoprenylové skupiny na adenin v tRNA. Pro zajímavost, jak shrnuli Frébort a kol. (2011),

se tento enzym nachází kromě domény Archaea bezmála ve všech žijících organismech: v bakteriích, kvasinkách, rostlinách i živočiších. Donorem isoprenylové skupiny v biosyntéze isoprenoidních cytokininů je dimethylallyl difosfát (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyl difosfát (HMBDP). DMAPP je produktem mevalonátové dráhy (MVA) nebo methylerythritol fosfátové dráhy (MEP), jejímž produktem je také HMBDP. Takto vzniká isopentenyladenin mono-, di- nebo trifosfát (iPMP, iPDP, iPTP) (Sakakibara a kol., 2006). Dalším důležitým krokem biosyntézy cytokininů je možnost modifikace isoprenylové části cytokininových meziproductů, které zprostředkovávají cytochromy P450 monooxygenasy (CYP450) (jejichž isoformy se u *Arabidopsis* nazývají CYP735A1 a A2) (Takei a kol., 2004). Zvýšení fyziologické účinnosti cytokininů poté zajišťují fosforibohydrolasy specifické pro cytokininy, zvané LOG („Lonely Guy“) (Kurakawa a kol., 2007). Cytokininy s hydroxylovou skupinou na postranním řetězci mohou být také přeměněny na zásobní formy cytokininů, pomocí O-glykosylace, kterou katalyzují glycosyltransferasy (UGT, uridin-5'-difosfo-glukuronosyltransferasa). Inaktivaci cytokininů zajišťují cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (CKX) (Galuszka a kol., 2007). Viz Obr. č.3.

Obrázek č.3: Schéma popisující model metabolismu cytokininů



Rychlost řídicím krokem biosyntézy cytokininů je reakce katalyzovaná enzymem adenosinfosfát isopentenyltransferasou (IPT), který katalysuje vznik iP-nukleotidů, které mohou být konvertovány na příslušné tZ-nukleotidy pomocí cytochrom-P450 monooxygenázy (CYP735A). Cytokininové nukleotidy mohou být přeměněny na aktivní volné báze pomocí „Lonely Guy“ phosphoribohydrolas (LOG). Biologicky aktivní cytokininy jsou zvýrazněny modrým rámečkem. Mohou být inaktivovány cytokinin

2.2.3 Percepce a transdukce signálu cytokininů

U *Arabidopsis* se přenos signálu cytokininů děje skrze dvousložkovou signální dráhu. Počáteční součástí této signální dráhy jsou receptory (Zwack a Rashotte, 2013) a dosud byly identifikovány tři tyto receptory: AHK2 (*Arabidopsis* Histidin Kinasa 2), AHK3 a AHK4 (Inoue a kol., 2001). Údajně však není vyloučena možnost existence dalšího nepopsaného receptoru (Higuchi a kol., 2004).

Jednotlivé receptory jsou funkčně navzájem alespoň částečně zastupitelné, ale jejich množství se liší v různých částech rostliny: AHK2 a AHK3 se vyskytují převážně v prýtu a AHK4 zejména v kořeni (Higuchi a kol., 2004). Co se týká vnitrobuněčné lokalizace, donedávna panoval názor, že cytokininové receptory se nacházejí v cytoplasmatické membráně. Novější výzkumy však ukazují, že většina z nich je součástí membránového systému endoplazmatického retikula (Wulfetange a kol., 2011).

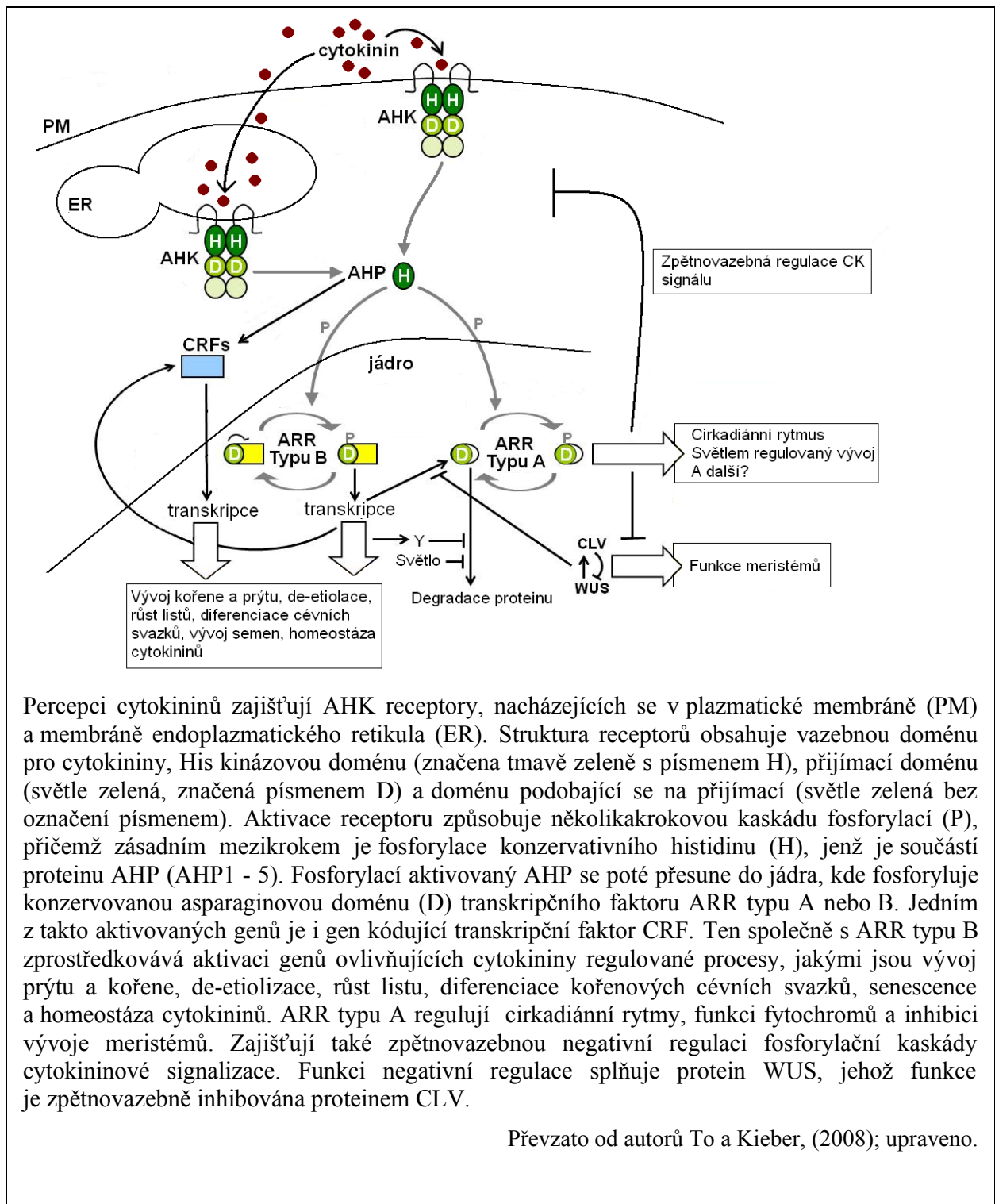
Cytokinininy se navazují na extramembránovou doménu AHK receptorů, zvanou CHASE (Cyclase/His Kinase-Associated Sensing Extracellular) (Dharmasiri a kol., 2013). Navázáním cytokininu na tuto doménu dojde k autofosforylaci histidin kinasové domény receptoru. Poté dojde k transferu fosfátové skupiny na konzervativní asparagin další domény, z něž je fosfát přenesen na další komponentu cytokininové signální dráhy - AHP protein (*Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer), který se nachází v cytoplazmě. Dosud bylo identifikováno pět typů AHP (AHP1-5). Fosforylací aktivované AHP signál přenáší do jádra, kde mohou fosforylovat transkripční faktory ARR (*Arabidopsis* Response Regulator). Ty pak mohou iniciovat transkripci cytokininů aktivovaných genů, mezi něž patří i samotné ARR typu A a také faktor cytokininové odezvy CRF (Cytokinin Response Factor), který dále funguje jako aktivátor exprese dalších genů cytokininové odezvy (To a Kieber, 2008; Dharmasiri a kol., 2013); viz Obr. č.4.

Co se týká variability ARR, bylo dosud popsáno celkem 25 proteinů a byly rozděleny do dvou tříd. ARR třídy A (A-ARR) jsou patrně negativními regulátory cytokininové odpovědi a jsou tvořeny pouze přijímací doménou. Mezi ARR třídy B (B-ARR) patří pozitivní regulátory cytokininové odpovědi a jsou tvořeny krom přijímací domény také výstupní doménou, která slouží jako transkripční faktor (Taiz a Zeiger, *kap. 21*, 2003). Viz Obr. č.4.

Konkrétním příkladem signální dráhy je propojení receptoru AHK3 a dvou klíčových komponentů: ARR2 proteinu a transkripčního faktoru CRF6. Přímý vztah mezi těmito třemi proteiny byl dokázán prostřednictvím vysoké podobnosti fenotypů rostlin, které nesly mutace výše uvedených klíčových prvků signální dráhy. Jedním z těchto mutantů je *ore12* s mutací zesilující funkci alely pro receptor AHK3, který funguje specificky pro vnímání cytokininových podnětů pro zpomalení senescence (Kim a kol., 2006). Podobný fenotyp vykazují i mutanti

s variantou proteinu ARR2 odolávající proteolýze, a rostliny nadexprimující transkripční faktor CRF6. Ten je exprimován převážně v žilnatě listů a jeho exprese roste při abiotickém stresu (v korelaci s nárůstem koncentrace cytokininů) a klesá s věkem rostliny. Je také známo, že CRF6 je negativním regulátorem přirozené i stresem vyvolané senescence. Kromě toho bylo prokázáno, že CRF6 interaguje i s jinými typy ARR proteinů, což dále podporuje pravděpodobnost, že všechny tři výše zmíněné proteiny jsou komponenty stejné signální dráhy (Zwack a Rashotte, 2013). Molekulární interakce v přenosu signálu cytokininů podrobněji popsali Dhamasiri a kol., (2013).

Obrázek č.4.: Schéma cytokininové signální dráhy



Percepci cytokininů zajišťují AHK receptory, nacházejících se v plazmatické membráně (PM) a membráně endoplazmatického retikula (ER). Struktura receptorů obsahuje vazebnou doménu pro cytokininy, His kinázovou doménu (značena tmavě zeleně s písmenem H), přijímací doménu (světle zelená, značená písmenem D) a doménu podobající se na přijímací (světle zelená bez označení písmenem). Aktivace receptoru způsobuje několikakrokovou kaskádu fosforylací (P), přičemž zásadním mezikrokem je fosforylace konzervativního histidinu (H), jenž je součástí proteinu AHP (AHP1 - 5). Fosforylací aktivovaný AHP se poté přesune do jádra, kde fosforyluje konzervovanou asparaginovou doménu (D) transkripčního faktoru ARR typu A nebo B. Jedním z takto aktivovaných genů je i gen kódující transkripční faktor CRF. Ten společně s ARR typu B zprostředkovává aktivaci genů ovlivňujících cytokininy regulované procesy, jakými jsou vývoj prýtu a kořene, de-etiolizace, růst listů, diferenciace kořenových cévních svazků, senescence a homeostáza cytokininů. ARR typu A regulují cirkadiánní rytmy, funkci fytochromů a inhibici vývoje meristémů. Zajišťují také zpětnovazebnou negativní regulaci fosforylační kaskády cytokininové signalizace. Funkci negativní regulace splňuje protein WUS, jehož funkce je zpětnovazebně inhibována proteinem CLV.

Převzato od autorů To a Kieber, (2008); upraveno.

2.2.4 Interakce cytokininů a dalších faktorů

2.2.4.1 Cytokininy a hladina cukrů

Hlavní význam cukrů spočívá v metabolismu. Krom toho jsou však také důležité z jiných důvodů, např. udržují osmotický potenciál a mají roli také v signalizaci (van Doorn, 2007). Například u kvasinek byly dosud objeveny alespoň tři glukózové signální dráhy a je pravděpodobné, že u mnohobuněčných organismů je signalizace cukrů ještě složitější. U rostlin se cukry prostřednictvím své signalizace zásadně podílí na regulaci fotosyntézy, fixace uhlíku, glykolýze, glukózo-fosfátového metabolismu (van Doorn, 2007). Krom toho mají cukry vliv také na řízení senescence (podrobněji níže).

Úloha hladiny cukrů v regulaci senescence může být matoucí, neboť senescence je ovlivňována mnoha faktory a skrze několik signálních drah. Dosud nepanuje jasná shoda v tom, jaký je přesně význam cukrů pro senescenci. Je to spíše jejich nahromadění, které urychluje senescenci nebo jejich nedostatek? **Ukazuje se, že pozitivním faktorem pro rozvoj senescence je jak nedostatek cukrů, tak i jejich nadměrná akumulace.**

Pro první možnost hovoří fakt, že u *Arabidopsis* je **při vývojové senescenci typická akumulace cukrů** (Lara a kol., 2004). Pourtau a Jennings (2006) pomocí *Affymetrix GeneChip* analýzy ukázali, že exprese genu *SAG12*, specifického pro senescenci, se zvýšila vlivem glukózy až 900 – násobně. Dalšími *SAG* geny, u nichž byla prokázána indukce glukózou, jsou geny transkripčních faktorů *PAP1* a *PAP2*, související s biosyntézou antokyanů, a geny kódující remobilizační metabolismus dusíku (glutamin syntetasa *GLN1;4* a nitrátový transportér *AtNRT2.5*) (Pourtau a Jennings, 2006).

Do tohoto tématu přinesl důležité poznatky mutant *Arabidopsis*, *gin2-1* (glucose insensitive = necitlivý ke glukóze). Tato rostlina nese v genu pro hexokinasový receptor 1 (*HXK1*, Hexokinas 1) tzv. nonsense mutaci (tedy takovou, která způsobuje poškození nebo ztrátu funkce výsledného proteinu) (Moore a kol., 2003). Je známo, že funkcí hexokinas je kontinuální vnímání množství glukózy v pletivech (Dai a kol., 1999). Ačkoliv se ví, že vnímání glukózy se děje i nezávisle na hexokinasach, jsou **mutanti *gin2-1* necitliví ke glukóze**, a bylo u nich pozorováno, že neakumulovali hexózy, a že zároveň **vykazovali zpožděnou senescenci** (Moore a kol., 2003). Je přitom známo, že u *Arabidopsis* **výrazná akumulace hexóz proces senescence provází** (Pourtau a Jennings, 2006). Navíc po exogenním dodání glukózy u *gin2-1* došlo jen k částečné normalizaci rychlosti nástupu senescence (Moore a kol., 2003). To potvrzuje i fakt, že naopak overexprese genu *HXK1* vedla ke zvýšené akumulaci hexózafosfátů spolu se zrychlením senescence (Dai a kol., 1999). U rostlin *gin2-1* se však ztráta funkce HXK1 projevila také

v dalších faktorech: mutanti měli velmi málo rozvinutý kořenový systém, malé listy a byli také charakterizováni necitlivostí k auxinům. Naopak byli hypersenzitivní k exogennímu podání cytokininů, což by mohlo také vysvětlit zpomalený nástup senescence. Pourtau a Jennings (2006) proto poukazují na zásadní roli receptoru HXK1, nejen jako regulátoru senescence, ale i pro jeho význam celkově v ontogenezi rostlin.

Ze studia mutanta *gin2-1* by mohlo plynout, že změna v metabolismu cukrů (inhibovaná akumulace hexóz) a/nebo narušení na glukóze závislé signalizace by mohla být primárním důvodem oddálení senescence. Jistou nezanedbatelnou roli zde však hraje také intenzita osvětlení: u nesenescentních *gin2-1* rostlin byla hladina hexóz nižší, rostly-li na světle o vysoké intenzitě, nikoli však u těch, které rostly při nízké hladině osvětlení (Moore a kol., 2003), vzniká zde tedy zajímavý paradox – více světla – menší akumulace hexóz. Na základě toho se autoři domnívají, že **HXK1 koordinuje vnitřní signalizaci s vlivem světelné intenzity**.

Samozřejmě, že nejen výše zmíněná akumulace, ale naopak právě i nedostatečná hladina cukrů může mít účinek oddalující senescenci. U zastíněných či zatemněných listů je omezena nebo zcela znemožněna fotosyntéza. To vede k hladovění, spojenému s nedostatkem sacharidů, a dochází také k senescenci. Byly-li oddělené listy *Arabidopsis* kultivovány ve tmě, *in vitro* a byla-li jim dodána sacharóza, nedošlo u nich k expresi tmou-indukovaných genů, včetně jednoho ze *SAG*. To značí, že u oddělených listů, kultivovaných ve tmě, vede dodání sacharózy k oddálení senescence (Fujiki a kol., 2001).

2.2.4.2 Cytokininy a charakter pletiva

K hlubšímu pochopení toho, jak ovlivňuje rozdílná hladina cukrů senescenci, se lze propracovat skrze uvědomění si důležitosti dynamiky změn charakteru orgánu či pletiva. Každá rostlina je totiž jakousi mozaikou fotosynteticky aktivních pletiv, sloužících jako zdroj (*source*), a fotosynteticky méně aktivních (nebo zcela neaktivních) pletiv, které živiny přijímají (*sink*). A vztahy mezi jednotlivými pletivy, mezi *source* a *sink*, se v rámci rostliny dynamicky mění (Lara a kol., 2004).

Přeměnu charakteru pletiva nebo orgánu ze *sinku* na *source* ovlivňují také cytokininy, což se děje částečně skrze regulaci aktivity enzymu invertasy vázané na buněčnou stěnu (CWINV, Cell Wall INVertase; nazývaná též jako extracelulární nebo apoplastická invertasa). CWINV je kovalentně vázaná na stěnu buněk *sinkového* pletiva, kde zajišťuje štěpení sacharózy, dostupné z floému, na monomery hexóz, které mohou buňky *sinku* transportovat přes svoji membránu a dále je mezi sebou distribuovat. Lara a kol. (2004) ukázali, že CWINV je uzlem v signalizaci cukrů a cytokininů, a zásadně ovlivňuje jejich působení na senescenci. Cytokininy totiž indukují CWINV, což vede k aktivaci využití cukrů, čímž se předchází tomu, aby akumulace sacharidů

mohla zapříčinit senescenci. Ovšem velmi zásadní je zjištění, plynoucí z experimentu s transgenními rostlinami tabáku, které pod promotorem indukovatelným cytokininu exprimovaly inhibitor enzymu CWINV. Po indukci senescence oddělením listů a následné aplikaci cytokininu (kinetinu) u listů transgenních rostlin zpomalení procesu senescence pozorováno nebylo, zatímco u listů WT kinetin senescenci oddálil. Z toho plyne nezastupitelná role CWINV při regulaci senescence (Lara a kol., 2004).

Ve vztahu k senescenci je důležitá nedávná studie popisující hypotetický tzv. „zbytečný“ (futile) cyklus, díky němuž by CWINV mohla imitovat silný export sacharózy, typický pro silná zdrojová pletiva (Zwack a Rashotte, 2013). Krom toho existuje také studie, provedená na hvozdíku karafiátu (*Dianthus caryophyllus*) ukazující, že sacharóza u oddělených kvetoucích prýtů oddaluje senescenci skrze zabránění upregulace *SAG* (Hoeberichts a kol., 2007). Aktivita CWINV je proto považována za centrální regulátor *sinkové* aktivity. Jak již bylo výše zmíněno, Lara a kol. (2004) prokázali vztah CWINV a cytokininů, když zjistili vyšší aktivitu CWINV u rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) se zvýšenou expresí genu *IPT*, řídicího biosyntézu cytokininů, který byl exprimován pod promotorem *SAG12* asociovaným se senescencí. Proto je pravděpodobné, že nárůst aktivity CWINV je nezbytnou komponentou molekulárního mechanismu, jakým cytokininu způsobují oddálení senescence. Kromě CWINV hrají důležitou roli také hexózové transportéry, které jsou vlivem cytokininů indukovány spolu s CWINV (Lara a kol., 2004).

2.2.4.3 Vliv dusíku

Jelikož senescence ovlivňuje metabolismy nejen uhlíku, ale i dusíku (redukcí asimilace uhlíku a zajišťováním opětovného využití dusíku ze senescenčních pletiv), dá se považovat za jakousi křížovatkou metabolismu těchto dvou prvků (Wingler a kol., 2009). Není možno proto opomenout i vliv dusíku na změnu charakteru pletiva ze *source* na *sink* a tedy i na senescenci, která je změnou poměru hladin cukrů a dusíku ovlivňována. Byly-li rostliny *Arabidopsis* pěstovány na médiu s 2% glukózou a s nedostatečným množstvím dusíku, došlo u nich k senescenci na rozdíl od rostlin, které byly živeny krom glukózy i dostatkem dusíku. Analýza exprese u *Arabidopsis*, kterou provedli Pourtau a Jennings (2006) ukázala, že exprese genu *SAG12* byla nejsilnější na médiu s glukózou a nedostatkem dusíku, v porovnání s variantami, kdy bylo rostlinám poskytnuto médium s vysokým obsahem dusíku a glukózou anebo s nízkým obsahem dusíku a bez přidané glukózy. Zvýšená akumulace cukrů u rostlin s deficitem dusíku tedy indikuje, že dostupnost dusíku má vliv na metabolismus cukrů (Pourtau a Jennings, 2006).

2.3 VLIV SVĚTLA A CYTOKININŮ NA SENESCENCI

2.3.1 Vliv světla na senescenci

Světlo je jedním z nejdůležitějších vnějších faktorů, na kterém závisí život rostlin. I proto jsou rostliny schopny vnímat jeho spektrální kvalitu, směr působení a periodicitu jeho změn. Na základě těchto informací pak také optimalizují svůj růst a vývoj. Světlo (nebo jeho absence) má kromě toho komplexní vliv i na senescenci. Ovlivňuje efektivitu fotosyntézy, oxidativní stres a cirkadiánní rytmus, přičemž to, jakým způsobem a do jaké míry světlo senescenci ovlivní, záleží na jeho intenzitě, kvalitě a délce působení (Gan a kol., kap.6.2, 2007).

2.3.1.1 Vliv zatemnění

Vliv zatemnění na senescenci také není jednotný a závisí na dalších faktorech. Je však zajímavé, že studie zjišťující vliv různých faktorů (věk, vodní stres, zatemnění a exogenní působení fytohormonů: ABA, cytokininy, etylén) na expresi několika *SAG* u *Arabidopsis* (a to jak u intaktních, tak i u oddělených listů) ukázala, že zatemnění oddělených listů zvyšuje expresi *SAG* nejvíce (Weaver a kol., 1998). Je také známo, že zatemnění vede ke změně exprese až tisíce genů (Gan a kol., kap.6.2.1, 2007).

Je důležité rozlišovat zatemnění jednotlivých listů a celé rostliny. Jsou-li přímo na rostlině *Arabidopsis* zatemněny jednotlivé listy, dojde k indukci senescence lokalizované specificky v těchto zatemněných listech. Avšak zatemnění celé rostliny *Arabidopsis* senescenci neindukovalo vůbec (Weaver a Amasino, 2001). Domnívám se tedy, že možnou příčinou by mohlo být to, jaký je poměr síly zdrojových orgánů (*source*). Jeden **zatemněný list se stává oproti ostatním slabým zdrojem a je u něj zahájen proces senescence**. Zatímco u celkově zatemněné rostliny poklesne síla zdroje u všech orgánů. Nicméně je jasné, že indukce senescence zatemněním je silně autonomní pro listy, ba dokonce možná buněčně-autonomní (Gan a kol., kap.6.2.1, 2007).

Procesy senescence indukované u rostlin jak přirozeným způsobem (jako součástí vývojového programu stárnutí rostliny) tak i „uměle“ (zatemněním) sdílejí biochemické a fyziologické charakteristiky. Aktivace nebo inhibice některých genů je také sdílenou charakteristikou pro senescenci přirozenou a senescenci vyvolanou zatemněním. Nicméně molekulární analýzy odhalily, že senescence umělá je spojena s expresí jiné sady genů než jak je tomu u přirozeně senescujících rostlin. Dosud není mnoho známo o mechanismech regulace *SAG* při zatemnění, velmi pravděpodobně ale procesy budou souviset s hladověním (Fujiki a kol., 2005). Proto je důležité odlišovat od sebe senescenci přirozenou a uměle vyvolanou.

2.3.1.2 Vliv nízké intenzity osvětlení

Co se týká nízké intenzity osvětlení, působí na senescenci různě a její efekt je druhově specifický. Rostliny se zpravidla na zastínění adaptují morfologickými změnami, jako např. prodlužováním stonků a řapíků, které samozřejmě souvisejí s fyziologickými změnami. Pro zastíněnou rostlinu je zásadní vybalancovat fotochemickou efektivitu fotosyntézy tak, aby byla minimalizována respirace za účelem snížení tzv. bodu světelné kompenzace (LCP, Light Compensation Point) (Brouwer a kol., 2012); LCP je charakterizován jako stav, kdy je ustavena rovnováha mezi mírou fotosyntézy a respirace organismu, proto zároveň nedochází k žádnému ukládání asimilátů.

Nízká intenzita osvětlení, způsobená v přirozených podmínkách zastíněním, bývá faktorem korelujícím se senescencí. Vliv zastínění na senescenci byl kupříkladu pozorován u plně rozvinutých zastíněných listů manioku (*Manihot esculenta*), u nichž **nízká intenzita osvětlení vedla k akceleraci senescence** (Cock a kol., 1979). Zajímavé také je, že podobně jako nedostatek světla působí také část červeného světelného spektra o vysoké vlnové délce, tzv. „far red“ (FR) světlo. Rousseaux a kol. (1996) zjistili, že světlo o dostatečné intenzitě, ale zároveň obohacené o FR část spektra způsobilo rychlejší žloutnutí listů. To je jeden z příznaků senescence, nikoli však průkazný.

Jak bude rostlina ovlivněna nízkou intenzitou světla, je do značné míry určeno tím, jak velká část rostliny je zastíněna. U individuálně zastíněných listů *Arabidopsis* je udáván efekt fotosyntetické **aklimatizace a přerozdělení zdrojů**, které spolu s menší respirací vedly ke snížení LCP (Brouwer a kol., 2012). Z toho plyne, že k senescenci dochází pouze u těch listů, které jsou kvůli zastínění fotosynteticky výrazně méně aktivní v porovnání s ostatními listy. Tím pádem **se změní charakter zastíněných listů ze source na sink**. Energie ze senescentních listů je proto využita pro růst nových listů, které by mohly potenciálně efektivně přispět k pokrytí energetických nároků celého organismu. Brouwer a kol. (2012) ukázali, že **senescence listů byla indukována pouze při silném zastínění**, které negativně ovlivnilo uhlíkovou rovnováhu.

Pozdější studie, kterou provedli Brouwer a kol. (2014) pak také ukázala rozdíl ve významu vlivu fytochromu A (PHYA) a fytochromu B (PHYB) na obsah chlorofylu, a fotosyntetickou aklimaci. U celkově zastíněných rostlin *Arabidopsis* bylo zjištěno, že udržení obsahu chlorofylu je řízeno pouze PHYB, zatímco při částečném zastínění tuto funkci splňuje PHYA. To potvrzuje důležitost rozlišování částečného a celkového zastínění. Krom toho Brouwer a kol., (2014) zjistili, že ačkoliv nedostatek PHYA (u mutantů *phyA*) vede kvůli nedostatečné biosyntéze chlorofylu k předčasnému žloutnutí listů, není zřejmě absence PHYA přímým spouštěčem senescence.

Vliv světla na oddálení senescence nastává pouze do té doby, dokud intenzita osvětlení přesahuje LCP. Když se například snížilo množství fotosynteticky aktivního světla poskytnutého rostlinám slunečnice, došlo k akceleraci senescence jejich bazálních listů. Naopak nárůst této složky světla oddálil senescenci týchž listů (Rousseaux a kol., 1996). To potvrzují i Brouwer a kol. (2012), kteří pozorovali, že v porovnání s úplným zatemněním došlo při nízké intenzitě osvětlení k senescenci později. Mechanismus, kterým nízká intenzita osvětlení způsobuje senescenci není dosud podrobně prozkoumán, ikdyž je jasné, že tím je negativně ovlivněn metabolismus cukrů, uchovávání energie a také možná dochází ke zvýšené míře oxidativního poškození (Špundová a kol., 2005; Gan a kol., *kap.6.2.1*, 2007). Brouwer a kol. (2012) zastávají názor, že indukce senescence listů při zastínění závisí na efektivitě s jakou je fixován uhlík, což je zřejmě modulováno skrze receptory PHYA.

2.3.1.3 Vliv vysoké intenzity osvětlení

Existují důkazy, že kontinuální osvětlení vysokou intenzitou vede k fotooxidativnímu poškození, jak ukázala práce autorů Choudhury a Behera (2001), kteří vystavili semenáčky pšenice světlu o intenzitě $1175 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. U těchto rostlin došlo k dramatickému poklesu obsahu chlorofylu a karotenoidů, a zároveň k nárůstu koncentrace malondialdehydu (MDA), považovaného za indikátor oxidativního poškození. Co se týká nárůstu koncentrace MDA, autoři zjistili, že nejvyšší koncentrace MDA nebyla zaznamenána u semenáčků vystavených vysoké intenzitě osvětlení, ale u těch, jež rostly při mírné intenzitě ($70,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Choudhury a Behera, 2001). To by mohlo být vysvětleno tím, že vysoká intenzita osvětlení může způsobit rozvoj rezistence vůči fotoinhibici, jak to zaznamenali Ivanov a kol. (1998).

Je však nutno podotknout, že bez studia dalších charakteristik typických pro senescenci (jako je exprese *SAG*), nejsou výše zmíněné změny dostatečným důkazem, že vnější stimul vedl k nástupu či akceleraci senescence (Brouwer a kol., 2012; Gan a kol., *kap.6.2.1*, 2007).

Jak poznamenává Gan a kol., *kap.6.2.1*, (2007), je také vysoce pravděpodobné, že v případě rostlin, u nichž již proces senescence započal, může mít vysoká intenzita osvětlení silnější poškozující účinek. Jeden z důvodů může být ten, že v průběhu senescence klesá schopnost rostliny nebo orgánu kompenzovat nárůst hladiny ROS. **Pro senescentní rostliny je totiž typické snížení aktivity antioxidantních enzymů. Dalším důležitým faktorem je snížená schopnost fotosyntetické aklimace** (Brouwer a kol., 2012). To je však zřejmě proměnlivé mezi jednotlivými druhy rostlin, jelikož u bavlníku (*Gossypium hirsutum*) nebyly zjištěny žádné rozdíly v poklesu fotosyntetické kapacity a efektivitě při studii vlivu různých intenzit světla (15% - 100% plného slunečního svitu) (Sassenrath-Cole a kol., 1996).

2.3.1.4 Podobnost působení světla a cytokininů

Odpovědi rostlin na světlo se v mnohém podobají odpovědím na exogenní aplikaci cytokininů (Husičková, 2010). Nejznámějším příkladem je fotomorfogeneze, regulovaná mimo světla také cytokininy. Chory a kol. (1994) zjistili, že klíčila-li WT semena *Arabidopsis* v médiu s obsahem cytokininů (iP / BA / kinetin; konc.: 0 – 95 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a zároveň ve tmě, byly výsledkem semenáčky, které se významně lišily od běžných etiolizovaných rostlin, naopak se v mnohém podobaly na světle rostoucím rostlinám. Z morfologického hlediska měly inhibovaný růst hypokotylu, vyvíjely se u nich listy a chloroplasty. Z molekulárního hlediska byla u těchto rostlin v porovnání s kontrolními (WT na světle. v médiu bez aplikace cytokininů) až osminásobně více aktivní exprese sledovaných světlem regulovaných genů. Byly to geny *CAB*, kódující proteiny vážící se na chlorofyl a/b (Chlorophyll a/b binding proteins) a *CHS* (Chalcone Synthase) (Chory a kol., 1994).

Podobnost vlivu cytokininů a světla dále potvrzují studie na mutantních rostlinách, například na *Arabidopsis* s mutací v genu *amp1*. Ta zvyšuje prostřednictvím biosyntézy endogenní hladinu cytokininů, což umožňuje projev de-etiolovaných znaků u rostlin rostoucích ve tmě (Chin-Atkins a kol., 1996; Nogué a kol., 2000). Dalším příkladem jsou mutantní *Arabidopsis*, s nimiž pracovali autoři Chory a kol. (1994) v již výše zmíněné studii. Semenáčky mutantů *det1* a *det2* nesly i ve tmě znaky de-etiolizované morfologie (od čehož je také odvozen název těchto mutantů), tím se podobaly na rostliny rostoucí na světle. Zásadní také je, že **fenotyp ve tmě rostoucích *det-* semenáčků je podobný ve tmě klíčícím WT rostlinám s cytokininy dodanými** prostřednictvím růstového média. Bylo zjištěno, že tento stav není zapříčiněn působením zvýšené hladiny cytokininů, ale změnou citlivostí vnímání cytokininů. Koncentrace cytokininů v *det-* mutantech nebyla významně odlišná od *wild-type* rostlin. Při senescenci listů *det1* a *det2*, způsobené jejich oddělením, byla například zjištěna až desetinásobná hladina chlorofylů, dále také indukce exprese světlem regulovaných genů, podnícení růstu děložních i pravých listů, a naopak potlačení prodloužení hypokotylu. Protože se prokázalo, že vývojové změny u mutantů *det1* a *det2* jsou způsobeny intenzivnější percepcí cytokininů, je velmi zajímavé, že ani jeden z *det-* mutantů nereagoval prohloubením fyziologických změn na exogenní působení cytokininů (Chory a kol., 1994). Z toho lze učinit závěr, že rostliny **WT, pěstované ve tmě a zároveň pod vlivem zvýšení signálního výstupu cytokininů, si jsou s rostlinami rostoucími na světle podobné ve třech hlavních charakteristikách: morfologii, vývoji plastidů a specifické expresi genů.**

Výše zmíněná studie není jediná, v níž se mluví o vlivu cytokinů na expresi světlem regulovaných genů. Této problematiky se dotkli ve své studii autoři Flores a Tobin (1986).

Na rostlinách okřehku (*Lemna gibba*) sledovali hladiny mRNA genů kódujících *CAB* a malou podjednotku RuBisCO. Byly-li rostliny přeneseny ze světla do tmy, došlo u nich ke snížení hladin sledovaných mRNA. Následně působili na rostliny červeným světlem anebo submikromolárními koncentracemi BA. Výsledkem vlivu červeného světla i BA bylo několikanásobně zvýšení hladin oněch mRNA. Současným působením obou faktorů bylo ještě vyšší zvýšení hladiny mRNA. Zajímavé také bylo, že nárůst hladiny nastal zřejmě na základě post-transkripční regulace množství mRNA (Flores a Tobin, 1986).

Další studie byla provedena na okurce seté (*Cucumis sativa*), u níž bylo zjištěno, že **hladina transkriptů světlem regulovaného genu *phyA* se u etiolizovaných semenáčků snížila po aplikaci benzyladeninu, tudíž oba faktory zřejmě regulují expresi fytochromu podobnou měrou (Cotton a kol. 1990).**

Mezi novějšími studiemi figuruje například ta, kde se autoři Ullanat a Jayabaskaran (2002) zabývali vlivem rostlinných hormonů (CK a auxiny) a světla na expresi genu nezbytného pro dělení chloroplastů (gen *FtsZ*). Výsledkem bylo, že **u etiolizovaných oddělených děložních listů okurky (*Cucumis sativa*) byl prokázán pozitivní vliv jak světla, tak i BA na zvýšení expresní aktivity sledovaného genu**, a to na rozdíl od auxinu, který žádný signifikantní vliv neměl. Světlo upregulovalo aktivitu sledovaného genu až sedminásobně, zatímco efekt benzyladeninu byl oproti světlu asi poloviční. Krom toho je zajímavé, že míra ovlivnění zásadně souvisela s délkou působení světla nebo cytokininu, přičemž působil-li jeden z těchto faktorů 24 hodin vedlo to přibližně ke zdvojnásobení nárůstu exprese oproti dvouhodinovému působení. Z toho plyne, pro regulaci exprese genu *FtsZ*, bylo světlo částečně nahrazeno exogenním působením benzyladeninu (Ullanat a Jayabaskaran, 2002).

2.3.1.5 Interakce světla a cytokininů

Jak jsem popsal výše, je známo, že některé důsledky působení cytokininů v rostlině se velice podobají vlivu světla. Z toho plyne možná interakce obou faktorů. Forma interakce však dosud zůstává neprozkoumaná.

Autoři Flores a Tobin (1986), vycházejíc z výsledků svých měření předpokládají, že cytokininy a červené světlo působí paralelně, tedy že histidinkinasy a fytochromy nezávisle na sobě mění hladinu intermediátu, který poté přímo reguluje genovou expresi. Výsledky autorů Flores a Tobin (1986) však zároveň ukazují, že **působení jednoho z faktorů, cytokininů a RL, bylo efektivnější za přítomnosti druhého faktoru**. Existuje také zpráva o tom, že u semen sosny (*Pinus silvestris*) dochází k postupnému nárůstu hladiny cytokininů v důsledku působení pulzů červeného světla (Quamaruddin a Tillberg, 1989).

Co se však děje v rostlinách, jsou-li vystaveny jak intenzivnímu světlu, tak i exogennímu podání cytokininů? Osvětlení této otázky přinesla již v osmdesátých letech publikovaná práce autorů Buschmann a Lichtenthaler (1982), kteří provedli experimenty na semenáčcích ředkvičky (*Raphanus sativus*). Ty byly pěstovány ve tmě, při mírné ($62 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) intenzitě osvětlení. Pro srovnání lze uvést hodnotu intenzity záření $1700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kterou jsem naměřil během jarního dne, za jasného počasí (v Olomouci, 10.4.2015, 10 hod 45 min). Těmto rostlinám byl aplikován roztok BA ($8,9\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo kinetinu ($9,3\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). **Výsledkem bylo zjištění, že vliv cytokininů se různil v závislosti na světelných podmínkách při nichž byly rostliny pěstovány.** Cytokininy stimulovaly prodlužování kořene a supresi růstu hypokotylu jak ve tmě, tak u obou intenzit světla. U semenáčků rostoucích ve tmě aplikace cytokininů vedla k většímu růstu plochy děložních listů, na rozdíl od těch, co rostly na světle, a také k větší akumulaci karotenoidů a fototransformovatelného protochlorofylidu. Semenáčky rostoucí na světle měly pod vlivem exogenních cytokininů obsah karotenoidů naopak snížený. (Buschmann a Lichtenthaler, 1982).

O několik let později pozorovali u *Arabidopsis* autoři Zacarias a Reid (1990) že vliv stejných koncentrací BA (byly použity konc. v rozsahu $10^{-6} - 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl zcela opačný u senescentních listových disků ve tmě oproti senescentním listovým diskům při kontinuálním osvětlení ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). **Ve tmě BA zpomalil pokles hladiny chlorofylu, zatímco na světle degradaci chlorofylu naopak stimuloval.**

Na rozdíl od těchto výsledků existují důkazy také o aditivním vlivu cytokininu a světla: oddělené listy ječmene a ovsu při kontinuálním světle ($140 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a za působení BA (konc. BA u listů ječmene: $4,5\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; u listů ovsu: $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Weidhase a kol., 1987; Klerk a kol., 1993).

To, že současný vliv světla a cytokininů může být jak antagonistický, tak i aditivní, se může zdát být rozporuplné. Toto na první pohled odlišné spolupůsobení však dává smysl při uplatnění hypotézy prahové hodnoty společného aditivního vlivu cytokininu a světla. **Jejich senescenci oddalující spolupůsobení se může přehoupnout v opačný, senescenci urychlující efekt, je-li rostlina vystavena působení buď příliš velké koncentrace cytokininu nebo příliš intenzivnímu světlu nebo kombinaci obojího.**

2.4 ROSTLINY SE ZMĚNĚNÝM VNÍMÁNÍM NEBO OBSAHEM CYTOKININŮ

V experimentální části této práce bylo použito několik druhů mutantů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, L.), přičemž všichni tito mutanti se od běžných rostlin lišili především buď obsahem cytokininů (v případě mutantu *pga22*) anebo změněným vnímáním cytokininů (u rostlin s mutacemi v AHK receptorech).

V této kapitole se budu nejprve věnovat popisu mutantu *pga22*. Poté popíšu rostlinné vnímání cytokininů prostřednictvím AHK receptorů a posléze se budu věnovat popisu různých mutantů, s různými kombinacemi vyřazených AHK receptorů.

2.4.1 Mutantní rostliny *pga22*

Autoři Sun a kol. (2003) provedli transformaci rostlin *Arabidopsis*, s cílem získat rostliny s modifikací v genech, klíčových pro biosyntézu či signalizaci cytokininů. Transformaci provedli za pomoci bakterie *Agrobacterium tumefaciens* s chemicky indukovatelným vektorem, označující aktivaci genu. Součástí tohoto vektoru byla regulační sekvence pER16, zajišťující indukovatelnost modifikovaného genu pomocí lidského hormonu 17- β -estradiolu (jako vektor byl použit LexA-VP146-estrogenový receptorový vektor pER16 - podle autorů Zuo a kol., 2000). Takto vzniklo přes čtyřicet různých geneticky modifikovaných kalusů, které díky estradiolové indukci byly schopny tvořit prýt při kultivaci na selekčním médiu, které obsahovalo auxiny, nikoli však cytokininy. Jedním z nich je *pga22* (*Plant Growth Activator 22*).

Klíčila-li semena *pga22* na neinduktivním médiu, nebyly u nich pozorovány žádné abnormální změny, což naznačuje, že tato mutace neovlivňuje normální fungování genu. Na induktivním médiu obsahujícím 17- β -estradiol v koncentracích 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a vyšších, však mutantní rostliny vykazovaly značné fenotypové abnormality: extrémně krátké kořeny, žluté zbarvení děložních listů po klíčení a značné potlačení vývoje pravých listů. Brzy po vyklíčení došlo u těchto rostlin ke kompletnímu zastavení růstu. Bylo-li však pro indukci použito nižších než rutinně používaných koncentrací, vyznačovali se mutantní semenáčky *pga22* fenotypem typickým pro rostliny se silnějším působením cytokininů, tedy kratšími kořeny, delšími hypokotyly, tmavěji zelenými děložními listy. Estradiol (0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) při růstu ve tmě způsoboval u *pga22* semenáček deetioloovaný fenotyp. Autoři uvádějí, že síla fenotypu velmi závisela na použité koncentraci 17- β -estradiolu (Sun a kol., 2003).

Krom studia vlivu mutace *pga22* na fenotyp prozkoumali Sun a kol., (2003) také, kterého konkrétního genu se tato mutace týká. Gen *PGA22* identifikovali jako totožný s již v minulosti

popsaným genem *AtIPT8*, který zřejmě zastává zásadní funkci při biosyntéze cytokininů a jehož upregulace prostřednictvím této mutace je dostatečná k tomu, aby stimulovala cytokininovou signální dráhu. Autoři to potvrdili expresní analýzou cytokininových markerových genů *CycD3* a *ARR5*, o nichž je známo, že jsou cytokiny aktivovány, přičemž exprese těchto genů byla po indukci u mutantů zvýšená. Obsah prekurzorů cytokininů u mutantů *pga22* byl estradiolovou indukcí výrazně zvýšen: hladiny iPMP (isopentenyladenosin-5'-monofosfát) a iPA (isopentenyladenosinu) vzrostly po 24 hodinové inkubaci semenáčků v roztoku $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 17- β -estradiol 19 – 38 násobně. Množství zeatinu a dalších jeho sledovaných forem (ribosidů a ribotidů) však vzrostlo pouze mírně (Sun a kol., 2003).

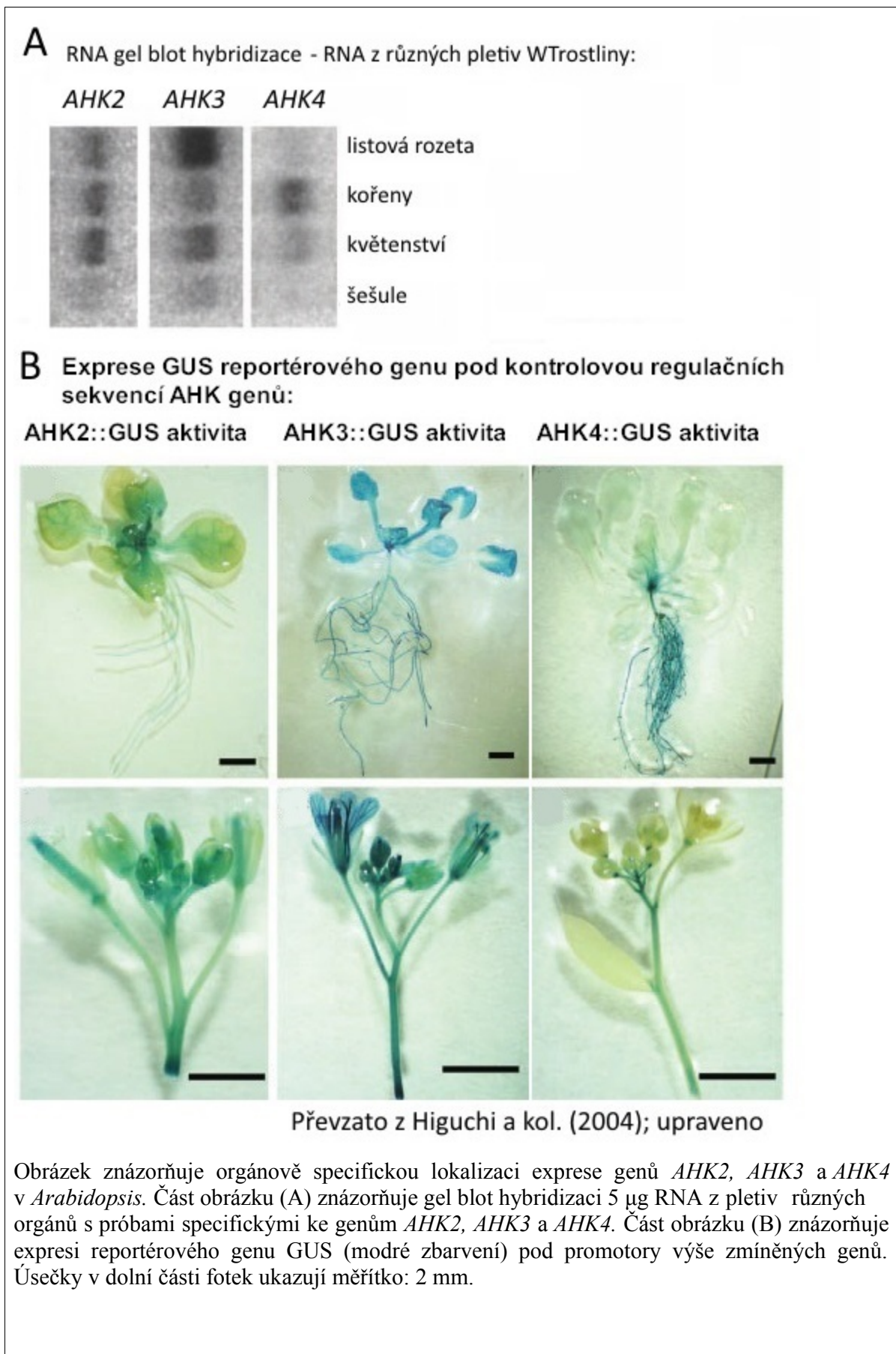
2.4.2 AHK receptory zajišťují percepci cytokininů

Pro připomenutí uvádím, že u rostlin jsou dosud známy tři receptory zajišťující percepci cytokininů, tedy AHK2, AHK3 a AHK4 (nebo též CRE1 / WOL1). Tyto receptory patří do rodiny histidin kinas. V následující kapitole se budu věnovat jejich specifikaci.

2.4.2.1 Lokalizace AHK receptorů

Jednotlivé *AHK* jsou exprimovány ve všech tkáních, avšak v odlišné míře (Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004; Stolz a kol., 2011). To potvrzuje také fakt, že mRNA všech tří receptorů je, ačkoliv v různém množství, přítomna v každém rostlinném orgánu (Riefler a kol., 2006). Higuchi a kol. (2004) analyzovali lokalizaci exprese *AHK* genů GUS reportérovou metodou. Tato metoda spočívá v tom, že se pod promotorem *AHK* exprimuje reportérový gen *GUS* (β -glukuronidasa), zajišťující modré zbarvení buněk, v nichž probíhá exprese tohoto konstruktu. Takto bylo zjištěno, že *AHK2* byl exprimován přibližně ve stejné míře jak v oblasti listové rozety, tak i v kořeni, více hlavně ve stvolu a listové žilnatině; exprese *AHK3* byla všudypřítomná, přičemž nejsilnější byla v listové rozetě, středně v kořeni a málo v plodu (šešuli); *AHK4* byl exprimován v kořeni, středně ve stvolu a nejméně v listové rozetě. Viz. Obr.č.5.

Obrázek č.5: Lokalizace AHK2, AHK3 a AHK4 v orgánech rostliny *Arabidopsis*



2.4.2.2 Ligandová specifita AHK receptorů

Jednotlivé receptory se také liší svou specifitou a afinitou k různým ligandům. Studie, kterou provedli Spíchal a kol. (2004) ukazuje odlišnou citlivost, s jakou receptory AHK3 a AHK4 vnímají některé z isoprenoidních a některé z aromatických cytokininů, tedy: *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*), dihydrozeatin (DZ), isopentenyladenin (iP), benzyladenin (BA), *meta*-topolin (*mT*) a kinetin (K). Studie ukazuje, že zatímco **AHK3 má podobnou citlivost vůči všem sledovaným cytokininům**, vyjma *tZ* (na nějž reaguje podstatně citlivěji), **AHK4 vykazuje vysokou afinitu k oběma hlavním cytokininům, iP i tZ**, avšak na ostatní ligandy slabě reaguje. Celkově vzato má AHK3 výrazně nižší citlivost vůči cytokininům, než AHK4.

Jedna z hypotéz hovoří také o tom, že AHK3 receptor je citlivý specifitěji k cytokininům pocházejícím z kořenů (*tZ* typ) a méně cytokininům iP-typu syntetizovaným v prýtu (Romanov a kol., 2006). Přesná specifita AHK3 však dosud není prozkoumána kvůli nesnadné heterologní expresi. Stolz a kol. (2011) také studovali aktivitu tří zmiňovaných receptorů *in planta*, s důrazem na srovnání citlivosti vůči iP a *tZ*, a došli k závěru, že **AHK2 má nejnižší citlivost ve srovnání s druhými dvěma receptory**. Také zjistili, že AHK3 má nižší citlivost k iP v porovnání s *tZ* (Stolz a kol., 2011), což potvrzuje i studie autorů Spíchal a kol. (2004), která také uvádí celkovou nižší citlivost AHK3 receptoru ve srovnání s AHK4. Bez ohledu na rozdíly v citlivosti k různým ligandům vyplývá ze studií Spíchal a kol., (2004) a Stolz a kol., (2011), že **lze určit pořadí všeobecné citlivosti AHK receptorů vůči (vybraným sledovaným) cytokininům takto: AHK4 > AHK3 > AHK2**.

2.4.2.3 Některé funkce specifické pro AHK receptorů

2.4.2.3.1 Regulace buněčného dělení a diferenciace

Nishimura a kol. (2004) na základě svých studií vícečetných *ahk*-mutantů uvádějí, že AHK receptory zprostředkovávají v meristémch regulaci diferenciace a dělení buněk. U mutantních rostlin se dvěma a více nefunkčními AHK receptory dochází k omezení dělení buněk a zároveň dřívější diferenciaci. To vše v různé míře ovlivňuje jak apikální meristém kořene i prýtu, tak i laterální kořenová primordia, cévní svazky i listy.

2.4.2.3.2 Ovlivnění hladiny cytokininů v důsledku narušené signalizace

Dalším důležitým aspektem, sledovaným u *ahk*-mutantů, byl vliv defektů vnímání cytokininů na jejich endogenní obsah. Tento vliv byl patrný především u rostlin s defektem ve dvou a nebo všech třech *ahk*-receptorech. Mezi jednoduchými mutanty tvořily výjimku

rostliny *ahk3-7*, u nichž byla naměřena dvoj- až trojnásobná koncentrace všech zeatinových metabolitů. Podobný nárůst byl zaznamenán i u dvojitých mutantů s mutovanou alelou *ahk3-7*. Nejvyšší hladiny cytokininů byly změřeny u trojitých mutantů (Riefler a kol., 2006). Naměřená data také konkrétně ukazují, že ačkoliv mutace *ahk3-7* vedla k výraznému nárůstu hladiny *tZ* a jeho derivátů, naopak cytokininů *iP* typu, *DHZ* typu a aromatických cytokininů se nárůst netýkal. A to dokonce ani u ostatních mutantů, s výjimkou toho s defektem ve všech třech receptorech (Riefler a kol., 2006).

2.4.2.3.3 Role AHK3 v regulaci senescence

Z výsledků práce, kterou provedli Werner a kol. (2003) vyplývá, že u rostlin s mutantními *ahk-* nebyl pozorován dřívější nástup senescence, stejně tak ani u cytokinin-deficientních rostlin, u nichž byla deficience způsobená nadměrnou expresí *AtCKX* (*Arabidopsis thaliana CKX*). To ukazuje, že **nízká hladina cytokininů zřejmě není spouštěčem senescence**. Novější výsledky však přinesly zásadní zjištění: analýza jednoduchých mutantů, kterou provedli Kim a kol. (2006). Studovali senescenci u rostlin *Arabidopsis*, s mutací *ore12-1*, které vykazovaly, v porovnání s kontrolními rostlinami, změny v mnoha různých faktorech, na nichž se senescence podepisuje. Po delší dobu měly vyšší hodnoty maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) a také vyšší hodnoty chlorofylu, což ukazuje, že u těchto rostlin mutace způsobuje zpoždění nástupu senescence. Expresí genetických markerů senescence to potvrdila taktéž: gen *CAB* (protein vázající chlorofyl *a/b*) byl exprimován u mutantů o několik dní déle a naopak exprese *SAG12* začala u mutantů o několik dní později. Senescence listů mutantů *ore12-1* byla zpožděná také během zatemnění, což ukazuje i zpožděná exprese genu *SEN4*, který je markerem senescence způsobené zatemněním a/nebo vysokým věkem. Mutace vyvolala také snížení exprese genů zodpovědných za remobilizaci nutrientů, což je také známka zpožděné senescence. Výše zmíněné množství důkazů ukazuje, že mutace *ore12-1* se nachází v genu s klíčovou funkcí v regulaci senescence. Přičemž pozičním klonováním se zjistilo, že *ore12-1* je alelou genu *AHK3* (Nishimura a kol., 2004; Higuchi a kol., 2004). *Ore12-1* je missense mutace zvyšující intenzitu genové exprese. Podobný vliv jaký má mutace *ore12-1* lze získat overexpresí *AHK3* u transgenních rostlin. Bylo zjištěno, že mezi geny, jejichž exprese se u mutantů zvýšila, jsou zejména *ARR* proteiny typu A, o nichž je známo, že jsou zapojeny do odpovědi regulovaných cytokininů. Že *AHK3* negativně reguluje nástup senescence autoři potvrzují také studiem mutantních *ahk3* rostlin, u nichž tmou indukovali senescenci. Výsledkem bylo, že *ahk3* měly fenotyp typický pro zrychlený nástup senescence. To ukazuje, že ostatní dva receptory, *AHK2* a *AHK4*, zprostředkovávají vliv cytokininů na senescenci pouze marginálně nebo vůbec.

Potvrzuje to i fakt, že u rostlin se ztrátovými mutacemi *ahk2* nebo *ahk4* byla při elektroforéze zaznamenána změna mobility proteinu ARR2, způsobená fosforylací ARR2. Mutace *ahk2* nebo *ahk4* tedy nevede k narušení fosforylace ARR2 tak, jako u rostlin s mutací *ahk3*. Konkrétně u proteinu ARR2 (transkripčního faktoru, jenž je součástí cytokininové signální dráhy) je známo, že je zapojen do procesu oddálení senescence, kterýžto je pozitivně regulován cytokininy (Kim a kol., 2006). Metodou *gel-shift assay* bylo potvrzeno zapojení ARR2 do cytokininové signální dráhy: Zjistili totiž, že exogenní aplikace cytokininu (*trans*-zeatin: 10 – 1000 nmol·l⁻¹) vedla při SDS-PAGE ke zpomalení mobility proužku, reprezentujícího ARR2 (Kim a kol., 2006). Autoři také prokázali funkční závislost ARR2 na AHK3 receptoru, když u *ahk3* mutanta ke zpomalení migrace ARR2 proužku nedošlo a naopak při heterologní expresi genu *ore12-1* u *ahk3* mutanta ano. To ukazuje, že exprese *ore12-1* u *ahk3* mutanta vyvolává akumulaci ARR2, což potvrzuje kompenzaci *ahk3* mutace. Autoři taktéž nezaznamenali žádnou akumulaci ARR2 u izolovaných protoplastů *ahk2ahk3* mutanta. Dohromady tyto výsledky potvrzují, že AHK3 je nutně potřebný pro fosforylací ARR2 (Kim a kol., 2006).

2.4.2.3.4 Zpomalení odbourávání chlorofylu během senescence zprostředkovává AHK3

Na základně výsledků, které publikovali Riefler a kol. (2006) se zdá, že cytokininy nejsou nutně potřebné pro syntézu a udržení chlorofylu. U všech jednoduchých a dvojitých *ahk*- mutantů, kromě mutantů *ahk4* a *ahk2ahk4*, totiž zaznamenali pokles hladiny chlorofylu, ale ani u trojitého mutanta u něž bylo množství chlorofylu mutací ovlivněno nejvíce, neklesla hladina chlorofylu pod 35% (v porovnání s WT). Jistá hladina chlorofylu se tedy udržuje i bez vlivu cytokininů, respektive bez účasti známých AHK receptorů. Přesto je zřejmé, že cytokininy přispívají k pozitivní regulaci hladiny chlorofylu nad určitou základní úroveň (Riefler a kol., 2006), což se projevuje výrazně během senescence, jejíž průvodním jevem je pokles množství chlorofylu. Riefler a kol. (2006) prozkoumali, jak jednotlivé AHK receptory zprostředkovávají zdržení odbourání chlorofylu při exogenní aplikaci cytokininu (0,1 a 1 μmol·l⁻¹ BA) na oddělené listy během senescence, vyvolané zatemněním: Ztráta funkce pouze jednoho z receptorů nezpůsobila výraznou změnu odpovědi na cytokininy (v porovnání s WT). Taktéž *ahk2ahk4* mutanti vykazovali míru reakce na exogenní cytokininy podobnou, jako WT. Zásadním zjištěním je, že při exogenní aplikaci 1 μmol·l⁻¹ BA na senescentní listy dvojitého mutanta *ahk2ahk3* nedošlo k žádnému zpomalení odbourávání chlorofylu. Z jejich výsledků plyne, že samotný receptor AHK3 dostačoval k tomu, aby rostliny plně reagovaly na efekt BA, zajišťující zlepšenou retenci chlorofylu. Reakce na signál cytokininů sice, při sledování tohoto faktoru, zprostředkovaly také ostatní dva receptory, nicméně až při vyšších koncentracích dodaného cytokininu (Riefler a kol., 2006).

2.4.2.3.5 Význam AHK receptorů při reakcích na vodní stres

Kumar a Verslues (2014) provedli na *ahk*- mutantech studii pro objasnění fyziologických vlastností AHK receptorů při stresových podmínkách (vodní stres). Zjistili, že mezi mutanty v genech jednotlivých AHK receptorů jsou zásadní rozdíly v reakcích na vodní stres, což se projevilo odlišnými fenotypy různých *ahk*- mutantů. Příkladem může být odlišnost změn v hladinách prolinu (významného nejen jako strukturní aminokyselina či nízkomolekulární antioxidant, ale také i jako osmolyt) u sledovaných *ahk*- mutantů. U jednoduchých i dvojitých mutantů s mutací *ahk4* byla zaznamenána výrazně nižší hladina prolinu (zřejmě kvůli jeho omezené biosyntéze), zatímco mutanti *ahk2-2* měli hladinu prolinu ve srovnání s WT výrazně zvýšenou (Kumar a Verslues, 2014).

2.4.2.3.6 Deetiologizaci reguluje AHK3 společně s AHK2 nebo AHK4

U semenáčků *Arabidopsis* inkubovaných ve tmě bylo také zjištěno, že vysoká hladina cytokininů je ovlivňuje tak, že u nich dochází k rozvoji některých charakteristik typických pro rostliny rostoucí na světle, tedy růst listů a potlačení dlouhivého růstu hypokotylu (Riefler a kol., 2006). U dvojitých mutantů *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* bylo zaznamenáno potlačení tohoto vlivu cytokininů, na rozdíl od mutantů s narušenou funkcí pouze jednoho AHK. Z toho plyte, že deetiologizační procesy závislé na cytokininech reguluje AHK3 za spoluúčasti AHK2 nebo AHK4 (Riefler a kol., 2006).

2.4.2.3.7 Inhibici klíčení tmou a FR-světlem ovlivňuje zejména AHK4

U AHK receptorů byl mimo jiné zjišťován také jejich vliv na klíčení. Za normálního stavu je u *Arabidopsis* klíčení semen během tmy blokováno. Tato vlastnost je regulována cytokininy prostřednictvím souhry všech tří receptorů, s pravděpodobně hlavním vlivem AHK4.

Za světla je klíčení inhibováno částí spektra v daleké červené oblasti spektra (FR), zatímco červená oblast funguje jako signál spouštějící klíčení. Při porovnání dynamiky klíčení na červeném a FR světle bylo zjištěno, že mutace ve dvou a více AHK receptorech urychlují klíčení na červeném světle, a při FR světle výrazně omezují inhibici klíčení. Nejvýraznější efekt byl zaznamenán u *ahk2ahk3* mutantu a trojitého mutantu, což ukazuje na regulační vliv AHK receptorů. Zejména AHK4 zřejmě nejzásadněji zprostředkovává vliv cytokininů na potlačení klíčení FR světlem (Riefler a kol., 2006).

2.4.3 Charakterizace rostlin s mutacemi v AHK receptorech:

2.4.3.1 Rostliny s mutací v jednom AHK genu

Nishimura a kol. (2005), kteří zkoumali mutanty *ahk2-1*, *ahk3-1* a *ahk4-1*, zjistili, že ztráta funkce v jednom ze tří AHK receptorů nevede ke změně fenotypu, tedy alespoň za standardních podmínek. Již ve stejném roce ale provedli analýzu jednoduchých mutantů také Riefler a kol. (2006). Ačkoliv potvrdili, že ztrátové mutace *ahk2-5* nebo *ahk4-2* neovlivňují fenotyp, zjistili však také, že mutant *ahk3-7* má asi o 15% redukovanou velikost listové rozety. Celkově lze ale říci, že ztráta funkce jednoho AHK receptoru vede pouze k malým změnám, což naznačuje, že funkce jednotlivých AHK se do značné míry překrývají.

2.4.3.1.1 Mutant *ahk2*

Bylo zjištěno, že mutace v genu *AHK2* vede ke sníženému obsahu chlorofylu, avšak méně, než-li u *ahk3* (Riefler a kol., 2006). Celkově se však z dosavadních zjištění zdá, že ačkoliv je *AHK2* sám o sobě dostačující k zachování normálního vývoje rostliny během standardních podmínek (Higuchi a kol., 2004), nejsou u něj známy žádné specifické funkce (Stolz a kol., 2011).

2.4.3.1.2 Mutant *ahk3*

Fakt, že *ahk3* mutant měl omezený růst nadzemní části, spočívá zřejmě ve snížené citlivosti vůči cytokininům, kterou Riefler a kol. (2006) zaznamenali u této mutantní rostliny. Kim a kol. (2006) také zjistili, že u oddělených listů mutantu *ahk3* tma indukovala senescenci rychleji, než-li u WT, a že exogenní aplikace cytokininů u těchto mutantů nemá tak výrazný vliv na oddálení senescence, jako u WT (Kim a kol., 2006). U *ahk3* mutantu byla také prozkoumána exprese *ARR* typu A. Ačkoliv mnohé z těchto genů jsou u těchto rostlin upregulovány, zjistilo se, že ty *ARR*, jejichž indukce je závislá na cytokininech, jsou u mutantu *ahk3* regulovány negativně (Kim a kol., 2006). Bylo také zjištěno, že mutace v genu *AHK3* vedla ke snížení obsahu chlorofylu u *in vitro* pěstovaných rostlin (24 dní po vyklíčení). U *ahk3-7* bylo pozorováno snížení obsahu chlorofylu na 75% oproti WT. Podobný, ale mírnější efekt byl pozorován taktéž u *ahk2* mutantu, zatímco u *ahk4* nikoliv (Riefler a kol., 2006).

Jelikož rostliny s mutací pouze v jednom z genů pro receptor *AHK2* nebo *AHK3* měly fenotyp srovnatelný s WT, je zřejmé, že pro normální růst za běžných podmínek rostlině stačí kombinace receptorů *AHK3* a *AHK4* anebo *AHK2* a *AHK4* (Stolz a kol., 2011).

2.4.3.1.3 Mutant *ahk4*

Ve spojitosti se studiem mutantů *ahk4* se Riefler a kol. (2006) zmiňují o tom, že ačkoliv většina známých mutací genu *AHK4* nezpůsobuje výrazné morfologické změny, ovlivňují fyziologické parametry, které jsou zřejmě *AHK4* receptorem řízeny: odpověď na nedostatek

fosfátu a regulaci využití sulfátu. Tento receptor má také významné vazby na řízení kořenů: reguluje jejich dlouhivý růst (Riefler a kol., 2006) a zárodečné formování kořene (Müller a Sheen, 2007).

Podstatné je také zjištění, že mutant *ahk4-1* má podobně jako *ahk3-7* sníženou citlivost k exogenní aplikaci cytokininů (Nishimura a kol., 2005).

2.4.3.2 Rostliny s mutací ve dvou AHK genech

Jelikož studiem jednoduchých mutantů byla zjištěna značná funkční redundance AHK receptorů, byly provedeny také studie s rostlinami, které nesly dvojitou mutaci a tedy pouze jedinou funkční AHK.

2.4.3.2.1 Mutant *ahk2ahk3*

Nejvýraznější změny, ať už morfologické či fyziologické, byly pozorovány u dvojitého mutantu *ahk2ahk3*: Jeho fenotyp charakterizovala redukovaná **velikost listů v rozetě** i celková velikost prýtu, včetně výrazně kratšího stvolu (Higuchi a kol., 2004; Stolz a kol., 2011). Další změnou typickou pro tohoto dvojitého mutantu je tvar listů: redukce jejich velikosti byla výraznější v délce, než v šířce, výsledkem byly proto mírně **okrouhlejší listy** (Nishimura a kol., 2004). Riefler a kol. (2006) dále popisují, že u *ahk2-5ahk3-7* (a také u trojitého mutantu *ahk2ahk3ahk4*) byly pozorovány směrem dolů se **rolující děložní listy**, naznačující, že narušené vnímání cytokininů u těchto rostlin způsobilo odlišný růst na adaxiální a abaxiální straně děložních listů. Bylo také odhaleno, že u mutantu *ahk2-5ahk3-7* je průměrná velikost **epidermálních buněk** dvojnásobná oproti WT. Zvětšením buněk zřejmě rostliny kompenzují omezený počet dělení (Riefler a kol., 2006). **Kořenový systém** byl u tohoto dvojitého mutantu výrazně zvětšený, hmotnější a také oproti WT více rozvětvený.

U tohoto mutantu je velmi zajímavý vliv mutací na stav chlorofylu. Když Riefler a kol. (2006) pěstovali rostliny *in vitro*, změřili 24 dní po vyklíčení množství chlorofylu a zjistili, že dvojitý mutant *ahk2ahk3* měl ze všech mutantů (jednoduchých i dvojitých *ahk-*) nejnižší hodnoty chlorofylu. Ještě výraznější rozdíly byly zjištěny, když výše zmínění autoři podrobili oddělené listy rostlin zatemněním indukované senescenci a aplikovali jim přitom exogenně 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BA. U všech jednoduchých i dvojitých *ahk-* mutantů totiž koncentrace chlorofylu pozitivně korelovala s koncentrací dodaného cytokininu, výjimkou byl dvojitý mutant *ahk2ahk3* (podobně jako trojitý mutant *ahk2ahk3ahk4*), u nějž hladina chlorofylu nijak po dodání BA nevzrostla (Riefler a kol., 2006). Z toho plyne, že samotný AHK4 nepostačuje k suplování funkcí ostatních AHK receptorů. Mutanti *ahk2ahk3* vykazovaly také sníženou citlivost

k cytokininům: Explantáty dvojitého mutantu *ahk2-5ahk3-7* potřebovaly pro vytvoření kalusu tří- až desetinásobnou koncentrací cytokininu (iP) a prýť tvořily velice zřídka (Riefler a kol., 2006).

Jelikož dvojitý mutant *ahk2ahk3* vykazoval nejzásadnější morfologické i fyziologické změny, je možné se domnívat, že receptory AHK2 a AHK3 zastávají částečně podobné funkce, nezastupitelné AHK4. S tím souvisí i vzájemné evoluční vztahy: AHK2 a AHK3 jsou si evolučně bližší než jak je kterýkoliv z nich příbuzný s AHK4 (Stolz a kol., 2011).

Zajímavé jsou výsledky *promoter-swap* (výměna promotoru) experimentu, který provedli Stolz a kol. (2011). Aby prozkoumali rozdíly v regulaci exprese jednotlivých *AHK* genů, transformovali *ahk2ahk3* mutantní rostliny. Vnesené geny byly chimerické konstrukty, vzniklé kombinací jednoho z genů *AHK2*, *AHK3* nebo *AHK4* a jednoho z promotorů těchto genů. Expresí $P_{AHK4}:AHK4$ u dvojitého mutantu *ahk2ahk3* se jeho fenotyp nijak nezměnil. Gen *AHK4* byl schopen komplementovat chybějící funkce u dvojitého mutantu téměř plně, ale pouze tehdy, byl-li exprimován pod *AHK2* promotorem (nikoli však, byl-li exprimován pod *AHK3* promotorem). Transformované rostliny měly velikost listové růžice jen o málo menší než WT a opět získaly schopnost reagovat na exogenní působení cytokininů při tmou indukované senescenci. Tyto výsledky ukazují možnost funkční zastupitelnosti AHK2 a AHK4 receptorů a to, že jejich funkční odlišnost spočívá z velké části v regulačních sekvencích. Tyto výsledky také korelují s podobností ligandové specifity AHK2 a AHK4.

2.4.3.2.2 Mutanti *ahk2-1ahk4-1* a *ahk3-1ahk4-1*

Co se týká rostlin s jinou kombinací AHK receptorů vyřazených z funkce, Nishimura a kol. (2004) vytvořili mutantní *ahk2-1ahk4-1* a *ahk3-1ahk4-1*. Ačkoliv se zjistilo, že mutace mírně ovlivnily embryogenezi rostlin (konkrétně byl zaznamenán asi o 10% nižší počet epidermálních buněk hypokotylu), nebyly zaznamenány fenotypové změny ani ve stadiu semenáčků, ani v průběhu dalšího vývoje.

2.4.3.3 Rostliny s mutací ve třech *AHK* genech

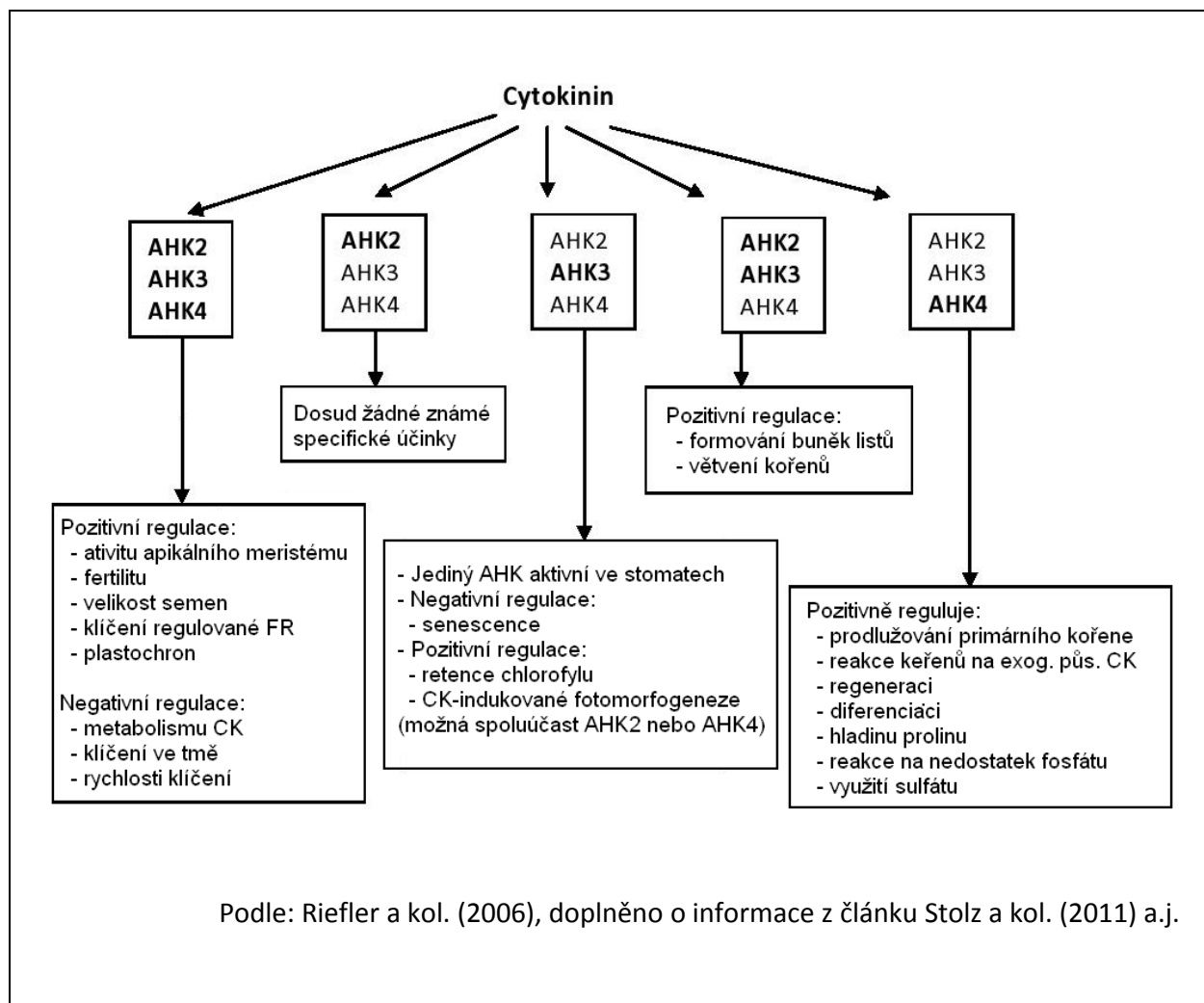
Rostliny s trojitou mutací *ahk2ahk3ahk4* měly fenotyp miniaturního vzrůstu, výrazně menší nejen v porovnání s WT, ale i se všemi ostatními mutantními genotypy. To také dokazuje funkci AHK4 v prýťové části rostliny. Všeobecně bylo u nich patrné prohloubení negativního účinku nedostatečné signalizace cytokininů (který byl patrný i u dvojitého mutantu *ahk2ahk3*). Růst celé rostliny byl výrazně omezen, což se týká jak prýtu, tak i hypokotylu a kořenové části (Nishimura a kol., 2004). Ačkoliv však měl trojitý mutant trpasličí vzrůst, Nishimura a kol. (2004) nezjistili změnu struktury a organizace apikálního meristému růstového vrcholu, pouze redukcí velikosti a počtu buněk. Naopak Higuchi a kol. (2004) změnu struktury apikálního meristému

prýtu zaznamenali. Jisté však je, že i přes změny v meristémech byla zachována jejich funkčnost, byť v omezené míře. Dalšími zjištěnými charakteristikami trojitého mutantu jsou až trojnásobná velikost epidermálních buněk, v porovnání s ostatními *ahk*-mutanty i WT, a také nejvýraznější pokles obsahu chlorofylu (pod 40% oproti WT), (Riefler a kol., 2006).

2.4.4 Cytokinininy působí zřejmě i mimo dosud známé AHK receptory

Werner a kol. (2003) zjistil, že silná redukce obsahu cytokininů vedla ke kompletnímu zastavení růstu nadzemní části rostliny. U mutantu s nefunkčními všemi třemi AHK receptory však funkčnost meristémů zůstala zachována, ačkoliv prýt měl pouze trpasličí vzrůst (Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004; Riefler a kol., 2006). Tyto výsledky ukazují, že rostliny možná vnímají cytokinininy i mimo známé AHK receptory. Proto **lze předpokládat existenci dalšího, dosud neznámého receptoru. Druhou, neméně pravděpodobnou možností je potenciální existence na receptorech nezávislého systému cytokininové signalizace**: autoři Riefler a kol. (2006) navrhují existenci dvou nezávislých systémů percepce cytokininů. Jeden, závislý na třech známých histidin kinasových receptorech, vnímajících cytokinininy (AHK), a druhý, pro nějž tyto receptory nejsou zapotřebí. Součástí této hypotézy je buněčně autonomní cytokininová signalizace, kdy hormon působí na tutéž buňku, v níž byl syntetizován. Domnívám se, že pro možnost autokrinní cytokininové signalizace může svědčit fakt, že se AHK receptory nacházejí převážně v membránách endoplazmatického retikula (Wulfetange a kol., 2011), nikoli v cytoplazmatické membráně.

Obrázek č.6: Schéma účinků jednotlivých AHK receptorů a jejich kombinací na procesy regulované cytokininy. Funkční receptory jsou zvýrazněné tučným písmem.



2.5 OXIDATIVNÍ STRES

Jelikož pro experimentální část této práce jsou stěžejní měření oxidativního poškození, je nutné popsat oxidativní stres jako takový, i jeho souvislosti se senescencí.

2.5.1 Oxidativní stres a senescence

Dva zásadní faktory, vztahující se k míře intenzity oxidativního stresu jsou koncentrace toxických vysoce reaktivních molekul (ROS a RNS, reaktivní formy kyslíku / dusíku) a aktivita systému antioxidantní ochrany. Nárůst koncentrace ROS je spojen se stresem a se senescencí a je považován za jeden z nejčasnějších detekovatelných příznaků senescence (Procházková a Wilhelmová, 2007).

Míra poškození, způsobeného oxidativním stresem závisí na ochranných účincích antioxidantních molekul. Koncentrace nízkomolekulárních antioxidantů se vyvíjí ne zcela jednoznačně. Například Dertinger a kol. (2003) při experimentech na rostlinách tabáku zjistili, že ačkoliv dochází postupně k poklesu koncentrace ve vodě rozpustných AsA (kyselina askorbová) a GSH (glutathion), hladina lipofilního α -tokoferolu naopak narůstá. Co se ale týká antioxidantních enzymů (AOE), askorbát peroxidasy (APX), glutathion reduktasy (GR) a superoxid dismutasy (SOD), jejich aktivita v průběhu života rostliny v listech jednoznačně klesala. Ve všeobecnosti lze říci, že v závěru života rostliny či orgánu postupně klesá celková antioxidantní aktivita, během senescence je pak nejnižší (Procházková a kol., 2001; Dertinger a kol., 2003; Gan a kol., *kap.6.2.1*, 2007). Přehled vývoje obsahu nebo aktivity různých AOE během senescence lze nalézt v *review* autorek: Procházková a Wilhelmová (2007). Spolu s nárůstem hladiny ROS, kterým je senescence provázena, je výsledkem zintenzivnění oxidativního stresu a tím také urychlení senescence (Procházková a kol., 2001; Gan a kol., *kap.6.2.1*, 2007).

O tom, že oxidativní poškození, resp. volné radikály, způsobují senescenci, psal ve své práci již před mnoha lety Harman (1956). Jeho teorie tvrdí, že na základě korelace tvorby volných radikálů a průběhu senescence je toxicita kumulovaných volných radikálů příčinou senescence a degradačních procesů ji provázejících. Existuje i novější práce, která to potvrzuje: Experimenty na listech kultivaru kukuřice s brzkým nástupem senescence ukazují, že pokles aktivity antioxidantního systému, způsobující nárůst oxidativního poškození, je základem senescence. Dřívější senescence je způsobena nárůstem tvorby H_2O_2 a peroxidací lipidů a současným poklesem aktivity různých antioxidantních enzymů v průběhu dozrávání Procházková a kol. (2001).

2.5.2 Vliv cytokininů na oxidativní stres

Je známo, že cytokininy hrají v rostlině roli při obraně vůči oxidačnímu stresu. Není však dosud přesně prozkoumáno, jakým mechanismem působí.

Prvním důkazem, že cytokininy regulují antioxidační enzymy, je studie, kterou provedli Toyama a kol. (1995) na oddělených děložních lístcích okurky seté (*Cucumis sativus*), kultivovaných ve tmě za působení BA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Zaznamenali pokles množství mRNA transkriptů některých genů, včetně mRNA transkriptů vykazujících vysokou homologii s genem kódujícím CAT. Po 24 hodinách působení BA kleslo množství zmíněných molekul mRNA na 20% v porovnání s kontrolou. Zřejmě tedy cytokininy regulují systém antioxidační ochrany na úrovni genové exprese. Jejich působením však také dochází ke zvýšení aktivity AOE.

Dalším příkladem je výzkum, v němž Hatami a kol. (2013) využili exogenní aplikace cytokininu thidiazuronu ($25 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) k prodloužení života u pelargoní (*Pelargonium zonale*). Bylo zjištěno, že došlo k navýšení hladiny chlorofylu *a* i *b*, karotenoidů a k vyšší aktivitě antioxidačních enzymů (APX a SOD) v kontrastu s kontrolními rostlinami. Krom toho autoři zaznamenali také menší poškození membránových systémů, charakterizované jako propustnost membrány pro ionty.

Podobně také Clarke a kol. (2002) ukázali vliv cytokininu na aktivitu AOE. Kontinuálně, po dobu deseti dní, dodávali dihydrozeatin v koncentraci $2,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ rostlinám fazole obecné (*Phaseolus vulgaris*). Použili při tom zvláštní metodu, využívající bavlněného vlákna, zavedeného do stonku rostliny s konci namočenými do roztoku cytokininu. Svým experimentem potvrdili, že vlivem exogenní aplikace cytokininů dochází k upregulaci aktivity sledovaných enzymů: SOD, CAT, GR a peroxidasy (POX).

Kromě výše zmíněných studií pracujících s vlivem exogenně podaného cytokininu, poskytují velmi zajímavé výsledky také studie s transgenními rostlinami, jež mají produkci cytokininů zvýšenou endogenně. Takovými rostlinami jsou například i ty, které studovali Dertinger a kol. (2003) – pracovali s rostlinami transgenního tabáku $P_{SAG12}\text{-ipt}$, který měl zvýšenou biosyntézu cytokininů autoregulovanou *SAG12* promotorem. Na těchto rostlinách byly zkoumány listy různého stáří. Během senescence byly při porovnání s kontrolními rostlinami zaznamenány zvýšené hodnoty všech sledovaných proměnných: transgenní tabák měl vyšší obsah chlorofylu i celkový obsah proteinů, a také vyšší rychlost asimilace CO_2 . Krom toho měl také vyšší koncentrace askorbátu a glutathionu a vyšší aktivitu sledovaných AOE (APX, GR, SOD). To vše vedlo k delší době života listů těchto rostlin. Autoři ve svých experimentech využili také transgenní rostliny tabáku se zvýšeným množstvím GR, hodnoty sledovaných parametrů u těchto rostlin však byly srovnatelné s WT, kromě zvýšené aktivity GR. To vypovídá o tom, že vyšší

endogenní hladiny cytokininů mají komplexní účinek na zvýšení antioxidačních schopností rostliny, což je jedna z cest, skrze níž zpomalují senescenci.

Podobné výsledky zaznamenali také Synková a kol. (2006) u transgenních *Pssu-ipt* rostlin tabáku, s genem *ipt* konstitutivně exprimovaným pod promotorem malé podjednotky enzymu RuBisCO. Tyto rostliny měly až desetinásobnou hladinu cytokininů oproti kontrolním WT a v průběhu ontogeneze nabyly akumulace CK u transgenních rostlin největšího rozdílu (oproti kontrole) v nejpozdějších stádiích vývoje. Nadprodukce cytokininů stimulovala aktivitu antioxidačních enzymů (CAT, GR, SOD, APX) v průběhu ontogeneze rostlin *Pssu-ipt*, přičemž rozdíl oproti kontrolním rostlinám byl patrný zejména v koncových stádiích ontogeneze rostlin. Tyto výsledky dokazují, že cytokininy potlačují rozvoj senescence prostřednictvím stimulace AOE. Zvýšená aktivita AOE je také všeobecně spojena s adaptací na zvýšené množství ROS a zlepšuje toleranci stresu (Synková a kol., 2006). Tento fakt také podporuje práce, v níž vyšší aktivita AOE zaznamenaná u mladých, nestresovaných listů, koresponduje s vyšší fotosyntetickou a metabolickou aktivitou (Casano a kol., 1994).

2.5.3 Měření oxidativního poškození

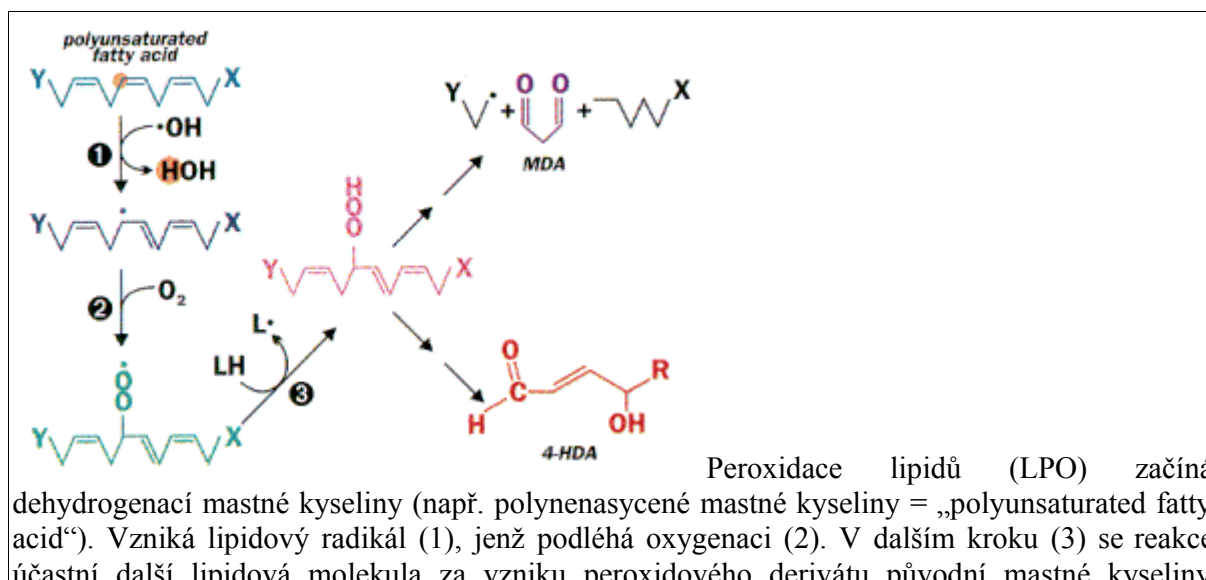
Vzhledem ke krátké životnosti ROS není lehké stanovit hodnoty těchto látek v buňkách. Jednodušší je analyzovat obsah látek, které vznikají následkem reaktivity ROS. Jelikož jedním z cílů působení ROS jsou lipidové molekuly a jelikož jsou lipidy v živých systémech všudypřítomné, bývá měření lipidové peroxidace (LPO), respektive jeho markerů, častým způsobem měření oxidativního poškození. Nejčastěji měřeným markerem je malondialdehyd (MDA).

2.5.3.1 Vznik malondialdehydu

MDA, spolu s dalšími aldehydy a hydroperoxydy lipidů, vzniká při peroxidaci lipidů (LPO). K tomu dochází v biologických systémech sice i přirozeně, nicméně míra peroxidace se následkem oxidativního stresu zvyšuje, s čímž také koreluje vyšší míra výskytu produktů LPO (Shibamoto, 2006). Příkladem může být reakce hydroxylového radikálu s mastnou kyselinou (přičemž polynenasycené mastné kyseliny jsou snadným cílem ataků radikálových molekul). Dehydrogenací lipidů vzniká lipidový radikál – viz (1) v Obr. č.7. Lipidový radikál podléhá další sérii reakcí. Těch se účastní také další lipidová molekula za vzniku peroxidového derivátu původní (substrátové) molekuly – viz (3) v Obr. č.7. Z nově do reakce vstupujícího lipidů vzniká nový radikál, čímž se reakce řetězové šíří – viz (3) v Obr. č.7. vzniku dalších radikálových

molekul. Molekula malondialdehydu vzniká při rozpadu meziprojektu zmíněných reakcí, má-li původní lipidová molekula alespoň tři nenasycené vazby.

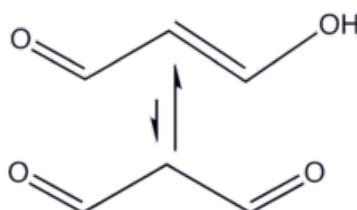
Obrázek č.7: Schéma vzniku MDA při peroxidaci lipidů



2.5.3.2 Malondialdehyd: struktura a reaktivita

MDA je komplexnější organická látka, než se na první pohled může zdát, neboť jeho struktura umožňuje přechod mezi dvěma formami, přičemž enolová forma je častější (viz Obr. č.8).

Obrázek č.8: Mezomerní struktura malondialdehydu



Díky své struktuře je MDA silně elektrofilní molekula, což vede k silné reaktivitě s nukleofily, jakými jsou například rezidua bazických aminokyselin. Reaktivita MDA není způsobena pouze aldehydickou povahou samotnou, ale také strukturou dialdehydu schopného tvořit mezomerními Schiffovy báze. Kvůli své vysoké reaktivitě působí MDA uvnitř buněk toxicky. Vytváří kovalentní proteinové adukty, zvané jako Advanced Lipoxidation End-products (ALE), ty jsou analogické k AGE (Advanced Glycation End-products). Dalším výsledkem vysoké reaktivity MDA je tvorba aduktů s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem v DNA (Giera a kol., 2012).

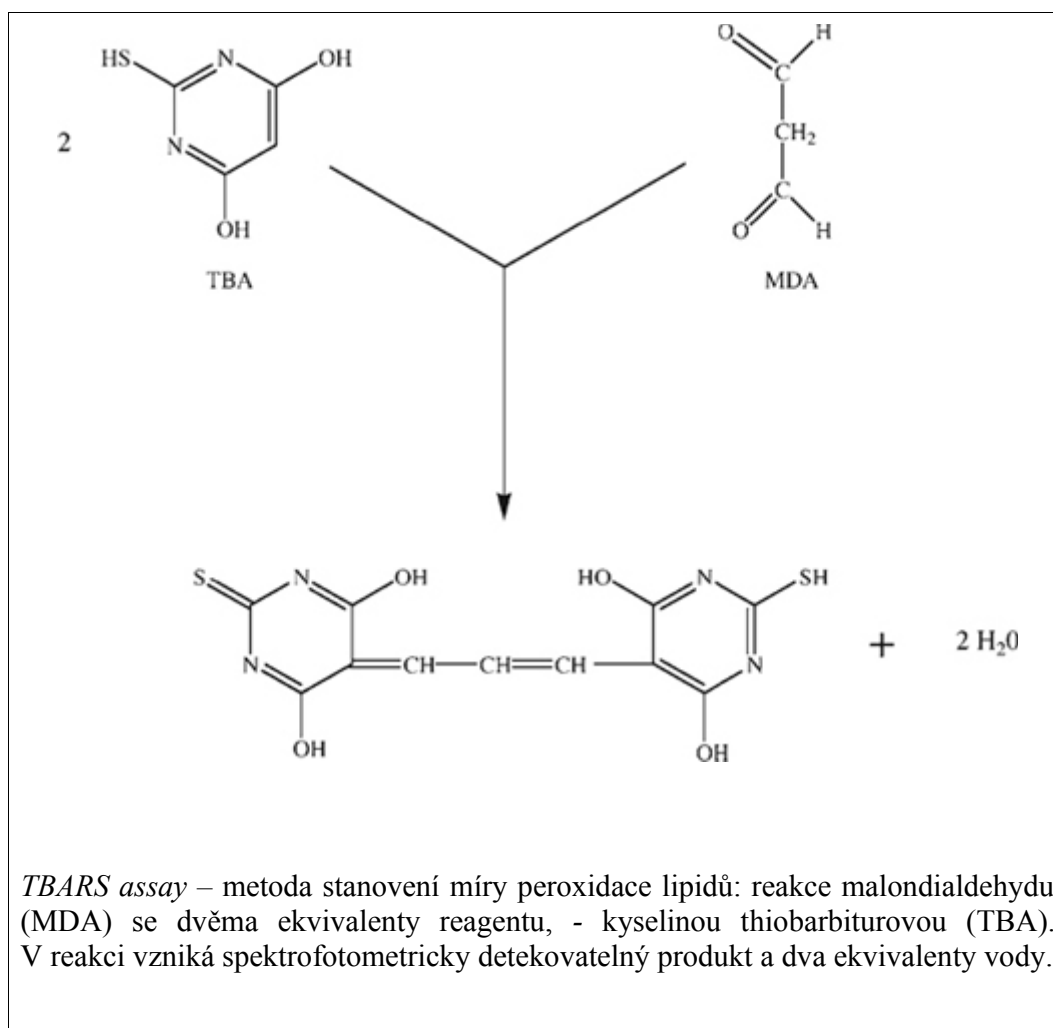
2.5.3.3 Metody stanovení malondialdehydu

2.5.3.3.1 Metoda TBARS

TBA (ThioBarbituric Acid), tedy kyselina thiobarbiturová je reagentem pro stanovení látek, vznikajících při LPO. Proto je tato skupina molekul, které při LPO vznikají, nazývána jako látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances). Totožně jako tyto látky je také nazývána běžná metoda měření LPO, využívající TBA, respektive koncentrace těchto látek, přičemž alternativním názvem se vztahuje k produktům, které vznikají při reakci TBA a látek, vzniklých při LPO, tedy TBARP (ThioBarbituric Acid Reactive Products).

Při reakci se využívá toho, že MDA a další látky reagující s thiobarbiturovou kyselinou (souhrnně tedy TBARS) kondenzují se dvěma ekvivalenty thiobarbiturové kyseliny (TBA); viz Obr.č.9. Vzniklé komplexy jsou chromofory s absorpčním maximem v červené části spektra, při 532 nm, spektrofotometrickou analýzou lze tedy zjistit jejich koncentraci, která koreluje s mírou peroxidace lipidů.

Obrázek č.9: Reakce TBA a MDA, za vzniku TBA-MDA komplexu a vody.



Ačkoliv je TBARS široce akceptovaná, řekněme až klasická metoda měření oxidativního poškození, má také své nevýhody. Mezi ně patří fakt, že MDA je pouze jednou z mnoha látek, vznikajících jako produkty peroxidační degradace lipidů. Navíc metoda TBARS samozřejmě nerozlišuje MDA, přirozeně se vyskytující ve vzorku a MDA vzniklý jako důsledek oxidativního poškození. Další významnou nevýhodou je, že v mnohých rostlinných pletivech se vyskytují látky (cukry, anthokyany a jiné fenolické molekuly), které podobně jako MDA mají absorpční maximum při vlnové délce 532 nm. Nadhodnocení obsahu MDA tak může dosahovat až o 96.5% (Hodges a kol., 1999)

2.5.3.3.2 Stanovení MDA pomocí DNPH

Právě kvůli výše zmíněným nevýhodám TBARS metody bylo vyvinuto několik nových metod. Mezi ně patří i derivatizace pomocí hydrazinových reagentů, jako je například DNPH (dinitrofenylhydrazin) (Sim a kol., 2003).

Konkrétním příkladem metody a zároveň metoda, která byla využita v této práci, zahrnuje homogenizaci, centrifugaci, alkalickou hydrolýzu, precipitaci proteinů kyselinou (využívá se kyselina chloristá, HClO_4), finální derivatizaci prostřednictvím DNPH a detekci pomocí HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

3 CÍLE PRÁCE

Jedním z cílů praktické části této diplomové práce byla snaha zjistit, jaký efekt má kombinace působení světla a cytokininů na senescenci huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, L.) a případně ověřit hypotézy týkající se aditivního vlivu těchto dvou faktorů, a hypotézy o „*threshold efektu*“, kdy nadměrná intenzita jednoho nebo obou faktorů vede k převrácení jejich účinku z protektivního vůči senescenci v senescenci urychlující.

Druhým cílem práce bylo zjistit, jakou roli hrají jednotlivé cytokininové receptory ve zprostředkování účinků cytokininů na senescenci, při současném působení světla o různých intenzitách.

Třetím cílem práce bylo otestování nové metodiky izolace malondialdehydu (MDA) z rostlinného materiálu a stanovení jeho obsahu za využití derivatizace MDA s DNPH (dinitrofenylhydrazinem) a měření pomocí HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

Pro předběžné vyzkoušení metodiky Experimentu 1 byl zvolen ječmen (*Hordeum vulgare*, L.); výsledky nejsou prezentovány.

Pro experimenty 1 a 2 (Exp.1 a Exp.2) byl zvolen modelový rostlinný organismus *Arabidopsis thaliana*, L. Jako wild-type (WT) sloužil kultivar Columbia 0. Kromě něj byly využity čtyři různé genotypy mutantních rostlin: *pga22* - mutant s indukovatelnou overexpresí klíčového genu syntézy cytokininů (*AtIPT8*), a tři typy rostlin s mutacemi vyřazující z funkce vždy dva ze tří cytokininových AHK receptorů, tedy mutanti: *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a mutant *ahk3ahk4*.

4.2 Metodika Experimentu 1

4.2.1 Exp.1: Metodika pěstování rostlin

Semena byla ponořena do vody - byla podrobena imbibici a chladové stratifikaci (4°C) ve tmě (květináče byly přikryty pro světlo nepropustnou fólií) po dobu tří dní. Poté bylo větší množství semen, dne 2. 11. 2013, vysazeno do květináčů se substrátem Potgrond H od firmy Klasmann a Geilmann (Geeste, Německo) a byly přesunuty do fytotronu, kde probíhalo klíčení a růst rostlin. Po dvou týdnech byly semenáčky vyjednoceny. Pěstování probíhalo v režimu krátkého dne (8 hod světla, 16 hod tmy), při intenzitě světla kolem 170 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Teplota ve fotokomoře byla 22°C přes den a 20°C v noci; vlhkost 60%.

4.2.2 Exp.1: Indukce syntézy cytokininů u rostlin *pga22*

Na všechny *pga22* rostliny byl dva dny před oddělením listů sprejem aplikován 17- β -estradiol (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok v 0,01% Silvetu; dále bude uváděn jako „estradiol“), a to v množství přibližně 2 ml / rostlinu. Aplikace byla provedena v digestoři mimo fytotron, ve kterém byly rostliny pěstovány.

4.2.3 Exp.1: Metodika oddělování listů a jejich kultivace

Po šesti týdnech růstu rostlin bylo provedeno oddělování listů. Bylo dbáno na to, aby byly oddělovány listy dospělé, přibližně stejného stáří.

Část oddělených listů byla zvážena a rozdělena tak, aby jeden vzorek vážil přibližně 0,5 g. Poté byly vzorky listů zabaleny do alobalu, ihned zmrazeny v tekutém dusíku, a uchovány v mrazícím boxu při -80°C. Tyto listy sloužily poté jako kontrolní vzorky.

Další listy umístěny do čtyř různých podmínek kultivace. První skupina byla ve tmě v Petriho miskách s destilovanou vodou. Druhá skupina vzorků byla také ve tmě, ale za působení cytokininu, jelikož do Petriho misky byl napipetován roztok *meta*-topolinu o koncentraci 10^{-4} mol·l⁻¹, rozpuštěný v 0,5% DMSO (dimethylsulfoxid); tento roztok bude dále uváděn jako „mT“. Další dvě skupiny vzorků byly umístěny do fytokomory s pěstebními podmínkami (viz kap. 4.2.1). Skupiny vzorků kultivovaných na světelném režimu se lišily použitým kultivačním roztokem, stejně jako skupiny vzorků kultivovaných ve tmě.

4.2.4 Exp.1: Sklizení senescentních listů a měření fotosyntetických parametrů

Oddělené listy byly sklizeny z kultivačních misek po šesti dnech. Než byly vzorky listů zamrazeny, byla na nich provedena neinvazivními metodami měření následujících dvou parametrů:

U kontrolních vzorků byl obsah chlorofylu měřen pomocí fluorometru SPAD-502 (od firmy Konica Minolta, Sensing, Japonsko). U ostatních vzorků byl změřen relativní obsah chlorofylu, a to pomocí přístroje PlantPen (od firmy Photon Systems Instruments, spol.s.r.o., Drásov, Česká Republika), který pracuje na principu měření reflektance, srovnává odražené světlo dvou různých vlnových délek, 660 a 740 nm. Výsledkem je stanovení NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), jakožto důležitého indikátoru obsahu chlorofylu.

Velmi rychlý fluorescenční indukční jev byl změřen fluorimetrem PEA (Plant Efficiency Analyser) od firmy Hansatech Instruments Ltd. (Norfolk, Spojené Království), Z naměřených křivek byl pak vyhodnocen maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m), což je parametr fluorescence, jehož pokles je korelující se stresem u rostlin.

Listy byly okamžitě zamrazeny uložením do tekutého dusíku a uchovány v mrazícím boxu při teplotě - 80°C.

4.2.5 Exp.1: Izolace TBARS a stanovení peroxidace lipidů

Měření bylo provedeno metodou TBARS (Thiobarbituric Reactive Substances), přičemž bylo využito postupu uvedeného v práci autorů Dan a kol., (1996), s jedinou změnou – v teplotě horké lázně. Konkrétní postup:

Vzorek listů o hmotnosti asi půl gramu byl homogenizován v hmoždíři s 0,5 ml 0,1% trichloroctové kyseliny (TCA, TriChloroacetic Acid) a centrifugován (10 000 g, 10 min, 4°C). Poté byl odebrán 1 ml supernatnatu a smíchan s 4 ml roztoku, obsahujícího 20 % TCA a 0,5 % (w/v) kyseliny thiobarbiturové (TBA, ThioBarbituric Acid). Takto vzniklá směs byla zahřívána ve vodní lázni o teplotě 96°C. Po 30 minutách zahřívání byla směs rychle ochlazena na ledové tříšti

a následně centrifugována (10 000 g, 10 min, 4°C). Supernatant byl odebrán a byla u něj změřena absorbance při 532 nm a 600 nm proti blanku, jímž byl roztok 20% TCA s 0,5% TBA. Koncentrace TBARS byla stanovena dle níže uvedeného vzorce, kde ϵ je molární extinkční koeficient ($155 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a $\Delta A = A_{532} - A_{600}$.

$$c_{\text{MDA}} = (\Delta A) / l \cdot \epsilon$$

4.3 METODIKA EXPERIMENTU 2

4.3.1 Exp.2: Metodika pěstování rostlin

Metodika pěstování rostlin byla totožná, jako u předchozího experimentu (viz kap. 4.2.1) s výjimkou použitého substrátu. V Exp.2 byl použit Substrat 2 od firmy Klasmann a Geilmann (Geeste, Německo). Vysazení semen proběhlo 19.1.2015.

4.3.2 Exp.2: Indukce syntézy cytokininů u rostlin *pga22*,

Polovina vysazených mutantů *pga22* byla dva dny před oddělením listů podrobena aplikaci 17- β -estradiolu ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok v 0,01% Silvetu; dále bude uváděn jako „estradiol“). Roztok hormonu byl aplikován sprejem v množství přibližně 2 ml / rostlinu. Pro kontrolu vedlejších vlivů roztoku byl aplikován také na polovinu WT rostlin. Aplikace byla provedena v digestoři mimo fytotron, kde byly rostliny pěstovány.

4.3.3 Exp.2: Metodika oddělování listů a jejich kultivace

Po šesti a půl týdnech od vysazení, když byly rostliny shledány dostatečně vzrostlými a zároveň ještě nekvetly, byly odděleny listy přibližně stejného stáří (7. - 10. list v pořadí od nejstaršího). Listy byly zváženy a rozděleny do kultivačních misek tak, aby jejich hmotnost byla v rozmezí 71 – 78 mg (čemuž odpovídalo asi 2 – 6 listů, v závislosti na genotypu). Jako kultivační misky byly použity šestijamkové makrotitrační destičky. Do misek byl před umístěním listů napipetován jeden ze čtyř roztoků 0,2% DMSO, lišící se v koncentraci rozpuštěného BA: 0, 10^{-7} , 10^{-6} a $10^{-5} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ BA. Jedna skupina destiček byla poté umístěna do tmy (zabalena do neprůsvitné fólie), druhá byla ponechána na pěstebních světelných podmínkách (pěstební režim den/noc a pěstební intenzita světla, tedy $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), a třetí skupina destiček byla umístěna na světelný režim s vyšší intenzitou osvětlení ($400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

4.3.4 Exp.2: Sklizení senescentních listů

Oddělené listy byly sklizeny z kultivačních misek po šesti dnech. Listy byly okamžitě zamrazeny uložením do tekutého dusíku a uchovány v mrazícím boxu při teplotě - 80°C.

4.3.5 Exp.2: Izolace a stanovení obsahu malondialdehydu ve vzorku

Pro měření celkového množství MDA ve vzorcích byla modifikována metodika izolace MDA dle Rác a kol. (2015).

Přípravené vzorky byly homogenizovány pomocí třecí misky a tloučku v 1,5 ml 0,11% butylhydroxytoluenu (BHT) rozpuštěném v metanolu. BHT sloužilo jako antioxidant, aby se zamezilo další potenciální peroxidaci lipidů zkreslující výsledek. Následně byl homogenát centrifugován (2000 g, 10 minut, 4°C). Po této první centrifugaci bylo 125 µl supernatantu odebráno a inkubováno s 25 µl NaOH (6 mol · l⁻¹) po dobu 30 minut při 60°C. Tím proběhla alkalická hydrolýza a tedy i zpřístupnění kovalentně vázaných molekul MDA. Dalším krokem byla precipitace proteinů pomocí přidání 62,5 µl HClO₄ (35%) a druhá centrifugace (16 000 g, 10 min, 4°C). Ze získaného supernatantu bylo odebráno 125 µl a napipetováno do insertu ve vialce. K tomuto byl přidán 1 µl DNPH reagentu o konc.: 50 mmol · l⁻¹ a důkladně promíchán. Poté proběhla 30 minutová inkubace při pokojové teplotě (25°C). 25 µl směsi bylo poté nastříknuto do HPLC systému s UV/VIS detekcí při 310 nm. Mobilní fáze A probíhala isokraticky 10 min. Následovala gradientní eluce trvající 2 min., ozačující přechod z fáze A na fázi B. Mobilní fáze A obsahovala směs triethylaminu (25 mmol · l⁻¹, pH = 3,5) a acetonitrilu (50 : 50, v / v). Mobilní fáze B, byla složena pouze ze 100% metanolu k pročištění kolony od případných nečistot. Průtok látek přes HPLC systém byl nastaven na 1 ml/min; teplota vzorkovny byla 25 °C a kolony 35°C.

Celý průběh přípravy vzorku i měření probíhal ve tmě.

4.3.6 Exp.2: Měření fotosyntetických parametrů

Tuto část experimentu provedla Mgr. Helena Melkovičová. Její i moje měření proběhla jako součást jednoho experimentu. A jelikož data získaná stanovením MDA a data získaná měřením fotosyntetických parametrů jsou nezbytná pro vzájemnou interpretaci, uvádím zde výsledky Mgr. Melkovičové jako jednu z nedílných součástí své diplomové práce. Grafické znázornění jejich výsledků je možné nalézt v příloze.

Pro měření obsahu chlorofylu a fluorescenčních indukčních křivek (parametru F_v/F_m) byly ze všech rostlin vybírány listy podobného stáří (přibližně 7. v pořadí od nejstaršího) a tyto listy byly odděleny a kultivovány - viz kap. 4.3.3. U těchto listů byly v průběhu kultivace opakovaně měřeny (měření byla vždy prováděna na stejných listech) následující fotosyntetické parametry, a to pomocí neinvazivních metod:

K měření relativního obsahu chlorofylu byl použit chlorofylmetr SPAD-502 od firmy Konica Minolta (Sensing, Japonsko).

K měření F_v/F_m byl použit přístroj FluorCam od firmy Photon Systems Instruments, spol.s.r.o. (Drásov, Česká Republika).

Měření bylo provedeno v desíti termínech: v den oddělování listů (ihned po oddělení), následně čtyřikrát každý sudý den (2., 4., 6., a 8. den po oddělení; dále uváděno jako d.p.o.) a nakonec ještě 12. den po oddělení.

5 VÝSLEDKY

5.1 Experiment 1

5.1.1 Obsah TBARS naměřený v Exp.1

U listů zamražených ihned po oddělení, tedy listy kontrolní (ctrl), byly naměřeny hodnoty TBARS v rozmezí od 166 – 256 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výraznější rozdíly v hladině TBARS byly zaznamenány v souvislosti se senescencí v různých podmínkách, jak uvádím dále.

U šest dní oddělených listů WT je vidět jasný nárůst obsahu TBARS jak ve tmě, tak i na světle, v porovnání s kontrolními listy, zamraženými ihned po oddělení. Exogenně podaný *meta*-topolin o koncentraci 10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (dále již koncentraci nebudu uvádět) způsobil ve tmě výrazné snížení hladiny TBARS, a to jak v porovnání s oddělenými listy ponechanými ve tmě, tak i s kontrolními rostlinami. Naopak, vliv stejné koncentrace *mT* na oddělené listy kultivované na světle byl opačný – peroxidace lipidů u těchto listů vzrostla.

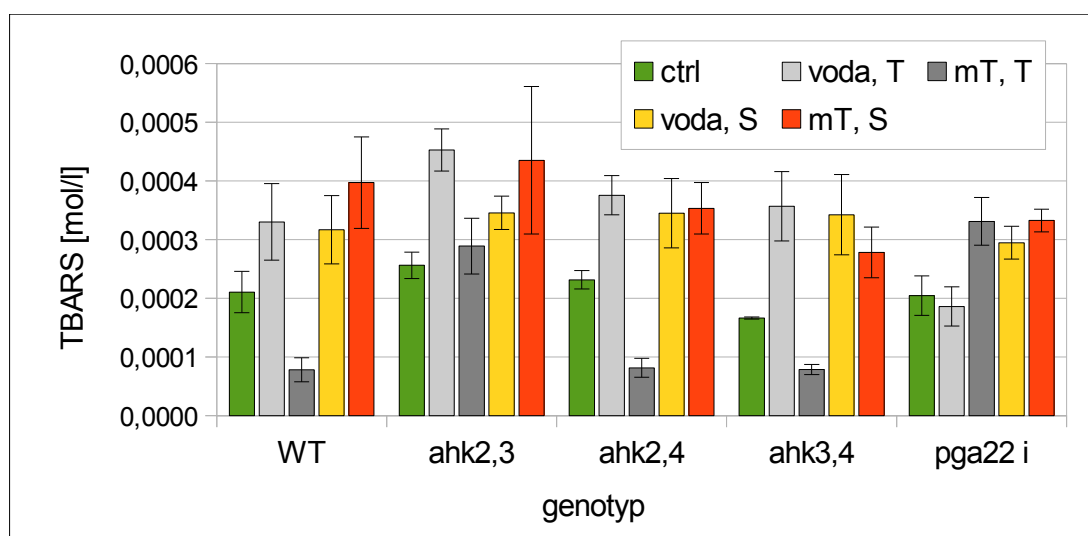
Listy některých variant mutantních rostlin genotypu *ahk2ahk3*, konkrétně ty, jež byly kultivovány ve tmě bez *mT* a na světle s *mT*, vykazovaly nejvyšší hodnoty TBARS. Byly-li listy ve tmě kultivovány s cytokininem, došlo u nich k menšímu nárůstu koncentrace TBARS, ve srovnání s těmi bez exogenního *mT*, zatímco na světle naopak exogenní *mT* nárůst hladiny TBARS urychlila.

U listů mutantu *ahk2ahk4* byly zaznamenány podobné hladiny TBARS, jako u WT, a to ve všech podmínkách, jen u listů na světle *mT* nevyvolal nárůst obsahu TBARS ve srovnání s listy bez exogenní aplikace cytokininu.

Na oddělené listy mutantu *ahk3ahk4* měla kultivace při zatemnění, při zatemnění s exogenním vlivem cytokininu i kultivace na světle bez exogenního cytokininu, podobný vliv jako na oddělené listy WT nebo mutantu *ahk2ahk4*. Mírný rozdíl nastal na světle u listů v roztoku *meta*-topolinu, který vyvolal mírné snížení TBARS oproti variantě na světle bez vlivu exogenního cytokininu, zatímco u WT i *ahk2ahk4* byl pozorován spíše nárůst.

Největší odlišnosti byly zaznamenány u mutantu *pga22*, u nějž byla před oddělením listů indukována biosyntéza endogenních cytokininů estradiolem. Listy *pga22* kultivované 6 dní ve tmě měly srovnatelnou hladinu TBARS s nesenescenčními listy kontroly. Při kultivaci ve tmě v roztoku cytokininu však byl zaznamenán téměř dvojnásobný nárůst obsahu TBARS. Na světle aplikace *mT* zvýšila obsah TBARS pouze mírně.

Graf č. 1: Peroxidace lipidů u oddělených listů *Arabidopsis* měřena 6. den po oddělení metodou TBARS



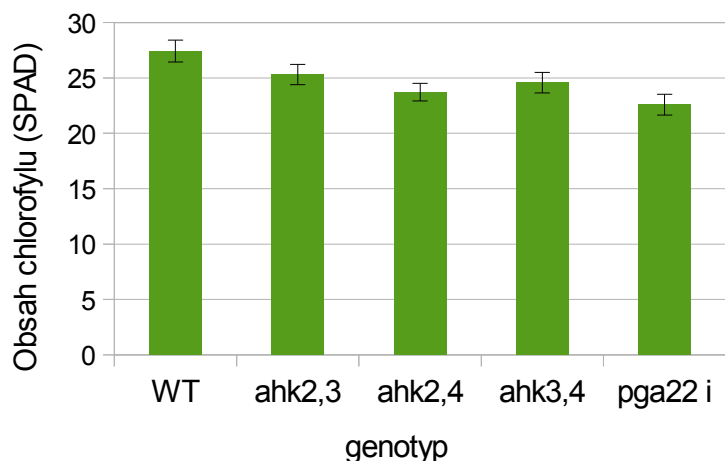
Peroxidace lipidů stanovena metodou TBAR na oddělených listech rostlin wild-type („WT“), *ahk2ahk3* („ahk2,3“), *ahk2ahk4* („ahk2,4“), *ahk3ahk4* („ahk3,4“) a *pga22* indukovaných 17- β -estradiolem („pga22 i“), kultivovaných po dobu 6 dní po oddělení ve vodě nebo v roztoku *meta*-topolinu o konc. 10^{-4} mol·l⁻¹ („mT“). Vzorby byly buď kultivovány na světle o pěstební intenzitě 170 μ mol·m⁻²·s⁻¹ („S“) nebo ve tmě („T“). Vzorby kontrolních listů („ctrl“) byly po oddělení ihned zamraženy a do doby měření byly uchovány při – 80°C. Hodnoty v grafu představují průměry (n = 3) \pm SE.

5.1.2 Fotosyntetické parametry naměřené v Exp.1

U listů kultivovaných během Exp. 1 byly také změřeny fotosyntetické parametry. Jedním z nich byl relativní obsah chlorofylu (NDVI). Ačkoliv se mnohé z rozdílů mezi naměřenými hodnotami liší již od prvního pohledu pouze nevýznamně, lze z hodnot vyčíst zásadní vliv *meta*-topolinu během senescence ve tmě. Bez vlivu *mT* totiž došlo ve tmě k dramatickému snížení obsahu chlorofylu, ve srovnání s listy kultivovanými ve vodě na pěstební intenzitě světla, zatímco při aplikaci zmíněného cytokininu byl pokles hladiny chlorofylu mnohem méně výrazný. Ve srovnání s těmito výsledky došlo ke zcela opačnému efektu u estradiolem indukovaných listů *pga22*, kultivovaných ve tmě. Zatímco byla u listů tohoto genotypu změřena ve tmě hladina chlorofylu srovnatelná s kultivací ve vodě při osvětlení, k dramatickému poklesu došlo právě u vzorků s exogenní aplikací *mT*.

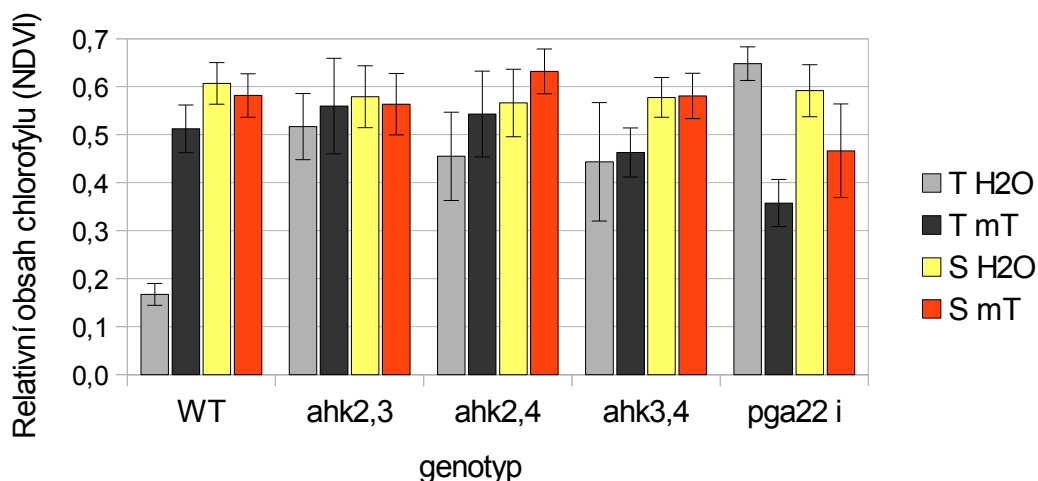
Za zmínění stojí ještě povšimnutelně nižší hladiny chlorofylu u zatemněných variant vzorků *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4*. Další jednoznačně významné změny relativního obsahu chlorofylu však pozorovány nebyly.

Graf č.2: Obsah chlorofylu (SPAD) měřen u kontrolních vzorků oddělených listů *Arabidopsis*



Obsah chlorofylu (SPAD), stanovený pomocí přístroje SPAD-502, u kontrolních vzorků (ihned po oddělení listů) různých genotypů: wild-type („WT“), *ahk2ahk3* („ahk2,3“), *ahk2ahk4* („ahk2,4“), *ahk3ahk4* („ahk3,4“) a *pga22* indukovaných 17- β -estradiolem („pga22 i“). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 10$) \pm SE.

Graf č.3: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu (NDVI) u listů *Arabidopsis* 6. den po oddělení



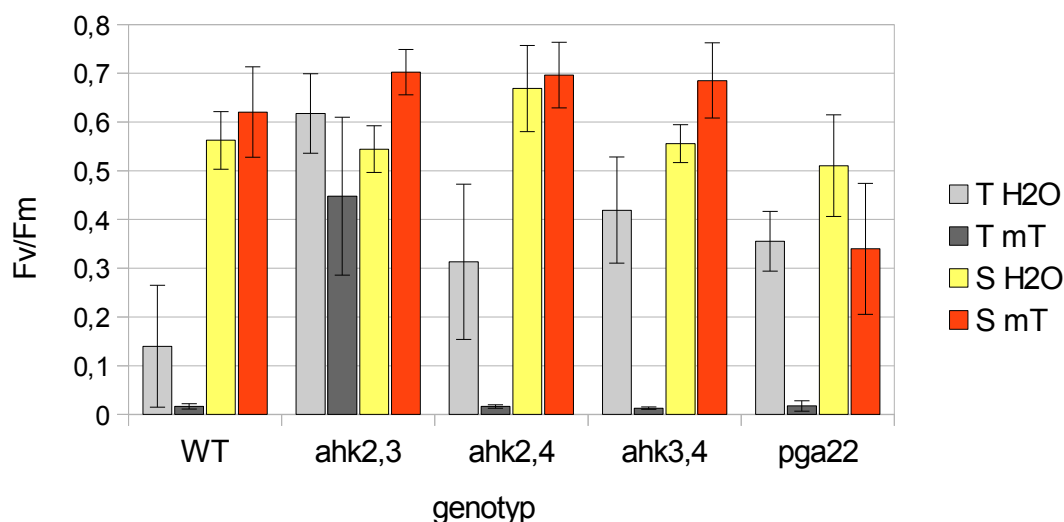
Relativní obsah chlorofylu (NDVI), stanovený pomocí přístroje PlantPen, u listů rostlin wild-type („WT“), *ahk2ahk3* („ahk2,3“), *ahk2ahk4* („ahk2,4“), *ahk3ahk4* („ahk3,4“) a u listů rostlin *pga22*, indukovaných 17- β -estradiolem („pga22 i“), kultivovaných 6 dní po oddělení v kombinaci různých podmínek: ve vodě nebo v roztoku *meta*-topolinu o konc. 10^{-4} mol \cdot l $^{-1}$ („mT“), a na světle o pěstební intenzitě 170 μ mol \cdot m $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$ („S“) nebo ve tmě („T“). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 10$) \pm SE.

V rámci Experimentu 1 byl také měřen parametr F_v/F_m , udávající maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII. U oddělených listů WT, které byly ponechány na pěstebním světelném režimu, byla vlivem mT hodnota F_v/F_m spíše vyšší, než-li z varianty bez aplikace cytokininu. Opačný efekt byl zaznamenán u zatemněných WT vzorků. Oddělené listy ve tmě bez aplikace cytokininu měly sice oproti těm, které byly na světle, výrazně nižší F_v/F_m , avšak při kultivaci s roztokem mT , došlo ještě ke zdatelně výraznějšímu poklesu F_v/F_m .

V naměřených hodnotách lze také všeobecně vidět, že nejen u WT, ale také u variant dvojitéch mutantů *ahk-* byly zjištěny vyšší hodnoty F_v/F_m u vzorků na světelném režimu s exogenním mT , než-li u na světle bez podání cytokininu. U listů *pga22* byla naopak hodnota F_v/F_m vyšší na světle bez aplikace mT , než-li na světle v roztoku s tímto cytokininem. Po aplikaci cytokininu byla u tohoto genotypu hodnota F_v/F_m na světle srovnatelná s hodnotu u zatemněných vzorků téže varianty bez exogenní aplikace cytokininu.

Při kultivaci ve tmě byly z jistého pohledu výsledky u všech genotypových variant podobné těm, jež byly naměřeny u WT – u všech genotypů došlo aplikací mT ve tmě k významnému snížení hodnoty F_v/F_m , ve srovnání se vzorky bez aplikace mT . Nutno však poukázat na genotyp *ahk2ahk3*, u něž nebyly ve tmě tak výrazně snížené hodnoty F_v/F_m (ve srovnání se vzorky téhož genotypu na světelném režimu), jako u vzorků ostatních dvou *ahk-* dvojitéch mutantů nebo u WT.

Graf č.4: Hodnoty F_v/F_m měřeny pomocí PEA u listů *Arabidopsis* 6. den po oddělení



Maximálního kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) stanovený přístrojem PEA u vzorků listů rostlin wild-type („WT“), *ahk2ahk3* („ahk2,3“), *ahk2ahk4* („ahk2,4“), *ahk3ahk4* („ahk3,4“) a rostlin *pga22* indukovaných 17- β -estradiolem („*pga22* i“), kultivovaných 6. dní po oddělení různých kultivačních podmínkách: ve vodě nebo roztoku

meta-topolinu o konc. $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ („mT“), a na světle o pěstební intenzitě $170 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ („S“) nebo ve tmě („T“). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 10$) \pm SE.

5.2 Experiment 2

Experiment 2 byl do jisté míry opakováním Exp.1, zároveň však byl rozšířen o další podmínky kultivace oddělených listů. Zásadní odlišností je také použití nové metodiky stanovení oxidativního poškození, která detekuje MDA přesněji, než metoda TBARS.

5.2.1 Výsledky genotypů WT a mutantu *pga22*

5.2.1.1 Senescence listů *pga22* kultivovaných ve tmě

5.2.1.1.1 Obsah malondialdehydu u listů *pga22* kultivovaných ve tmě

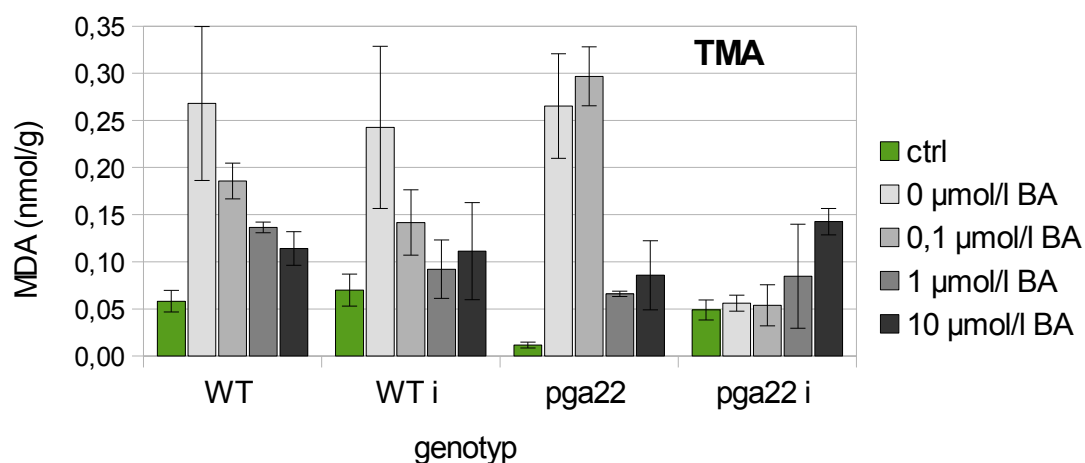
Srovnám-li výsledky hodnot MDA u kontrolních listů (ctrl; byly zamrazeny těsně po oddělení listů) indukovaných a neindukovaných variant WT a *pga22* genotypu, je patrné, že rozdíly mezi vzorky jednotlivých variant nejsou velmi výrazné, s výjimkou listů neindukovaných *pga22*, které měly několikanásobně nižší hladinu MDA oproti ostatním kontrolám. Navíc tato zjištěná koncentrace MDA byla zároveň nejnižší mezi všemi naměřenými hodnotami MDA v průběhu celého Exp.2.

Po šesti dnech senescence, došlo u listů varianty WT, ponechaných v DMSO, k několikanásobnému nárůstu MDA ve srovnání se stavem těsně po oddělení. Exogenní aplikace BA tento nárůst snížila, přičemž vyšší koncentrace BA měla na potlačení nárůstu větší účinek. U wild-type listů, na něž byl nasprejován estradiol, byl zaznamenán velmi podobný trend, tedy nárůst MDA se senescencí a výrazně klesající hladina MDA korelující s rostoucí koncentrací exogenního cytokininu.

Do jisté míry podobný trend se také uplatnil u senescentních listů neindukované varianty *pga22*. Pouze nejnižší použitá koncentrace BA ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) neměla na obsah MDA výrazný vliv. Měření MDA u listů rostlin *pga22*, na něž byl před oddělením estradiol aplikován, však přineslo odlišné výsledky. Naměřené hodnoty obsahu MDA u listů kultivovaných v DMSO byly srovnatelné s kontrolní variantou. A exogenně podaný BA měl všeobecně opačný vliv na koncentraci MDA, než-li u neindukované varianty *pga22* a obou variant WT. Nejnižší koncentrace BA ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) sice ještě neměla žádný významný vliv na změnu hladiny MDA během senescence listů, avšak vyšší koncentrace zvýraznily nárůst MDA o asi 70% při podání

BA o konc. $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, a až téměř na trojnásobek u nejvyšší konc. MDA ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), vše v porovnání s hodnotami změřenými u kontrolních listů.

Graf č.5 : Vliv různých koncentrací BA na obsah MDA v oddělených listech *Arabidopsis* (WT a *pga22*, a jejich estradiolem ovlivněných variantách), kultivovaných 6 dnů ve tmě



Obsah malondialdehydu (MDA) v listech rostlin genotypů: wild-type („WT“), *pga22* a jejich 17- β -estradiolem indukovaných variant („WT i“ a „*pga22* i“), jež byly buď zamrazeny (-80°C) ihned po oddělení („ctrl“) nebo byly kultivovány 6 dní po oddělení ve tmě v roztocích DMSO, obsahujících různé koncentrace BA (0, 0,1, 1 anebo $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 3 - 4$) \pm SE.

5.2.1.1.2 Fotosyntetické parametry u listů *pga22* kultivovaných ve tmě

Byly-li oddělené listy WT kultivovány ve tmě, klesal u nich relativní obsah chlorofylu nejvýrazněji, pokud byly ponechány v roztoku DMSO. Aplikací jakékoliv koncentrace cytokininu se tento úbytek chlorofylu zpomalil, přičemž bylo zřejmé, že vyšší koncentrace mají na zpomalení úbytku chlorofylu výraznější vliv (viz Přílohu 1).

Srovnáním listů WT rostlin – těch na něž byl aplikován estradiol, a těch bez jeho aplikace, se ukázalo, že vlivem estradiolu nedošlo ve tmě k významnému snížení relativního obsahu chlorofylu u intaktních rostlin. Nicméně u oddělených listů WT, na něž byl estradiol aplikován (a které byly zároveň kultivovány bez cytokininu), byl pozorován rychlejší úbytek chlorofylu než-li u estradiolem neovlivněných WT listů (viz Přílohy 1 a 2). Aplikace cytokininů úbytek chlorofylu zpomalila u obou variant WT, a to ve všech použitých koncentracích. Zejména 6.d.p.o. byl relativní obsah chlorofylu mnohonásobně vyšší u všech variant WT ovlivněných estradiolem a exogenním cytokininem zároveň, ve srovnání s estradiolem indukovanými WT listy

kultivovanými v DMSO (viz Přílohu 1 a 2). Nejvýrazněji byl úbytek chlorofylu zpomalen u indukovaných listů kultivovaných v roztoku s 10^{-7} mol·l⁻¹ BA. Mezi estradiolem ovlivněnými a neovlivněnými WT listy byl pozorován rozdíl týkající se efektu koncentrace cytokininu. Estradiolem neovlivněné WT listy měly při obou vyšších (10^{-6} a 10^{-5} mol·l⁻¹) koncentracích BA nejméně sníženou hladinu chlorofylu ve srovnání se vzorky v nejnižší koncentraci BA (viz Přílohu 1). Oproti tomu, u WT listů s aplikací estradiolu měla na zpomalení úbytku chlorofylu nejvýraznější účinek právě nejnižší koncentrace BA (10^{-7} mol·l⁻¹) (viz Přílohu 2).

Co se týká parametru F_v/F_m , i jeho hodnoty klesaly u listů WT po oddělení velmi výrazně. Šestý d.p.o. však aplikace 10^{-7} mol·l⁻¹ BA u vzorků bez vlivu estradiolu tento pokles výrazně zpomalila. Nejvyšší koncentrace (10^{-5} mol·l⁻¹) BA naopak pokles F_v/F_m zrychlovala. Co se týká srovnání estradiolem ovlivněných a neovlivněných WT, u listů bez aplikace estradiolu byla v době oddělení listů naměřena sice o málo nižší, leč zřejmě významně menší hodnota F_v/F_m , než-li u vzorků bez aplikace estradiolu. Tento rozdíl se zvýrazňoval s dobou plynoucí od oddělení listů. U estradiolem ovlivněných vzorků byl také zjištěn výraznější vliv na účinek BA – u estradiolem ovlivněných vzorků s aplikací kterékoli koncentrace BA byla naměřena výrazně menší F_v/F_m ve srovnání se vzorky bez aplikace estradiolu (a také ve srovnání se vzorky téže varianty kultivované v DMSO) a také ve srovnání u vzorků na něž byl aplikován estradiol (viz Přílohy 8 a 9).

Co se týká rostlin genotypu *pga22*, měly všechny varianty, kromě těch, jež byly kultivovány v roztoku s 10^{-7} mol·l⁻¹ BA, vyšší relativní obsah chlorofylu ve srovnání s odpovídajícími variantami WT (viz Přílohu 3). Vezmeme-li v potaz rozdíly či podobnosti mezi indukovanými a neindukovanými *pga22*, pak je možné vidět, že pokles relativního obsahu chlorofylu byl u vzorků estradiolem ovlivněných i neovlivněných *pga22* podobný (viz Přílohy 3 a 4). Přestože docházelo k výkyvům, obecně se dá říci, že dynamika poklesu byla u obou variant srovnatelná. Jediný patný rozdíl mezi oběma variantami lze spatřit u vzorků kultivovaných v nejnižší koncentraci cytokininu (10^{-7} mol·l⁻¹), která u neindukované varianty spíše zpomalovala pokles relativního obsahu chlorofylu (viz Přílohu 3 a 4).

Co se týká změn v hodnotách F_v/F_m , klesaly u indukovaných *pga22* listů, kultivovaných v DMSO, sice o málo, ale přesto významně rychleji, než-li u neindukovaných listů tohoto mutanta. Naopak, obecně aplikace cytokininů vedla ke zpomalení poklesu obsahu chlorofylu u indukovaných variant *pga22*, ve srovnání se vzorky neindukovanými *pga22*. Čím vyšší byla však použita koncentrace BA, tím rychlejší byl úbytek chlorofylu, a to u obou variant *pga22* (viz Přílohy 10 a 11)..

5.2.1.2 Senescence listů *pga22* kultivovaných na pěstebním světle

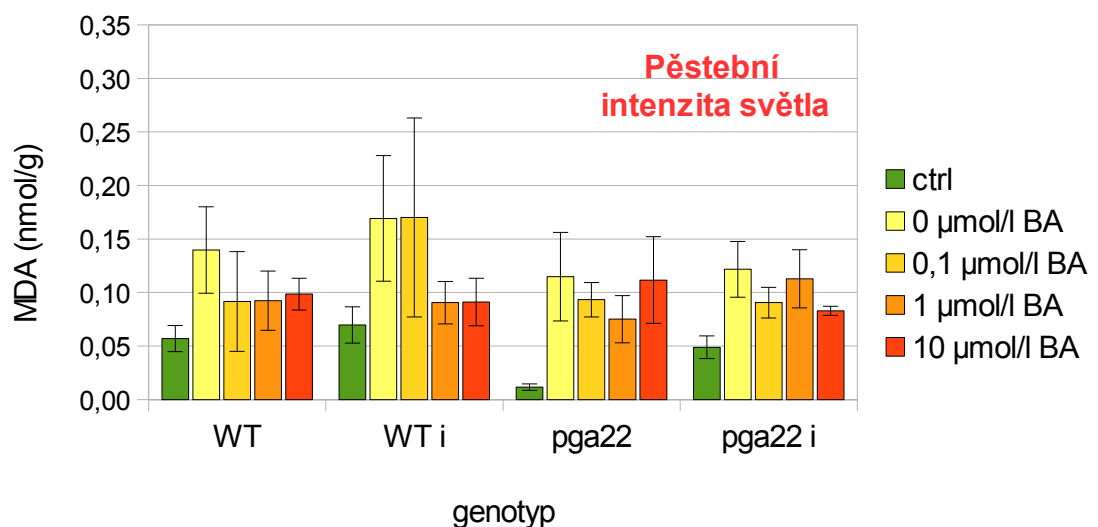
5.2.1.2.1 Obsah malondialdehydu u listů *pga22* na pěstebním světle

Obsah MDA se u oddělených listů WT, kultivovaných po šest dní na pěstebním světle zvýšil asi 2,5 krát ve srovnání se stavem těsně po oddělení listů a přibližně polovičně ve srovnání se stavem po šesti dnech senescence ve tmě. Tento nárůst byl méně výrazný u listů, kultivovaných při použití BA o různých koncentracích. Nicméně v rámci srovnání různých použitých koncentrací BA nebyly pozorovány významné rozdíly v hladinách MDA.

Podobné hodnoty byly naměřeny u vzorků z WT rostlin, na něž byl aplikován estradiol.

U vzorků *pga22* bez exogenně přidaného cytokininu nastal 6. d.p.o. výrazný, mnohonásobný nárůst koncentrace MDA, až na hladinu srovnatelnou se vzorky WT s podobným treatmentem. U listů kultivovaných v roztocích BA o koncentracích 10^{-7} mol·l⁻¹ a 10^{-6} mol·l⁻¹ došlo oproti kontrole k nárůstu koncentrace MDA sice také, avšak mírněji, než u listů kultivovaných v DMSO. Avšak použitím 10^{-5} mol·l⁻¹ BA došlo k nárůstu koncentrace MDA téměř totožně se vzorky v DMSO.

Graf č.6: Vliv různých koncentrací BA na obsah MDA v oddělených listech *Arabidopsis* (genotypech WT a *pga22*, a jejich estradiolem indukovaných variantách), kultivovaných 6 dnů na pěstební intenzitě světla



Obsah malondialdehydu (MDA) v listech rostlin genotypů: wild-type („WT“), *pga22* a jejich 17-β-estradiolem indukovaných variant („WT i“ a „*pga22* i“), jež byly buď zamrazeny (-80°C) ihned po oddělení („ctrl“) nebo byly kultivovány 6 dní po oddělení

na pěstební intenzitě světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) v roztocích DMSO, obsahujících různé koncentrace BA (0, $0,1$, 1 anebo $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 3 - 4$) \pm SE.

Budeme-li posuzovat hodnoty MDA u listů rostlin *pga22*, které prošly estradiolovou indukci, je vidět, že nárůst hladiny MDA u vzorků kultivovaných v DMSO je sice v absolutní hodnotě srovnatelný s neindukovanými listy kultivovanými ve stejných podmínkách, vztáhne-li se však nárůst MDA u indukovaných *pga22* k vlastní kontrole je rozdíl relativně menší. Při aplikaci cytokininů se u senescentních listů indukovaných *pga22* nárůst MDA, ve srovnání s DMSO, buď zmírnil (viz konc. BA 10^{-7} a $10^{-5} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

5.2.1.2.2 Fotosyntetické parametry u listů *pga22* na pěstebním světle

Všeobecně řečeno, u všech variant WT i *pga22*, kultivovaných na pěstební intenzitě došlo během senescence k signifikantně menšímu úbytku chlorofylu (viz Přílohy 1 - 4) a k signifikantně menšímu poklesu F_v/F_m , oproti kultivaci ve tmě (viz Přílohy 8 – 11).

Konkrétněji, absolutní hodnoty obsahu chlorofylu byly u senescentních vzorků WT na pěstební intenzitě vyšší než-li ve tmě, přičemž nejvýraznějšího rozdílu bylo pozorováno mezi variantami kultivovanými v DMSO – listy na nízkém světle v DMSO měly přibližně srovnatelnou koncentraci s těmi, které byly pod vlivem exogenního BA, na rozdíl od listů v DMSO ve tmě, u nichž byl pokles obsahu chlorofylu dynamičtější (viz Přílohu 1).

U listů WT varianty ovlivněných estradiolem klesal během senescence relativní obsah chlorofylu významně mírněji, než-li u WT bez vlivu estradiolu. Srovnáním vzorků v různých koncentracích BA, však není patrný výrazný rozdíl (viz Přílohu 2).

Zajímavé výsledky je však možné vidět při porovnání hodnot F_v/F_m u indukovaných a neindukovaných *pga22* rostlin. Zatímco u *pga22*, kultivovaných v roztocích DMSO a $10^{-7} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BA, se během senescence postupně snižovaly hodnoty F_v/F_m , při použití vyšších konc. BA ($10^{-6} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10^{-5} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) došlo ke snížení hodnot F_v/F_m jen velmi mírně a to dokonce i u listů měřených 12.d.p.o. (viz Přílohy 10 a 11).

5.2.1.3 Senescence listů *pga22* kultivovaných na vysoké intenzitě světla

5.2.1.3.1 Obsah malondialdehydu u listů *pga22* na světle o vysoké intenzitě

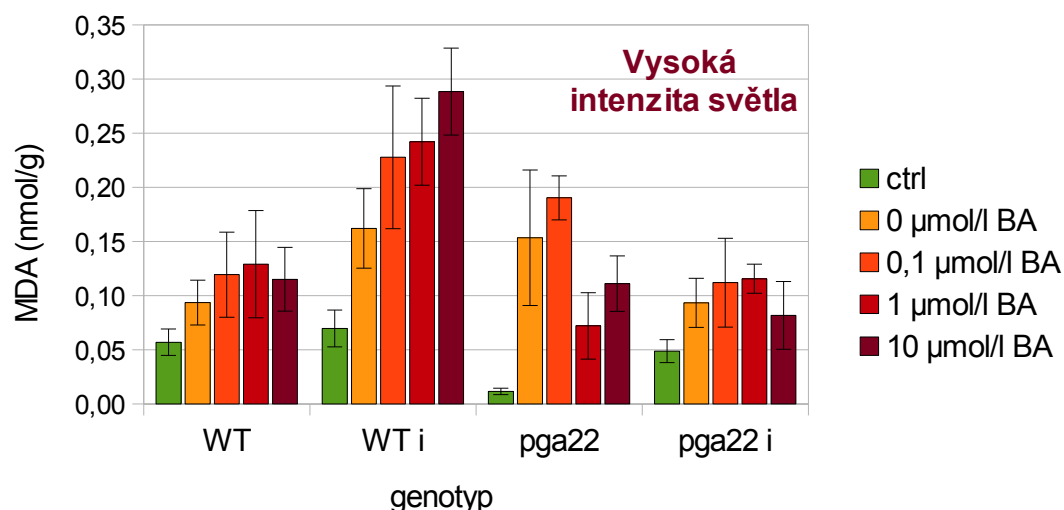
U oddělených listů WT bez vlivu cytokininů a estradiolu došlo při kultivaci na vysoké intenzitě světla k menšímu nárůstu obsahu MDA ve srovnání se vzorky kultivovanými na pěstební intenzitě světla. Při kultivaci estradiolem ovlivněných vzorků WT na vysoké intenzitě osvětlení

byl však 6.d.p.o nárůst obsahu MDA srovnatelný s výsledy vzorků na pěstební intenzitě. U obou variant (estradiolem ovlivněné i neovlivněné listy WT) naměřené hodnoty MDA narůstaly s rostoucí koncentrací cytokininu v kultivačním roztoku, přičemž se dá všeobecně říci, že u všech kultivačních roztoků byl nárůst hladiny MDA mnohem výraznější u estradiolem ovlivněné varianty WT, než-li u estradiolem neovlivněných vzorků.

Senescentní listy genotypu *pga22*, bez vlivu exogenního cytokininu a estradiolu, měly oproti kontrole mnohonásobně vyšší koncentraci MDA. Podobně vysoká byla hladina MDA i u vzorků neindukovaných *pga22* kultivovaných v roztoku 10^{-7} mol·l⁻¹ BA. Při použití vyšší koncentrací cytokininu u neindukovaných vzorků však došlo k mírnějšímu nárůstu MDA ve srovnání s menší koncentrací BA nebo s DMSO.

Indukovaná varianta *pga22*, respektive její senescentní listy v DMSO, se vyznačovaly taktéž nárůstem koncentrace MDA ve srovnání s kontrolou. Nicméně tento nárůst nebyl tak výrazný, jako vzorků neindukované varianty stejného genotypu. Použitím cytokininu v kultivačním roztoku nedošlo k významným změnám nárůstu, oproti DMSO.

Graf č.7: Vliv různých koncentrací BA na obsah MDA v oddělených listech *Arabidopsis* (genotypech WT a *pga22*, a jejich estradiolem indukovaných variantách), kultivovaných 6 dnů na světle o vysoké intenzitě



Obsah malondialdehydu (MDA) v listech rostlin genotypů: wild-type („WT“), *pga22* a jejich 17-β-estradiolem indukovaných variant („WT i“ a „*pga22* i“), jež byly buď zamrazeny (– 80°C) ihned po oddělení („ctrl“) nebo byly kultivovány 6 dní po oddělení na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) v roztocích DMSO, obsahujících různé koncentrace BA (0, 0,1, 1 a nebo $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 3 - 4$) ± SE.

5.2.1.3.2 Fotosyntetické parametry u listů *pga22* na světle o vysoké intenzitě

Co se týká poklesu relativního obsahu chlorofylu u listů WT v roztoku DMSO, je zřejmé, že obsah chlorofylu klesal u vzorků kultivovaných při vysoké intenzitě osvětlení výrazně pomaleji, než ve tmě, a zároveň rychleji, než při kultivaci na pěstební intenzitě světla. Naopak rychlejší snižování obsahu chlorofylu ve srovnání jak s jinými variantami použitých kultivačních roztoků na témže světle, tak se srovnání s jinými světelnými podmínkami, bylo zaznamenáno u senescentních listů WT, kultivovaných v roztoku 10^{-7} mol·l⁻¹ BA na vysoké intenzitě světla. (viz Přílohu 1). Vyšší koncentrace cytokininu (10^{-6} a 10^{-5} mol·l⁻¹) pokles obsahu chlorofylu oproti DMSO sice také urychlily, nicméně méně výrazně, než nejnižší koncentrace cytokininu (viz Přílohu 1). Podobný trend nejpomalejšího poklesu obsahu chlorofylu u vzorků v DMSO a zvyšujícího se úbytku chlorofylu při vyšších koncentracích cytokininu v roztoku, se ukázal také u listů WT s aplikací estradiolu (viz Přílohu 2). Avšak o dynamice změn u varianty s nejnižší koncentrací cytokininu a vlivem estradiolu, se nelze spolehlivě vyjádřit, kvůli vysoké směrodatné odchylce.

K úbytku chlorofylu u neindukovaných listů rostlin *pga22* lze všeobecně říci, že byl při kultivaci na vysoké intenzitě světla rychlejší, než u ostatních světelných podmínek, a to u všech variant kultivačních roztoků (viz Přílohu 3). Při srovnání v rámci jednotlivých variant lze pozorovat trend výraznějšího poklesu relativního obsahu chlorofylu při použití BA, přičemž s rostoucí koncentrací cytokininu byl pokles rychlejší. U listů indukovaných rostlin tohoto genotypu byly zaznamenány podobné trendy poklesu obsahu chlorofylu, jako u neindukovaných rostlin *pga22*. A také, podobně jako u neindukovaných vzorků, docházelo do 6.d.p.o. k urychlení poklesu obsahu chlorofylu při aplikaci BA o všech koncentracích (viz Přílohu 4). Ve všeobecnosti lze říci, že na vysoké intenzitě světla klesal u listů WT i *pga22* obsah chlorofylu výrazněji, byly-li kultivovány v roztoku s cytokininem (viz Přílohy 1 a 3).

Co se týká měření maximálního kvantového výtěžku fotosystému II u WT a *pga22*, kultivovaných na vysoké intenzitě světla, existuje ohledně výsledků těchto měření obava, že by mohly být ovlivněny systematickou chybou při zpracování (viz Přílohy 8 a 10).

Co se týká *pga22*, u všech vzorků listů neindukovaných rostlin byla dynamika a míra poklesu hodnot F_v/F_m postupná, jako u WT vzorků v DMSO. U těch *pga22*, které však byly naindukovány estradiolem byl pokles velmi výrazně zpomalen, bez ohledu na roztok použitý při kultivaci. U těchto vzorků byly tedy výsledky poklesu F_v/F_m velmi podobné výsledkům u indukovaných WT (viz Přílohy 8, 10 a 11).

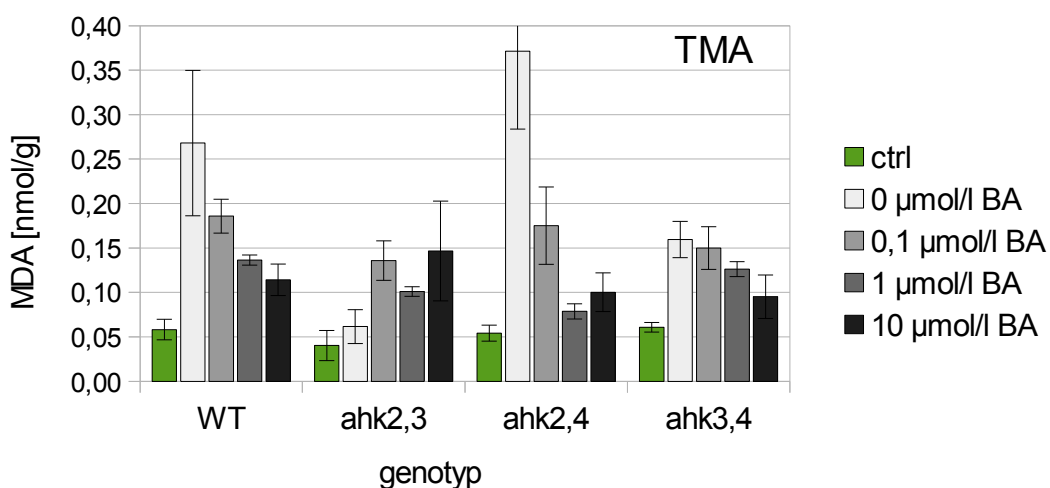
5.2.2 Srovnání dvojitých *ahk*- mutantů s wild-type

5.2.2.1 Senescentní listy dvojitých *ahk*- mutantů kultivované ve tmě

5.2.2.1.1 Obsah MDA u listů dvojitých *ahk*- mutantů kultivovaných ve tmě

Změřením obsahu MDA u kontrolních listů mutantu *ahk2ahk3* se ukázalo, že ve srovnání s WT kontrolou mají menší hladinu MDA. Také senescentní listy *ahk2ahk3* bez aplikace exogenního cytokininu měly ve tmě 6.d.p.o. výrazně nižší hladinu MDA, než listy WT kultivované za stejných podmínek: zatímco u listů WT došlo k nárůstu obsahu MDA na přibližně čtyřnásobek hodnoty výchozího stavu, u *ahk2ahk3* mutantu narostl obsah MDA pouze asi o 50%, čímž se dostal přibližně na hladinu MDA naměřenou u listů WT před začátkem senescence. Co se týká vlivu exogenní aplikace cytokininu, je zřejmý jejich opačný účinek u vzorků *ahk2ahk3* ve srovnání s WT: Zatímco u vzorků WT zmírnily aplikovaný BA nárůst obsahu MDA se zřejmou korelací: vyšší koncentrace cytokininu – menší nárůst MDA, u senescentních listů *ahk2ahk3* byl výsledek působení cytokininu opačný, totiž všechny použité koncentrace BA významně zvýšily nárůst koncentrace MDA.

Graf č.8: Vliv různých koncentrací BA na obsah MDA v 6 dnů zatemněných oddělených listech dvojitých *ahk*- mutantů rostlin *Arabidopsis*



Obsah malondialdehydu (MDA) v oddělených listech rostlin wild-type („WT“), *ahk2ahk3* („ahk2,3“), *ahk2ahk4* („ahk2,4“) a *ahk3ahk4* („ahk3,4“), jež byly buď zamrazeny (– 80°C) ihned po oddělení („ctrl“) nebo byly kultivovány 6 dní po oddělení ve tmě v roztocích DMSO, obsahujících různé koncentrace BA (0, 0,1, 1 anebo 10 μmol·l⁻¹). Hodnoty v grafu představují průměry (n = 3 - 4) ± SE.

I přes to, že listy mutantu *ahk2ahk4* měly před indukcí senescence obsah MDA srovnatelný s WT, 6.d.p.o. byl u nich zaznamenán, největší nárůst obsahu MDA, ve srovnání se všemi genotypy a všemi podmínkami v Exp.2. Podobně jako u WT, všechny použité koncentrace BA výrazně zmírnily tento nárůst. Nejúčinnější byla konc. 10^{-6} M BA.

U oddělených listů mutantu *ahk3ahk4*, kultivovaných ve tmě, byl nárůst hodnoty MDA při senescenci ve srovnání s kontrolou sice vyšší, než u mutantu *ahk2ahk3*, nikoli však tak vysoký, jak genotypu *ahk2ahk4* nebo u WT. A exogenní aplikace cytokininu v kultivačním roztoku tento nárůst zmírnila, přičemž u tohoto genotypu je patrná korelace zvyšující se koncentrace aplikovaného BA a nižších nárůstů hodnot MDA.

5.2.2.1.2 Fotosyntetické parametry u listů dvojitých *ahk*- mutantů ve tmě

Porovnáním poklesu relativního obsahu chlorofylu u mutantu *ahk2ahk3* s WT se všeobecně dá říci, že úbytek chlorofylu byl u všech variant použitého kultivačního roztoku rychlejší u senescentních listů mutantu *ahk2ahk3* než u WT varianty. Dále lze ze srovnání mutantu a WT vidět, že jak u WT, tak i u mutantu cytokininu zpomalily pokles obsahu chlorofylu (viz Přílohy 1 a 5).

Co se týká parametru F_v/F_m , u listů *ahk2ahk3* mutantu klesal v porovnání s WT podobně rychle, nicméně u mutantních listů hrál exogenní vliv BA a jeho koncentrace jinou roli, než u WT. U vzorků mutantu *ahk2ahk3* byl zjištěn nejvýraznější vliv BA na zpomalení poklesu hodnot F_v/F_m při použití nejvyšší koncentrace cytokininu (10^{-5} mol·l⁻¹), tedy opačně, než u vzorků WT, kde měla nejvýraznější efekt nejnižší koncentrace BA (viz Přílohy 8 a 12).

U oddělených listů mutantu *ahk2ahk4* byl naměřen pomalejší pokles relativního obsahu chlorofylu, než-li u WT, a také, při použití kultivačního roztoku obsahujícího BA, se pokles zpomalil více, než-li u WT. Podobně jako u WT měla na zpomalení poklesu chlorofylu největší vliv koncentrace BA 10^{-6} mol·l⁻¹ (viz Přílohy 1 a 6).

Zpomalení poklesu hodnot F_v/F_m bylo u *ahk2ahk4* mutantu také pomalejší než u WT, a to výrazně. Při vyšších koncentracích cytokininu v kultivačním roztoku však byl pokles rychlejší než při kultivaci v roztoku bez cytokininu, hodnoty F_v/F_m však byly i u nejvyšší koncentrace BA vyšší, než-li u odpovídajících vzorků WT (viz Přílohy 8 a 13).

U vzorků mutantu *ahk3ahk4* se měřením obsahu chlorofylu ukázalo, že pokles hladiny chlorofylu ve srovnání s WT byl pomalejší. U listů kultivovaných při kterékoli ze tří použitých koncentrací cytokininu byl 6.d.p.o a později zaznamenán menší pokles relativního obsahu chlorofylu oproti listům kultivovaným v DMSO, přičemž u dvou vyšších koncentrací (10^{-6} a 10^{-5} mol·l⁻¹) bylo zpomalení úbytku chlorofylu výraznější (viz Přílohy 1 a 7).

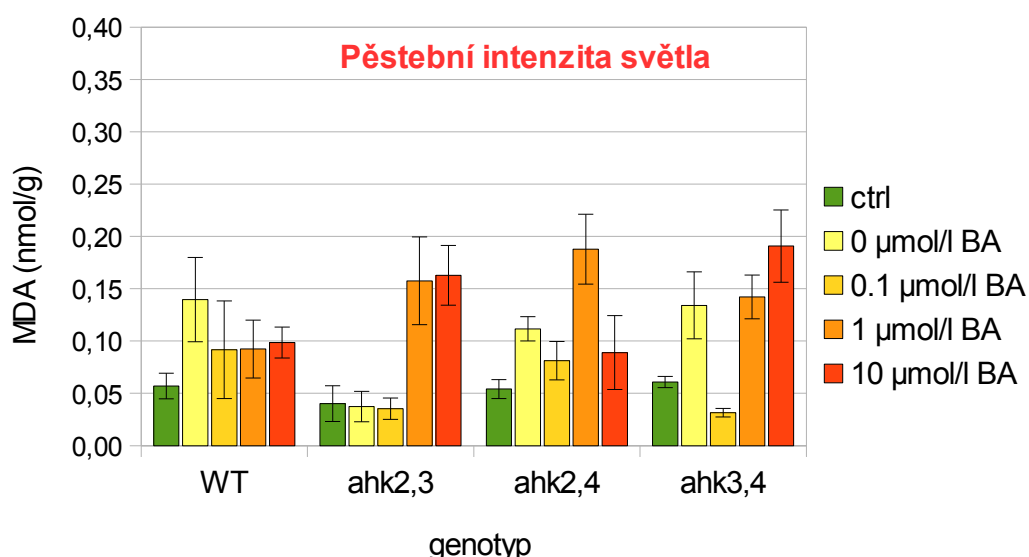
Pokles hodnot F_v/F_m byl během senescence *ahk3ahk4* listů pomalejší ve srovnání se vzorky WT, přičemž užití cytokininu v kultivačním roztoku signifikantně snížilo F_v/F_m . Nejrychlejší pokles nastal při aplikaci nejvyšší koncentrace BA. Výraznější úbytek byl zaznamenán zejména u nejvyšší koncentrace BA po vícedenním působení (6.d.p.o. a později) (viz Přílohy 8 a 14).

5.2.2.2 Senescentní listy dvojitých *ahk*- mutantů při pěstební intenzitě světla

5.2.2.2.1 Obsah MDA u listů dvojitých *ahk*- mutantů na pěstební intenzitě světla

Při ponechání oddělených listů v roztoku DMSO na pěstební intenzitě světla byl pozorován menší nárůst obsahu MDA, než u oddělených listů ve tmě, a to u všech variant *ahk*-mutantů a stejně tak i u WT. Tento menší nárůst byl u WT listů na pěstební intenzitě světla ještě více zmírněn použitím cytokininů. A podobně jako ve tmě, byl i na pěstební intenzitě světla u senescentních listů mutantu *ahk2ahk3* trend opačný vůči WT. Oddělené listy tohoto mutantu si překvapivě udržely nízký obsah MDA i 6.d.p.o., a aplikace 10^{-7} M BA na tuto nízkou hodnotu neměla vliv. Ale při aplikaci vyšších koncentrací (10^{-6} mol·l⁻¹ a 10^{-5} mol·l⁻¹) BA byl zaznamenán výrazný nárůst obsahu MDA.

Graf č.9: Vliv různých koncentrací BA na obsah MDA v oddělených listech dvojitých *ahk*-mutantů rostlin *Arabidopsis*, kultivovaných 6 dnů na pěstební intenzitě světla



Obsah malondialdehydu (MDA) v oddělených listech rostlin wild-type („WT“), *ahk2ahk3* („ahk2,3“), *ahk2ahk4* („ahk2,4“) a *ahk3ahk4* („ahk3,4“), jež byly buď zamraženy (-80°C) ihned po oddělení („ctrl“) nebo byly kultivovány 6 dní po oddělení na pěstební intenzitě světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) v roztocích DMSO, obsahujících různé koncentrace BA (0, 0,1, 1 anebo $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 3 - 4$) \pm SE.

Kontrolní listy mutantu *ahk2ahk4* obsahovaly těsně po oddělení podobnou koncentraci MDA, jako WT. A také podobně jako u WT, došlo při kultivaci v DMSO u listů mutantu po šesti dnech senescence k nárůstu hladiny MDA na přibližně dvojnásobek ve srovnání s kontrolou. Aplikace BA o koncentraci 10^{-7} mol·l⁻¹ vedla u listů mutantu k menšímu nárůstu obsahu MDA, u konc. 10^{-6} mol·l⁻¹ byl ovšem zaznamenán výrazný nárůst MDA.

U oddělených listů mutantu *ahk3ahk4*, podobně jako u mutantu *ahk2ahk4*, dokázala nárůst MDA v průběhu senescence efektivně zmírnit pouze 10^{-7} mol·l⁻¹ koncentrace BA. Nejenže u listů v tomto roztoku nebyl zaznamenán nárůst obsahu MDA, byl zaznamenán dokonce pokles na téměř polovinu obsahu MDA v kontrolních (nesenscentních) listech. Při kultivaci v roztoku o vyšší koncentraci BA (10^{-6} mol·l⁻¹) pak měly listy hladinu MDA srovnatelnou s těmi bez exogenního cytokininu v kultivačním roztoku, a nejvyšší koncentrace BA (10^{-5} mol·l⁻¹) nárůst hladiny MDA dokonce, ve srovnání s variantou v DMSO, zvýšila.

5.2.2.2 Fotosyntetické parametry u listů dvojitých *ahk*- mutantů na pěstebním světle

Podobně jako u listů senescentních WT a *ahk2ahk3*, kultivovaných na pěstební intenzitě světla, kde byla zaznamenána mírnější rychlost úbytku relativního obsahu chlorofylu ve srovnání s kultivací ve tmě, a to při použití kteréhokoli z kultivačních roztoků. Významný rozdíl mezi WT variantou a mutantem však lze vidět v celkově pomalejším úbytku relativního obsahu chlorofylu, naměřeného u listů *ahk2ahk3* na pěstebním světle, zatímco u WT byl tento pokles o něco rychlejší. Další podobnost *ahk2ahk3* senescentních listů s WT je vidět v tom, že žádná varianta kultivačního roztoku neměla prokazatelně významný vliv na rychlost úbytku chlorofylu (viz Přílohy 1 a 5).

Co se týká poklesu hodnot parametru F_v/F_m byl u listů tohoto mutantu také podobný, jako u WT, avšak pouze u listů kultivovaných v DMSO a s nejmenší koncentrací BA. Obě vyšší koncentrace signifikantně urychlily pokles F_v/F_m a to zejména 6.d.p.o. a později. Kromě toho je také zajímavé, že podobně jako ve tmě, i při pěstební intenzitě světla docházelo u *ahk2ahk3* k pomalejšímu poklesu hodnot F_v/F_m , než u WT (viz Přílohy 8 a 12).

Podobně jako u předchozího zmíněného mutantu, také u *ahk2ahk4* došlo ke zpomalení poklesu relativního obsahu chlorofylu oproti WT. Z naměřených hodnot však také vyplývá, že použití BA o nižších koncentracích úbytek chlorofylu urychluje, přičemž výraznější pokles nastal při konc. BA 10^{-6} mol·l⁻¹ než-li u 10^{-7} mol·l⁻¹ BA (viz Přílohy 1 a 6).

Hodnoty F_v/F_m u listů *ahk2ahk4* mutantu klesaly oproti WT mírně pomaleji. Lze také říci, že se hodnoty držely po celou dobu experimentu na úrovni 2.d.p.o. Aplikace exogenního cytokininu zde neměla na hodnoty F_v/F_m u *ahk2ahk4* mutantu kultivovaného při pěstební intenzitě

světla zřetelný vliv (viz Přílohy 13).

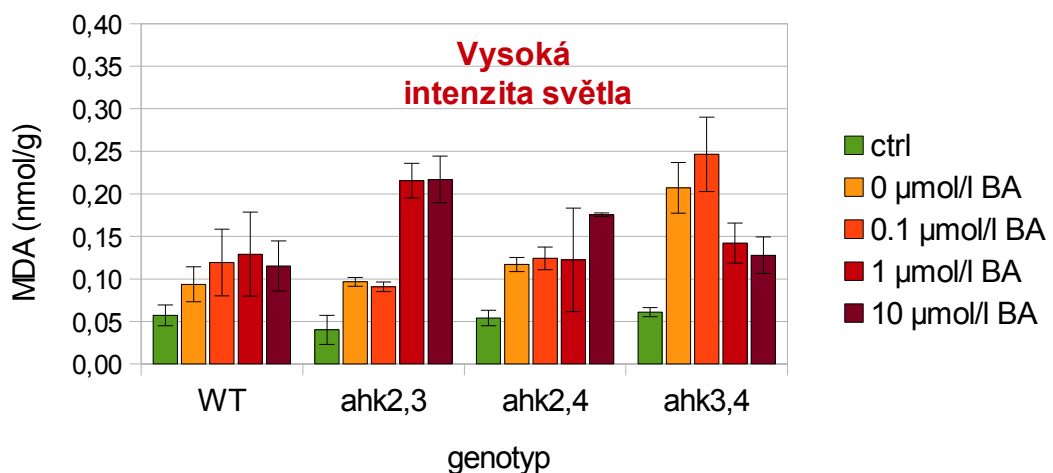
U senescentních listů *ahk3ahk4* mutantů klesal relativní obsah chlorofylu s podobnou dynamikou jako u WT. U parametru F_v/F_m nastal hned 2.d.p.o. výrazný pokles, který se poté již výrazně neměnil, až do posledního dne měření (12.d.p.o.), které ukázalo výrazný nárůst F_v/F_m , což může ukazovat na chybně provedené měření (viz Přílohy 8 a 14).

5.2.2.2.3 Obsah MDA u listů dvojitých *ahk*- mutantů na světle o vysoké intenzitě

Připomenou, že u vzorků WT kultivovaných na vysoké intenzitě světla došlo k menšímu nárůstu obsahu MDA oproti vzorkům na pěstební intenzitě, přičemž s exogenní aplikací BA o různých koncentracích byl nárůst větší.

U vzorků mutantů *ahk2ahk3* na vysoké intenzitě světla byl zaznamenán podobný trend, jako u WT ve stejných podmínkách, nicméně aplikace 10^{-7} mol·l⁻¹ BA nevedlo k nárůstu MDA oproti vzorkům v DMSO, tak jako u WT, a naopak při podání jedné ze dvou vyšších koncentrací BA (10^{-6} nebo 10^{-5} mol·l⁻¹) došlo k výraznějšímu nárůstu obsahu MDA oproti vzorkům v DMSO, než-li u WT. Po srovnání výsledků *ahk2ahk3* při kultivacích na dvou použitých světelných intenzitách lze říci, že při kultivaci na vysoké intenzitě světla se zachoval stejný trend, jako u pěstební intenzity, s vyššími hodnotami MDA při kultivaci v každém z roztoků.

Graf č.10: Vliv různých koncentrací BA na obsah MDA v oddělených listech dvojitých *ahk*-mutantů rostlin *Arabidopsis*, kultivovaných 6 dnů na vysoké intenzitě světla



Obsah malondialdehydu (MDA) v oddělených listech rostlin wild-type („WT“), *ahk2ahk3* („ahk2,3“), *ahk2ahk4* („ahk2,4“) a *ahk3ahk4* („ahk3,4“), jež byly buď zamrazeny (– 80°C) ihned po oddělení („ctrl“) nebo byly kultivovány 6 dní po oddělení na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) v roztocích DMSO, obsahujících různé koncentrace BA (0, 0,1, 1 anebo $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Hodnoty v grafu představují průměry ($n = 3 - 4$) \pm SE.

Stav obsahu MDA u vzorků *ahk2ahk4* se od předchozího zmíněného mutantu výrazně nelišil, ačkoliv při aplikaci vyšších koncentrací BA došlo k mírně menšímu nárůstu MDA, než-li u *ahk2ahk3*. Tento nárůst byl stále však výraznější, než u WT. U oddělených listů *ahk2ahk4* byl také méně patrný všeobecný nárůst hodnot MDA při kultivaci na vysoké intenzitě světla oproti pěstební intenzitě, srovnáme-li to se variantami *ahk2ahk3* vzorků.

Nárůst obsahu MDA u vzorků *ahk3ahk4* byl při kultivaci na vysoké intenzitě světla větší, než na pěstebním světle, byly-li vzorky kultivovány bez BA v roztoku anebo s nejnižší použitou koncentrací BA (10^{-7} mol·l⁻¹) - právě s použitím této koncentrace BA byl nárůst obsahu MDA markantní. Nicméně aplikace dvou vyšší koncentrací BA nedošlo oproti hodnotám při pěstební intenzitě k výrazným změnám.

5.2.2.2.4 Fotosyntetické parametry u listů dvojitých *ahk*- mutantů na světle o vysoké intenzitě

Pro srovnání uvedu znovu výsledky relativního obsahu chlorofylu u vzorků WT: oproti pěstební intenzitě světla a zjeměna oproti tmě došlo k výraznému zpomalení úbytku chlorofylu, především, jednalo-li se o vzorky kultivované v roztoku DMSO. S aplikací cytokininů se na vysoké intenzitě mírně urychlil pokles obsahu chlorofylu, což bylo patrné zejména ve srovnání se vzorky ve tmě (viz Přílohu 1).

U oddělených listů mutantu *ahk2ahk3* kultivovaných v roztoku DMSO nebyla patrná výrazná změna v rychlosti úbytku chlorofylu při kultivaci na vysoké intenzitě světla, oproti kultivaci pěstební intenzitě. Avšak téměř nepatrné zpomalení poklesu obsahu chlorofylu u vzorků kultivovaných s BA, které bylo patrné na pěstební intenzitě světla, bylo na vysoké intenzitě mnohem výraznější (viz Přílohy 1 a 5).

U vzorků *ahk2ahk4* se na vysoké intenzitě světla také zvýraznil vliv BA na relativní obsah chlorofylu – jeho pokles byl s aplikací BA mnohem výraznější na vysoké intenzitě světla než-li na pěstební (viz Přílohy 1 a 6).

Relativní obsah chlorofylu u vzorků *ahk3ahk4* mutantu klesal při kultivaci na vysoké intenzitě světla přibližně stejně rychle, jako při kultivaci na pěstební intenzitě. Při kultivaci na vysoké intenzitě nebyl u tohoto mutantu patrný jasný vliv cytokininů na obsah chlorofylu (viz Přílohy 1 a 7).

6 DISKUSE

6.1 Úvod do diskuze

Tato kapitola se bude týkat interpretace výsledků experimentů, provedených v rámci méj diplomové práce na vzorcích oddělených listů *Arabidopsis* – tedy analýzy obsahu MDA, jakožto produktu peroxidace lipidů. MDA bylo stanovováno pomocí metody TBARS a také metodou využívající DNPH reagentu a HPLC analýzy, přičemž druhá z těchto metod je považována za přesnější. U vzorků byly také analyzovány fotosyntetické parametry, přičemž část měření fotosyntetických parametrů byla provedena kolegyní Mgr. Melkovičovou. Tyto výsledky srovnám se znalostmi získanými v minulosti jinými autory.

6.2 Vliv estradiolu na listy WT rostlin

V experimentech provedených v této diplomové práci bylo využito m.j. rostlin, modifikovaných pro možnost indukce biosyntézy cytokininů pomocí 17- β -estradiolu (pro zjednodušení používám jen „estradiol“), který u mutantních rostlin *pga22* způsobuje zvýšení exprese genu *IPT*, kódujícího enzym určující rychlost biosyntézy cytokininů (Sun a kol., 2003). Jelikož je však estradiol široce považován za živočišný, resp. lidský hormon, bylo předpokládáno, že výše zmíněný záměrný indukční účinek je jediným způsobem, jakým může estradiol ovlivnit rostliny, které byly využité v této diplomové práci. Ve studii, kterou provedli Sherafatmandjour a kol. (2013) byl však u estradiolu zaznamenán protektivní vliv na některé parametry, měřené u semenáčků fenyklu (*Foeniculum vulgare*). Sedmidenní aplikace estradiolu (o konc. 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; aplikován sprejem, jednou denně,) způsobila pokles obsahu MDA a zároveň nárůst hladin chlorofylu, prolinu a sacharidů.

Výsledky měření, provedených v rámci Exp.2 méj diplomové práce potvrzují, že aplikace estradiolu má vliv na rostliny, respektive na oddělené listy rostlin *Arabidopsis*. Mezi estradiolem ovlivněnými a neovlivněnými listy WT jsem konkrétně zaznamenal odlišný obsah MDA při kultivaci v režimu s vysokou intenzitou světla, a také rozdíly v relativním obsahu chlorofylu při kultivaci ve tmě (viz Graf č.7 a přílohy), přičemž z výsledků lze soudit, že estradiol v použité koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ má na oddělené listy *Arabidopsis*, kultivované při vysoké intenzitě osvětlení (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) účinek zvyšující míru oxidativního poškození. Tato koncentrace estradiolu ovlivňuje také při kultivaci ve tmě obsah chlorofylu, a to mírným urychlením jeho úbytku u oddělených listů kultivovaných v DMSO (tedy v 0,2 % DMSO = kontrolním roztoku, jelikož použité cytokininy byly solubilizovány v 0,2% DMSO). Nutno však zdůraznit,

že v ostatních kultivačních podmínkách Experimentu 2 nebyly zjištěny žádné další významné odlišnosti mezi estradiolem ovlivněnými a neovlivněnými variantami WT listů. Proto je potřeba, pro zvýšení důvěryhodnosti tvrzení o vlivu $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ estradiolu, provést další, na to zaměřené experimenty.

Z popsaných výsledků by se dalo soudit, že jsou v protikladu k výše zmíněné studii, tedy že ukazují negativní účinek aplikace estradiolu na rostliny, respektive na oddělené listy. Nutno však dodat, že ve studii autorů Sherafatmandjour a kol. (2013) se jasně ukazuje protektivní účinek nižší koncentrace estradiolu, tedy $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, zatímco při použití $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku byly pozorovány slabší protektivní nebo nesignifikantní účinky. Z toho může vyplývat, že protektivní účinek estradiolu na obsah chlorofylu se projevuje u nižších, nanomolárních koncentrací, zatímco vyšší, mikromolární koncentrace, mají spíše negativní vliv.

Dále z výsledků plyne, že faktorem modulujícím účinek estradiolu může potenciálně být i světlo, jelikož vliv estradiolu na zvyšování obsahu MDA byl patrný jen u listů kultivovaných při vysoké intenzitě osvětlení, nikoli u těch na pěstební intenzitě či ve tmě. Navíc nelze vyloučit, že efekt estradiolu, a jeho různých koncentrací, může být u rostlin druhově specifický.

Zásadní je poznatek, že estradiol nefunguje pouze jako plánovaný induktor biosyntézy cytokininů u cílených mutantů *pga22*, ale že tento živočišný hormon ovlivňuje také fyziologické procesy u rostlin, které nebyly pro vliv estradiolu cíleně geneticky modifikovány.

6.3 Potvrzení hypotézy o prahové koncentraci působení cytokininů

V rámci této práce byla potvrzena dosud platná hypotéza o prahové koncentraci působení cytokininů na senescenci. Vyplývá to ze srovnání výsledků, naměřených jak během Exp.1, tak i Exp.2 u oddělených listů WT a mutantu *pga22*, kultivovaných ve tmě. Estradiolová indukce u mutantu *pga22* vedla k tomu, že jeho oddělené listy ani 6. d.p.o. neměly zvýšený obsah MDA, oproti vzorkům WT i neindukovaným vzorkům *pga22* - u nich byl zaznamenán výrazný nárůst (viz Graf č.5). Tyto výsledky jsou zvláště zajímavé srovnáme-li je s ostatními variantami roztokových a světelných podmínek, a s ostatními genotypy (včetně dvojitých *ahk*- mutantů). Zásadní je, že k nárůstu obsahu MDA došlo, když byly zatemněné listy *pga22* zároveň pod vlivem exogenního cytokininu (BA) a estradiolové indukce (která u *pga22* zvyšuje endogenní biosyntézu cytokininů). Navíc, nárůst obsahu MDA u těchto listů pozitivně koreloval s koncentrací aplikovaného BA. U oddělených listů WT i neindukovaných *pga22* se výsledky měření ukázaly být oproti vzorkům indukovaným *pga22* přesně opačné – s rostoucí koncentrací

BA byl zaznamenán menší nárůst MDA. S těmito výsledky jsou v souladu výsledky měření koncentrace TBARS v Exp.1 (viz Graf č.1). Celkově lze tyto výsledky interpretovat tak, že u oddělených listů WT kultivovaných ve tmě dochází díky aplikaci cytokininu ke zpomalení nárůstu peroxidace lipidů, spojeného se senescencí, přičemž použití BA mělo nejvyšší účinek v nejvyšší použité koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak u listů mutanta *pga22* samotnou estradiolovou indukci zvýšená hladina cytokininů zřejmě minimalizuje oxidativního poškození, zatímco další zvyšování hladiny cytokininů exogenní aplikací vede až k supraoptimálnímu efektu cytokininů. Tyto výsledky tedy potvrzují výše zmíněnou hypotézu, že překročením prahové koncentrace cytokininů dochází ke změně účinku cytokininů ze senescenci zpomalujícího na senescenci urychlující účinek.

6.4 Podobné účinky světla a cytokininů

Výsledky mé práce ukazují, že efekt cytokininů je ovlivňován světelnými podmínkami při kultivaci. Toto téma bylo zkoumáno již v minulosti, například cytokininy aplikované exogenně na semenáčky *Arabidopsis* iniciovaly, podobně jako světlo, rozvoj charakteristik, typických pro deetioloizované rostliny, včetně morfologických změn, vývoje plastidů a specifické exprese genů (Chory a kol., 1994). Přitom vliv má jak endogenně zvýšená hladina cytokininů (např. u mutanta *ampl*), tak i exogenní aplikace cytokininu (Nogué a kol., 2000; Chory a kol., 1994; Chin-Atkins a kol., 1996).

V souladu s výsledky výše uvedených studií jsem díky experimentální části mé práce pozoroval, že pokud je na oddělené listy WT kultivované ve tmě exogenně aplikován BA o koncentracích $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ či $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, vede to ke snížení nárůstu obsahu MDA na hodnoty srovnatelné s těmi, jež byly naměřeny u vzorků kultivovaných v roztoku DMSO při pěstební intenzitě světla (viz Graf č.5 a Graf č.6). Podobně také zatemněné listy indukovaných *pga22* kultivované v roztoku $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BA měly podobnou hodnotu obsahu MDA, jako indukované vzorky téže genotypové varianty kultivované na světle bez exogenního podání BA. **Z toho plyne, že při kultivaci ve tmě exogenní podání BA, endogenně zvýšená biosyntéza cytokininů i kultivace za normálních (pěstebních) světelných podmínek vedou u oddělených listů k podobnému ochrannému účinku proti oxidativnímu poškození, jako.** Tato zjištění však nebyla potvrzena výsledky analýzy TBARS, provedené v rámci Exp.1. U listů na něž nebyly aplikovány cytokininy a byly kultivovány ve tmě nebo na světle byla totiž zaznamenána srovnatelná míra oxidativního poškození charakterizovaného množstvím TBARS (viz Graf č.1). Tato rozdílnost by hypoteticky mohla být dána rozdílnou přesností TBARS metody ve srovnání se stanovením MDA pomocí HPLC metody. Při využití metody TBARS totiž s používaným

reagentem (TBA) mohou reagovat kromě MDA i jiné látky, jež nejsou produkty lipidové peroxidace, a to zejména proteiny, což snižuje přesnost této metody oproti využití DNPH reagentu a HPLC metodiky.

6.5 Aditivní účinek světla a cytokininů

Jestliže cytokininy a světlo jsou schopny vyvolat podobné odezvy, otevírá se otázka, zda-li působí skrze stejnou signální dráhu či nikoliv. Autoři Buschmann a Lichtenthaler (1982) zjistili, že u semenáčků ředkve (*Raphanus sativus*) má působení cytokininů a světla aditivní charakter. Výsledkem toho je, že spolupůsobením obou těchto faktorů může být překročena prahová úroveň účinků, čímž dochází k obrácení účinků spolupůsobících faktorů. Důležitým poznatkem jejich studie je fakt, že pro různé sledované procesy, ovlivňované světlem a cytokininy (prodlužování kořene, suprese růstu hypokotyly, akumulace antokyanů, expanze listů, akumulace protochlorofylidů a karotenoidů), existuje různá prahová úroveň.

V kapitole 6.3 zmíněná hypotéza o prahové koncentraci působení cytokininů, kterou potvrzují i Vlčková a kol. (2006), byla v jejich studii dána do souvislosti s účinky světla. Zjistilo se, že účinek aplikace cytokininu (*mT*) na oddělené listy pšenice (*Triticum aestivum*) může vést k utlumení projevů senescence nebo naopak k jejich prohloubení, a to v závislosti na absenci či přítomnosti světla oddalující. Zmíněnou hypotézu rovněž podporují i výsledky starších studií. Kupříkladu autoři Zacarias a Reid (1990) ve své studii vlivu hormonů na senescenci oddělených listových disků zjistili, že aplikace BA v koncentračním rozsahu $10^{-7} - 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zabraňoval odbourávání chlorofylu, byly-li disky kultivovány ve tmě. Aplikace stejných koncentrací BA při kultivaci na světle však měla opačný účinek (Vlčková a kol., 2006).

Jak ukazují experimenty provedené v rámci méj diplomové práce, aditivní vliv cytokininů a světla se projevuje také u oddělených listů *Arabidopsis*. Dobře pozorovatelné to je na hodnotách obsahu MDA naměřených v Exp.2. Spolupůsobení světla o pěstební intenzitě a exogenní aplikace cytokininu omezila nárůst obsahu MDA při senescenci WT listů více, než pouhá aplikace BA při kultivaci ve tmě (viz Grafy č.5 a 6). Překročení prahové hodnoty spolupůsobení světla a cytokininů se projevilo u vzorků mutanta *pga22*, a to při srovnání výsledků při kultivaci ve tmě a na pěstební intenzitě světla. Vzorky *pga22* bez exogenní aplikace BA totiž měly při kultivaci na pěstební intenzitě světla vyšší obsah MDA, než vzorky ve stejném roztoku kultivované ve tmě. Velmi zajímavé však je, že exogenní aplikace BA nepřispěla ke zvýraznění opačného efektu cytokininů a světla. Tomuto faktu se budu věnovat podrobněji níže (viz kap. 6.6). V souladu s těmito výsledky jsou také hodnoty relativního obsahu chlorofylu. Zatímco u WT listů kultivovaných ve tmě byl pozorován jasný protektivní vliv exogenně podaného cytokininu (*mT* nebo BA) na udržení obsahu chlorofylu, při kultivaci WT listů na světle (ať už o pěstební

nebo vysoké intenzitě) neměl exogenně podaný cytokinin na obsah chlorofylu výrazný vliv (obojí se projevilo jak v Exp.1, tak i v Exp.2) (viz Graf č.3 a příloha). Tyto i všechny výše zmíněné výsledky v souladu s již zmíněnými měřeními MDA provedenými v Exp.2, a ukazují, že u indukovaných vzorků *pga22* se aditivní vliv světla, indukci způsobené overexpresí *IPT*, a exogenní aplikace cytokininů, neprojevuje tak negativně, jak by se dalo čekat dle hypotéz o aditivním vlivu světla a cytokininů, a prahové hodnotě jejich působení.

S těmito výsledky jsou do značné míry v souladu také výsledky srovnání hodnot relativního obsahu chlorofylu u oddělených listů indukovaných a neindukovaných rostlin *pga22* (viz příloha). Jak při kultivaci ve tmě, tak na pěstební intenzitě světla se u neindukovaných rostlin projevilo 6. d.p.o. mírný protektivní vliv 10^{-7} mol·l⁻¹ BA na zpomalení úbytku chlorofylu. Tento protektivní vliv exogenního podání cytokininu se však neuplatnil u listů *pga22* rostlin indukovaných estradiolem. U nich zřejmě mohlo dojít k tomu, že spolupůsobení estradiolové indukce a exogenní aplikace BA vedlo již k takovému zvýšení obsahu cytokininů, že začalo docházet spíše k opačnému, tedy negativnímu působení cytokininů na obsah chlorofylu.

S návrhem, jak vysvětlit odlišnost působení cytokininů v podmínkách světla a tmy přišla ve své disertační práci také Husičková (2010), díky tomu, že sledovala, jak může současné působení světla (kontinuální režim s intenzitou 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a exogenně aplikovaného cytokininu (*mT*) ovlivnit senescenci oddělených listů pšenice. Na základě výsledků těchto experimentů byla navržena následující hypotéza: Zvýšená koncentrace cytokininů vede k udržení funkce fotosyntetického aparátu, a tím pomáhá oddálit senescenci. Cytokininy však také indukují enzym CWINV (Cell Wall Invertase), který je významným regulátorem charakteru pletiva a potažmo i senescence (Lara a kol., 2004). Husičková (2010) zjistila, že aplikace *mT* zvýšila aktivitu CWINV asi dvojnásobně, a ačkoliv je o CWINV užíváno spíše jako o negativním regulátoru senescence, je zřejmé, že zvýšená akumulace hexóz, kterou způsobuje, může vést naopak i k urychlení senescence skrze negativní zpětnovazebnou regulaci fotosyntézy (Husičková, 2010), což potvrzuje mikroskopicky detekovaná akumulace škrobů (Vlčková a kol., 2006).

6.6 Světlo ovlivňuje aktivitu CKX

Na rozdíl od kultivace ve tmě, byl při kultivaci oddělených listů indukovaných mutantů *pga22* vliv cytokininů, kombinovaný s vlivem světla o pěstební intenzitě buď nevýrazný nebo spíše snižující oxidativní poškození (zjišťované jako obsah MDA v Exp.2). Tento vliv se projevilo i u neindukovaných *pga22*. U vzorků WT, ať už s aplikací estradiolu nebo bez ní, měla

kombinace aplikovaného BA a pěstební intenzity světla jednoznačně pozitivní vliv – došlo k menšímu nárůstu oxidativního poškození (viz Graf č.6). Podobné výsledky ukázal také Exp. 1 (viz Graf č.1). Při vyhodnocení výsledků působení vysoké intenzity osvětlení a exogenní aplikace cytokininů lze spíše vidět, že tyto faktory mají při spolupůsobení spíše nárůst oxidativního poškození. Nicméně u vzorků kultivovaných na vysoké intenzitě světla nelze přehlédnout ani odlišnost trendů vlivu koncentrací aplikovaného BA u indukovaných a neindukovaných vzorků WT. Tento zvláštní rozdíl zůstává předmětem dohadů. Slibné však může být vyhodnocení dalšího zjištěných faktů: Navzdory mým očekáváním se obsah MDA u listů indukovaných rostlin *pga22* podobal (neindukovaným) WT vzorkům, a to při kultivaci na obou světelných režimech. Naopak ve tmě, jak již bylo zmíněno, byl rozdíl mezi hodnotami indukovaných *pga22* a WT markantní. Tyto výsledky je možné vysvětlit tím, že ve tmě dochází u rostlin *pga22* k snadné akumulaci cytokininů, jejichž nadměrná koncentrace vede k nárůstu oxidativního poškození. Při kultivaci oddělených listů na světelném režimu však k tak vysoké akumulaci cytokininů nedochází a vliv jejich hladiny si proto buď zachová protektivní účinky vůči oxidativnímu poškození anebo nedojde ke zřetelnému překročení hranice mezi protektivními a poškozujícími účinky. Proč by ale ve tmě a na světle mělo docházet k odlišné akumulaci cytokininů? **To může vysvětlit různá míra degradace cytokininů, způsobená (hypoteticky) vyšší aktivitou CKX enzymů ve vzorcích indukovaných *pga22* kultivovaných na světle, ve srovnání s těmi, co byly kultivovány ve tmě.** Pravděpodobnost této hypotézy dokládá fakt, že v minulosti již působení světla na aktivitu CKX zaznamenáno bylo: autoři Schlüter a kol. (2011) experimentovali s oddělenými segmenty ječmenných listů (*Hordeum vulgare*), přičemž tyto listy byly kultivovány buď ve tmě nebo na režimu 16 hodin den – 8 hodin noc. Zjistili, že nárůst sledované aktivity CKX byl u vzorků kultivovaných na režimu den-noc několikanásobně větší oproti vzorkům kultivovaným ve tmě. Pro ověření správnosti této hypotézy by bylo vhodné provést analýzu obsahu cytokininů u různých variant vzorků. Pro tento případ jsou již připraveny vzorky, které jsou dosud uschovány v mrazícím boxu, případná analýza obsahu cytokininů proto může být dodatečně provedena.

6.7 Podobnosti a odlišnosti vlivu světla a cytokininů na oxidativní poškození a obsah chlorofylu

Další rovinu interpretace výsledků přináší pohled na hodnoty relativního obsahu chlorofylu. Že je obsah chlorofylu v průběhu senescence zásadně regulován cytokininy, je dobře známo. Namátkou je možno zmínit příklad mutantů *det1* a *det2* se zvýšenou citlivostí

k cytokininům, u nichž byla během senescence zaznamenána až desetinásobná hladina chlorofylu, oproti WT (Chlory a kol., 1994). Výsledky této diplomové práce jsou s tím v souladu – například během Exp.2 bylo u vzorků WT kultivovaných ve tmě možné pozorovat jasný protektivní účinek exogenně aplikovaného BA (o všech použitých koncentracích). Krom toho jsme zaznamenali také změny tohoto efektu cytokininů, a to v souvislosti se světelnými podmínkami. Protektivní účinek aplikovaného cytokininu, který se projevil ve tmě již na pěstební intenzitě světla zaznamenaný nebyl, a naopak při pěstování na vysoké intenzitě světla přispěl k mírnému, avšak znatelně rychlejšímu úbytku chlorofylu. V souladu s tím jsou i výsledky naměřené během Exp.1. Fakt, že vliv cytokininů na obsah chlorofylu je propojen s vlivem světla ukazuje již zmíněné zpomalení odbourávání chlorofylu vlivem aplikace BA u senescentních listových disků *Arabidopsis thaliana*, k němuž však došlo pouze za tmy, zatímco při vystavení listových disků současně světlu a exogenní aplikaci BA, došlo k obrácení účinku – úbytek chlorofylu se zvýraznil (Zacarias a Reid, 1990).

Důležité je také porovnání vlivu cytokininů a světla na sledované parametry oxidativního poškození (resp. obsahu MDA) a retence chlorofylu. Vezmeme-li v potaz výsledky plynoucí z Exp.2, konkrétně z výsledků naměřených u vzorků WT kultivovaných za různých podmínek, uvidíme, že při kultivaci ve tmě se dodáváním vyšších množství cytokininů snižoval obsah MDA přibližně na hladinu, jaká byla u vzorků WT při kultivaci na pěstebním světle. Přidání BA u vzorků na pěstebním světle pak ještě více snížilo obsah MDA a k mírnému překlenutí hranice protektivního účinku cytokininů a světla došlo až při spolupůsobení vysoké intenzity světla a vyšších koncentrací cytokininů. Podobný trend je patrný také z výsledků měření obsahu chlorofylu, kdy dramatický úbytek chlorofylu u WT byl významně zmírněn buď vlivem exogenní aplikace BA nebo účinkem světla o pěstební intenzitě. Vyšší míra spolupůsobení obou faktorů (vysoká intenzita světla a exogenně dodaného cytokininu) se projevila mírným obrátem v účinku. **Z těchto výsledků vyplývá, že pro různé parametry, související s oddálením senescence (tedy v této práci sledovaná míra oxidativního poškození a schopnost udržení dostatečně funkčního fotosyntetického aparátu) platí podobná hranice oddělující protektivní a poškozující účinek aditivního vlivu cytokininů a světla.**

Vliv spolupůsobení světla o pěstební intenzitě a aplikace cytokininů mělo zřetelně silnější protektivní vliv proti oxidativnímu poškození, než pouhý vliv pěstebního světla anebo pouhý vliv exogenního podání BA, zatímco exogenní aplikace BA nezlepšila protektivní vliv světla o pěstební intenzitě na zpomalení úbytku chlorofylu. **Jako rozdílná se tedy ukazuje hranice, kdy nastává fáze *plató*, tedy stav, kdy další zvyšování signálu cytokininů a světla na jistou dobu nepovede ani ke zvýraznění jejich protektivního účinku, ani ke změně na senescenci urychlující účinek.**

6.8 Role AHK receptorů

Jako další díly komplexní skládačky poznání senescence rostlin a vlivu cytokininů a světla, je úloha AHK receptorů, které zprostředkovávají účinky cytokininů. Proto byl jedním z cílů této práce zjistit další fakta o funkční specifitě jednotlivých AHK receptorů. Z tohoto důvodu byly pro Exp.1 a Exp.2 vybrány také rostliny dvojitéch *ahk*- mutantů, které mají funkční pouze jeden známý AHK receptor pro percepci cytokininů.

6.8.1 Interpretace výsledků experimentů s mutantem *ahk2ahk3*

Mutant *ahk2ahk3* poskytl dle mého názoru nejzajímavější výsledky ve srovnání s ostatními *ahk*- mutanty. Po šesti dnech kultivace ve tmě měly oddělené listy tohoto mutantu sice vyšší obsah MDA, než vzorky kontrol, ale ve srovnání s WT i ostatními *ahk*- mutanty to byly stále výrazně nejnižší hodnoty naměřené u vzorků kultivovaných ve tmě v roztoku DMSO (viz Graf č.8). Tyto výsledky pravděpodobně souvisí s endogenně zvýšenou hladinou cytokininů u *ahk2ahk3* mutantů, což potvrzuje studie autorů Riefler a kol. (2006), která uvádí, že u rostlin s vyřazeným genem *AHK3* byla naměřena dvoj- až trojnásobná koncentrace všech zeatinových metabolitů. **To by mohlo znamenat, že právě AHK4, tedy jediný funkční receptor (z dosud známých) u tohoto mutantu, zprostředkovává účinek cytokininů na zbrždění oxidativního poškození v průběhu senescence nejvýrazněji ze všech tří známých AHK receptorů.** Jakým způsobem k tomu dochází – zda-li dochází k produkci menšího množství reaktivních kyslíkových substancí (ROS) nebo vyšší aktivitou antioxidantních enzymů, však dosud není známo.

To, že aplikace jakékoli ze zkoumaných koncentrací BA vedla ve tmě u vzorků *ahk2ahk3* k výraznému zvýšení obsahu MDA, a že takto fungovaly i vyšší koncentrace BA při kultivacích na světelných podmínkách (viz Grafy č.9 a 10) naznačuje, že listy *ahk2ahk3* mutantu mohly být co do stavu oxidativního poškození blízko optimu, a další zvýšení hladiny cytokininů aplikací BA vedlo k supraoptimálním účinkům.

Exp.1 však ukázal výsledky protichůdné výše zmíněným, tedy výsledkům Exp.2. Je vidět, že u vzorků ostatních genotypů (vyjma indukovaných *pga22*) aplikace *mT* při kultivaci ve tmě způsobila markantní snížení oxidativního poškození, zatímco u vzorků *ahk2ahk3* tento protektivní efekt byl mnohem slabší. Možné vysvětlení lze vyvodit za pomoci výsledků studie ligandové specifity, kterou provedli Spíchal a kol. (2004). Z jejich zjištění vyplývá, že AHK4 receptor reaguje mnohem citlivěji (asi čtyřnásobně) na *mT*, než-li na BA. Navíc je receptor AHK4 všeobecně vůči cytokininům citlivější, než AHK3, konkrétně vůči *mT* asi 2,5x více. Na základě těchto poznatků vyplývá možné vysvětlení zdánlivé rozporuplnosti výsledků analýzy TBARS

v Exp.1 a obsahu MDA v Exp.2: v podané koncentraci 10^{-4} mol·l⁻¹ (tedy desetinasobně vyšší než v Exp.2 nejvyšší použitá konc. BA) působil *mT* výrazně silněji na mutanta *ahk2ahk3*, jehož jediným funkčním (ze známých receptorů cytokininů) byl AHK4 a kvůli jeho vyšší citlivosti všeobecně a také kvůli vyšší citlivosti k *mT* (než k BA) vedla aplikace *mT* k supraoptimálnímu účinku.

Zároveň podle výsledků Exp.2 vyplývá, že funkce receptoru **AHK4 pravděpodobně zprostředkovává zachování relativního obsahu chlorofylu, s cytokininy a světlem jako pozitivními regulátory této funkce.** Ze srovnání Exp.1 a Exp.2 pak také plyne, že *mT*, na rozdíl od BA, nemá u mutanta *ahk2ahk3* znatelné účinky na relativní obsah chlorofylu, tedy alespoň v použité koncentraci 10^{-4} mol·l⁻¹ (ta je však, podotýkám, desetinasobně vyšší, než nejvyšší použitá koncentrace BA v Exp.2).

6.8.2 Interpretace výsledků experimentů s mutantem *ahk2ahk4*

Z výsledků experimentů s listy mutanta *ahk2ahk4* bych rád poukázal na zřetelnou podobnost výsledků měření koncentrace TBARS (Exp.1) a obsahu MDA (Exp.2) u vzorků tohoto mutanta a vzorků WT (viz Graf č.1 a Grafy č.8 - 10). Tento fakt ukazuje, že co se týká vlivu cytokininů a světla na zabrzdění či naopak rozvoj oxidativního poškození v průběhu senescence listů, je receptor **AHK3 sám, z dosud známých, schopen zprostředkovat normální vliv sledovaných faktorů v dostatečné míře.**

Ačkoliv tedy současné vyřazení funkce AHK2 a AHK4 zřejmě výrazně nemění možnosti světla a cytokininů regulovat oxidativní stres a jeho projevy, neplatí to pro vliv na relativní obsah chlorofylu. V Exp.1 bylo zjištěno, že *mT* (10^{-4} mol·l⁻¹) **má pozitivní vliv na zachování obsahu chlorofylu u oddělených listů mutanta *ahk2ahk4*, a to jak na světle, tak i ve tmě.** Z výsledků Exp.2, konkrétně ze snížené rychlosti úbytku chlorofylu u vzorků kultivovaných ve tmě bez exogenního podání BA, (viz Graf č.8) pak plyne, že u mutanta *ahk2ahk4* dochází (zejm. ve tmě) k nejpomalejšímu poklesu chlorofylu ve srovnání s ostatními *ahk*-mutanty i ve srovnání s WT. **Receptor AHK3 (jenž je u *ahk2ahk4* mutanta jediný funkční ze známých receptorů vnímajících cytokininy) se zřejmě nejvýrazněji podílí na zprostředkování zpomalení odbourávání chlorofylu ve tmě.**

6.8.3 Interpretace výsledků experimentů s mutantem *ahk3ahk4*

Mezi výsledky mutanta *ahk3ahk4* považuji za nejvýznamnější ty, které ukazují, že **funkce samotného AHK2 receptoru umožňuje prostřednictvím působení endogenních cytokininů a bez vlivu světla výraznou obranu vůči oxidativnímu poškození, tedy alespoň ve srovnání**

s WT. Ukazuje se to z měření obsahu MDA provedených v rámci Exp.2 (viz Grafy č.8 - 10). Kromě toho také AHK2 působí zřejmě jako významný regulátor množství chlorofylu. Z výsledků totiž vyplývá, že **zprostředkovává vliv endogenních cytokininů na zabránění odbourávání chlorofylu, ačkoliv ne do té míry, jako AHK3.**

6.8.4 Srovnání úloh AHK při spolupůsobení cytokininů a světla

Z výše diskutovaných výsledků vyplývá, že každý ze tří známých AHK receptorů sám o sobě působí během senescence oddělených listů na zachování obsahu chlorofylu, a také na zachování funkčnosti obrany vůči oxidativnímu poškození. Je však také jasné, že na každou rostlinnou, resp. genotypovou variantu působí zkoumané vnější faktory (intenzita světla, exogenní aplikace cytokininů) různě. Stejná míra spolupůsobení světla a cytokininů vyvolává u každého z dvojitých *ahk*-mutantů reakce o různé intenzitě, což je dáno mírnými odlišnostmi fyziologických vlastností jednotlivých receptorů, které zůstaly u těchto mutantů funkční, a to i přesto, že jejich funkce se navzájem do značné míry překrývají. Jak zjistili Higuchi a kol. (2004), exprese všech tří cytokininových receptorů je redundantní, exprese *AHK3* je však nejsilnější v listové rozetě, zatímco *AHK4* je exprimován výrazněji v kořeni. Dalším příkladem odlišností jednotlivých receptorů může být funkční specifita, přičemž funkce se opět, tak jako v případě lokalizace, do jisté míry překrývají, přesto jednotlivé receptory ovlivňují některé jevy různou silou. *AHK3* je (oproti *AHK2* a *AHK4*) významnější v působení proti ztrátě chlorofylu a proti nástupu senescence. Naopak *AHK4* má významnější vliv na regulaci inhibičního vlivu světla na klíčení (Riefler a kol., 2006).

Pro snazší srovnání a lepší znázornění specifík AHK receptorů, jež byly v průběhu indukované senescence listů v rámci této práce zjištěny, jsem vytvořil dva grafy ilustrující odlišnosti v působení popř. spolupůsobení cytokininů a světla během senescence oddělených listů jednotlivých *ahk*- dvojitých mutantů. Graf č.11 ukazuje vliv na oxidativní poškození (které lze charakterizovat mírou kumulace MDA), zatímco Graf č.12 znázorňuje vliv na relativní obsah chlorofylu, jakožto indikátoru míry senescence. Jako výchozí stav všech znázorněných genotypů jsem zvolil stav oddělených listů 6 dní kultivovaných ve tmě v roztoku DMSO, tedy bez vlivu jak exogenní aplikace cytokininů, tak i světla. Zvonovitá křivka reprezentuje míru ochrany proti oxidativnímu poškození s optimem ve vrcholu křivky. Šipky pak označují posun na této křivce vlivem působení pěstební intenzity světla, exogenní aplikace BA, či spolupůsobením vysoké intenzity světla a exogenní aplikace BA.

Z Grafu č.8 lze vyčíst, že vzorky oddělených listů WT, jsou při kultivaci ve tmě výrazně vzdáleny od optimálního stavu, tedy od nejmenší míry oxidativního poškození, spojeného

s indukovanou senescencí (způsobenou oddělením listů). Exogenní působení cytokininů anebo světla o pěstební intenzitě na tyto vzorky vede ke zmírnění změn spojených se senescencí – přiblížení optimálnímu stavu. Současné spolupůsobení vyšší intenzity světla a vyšších koncentrací exogenně podaných cytokininů vede naopak k překročení optima (viz Graf č.11).

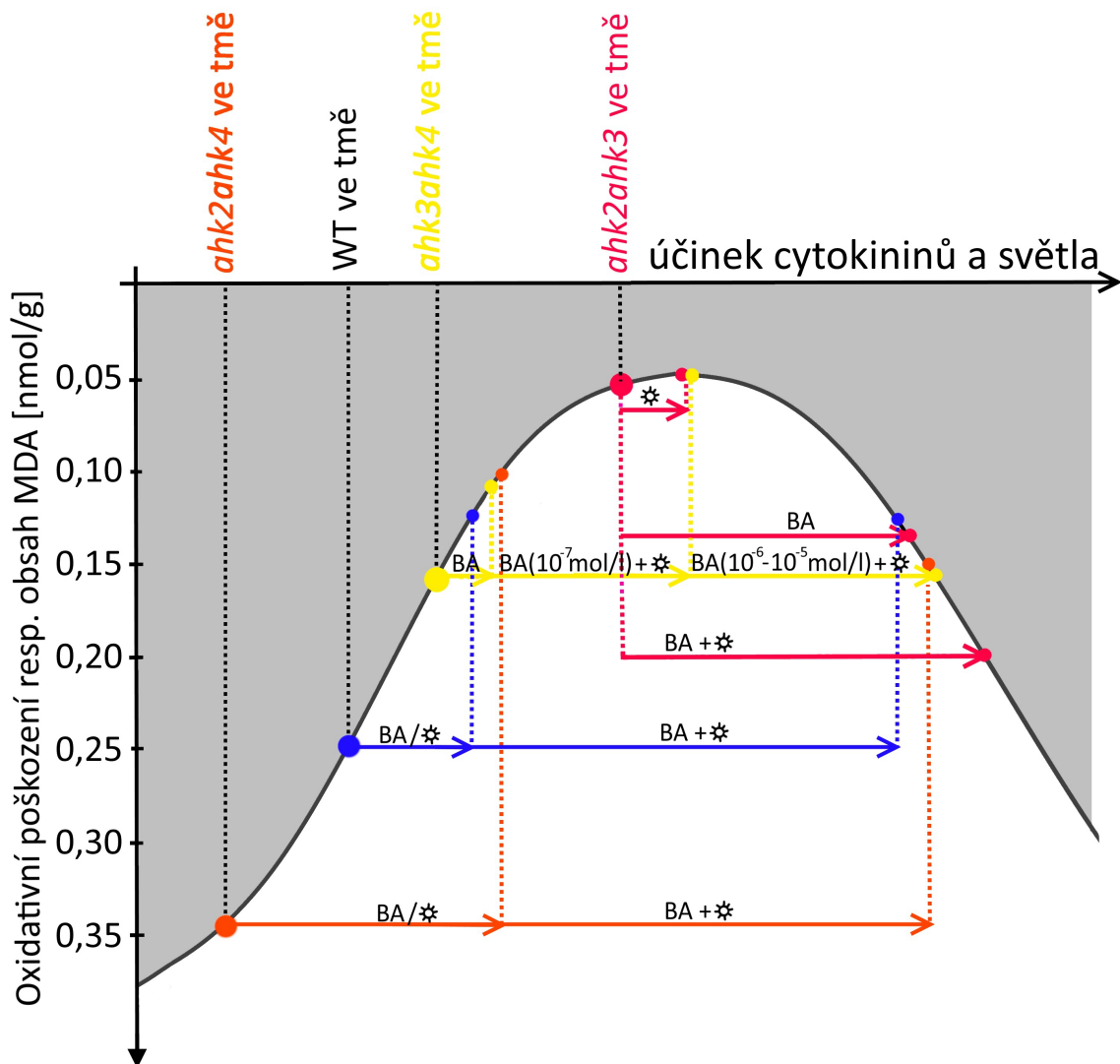
Zůstal-li ze známých receptorů aktivní pouze AHK4, lze vidět, že došlo k posunu vlivu endogenních cytokininů na téměř optimální úroveň. Spolupůsobení pěstební intenzity světla a endogenních cytokininů vede zřejmě právě k optimálnímu spolupůsobení cytokininů. Přidání BA (o jakékoli z testovaných koncentrací) vede pak již k supraoptimálnímu účinku (viz Graf č.11), což zřejmě souvisí s mnohem vyšší citlivostí AHK4 receptoru vůči cytokininům (Spíchal a kol., 2004). **Ve srovnání s WT a ostatními zkoumanými *ahk*-mutanty, se při vlivu pouze svých endogenních cytokininů nejvíce blíží optimu právě vzorky mutanta *ahk2ahk3*. Receptor AHK4 tedy pravděpodobně nejvíce ze všech tří známých AHK receptorů zprostředkovává účinek cytokininů na ochranu před oxidativním poškozením.**

U oddělených listů mutanta *ahk3ahk4*, u něhož si ze známých AHK receptorů zachoval funkci AHK2, je při působení pouhých endogenních cytokininů posunut jejich vliv také blíže k optimálnímu stavu, než u WT, nikoli však tolik, jako u vzorků předchozího zmíněného mutanta. Do stavu blízkého optimu, co do minimalizace oxidativního poškození se však oddělené listy mutanta *ahk3ahk4* dostávají také, avšak až za spolupůsobení exogenně podaného 10^{-7} mol·l⁻¹ BA a pěstební intenzity světla. Vyšší úroveň spolupůsobení obou faktorů však už vede k překročení hranice do supraoptimální úrovně (viz Graf č.11).

Naopak oddělené listy mutanta s funkčním receptorem AHK3, tedy *ahk2ahk4* mutanta, byly při kultivaci ve tmě vzdáleny od optimální úrovně nejvíce, z čehož lze soudit, že **AHK3 receptor zprostředkovává vliv endogenních cytokininů na minimalizaci oxidativního poškození nejméně** (viz Graf č.11).

Zajímavé jsou i zjištění, že jak WT, tak i mutanti *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4* se z různých suboptimálních úrovní posunuli pouhým vlivem exogenní aplikace BA do podobného bodu nacházejícího se blíže optimu. Dále z výsledků vyplývá, že vysoká intenzita světla spolupůsobící s exogenním BA vede u všech sledovaných genotypů (WT a všech tří *ahk*-dvojitých mutantů) k překročení hranice optima přibližně na stejnou supraoptimální úroveň (viz Graf č.11).

Graf č. 11: Graf popisující účinky cytokininů a světla na oxidativní poškození, resp. obsah MDA v oddělených listech dvojitéch *ahk*- mutantů

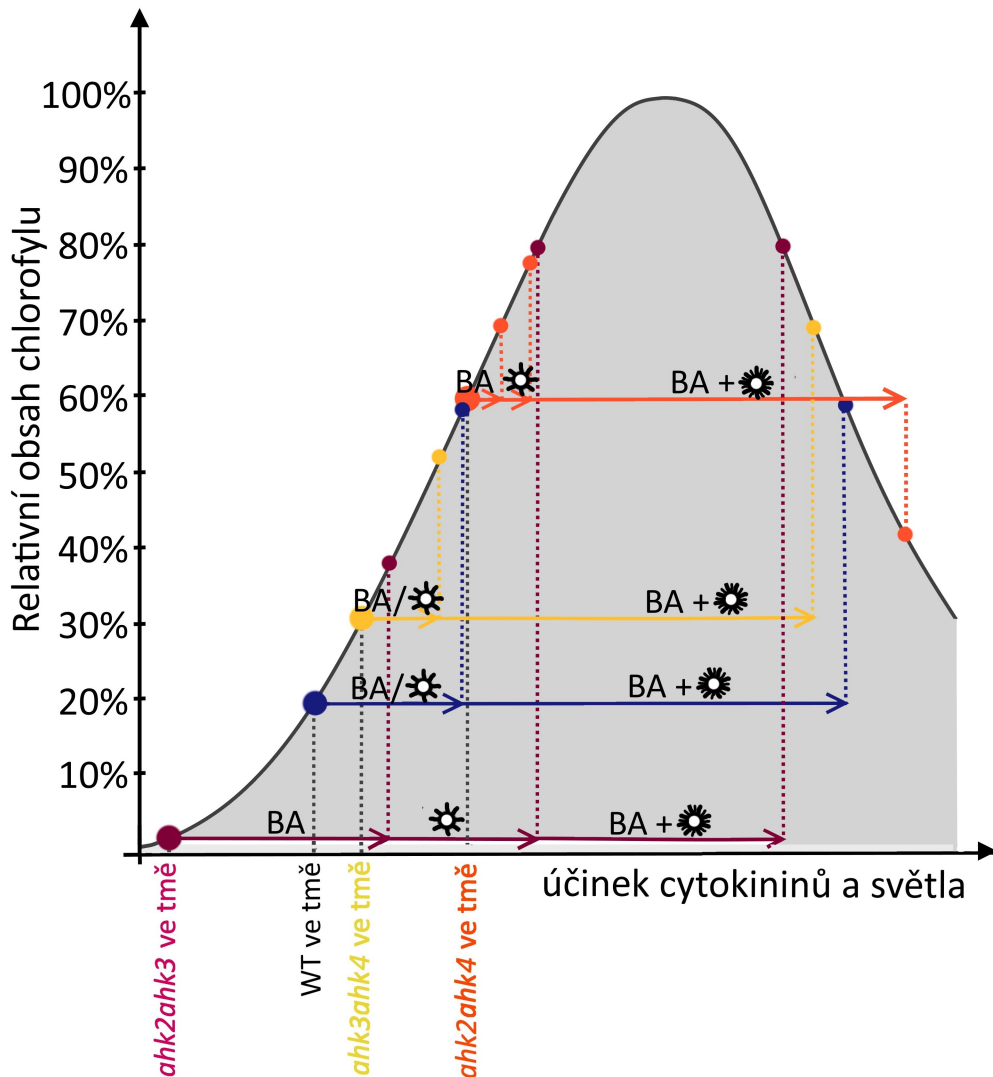


Graf znázorňuje, do jaké míry mohou cytokininy, světlo nebo jejich spolupůsobení ovlivnit oxidativní poškození, resp. obsah MDA (jež je průvodním jevem senescence), a jakou roli v působení těchto faktorů sehrávají dosud známé AHK receptory, zprostředkovávající vliv cytokininů. Jako výchozí stav (větší barevné tečky) je brán stav po 6 dnech kultivace oddělených listů ve tmě. Šipky znázorňují přibližnou míru ovlivnění výchozího stavu exogenní aplikací cytokininu (BA) a/nebo světla (☼). Vzorky WT jsou označeny modře, vzorky *ahk2ahk3* růžově, *ahk2ahk4* oranžově a vzorky *ahk3ahk4* žlutě. Graf představuje **přibližné hodnoty** odvozené z výsledků Exp.2 (viz Grafy č.8-10).

Grafická interpretace výsledků experimentů týkajících se role AHK receptorů v retenci chlorofylu při senescenci oddělených listů ukazuje pozitivní vliv světla nebo exogenní aplikace BA na zpomalení odbourávání chlorofylu u vzorků WT, přičemž tento vliv se může při současném působení obou zmíněných faktorů (podobně jako u obsahu MDA) přehoupnout do supraoptimální úrovně. Za podmínek kultivace ve tmě, tedy pouze za vlivu endogenních cytokininů, jsou vzorky mutanta *ahk2ahk3*, jak lze z Grafu č.12 vidět, optimu nejvzdálenější. Nicméně ani působení světla o vysoké intenzitě a vysokých koncentrací exogenně aplikovaného BA nevedlo zřejmě k překročení hranice za optimum. Z toho plyne, že ačkoliv AHK4 zprostředkovává zachování obsahu chlorofylu, a tím i funkční fotosyntézu, je u něj tato funkce ze všech tří známých receptorů nejslabší, což souvisí pravděpodobně i s tím, že je AHK4 zřejmě nejméně citlivý vůči vlivu cytokininů a světla na regulaci retence chlorofylu. **Zásadní je, že ve srovnání s ostatními dvěma receptory má AHK4 nejslabší účinek na retenci chlorofylu i přesto, že na zmírnění nárůstu MDA má účinek naopak nejsilnější.**

Oproti zmíněnému vlivu AHK4 receptoru na retenci chlorofylu u oddělených listů, je vliv receptorů AHK2 a AHK3 významnější, a to zejména u receptoru AHK3, jak lze vidět v Grafu č.12. Za vlivu pouze svých endogenních cytokininů měli oba mutanti, *ahk2ahk4* i *ahk3ahk4* větší schopnost pozastavit úbytek chlorofylu během senescence, než-li WT. A tedy i vliv exogenního podání cytokininů nebo možnost fotosyntetizovat při kultivaci na pěstebním světelném režimu posunula vzorky obou mutantů ještě blíže optimu, než jak k tomu došlo u WT. Zajímavé však je, že vliv světla (o pěstební intenzitě) vedl k přiblížení retence chlorofylu k optimu všech mutantů přibližně stejně, a zároveň více, než u WT.

Graf č.12: Účinky cytokininů a světla na relativní obsah chlorofylu v oddělených listech dvojitých *ahk*- mutantů



Graf znázorňuje, do jaké míry mohou cytokininy, světlo nebo jejich spolupůsobení ovlivnit relativní obsah chlorofylu, (jehož úbytek je průvodním jevem senescence), a jakou roli v působení těchto faktorů sehrávají dosud známé AHK receptory, zprostředkovávající vliv cytokininů. Jako výchozí stav (větší barevné tečky) je brán stav po 6 dnech kultivace oddělených listů ve tmě. Šipky znázorňují přibližnou míru ovlivnění výchozího stavu exogenní aplikací cytokininu (BA) a/nebo světla (pěstební intenzita světla, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$: ☼; vysoká intenzita světla, $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$: ☼). Vzorky WT jsou označeny modře, vzorky *ahk2ahk3* růžově, *ahk2ahk4* oranžově a vzorky *ahk3ahk4* žlutě. Graf představuje přibližné hodnoty odvozené z výsledků Exp.2 (viz přílohy).

Z obou uvedených grafických znázornění vyplývá zjednodušené schéma (viz Obr. č.10), které zdůrazňuje, že všechny tři známé AHK receptory se funkčně překrývají, přesto jsou specifické, a to například v tom, do jaké míry ovlivňují různé fyziologické jevy. Konkrétně receptor AHK3 se ze všech tří receptorů nejvýznamnějším způsobem podílí na zpomalení poklesu obsahu chlorofylu. Zároveň ale nejméně zpomaluje nárůst oxidativního poškození. Právě naopak působí receptor AHK4, který nejvýrazněji zpomaluje oxidativní poškození, ale nejméně významně zpomaluje pokles obsahu chlorofylu. Receptor AHK2 je v rámci ovlivňování zmíněných jevů nejméně specifický, vzhledem k tomu, že míra jeho příspěvku ke zmíněným jevům se pohybuje někde mezi ostatními dvěma AHK receptory. Schéma také znázorňuje odlišnou citlivost jednotlivých receptorů k cytokininům, tedy že $AHK4 > AHK3 > AHK2$ (Spíchal a kol., 2004; Stolz a kol., 2011).

Obr. č.10: Schéma vlivu receptorů AHK2, AHK3 a AHK4 na ztrátu chlorofylu a oxidativní poškození způsobené senescencí

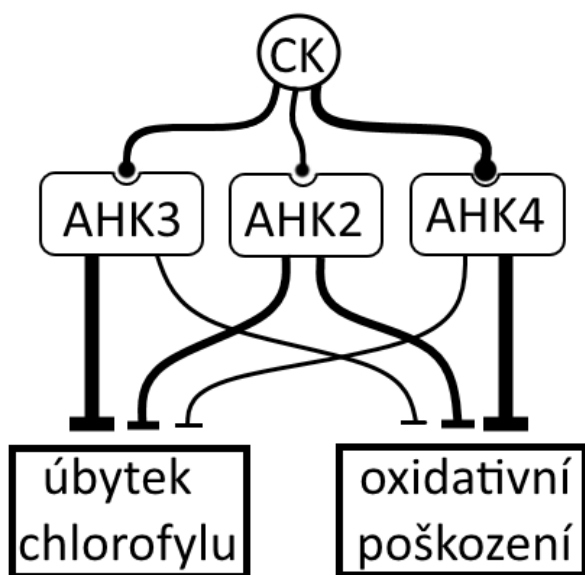


Schéma zjednodušeně znázorňuje rozdílnou citlivost AHK receptorů vůči cytokininům a rozdílnou míru, jakou každý ze znázorněných AHK receptorů ovlivňuje úbytek chlorofylu a oxidativní poškození způsobené senescencí.

7 ZÁVĚR

Z experimentů provedených v rámci této diplomové práce na oddělených listech rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) a mutantech odvozených od tohoto druhu vyplývají následující závěry:

Působení cytokininů a světla má u rostlin *Arabidopsis* podobný účinek, alespoň pokud se jedná o ovlivnění oxidativního poškození a zachování funkčnosti fotosyntetického aparátu v průběhu senescence.

Působení cytokininů a světla má u rostlin *Arabidopsis* aditivní charakter. Jejich účinky zpomalují nástup a průběh senescence, což se projevuje zpomalením nárůstu oxidativního poškození a zpomalením odbourávání chlorofylu. Překoná-li však jejich souběžný účinek určitou hranici, změní se účinek těchto faktorů na senescenci urychlující.

Během senescence oddělených listů *Arabidopsis* má receptor AHK4, ve srovnání s AHK2 a AHK3, nejvýznamnější vliv na snižování oxidativního poškození, a naopak má nejslabší vliv na ztrátu chlorofylu, což se projevilo tím, že u vzorků mutanta *ahk2ahk3* byla zjištěna nejnižší míra oxidativního poškození a zároveň docházelo k nejrychlejšímu úbytku chlorofylu.

Receptor AHK3 má naopak nejvýznamnější vliv na pokles obsahu chlorofylu a nejslabší vliv na oxidativní poškození, což se projevilo u vzorků mutanta *ahk2ahk4* nejvyšší mírou oxidativního poškození a zároveň nejpomalejším úbytkem chlorofylu.

U receptoru AHK2 nebylo odhaleno specifické zaměření.

Výsledky potvrzují dosavadní zjištění, že afinita benzyladeninu (BA) je, ze tří zkoumaných receptorů, nejsilnější vůči receptoru AHK4 a nejslabší vůči receptoru AHK2.

Lidský hormon 17- β -estradiol ovlivňuje fyziologii rostlin včetně obsahu chlorofylu a ochrany vůči oxidativnímu poškození.

8 LITERATURA

AREMU, A. O., M. W. BAIRU, O. NOVÁK, L. PLAČKOVÁ, M. ZATLOUKAL, K. DOLEŽAL, J. F. FINNIE, M. STRNAD a J. Van STADEN. Physiological responses and endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured 'Williams' bananas in relation to roscovitine and an inhibitor of cytokinin oxidase/dehydrogenase (INCYDE) treatments. *Planta*. 2012, vol. 236, iss. 6, s. 1775-1790 DOI: 10.1007/s00425-012-1721-z.

BESSEAU, S., J. LI a T. PALVA. WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2012 vol. 63, iss. 7, s. 2667-2679. DOI: 10.1093/jxb/err450

BLEECKER, A. B., S. E. PATTERSON. Last Exit: Senescence, Abscission, and Meristem Arrest in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*. 1997, vol. 9, iss. 7, s. 1169-1179. DOI: 10.1105/tpc.9.7.1169.

BROUWER, B., P. GARDESTRÖM and O. KEECH. In response to partial plant shading, the lack of phytochrome A does not directly induce leaf senescence but alters the fine-tuning of chlorophyll biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 2014. DOI: 10.1093/jxb/eru060

BROUWER, B., A. ZIOLKOWSKA, M. BAGARD, O. KEECH a P. GARDESTRÖM. The impact of light intensity on shade-induced leaf senescence. *Plant, Cell & Environment*. 2012, vol. 35, iss. 6, s. 1084-1098. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02474.x.

BUCHANAN-WOLLASTON, V., T. PAGE, E. HARRISON, E. BREEZE, P. OK LIM, H. G. NAM, J-F LIN, S-H WU, J. SWIDZINSKI, K. ISHIZAKI a C. J. LEAVER. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2005, vol. 42, iss. 4, s. 567-585. DOI: 10.1111/j.1365-313x.2005.02399.x.

BUSCHMANN, C. a H. K. LICHTENTHALER. The effect of cytokinins on growth and pigment accumulation of radis seedlings (*Raphanus sativus* L.) grown in the dark and at different light quanta fluence rates. *Photochemistry and Photobiology*. 1982, vol. 35, iss. 2, s. 217-221. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1982.tb03835.x.

CASANO, L. MARIO, M. MARTIN a B. SABATER. Sensitivity of Superoxide Dismutase Transcript levels and Activities to Oxidative Stress Is lower in Mature-Senescent Than in Young Barley leaves. *Plant Physiology*. 1994, vol. 106, s. 1033-1039.

CHIN-ATKINS, A. N., S. CRAIG, C. H. HOCART, E. S. DENNIS a A. M. CHAUDHURY. Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis ampl* mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta*. 1996, vol. 198, iss. 4. DOI: 10.1007/bf00262641.

CHORY, J., D. REINECKE, S. SIM, T. WASHBURN, and M. BRENNER. A Role for Cytokinins in De-Etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 1994, vol. 104, s. 339-347.

CHOUDHURY, N.K. a R.K. BEHERA. *Photosynthetica*. 2001, vol. 39, iss. 4, s. 481-488. DOI: 10.1023/a:1015647708360.

CLARKE, S. F., P. L. GUY, D. J. BURRITT a P. E. JAMESON. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum*. 2002, vol. 114, iss. 2, s. 157-164. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140201.x.

COCK, J. H., D. FRANKLIN, G. SANDOVAL a P. JURI. The Ideal Cassava Plant for Maximum Yield1. *Crop Science*. 1979, vol. 19, iss. 2. DOI: 10.2135/cropsci1979.0011183x001900020025x.

COTTON, J. L. S., C. W. ROSS, D. H. BYRNE a J. T. COLBERT. Down-regulation of phytochrome mRNA abundance by red light and benzyladenine in etiolated cucumber cotyledons. *Plant Molecular Biology*. 1990, vol. 14, iss. 5, s. 707-714. DOI: 10.1007/bf00016503.

DAI, N., A. SCHAFFER, M. PETREIKOV, Y. SHAHAK, Y. GILLER, K RATNER, A. LEVINE a D. GRANOT. Overexpression of Arabidopsis Hexokinase in Tomato Plants Inhibits Growth, Reduces Photosynthesis, and Induces Rapid Senescence. *Plant Cell*. 1999, Vol. 11, iss. 7, s. 1253-1266. DOI: 10.1105/tpc.11.7.1253

DAN, K., M. NAGATA a I. YAMASHITA. Changes in Lipid Peroxidation and Antioxidants Content in Cotyledons of Japanese Radish. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 1996, vol. 65, iss. 3, s. 603-608.

DAVIES, P. J. a S. GAN. Towards an integrated view of monocarpic plant senescence. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012, vol. 59, iss. 4, s. 467-478. DOI: 10.1134/s102144371204005x.

DERTINGER, U., U. SCHAZ a E-D SCHULZE. Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum*. 2003, vol. 119, iss. 1, s. 19-29. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00095.x.

DHARMASIRI, S., T. JAYAWEEERA a N. DHARMASIRI. Plant Hormone Signalling: Current Perspectives on Perception and Mechanisms of Action. *Ceylon Journal of Science*. 2013, vol. 42, iss. 1, s. 1-17. DOI: 10.4038/cjsbs.v42i1.5895

FLORES, S. a E. M. TOBIN. Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*: Apparent post-transcriptional regulation. *Planta*. 1986, vol. 168, iss. 3, s. 340-349. DOI: 10.1007/bf00392359.

FUJIKI, Y., Y. YOSHIKAWA, T. SATO, N. INADA, M. ITO, I. NISHIDA a Akira WATANABE. Dark-inducible genes from Arabidopsisthaliana are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiologia Plantarum*. 2001, vol. 111, iss. 3, s. 345-352 . DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110312.x.

FRÉBORT, I., M. KOWALSKA, T. HLUŠKA, J. FRÉBORTOVÁ a P. GALUSZKA. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*. 2011, vol. 62, iss. 8, s. 2431–2452. DOI:10.1093/jxb/err004

GALUSZKA, P., H. POPELKOVÁ, T. WERNER, J. FRÉBORTOVÁ, H. POSPÍŠILOVÁ, V. MIK, I. KÖLLMER, T. SCHMÜLLING a I. FRÉBORT. Biochemical Characterization of Cytokinin Oxidases/Dehydrogenases from Arabidopsis thaliana Expressed in Nicotiana tabacum L. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2007, vol. 26, iss. 3, s. 255-267. DOI: 10.1007/s00344-007-9008-5.

GAN, S. a R. M. AMASINO. Making Sense of Senescence. *Plant Physiology* 1997, vol. 113, iss. 2, s. 313-319.

GAN, S. a R. M. AMASINO. Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science*. 1995, vol. 270, iss. 5244, s. 1986-1988. DOI: 10.1126/science.270.5244.1986.

GAN, S. *Senescence processes in plants*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2007, vol. 17, iss. 332 p. ISBN 9781405139847.

GUO, Y., Z. CAI a S. GAN. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell & Environment*. 2004, vol. 27, iss.5, s.521-549. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2003.01158.x

HARMAN, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*. 1956, vol. 11, iss. 3, s. 298-300. DOI: 10.1093/geronj/11.3.298.

HATAMI, M., A. HATAMZADEH, M. GHASEMNEZHADI, R. H. SAJEDI. Antioxidant enzymatic protection during *Pelargonium* plant leaf senescence is mediated by thidiazuron. *Trakia Journal of Sciences*. 2013, vol. 2, s. 152-157.

HENSEL, L. L., V. GRBIĆ, D. A. BAUMGARTEN a A. B. BLEECKER. Developmental and Age-Related Processes That Influence the Longevity and Senescence of Photosynthetic Tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 1993, vol. 5, iss. 5, s. 553-564.

HIGUCHI, M., M. S. PISCHKE, A. P. MAHONEN, K. MIYAWAKI, Y. HASHIMOTO, M. SEKI, M. KOBAYASHI, K. SHINOZAKI, T. KATO, S. TABATA, Y. HELARIUTTA, M. R. SUSSMAN a T. KAKIMOTO. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, vol. 101, iss. 23, s. 8821-8826. DOI: 10.1073/pnas.0402887101.

HODGES, D. M., J. M. DeLONG, C. F. FORNEY a R. K. PRANGE. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*. 1999, vol 207, iss. 4, s. 604-611.

HOEBERICHTS, F. A., W. G. VAN DOORN, O. VORST, R. D. HALL a M. F. VAN WORDRAGEN. Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol. 58, iss. 11, s. 2873–2885. DOI:10.1093/jxb/erm076.

HÖRTENSTEINER S. a U. FELLER. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*. 2002, vol. 53, Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue, s. 927–937.

HUSIČKOVÁ, A. A cytokinin potion in plant lives: almost as miraculous as light. 2010. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

INOUE, T., M. HIGUCHI, Y. HASHIMOTO, M. SEKI, M. KOBAYASHI, T. KATO, S. TABATA, K. SHINOZAKI a T. KAKIMOTO. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*. 2001, vol. 409, iss. 6823, s. 1060-1063. DOI: 10.1038/35059117.

IVANOV, A.G, R.M MORGAN, G.R GRAY, M.Y VELITCHKOVA a N.P.A HUNER. Temperature/light dependent development of selective resistance to photoinhibition of photosystem I. *FEBS Letters*. 1998, 430(3): 288-292. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)00681-4.

JIBRAN, R., D. A. HUNTER a P. P. DIJKWEL. Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Molecular Biology*. 2013, vol. 82, iss. 6, s. 547-561. DOI: 10.1007/s11103-013-0043-2.

JING, H-C., J. H. M. SCHIPPERS, J. HILLE a P. P. DIJKWEL. Ethylene-induced leaf senescence depends on age-related changes and *OLD* genes in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 2005, vol. 56, iss. 421, s.2915-2923. DOI: 10.1093/jxb/eri287

KAKIMOTO, T. Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate: ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*. 2001, vol. 42, iss. 7, s. 677-685. DOI: 10.1093/pcp/pce112.

- KHAN, M., W. ROZHON a B. POPPENBERGER. The Role of Hormones in the Aging of Plants – A Mini-Review. *Gerontology*. 2014, vol. 60, iss. 1, s. 49-55. DOI: 10.1159/000354334.
- KIM, H. J., H. RYU, S. H. HONG, H. R. WOO, P. O. LIM, I. C. LEE, J. SHEEN, H. G. NAM a I. HWANG. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, vol. 103, iss. 3, s. 814-819. DOI: 10.1073/pnas.0505150103.
- KLERK, H., M. REBERS a L. C. van LOON. Effects of light and regulators on senescence-related changes in soluble proteins in detached oat (*Avena sativa* L.) leaves. *Plant Growth Regulation*. 1993, vol. 13, iss. 2, s. 137-145. DOI: 10.1007/bf00024256.
- KUMAR, M. N. a P. E. VERSLUES. Stress physiology functions of the Arabidopsis histidine kinase cytokinin receptors. *Physiologia Plantarum*. 2014. DOI: 10.1111/ppl.12290.
- KURAKAWA, T., N. UEDA, M. MAEKAWA, K. KOBAYASHI, M. KOJIMA, Y. NAGATO, H. SAKAKIBARA a J. KYOZUKA. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*. 2007, vol. 445, iss. 7128, s. 652-655. DOI: 10.1038/nature05504.
- LARA, M. E. Balibrea. Extracellular Invertase Is an Essential Component of Cytokinin-Mediated Delay of Senescence. *The Plant Cell Online*. 2004, vol. 16, iss. 5, s. 1276-1287. DOI: 10.1105/tpc.018929.
- LIM, P. O., I. C. LEE, J. KIM, Hyo J. KIM, J. S. RYU, H. R. WOO a H. G. NAM. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of Experimental Botany*. 2010, vol. 61, iss. 5, s. 1419-1430.
- LU, C. a J. ZHANG. Changes in photosystem II function during senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum*. 1998, vol. 104, iss. 2, s. 239-247. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040212.x.
- MÜLLER, B. a J. SHEEN. Arabidopsis Cytokinin Signaling Pathway. *Science Signalling*. 2007, vol. 2007, iss. 407. DOI: 10.1126/stke.4072007cm5
- MARTÍNEZ, D. E., M. L. COSTA a J. J. GUIAMET. Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology*. 2008, vol. 10, s. 15-22. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2008.00089.x.
- MIYAWAKI, K., P. TARKOWSKI, M. MATSUMOTO-KITANO, T. KATO, S. SATO, D. TARKOWSKA, S. TABATA, G. SANDBERG a T. KAKIMOTO. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, vol. 103, iss. 44, s. 16598-16603. DOI: 10.1073/pnas.0603522103.
- MOORE, B., F. ROLLAND, Q. HALL, W-H. CHENG, Y-X. LIU, I. HWANG, T. JONES a J. SHEEN. Role of the Arabidopsis Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science*. 2003, vol. 300, iss. 5617, s. 332-336. DOI: 10.1126/science.1080585.
- MORRIS, K., S. A.-H.-MACKERNESS, T. PAGE, C. F. JOHN, A. M. MURPHY, J. P. CARR a V. BUCHANAN-WOLLASTON. *The Plant Journal*, 2000, vol. 23, iss. 5, s. 677-685.
- MURAI, N. Review: Plant Growth Hormone Cytokinins Control the Crop Seed Yield. *American Journal of Plant Sciences*. 2014, vol. 05, iss. 14, s. 2178-2187. DOI: 10.4236/ajps.2014.514231.

NISHIMURA, Ch, Y. OHASHI, S. SATO, T. KATO, S. TABATA a C. UEGUCHI. Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 2004, vol. 16, iss. 6, s. 1365–1377.

NOGUÉ, N., H. HOCART, D. S. LETHAM, E. S. DENNIS a A. M. CHAUDHURY. *Plant Growth Regulation*. 2000, vol. 32, 2/3, s. 267-273. DOI: 10.1023/a:1010720420637.

POURTAU, N., R. JENNINGS, E. PELZER, J. PALLAS a A. WINGLER. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta*. 2006, vol. 224, iss. 3, s. 556-568. DOI: 10.1007/s00425-006-0243-y.

PROCHAZKOVA, D., R.K. SAIRAM, G.C. SRIVASTAVA, D.V. SINGH. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*. 2001, vol. 161, iss., s. 761-771.

PROCHÁZKOVÁ, D. a N. WILHELMOVÁ. Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologia Plantarum*. 2007, vol. 51, iss. 3, s. 401-406. DOI: 10.1007/s10535-007-0088-7.

QAMARUDDIN, M. a E. TILLBERG. Rapid Effects of Red Light on the Isopentenyladenosine Content in Scots Pine Seeds. *Plant Physiology*. 1989, vol. 91, s. 5-8.

RÁC, M., M. KŘUPKA, S. BINDER, M. SEDLÁŘOVÁ, Z. MATUŠKOVÁ, M. RAŠKA a P. POSPÍŠIL. Oxidative Damage of U937 Human Leukemic Cells Caused by Hydroxyl Radical Results in Singlet Oxygen Formation. *PloS One*. 2015, vol. 10, iss.3, e0116958. DOI: 10.1371/journal.pone.0116958.

RIEFLER, M. Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism. *The Plant Cell Online*. 2006, vol. 18, iss. 1, s. 40-54. DOI: 10.1105/tpc.105.037796.

ROMANOV, G. A., S. N. LOMIN a T. SCHMÜLLING. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*. 2006, vol.57, iss. 15, s.4051-4058. DOI: 10.1093/jxb/erl179

ROUSSEAUX, M. C., A. J. HALL a R. A. SANCHEZ. Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field-grown sunflower. *Physiologia Plantarum*. 1996, vol. 96, iss. 2, s. 217-224. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00205.x.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 2006, vol. 57, iss. 1, s. 431-449. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231.

SASSENATH-COLE, G. F., G. LU, H. F. HODGES a J. M. MCKINION. Photon flux density versus leaf senescence in determining photosynthetic efficiency and capacity of *Gossypium Hirsutum* L. leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 1996, vol. 36, iss. 4, s. 439-446. DOI: 10.1016/s0098-8472(96)01019-2.

SCHLÜTER, T., J. LEIDE a K. CONRAD. Light promotes an increase of cytokinin oxidase/dehydrogenase activity during senescence of barley leaf segments. *Journal of Plant Physiology*. 2011, vol. 168, iss. 7, s. 694-698. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.10.004.

SERAFATMANDJOUR, A., M. KHORSHID, A. ABAVISANI. Effect of estradiol on Photosynthetic pigments, proline and sugars in fennel. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 2013, vol.2, iss. 17, s. 567-571.

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, vol. 41, iss. 1, s. 12-25. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.01.047.

SIM, A. S., C. SALONIKAS, D. NAIDOO a D. E. L. WILCKEN. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *Journal of Chromatography B*. 2003, vol. 785, iss. 2, s. 337-344. DOI: 10.1016/s1570-0232(02)00956-x.

SINGH, S., D. S. LETHAM a L. M. S. PALNI. Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VIII. Translocation, metabolism and biosynthesis of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiologia Plantarum*. 1992, vol. 86, iss. 3, s. 398-406. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb01335.x.

SPÍCHAL, L., N. Y. RAKOVÁ, M. RIEFLER, T. MIZUNO, G. A. ROMANOV, M. STRNAD a T. SCHMÜLLING. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol*, 2004, vol. 45, iss. 9, s.1299-305.

STRNAD, M.. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*. 1997, vol. 101, iss. 4, s. 674-688. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x.

SUN, J., Q-W NIU, P. TARKOWSKI, B. ZHENG, D. TAROWSKA, G. SANDBERG, N-H CHUA a J. ZUO. The *Arabidopsis* AtIPT8/PGA22 Gene Encodes an Isopentenyl Transferase That Is Involved in De Novo Cytokinin Biosynthesis. *The Plant Plant Physiology*. 2003, vol. 131, iss. 1, s. 167-176.

STOLZ, A., M. RIEFLER, S. N. LOMIN, K. ACHAZI, G. A. ROMANOV a T. SCHMÜLLING. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*. 2011, vol. 67, iss. 1, s. 157-168. DOI: 10.1111/j.1365-313x.2011.04584.x.

SYNKOVÁ, H., Š. SEMORÁDOVÁ, R. SCHNABLOVÁ, E. WITTERS, M. HUŠÁK a R. VALCKE. Cytokinin-induced activity of antioxidant enzymes in transgenic *Pssu-ipt* tobacco during plant ontogeny. *Biologia Plantarum*. 2006, vol. 50, iss. 1, s. 31-41.

ŠPUNDOVÁ, M., K. SLOUKOVÁ, M. HUNKOVÁ a J. NAUŠ. Plant shading increases lipid peroxidation and intensifies senescence-induced changes in photosynthesis and activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in wheat. *Photosynthetica*. 2005, vol. 43, iss. 3, s. 403-409. DOI: 10.1007/s11099-005-0064-4.

TAIZ a E. ZEIGER; T., L. LAZAR (ed.) *Plant Physiology*, 3rd edn., *Sinauer Associates*, 2003. DOI: 10.1093/aob/mcg079.

TAKEI, K., T. YAMAYA a H. SAKAKIBARA. *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of trans-Zeatin. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, vol. 279, iss. 40, s. 41866-41872. DOI: 10.1074/jbc.m406337200.

THOMAS, H. Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist*. 2012, vol. 197, iss. 3, s. 696-711. DOI: 10.1111/nph.12047.

THOMAS, H., H. J. OUGHAM, C. WAGSTAFF a A. D. STEAD. Defining senescence and death. *Journal of experimental botany*. 2003, vol. 54, iss. 385, s. 1127-1132. DOI: 10.1093/jxb/erg133

TO, J. P.C. a J. J. KIEBER. Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science*. 2008, vol. 13, iss. 2, s. 85-92. DOI: 10.1016/j.tplants.2007.11.005.

- TOYAMA, T., H. TERAMOTO, G. TAKEBA a H. TSUJI. Cytokinin Induces a Rapid Decrease in the Levels of mRNAs for Catalase, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, Lectin and Other Unidentified Proteins in Etiolated Cotyledons of Cucumber. *Plant Cell Physiology*. 1995, vol. 37, iss. 5, s. 1349-1359.
- ULLANAT, R. a C. JAYABASKARAN. *Plant Growth Regulation*. 2002, vol. 38, iss. 3, s. 209-218. DOI: 10.1023/a:1021575816558.
- VAN DOORN, W. G. Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? *Journal of Experimental Botany*. 2008 vol. 59, iss. 8, s. 1963–1972. DOI: 10.1093/jxb/ern076
- VOGELMANN, K., G. DRECHSEL, J. BERGLER, C. SUBERT, K. PHILIPPAR, J. SOLL, J. C. ENGELMANN, T. ENGELSDORF, L. M. VOLL a S. HOTH. Early Senescence and Cell Death in Arabidopsis saul1 Mutants Involves the PAD4-Dependent Salicylic Acid Pathway. *Plant Physiology*. 2012, vol. 159, iss. 4, s. 1477-1487. DOI: 10.1104/pp.112.196220.
- WEAVER, L. M. a R. M. AMASINO. Senescence Is Induced in Individually Darkened Arabidopsis Leaves, but Inhibited in Whole Darkened Plants. *Plant Physiology*. 2001, vol. 127, iss. 3, s. 876-886. DOI: 10.1104/pp.010312.
- WEAVER, L. M., S. GAN, B. QUIRINO a R. M. AMASINO. *Plant Molecular Biology*. 1998, vol. 37, iss. 3, s. 455-469. DOI: 10.1023/a:1005934428906.
- WEIDHASE, R. A., H.-M. KRAMMEL, J. LEHMANN, H.-W. LIEBISCH, W. LERBS a B. PARTHIER. Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Science*. 1987, vol. 51, iss. 2-3, s. 177-186. DOI: 10.1016/0168-9452(87)90191-9.
- WERNER, T. 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 Online*. 2003, vol. 15, iss. 11, s. 2532-2550. DOI: 10.1105/tpc.014928
- WERNER, T. a T. SCHMÜLLING. Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009, vol.12, iss. 5, s. 527-538. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.07.002.
- WINGLER, A., C. MASCLAUX-DAUBRESSE a A. M. FISCHER. Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany*. 2009, vol. 60, iss.. 4, s. 1063–1066. DOI:10.1093/jxb/erp067
- WU, X-Y, B-K. KUAI, J-Z. JIA a H-C. JING. Regulation of Leaf Senescence and Crop Genetic Improvement F. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2012, vol. 54, iss. 12, s. 936-952. DOI: 10.1111/jipb.12005.
- WULFETANGE, K., S. N. LOMIN, G. A. ROMANOV, A. STOLZ, A. HEYL a T. SCHMULLING. The Cytokinin Receptors of Arabidopsis Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum. *Plant Physiology*. 2011, vol. 156, iss. 4, s. 1808-1818. DOI: 10.1104/pp.111.180539.
- ZACARIAS, L. a M. S. REID. Role of growth regulators in the senescence of Arabidopsis thaliana leaves. *Physiologia Plantarum*. 1990, vol. 80, iss. 4, s. 549-554. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb05677.x.
- ZHANG, H. a C. ZHOU. Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology*. 2012, vol. 82, iss. 6, s. 539-545. DOI: 10.1007/s11103-012-9980-4.

ZIMMERMANN, P. a U. ZENTGRAF. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular biology letters*. 2005, vol. 10, iss. 3, s. 515-534.

ZUO, J., Q-W. NIU a N.-H. CHUA. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal*. 2000, vol. 24, iss. 2, s. 265-273. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00868.x.

ZWACK, P. J. a A. M. RASHOTTE. Cytokinin inhibition of leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior*. 2013, vol. 8, iss. 7. DOI: 10.4161/psb.24737.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABA = Abscisic Acid, kyselina abscisová: rostlinný hormon

AHK2 = *Arabidopsis* Histidin Kinasa 2: receptor vnímání cytokininů u *Arabidopsis*

AHK3 = *Arabidopsis* Histidin Kinasa 3: receptor vnímání cytokininů u *Arabidopsis*

AHK4 / WOL1 / CRE1 (*Arabidopsis* Histidin Kinasa 4 / Wooden Leg1 / Cytokinin Response1): receptor vnímání cytokininů u *Arabidopsis*

AHP protein (*Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer protein): protein, jež jsou součástí signální dráhy cytokininů

AOE = antioxidační enzymy: skupina enzymů eliminující látky, které způsobují oxidativní poškození

APX = askorbát peroxidasa: antioxidační enzym

ARR = *Arabidopsis* Response Regulator: protein, jež jsou součástí signální dráhy cytokininů

AsA = kyselina askorbová = antioxidační enzym

BA = benzyladenin: jeden z aromatických cytokininů, benzylaminopurin

CAB = Chlorophyll a/b binding = protein vážící se na chlorofyl *a/b*

det1 / 2 = *de-etiolisated1 / 2*: mutanti *Arabidopsis* s deetioloizovaným fenotypem

CWINV = Cell Wall INVertase = Invertasa vázaná na buněčnou stěnu

CKX = cytokinin oxidasa/dehydrogenasa: enzym podílející se na degradaci cytokininů

CRF = Cytokinin Response Factor = faktor cytokininové odezvy: protein, jež jsou součástí signální dráhy cytokininů

cZ = *cis*-zeatin: jeden z isoprenoidních cytokininů

DHZ = dihydrozeatin: jeden z isoprenoidních cytokininů

DMSO = dimethylsulfoxid: organické rozpouštědlo použité k přípravě roztoků cytokininů pro exogenní aplikaci

DNPH = dinitrofenylhydrazin: reagent pro stanovení obsahu MDA

d.p.o. = den po oddělení

FR = Far Red = část červeného světelného spektra o vysoké vlnové délce

F_v/F_m = maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II

gin2-1 = glucose insensitive = necitlivý ke glukóze: mutant s nefunkčním HXK1 receptorem

GR = glutathion reductasa: antioxidační enzym

GLN = glutamin synthetasa: gen kódující remobilizační metabolismus dusíku

GSH = glutathion = antioxidační enzym

HPLC = High Performance Liquid Chromatography = vysoko účinná kapalinová chromatografie

HXK1 = hexokinasový receptor 1: receptor vnímající monosacharidy

iP = isopentenyladenin: jeden z isoprenoidních cytokininů

IPT = isopentenyltransferasa: enzym zajišťující klíčový krok biosyntézy cytokininů

LCP = Light Compensation Point = bod světelné kompenzace: rovnováha mezi mírou fotosyntézy a respirace organismu

LPO = Lipid Peroxidation = peroxidace lipidů: degradace lipidů

ore-12-1 = oresara-12-1: mutant se zvýšenou intenzitou exprese *AHK3*

mT = *meta*-topolin: jeden z aromatických cytokininů

NDVI = Normalized Difference Vegetation Index: indikátor obsahu chlorofylu: parametr měřený fluorometrem SPAD

PEA = Plant Efficiency Analyser = Analyzátor rostlinné efektivity: fluorimetr

PHYA = phytochrom A = fytochrom A: receptor vnímající světlo z červené oblasti spektra

PHYB = Phytochrom B = fytochrom B: receptor vnímající světlo z červené oblasti spektra

pga22 = Plant Growth Activator22 = aktivátor rostlinného růstu22: mutant *Arabidopsis thaliana* s estradiolem indukovatelnou overexpresí genu *AtIPT8*

POX = peroxidasa: antioxidační enzym

ROS = Reactive Oxygen Species = reaktivní formy kyslíku

RuBisCO = Ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa: klíčový enzym fotosyntézy

SAG = Senescence Associated Genes, geny spojené se senescencí

SDG = Senescence Downregulated Genes = geny downregulované senescencí

SEN4 = Senescence 4: gen, patřící mezi *SAG*; marker senescence způsobené vysokým věkem

SOD = superoxid dismutasa: antioxidační enzym

TBA = Thiobarbituric Acid = kyselina thiobarbiturová: reagent využívaný v metodě TBARP

TCA = Trichloroacetic Acid = kyselina trichloroctová

TBARS / TBARP = ThioBarbituric Acid Reactive Substances / Products: látky vzniklé při peroxidaci lipidů, které reagují s kyselinou thiobarbiturovou, resp. produkty této reakce; název pro metodu stanovení peroxidace lipidů

tZ = *trans*-zeatin: jeden z isoprenoidních cytokininů

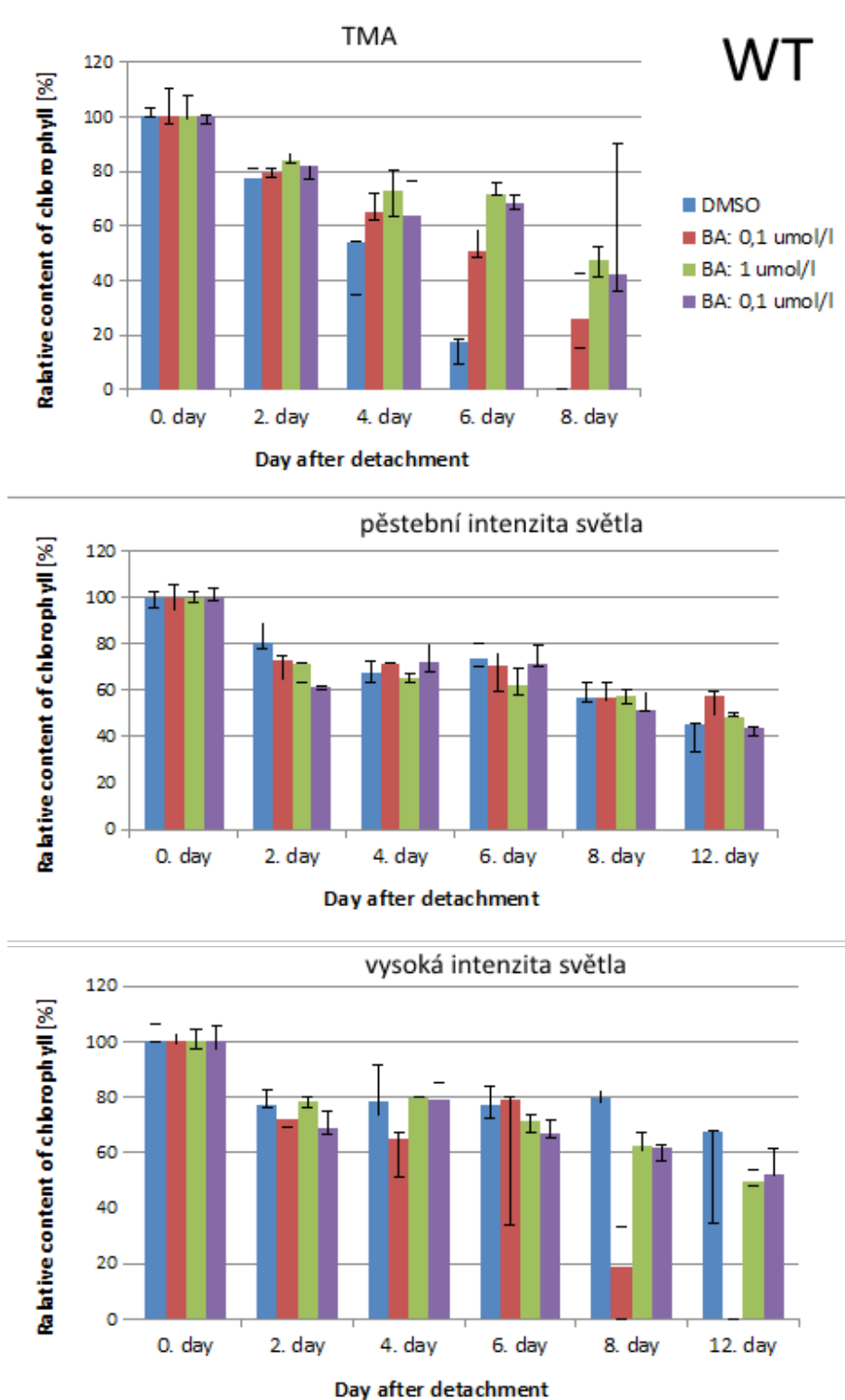
WT = wild type: typický, v přírodě se vyskytující fenotyp daného druhu

10 PŘÍLOHY

10.1 Grafy

Příloha 1: Vliv aplikace BA na relativní obsah chlorofylu u WT vzorků *Arabidopsis thaliana*

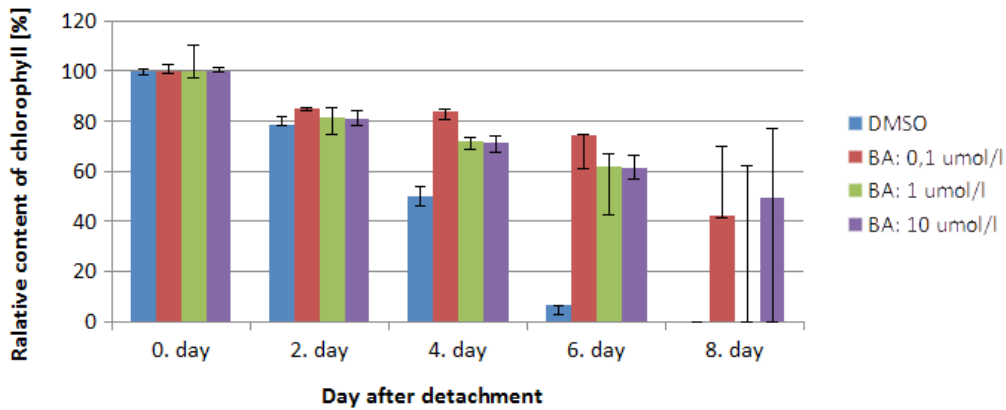
Relativní obsah chlorofylu (relative content of chlorophyll) u listů WT v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření i grafy provedla Helena Mgr. Melkovičová.



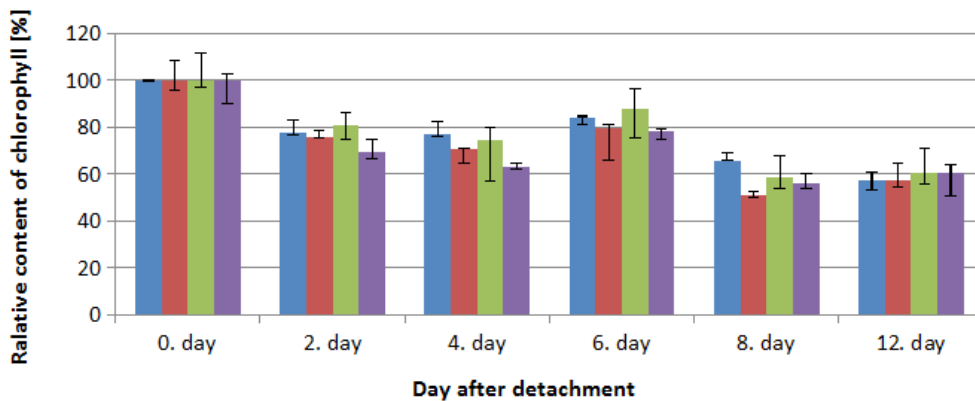
Příloha 2: Vliv aplikace BA na relativní obsah chlorofylu u oddělených listů estradiolem ovlivněných rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků WT

Relativní obsah chlorofylu (relative content of chlorophyll) u listů WT, ovlivněných estradiolem, v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno

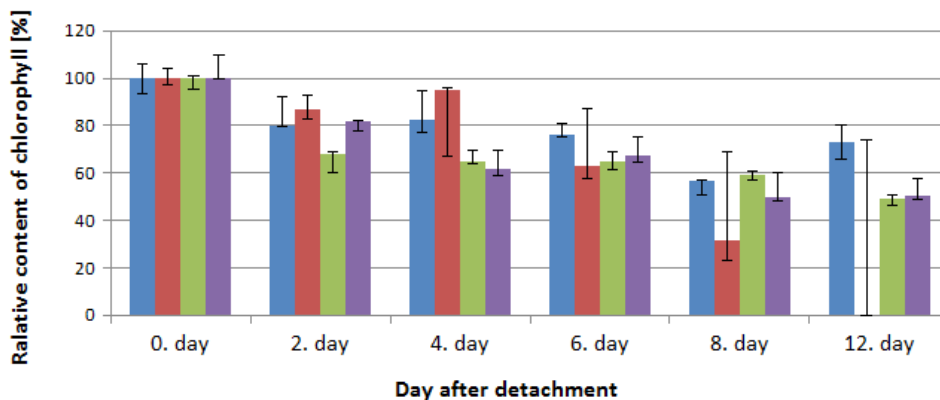
WT (I) - tma



WT (I) - nízká intenzita světla



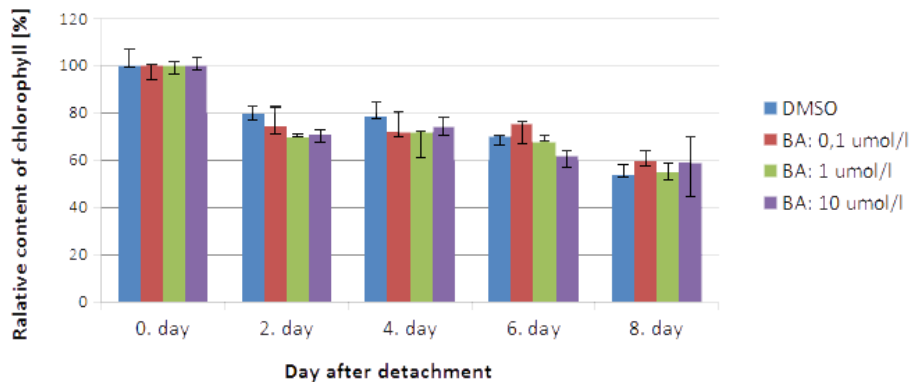
WT (I) - vysoká intenzita světla



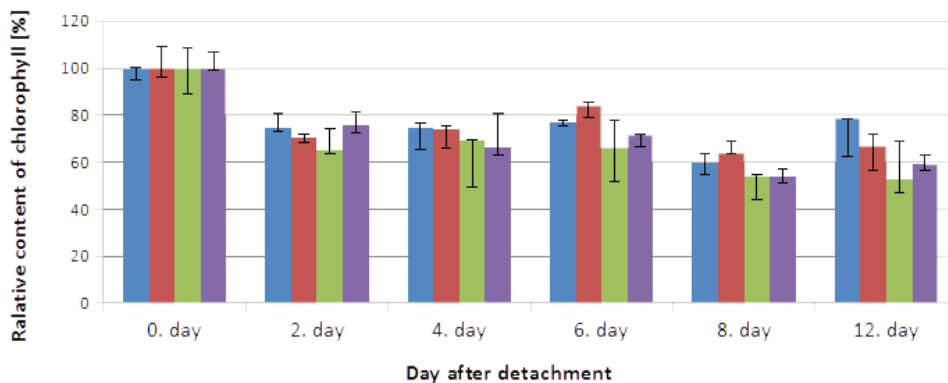
Příloha 3: Vliv aplikace BA na relativní obsah chlorofylu u oddělených listů *Arabidopsis thaliana*, vzorků *pga22*

Relativní obsah chlorofylu (relative content of chlorophyll) u listů *pga22* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno

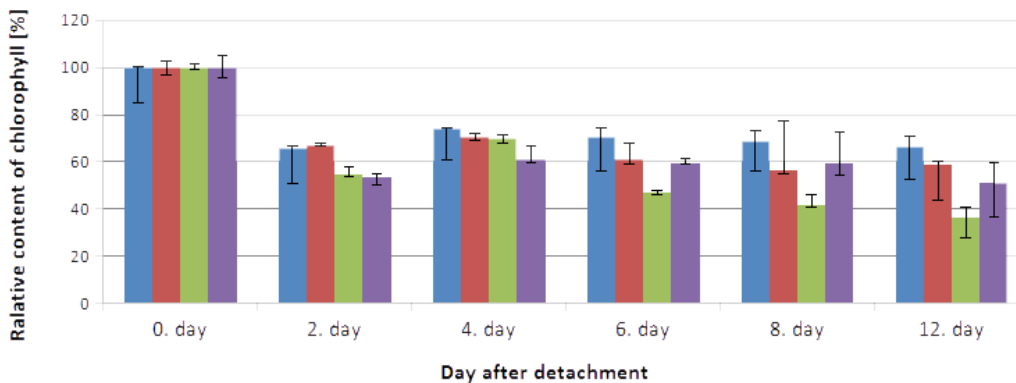
pga22 - tma



pga22 - pěstební intenzita světla

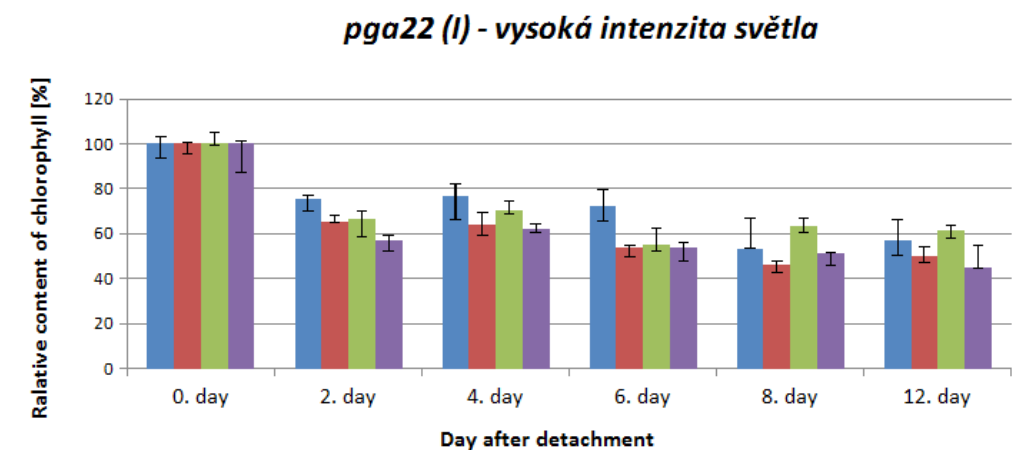
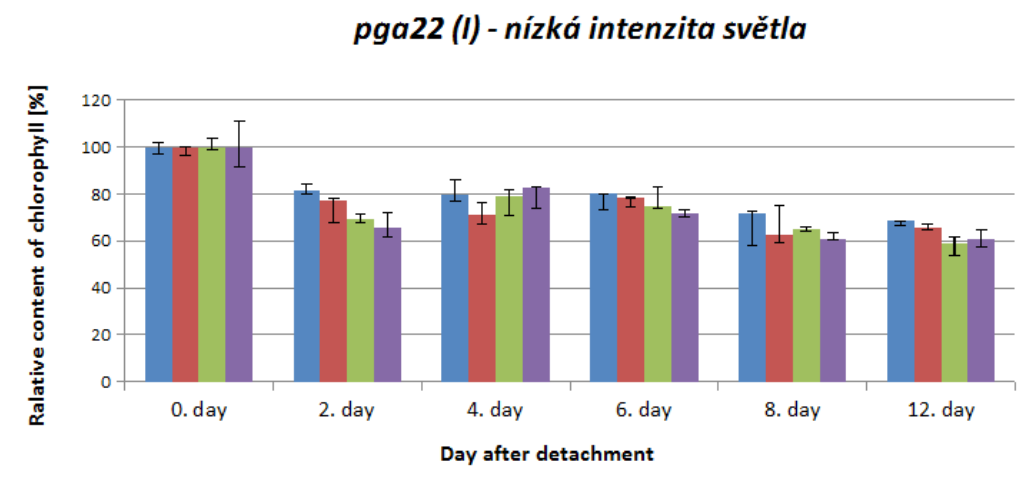
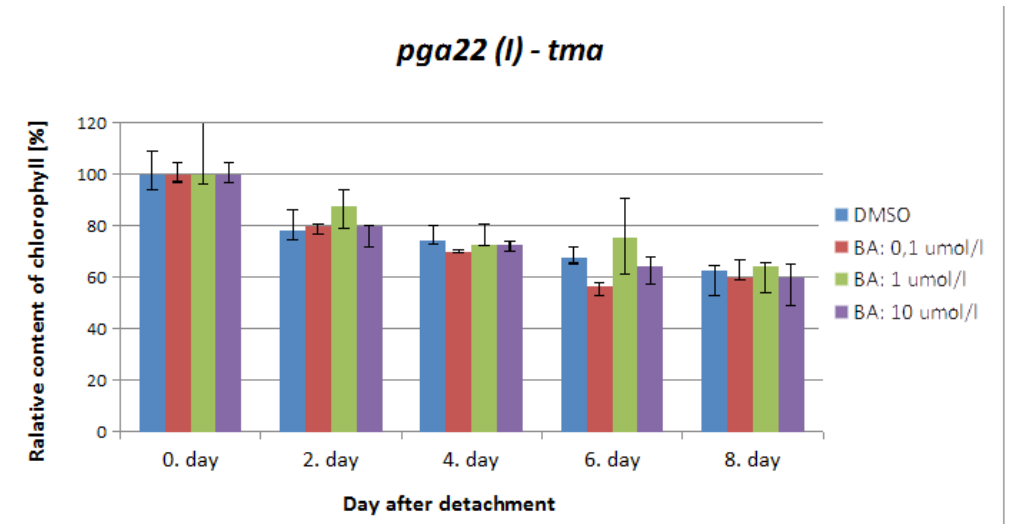


pga22 - vysoká intenzita světla



Příloha 4: Vliv aplikace BA na relativní obsah chlorofylu u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *pga22* indukovaných estradiolem

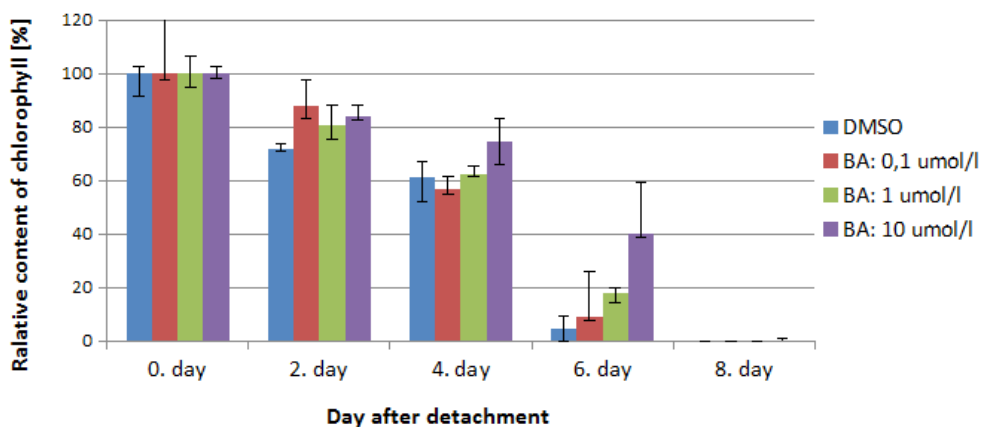
Relativní obsah chlorofylu (relative content of chlorophyll) u listů rostlin *pga22* indukovaných estradiolem v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno



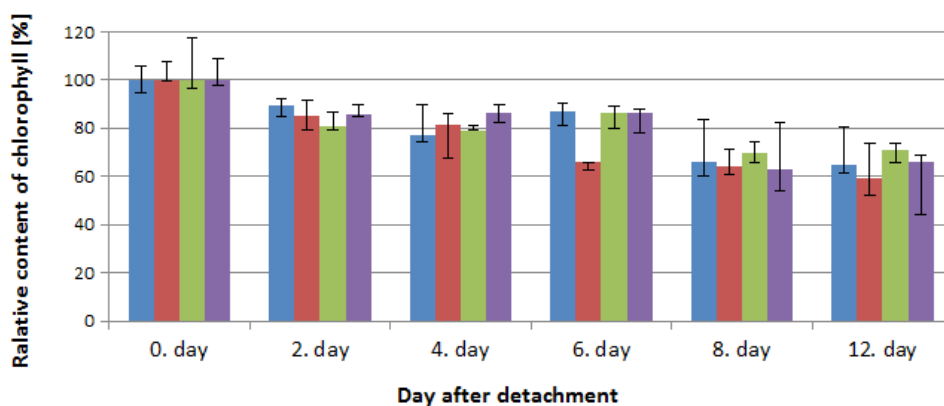
Příloha 5: Vliv aplikace BA na relativní obsah chlorofylu u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *ahk2ahk3*

Relativní obsah chlorofylu (relative content of chlorophyll) u listů rostlin *ahk2ahk3* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

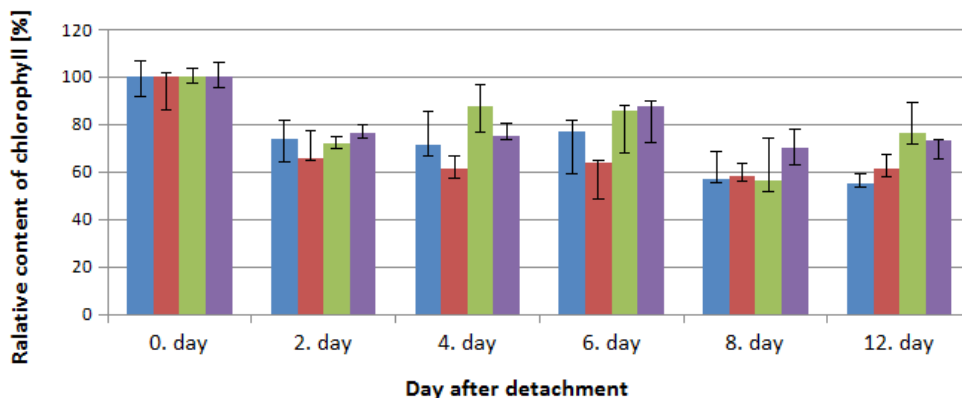
ahk2ahk3 - tma



ahk2ahk3 - nízká intenzita světla

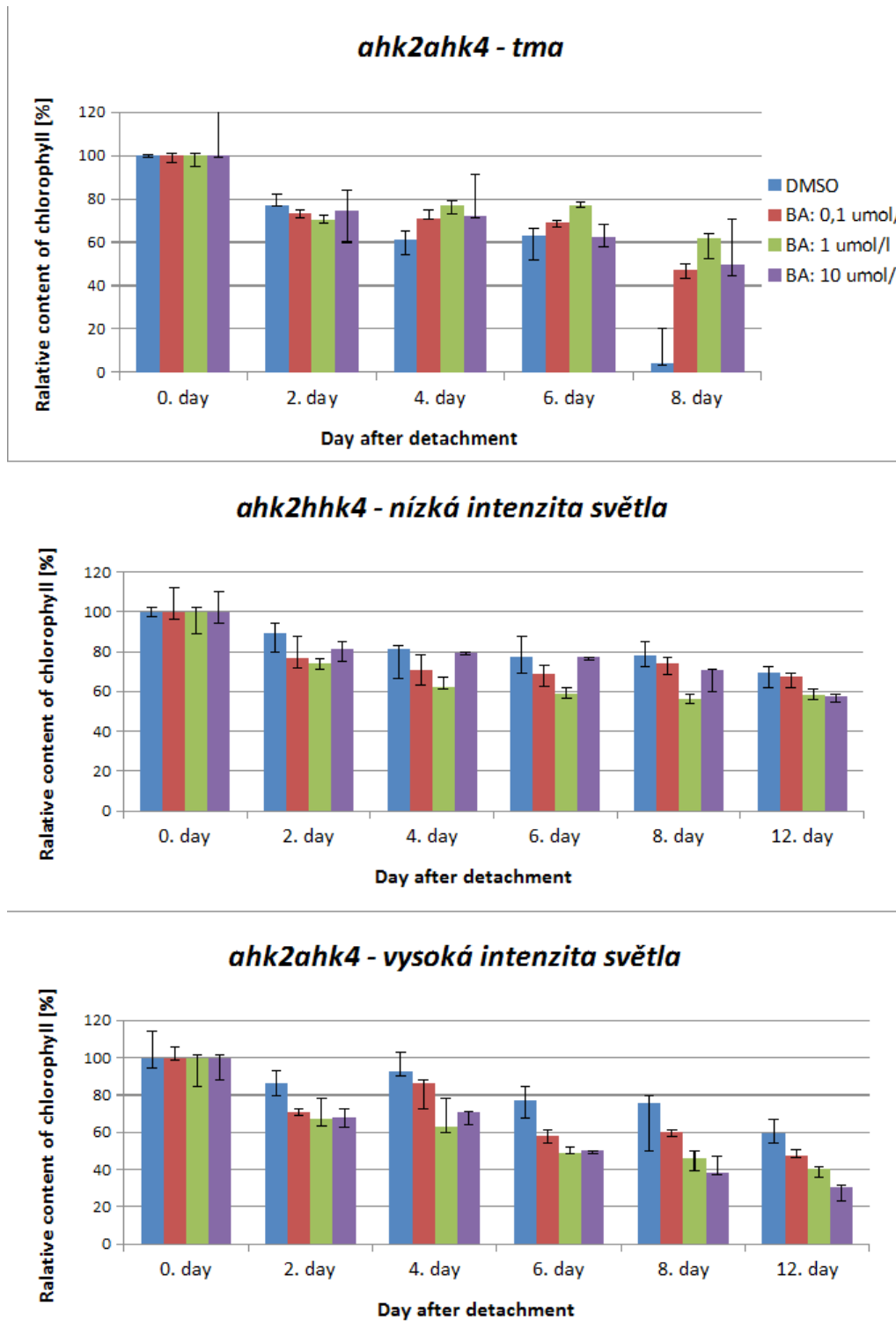


ahk2ahk3 - vysoká intenzita světla



Příloha 6: Vliv aplikace BA na relativní obsah chlorofylu u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *ahk2ahk4*

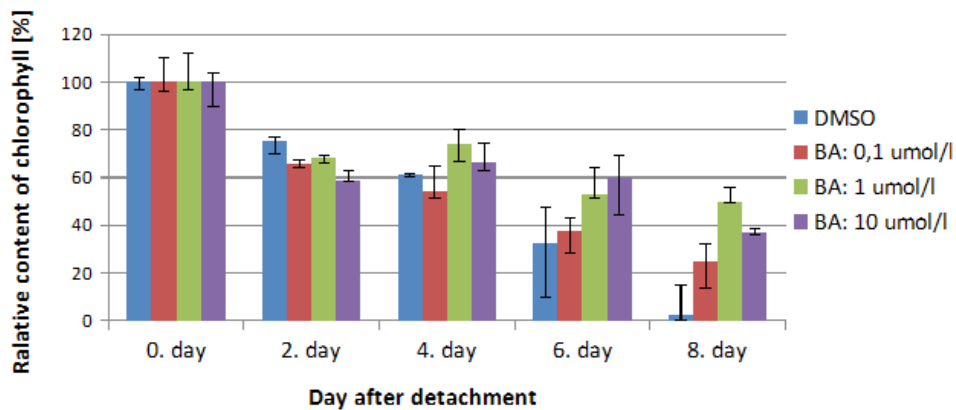
Relativní obsah chlorofylu (relative content of chlorophyll) u listů rostlin *ahk2ahk4* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.



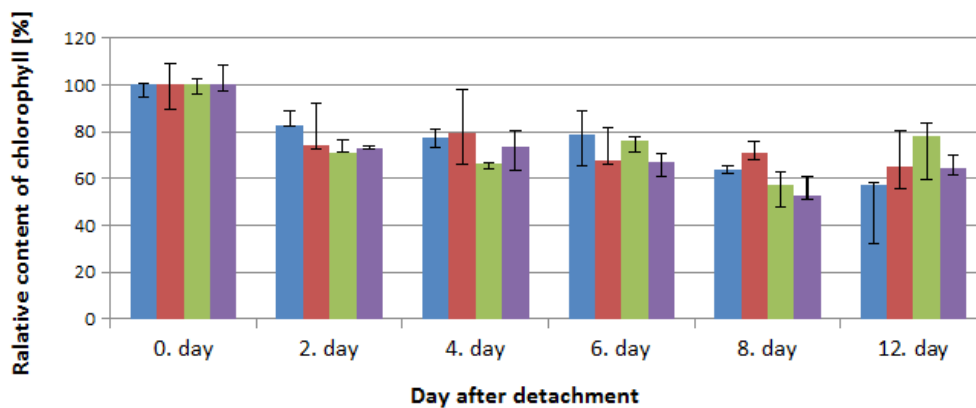
Příloha 7: Vliv aplikace BA na relativní obsah chlorofylu u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *ahk3ahk4*

Relativní obsah chlorofylu (relative content of chlorophyll) u listů rostlin *ahk3ahk4* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

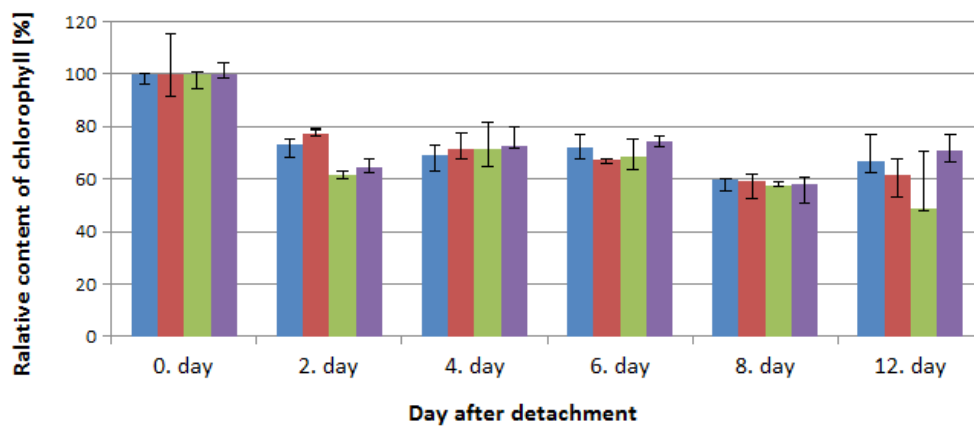
ahk3ahk4 - tma



ahk3ahk4 - nízká intenzita světla



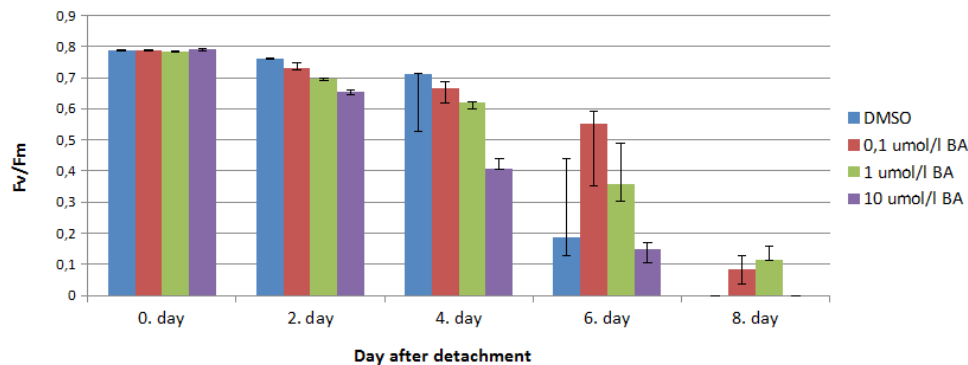
ahk3ahk4 - vysoká intenzita světla



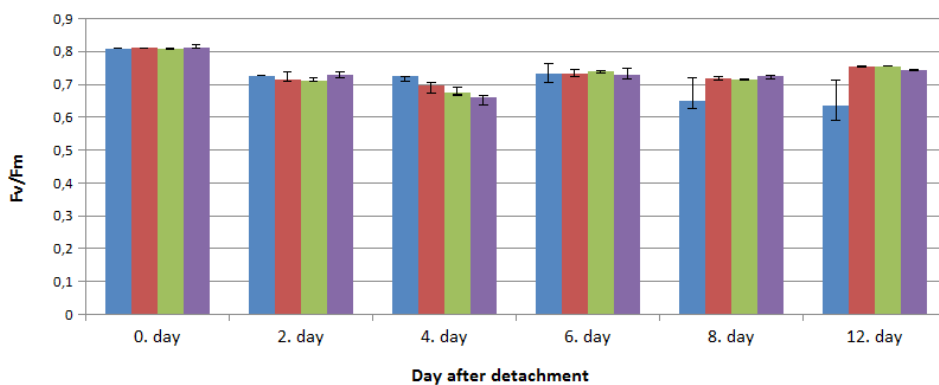
Příloha 8: Vliv aplikace BA na F_v/F_m u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků WT

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin WT, v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

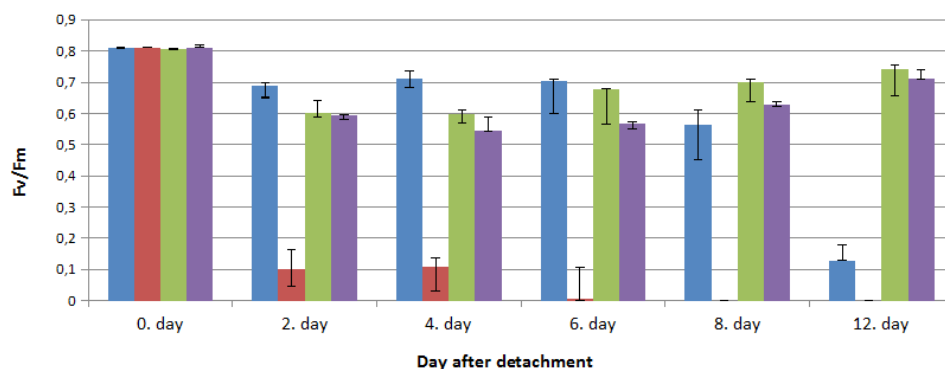
WT - tma



WT - pěstební intenzita světla



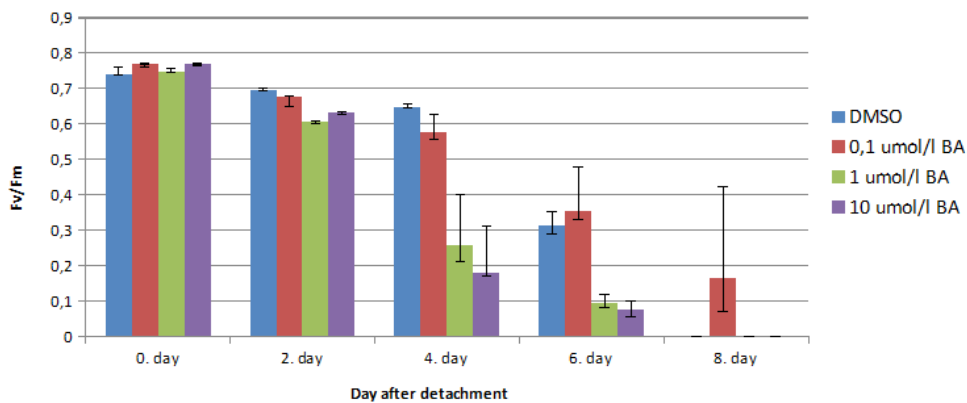
WT - high intensity



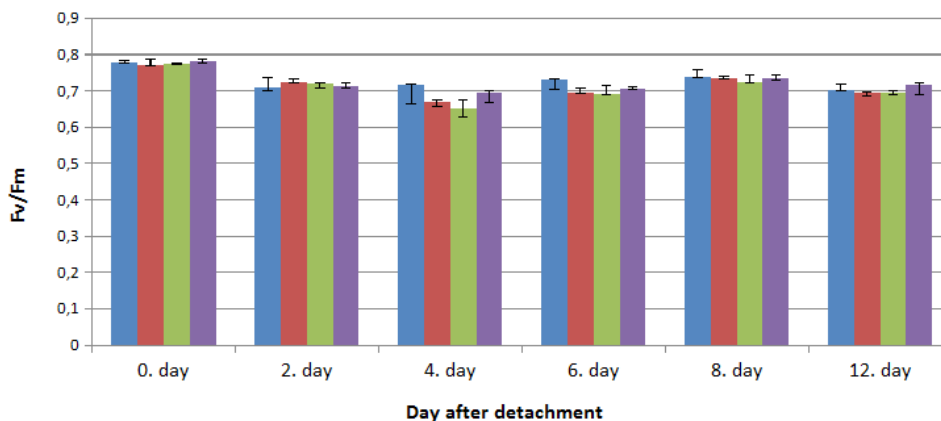
Příloha 9: Vliv aplikace BA na F_v/F_m u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků WT, ovlivněných estradiolem

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin WT, ovlivněných 17- β -estradiolem, v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

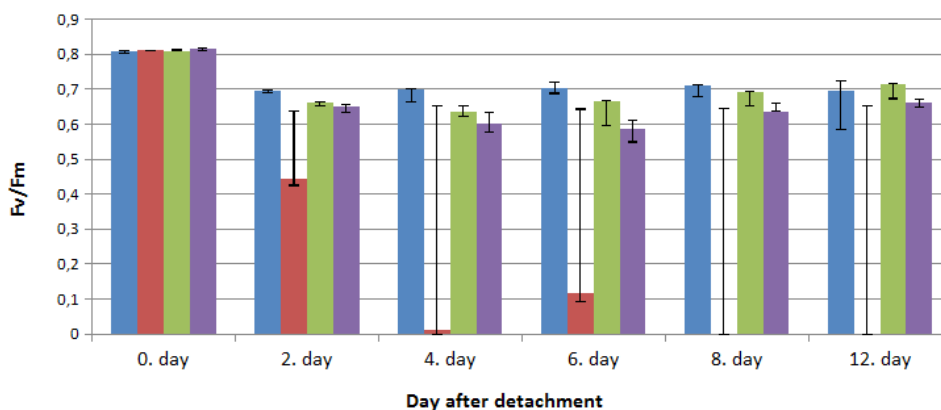
WT i - tma



WT i - pěstební intenzita světla



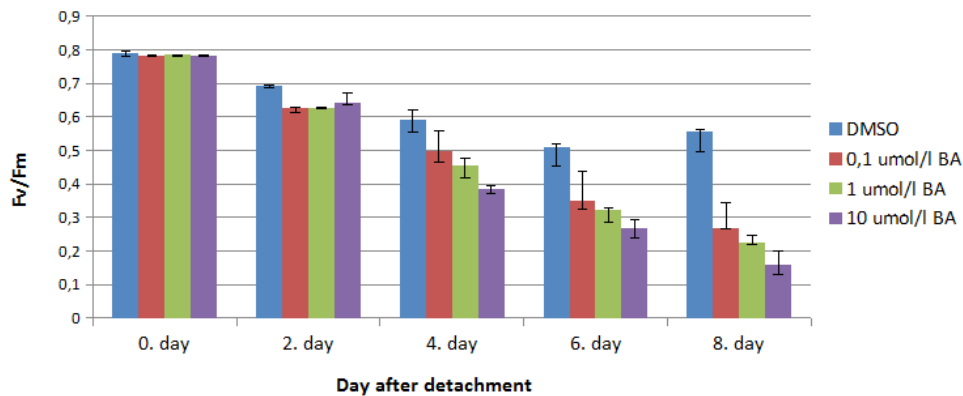
WT i - high intensity



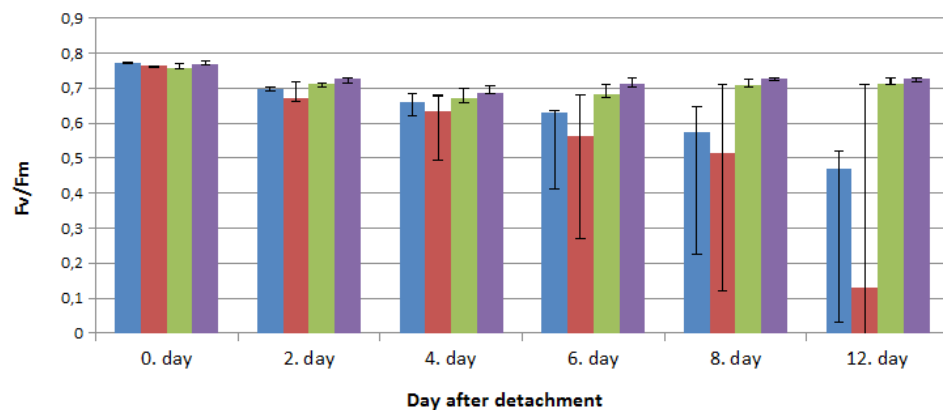
Příloha 10: Vliv aplikace BA na F_v/F_m u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *pga22*

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin *pga22* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

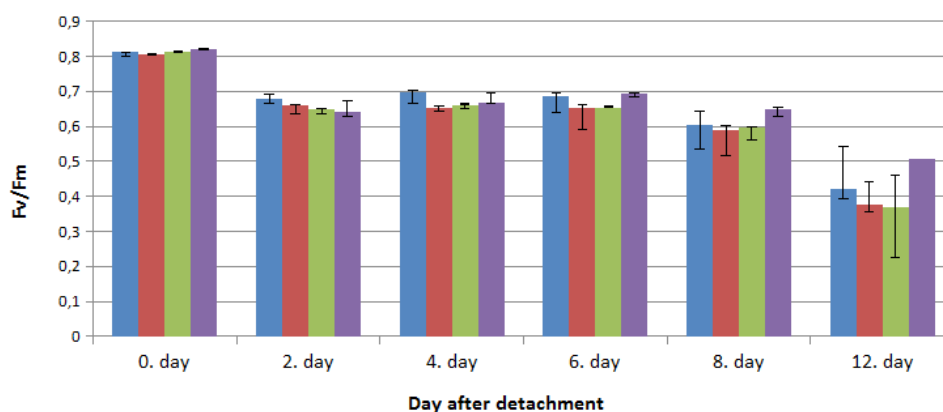
pga22 - tma



pga22 - pěstební intenzita světla



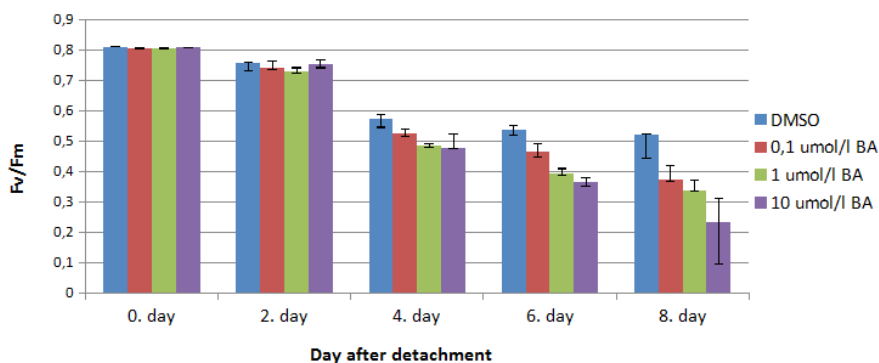
pga22 - high intensity



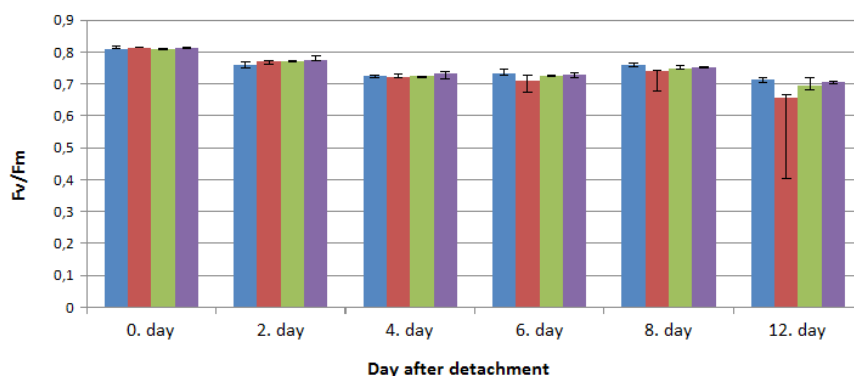
Příloha 11: Vliv aplikace BA na F_v/F_m u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *pga22*, indukovaných estradiolem

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin *pga22* indukovaných 17- β -estradiolem („*pga22 i*“) v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

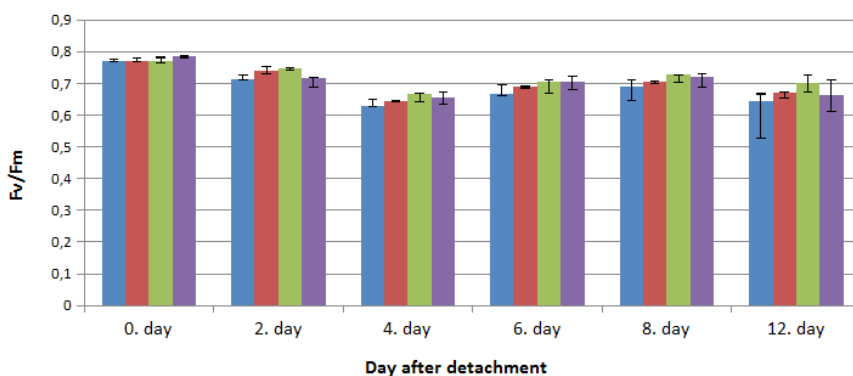
pga22 i - tma



pga22 i - pěstební intenzita světla



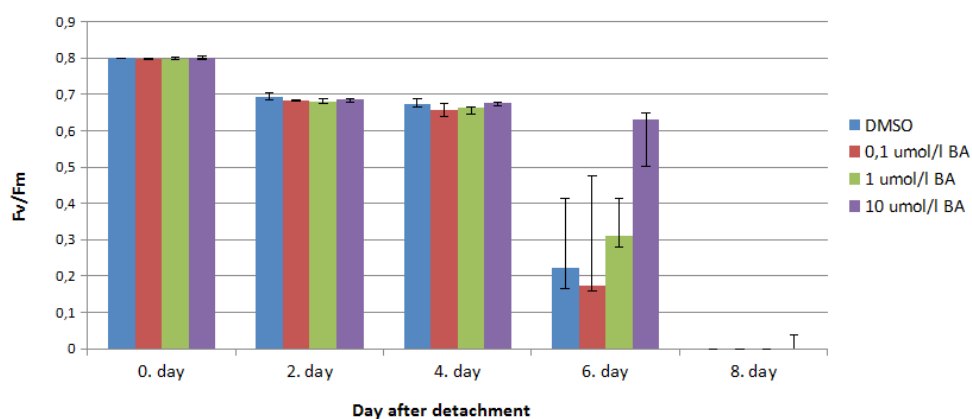
pga22 (l) - high intensity



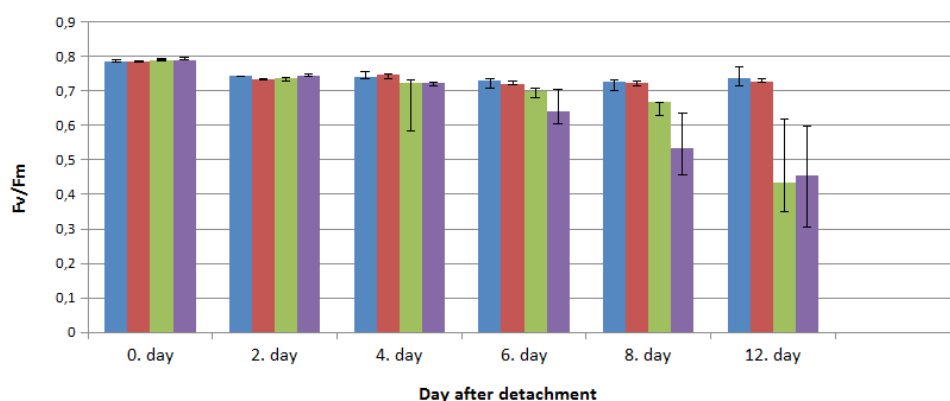
Příloha 12: Vliv aplikace BA na F_v/F_m u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *ahk2ahk3*

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin *ahk2ahk3* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

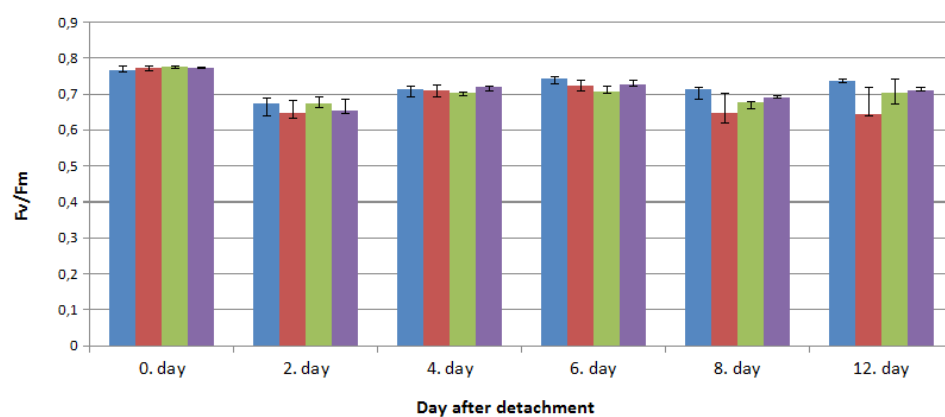
ahk2, 3 - dark



ahk2ahk3 - pěstební intenzita světla



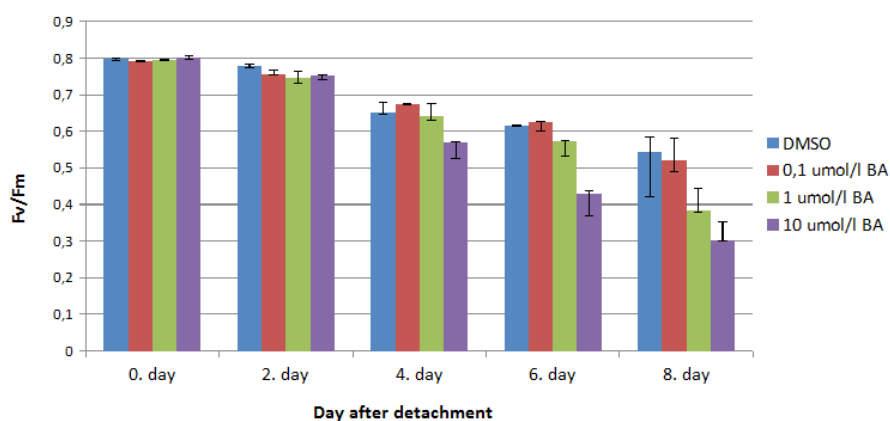
ahk2ahk3 - vysoká intenzita světla



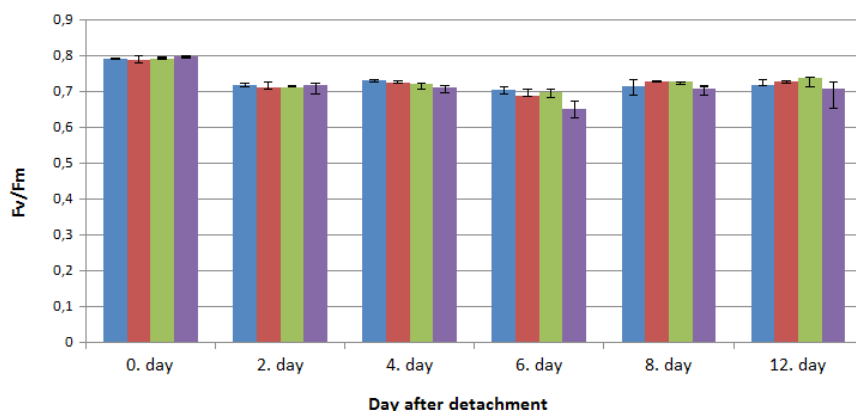
Příloha 13: Vliv aplikace BA na F_v/F_m u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *ahk2ahk4*

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin *ahk2ahk4* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.

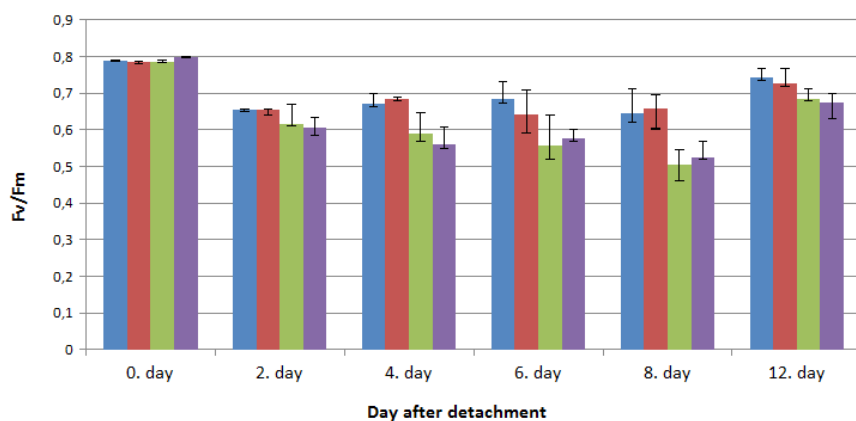
ahk2, 4 - dark



ahk2ahk 4 - pěstební intenzita světla

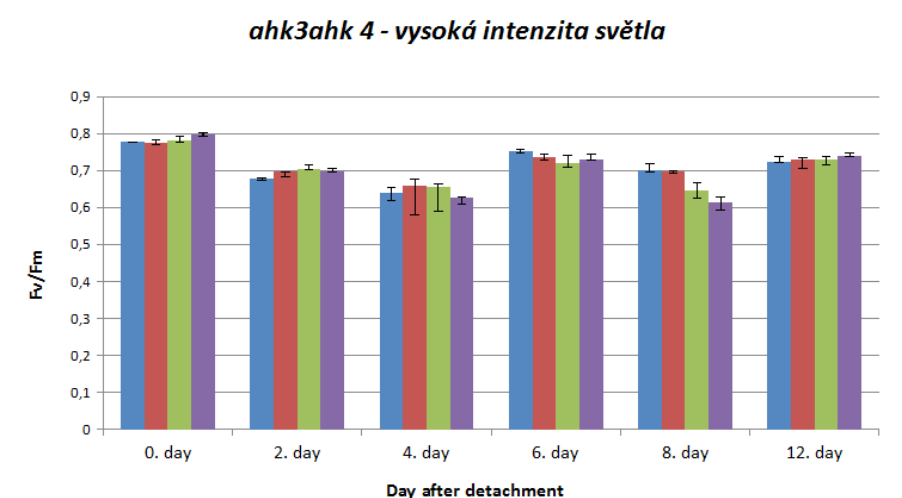
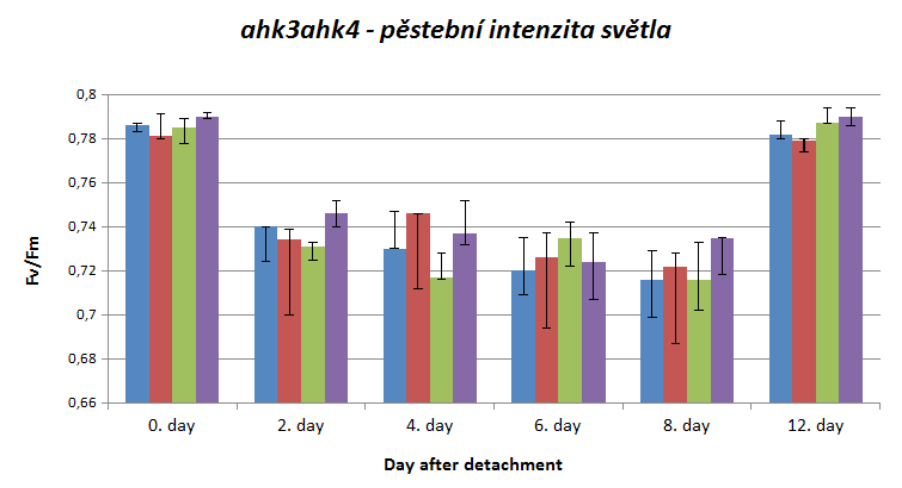
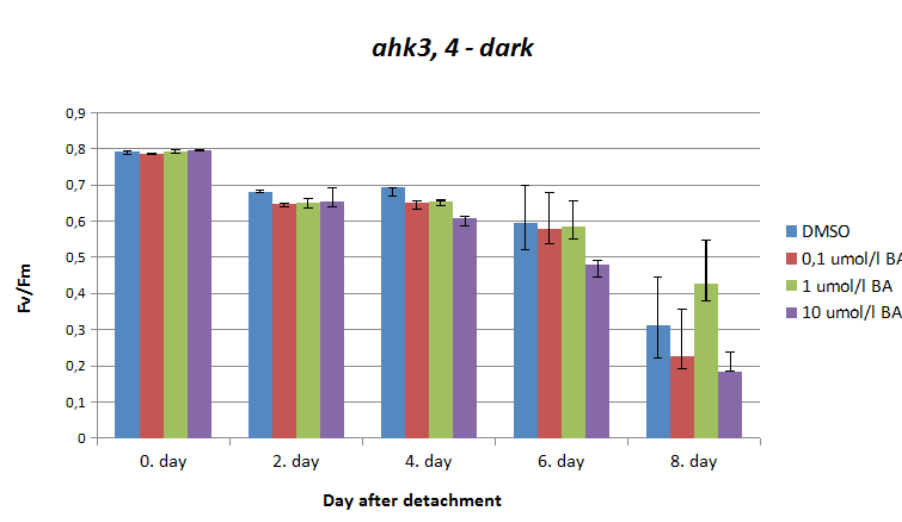


ahk2ahk4 - vysoká intenzita světla



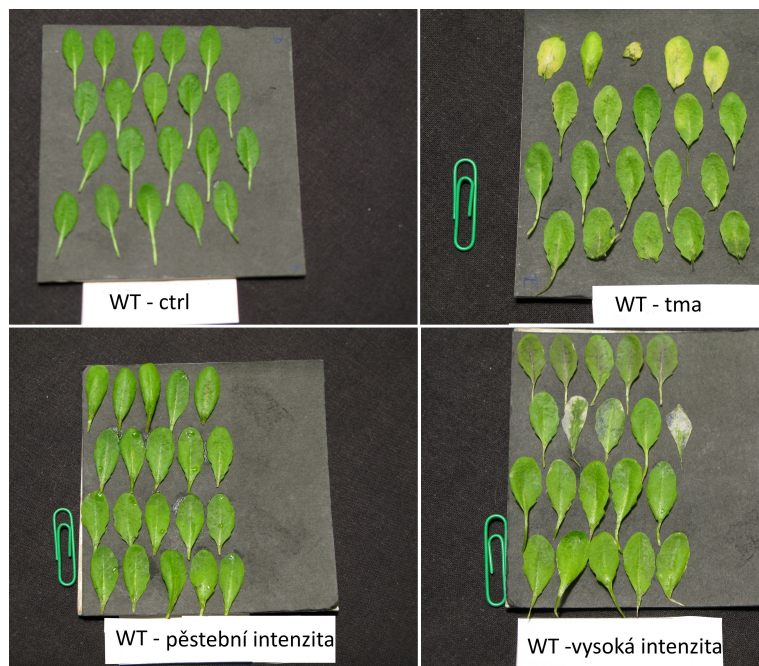
Příloha 14: Vliv aplikace BA na F_v/F_m u oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, vzorků *ahk3ahk4*

Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) u listů rostlin *ahk3ahk4* v průběhu několika dní po oddělení (day after detachment = den po oddělení) a za různých světelných podmínek. DMSO reprezentuje vzorky kultivované bez exogenní aplikace BA. Měření provedla a grafy vytvořila Mgr. Helena Melkovičová; upraveno.



10.2 Fotografie

Příloha 15: Fotografie oddělených WT listů *Arabidopsis thaliana* při kultivaci v různých podmínkách



Fotografie ukazují vzhled WT listů v čase těsně po oddělení („ctrl“) anebo po oddělení a následné šestidenní kultivaci za různých světelných podmínek:

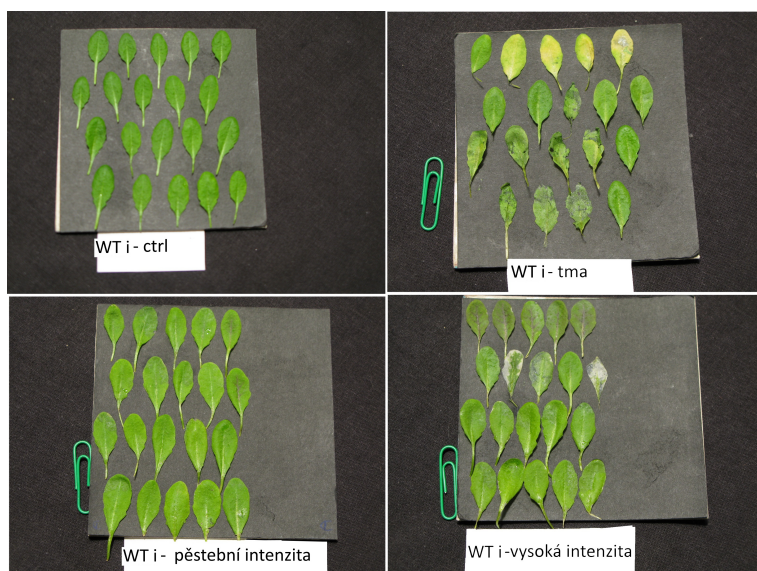
ve tmě („tma“),

na pěstební intenzitě světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „pěstební intenzita“),

a na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „vysoká intenzita“).

Řady listů jsou seřazeny sestupně podle koncentrace benzyladeninu (0 , $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikovaného do kultivačního roztoku. Fotografie pořídila Mgr. Helena Melkovičová; byly upraveny.

Příloha 16: Fotografie oddělených WT listů *Arabidopsis thaliana*, ovlivněných estradiolem, při kultivaci v různých podmínkách



Fotografie ukazují vzhled WT listů ovlivněných estradiolem („WT i“)

v čase těsně po oddělení („ctrl“) anebo po oddělení a následné šestidenní kultivaci za různých světelných podmínek:

ve tmě („tma“),

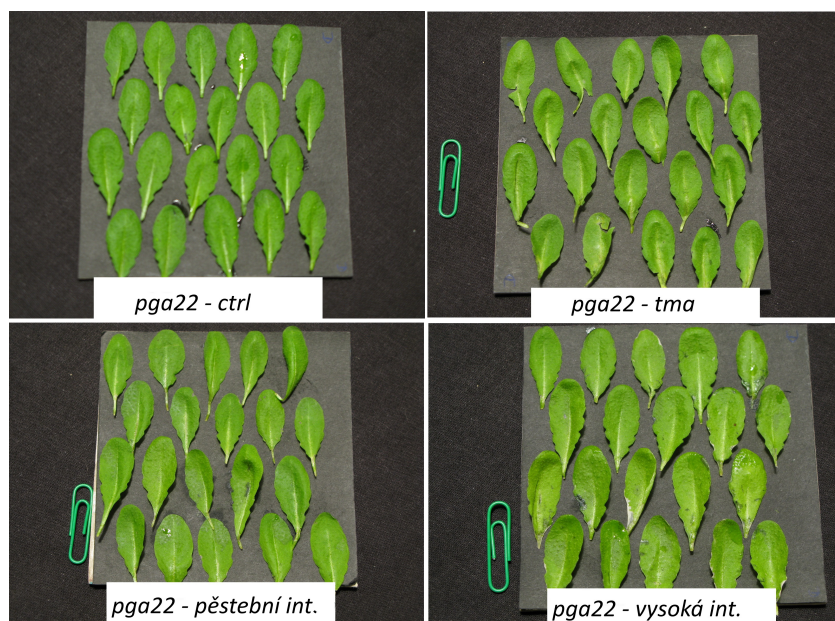
na pěstební intenzitě světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „pěstební intenzita“),

a na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „vysoká intenzita“).

Řady listů jsou seřazeny sestupně podle koncentrace benzyladeninu (0 , 10^{-7}

$10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikovaného do kultivačního roztoku. Fotografie pořídila Mgr. Helena Melkovičová; byly upraveny

Příloha 17: Fotografie oddělených *Arabidopsis thaliana* listů mutanta *pga22*; kultivace v různých podmínkách



Fotografie ukazují srovnání vzhledu listů *pga22* („*pga22*^{cc}“), v čase těsně po oddělení („*ctrl*^{cc}“) anebo po oddělení a následné šestidenní kultivaci za různých světelných podmínek:

ve tmě („*tma*^{cc}“),

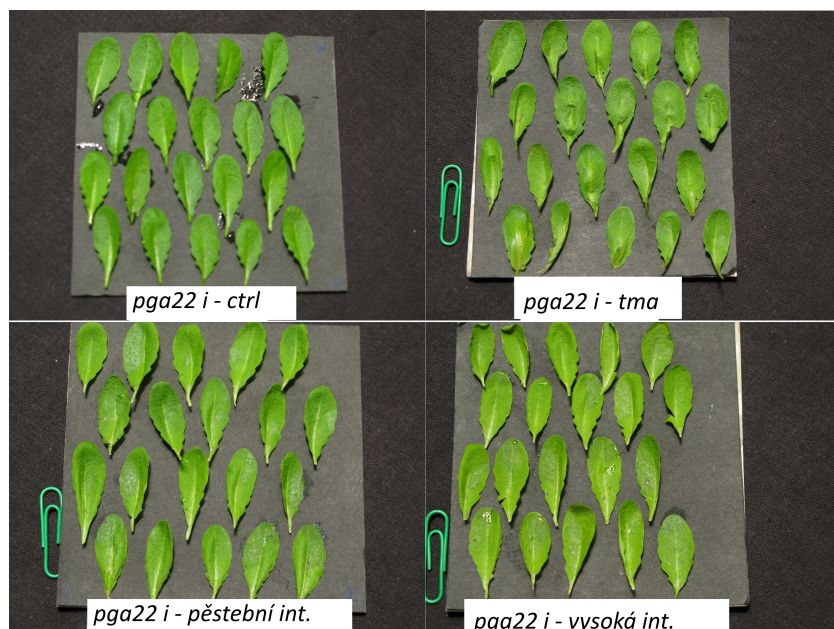
na pěstební intenzita světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „*pěstební int.*^{cc}“),

a na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ „*vysoká int.*^{cc}“).

Řady listů jsou seřazeny

sestupně podle koncentrace benzyladeninu (0 , $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikovaného do kultivačního roztoku. Fotografie pořídila Mgr. Helena Melkovičová; byly upraveny.

Příloha 18: Fotografie oddělených listů estradiolem indukovaných rostlin *Arabidopsis thaliana*, mutanta *pga22*; kultivace v různých podmínkách



Fotografie ukazují srovnání vzhledu listů *pga22*, jež byly ovlivněny 17- β -estradiolem („*pga22 i*^{cc}“), v čase těsně po oddělení („*ctrl*^{cc}“) anebo po oddělení a následné šestidenní kultivaci, která proběhla v různých podmínkách:

ve tmě („*tma*^{cc}“),

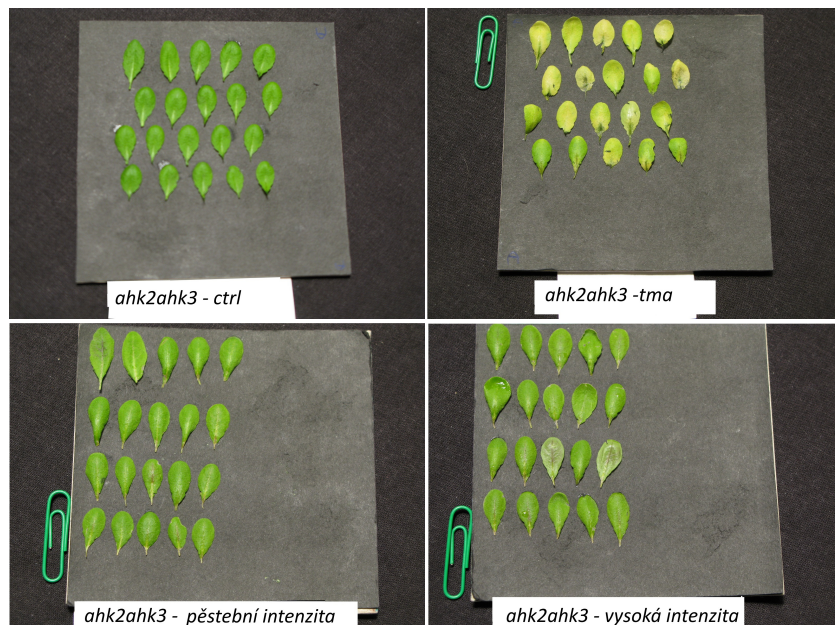
na pěstební intenzita světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „*pěstební intenzita*^{cc}“),

a na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ „*vysoká intenzita*^{cc}“).

Řady listů jsou seřazeny

sestupně podle koncentrace benzyladeninu (0 , $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikovaného do kultivačního roztoku. Fotografie pořídila Mgr. Helena Melkovičová; byly upraveny.

Příloha 19: Fotografie oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, mutanta *ahk2ahk3*; kultivace v různých podmínkách



Fotografie ukazují srovnání vzhledu listů *ahk2ahk3*, („*ahk2ahk3*“), v čase těsně po oddělení („ctrl“) anebo po oddělení a následné šestidenní kultivaci za různých světelných podmínek:

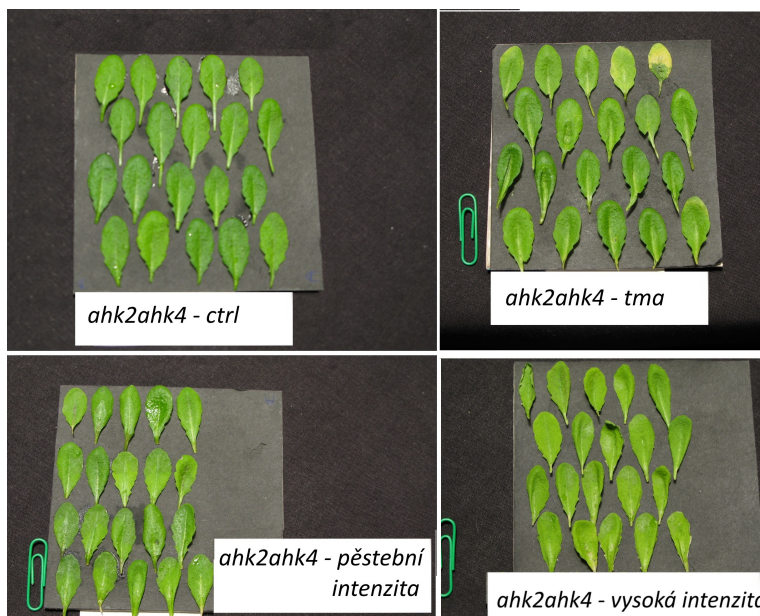
ve tmě („tma“),

na pěstební intenzita světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „pěstební intenzita“),

a na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ „vysoká intenzita“).

Řady listů jsou seřazeny sestupně podle koncentrace benzyladeninu (0 , $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikovaného do kultivačního roztoku. Fotografie pořídila Mgr. Helena Melkovičová; byly upraveny.

Příloha 20: Fotografie oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, mutanta *ahk2ahk4*; kultivace v různých podmínkách



Fotografie ukazují srovnání vzhledu listů *ahk2ahk4*, („*ahk2ahk4*“), v čase těsně po oddělení („ctrl“) anebo po oddělení a následné šestidenní kultivaci za různých světelných podmínek:

ve tmě („tma“),

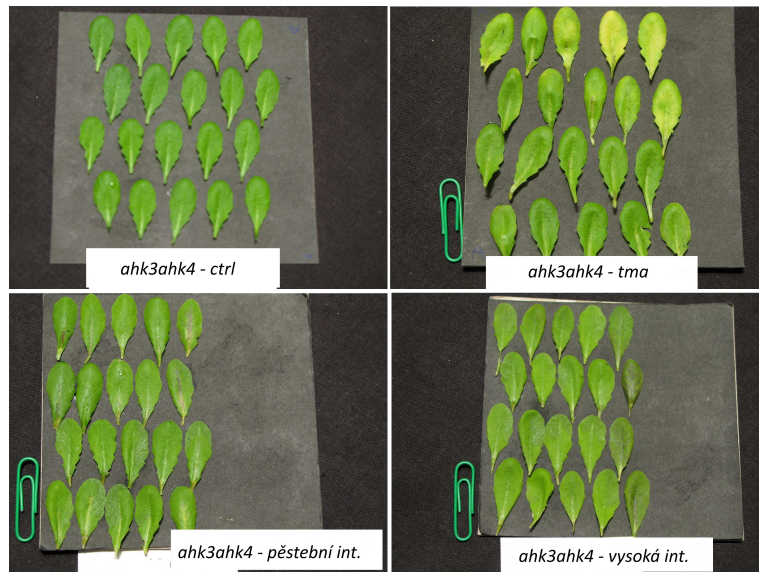
na pěstební intenzita světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „pěstební intenzita“),

a na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ „vysoká intenzita“).

Řady listů jsou seřazeny sestupně podle koncentrace benzyladeninu (0 , $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikovaného

do kultivačního roztoku. Fotografie pořídila Mgr. Helena Melkovičová; byly upraveny.

Příloha 21: Fotografie oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana*, mutanta *ahk3ahk4*; kultivace v různých podmínkách



Tyto fotografie ukazují srovnání vzhledu listů *ahk3ahk4*, („*ahk3ahk4*“), v čase těsně po oddělení („ctrl“) anebo po oddělení a následné šestidenní kultivaci za různých světelných podmínek:

ve tmě („tma“),

na pěstební intenzita světla ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, „pěstební int.“,

a na vysoké intenzitě světla ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ „vysoká int.“).

Řady listů jsou seřazeny sestupně podle koncentrace benzyladeninu (0 , $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10^{-5}

$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aplikovaného do kultivačního roztoku. Fotografie pořídila Mgr. Helena Melkovičová; byly upraveny.