

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Vliv aplikace nového derivátu cytokininu na průběh  
stresu v intaktních rostlinách

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Denisa Gregůrková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Denisa Gregůrková
Název práce:	Vliv aplikace nového derivátu cytokininu na průběh stresu v intaktních rostlinách
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra chemické biologie
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.
Rok obhajoby:	2023
Abstrakt:	<p>Předkládaná bakalářská práce se zabývá působením nového derivátu cytokininu (mesylátu) na fotosyntetické parametry a metabolismus cytokininů v rostlinách ječmene vystavených suchu. V teoretické části je shrnuta problematika reakcí fotosyntézy a růstu rostlin na stres suchem a role cytokininů ovlivňující tyto procesy. Cílem experimentální části byla optimalizace stresu suchem včetně aplikace a monitorování účinků nově nasyntetizovaných derivátů cytokininů na intaktních rostlinách. Intaktní rostliny jarního ječmene (<i>Hordeum vulgare L.</i>) byly vedle kontrolních ošetření vodou a DMSO, ošetřeny postřikem látkami MeOBAP (6-(3-methoxybenzylamino)purin) a MeOBAPM (6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát) a byly studovány účinky látek během stresu suchem na obsah fotosyntetických pigmentů, parametry velmi rychlé a pomalé fluorescence indukce chlorofylu <i>a</i> a v neposlední řadě na koncentrace jednotlivých cytokininových typů ve studovaných listech. Aplikované látky prostřednictvím zachování fotosyntetických pigmentů, oddálení poškození funkčnosti fotosystému II a zvýšením množství aktivních forem cytokininů (zejména iP, cZ a mT typů) působily protektivně a zvyšovaly schopnosti rostlin ječmene tolerovat stres suchem.</p>
Klíčová slova:	Stres, sucho, ječmen, cytokinin, mesylát, fotosyntéza, fluorescence chlorofylu
Počet stran:	61
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

## Bibliographic identification

Author's first name and surname:	Denisa Gregůrková
Title of thesis:	Effect of application of cytokinin derivivate on stress progression in plants
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Chemical Biology
Supervisor:	Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.
The year of presentation:	2023
Abstract:	<p>The present bachelor thesis deals with the effect of a new cytokinin derivative (mesylate) on photosynthetic parameters and cytokinin metabolism in barley plants exposed to drought. The theoretical part summarizes the problems of photosynthesis and plant growth responses to drought stress and the role of cytokinins affecting these processes. The aim of the experimental part was to optimize drought stress, including application and monitoring of the effects of newly synthesized cytokinin derivatives on intact plants. Intact plants of spring barley (<i>Hordeum vulgare L.</i>) were treated with MeOBAP (6-(3-methoxybenzylamino)purine) and MeOBAPM (6-(3-methoxybenzylamino)purine mesylate) foliar application, in addition to control treatments with water and DMSO. The effects of the compounds during drought stress on the content of photosynthetic pigments, the parameters of very fast and slow chlorophyll <i>a</i> fluorescence induction, and, last but not least, on the concentrations of individual cytokinin types in the analysed leaves were studied. The applied substances, by preserving photosynthetic pigments, delaying damage to photosystem II functionality and increasing the amount of active forms of cytokinins (especially iP, cZ and mT types), exerted a protective effect and increased the ability of barley plants to encompass the drought stress.</p>
Keywords:	Stress, drought, barley, cytokinin, mesylate, photosynthesis, chlorophyll fluorescence
Number of pages:	61
Number of appendices:	2
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Vladimíry Nožkové, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování: Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D. z Katedry chemické biologie za odborné vedení, rady a motivaci při tvorbě této práce, dále Mgr. Dardanovi Klosovi za přípravu aplikovaných látek, Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. za analýzu cytokininů v rostlinném materiálu a Mgr. Karlu Doležalovi, Dr., DSc. za konzultaci hormonálních výsledků.

## OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	7
<b>1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE</b> .....	9
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	10
<b>2.1 Klimatická změna</b> .....	10
<b>2.2 Sucho</b> .....	10
<b>2.3 Reakce rostlin na sucho</b> .....	11
<b>2.4 Fotosyntéza a sucho</b> .....	12
<b>2.4.1 Obsah chlorofylu a sucho</b> .....	14
<b>2.4.2 Optické vlastnosti listu a sucho</b> .....	16
<b>2.5 Fytohormony, fotosyntéza a sucho</b> .....	17
<b>2.5.1 Cytokininy, fotosyntéza a sucho</b> .....	18
<b>2.5.2 Cytokininy v zemědělství</b> .....	19
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	21
<b>3.1 POUŽITÉ LÁTKY PRO OŠETŘENÍ ROSTLIN</b> .....	21
<b>3.2 ROSTLINNÝ MATERIÁL A OŠETŘENÍ</b> .....	21
<b>3.2.1 Stres suchem</b> .....	22
<b>3.3 POUŽITÉ METODY</b> .....	26
<b>3.3.1 Neinvazivní metody</b> .....	26
<b>3.3.2 Invazivní (destruktivní) metody</b> .....	28
<b>3.3.3 Analýza a zpracování dat</b> .....	31
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	32
<b>5 DISKUZE</b> .....	43
<b>6 ZÁVĚR</b> .....	48
<b>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	49
<b>8 PŘÍLOHY</b> .....	59

## SEZNAM ZKRATEK

$\Phi_{f,D}$	kvantový výtěžek pro konstitutivní neregulované disipační procesy
$\Phi_{NPQ}$	kvantový výtěžek regulovaného nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu
$\Phi_P$	maximální kvantový výtěžek ve stavu přizpůsobeném světlu
$\Phi_{PSII}$	aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu přizpůsobeném světlu
ABA	kyselina abscisová
ABS/RC	zdánlivá velikost antény aktivního PSII
BAP	6-benzylaminopurin
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZ9G	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
cZOG	<i>cis</i> -zeatin O-glukosid
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
cZROG	<i>cis</i> -zeatin ribosid O-glukosid
DMSO	dimethylsulfoxid
DW	hmotnost sušiny
$(dV/dt)_0$	počáteční nárůst rychlosti akumulace fluorescence O-J
$F_0$	minimální hodnota fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu
$F_0'$	minimální hodnota fluorescence ve stavu adaptovaném na světlu
$F_I$	fluorescence v bodě I křivky OJIP
$F_J$	fluorescence v bodě J křivky OJIP
$F_M$	maximální hodnota fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu
$F_M'$	maximální hodnota fluorescence ve stavu adaptovaném na světlu
$F_p$	maximální dosažitelná hladina fluorescence
$F_t$	aktuální fluorescence měřená před aplikací pulzu
$F_v/F_M$	maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII
$F_v$	maximální variabilní fluorescence ve stavu adaptovaném na tmu
$F_v'$	maximální variabilní fluorescence ve stavu adaptovaném na světlu
FW	hmotnost čerstvé hmoty
iP	N <sup>6</sup> -isopentenyladenin
iPR	N <sup>6</sup> -isopentenyladenin ribosid

iPR5'MP	N <sup>6</sup> -isopentenyladenin ribosid 5'-monofosfát
iP9G	N <sup>6</sup> -isopentenyladenin-9-glukosid
LAle	efektivní index listové zelené plochy
MeOBAP	6-(3-methoxybenzylamino)purin
MeOBAPM	6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát
mT	<i>meta</i> -topolin
mTR	<i>meta</i> -topolin ribosid
mT7G	<i>meta</i> -topolin-7-glukosid
mT9G	<i>meta</i> -topolin-9-glukosid
NDVI	normalizovaný vegetační index
NPQ	nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
PEA	Plant Efficiency Analyser
PEG	polyethylenglykol
PRI	index fotochemické reflektance
PSI/PSII	fotosystém I/fotosystém II
Q <sub>A</sub> /Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>	plastochinon A/plastochinon A redukovaný
q <sub>p</sub>	koeficient fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu
RC	reakční centra
ROS	reaktivní formy kyslíku
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
RWC	relativní obsah vody
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZOG	<i>trans</i> -zeatin O-glukosid
tZ9G	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
V <sub>I</sub>	relativní variabilní fluorescence v bodě I křivky OJIP
V <sub>J</sub>	relativní variabilní fluorescence v bodě J křivky OJIP
WC	obsah vody
WT	wild-type



# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

V důsledku globálního oteplování na rostliny působí různé stresy, mezi kterými je sucho jedním z nejzávažnějších. Sucho negativně ovlivňuje rostliny v průběhu celého životního cyklu. Stres suchem působí zmenšení listové plochy a snížení počtu listů, klesá obsah chlorofylu a dochází k narušení fotosyntetické aktivity, což v konečném důsledku vede k poklesu produkce i kvality plodin. Studium stresu suchem a možností jeho ovlivnění je důležité k dosažení vyšší produkce v zemědělství i za takto nepříznivých podmínek. Významnou zemědělskou plodinou pro studium stresu suchem je ječmen setý (*Hordeum vulgare L.*), který je pěstován k výrobě sladu, potravin a krmiv.

Rostlinné hormony cytokininy jsou známy mimo jiné svou ochrannou funkcí u rostlin vystavených různým stresovým podmínkám, kdy se podílejí na zachování struktury a funkce fotosyntetického aparátu. Exogenní aplikace cytokininů a jejich derivátů může při stresu suchem působit protektivně, ale může vykazovat i některé negativní účinky. Před aplikací v zemědělství a polních podmínkách je důležitá nejprve optimalizace aplikace a použití vhodné koncentrace.

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se problematiky působení sucha na růst rostlin a fotosyntézu a popsat účinky cytokininů v reakci na stres suchem. V experimentální části byla cílem optimalizace aplikace nově nasyntetizovaných derivátů cytokininů na intaktní rostliny jarního ječmene (*Hordeum vulgare L.*), monitorování účinků aplikovaných látek na fyziologický stav rostliny po vystavení stresu suchem a jejich vyhodnocení.

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Klimatická změna**

Zemědělství a klimatická změna se vyznačují komplexním vztahem příčin a následků. Zemědělský sektor produkuje značné množství skleníkových plynů, které ovlivňují klima. Nárůst koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, zvyšování teplot a změny srážkového režimu mají vliv na objem, kvalitu a stabilitu zemědělské produkce i na životní prostředí (Agovino a kol., 2019).

Z výsledků hodnotících zpráv Mezinárodního panelu pro klimatickou změnu se sídlem v Ženevě (Intergovernmental Panel on Climate Change) vyplývá, že klimatická změna již ovlivňuje potravinovou bezpečnost. Vyhodnocení mnoha studií posledních desetiletí, které pokrývají širokou škálu regionů a plodin, ukazuje, že negativní dopady změny klimatu na výnosy plodin jsou častější než pozitivní dopady (Pachauri a kol., 2014).

S každým dalším navýšením globální teploty je jasně patrné zvýšení intenzity a četnosti teplotních extrémů, včetně vln veder, vydatných srážek, a také zemědělského a ekologického sucha v některých regionech (Masson-Delmotte a kol., 2021).

Bylo zjištěno, že teplota během vegetačního období na sklizených plochách pro deset nejpěstovanějších světových plodin (ječmen, maniok, kukuřice, rýže, palma olejná, řepka, čirok, cukrová třtina, sója a pšenice) vzrostla o 0,5 °C až 1,2 °C. Změna klimatu v poslední době obecně snížila výnosy v Evropě, subsaharské Africe a Austrálii a zvýšila výnosy v Latinské Americe. V Severní, Střední Americe a Asii byly výsledky výnosu smíšené (Ray a kol., 2019).

### **2.2 Sucho**

Globální oteplování a související výkyvy v přírodních podmínkách mají za následek působení různých abiotických stresů na rostliny, jako jsou nedostatek vody, vysoká salinita, extrémní teploty a nedostatek minerálních látek nebo toxicita kovů (Yadav a kol., 2020).

Stres suchem je klíčový enviromentální stres, jeho kumulativní dopad a mnohorozměrný charakter vážně ovlivňuje morfologické, fyziologické, biochemické a molekulární vlastnosti rostlin s nepříznivým dopadem na fotosyntetickou kapacitu (Seleiman a kol., 2021).

Wilhite a Glantz (1985) dle přístupů zabývajících se měřením sucha jako fyzikálního jevu definovali sucho meteorologické, hydrologické a zemědělské. Přístup zabývajících se

suchem z hlediska nabídky a poptávky a sledující dopady nedostatku vody, který se šíří socioekonomickými systémy, definuje sucho socioekonomické (Wilhite a Glantz, 1985).

Meteorologické sucho je způsobené dlouhodobým deficitem srážek, hydrologické sucho je pokles průtoků řek a hladin vodních ploch a zemědělské sucho vzniká v důsledku nedostatku vláhy v půdě pro optimální růst a vývoj rostlin. Půda v sobě dokáže pojmout obrovské množství vody a její význam v koloběhu vody je s nástupem klimatických extrémů stále rostoucí (Žalud a kol., 2019).

### **2.3 Reakce rostlin na sucho**

Reakcí rostlin na stav sucha je komplex procesů, které závisí na řadě faktorů, jako jsou konkrétní míra dostupnosti půdní vláhy, načasování (vzhledem k vývojovým fázím plodin) a trvání deficitu či interakce s dalšími faktory (např. vysoké teploty vzduchu) (Žalud a kol., 2019). Aby rostliny překonaly nepříznivé působení stresu suchem, využívají určité mechanismy, které zvyšují jejich odolnost vůči suchu (Seleiman a kol., 2021).

Rostlina reaguje na stres suchem biochemickými (obsah antioxidantů, obsah chlorofylu, akumulace prolinu, obsah hormonů, sekundárních metabolitů atd.), fyziologickými (aktivita průduchů, fotosyntéza, osmotická rovnováha, transpirace, obsah vody v listech, přenos vody) a morfologickými změnami (snížení listové plochy, počtu listů, délka kořenů, stárnutí listů, předčasné dozrávání, změna růstových stádií) (Oguz a kol., 2022). Mění se poměr růstu nadzemních částí a kořenů a dochází k redukci odnožování. Při pokračujícím suchu rostliny vadnou, stáčejí listy a odumírají. Postupně mohou usychat odnože, dochází k redukci kvítků a zrn a může docházet k zasychání konců klasů. V konečném důsledku pak dochází k poklesu kvality či produkce sušiny a výnosu (Žalud a kol., 2019).

Za podmínek nedostatku vody může být prodlužování buněk vyšších rostlin potlačeno přerušением toku vody z xylému do okolních prodlužujících se buněk. Za působení velkého sucha rostliny zcela zastaví růst a hromadí v buňkách rozpuštěné látky pro zachování buněčného objemu a turgoru (Nonami, 1998). V reakci na stres z nedostatku vody iontové a vodní transportní kanály v membránách kontrolují změny turgoru v buňkách a stimulují uzavření stomat. Stomatální aktivita ovlivněná stresem ze sucha může ovlivnit příjem CO<sub>2</sub>, a tím ovlivnit fotosyntézu a růst rostlin (Osakabe a kol., 2014). Výsledky studie Wang a kol. (2022) naznačují, že rostliny v reakci na stres suchem uzavírají stomata, aby snížily ztráty vody transpirací.

Stres suchem má také významný vliv na fotosyntetické pigmenty, jako je chlorofyl *a*, *b* a složky karotenoidů a také negativně ovlivňuje fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII) (Fu a Huang, 2001).

## 2.4 Fotosyntéza a sucho

Fotosyntéza spolu s buněčným růstem patří mezi primární procesy, které mohou být ovlivněny suchem. Oba procesy jsou ovlivněny v závislosti na intenzitě, době trvání a rychlosti vývoje stresu. Pomalu aplikovaný stres často vyvolává osmotické přizpůsobení, které je považováno za důležitý mechanismus umožňující udržení příjmu vody a buněčného turgoru za stresových podmínek (Chaves a kol., 2009). V důsledku sucha mohou být reakce rostlin přímé např. snížení dostupnosti CO<sub>2</sub> omezením difúze přes stomata a mezofyl, a nepřímé způsobené např. oxidativním stresem (Chaves a kol., 2009).

Redukce CO<sub>2</sub> má mimo jiné za následek větší podíl elektronů pro tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), stres suchem tak narušuje rovnováhu mezi produkcí ROS a antioxidační obranou (Farooq a kol., 2009). ROS vznikají v transportních elektronových systémech chloroplastů a mitochondrií. Jsou vysoce toxické a mohou poškodit mnoho důležitých buněčných složek jako jsou lipidy, bílkoviny, DNA a RNA (Smirnov, 1993). Když produkce ROS významně převýší jeho vychytávání v buňce, naruší tím rovnováhu buněčné redoxní homeostázy a vzniká přechodný nadbytek ROS známý jako oxidativní stres (Sharma a kol., 2012).

Při velkém suchu se výrazně snižuje aktivita Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa), dostupnost substrátu RuBP (ribulosa-1,5-bisfosát) a fotosyntéza se téměř zastaví. Pokles hodnoty RWC, při níž dochází k inhibici výše zmíněných metabolických složek, je silně závislý na analyzovaném rostlinném druhu, přičemž některé druhy vykazují silnou inhibici při středně nízké RWC (75 %) a jiné nejsou ovlivněny při RWC < 60 % (Bota a kol., 2004).

Pro posouzení fungování fotosyntézy lze měřit fluorescenci chlorofylu a tím sledovat fotochemickou účinnost. Měřením velmi rychlé fluorescenční indukce (OJIP křivka) lze vypočítat obligátní fluorescenční parametr  $F_v/F_M$ , který odráží maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (Stirbet a kol. 2018) a při stresu dochází k jeho poklesu (Baker a Rosenqvist, 2004).

Dokud stres suchem není závažný, rostlinné ochranné mechanismy jsou dostatečné a nedojde k ovlivnění reakčního centra fotosystému II (RC PSII). Když nadměrná excitace převýší energetickou potřebu chloroplastu, přebytečné světlo se odvádí formou tepla

prostřednictvím nefotochemického zhášení (NPQ) (Sommer a kol., 2023). Naopak fotochemické zhášení ( $q_p$ ) je proces, při kterém jsou elektrony transportovány pryč z PSII díky světlem vyvolané aktivaci enzymů zapojených v procesech asimilace uhlíku. Vedle mnoha parametrů počítaných z měření fluorescence chlorofylu je významný také Gentyho parametr  $\Phi_{PSII}$ , který odráží podíl světla absorbovaného chlorofylem spojeným s PSII využitého ve fotochemii. Jako takový může být měřítkem rychlosti lineárního přenosu elektronů, a tedy ukazatelem celkové fotosyntézy. Zatímco  $\Phi_{PSII}$  vyjadřuje podíl absorbované energie využívané ve fotochemii,  $q_p$  udává podíl otevřených reakčních center PSII. Pokles  $q_p$  je způsoben uzavřením reakčních center v důsledku nadměrné excitační energie (Maxwell a Johnson, 2000).

Studie Ghotbi-Ravandi a kol. (2014) zkoumala reakce fotosyntetického aparátu u relativně tolerantních a náchylných genotypů ječmene při stresu suchem. Hodnota minimální fluorescence ( $F_0$ ), relativní variabilní fluorescence v bodě J ( $V_J$ ) a relativní variabilní fluorescence ve bodě I ( $V_I$ ) ukázaly postupný nárůst v reakci na stres suchem. Při silném suchu se tyto parametry u obou genotypů ve srovnání s jejich kontrolní skupinou významně zvýšily. Oukarroum a kol. (2007) studovali účinky sucha a opětovného zavlažení na 10 odrůdách ječmene (*Hordeum vulgare L.*). Výsledky ukázaly nepatrný rozdíl v maximálním výtěžku primární fotochemie PSII. Relativní poměr  $F_v/F_M$  normovaný na kontrolu se pohyboval mezi 0,98 a 1 po mírném stresu suchem, mezi 0,96 a 1,04 po silném stresu suchem a mezi 0,96 a 1,05 po opětovném zavlažení. Poměr  $F_v/F_M$  tedy neposkytoval informace o toleranci nebo odolnosti studovaných odrůd vůči stresu suchem nebo po opětovném zavlažení (Oukarroum a kol., 2007). U odrůd *Triticum aestivum L.* vystavených vodnímu stresu suchem zůstal maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII až do poslední třetiny období dehydratace téměř neovlivněn. Výrazný pokles  $F_v/F_M$  nastal při hodnotě RWC 70 % a méně (Živčák a kol., 2008). Při působení sucha u stejného druhu rostliny (*Triticum aestivum L.*) Hassan (2006) prokázal snížení poměru  $F_v/F_M$  a hodnot parametrů  $\Phi_{PSII}$  a  $q_p$ , naopak u parametru NPQ došlo k nárůstu (Hassan, 2006). I Wang a kol. (2022) ve studii dvou kultivarů *Triticum aestivum L.* prokázali, že funkčnost PSII byla při dlouhodobém suchu významně snížena a doprovázena poklesem hodnot  $F_v/F_M$  a  $q_p$ . Naopak hodnoty NPQ se zvýšily v důsledku disipace světelné energie na energii tepelnou. Studie Oukarroum a kol. (2006) testovala odolnost vůči suchu pomocí roztoků polyethylenglykolu 6000 (PEG) s různým osmotickým potenciálem na klíčení semen a růstu semenáčků (seedling establishment) šesti odrůd ječmene (*Hordeum vulgare L.*). Data ukázala, že stres suchem vyvolaný PEG 6000 má jen malý vliv na hodnotu  $F_v/F_M$ , což potvrzuje vysokou

stabilitu kvantového výtěžku primární fotochemie PSII při stresu suchem. U parametru  $(dV/dt)_0$  došlo ke zvýšení, což mohlo být způsobeno inhibicí rychlosti reoxidace  $Q_A^-$  (Oukarroum a kol. 2006).

Ze změřené OJIP křivky, lze také vypočítat parametr ABS/RC, který odráží zdánlivou velikost antény aktivního PSII (Stirbet a kol., 2018). Při stresu suchem dochází u kultivarů pšenice ke zvýšení poměru ABS/RC (Ghaffar a kol., 2023) pravděpodobně v důsledku inaktivace některých reakčních center PSII nebo zvětšením velikostí antén (Kalaji a kol., 2016).

#### 2.4.1 Obsah chlorofylu a sucho

Za nepříznivých podmínek rostliny ztrácejí chlorofyl (Havaux a Tardy, 1999) a přeměrovávají absorbované světlo na jiné procesy, jako je např. tepelná disipace, aby ochránily fotosyntetický aparát (Demmig-Adams a Adams, 1996).

Chlorofyl je pigment fotosyntetického aparátu, který absorbuje světlo a přenáší světelnou energii do reakčního centra fotosystému. Chlorofyl *a* i *b* jsou náchylné k vysychání půdy (Pandey a Shukla, 2015). Pokles chlorofylu při stresu suchem je dán především poškozením chloroplastů reaktivními formami kyslíku (Smirnoff, 1993).

Nikolaeva a kol. (2010) u třech odrůd pšenice zaznamenali v počátečním období sucha nejprve nízké ztráty vody z listů a v prvních 3 dnech se obsah chlorofylu zvýšil, 7. den došlo k poklesu obsahu chlorofylu o 13-15 % a obsah vody v listech se snížil o 5,2-6,8 % (Nikolaeva a kol., 2010).

Studie Li a kol. (2006) ukázala pokles obsahu chlorofylu u čtyř genotypů ječmene (*Hordeum vulgare L.*) při stresu suchem. U dvou genotypů tolerantních k suchu se obsah chlorofylu snížil o 10,7, resp. 1,6 %, zatímco u genotypů citlivých k suchu se obsah snížil o 31,3, resp. 30,1 %. Ghotbi-Ravandi a kol. (2014) při silném stresu suchem prokázali snížení obsahu chlorofylu *a* a *b* u dvou genotypů ječmene. Také obsah  $\beta$ -karotenu se u obou genotypů snížil v reakci na stres suchem (Ghotbi-Ravandi a kol., 2014). Studie Nyachiro a kol. (2001) popsala významný pokles chlorofylu *a* a *b* způsobený nedostatkem vody u šesti odrůd *Triticum aestivum* a dvou odrůd *Triticum durum*. Anjum a kol. (2003) zkoumali vliv sucha na dva kultivary ječmene. Množství chlorofylu *a* a *b* se u obou kultivarů lišilo. Vliv postupujícího sucha byl výraznější u chlorofylu *a* u obou kultivarů než u chlorofylu *b* nebo celkového chlorofylu. Obsah chlorofylu *a* se výrazněji snížil u kultivaru Jau-87 než u kultivaru S-84728. Stres suchem vyvolal 6% nárůst chlorofylu *b* u kultivaru S-84728, ale u kultivaru Jau-87 snížení o 28 % během devítidenního stresového období. Celkový obsah

chlorofylu se u obou kultivarů snížil vzhledem ke kontrolním rostlinám (Anjum a kol., 2003).

Poměr chlorofylu *a/b* se často používá k charakterizaci vývojového stavu fotosyntetického aparátu a izolovaných pigment-proteinových komplexů. Ačkoli je poměr chlorofylu *a/b* v plně zelených listech vyšších rostlin poměrně stabilní (přibližně 3), může se značně měnit v závislosti na fyziologickém stavu rostliny (Kouřil a kol., 1999). Ve studii Nikolaeva a kol. (2010) nebyl pokles chlorofylu u kultivarů pšenice vystavených suchu doprovázen změnami v poměru chlorofylu *a/b*. Absence vlivu sucha na poměr chlorofylu *a/b* naznačuje, že chlorofyl *b* není na suchu citlivější než chlorofyl *a* (Mafakheri a kol., 2010).

Měřicí přístroj SPAD-502 (Konica-Minolta, Japonsko) poskytuje alternativní neinvazivní metodu měření relativního obsahu celkového chlorofylu v listech (Ling a kol., 2011) k obvyklému spektrofotometrickému stanovení po jeho extrakci pomocí organického rozpouštědla, jako je např. aceton (Porra a kol., 1989). Ačkoliv je spektrofotometrické stanovení dobře zavedená a přesná metoda, je také časově náročná a destruktivní, měření přístrojem SPAD-502 tyto nevýhody překonává (Ling a kol., 2011).

Studie Hasanuzzaman a kol. (2022) zkoumala vliv sucha na 80 genotypů ječmene měřením obsahu chlorofylu přístrojem SPAD-502. U poloviny genotypů se obsah chlorofylu zvýšil (pravděpodobně v důsledku zmenšení listové plochy) a u zbylých 50 % naopak došlo ke snížení obsahu chlorofylu. Významná pozitivní korelace mezi obsahem chlorofylu SPAD a celkovým indexem tolerance k suchu a indexem obnovy po suchu dále naznačila, že tolerantní genotypy ječmene jsou schopny udržet vyšší obsah chlorofylu v podmínkách stresu suchem (Hasanuzzaman a kol. 2022). Studie kultivarů ječmene Morroco prokázala při stresu suchem významný pokles obsahu chlorofylu (hodnota SPAD) u všech kultivarů (Ferionun a kol. 2023). Ve studii Yang a kol. (2023) hodnoty SPAD naznačovaly, že obsah chlorofylu u několika odrůd pšenice měl tendenci se při stresu suchem zvyšovat, zatímco hodnoty u jiných odrůd při stresu suchem výrazně klesaly. Z výsledků lze usuzovat, že různé odrůdy pšenice vykazují rozdíly ve fotosyntetické kapacitě při stresu suchem, což úzce souvisí s odolností vůči suchu (Yang a kol. 2023).

Kromě chlorofylu hrají významnou roli při absorpci světla také karotenoidy. Karotenoidy jsou schopny relativně rychle převádět excitační energii na energii tepelnou (Demmig-Adams a Adams, 1996), zachovávají struktury fotosystémů chloroplastů, chrání před fotoinhibicí a pomáhají tak rostlinám odolávat suchu (Pandey a Shukla, 2015).

### 2.4.2 Optické vlastnosti listu a sucho

Obsah pigmentů v listech může poskytnout cenné informace o fyziologické funkčnosti listů. Měření spektrální odrazivosti poskytuje rychlou a nedestruktivní metodu pro stanovení relativního obsahu pigmentů v listech (Sims a Gamon, 2002).

Normalizovaný vegetační index (normalized difference vegetation index, NDVI) je široce používán pro hodnocení biomasy, výnosu, fotosyntézy a pro hospodaření rostlin s dusíkem (Miroslavjević a kol., 2018). Při studii 23 genotypů dvouřadého ozimého ječmene hodnoty NDVI v období kvetení ve dvou vegetačních obdobích pozitivně korelovaly s výnosem zrna, počtem zrn a výškou rostlin (Miroslavjević a kol., 2018). Ačkoli je NDVI dále vhodný pro zjišťování fotosyntetického potenciálu, opomíjí mnoho jemnějších fotosyntetických reakcí na stres, které vyplývají ze změn fyziologické aktivity (např. snížení fotosyntetické aktivity během krátkodobého stresu) (Gamon a kol., 2015).

Index fotochemické reflektance (photochemical reflectance index, PRI), původně vyvinutý pro odhad změn v obsahu pigmentů xantofylového cyklu, souvisí s poměrem karotenoidů a chlorofylu v zelených listech. PRI může být účinný jako měřítko změn účinnosti využití světla při fotosyntéze během senescence nebo v reakci na stres, pokud účinnost využití světla při fotosyntéze koreluje s poměrem karotenoidů a chlorofylu. Takový vztah se zdá být pravděpodobný, protože senescence a stres vedou ke zvýšení poměru karotenoidů a chlorofylu a snížení účinnosti využití světla při fotosyntéze (Sims a Gamon, 2002). Kombinace měření obou indexů může poskytnout doplňující informace o fotosyntetické aktivitě (Gamon a kol., 2015).

Mänd a kol. (2010) měřili indexy NDVI a PRI v šesti evropských oblastech v reakci na oteplení a sucho. Byla měřena odrazivost korun stromů, efektivní index listové zelené plochy (LAI<sub>e</sub>) a fluorescence chlorofylu dominantních druhů. Oteplování obecně zvýšilo PRI, zatímco vliv na NDVI byl nevýznamný. Působení sucha bylo méně zřejmé u PRI, ale hodnoty NDVI se obecně v důsledku působení sucha výrazně snížily (Mänd a kol., 2010).

Studie Abdelhakim a kol. (2021) zkoumala potenciál na teplo citlivých a tolerantních genotypů pšenice odolávat nepříznivým stresovým podmínkám. Ve fázi odnožování byly rostliny podrobeny čtyřem ošetřením v kontrolovaných podmínkách: kontrola, sucho, teplo a kombinovaný stres sucha i tepla. Měření spektrální odrazivosti listů přístrojem Polypen RP410 (Photon System Instruments, Drásov, ČR) bylo použito ke zkoumání vegetačních indexů. U všech genotypů došlo ke snížení hodnot PRI při stresu suchem. Hodnota NDVI při stresu suchem se zvýšila u genotypů citlivých na teplo, naopak u genotypů tolerantních k teplu došlo ke snížení hodnoty NDVI (Abdelhakim a kol., 2021).



## 2.5 Fytohormony, fotosyntéza a sucho

Fytohormony mají klíčový vliv ve vývojových procesech od iniciace orgánů až po jejich stárnutí, a to díky své roli regulátorů růstu a vývoje a také díky své ústřední funkci v regulaci fotosyntézy. Interakce mezi světlem a fytohormony hraje důležitou roli během vývoje chloroplastů zejména v raných fázích vývoje rostlin (Cackett a kol., 2022). Fytohormony hrají významnou roli v ochraně fotosyntetického aparátu za stresových podmínek, přičemž hormonální interakce a komplementace jsou důležité pro časoprostorovou regulaci fotosyntetických procesů na úrovni celé rostliny (Müller a Munné-Bosch, 2021).

Kyselina abscisová (ABA) je považována za hlavní hormon, který zvyšuje toleranci rostlin k suchu prostřednictvím různých morfologických, fyziologických a molekulárních procesů, včetně regulace průduchů, vývoje kořenů a iniciace dráhy závislé na ABA (Ullah a kol., 2018).

ABA hraje ústřední roli v regulaci vztahu mezi stomatální vodivostí a fotosyntézou (Ullah a kol., 2018). Když dojde ke snížení vodního potenciálu v listových buňkách, ABA v reakci na stres suchem způsobí uzavření průduchů, což sníží ztráty vody transpirací (Osakabe a kol. 2014). Uzavírání stomat vede ke snížení příjmu CO<sub>2</sub>, což ovlivňuje rychlost fotosyntézy v rostlinách (Chaves a kol., 2009) a mění metabolismus fotosyntézy (Lawlor, 2002). Velmi důležitými fytohormony v souvislosti se stresem suchem jsou dále kyselina jasmonová (Ali a Baek, 2020), kyselina salicylová (Khalvandi a kol., 2021), ethylen (Husain a kol. 2020), auxiny (Verma a kol., 2022), gibereliny (Colebrook et al., 2014), cytokininy (Chernyad'ev, 2009) a brassinosteroidy (Anwar kol., 2018). Vzájemné propojení mezi ROS, antioxidanty a fytohormony tvoří v reakci na stresové podmínky komplexní signální síť, v níž se zdají být hlavními regulátory fotosyntézy kyselina abscisová a jasmonová (Müller a Munné-Bosch, 2021).

V posledních letech ukazují protektivní funkci za stresových podmínek také cytokininy, které napomáhají k zachování struktury a funkce fotosyntetického aparátu díky své schopnosti řídit rozličné fyziologické procesy v rostlinách. Účinky cytokininů zahrnují kvantitativní a kvalitativní regulaci proteinů, enzymů (včetně Rubisco), fotosyntetických pigmentů, pigment-proteinových komplexů, aktivit fotosystémů a fotosyntetické fixace uhlíku (Chernyad'ev, 2009).

### 2.5.1 Cytokininy, fotosyntéza a sucho

Cytokininy byly původně definovány jako chemické látky, které při aplikaci s auxiny indukují proliferaci buněk a spouštějí diferenciaci kalusu. Cytokininy ale hrají klíčovou roli v mnoha aspektech růstu a vývoje rostlin (Osugi a Sakakibara, 2015) jako je buněčné dělení, iniciace a růst výhonů, stárnutí listů, apikální dominance i reakce na biotické a abiotické stresové faktory (Kieber a Schaller, 2014). Od počátku nového tisíciletí bylo dosaženo významného pokroku v pochopení molekulární podstaty funkce, biosyntézy, metabolismu, degradace, signalizace a evoluce cytokininů (Spíchal, 2012).

Přírodně se vyskytující cytokininy jsou deriváty adeninu s odlišnými substitucemi navázanými na pozici N<sup>6</sup> adeninového kruhu. Nejběžnější cytokininovou bází v rostlinách je zeatin. Ve vyšších rostlinách se zeatin vyskytuje jak v *cis*, tak v *trans* konfiguraci (Kieber a Schaller, 2014).

Cytokininy lze v závislosti na N<sup>6</sup>-substituentu rozdělit na isoprenoidní a aromatické cytokininy. Isoprenoidní cytokininy jsou *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ), N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP) a dihydrozeatin (DZ). Mezi aromatické cytokininy patří 6-benzylaminopurin (BAP), 6-furfurylaminopurin (kinetin) a *orto*-, *meta*- a *para*-topolin (oT, mT, pT) a jejich metabolity (Sakakibara, 2006).

Aby se rostliny vyrovnaly s nepříznivými podmínkami nedostatku vody, používají složité a komplexní mechanismy k úpravě endogenních hladin cytokininů, které vhodně řídí signální dráhu cytokininů až k expresi genů. Nejnovější poznatky poskytují důkazy o tom, že rostliny mohou v určitých obdobích stresu aktivovat aklimatizační mechanismy k potlačení signalizace cytokininů snížením biosyntézy cytokininů a snížením exprese některých složek signalizace cytokininů. To následně vede k morfologickým a fyziologickým úpravám, které rostlinám umožňují přežít deficit vody (Li a kol., 2016). Za stresových podmínek jako je např. nedostatek vody se u různých druhů rostlin obecně snižuje množství Rubisco v listech. Cytokininy naopak indukují syntézu proteinů elektronového transportního řetězce, fotosyntetických chlorofyl-proteinových komplexů a Rubisco (Chernyad'ev, 2009). Dále mají pozitivní vliv na zachování chlorofylových pigmentů a integrity membrán chloroplastů (Hudeček a kol., 2023). Priming s BAP před vodním stresem vedl ke zvýšení obsahu pigmentů xantofylového cyklu u čtyř druhů rostlin vystavených suchu (Haisel a kol., 2006). Foliární aplikace (postřik) cytokininů zvýšila toleranci vůči suchu u čtyř druhů pšenice oddálením suchem indukované senescence listů. Zároveň u ošetřených rostlin s vodním deficitem došlo ke zvýšení celkového obsahu chlorofylu o 10 % ve srovnání s rostlinami bez ošetření (Dwivedi a kol., 2014). U pšenice

jarní zmírnila cytokininům podobná sloučenina kartolin-4 negativní vliv vodního stresu na obsah a aktivitu Rubisco (Chernyad'ev a Monakhova 1998). Ve výzkumu Gupta a kol. (2012) podmínky vodního stresu výrazně snížily RWC u pšenice (*Triticum aestivum L.*), ale postřik listů putrescinem a BAP hrál klíčovou roli pro udržení vyššího stavu RWC. V důsledku vodního stresu se také výrazně snížil obsah chlorofylu, postřik listů putrescinem a BAP však pomohl obsah chlorofylu zachovat (Gupta a kol., 2012). Exogenní aplikace cytokininů podporuje fyziologický poměr fytohormonů a vytváří podmínky pro adaptaci rostlinných buněk a pletiv na stres (Chernyad'ev, 2009).

### 2.5.2 Cytokininy v zemědělství

Použití přírodních cytokininů a mnoha jejich derivátů nabízí řadu výhod díky jejich zanedbatelné cytotoxicitě pro lidské buňky a nízkému riziku pro životní prostředí vyplývajícímu z jejich vysoké biologické aktivity v rostlinách (Hudeček a kol., 2023). Komerční využití cytokininových látek pro ochranu plodin je výhodné z důvodu aplikace nízkých koncentrací a jejich nízké ceně. Narozdíl od pesticidů jsou cytokininy rychle odbouratelné látky bezpečné pro životní prostředí (Chernyad'ev, 2009). Aplikace pesticidů může vést k oxidativnímu stresu, inhibici fyziologických a biochemických drah, bránit fotosyntéze a negativně ovlivňovat výnosy plodin. Exogenní aplikace regulátorů růstu rostlin zmírňuje negativní účinky pesticidů tím, že stimuluje antioxidační obranný systém a zvyšuje toleranci vůči stresovým podmínkám. Současné studie prokázaly účinek rostlinných regulátorů růstu při podpoře růstu rostlin vystavených pesticidnímu stresu (Jan a kol., 2020). Bylo zjištěno, že fenylureový cytokinin 4PU-30 zmírňuje škodlivé účinky způsobené působením glyfosátu indukci antioxidačních obranných systémů v rostlinách kukuřice podobně jako ochranné látky aplikované po ošetření herbicidy (angl. herbicide safeners) (Sergiev a kol., 2006).

Přestože však přírodní a některé syntetické cytokininy vykazují uspokojivé výsledky, vykazují také některé negativní účinky např. na vývoj kořenů a optimalizace jejich účinného použití v polních podmínkách zůstává výzvou (Hudeček a kol., 2023).

Pro své pozitivní účinky se staly cytokininy potenciálními agrochemikáliemi, ale zatím nenašly své stabilní místo mezi komerčně využívanými regulátory růstu rostlin, a to především kvůli složitosti jejich účinků. Mnoho aspektů růstu a vývoje rostlin je řízeno interakcemi různých skupin rostlinných hormonů. Některé účinky tak mohou být výsledkem změněné rovnováhy mezi vzájemně se ovlivňujícími hormony (Koprna a kol., 2016).

V zemědělství a v biotechnologiích je díky svým účinkům, cenové dostupnosti a stabilitě často využíván aromatický cytokinin 6-benzylaminopurin (Doležal a kol. 2006). U rostlin pšenice ošetřených postřikem BAP, který současně zvyšoval hladinu endogenního zeatinu, byla zjištěna lepší fotosyntetická účinnost na donorové i akceptorové straně reakčních center PSII. U pšenice ošetřené BAP byl zjištěn vyšší efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu přizpůsobeném světlu ( $\Phi_{PSII}$ ) i tmě ( $F_v/F_m$ ), lepší přenos elektronů za  $Q_A$ , zvýšená rychlost transportu elektronů a nižší relativní hodnota variabilní fluorescence v bodě J (Yang a kol., 2018).

BAP může mít za určitých podmínek ale také negativní vliv na vývoj a růst rostlin, protože inhibuje prodlužování a tvorbu postranních kořenů a stimuluje bobtnání kořenových špiček (Bertell a Eliasson, 1992). To vede k hledání aromatických derivátů cytokininů, které by nevykazovaly tyto negativní účinky (Plíhalová a kol., 2016).

Klos a kol. (2022) zkoumali čtyři nově syntetizované soli cytokininů: 6-benzylaminopurin mesylát, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin mesylát a 6-(3-metoxybenzylamino)purin mesylát (MeOBAPM), a stanovili jejich krystalové struktury k objasnění jejich strukturního vlivu na rozpustnost ve vodě. Mesyláty byly o několik řádů rozpustnější ve vodě než výchozí cytokininy a to i bez použití DMSO (dimethylsulfoxid). Nové soli cytokininů významně snížily degradaci chlorofylu a narušení funkčnosti fotosystému II v segmentech listů ječmene procházejících umělou senescencí a na rozdíl od kanonických cytokininů udržovaly vysoké koncentrace aktivních cytokininových metabolitů po několik dní. Tento účinek byl přisuzován vyšší biologické dostupnosti mesylátových solí rostlinou a zamezení expozici toxického DMSO (Klos a kol., 2022).

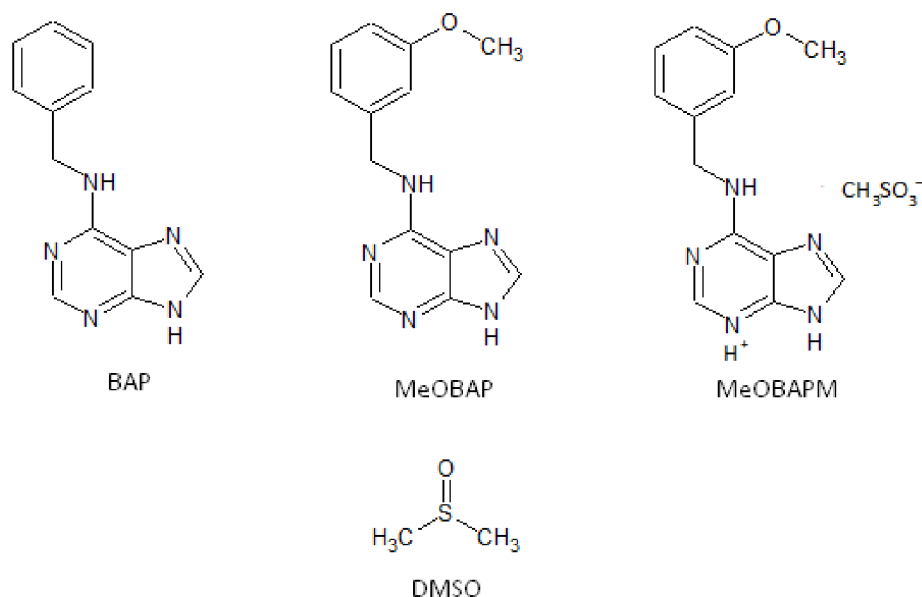
Vyhnutí se rozpouštědлу DMSO je žádoucí kvůli jeho negativním účinkům na rostliny, které zahrnují rychlé snížení obsahu bílkovin ve výhoncích, snížení koncentrace chlorofylu a karotenoidů a zvýšení hladiny prolinu v rostlinných buňkách způsobené zvýšenou koncentrací ROS (Zhang a kol., 2016).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 POUŽITÉ LÁTKY PRO OŠETŘENÍ ROSTLIN

- MeOBAP 6-(3-methoxybenzylamino)purin, *meta*-methoxy topolin
- MeOBAPM 6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát
- DMSO dimethylsulfoxid (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, ČR)
- BAP 6-benzylaminopurin (VWR International s. r. o., Stříbrná Skalice, ČR)

Látky MeOBAP a MeOBAPM (ve vodě rozpustná cytokininová sůl) byly nasyntetizovány na Katedře chemické biologie Univerzity Palackého v Olomouci.



Obr. 1: Chemické struktury látek BAP (6-benzylaminopurin), MeOBAP (6-(3-methoxybenzylamino)purin), MeOBAPM (6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát) a DMSO (dimethylsulfoxid).

### 3.2 ROSTLINNÝ MATERIÁL A OŠETŘENÍ

Byly provedeny celkem 4 experimenty s postupnou optimalizací aplikace látek a působení sucha. V prvních 3 experimentech byly aplikovány látky s koncentrací  $10^{-4}$  M a do BP byl vybrán 3. experiment s nejvhodnější optimalizací uvedených postupů. V posledním 4. experimentu byly použity látky s koncentrací  $10^{-5}$  M, které na intaktní rostliny nevykazovaly u všech ošetření stejnou účinnost jako látky koncentrovanější, ale bylo optimalizováno stanovení obsahu vody v rostlinách.

#### Experiment 3 – s použitím látek s vyšší koncentrací ( $10^{-4}$ M)

Dvouřadý sladovnický jarní ječmen (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) byl vysazen ve dvou řadách po 8 semenech do květináčů s perlitem a zaléván Hoaglandovým

roztokem (ředěn  $10\times$  ze zásobního roztoku: 100 ml Hoaglandova roztoku + 900 ml deionizované vody). Jedna polovina květináčů byla zalévána dostatečně (varianta „mokrá“ – M) a druhá naopak vystavena suchu (varianta „suchá“ – S, viz. kapitola 3.2.1). Růst ve fytokomoře AR-100L3 (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA) probíhal za kontrolovaných podmínek (16 h světla ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )/8 h tmy, teploty  $21 \text{ }^\circ\text{C}/21 \text{ }^\circ\text{C}$  a 60 % relativní vzdušné vlhkosti). Po 7 dnech zalévané i suché rostliny byly rozděleny na pět variant a byly foliárně aplikovány uvedené roztoky (bez ošetření, postřik deionizovanou vodou, postřik 0,5% DMSO,  $10^{-4}$  M MeOBAP v 0,5% DMSO,  $10^{-4}$  M MeOBAPM v deionizované vodě). Strukturální vzorce a názvy látek jsou uvedeny v kapitole 3.1. U všech kromě „bez ošetření“ bylo použito smáčedlo MERO<sup>®</sup> 33528 (olej řepkový – methylester 733 g/l, BAYER s.r.o., Praha) v množství 1 ml na cca 300 ml aplikované látky. Postřik rostlin byl aplikován  $5\times$  z každé strany květináče. Po 14 dnech od výsevu (7 dní od postřiku) proběhlo měření intaktních rostlin všemi níže uvedenými metodami a byly odebrány vzorky na pozdější analýzu obsahu chlorofylů a hormonů v listech (Obr. 2).



Obr. 2: Ošetřené rostliny jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zalévané (M) a vystavené stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, R představuje rostliny bez zásahu.

### 3.2.1 Stres suchem

Po vysazení semen byla polovina květináčů zalita 250 ml (varianta M) a druhá 150 ml (varianta S) Hoaglandova roztoku. Po 6 dnech růstu ve fytokomoře byla varianta M zalita 100 ml Hoaglandova roztoku, varianta S již zůstala bez zálivky do konce experimentu. Následující 7. den byly některé rostliny z květináčů vytrhány tak, aby v každém květináči zůstalo 10 rostlin (stejná asimilace vody ve všech květináčích) a proběhlo ošetření jednotlivými roztoky. Varianta M byla 11. den zalita 150 ml Hoaglandova roztoku a 14. den proběhlo měření.

### 3.2.2 Obsah vody v půdě

Obsah vody v květináčích byl vypočten pro každou variantu na základě hmotnosti květináčů s perlitem a hmotnosti biomasy. Původně jsme chtěli vypočítat standardní RWC, tj.  $(\text{hmotnost čerstvé hmoty} - \text{hmotnost sušiny}) / (\text{hmotnost plně turgescenčního listu} - \text{hmotnost sušiny})$ , který uvažuje plně turgescenční vzorek. Nicméně po třech hodinách umístění rostlin s kořínky do kádinky s deionizovanou vodou pro jejich maximální nasycení byly hmotnosti rostlin často nižší než před nasycením. Proto jsme se rozhodli nepočítat standardní RWC a počítali jsme půdní vlhkost následujícím způsobem, tzn. hmotnostní procento vody v květináči pro každé ošetření.

Na konci měření byla od květináče s mokřým perlitem a biomasou odečtena celková vytrhaná a samostatně zvážená biomasa a hmotnost samotného květináče, tak byla získána hmotnost mokrého perlitu. Odečtením hmotnosti suchého perlitu před výsadbou semen od hmotnosti mokrého perlitu, byla získána hmotnost vody v jednotlivých květináčích. Ze zjištěné hmotnosti vody (V) a mokrého perlitu (P) v daném květináči byl spočítán procentuální podíl obsahu vody v každém květináči  $(V \times 100 / P)$  [1].

Při vysazení všechny květináče naplněny stejným množstvím suchého perlitu. Květináč se suchým perlitem byl zvážen a hodnota použita pro výpočet procentuálního obsahu vody v den postřiku a poté v den měření. Těsně před postřikem zvážena hmotnost květináčů s perlitem, vodou a biomasou. Z každého květináče vytrhány 2 reprezentativní rostliny a vypočítán průměr jejich hmotnosti. Celkový počet rostlin v každém květináči byl vynásoben vypočítaným průměrem pro příslušnou variantu a byla tak získána hodnota hmotnosti biomasy a vypočítán procentuální obsah vody pro každý květináč v den postřiku (Tab. 1) na základě výše popsaného postupu [1].

Tab. 1: Půdní vlhkost (obsah vody v %) spočítaná u všech ošetřených variant v den postřiku. Postup stresování suchem a výpočtu obsahu vody [1] uveden v textu. Prezentována půdní vlhkost v květináčích s rostlinami stresovaných suchem (S) a zalévaných (M).

VARIANTA	OBSAH VODY	VARIANTA	OBSAH VODY
S	[%]	M	[%]
R-S	49,4	R-M	71,6
K-S	56,0	K-M	70,5
DMSO-S	49,3	DMSO-M	70,2
MeOBAP-S	49,6	MeOBAP-M	69,6
MeOBAPM-S	46,6	MeOBAPM-M	73,3

O týden později v den měření po změření rostlin všemi metodami byly zváženy květináče s perlitem, vodou i biomasou, následně rostliny i s kořínkem a semenem z každého květináče vytrhány a zvážena celková biomasa jednotlivých variant. Poté zvážen květináč s vlhkým perlitem bez biomasy. Procentuální obsah vody (Tab. 2) v květináčích příslušných variant vypočítán podle výše zmíněného postupu [1].

Tab. 2: Půdní vlhkost (obsah vody v %) spočítaná u všech ošetřených variant v den měření. Postup stresování suchem a výpočtu obsahu vody [1] uveden v textu. Prezentována půdní vlhkost v květináčích s rostlinami stresovaných suchem (S) a zalévaných (M).

VARIANTA S	OBSAH VODY [%]	VARIANTA M	OBSAH VODY [%]
R-S	23,3	R-M	72,4
K-S	30,9	K-M	70,9
DMSO-S	22,5	DMSO -M	71,1
MeoBAP-S	24,1	MeoBAP-M	70,6
MeoBAPM-S	23,0	MeoBAPM-M	73,1

#### Experiment 4 – s použitím látek s nižší koncentrací ( $10^{-5}$ M)

Dvouřadý sladovnický jarní ječmen (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) vysazen ve třech řadách po 8 semenech do květináčů s perlitem. Po vysazení semen polovina květináčů zalita 250 ml (varianta M) a druhá 150 ml (varianta S) Hoaglandova roztoku (ředění stejné jako u předchozího experimentu). Varianty stresované suchem již nebyly zalévány do konce experimentu. Po 5 dnech růstu ve stejné fytokomoře varianta M zalita 150 ml Hoaglandova roztoku. 7. den rostliny vytrhány tak, aby v každém květináči zůstalo 20 rostlin a proběhlo ošetření jednotlivými roztoky stejně jako v předchozím experimentu. Varianta M 12. den zalita 100 ml Hoaglandova roztoku a 14. den proběhlo měření.

Při vysazení byly květináče se suchým perlitem zváženy a hodnota použita pro výpočet procentuálního obsahu vody v den postřiku a poté v den měření. Těsně před postřikem zvážena hmotnost květináčů s perlitem, vodou a biomasou a spočítán počet rostlin v každém květináči před vytrháním na počet 20 rostlin. Z rezervních květináčů (R-M a R-S) byla vytrhána veškerá biomasa a pro variantu M i S vypočítána průměrná hmotnost jedné rostliny s kořínkem i semenem. Celkový počet rostlin v každém květináči byl vynásoben vypočítaným průměrem pro příslušnou variantu a byla tak získána hodnota hmotnosti biomasy a vypočítán procentuální obsah vody pro každý květináč v den postřiku (Tab. 3) na základě výše popsaného postupu [1].



Tab. 3: Půdní vlhkost (obsah vody v %) spočítaná u všech ošetřených variant v den postřiku. Postup stresování suchem a výpočtu obsahu vody [1] uveden v textu. Presentována půdní vlhkost v květináčích s rostlinami stresovaných suchem (S) a zalévaných (M).

VARIANTA S	OBSAH VODY [%]	VARIANTA M	OBSAH VODY [%]
K-S	46,5	K-M	71,7
DMSO-S	45,5	DMSO -M	72,8
MeoBAP-S	43,6	MeoBAP-M	71,1
MeoBAPM-S	41,7	MeoBAPM-M	72,0

O týden později v den měření po změření rostlin všemi metodami byly zváženy květináče s perlitem, vodou i biomasou, následně rostliny i s kořínkem a semenem z každého květináče vytrhány a zvážena celková biomasa jednotlivých variant. Poté zvážena květináč s vlhkým perlitem bez biomasy. Procentuální obsah vody (Tab. 4) v květináčích příslušných variant vypočítán podle výše zmíněného postupu [1].

Tab. 4: Půdní vlhkost (obsah vody v %) spočítaná u všech ošetřených variant v den měření. Postup stresování suchem a výpočtu obsahu vody [1] uveden v textu. Presentována půdní vlhkost v květináčích s rostlinami stresovaných suchem (S) a zalévaných (M).

VARIANTA S	OBSAH VODY [%]	VARIANTA M	OBSAH VODY [%]
K-S	18,3	K-M	65,5
DMSO-S	18,9	DMSO -M	64,6
MeoBAP-S	24,2	MeoBAP-M	59,0
MeoBAPM-S	19,1	MeoBAPM-M	62,6

Hmotnost čerstvé biomasy (FW) byla stanovena po měření zvážením všech rostlin (včetně kořínků a semen) v květináči příslušné varianty. Poté byly listy sušeny v sušárně 30 hodin při teplotě 70 °C do konstantní hmotnosti (hmotnost sušiny, DW). Obsah vody v rostlinách (WC) se pak vypočítal jako:  $WC = (FW - DW) / FW$  (Mihaljević a kol. 2021) (Tab. 5).

Tab. 5: Celkový obsah vody v rostlinách (WC, %) jednotlivých variant ošetřených uvedenými roztoky v den měření. Znárodněny suchá (S) a mokrá (M) varianta k danému ošetření. Postup stresování suchem a výpočet WC uvedeny v textu.

VARIANTA M	K-M	DMSO-M	MeOBAP-M	MeOBAPM-M
WC [%]	91,1	90,7	88,5	90,2
VARIANTA S	K-S	DMSO-S	MeOBAP-S	MeOBAPM-S
WC [%]	74,4	72,6	69,5	71,3

### 3.3 POUŽITÉ METODY

#### 3.3.1 Neinvazivní metody

Měření přístroji SPAD a PolyPen probíhalo za slabého světla ( $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) v laboratoři při pokojové teplotě ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a relativní vlhkosti vzduchu 34 % na adaxiální straně uprostřed listu. Měření přístrojem PEA bylo provedeno za stejných podmínek, ale rostliny byly před samotným měřením nejprve půl hodiny zatemněny. Pro měření byl vybrán první vyrostlý list na každé rostlině.

**Chlorofylmetr SPAD-502** (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonsko) umožňuje velmi rychlé a nedestruktivní určení relativního obsahu chlorofylu v listech rostlin bez nutnosti extrakce pigmentů. Hodnoty měřené chlorofylmetrem jsou počítány z propustnosti listu pro dvě různé vlnové délky (650 nm a 940 nm). Hodnota, která charakterizuje obsah chlorofylů v listě, je přístrojem vypočítána srovnáním poměru intenzit detekovaného záření o vlnových délkách 650 a 940 nm při měření bez vzorku a se vzorkem. Měření proběhlo v pěti opakováních ve střední části každého měřeného listu a byl získán průměr. Měřeno bylo vždy 8 rostlin z každé varianty.

Přístroj **PolyPen** (Photon System Instruments, Drásov, ČR) umožňuje rychlé měření celých spekter odrazivosti a následný výpočet indexů odrazivosti NDVI a PRI. NDVI je indikátorem obsahu chlorofylu v rostlinách. Hodnoty NDVI se pohybují v rozmezí -1 až +1. Když se hladina chlorofylu sníží v důsledku stresu nebo stárnutí, bude se NDVI blížit hodnotě 0 v důsledku menší absorpce viditelného červeného světla (Stamford a kol., 2023). NDVI počítáno dle vzorce:  $\text{NDVI} = (\text{R}780 - \text{R}630) / (\text{R}780 + \text{R}630)$ . PRI počítáno dle vzorce:  $\text{PRI} = (\text{R}531 - \text{R}570) / (\text{R}531 + \text{R}570)$ , kde  $\text{R}_x$  odpovídá odrazivosti v dané vlnové délce. Pigmenty xantofylového cyklu hrají nejspíše hlavní roli v absorpci světla při vlnové délce 531 nm (Peñuelas a kol., 1995). Konvenčním mechanismem světlem indukovaného poklesu PRI je deepoxidace violaxanthinu (zvýšení koncentrace zeaxanthinu) (Peñuelas a kol., 1995; Demmig-Adams, 1990), hodnoty PRI se pohybují v rozmezí -1 až +1. Změřená spektra odrazivosti jednotlivých rostlin byla korigována korekční křivkou změřenou se standardem a až z korigovaných spekter byly spočítány uvedené parametry.

Přístroj **PEA (Plant Efficiency Analyser – Hansatech Instruments, King's Lynn, UK)** byl použit ke změření velmi rychlé fluorescenční indukce (O-J-I-P) a příslušný software k následnému výpočtu vybraných parametrů, tj.  $F_v/F_m$ ,  $(dF/dt)_0$ ,  $V_j$  a  $\text{ABS}/\text{RC}$ . Ke generaci typické fluorescenční křivky došlo po ozáření vzorku adaptovaného na tmou saturačním světlem ( $2 \text{ s}$ ,  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), kdy z minimální fluorescence  $F_0$  (všechna reakční centra PSII jsou „otevřená“) fluorescence narostla až k vrcholu „P“ (maximální fluorescence  $F_m$ ,

všechna reakční centra jsou „uzavřená“) se dvěma přechodnými kroky „J“ a „I“ (fluorescence  $F_J$  a  $F_I$ , dochází k postupnému zavírání reakčních center) (Strasser a kol., 2000). Analýza indukčních křivek (OJIP) fluorescence chlorofylu poskytuje informace o fotosyntetické kapacitě a vitalitě rostlinného materiálu.

Poměr  $F_V/F_M$  (běžná hodnota 0,74-0,85), kde  $F_V = (F_M - F_0)$ , odráží maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (Stirbet a kol., 2018; Lichtenthaler a kol., 2005). Parametr  $(dV/dt)_0 = M_0 = 4(F_{300\mu s} - F_{50\mu s})/F_V$  koresponduje s maximální rychlostí akumulace frakcí uzavřených reakčních center PSII a odráží rychlost přísunu excitací do RCII a následně rychlost redukce  $Q_A$  na  $Q_A^-$  (Strasser a kol., 2000).  $V_J = (F_J - F_0)/F_V$ , kde  $F_J$  je intenzita fluorescence v čase 2 ms, je relativní variabilní fluorescence v bodě J a poukazuje na frakci redukovaných  $Q_A$  (Strasser a kol., 2000).  $ABS/RC = (dV/dt)_0/V_J \times F_p/F_V$  charakterizuje zdánlivou velikost antény aktivního PSII (Stirbet a kol., 2018).

Kromě rychlých metod byly vzorky dále měřeny neinvazivně **fluorescenčním zobrazovacím systémem FluorCam 800 MF** (Photon System Instruments, Drásov, ČR) s dobou měření 25 minut pro každý vzorek. Jedná se o typ zobrazovacího (imaging) fluorometru, u kterého je fluorescenční signál pocházející z měřené plochy vzorku detekován pomocí digitální kamery. Výsledkem jsou mapy fluorescenčního signálu z celých listů, které umožňují zachytit heterogenitu hodnot jednotlivých parametrů v rámci celého listu v čase. Obrovské množství datových bodů získaných z fluorescenčního zobrazování nabízí možnost velmi dobrého statistického testování pokročilými statistickými testy a také umožňuje včasnou detekci stresu rostlin (Lazár a kol., 2006). Před měřením fluorometrem byly vzorky adaptovány na tmu (30 minut) a poté byly listy oboustrannou lepící páskou přichyceny na desku pod kamerou. Byla snímána adaxiální strana 6 prvních vyrostlých intaktních listů každé varianty. Byly vyhodnoceny vybrané parametry zhášení fluorescence chlorofylu, tj.  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $\Phi_{NPQ}$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $q_P$ .

Koeficient fotochemického zhášení ( $q_P$ ) byl vypočten podle Lazára (2015) jako  $(F_M' - F_t)/(F_M' - F_0')$ , kde  $F_t$  je aktuální fluorescence měřená těsně před aplikací pulzu,  $F_M'$  odráží maximální fluorescenci a  $F_0'$  naopak minimální fluorescenci pro vzorky adaptované na světlo. Kvantový výtěžek pro konstitutivní neregulované disipační procesy byl vypočten jako  $\Phi_{f,D} = F_t/F_M'$  (Lazár, 2015). Kvantový výtěžek regulovaného nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu ( $\Phi_{NPQ}$ ) byl vypočten jako  $(F_t/F_M') - (F_t/F_M)$  (Lazár, 2015) a aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) byl vypočten jako  $(F_M' - F_t)/F_M'$  (Lazár, 2015).  $\Phi_P$  odráží maximální kvantový výtěžek ve stavu přizpůsobeném světlu za přítomnosti

aktinického světla  $(F_M' - F_0')/F_M'$ . Součet  $\Phi_{NPQ}$ ,  $\Phi_{PSII}$  a  $\Phi_{f,D}$  se rovná jedné (Lazár, 2015). Ze změřených hodnot byl také vypočítán parametr nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ) jako  $(F_M - F_M')/F_M'$  neboli  $\Phi_{NPQ}/\Phi_{f,D}$  (Lazár, 2015).

K měření fluorescenčních signálů byly použity mikrosekundové měřicí záblesky červeného světla v intervalech 20 ms, minimální fluorescence chlorofylu ( $F_0$ ) byla stanovena v listech adaptovaných na tmu pomocí záblesků měřicího červeného světla (650 nm, trvání 10  $\mu$ s). Pro stanovení maximální fluorescence chlorofylu ve stavu přizpůsobeném tmě ( $F_M$ ) byl aplikován puls silného modrého světla (2000  $\mu$ mol fotonů  $m^{-2} s^{-1}$ , trvání 800 ms). Po relaxaci ve tmě (90 s) byly listy vystaveny dlouhé periodě aktinického světla (650 nm, 100  $\mu$ mol fotonů  $m^{-2} s^{-1}$ , trvání 25 minut), kdy byly vypočteny všechny parametry analýzy zhášení. Během období aktinického světla bylo použito 17 saturačních pulzů pro stanovení maximální fluorescence ve stavu přizpůsobeném světlu ( $F_M'$ ). První až šestý saturační pulz byl aplikován ve třicetisekundových intervalech, sedmý až jedenáctý záblesk v šedesátisekundových intervalech, dvanáctý až patnáctý záblesk ve dvouminutových periodách a poslední dva záblesky byly aplikovány ve třiminutových a čtyřicetisekundových intervalech.

### 3.3.2 Invazivní (destruktivní) metody

#### 3.3.2.1 Stanovení obsahu chlorofylu

##### Chemikálie a roztoky

- Uhličitan hořečnatý
- 80% aceton

##### Přístrojová technika

- Spektrofotometr (Unicam UV 500, Thermo Spectronics, Cambridge, UK)
- Centrifuga (Centrifuge 5340 R, Eppendorf, Hamburk, Německo)

##### Metodika

Odebrané a zvážené vzorky ječmene (z každé varianty odebráno 5 listů u báze) byly po každém experimentu zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy při  $-80$  °C. Pro vlastní analýzu byly vzorky homogenizovány ve třecí misce s 80% acetonem a malým množstvím  $MgCO_3$ , třecí miska byla opakovaně vypláchnuta 80% acetonem a obsah byl slit do mikrozkuvek (celkové množství acetonu: 2,5-3 ml). Homogenát byl odstředěn při  $6000\times g$  po dobu 10 minut při  $4$  °C. Supernatant byl slit do zkumavky a použit pro spektrofotometrické stanovení obsahu chlorofylu a karotenoidů podle Lichtenthalera (1987) při vlnových délkách

646,8; 663,2 a 750 nm v jednocentimetrové kyvetě. Supernatant byl zředěn tak, aby absorbance při vlnové délce 663,2 nm byla v rozmezí 0,4-0,8. Příprava extraktu probíhala ve tmě na ledu při velmi slabém zeleném světle.

Celkový obsah chlorofylu a karotenoidů v rostlinném materiálu byl vypočten dle Lichtenthalera (1987). Získaná hodnota [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ] byla vynásobena celkovým objemem extraktu [ml] a podělena hmotností vzorku [mg], výsledná hodnota [ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ] popisuje obsah chlorofylu na hmotnost jednotlivých listů.

### 3.3.2.2 Analýza cytokininů

Analýza endogenního obsahu cytokininů byla provedena Mgr. Lenkou Plačkovou, Ph.D. z Laboratoře růstových regulátorů. Zpracování a interpretace získaných dat byly provedeny autorkou bakalářské práce.

#### Chemikálie a roztoky

- Hydroxid amonný 25% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina dusičná (68%), VWR Chemicals S. A. S. (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Kyselina mravenčí 98% – 100% pro LC-MS, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí p.a., Honeywell (Seelze, Německo)
- Methanol ( $\geq 99,9\%$ ) gradient grade for liquid chromatography, LiChrosolv, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Methanol hypergrade for LC-MS, LiChrosolv, Merck KGaA (Darmstadt, Německo)
- Redestilovaná voda z Millipore Simplicity™
- Izotopicky značené cytokininové standardy, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého (Olomouc, Česká republika)
  - báze (B) a ribosidy (R): [ $^{13}\text{C}_5$ ]cZ, [ $^{13}\text{C}_5$ ]tZ, [ $^2\text{H}_5$ ]tZR, [ $^2\text{H}_3$ ]DHZ, [ $^2\text{H}_3$ ]DHZR, [ $^2\text{H}_6$ ]iP, [ $^2\text{H}_6$ ]iPR,
  - N-glukosidy (NG): [ $^{15}\text{N}_4$ ]cZ7G, [ $^2\text{H}_5$ ]tZ7G, [ $^2\text{H}_5$ ]tZ9G, [ $^2\text{H}_3$ ]DHZ9G, [ $^2\text{H}_6$ ]iP7G, [ $^2\text{H}_6$ ]iP9G
  - O-glukosidy (OG): [ $^2\text{H}_5$ ]tZOG, [ $^2\text{H}_5$ ]tZROG, [ $^2\text{H}_7$ ]DHZOG
  - nukleotidy (NT): [ $^2\text{H}_5$ ]tZRMP, [ $^2\text{H}_3$ ]DHZRMP, [ $^2\text{H}_6$ ]iPRMP
- Modifikovaný Bielecki pufr (75 % methanolu + 5 % kyseliny mravenčí + 20 % redestilované vody – 375 ml/500 ml methanolu + 25 ml/500 ml kyseliny mravenčí + 100 ml/500 ml redestilované vody)

- 50% kyselina dusičná (183,8 ml/250 ml kyseliny dusičné + 66,2 ml/250 ml redestilované vody)
- 0,5M roztok hydroxidu amonného v 60% methanolu
- 15mM mravenčan amonný (pH 3,95) (0,566 ml/l kyseliny mravenčí, upravení 25% roztokem hydroxidu amonného na pH 3,95)
- 10% methanol (1 ml/10 ml methanolu + 9 ml/10 ml redestilované vody)

#### **Stacionární fáze pro SPE purifikaci a kolona pro kapalinovou chromatografii:**

- Oasis<sup>®</sup> MCX (30 mg/1 ml), Waters (Milford, MA, USA)
- Pro UHPLC separaci použita kolona s reverzní fází Waters UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (1,7 μm: 2,1 × 150 mm), Waters (Milford, MA, USA)

#### **Přístrojová technika**

- Acquity UPLC<sup>®</sup> I-class systém (Waters, Milford, MA, USA) v zapojení s Xevo<sup>™</sup> TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) vybavený ionizací elektrosprejem ESI. Data zpracována MassLynx<sup>™</sup> software s TargetLynx<sup>™</sup> programem (verze 4.2, Waters, Milford, MA, USA)
- Analytické váhy, Sartorius Weighing Technology GmbH (Goettingen, Německo)
- Centrifuga Avanti<sup>™</sup> 30, Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
- Centrifuga Hettlich Micro 220R, Hettlich GmbH (Tuttingen, Německo)
- Kulový mlýnek MM301, Retsch<sup>®</sup> & Co. KG (Hann, Německo)
- Millipore Simplicity<sup>™</sup> water purification system, Milipore Corp (Billerica, MA, USA)
- Stolní laboratorní rotátor Stuart SB3-BB Scientific, Keison Products (Chelmsford, Velká Británie)
- Ultrazvuková lázeň Transsonic T310, ELMA<sup>®</sup> Schmidbauer GmbH (Singen, Německo)
- Vakuová rotační odparka Trigon-plus<sup>®</sup> RCT1010, Thermo Electron Corporation – k 2006 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Vortex typ Wizard, Velp Scientifica (Usmate, Itálie)

## **Metodika**

Odebrané a zvážené vzorky ječmene (z každé varianty odebráno 5 listů u báze) byly zmrazeny v kapalném dusíku, uloženy při -80 °C a následně rozděleny do tří technických opakování o přibližné hmotnosti 10 mg FW. Vzorky byly extrahovány v 0,5 ml vychlazeného modifikovaného Bieleškiho pufru (Bieleški, 1964; Hoyerová a kol., 2006) se třemi keramickými kuličkami a 10 µl směsi izotopově značených cytokininových standardů (0,2 pmol bází, ribosidů, N-glukosidů a 0,5 pmol nukleotidů a O-glukosidů) pro kontrolu výtěžnosti purifikačního kroku a validaci stanovení (Novák a kol., 2008). Vzorky byly homogenizovány na kulovém mlýnku (5 minut, 27 Hz), extrahovány 30 minut na laboratorním rotátoru Stuart (4 °C) a následně centrifugovány (20 000 rpm, 10 minut, 4 °C) pro oddělení supernatantů. Postup použitý pro purifikaci cytokininů byl kombinací metod popsanych Dobrevem a Kamínkem (2002) a Svačinovou a kol. (2012). Vzorky byly přečištěny použitím SPE kolonek Oasis MCX 1 cc (30 mg) a eluáty byly odpařeny do sucha pomocí koncentrátoru SpeedVac a následně rozpuštěny ve 40 µl 10% methanolu. Vzorky byly analyzovány pomocí ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografie v zapojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC -MS/MS) s trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+) podle Svačinové a kol. (2012). Vzorky byly separovány gradientovou elucí sestávající z methanolu (A) a 15mM mravenčanu amonného (B; pH 3,95) za použití chromatografické kolony Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (1,7 µm; 2,1 x 150 mm) s průtokem 0,400 ml/min a teplotou kolony 55 °C. Kvantifikace byla provedena pomocí záznamu více iontových reakcí (Multiple Reaction Monitoring, MRM) [M+H]<sup>+</sup> a příslušného produktového iontu. Při analýze byly nastaveny parametry následovně: teplota zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 600 °C; průtok desolvatačního plynu 600 l/h; napětí v kapiláře 0,75 kV (Novák a kol., 2008). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru MassLynx a kvantifikace pomocí programu TargetLynx za použití metody standardního izotopového ředění (Novák a kol., 2003).

### **3.3.3 Analýza a zpracování dat**

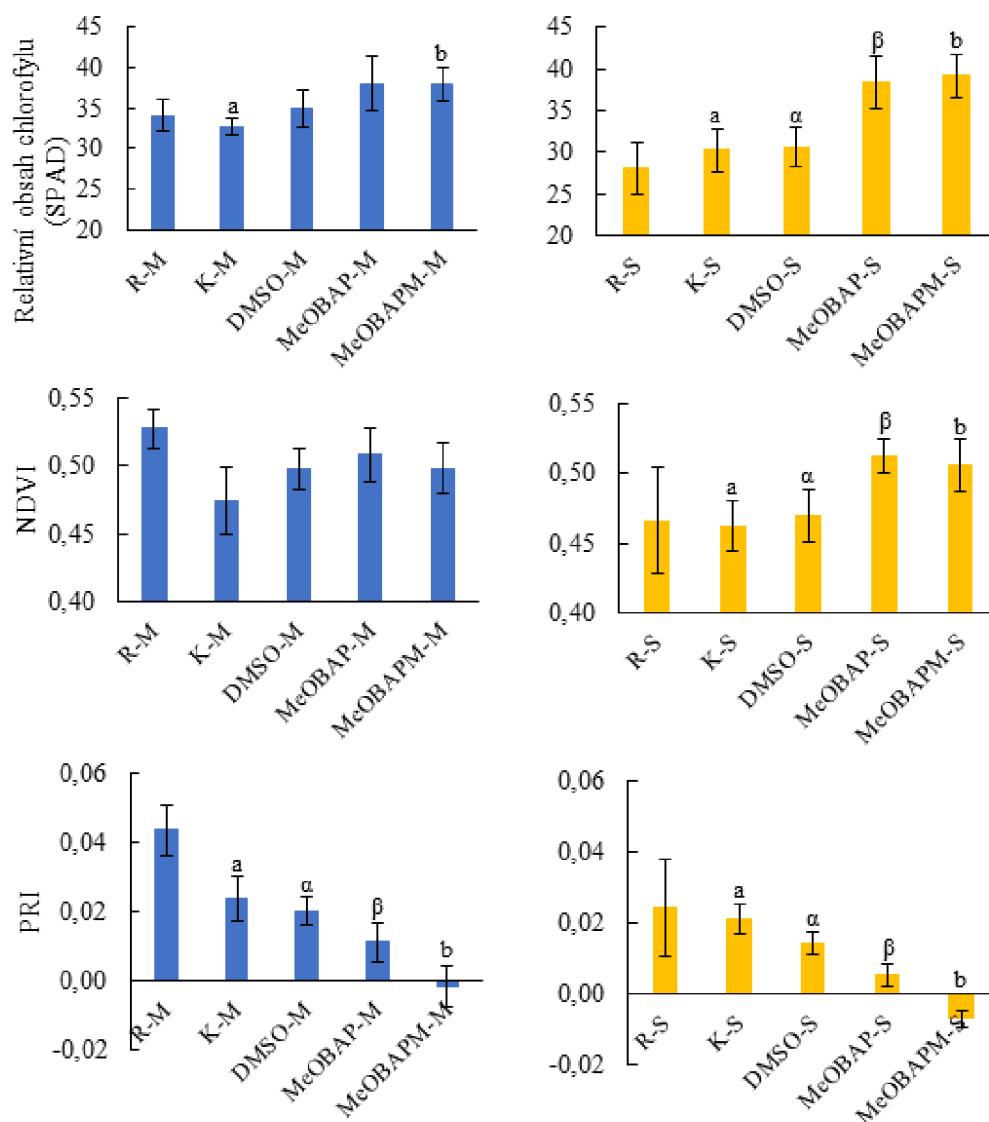
K analýze dat byly využity programy Microsoft Excel 2010 a SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA). K určení statistické významnosti dat byl využit Studentův t-test a Mann-Whitney Rank Sum test.

## 4 VÝSLEDKY

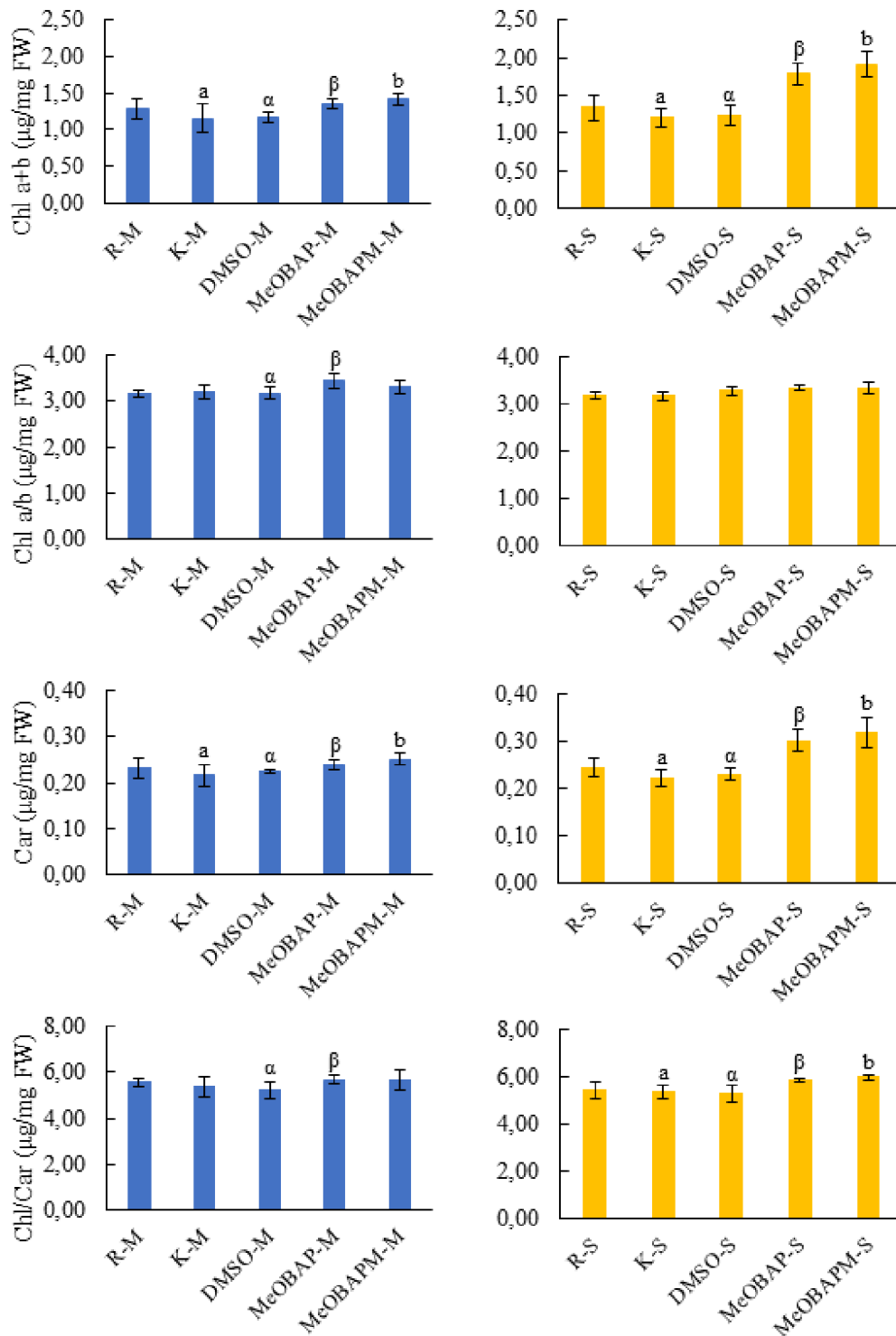
### Obsah chlorofylu, PRI a NDVI

7. den od postřiku intaktních rostlin u suchých variant s půdní vlhkostí 20 % (což odpovídalo zhruba 70% obsahu vody v rostlinách – změřeno v experimentu 4) ošetřených látkami MeOBAP a MeOBAPM byl naměřen vyšší relativní obsah chlorofylu oproti kontrole (K-S) a ošetření DMSO (DMSO-S) (Obr. 3). Stejně došlo k nárůstu relativního obsahu chlorofylu u zalévaných variant, signifikantní bylo ošetření látkou MeOBAPM (MeOBAPM-M) oproti kontrole (K-M). Nárůst obsahu chlorofylu u suché i zalévané varianty ošetřené látkami MeOBAP a MeOBAPM oproti kontrolám (K-S, K-M) a ošetření DMSO (DMSO-S, DMSO-M) potvrdilo i spektrofotoskopické stanovení obsahu chlorofylu po oddělení listů (Obr. 4). Tyto výsledky indikují pozitivní působení aplikovaných látek MeOBAP a MeOBAPM na obsah chlorofylu při působení stresu i při jeho absenci. Poměr chlorofylu *a/b* zůstal konstantní u obou variant a všech typů ošetření s výjimkou nárůstu poměru u zalévané varianty ošetřené látkou MeOBAP (MeOBAP-M) oproti DMSO (DMSO-M) indikující menší obsah chlorofyl *b*. Také obsah karotenoidů byl vyšší u listů ječmene ošetřených MeOBAP a MeOBAPM oproti příslušným kontrolám, což bylo zřejmé i u zalitých variant v menším, byť signifikantním rozdílu. U listů suché varianty ošetřených látkami MeOBAP a MeOBAPM (MeOBAP-S, MeOBAPM-S) se zvýšil poměr chlorofylu ke karotenoidům poukazující na vyšší obsah chlorofylů oproti karotenoidům. U zalévané varianty byl pozorován signifikantní nárůst tohoto poměru u listů ošetřených látkou MeOBAP (MeOBAP-M) oproti ošetření látkou DMSO (DMSO-M). Vyšší obsah chlorofylu u variant MeOBAP a MeOBAPM u zalévaných i suchých variant byl potvrzen také zvýšením hodnot NDVI (Obr. 3). Index NDVI bývá přesný pouze při poměrně nízkých hladinách chlorofylu, při středních a vyšších hladinách ve vegetaci není citlivý na změny obsahu chlorofylu (Lichtenthaler a kol. 1996), v tomto případě však bylo měření NDVI dostačující a jeho hodnoty korelovaly s obsahem chlorofylu. Naopak hodnoty indexu PRI významně poklesly u zalévané i suché varianty rostlin ošetřených látkami MeOBAP a MeOBAPM (Obr. 3) poukazující na nárůst relativního obsahu zeaxantinu, což koreluje s nárůstem obsahu karotenoidů změřeným u těchto variant.





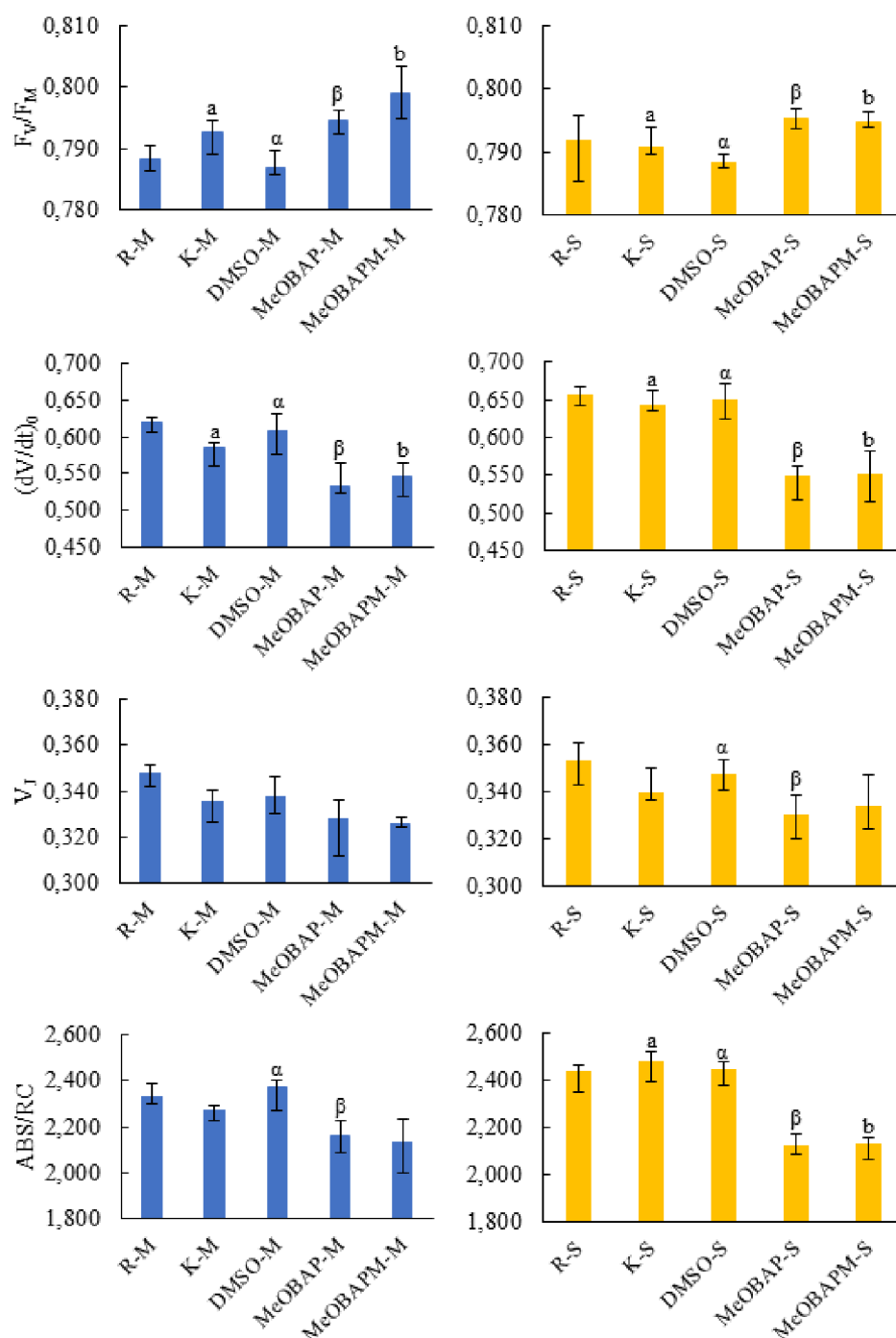
Obr. 3: Parametry spočítané ze změřené propustnosti a odrazivosti listu ječmene. Relativní obsah chlorofylu (SPAD), normalizovaný vegetační index (NDVI) a index fotochemické reflektance (PRI) v intaktních listech jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zalévaných rostlin (M) a rostlin vystavených stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, R představuje rostliny bez zásahu. V grafu jsou vyneseny průměry naměřených hodnot  $\pm$  SD ( $n=8$ ). Statisticky signifikantní rozdíly mezi dvojicemi K-MeOBAPM a DMSO-MeOBAP vyznačeny různými písmeny. Pro normální data s rovností rozptylu testováno párovým t-testem, pro nerovné rozptyly testováno Mann-Whitney Rank Sum testem ( $P < 0,05$ ).



Obr. 4: Obsah fotosyntetických pigmentů stanovených spektrofotometriky v listech ječmene. Obsah chlorofylu (Chl) a+b, poměr Chl a/b, obsah karotenoidů (Car) a poměr Chl/Car (µg/mg FW) v listech jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zalévaných rostlin (M) a rostlin vystavených stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, R představuje rostliny bez zásahu. V grafu jsou vyneseny průměry naměřených hodnot spočítané z biologických replikátů ± SD (n=4-5). Statisticky signifikantní rozdíly mezi dvojicemi K-MeOBAPM a DMSO-MeOBAP vyznačeny různými písmeny. Pro normální data s rovností rozptylu testováno párovým t-testem, pro nerovné rozptyly testováno Mann-Whitney Rank Sum testem (P < 0,05).

### **Velmi rychlá fluorescenční indukce**

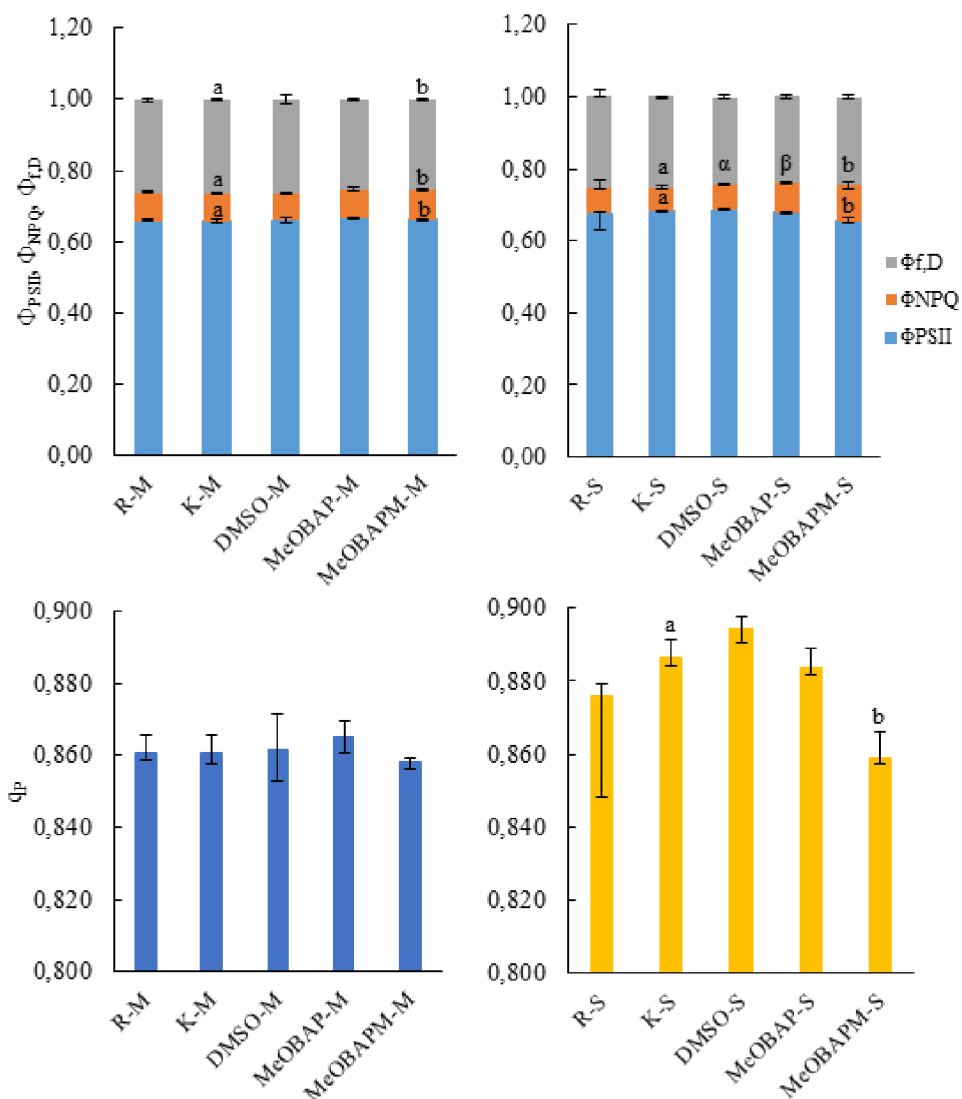
Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $F_v/F_M$ ) byl podstatně vyšší u suché i zalévané varianty ošetřené látkami MeOBAP a MeOBAPM oproti rostlinám neošetřeným (Obr. 5). Nejvýznamnější negativní vliv, ještě větší než samotné sucho, na fotochemii PSII mělo DMSO. Potlačení stresu suchem u ošetřených variant byl také zřejmý i ostatních parametrů velmi rychlé fluorescenční indukce (Obr. 5). Především u suchých ošetřených variant byla pozorována nízká hodnota parametrů  $(dV/dt)_0$ ,  $V_J$  a ABS/RC oproti kontrole (K-S) a ošetření DMSO (DMSO-S).  $(dV/dt)_0$  odráží rychlost přisunu excitace do RCII a následně rychlost redukce  $Q_A$ ,  $V_J$  taktéž indikuje zrychlení redukce  $Q_A$ . Nárůst těchto parametrů bývá často indikátorem stresu a je spjat i s vyšším relativním zastoupením antén PSII (nárůst hodnoty ABS/RC). Vyšší hodnota ABS/RC byla u neošetřených variant také doprovázena nízkými hodnotami parametru  $F_v/F_M$ , to svědčí o přednostním poškození RCII, což bylo nejvíce patrné u ošetření látkou DMSO (DMSO-M, DMSO-S). Ošetření látkami MeOBAP a MeOBAPM i v tomto případě působilo na rostliny protektivně nezávisle na působení stresu.



Obr. 5: Vybrané parametry spočítané z křivky velmi rychlé fluorescenční indukce změřené na listech ječmene. Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu přizpůsobeném tmě ( $F_v/F_m$ ), počáteční nárůst rychlosti akumulace fluorescence O-J ( $(dV/dt)_0$ ), relativní variabilní fluorescence v bodě J ( $V_j$ ), a zdánlivá velikost antén aktivního RCII (ABS/RC) intaktních listů jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, L. conv. *distichon*) zalévaných rostlin (M) a rostlin vystavených stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, R představuje rostliny bez zásahu. V grafu jsou vyneseny mediány naměřených hodnot a kvartily ( $n=8$ ). Statisticky signifikantní rozdíly mezi dvojicemi K-MeOBAPM a DMSO-MeOBAP vyznačeny různými písmeny. Pro normální data s rovností rozptylu testováno párovým t-testem, pro nerovné rozptyly testováno Mann-Whitney Rank Sum testem ( $P < 0,05$ ).

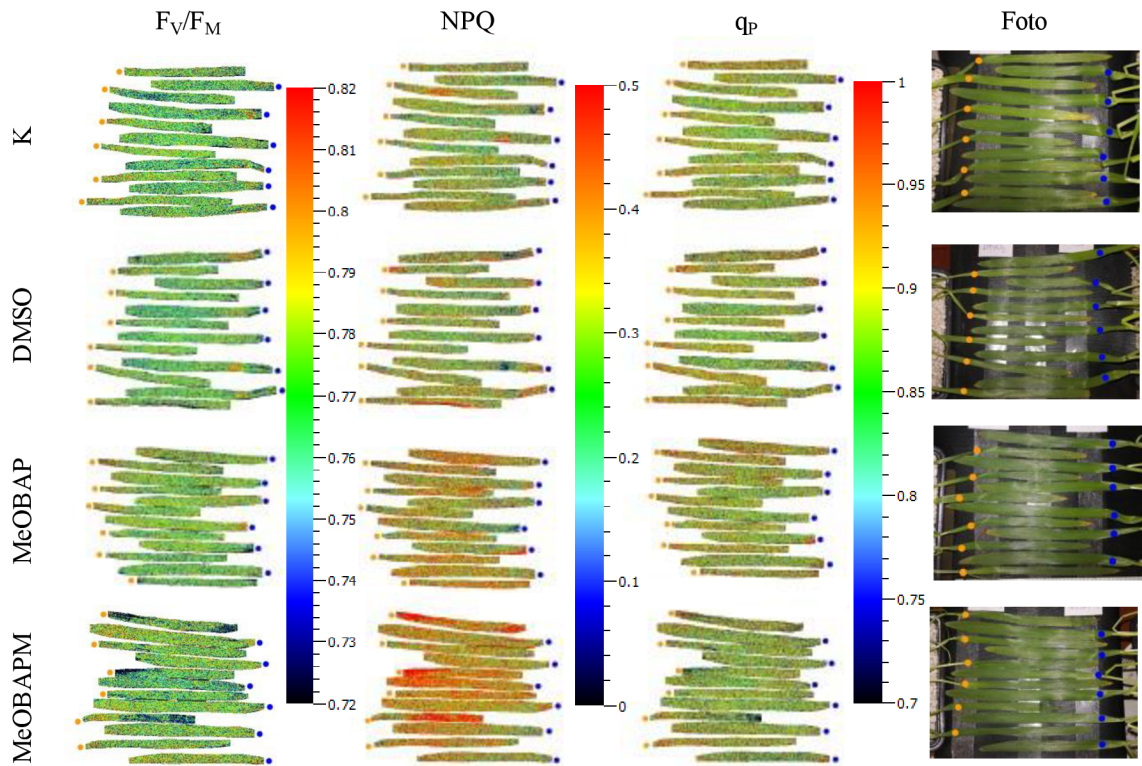
## Pomalá fluorescenční indukce

Ve variantách suchých i zaléváných ošetřených MeOBAP a MeOBAPM byla změřena aktivace ochranných regulovaných nefotochemických procesů (nárůst  $\Phi_{NPQ}$ ) na rozdíl od neošetřených rostlin (Obr. 6). U suchých variant ošetřených MeOBAPM byl nárůst nefotochemického zhášení doprovázen poklesem Gentyho parametru ( $\Phi_{PSII}$ ) (Obr. 6). Koeficient fotochemického zhášení ( $q_P$ ) narostl u suchých variant zejména u látky DMSO (DMSO-S), výrazný byl jeho pokles u látky MeOBAPM oproti kontrole (K-S).



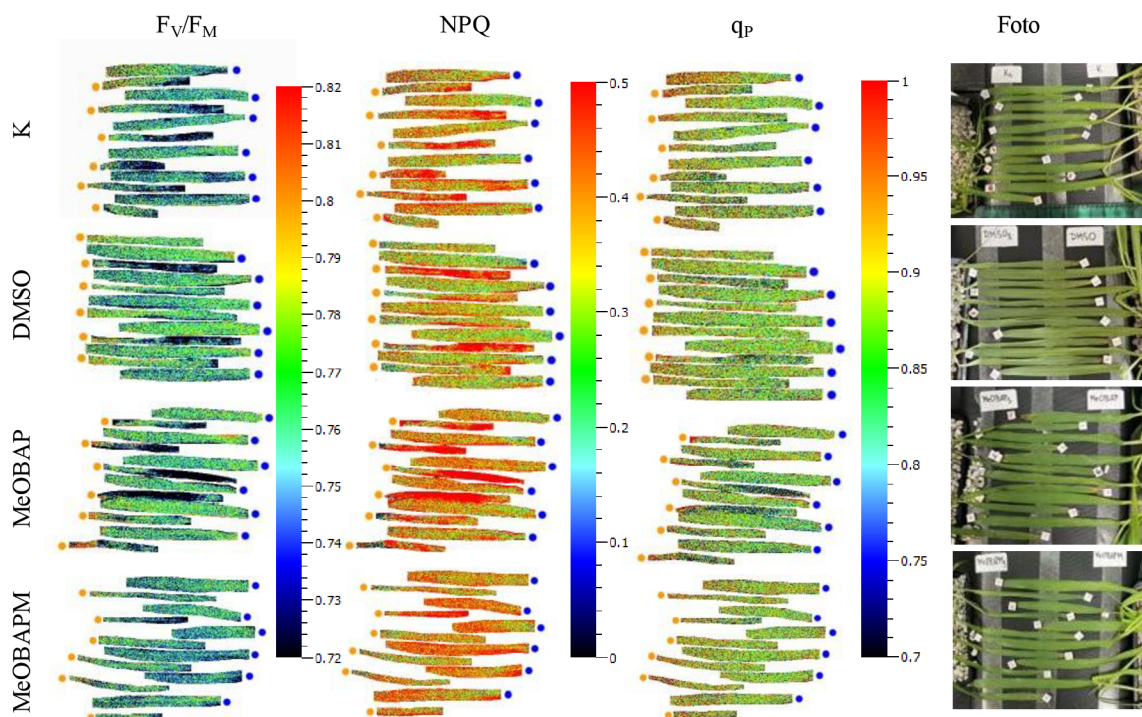
Obr. 6: Parametry spočítané v ustáleném stavu pomalé fluorescenční indukce ve stavu adaptovaném na světlo. Aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), kvantový výtěžek nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu ( $\Phi_{NPQ}$ ), kvantový výtěžek pro konstitutivní neregulované disipační procesy ( $\Phi_{f,D}$ ) a koeficient fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu ( $q_P$ ) intaktních listů jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zaléváných rostlin (M) a rostlin vystavených stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, R představuje rostliny bez zásahu. V grafu jsou vyneseny mediány naměřených hodnot a kvartily (n=6). Součet  $\Phi_{NPQ}$ ,  $\Phi_{PSII}$  a  $\Phi_{f,D}$  se rovná jedné. Statisticky signifikantní rozdíly mezi dvojicemi K-MeOBAPM a DMSO-MeOBAP vyznačeny různými písmeny. Pro normální data s rovností rozptylu testováno párovým t-testem, pro nerovné rozptyly testováno Mann-Whitney Rank Sum testem ( $P < 0,05$ ).

Fluorescenční imaging (Obr. 7) znázorňuje reprezentativní měření parametrů  $F_v/F_M$ , NPQ a  $q_P$  na celé ploše intaktních listů u variant K, DMSO, MeOBAP a MeOBAPM. Rostlina bez ošetření (R) není uvedena, protože hodnoty byly podobné ke K. Z imagingu je nejlépe patrný nárůst parametru NPQ u listů stresovaných suchem a ošetřených látkou MeOBAPM. Heterogenita listů napříč typem ošetření a působením sucha u parametrů  $F_v/F_M$  a  $q_P$  nebyla u experimentu 3 výrazně patrná.



Obr. 7: Zobrazení reprezentativních parametrů fluorescence chlorofylu  $F_v/F_M$ , NPQ a  $q_P$  z experimentu 3. Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII pro vzorek adaptovaný na tmu ( $F_v/F_M$ ), nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ) a koeficient fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu ( $q_P$ ) měřeny FluorCamem 800MF na celé ploše intaktních listů jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zalévaných rostlin (modrý bod) a rostlin vystavených stresu suchem (žlutý bod) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem a fotografie měřených listů těsně po vlastní zhášecí analýze. Rostlina bez ošetření (R) není uvedena, protože hodnoty byly podobné ke K.

U experimentu 4 (Obr. 8) bylo patrné větší poškození fotosyntetického aparátu (pokles  $F_v/F_m$  a  $q_p$ , nárůst NPQ) u většiny suchých variant. Zatímco u varianty MeOBAP jsou rozdíly mezi suchými i mokřými listy nejmarkantnější, varianta MeOBAPM se jeví být nejhomogennější. Suché varianty mají maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, parametr fotochemického zhášení i nefotochemické zhášení srovnatelné s variantou zalévanou. Výpočet průměrných hodnot z celé plochy listu (data neukázána) prokázal dokonce lepší hodnoty NPQ i  $q_p$  oproti kontrole u varianty MeOBAPM-S. Naopak varianta MeOBAP-S vykazovala největší pokles fotochemického zhášení a maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII a nárůst nefotochemického zhášení oproti zalévané variantě.



Obr. 8: Zobrazení reprezentativních parametrů fluorescence chlorofylu  $F_v/F_m$ , NPQ a  $q_p$  z experimentu 4. Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII pro vzorek adaptovaný na tmu ( $F_v/F_m$ ), nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ) a koeficient fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu ( $q_p$ ) měřeny FluorCamem 800MF na celé ploše intaktních listů jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, L. conv. *distichon*) zalévaných rostlin (modrý bod) a rostlin vystavených stresu suchem (žlutý bod) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem a fotografie měřených listů těsně po vlastní zhášecí analýze.

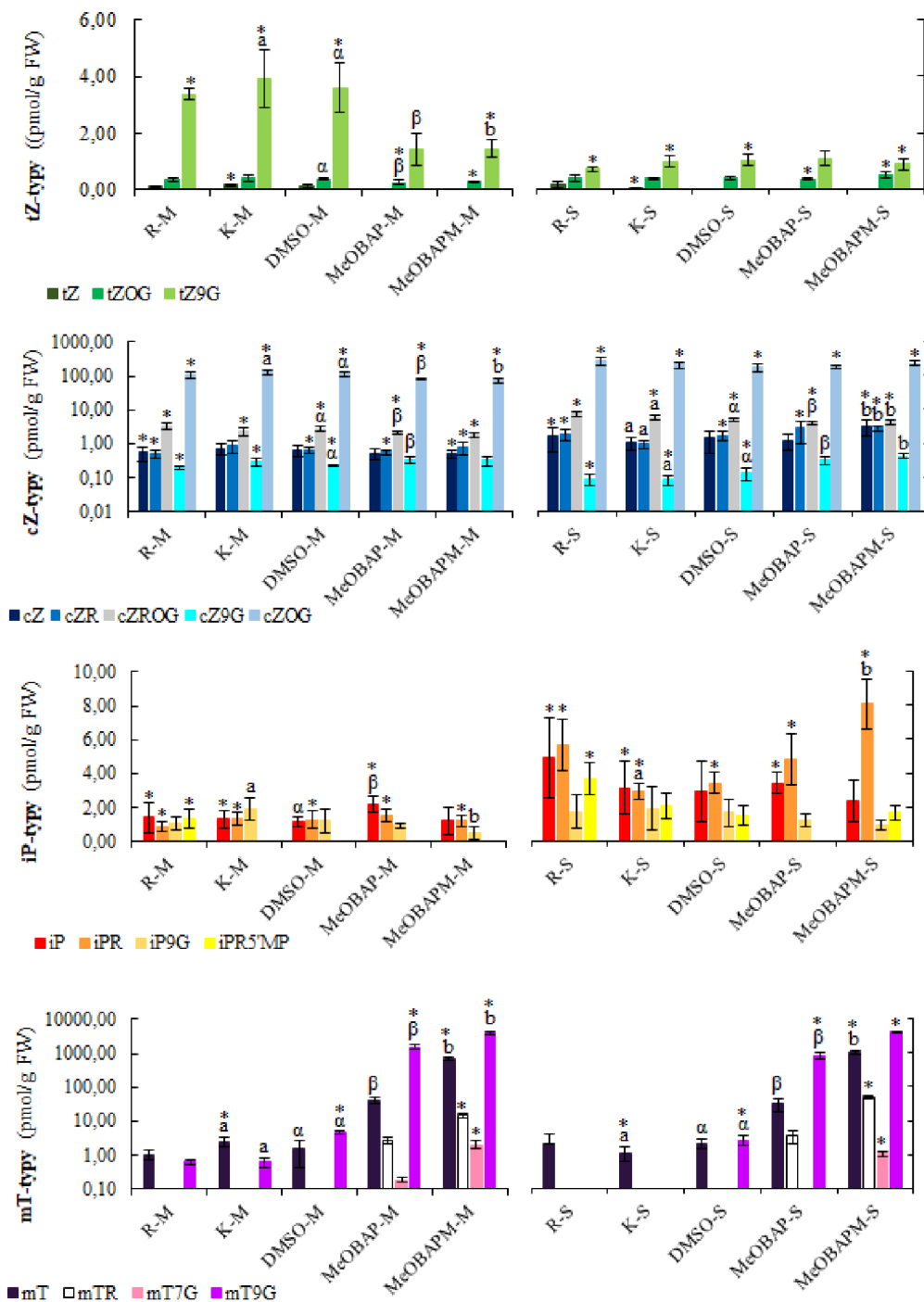
### Analýza cytokininů

Při stresu suchem došlo k poklesu aktivních i neaktivních tZ typů cytokininů (tZ, tZ9G) (Obr. 9). Celkový pool tZ typů poklesl při stresu suchem nezávisle na ošetření příslušnými látkami (Obr. 9). Přestože biosyntéza tZ byla lehce inhibována exogenní aplikací MeOBAP a MeOBAPM u zalévaných i suchem stresovaných rostlin (viz srovnání obsahu tZ u varianty R a K s obsahem tZ u variant MeOBAP a MeOBAPM), tato inhibice byla v celkovém poolu tZ typů zanedbatelná. U cZ typů cytokininů naopak celkový pool aktivních i neaktivních forem vzrostl. Za stresu suchem narostla především tvorba aktivních (cZ, cZR) i některých zásobních a neaktivních (cZOG, cZROG, cZ9G) cZ typů cytokininů a to zejména u listů

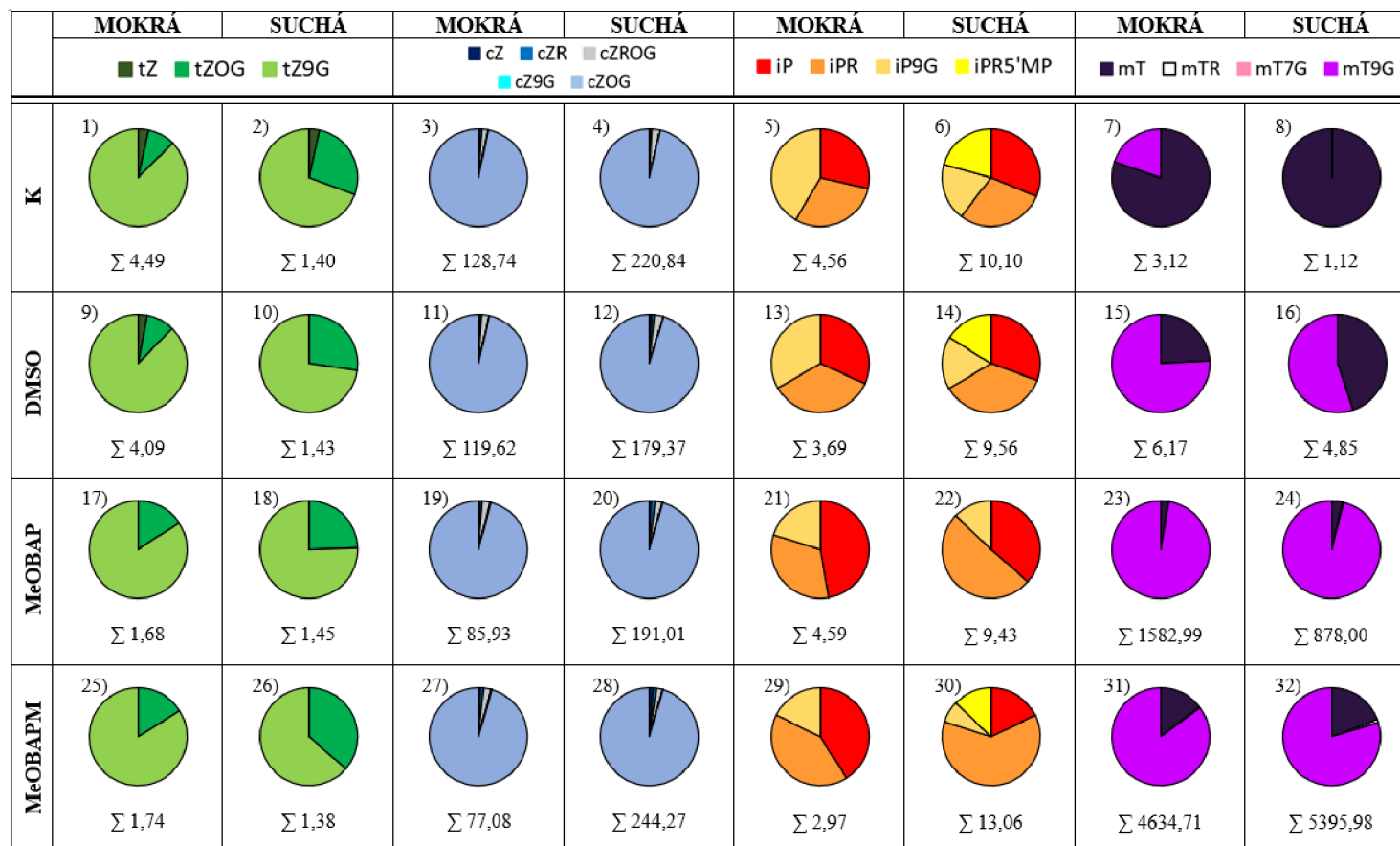
ošetřených látkami MeOBAP a MeOBAPM (cZ, cZR, cZ9G). U iP typů došlo u suché varianty k významnému nárůstu aktivních forem (iP, iPR) a narozdíl od zalévané varianty (s výjimkou varianty R-M) byly detekovány i biosyntetické formy (iPR5'MP) (Obr. 9). Defosforylace a deglykosilace iPR5'MP může zvýšit iPR/iP pool v zasychajících listech. Největší zvýšení koncentrace aktivních ribosidů (iPR) bylo dosaženo u suché varianty ošetřené MeOBAPM, poukazující na jeho významný vliv v regulaci iP biosyntetické dráhy. Rostlina v podmínkách sucha nejspíše syntetizuje iP typy za účelem ochrany fotosyntetického aparátu a zachování obsahu chlorofylu. IP typy jsou v cytokininové biosyntetické dráze dříve než tZ typy, proto je jejich syntéza rychlejší a méně energeticky náročná.

U mT typů došlo k obrovskému nárůstu volných bází (mT) i neaktivní formy (mT9G) cytokininů u suché i mokré varianty ošetřené látkou MeOBAP i MeOBAPM, a to zde naopak nezávisle na míře sucha, větší faktor hrál spíše typ ošetření (Obr. 9). Podstatně větší nárůst mT, mT7G a mT9G u rostlin ošetřených mesylátem indikuje účinnější příjem a využití mesylátů v metabolismu rostliny než v případě odpovídající volné báze (MeOBAP). Ječmen je tedy nejspíše schopen dodaný MeOBAP a MeOBAPM použít k syntéze mT forem, které potom využívá ve svém metabolismu k rozličným ochranným procesům. Důležitým závěrem z analýzy cytokininů je, že hladina endogenních cytokininů není téměř inhibována exogenní aplikací našich cytokininových derivátů, což je častý nežádoucí efekt exogenních aplikací (Aremu a kol., 2014). Naopak exogenně aplikované deriváty cytokininů v našem případě spíše podporují biosyntézu dalších aromatických cytokininů, které následně vykazují ochranné účinky na fotosyntézu a růst rostlin.





Obr. 9: Analýza endogenní koncentrace jednotlivých cytokininových typů v listech ječmene. Celkový obsah tZ-typů, cZ-typů, iP-typů a mT-typů cytokininů (pmol/g FW) v listech jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zalévaných rostlin (M) a rostlin vystavených stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčečadlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, R představuje rostliny bez zásahu. tZ (*trans*-zeatin), tZOG (tZ O-glukosid), tZ9G (tZ 9-glukosid), cZ (*cis*-zeatin), cZR (cZ ribosid), cZROG (cZ ribosid O-glukosid), cZ9G (cZ 9-glukosid), cZOG (cZ O-glukosid), iP ( $N^6$ -isopentenyladenin), iPR (iP ribosid), iP9G (iP 9-glukosid), iPR5'MP (iPR 5'-monofosfát), mT (*meta*-topolin), mTR (mT ribosid), mT7G (mT 7-glukosid), mT9G (mT 9-glukosid). V grafu jsou vyneseny průměry spočítané z naměřených hodnot pro biologické replikáty  $\pm$  SD (n=4-5). Statisticky signifikantní rozdíly mezi dvojicemi K-MeOBAPM a DMSO-MeOBAP vyznačeny různými písmeny. Statisticky signifikantní rozdíly mezi zalévanými rostlinami (M) a rostlinami vystavenými suchu (S) vyznačeny hvězdičkou. Pro normální data s rovností rozptylu testováno párovým t-testem, pro nerovné rozptyly testováno Mann-Whitney Rank Sum testem ( $P < 0,05$ ). U grafů pro cZ-typy a mT-typy je pro vynesení průměrů naměřených hodnot použito logaritmické měřítko.



Obr. 10: Celkový obsah jednotlivých cytokininových typů (Σ: pmol/g FW) a relativní zastoupení jednotlivých cytokininových typů u rostlin ječmene. Znázorněny tZ-typy, cZ-typy, iP-typy a mT-typy cytokininů v listech jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, L. conv. *distichon*) zalévaných rostlin (MOKRÁ) a rostlin vystavených stresu suchem (SUCHÁ) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, rostlina bez ošetření (R) není uvedena, protože hodnoty byly podobné ke K. tZ (*trans*-zeatin), tZOG (tZ O-glukosid), tZ9G (tZ 9-glukosid), cZ (*cis*-zeatin), cZR (cZ ribosid), cZROG (cZ ribosid O-glukosid), cZ9G (cZ 9-glukosid), cZOG (cZ O-glukosid), iP (N6-isopentenyladenine), iPR (iP ribosid), iP9G (iP 9-glukosid), iPR5'MP (iPR 5'-monofosfát), mT (*meta*-topolin), mTR (mT ribosid), mT7G (mT 7-glukosid), mT9G (mT 9-glukosid).

## 5 DISKUZE

### **Obsah chlorofylu, PRI a NDVI a velmi rychlá a pomalá fluorescenční indukce**

Stresové a adaptační reakce rostlin úzce souvisejí s regulací fotosyntézy, od změn stomatální vodivosti až po indukci syntézy chloroplastových proteinů, což se finálně projevuje ve fenotypových charakteristikách stresovaných rostlin včetně jejich růstu a výnosu. Cytokininy mají schopnost řídit různé fyziologické procesy v rostlinách a působit ochranně právě za stresových podmínek (Chernyad'ev, 2009).

Součástí stresové adaptace je zachování fyziologického stavu fotosyntetických pigmentů (chlorofylů *a* a *b*, karotenoidů a xantofylů) (Chernyad'ev, 2009). Při stresu suchem rostliny obecně ztrácejí chlorofyl, což potvrzuje řada studií (Nikolaeva a kol. 2010; Li a kol. 2006; Ghotbi-Ravandi a kol. 2014; Nyachiro a kol. 2001; Anjum a kol. 2003; Ferioun a kol. 2023). Cytokininy udržují obsah chlorofylu v listu potlačením katabolismu chlorofylu (Vylíčilová a kol., 2016). V naší práci byla ztráta chlorofylu pozorována u suchých neošetřených rostlin, naproti tomu u suchých ošetřených rostlin látkami MeOBAP a MeOBAPM došlo k výraznému potlačení degradace chlorofylu a to jak při neinvazivním měření relativního obsahu chlorofylu přístrojem SPAD a Polypen, tak i při spektrofotometrickém stanovení. Potlačení degradace chlorofylu v důsledku ošetření cytokininy potvrdila i studie Dwivedi a kol. (2014), kde foliární aplikace cytokininů na rostliny pšenice s vodním deficitem vedla ke zvýšení celkového obsahu chlorofylu o 10 % ve srovnání s rostlinami bez postřiku (Dwivedi a kol., 2014). Zachování obsahu chlorofylu postřikem listů pšenice látkou BAP a putrescin potvrdila dále studie Gupta a kol. (2012), kdy zároveň došlo k výraznému snížení obsahu chlorofylu v důsledku vodního stresu u rostlin neošetřených.

Změny v obsahu chlorofylu nebyly doprovázeny změnami v poměru chlorofylu *a/b*, tyto výsledky se shodují se studií Nikolaeva a kol. (2010), kde pokles chlorofylu u kultivarů pšenice vystavených suchu nebyl doprovázen změnami v poměru chlorofylu *a/b*. Z výsledků vyplývá, že při stresu suchem ubývá chlorofyl *a* stejně rychle jako chlorofyl *b* a lze tak usoudit, že chlorofyl *b* není na sucho citlivější než chlorofyl *a* (Mafakheri a kol., 2010).

Karotenoidy patří taktéž mezi důležité ukazatele k hodnocení odolnosti vůči stresu suchem u vyšších rostlin (Farooq a kol., 2009) a jejich obsah obecně klesá pomaleji než obsah chlorofylů (Sims a Gamon, 2002). Obsah karotenoidů byl v naší práci vyšší u listů ječmene ošetřených MeOBAP a MeOBAPM oproti příslušným kontrolám ve shodě se studií Haisel a kol. (2006), kde priming s BAP vedl ke zvýšení pigmentů xantofylového cyklu

u čtyř druhů rostlin vystavených suchu. Zvýšení poměru Chl/Car u listů ošetřených látkami MeOBAP a MeOBAPM oproti příslušným kontrolám opět značí protektivní účinky aplikovaných látek při stresu suchem. Tyto výsledky také poukazují na ochrannou funkci karotenoidů, které jsou známé svou antioxidantivní aktivitou (Das a Roychoudhury, 2014) a pomáhají rostlinám odolávat suchu (Pandey a Shukla, 2015).

Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmou ( $F_v/F_m$ ) odrážející míru fotoinhibice nebo poškození PSII (Stirbet a kol. 2018) neposkytuje vždy informace o toleranci nebo odolnosti vůči stresu suchem (Oukarroum a kol., 2006; Oukarroum a kol., 2007). Přesto řada studií potvrdila pokles tohoto parametru při dlouhodobém působení sucha (Živčák a kol., 2008; Wang a kol. 2022) a i v naší práci došlo k mírnému poklesu tohoto parametru při stresu suchem. Ošetření rostlin látkami MeOBAP a MeOBAPM vedlo k zachování maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII u suchem stresovaných nebo zalévaných rostlin, kde došlo dokonce ke zvýšení účinnosti fotochemických reakcí v PSII. Pokles  $F_v/F_m$  u vzorků ošetřených DMSO poukazuje na snížené využití světelné energie ve fotochemii PSII a tedy na inhibiční působení DMSO na primární fotosyntetické reakce.

Pokles hodnot NDVI u neošetřených rostlin vystavených suchu byl v souladu se studií Mänd a kol. (2010), u rostlin ošetřených látkami MeOBAP a MeOBAPM naopak index vzrostl a koreloval i s vyšším obsahem chlorofylu. Pokles hodnot indexu PRI byl v souladu se studií Abdelhakim a kol. (2021), kde došlo ke snížení PRI při stresu suchem u několika genotypů pšenice.

Nízká hodnota parametrů  $(dV/dt)_0$ ,  $V_J$  a ABS/RC u rostlin ošetřených látkami MeOBAP a MeOBAPM vystavených suchu odrážela jejich výrazné působení proti stresu. Naopak vysoká hodnota parametrů u neošetřených variant značila rychlou akumulaci zavřených RCII, zrychlení redukce  $Q_A$  a vyšší relativní zastoupení antén, což potvrzuje studie Oukarroum a kol. (2006), kde došlo ke zvýšení hodnot parametru  $(dV/dt)_0$  při testování odolnosti odrůd ječmene vůči suchu pomocí látky PEG 6000. Ghaffar a kol. (2023) prokázali zvýšení poměru ABS/RC při stresu suchem u kultivarů pšenice. A studie Ghotbi-Ravandi a kol. (2014) při zkoumání reakce fotosyntetického aparátu u genotypů ječmene zaznamenala nárůst relativní variabilní fluorescence v bodě J ( $V_J$ ) v reakci na stres suchem. Ve studii Klos a kol. (2022) byly látky MeOBAP a MeOBAPM o stejné koncentraci  $10^{-4}$  M aplikovány na oddělené listy ječmene vystavené senescenci tmou. V souladu s naší prací byly pozorovány nízké hodnoty parametrů  $(dV/dt)_0$ ,  $V_J$  i ABS/RC oproti příslušným

kontrolám. Z výsledků lze usoudit, že aplikované látky působí na výše zmíněné parametry protektivně nezávisle na typu aplikovaného stresu.

Ošetření intaktních rostlin vystavených suchu látkami MeOBAP a MeOBAPM nepůsobilo výrazně protektivně na  $\Phi_{PSII}$ , narozdíl od studie Klos a kol. (2022) vedlo k aktivaci nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu a koeficient fotochemického zhášení naopak narostl u suchých variant ošetřených látkou DMSO. Nárůst parametru  $\Phi_{NPQ}$  odráží nárůst parametru nefotochemického zhášení (NPQ, data v příloze) při neměnném  $\Phi_{f,D}$ . Aktivaci xantofylového cyklu (konverze violaxantinu na zeaxantin) a disipaci nadměrné excitační energie na teplo také podporuje nízká až záporná hodnota PRI u variant ošetřených MeOBAP a MeOBAPM (Obr. 3). S nízkou hodnotou PRI koresponduje i nižší hodnota Gentyho parametru  $\Phi_{PSII}$  u těchto variant, taková shoda již byla popsána dříve u douglasky při různých světelných intenzitách (Gamon a Bond, 2013). Pokles Gentyho parametru u suchých MeOBAP a MeOBAPM variant byl způsoben poklesem parametru fotochemického zhášení (Obr. 6) a tedy nižším zastoupením otevřených RC PSII, neboť maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII na světle ( $\Phi_P$ , data v příloze) nevykazoval u všech suchých variant významné rozdíly. Zajímavostí je, že v experimentu 4 (koncentrace látek  $10^{-5}$  M a mírně větší stres suchem) vykazovaly parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $\Phi_{NPQ}$  a  $q_P$  opačný trend zejména u varianty MeOBAPM-S než v experimentu 3, tzn. že v experimentu 4 parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_P$  dosahovaly podstatně vyšších hodnot a  $\Phi_{NPQ}$  nižších hodnot u varianty MeOBAPM oproti MeOBAP či kontrolám. Může to být způsobeno příliš nízkou koncentrací látky MeOBAP pod prahem její účinnosti na zhášecí procesy za stresu suchem.

### **Analýza cytokininů**

Analýza endogenních koncentrací cytokininů prokázala významnou roli isoprenoidních cytokininů (cZ a iP typy) při stresu suchem, přičemž MeOBAPM významně ovlivňuje jejich biosyntetickou dráhu. Došlo k výraznému nárůstu cZ typů (cZ, cZR, cZROG) i iP typů (iP, iPR, iPR5'MP) cytokininů při stresu suchem, což naznačuje (iPR5'MP), že jejich biosyntéza byla dokonce stimulována. Mesyláty cytokininů jsou nejspíše rostlinou dobře metabolizovány a využity k syntéze mT typů s protektivními účinky. Celkový pool tZ (tZ, tZ9G) typů poklesl při stresu suchem, v případě tZ se jednalo o zanedbatelnou inhibici po ošetření MeOBAP a MeOBAPM, v případě tZ9G zde sehrály roli obojí, stres suchem včetně působení exogenně aplikovaných MeOBAP a MeOBAPM.

Zeatin se vyskytuje ve dvou izomerech, zatímco tZ byl shledán bioaktivní látkou, cZ, který byl dlouhou dobu považován za neaktivní nebo přítomný ve slabě aktivních formách,

má údajně slabý biologický účinek. Navzdory předpokládané neaktivitě cZ byla opakovaně zaznamenána přítomnost volných cZ bází v rostlinných pletivech. Některé rostlinné druhy obsahují detekovatelné množství různých cytokininových cZ typů, a to příležitostně i jako převažující skupinu celkových cytokininů (Gajdošová a kol., 2011).

Ve studii Gajdošová a kol. (2011) byla potvrzená heterogenita v hladinách cytokininů typu cZ a tZ během senescence v nejmladších zelených a nejstarších senescentních listech rostlin *Arabidopsis* starých 65 dní. Ve srovnání s nejmladšími zelenými listy bylo množství cZ typů ve starých listech 1,6× vyšší. Hladina tZ typů se snížila 1,3×. V senescentních listech představovaly cZ typy téměř 30 % celkového obsahu cytokininů (Gajdošová a kol., 2011).

V souladu s poklesem obsahu tZ typů a nárůstem cZ typů pozorovaných v naší práci, studie Macková a kol. (2013) popsala též výrazný pokles tZ typů a jeho ribosidu u transgenních rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum L.*) při stresu suchem. Hladiny bioaktivních cytokininů (tZ, iP a jejich odpovídající ribosidy a dihydrozeatin) se silně snížily v listech WT (wild-type); v kořenech WT se výrazný pokles tZ shodoval s mírným zvýšením iPR. Pokles bioaktivních cytokininů byl menší v listech rostlin W6:CKX1, které jsou tolerantnější k suchu. Pokles tZ bylo v celé rostlině doprovázeno zvýšením iPR. V listech vysoce tolerantních rostlin k suchu 35S:CKX1 byl pokles ribosidu tZ v kořenech také kompenzován zvýšením iPR. Na rozdíl od poklesu tZ a jeho ribosidu u rostlin WT a W6:CKX1 se obsah odpovídajících metabolitů cZ po stresu suchem zvýšil (Macková a kol., 2013). Ve studii Mehmood a kol. (2021) došlo ke snížení obsahu aktivního cytokininu tZ u rostlin sezamu (*Sesamum indicum L.*) souběžně se zvýšením obsahu iP za sucha, což naznačuje částečné metabolické omezení biosyntézy cytokininů v listech při stresu z nedostatku vody. Snížení endogenního obsahu tZ může být důsledkem nižší konverze iP na tZR (Mehmood a kol., 2021), ale může být také způsobeno aktivací cytokininoxidázy, u které bylo prokázáno, že se zvyšuje při stresu z nedostatku vody u jiných rostlinných druhů (Brugière et al., 2003).

Cytokiny typu cZ převládají ve vývojových stádiích spojených s omezeným růstem, ale zachovalou schopností fyziologických procesů. Předpokládá se, že cytokiny typu cZ mají funkci regulátorů zodpovědných za udržení bazální cytokininové aktivity společně s omezením růstu nezbytných pro přežití v nepříznivých podmínkách, což podporuje následné zotavení rostlin (Gajdošová a kol., 2011). cZR a cZOG se významně podílely na zachování obsahu chlorofylu v listech ovsa (Gajdošová a kol., 2011). Reverzibilní inaktivace cytokininů procesem O-glukosylace umožňuje rostlinám rychle reagovat na narušenou hormonální homeostázu způsobenou stresem (Klos a kol., 2022).

U mT typů došlo k obrovskému nárůstu mT, mTR a mT7G a mT9G u suché i mokré varianty ošetřené látkami MeOBAP a zejména MeOBAPM odrážející schopnost rostliny zmetabolizovat si exogenně aplikované látky na biologicky aktivní látky s protektivním účinkem. Ve studii Klos a kol. (2022) byla u segmentů listů inkubovaných ve tmě znatelná též výrazná akumulace volných mT bází a jeho ribosidu pozorována u ošetření mesylátem (MeOBAPM). Mesyláty cytokininů jsou tedy nejspíše přijímány a metabolizovány rostlinou snadněji než odpovídající volné báze (př. MeOBAP) a to při umělé senescenci i stresu suchem, vypovídající o jejich univerzální protektivní roli v různých stresových podmínkách. Důležitý je také fakt, že i při takto vysokých koncentracích mT typů (tisíce pmol/g FW), nejsou tyto koncentrace toxické a mají naopak ochranný účinek na funkčnost PSII a zachování obsahu chlorofylu. Ve studii Tarkowská a kol. (2003) aplikace BAP v koncentraci  $10^{-4}$  M na oddělené listy pšenice vedla k poklesu obsahu chlorofylu oproti koncentraci  $10^{-5}$  M. Naopak při aplikaci methoxytopolinových látek o koncentraci  $10^{-4}$  M došlo ke zvýšení obsah chlorofylu oproti použití nižší koncentrace  $10^{-5}$  M.

V případě aplikace exogenních cytokininů je výhodné použít aromatické cytokininy, např. BAP nebo mT, protože isoprenoidní cytokininy podléhají rychlé degradaci enzymy deaktivujícími cytokininy – cytokininoxidázami/dehydrogenázami (CKX) (Mrízová a kol., 2013). Široce používaný aromatický cytokinin BAP je však v rostlinách rychle N-glukosylován a nahromaděné N<sup>7</sup>- a N<sup>9</sup>-glukosidy mohou inhibovat růst (Werbrouck et al., 1996). Naproti tomu jeho hydroxylovaný derivát, mT, je deaktivován glukosylací na postranním řetězci. Vzniklý O-glukosid slouží jako zásobní forma cytokininů, která může být postupně hydrolyzována, čímž se uvolňuje aktivní sloučenina (Werbrouck et al., 1996) a výrazně se prodlužuje účinek cytokininů (Přerostová kol., 2018).

Souhrnně lze říci, že testované látky měly významné ochranné účinky na intaktní rostliny ječmene během stresu suchem. Významně snižovaly degradaci fotosyntetických pigmentů a zpomalovaly poškození funkce PSII. Některé fotosyntetické parametry ošetřených rostlin byly dokonce příznivější než u příslušných kontrol.

## 6 ZÁVĚR

V prvních experimentech byl optimalizován postřik rostlin ječmene, použití vhodného smáčedla a jeho koncentrace a aplikace a také byl hledán vhodný postup pro výpočet obsahu vody v perlitu.

Stres suchem byl aplikován na základě čtyřech pokusů, při kterých bylo stanoveno množství závlivky tak, aby zalévané rostliny nebyly ve stresu suchem ani z přílišného zalití a současně aby rostliny vystavené suchu byly dostatečně, nikoli však letálně, stresované.

Neinvazivní metody měření pro zachování intaktnosti rostlin umožnily stanovení relativního obsahu chlorofylu, měření celých spekter odrazivosti pro výpočet indexů odrazivosti NDVI a PRI, měření velmi rychlé fluorescenční indukce a výpočet parametrů  $F_v/F_m$ ,  $(dV/dt)_0$ ,  $V_J$  a  $ABS/RC$  a v neposlední řadě také vyhodnocení parametrů pomalé fluorescenční indukce  $\Phi_{PSII}$ ,  $\Phi_{NPQ}$ ,  $\Phi_{E,D}$  a  $q_P$ . Pro potvrzení obsahu chlorofylu byla použita invazivní metoda extrakce pigmentů z oddělených listů se spektrofotometrickým stanovením. Poslední část práce je tvořena vyhodnocením analýzy endogenního obsahu cytokininů v odebraných listech.

Z vyhodnocených dat vyplývá, že aplikované cytokininové deriváty významně snížily degradaci fotosyntetických pigmentů a oddálily poškození funkčnosti PSII v intaktních listech ječmene během zasychání rostlin. Postřik vybranými cytokininovými deriváty měl také výrazný vliv na následný metabolismus cytokininů v listech, nejvýznamnější nárůst v endogenní koncentraci byl zaznamenán u cZ, iP a mT typů. Ječmen využívá aplikované cytokinininy přeměnou na metatopoliny k syntéze potřebných cytokininových typů, které disponují protektivními účinky na fotosyntetický aparát a růst rostlin.

Nově nasyntetizované cytokininové deriváty se tak zdají být slibnými látkami podílejícími se na zachování rostlinné fitness ve stresových podmínkách. Zejména cytokininové mesyláty rozpustné ve vodě (absence toxického DMSO) by mohly být následně využity v zemědělské praxi. I přes pozitivní výsledky, je nutná optimalizace použití látek v polních podmínkách jako komerčních agrochemikálií.



## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abdelhakim, L. O. A., E. Rosenqvist, B. Wollenweber, I. Spyroglou, C. O. Ottosen & K. Panzarova (2021) Investigating combined drought- and heat stress effects in wheat under controlled conditions by dynamic image-based phenotyping. *Agronomy-Basel*, 11.

Agovino, M., M. Casaccia, M. Ciommi, M. Ferrara & K. Marchesano (2019) Agriculture, climate change and sustainability: The case of EU-28. *Ecological Indicators*, 105, 525-543.

Ali, M. S. & K. H. Baek (2020) Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.

Anjum, F., M. Yaseen, E. Rasul, A. Wahid & S. Anjum (2003) Water stress in barley (*Hordeum vulgare L.*). II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 40, 45-49.

Anwar, A., Y. M. Liu, R. R. Dong, L. Q. Bai, X. C. Yu & Y. S. Li (2018) The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: A review. *Biological Research*, 51.

Aremu, A. O., L. Plačková, M. W. Bairu, O. Novák, L. Szüčová, K. Doležal, J. F. Finnie & J. Van Staden (2014) Endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured and acclimatized 'Williams' bananas subjected to different aromatic cytokinin treatments. *Plant Science*, 214, 88-98.

Baker, N. R. & E. Rosenqvist (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1607-1621.

Bertell, G. & L. Eliasson (1992) Cytokinin effects on root-growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic-acid. *Physiologia Plantarum*, 84, 255-261.

Bieleski, R. L. (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical biochemistry*, 9, 431-442.

Bota, J., H. Medrano & J. Flexas (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist*, 162, 671-681.

Brugiere, N., S. P. Jiao, S. Hantke, C. Zinselmeier, J. A. Roessler, X. M. Niu, R. J. Jones & J. E. Habben (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology*, 132, 1228-1240.

Cackett, L., L. H. Luginbuehl, T. B. Schreier, E. Lopez-Juez & J. M. Hibberd (2022) Chloroplast development in green plant tissues: The interplay between light, hormone, and transcriptional regulation. *New Phytologist*, 233, 2000-2016.

Chaves, M. M., J. Flexas & C. Pinheiro (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551-560.

Chernyad'ev, II (2009) The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45, 351-362.

Chernyad'ev, II & O. F. Monakhova (1998) The activity and content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in wheat plants as affected by water stress and kartridin-4. *Photosynthetica*, 35, 603-610.

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

Das, K. & A. Roychoudhury (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2.

Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1020, 1-24.

Demmig-Adams, B. & W. W. Adams (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: Uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*, 198, 460-470.

Dobrev, P. I. & M. Kamínek (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 950, 21-29.

Doležal, K., I. Popa, V. Kryštof, L. Spíchal, M. Fojtíková, J. Holub, R. Lenobel, T. Schmülling & M. Strnad (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 875-884.

Dwivedi, S. K., S. Kumar, S. Mondal, N. Malviya & R. Dubey (2014) Physiological basis of cytokinin induced drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal of AgriSearch*, 1.

Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita & S. M. A. Basra (2009) Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture*, 153-188.

Feroun, M., N. Srhiouar, S. Bouhraoua, N. El Ghachtouli & S. Louahlia (2023) Physiological and biochemical changes in Moroccan barley (*Hordeum vulgare L.*) cultivars submitted to drought stress. *Heliyon*, 9.

Fu, J. M. & B. R. Huang (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 45, 105-114.

Gajdošová, S., L. Spíchal, M. Kamínek, K. Hoyerová, O. Novák, P. I. Dobrev, P. Galuszka, P. Klima, A. Gaudinová, E. Žižková, J. Hanuš, M. Dančák, B. Trávníček, B. Pešek, M. Krupička, R. Vaňková, M. Strnad & V. Motyka (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2827-2840.

Gamon, J. A. & B. Bond (2013) Effects of irradiance and photosynthetic downregulation on the photochemical reflectance index in Douglas-fir and ponderosa pine. *Remote Sensing of Environment*, 135, 141-149.

Gamon, J. A., O. Kovalchuck, C. Y. S. Wong, A. Harris & S. R. Garrity (2015) Monitoring seasonal and diurnal changes in photosynthetic pigments with automated PRI and NDVI sensors. *Biogeosciences*, 12, 4149-4159.

Ghaffar, A., N. Hussain, R. Ajaj, S. M. Shahin, H. Bano, M. Javed, A. Khalid, M. Yasmin, K. H. Shah, M. Zaheer, M. Iqbal, Z. U. Zafar & H. U. R. Athar (2023) Photosynthetic activity and metabolic profiling of bread wheat cultivars contrasting in drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 14.

Ghotbi-Ravandi, A. A., M. Shahbazi, M. Shariati & P. Mulo (2014) Effects of mild and severe drought stress on photosynthetic efficiency in tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare L.*) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200, 403-415.

Gupta, S., V. P. Agarwal & N. Gupta (2012) Efficacy of putrescine and benzyladenine on photosynthesis and productivity in relation to drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18, 331-336.

Haisel, D., J. Pospíšilová, H. Synková, R. Schnablová & P. Bařková (2006) Effects of abscisic acid or benzyladenine on pigment contents, chlorophyll fluorescence, and chloroplast ultrastructure during water stress and after rehydration. *Photosynthetica*, 44, 606-614.

Hasanuzzaman, M., L. Shabala, T. J. Brodribb, M. X. Zhou & S. Shabala (2022) Understanding the role of physiological and agronomical traits during drought recovery as a determinant of differential drought stress tolerance in barley. *Agronomy-Basel*, 12.

Hassan, I. A. (2006) Effects of water stress and high temperature on gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Triticum aestivum* L. *Photosynthetica*, 44, 312-315.

Havaux, M. & F. Tardy (1999) Loss of chlorophyll with limited reduction of photosynthesis as an adaptive response of Syrian barley landraces to high-light and heat stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 569-578.

Hoyerová, K., A. Gaudinová, J. Malbeck, P. I. Dobrev, T. Kocábek, B. Šolcová, A. Trávníčková & M. Kamínek (2006) Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins. *Phytochemistry*, 67, 1151-1159.

Hudeček, M., V. Nožková, L. Plíhalová & O. Plíhal (2023) Plant hormone cytokinin at the crossroads of stress priming and control of photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 13.

Husain, T., A. Fatima, M. Suhel, S. Singh, A. Sharma, S. M. Prasad & V. P. Singh (2020) A brief appraisal of ethylene signaling under abiotic stress in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 15.

Jan, S., R. Singh, R. Bhardwaj, P. Ahmad & D. Kapoor (2020) Plant growth regulators: a sustainable approach to combat pesticide toxicity. *3 Biotech*, 10.

Kalaji, H. M., A. Jajoo, A. Oukarroum, M. Brestič, M. Živčák, I. A. Samborska, M. D. Cetner, I. Lukasik, V. Goltsev & R. J. Ladle (2016) Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38.

Khalvandi, M., A. Siosemardeh, E. Roohi & S. Keramati (2021) Salicylic acid alleviated the effect of drought stress on photosynthetic characteristics and leaf protein pattern in winter wheat. *Heliyon*, 7.

Kieber, J. J. & G. E. Schaller (2014) Cytokinins. *Arabidopsis Book*, 12, e0168.

Klos, D., M. Dušek, E. Samolová, M. Zatloukal, V. Nožková, N. Nesnas, L. Plačková, R. Koprna, Z. Špíšek, H. Vylíčilová, O. Plíhal, K. Doležal, J. Voller, A. Kadlecova, M. Strnad & L. Plíhalová (2022) New water-soluble cytokinin derivatives and their beneficial impact on barley yield and photosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70, 7288-7301.

Koprna, R., N. De Diego, L. Dundálková & L. Spíchal (2016) Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24, 484-492.

Kouřil, R., P. Ilík, J. Nauš & B. Schoefs (1999) On the limits of applicability of spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of chlorophyll a/b ratio. *Photosynthesis Research*, 62, 107-116.

- Lawlor, D. W. (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89 Spec No, 871-85.
- Lazár, D. (2015) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology*, 175, 131-147.
- Lazár, D., P. Sušila & J. Nauš (2006) Early detection of plant stress from changes in distributions of chlorophyll a fluorescence parameters measured with fluorescence imaging. *Journal of Fluorescence*, 16, 173-176.
- Li, R.-h., P.-G. Guo, B. Michael, G. Stefania & C. Salvatore (2006) Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China*, 5, 751-757.
- Li, W. Q., L. Herrera-Estrella & L. S. P. Tran (2016) The Yin-Yang of cytokinin homeostasis and drought acclimation/adaptation. *Trends in Plant Science*, 21, 548-550.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids – Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lichtenthaler, H. K., C. Buschmann & M. Knapp (2005) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R-Fd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43, 379-393.
- Lichtenthaler, H. K., A. Gitelson & M. Lang (1996) Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology*, 148, 483-493.
- Ling, Q. H., W. H. Huang & P. Jarvis (2011) Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, 107, 209-214.
- Macková, H., M. Hronková, J. Dobrá, V. Turečková, O. Novák, Z. Lubovská, V. Motyka, D. Haisel, T. Hájek, I. T. Prášil, A. Gaudinová, H. Štorchová, E. Ge, T. Werner, T. Schmülling & R. Vaňková (2013) Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2805-2815.
- Mafakheri, A., A. Siosemardeh, B. Bahramnejad, P. C. Struik & E. Sohrabi (2010) Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 580-585.

Mänd, P., L. Hallik, J. Penuelas, T. Nilson, P. Duce, B. A. Emmett, C. Beier, M. Estiarte, J. Garadnai, T. Kalapos, I. K. Schmidt, E. Kovacs-Lang, P. Prieto, A. Tietema, J. W. Westerveld & O. Kull (2010) Responses of the reflectance indices PRI and NDVI to experimental warming and drought in European shrublands along a north-south climatic gradient. *Remote Sensing of Environment*, 114, 626-636.

Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb & M. Gomis (2021) Climate change 2021: The physical science basis. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *IPCC*, Geneva, Switzerland, 2.

Maxwell, K. & G. N. Johnson (2000) Chlorophyll fluorescence – A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668.

Mehmood, M., M. Perez-Llorca, A. Casadesus, S. Farrakh & S. Munne-Bosch (2021) Leaf size modulation by cytokinins in sesame plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 763-770.

Mihaljević, I., M. Viljevac Vuletić, V. Tomaš, D. Horvat, Z. Zdunić & D. Vuković (2021) PSII photochemistry responses to drought stress in autochthonous and modern sweet cherry cultivars. *Photosynthetica*, 59, 517-528.

Mirosavljević, M., V. Momčilović, P. Čanak, V. Acin, B. Jocković & B. Vujošević (2018) Variation in NDVI values and relationship with grain yield in two-rowed winter barley. *Ratarstvo i povrtarstvo/Field and Vegetable Crops Research*, 55, 118-124.

Mrízová, K., E. Jiskrová, S. Vyroubalová, O. Novák, L. Ohnoutková, H. Pospíšilová, I. Frébort, W. A. Harwood & P. Galuszka (2013) Overexpression of cytokinin dehydrogenase genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise) fundamentally affects morphology and fertility. *Plos One*, 8.

Müller, M. & S. Munne-Bosch (2021) Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants. *Plant Physiology*, 185, 1500-1522.

Nikolaeva, M. K., S. N. Maevskaya, A. G. Shugaev & N. G. Bukhov (2010) Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 87-95.

Nonami, H. (1998) Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. *Journal of Plant Research*, 111, 373-382.

Novák, O., E. Hauserová, P. Amakorová, K. Doležal & M. Strnad (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 69, 2214-2224.

- Novák, O., P. Tarkowski, D. Tarkowská, K. Doležal, R. Lenobel & M. Strnad (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 480, 207-218.
- Nyachiro, J. M., K. G. Briggs, J. Hoddinott & A. M. Johnson-Flanagan (2001) Chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and water deficit in spring wheat. *Cereal Research Communications*, 29, 135-142.
- Oguz, M. C., M. Aycan, E. Oguz, I. Poyraz & M. Yildiz (2022) Drought stress tolerance in plants: Interplay of molecular, biochemical and physiological responses in important development stages. *Physiologia*, 2, 180-197.
- Osakabe, Y., K. Osakabe, K. Shinozaki & L.-S. Tran (2014) Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Osugi, A. & H. Sakakibara (2015) Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *Bmc Biology*, 13.
- Oukarroum, A., S. El Madidi, G. Schansker & R. J. Strasser (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare L.*) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 438-446.
- Oukarroum, A., S. El Madidi & R. J. Strasser (2006) Drought stress induced in barley cultivars (*Hordeum vulgare L.*) by polyethylene glycol, probed by germination, root length and chlorophyll a fluorescence rise (OJIP). *Archives Des Sciences*, 59, 65-74.
- Pachauri, R. K., M. R. Allen, V. R. Barros, J. Broome, W. Cramer, R. Christ, J. A. Church, L. Clarke, Q. Dahe & P. Dasgupta (2014) Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *IPCC*, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Pandey, V. & A. Shukla (2015) Acclimation and tolerance strategies of rice under drought stress. *Rice Science*, 22, 147-161.
- Peñuelas, J., I. Filella & J. A. Gamon (1995) Assessment of photosynthetic radiation-use efficiency with spectral reflectance. *New Phytologist*, 131, 291-296.
- Plíhalová, L., H. Vylíčilová, K. Doležal, L. Zahajská, M. Zatloukal & M. Strnad (2016) Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology*, 33, 614-624.
- Porra, R. J., W. A. Thompson & P. E. Kriedemann (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents – Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 975, 384-394.

Přerostová, S., P. I. Dobrev, A. Gaudinová, V. Knirsch, N. Korber, R. Pieruschka, F. Fiorani, B. Brzobohatý, M. Černý, L. Spíchal, J. Humplík, T. Vaněk, U. Schurr & R. Vaňková (2018) Cytokinins: Their impact on molecular and growth responses to drought stress and recovery in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9.

Ray, D. K., P. C. West, M. Clark, J. S. Gerber, A. V. Prishchepov & S. Chatterjee (2019) Climate change has likely already affected global food production. *Plos One*, 14.

Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449.

Seleiman, M. F., N. Al-Suhaibani, N. Ali, M. Akmal, M. Alotaibi, Y. Refay, T. Dindaroglu, H. H. Abdul-Wajid & M. L. Battaglia (2021) Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants-Basel*, 10.

Sergieiev, I. G., V. S. Alexieva, S. V. Ivanov, Moskova, II & E. N. Karanov (2006) The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 139-146.

Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey & M. Pessarakli (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Sims, D. A. & J. A. Gamon (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81, 337-354.

Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125, 27-58.

Sommer, S. G., E. Han, X. Li, E. Rosenqvist & F. Liu (2023) The chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm correlates with loss of grain yield after Severe drought in three wheat genotypes grown at two CO<sub>2</sub> concentrations. *Plants*, 12, 436.

Spíchal, L. (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39, 267-284.

Stamford, J. D., S. Violet-Chabrand, I. Cameron & T. Lawson (2023) Development of an accurate low cost NDVI imaging system for assessing plant health. *Plant Methods*, 19.

Stirbet, A., D. Lazar, J. Kromdijk & Govindjee (2018) Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica*, 56, 86-104.



Strasser R.J., Tsimilli-Michael M. & A. Srivastava (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, 445-483.

Svačinová, J., O. Novák, L. Plačková, R. Lenobel, J. Holík, M. Strnad & K. Doležal (2012) A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: Pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods*, 8.

Tarkowská, D., K. Doležal, P. Tarkowski, C. Astot, J. Holub, K. Fuksová, T. Schmülling, G. Sandberg & M. Strnad (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus × canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*, 117, 579-590.

Ullah, A., H. Manghwar, M. Shaban, A. H. Khan, A. Akbar, U. Ali, E. Ali & S. Fahad (2018) Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 33103-33118.

Verma, S., N. P. Negi, S. Pareek, G. Mudgal & D. Kumar (2022) Auxin response factors in plant adaptation to drought and salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 174.

Vylíčilová, H., A. Husičková, L. Spíchal, J. Srovnal, K. Doležal, O. Plíhal & L. Plíhalova (2016) C2-substituted aromatic cytokinin sugar conjugates delay the onset of senescence by maintaining the activity of the photosynthetic apparatus. *Phytochemistry*, 122, 22-33.

Wang, J. R., X. Y. Zhang, Z. D. Han, H. X. Feng, Y. Y. Wang, J. Kang, X. J. Han, L. F. Wang, C. Y. Wang, H. Li & G. Ma (2022) Analysis of physiological indicators associated with drought tolerance in wheat under drought and re-watering conditions. *Antioxidants*, 11.

Werbrouck, S. P. O., M. Strnad, H. A. VanOnckelen & P. C. Debergh (1996) Metatoplin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum*, 98, 291-297.

Wilhite, D. A. & M. H. Glantz (1985) Understanding: the drought phenomenon: The role of definitions. *Water international*, 10, 111-120.

Yadav, S., P. Modi, A. Dave, A. Vijapura, D. Patel & M. Patel (2020) Effect of abiotic stress on crops. *Sustainable crop production*, 3.

Yang, D. Q., Y. L. Luo, W. H. Dong, Y. P. Yin, Y. Li & Z. L. Wang (2018) Response of photosystem II performance and antioxidant enzyme activities in stay-green wheat to cytokinin. *Photosynthetica*, 56, 567-577.

Yang, Y., R. Nan, T. Mi, Y. Song, F. Shi, X. Liu, Y. Wang, F. Sun, Y. Xi & C. Zhang (2023) Rapid and nondestructive evaluation of wheat chlorophyll under drought stress using hyperspectral imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 5825.

Zhang, X. H., X. Z. Yu & D. M. Yue (2016) Phytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) to rice seedlings. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13, 607-614.

Žalud, Z., M. Trnka & P. Hlavinka (2019) *Zemědělské sucho v České republice – Vývoj, dopady a adaptace*. Agrární komora České republiky.

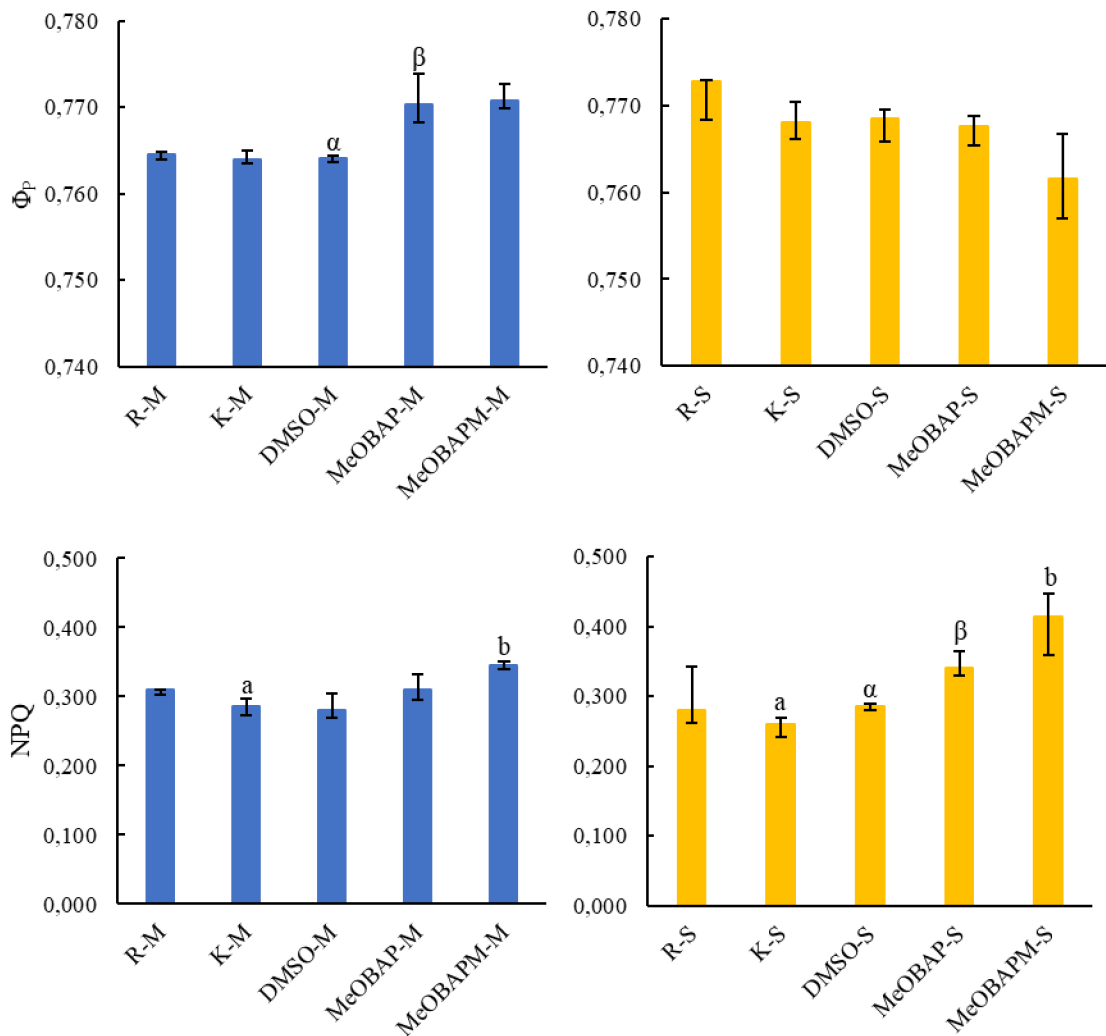
Živčák, M., M. Brestič, K. Olšovská & P. Slamka (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil and Environment*, 54, 133-139.

## 8 PŘÍLOHY

Další vyhodnocené parametry zhášení fluorescence ( $\Phi_p$ , NPQ) a číselné hodnoty detekovaných hladin cytokininů z experimentu 3.

Obr. 1: Parametry spočítané v ustáleném stavu pomalé fluorescenční indukce ve stavu adaptovaném na světlo ( $\Phi_p$ , NPQ).

Tab. 1: Číselné hodnoty detekovaných hladin cytokininů.



Obr. 1: Parametry spočítané v ustáleném stavu pomalé fluorescenční indukce ve stavu adaptovaném na světlo v experimentu 3. Maximální kvantový výtěžek ve stavu přizpůsobeném světlu za přítomnosti aktinického světla ( $\Phi_p$ ) a nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ) intaktních listů jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zalévaných rostlin (M) a rostlin vystavených stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postříkem, R představuje rostliny bez zásahu. V grafu jsou vyneseny mediány naměřených hodnot a kvartily (n=6). Statisticky signifikantní rozdíly mezi dvojicemi K-MeOBAPM a DMSO-MeOBAP vyznačeny různými písmeny. Pro normální data s rovností rozptylu testováno párovým t-testem, pro nerovné rozptyly testováno Mann-Whitney Rank Sum testem ( $P < 0,05$ ).

Tab. 1: Číselné hodnoty detekovaných hladin cytokininů v listech jarního ječmene (*Hordeum vulgare*, *L. conv. distichon*) zalévaných rostlin (M) a rostlin vystavených stresu suchem (S) po 14 dnech růstu, kdy byly 7. den aplikovány látky (voda+smáčedlo = K, DMSO, MeOBAP, MeOBAPM) foliárním postřikem, R představuje rostliny bez zásahu. tZ (*trans*-zeatin), tZOG (tZ O-glukosid), tZ9G (tZ 9-glukosid), cZ (*cis*-zeatin), cZR (cZ ribosid), cZROG (cZ ribosid O-glukosid), cZ9G (cZ 9-glukosid), cZOG (cZ O-glukosid), iP (N<sup>6</sup>-isopentenyladenin), iPR (iP ribosid), iP9G (iP 9-glukosid), iPR5'MP (iPR 5'-monofosfát), mT (*meta*-topolin), mTR (mT ribosid), mT7G (mT 7-glukosid), mT9G (mT 9-glukosid). V tabulce jsou vyneseny průměry spočítané z naměřených hodnot pro biologické replikáty ± SD (n=4-5). < LOD = pod limitem detekce.

	typy cytokininů [pmol/g FW]							
	tZ	tZOG	tZ9G	cZ	cZOG	cZR	cZROG	cZ9G
<b>R-M</b>	0,13 ± 0,02	0,37 ± 0,05	3,36 ± 0,20	0,55 ± 0,25	108,60 ± 24,07	0,49 ± 0,13	3,20 ± 0,66	0,19 ± 0,03
<b>K-M</b>	0,16 ± 0,02	0,41 ± 0,13	3,93 ± 1,01	0,71 ± 0,23	124,62 ± 17,18	0,89 ± 0,36	2,24 ± 0,57	0,29 ± 0,07
<b>DMSO-M</b>	0,12 ± 0,03	0,38 ± 0,04	3,59 ± 0,88	0,65 ± 0,24	115,38 ± 17,70	0,66 ± 0,14	2,69 ± 0,41	0,23 ± 0,02
<b>MeOBAP-M</b>	< LOD	0,27 ± 0,06	1,42 ± 0,56	0,53 ± 0,21	82,41 ± 4,48	0,57 ± 0,10	2,09 ± 0,19	0,32 ± 0,07
<b>MeOBAPM-M</b>	< LOD	0,28 ± 0,02	1,46 ± 0,33	0,51 ± 0,13	73,65 ± 9,27	0,78 ± 0,34	1,81 ± 0,21	0,32 ± 0,10
<b>R-S</b>	0,15 ± 0,11	0,41 ± 0,11	0,71 ± 0,08	1,71 ± 0,13	273,58 ± 85,02	1,91 ± 0,70	7,25 ± 0,89	0,09 ± 0,04
<b>K-S</b>	0,05 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,97 ± 0,19	1,02 ± 0,41	213,09 ± 46,43	0,99 ± 0,27	5,68 ± 0,97	0,09 ± 0,03
<b>DMSO-S</b>	< LOD	0,39 ± 0,06	1,04 ± 0,20	1,44 ± 0,95	171,13 ± 40,42	1,71 ± 0,53	4,96 ± 0,49	0,14 ± 0,06
<b>MeOBAP-S</b>	< LOD	0,36 ± 0,04	1,10 ± 0,27	1,18 ± 0,58	182,73 ± 25,14	2,70 ± 1,76	4,08 ± 0,49	0,33 ± 0,10
<b>MeOBAPM-S</b>	< LOD	0,50 ± 0,13	0,88 ± 0,22	3,28 ± 1,59	233,50 ± 37,75	2,70 ± 0,47	4,37 ± 0,81	0,42 ± 0,08
	typy cytokininů [pmol/g FW]							
	iP	iPR	iP9G	iPR5'MP	mT	mTR	mT7G	mt9G
<b>R-M</b>	1,42 ± 0,89	0,87 ± 0,32	1,07 ± 0,35	1,35 ± 0,59	1,05 ± 0,32	< LOD	< LOD	0,63 ± 0,08
<b>K-M</b>	1,31 ± 0,53	1,36 ± 0,37	1,90 ± 0,63	< LOD	2,51 ± 0,71	< LOD	< LOD	0,62 ± 0,20
<b>DMSO-M</b>	1,17 ± 0,29	1,29 ± 0,48	1,23 ± 0,72	< LOD	1,49 ± 1,05	< LOD	< LOD	4,68 ± 0,55
<b>MeOBAP-M</b>	2,17 ± 0,46	1,49 ± 0,38	0,93 ± 0,14	< LOD	40,30 ± 8,84	2,82 ± 0,57	0,18 ± 0,03	1539,68 ± 222,46
<b>MeOBAPM-M</b>	1,22 ± 0,78	1,23 ± 0,33	0,53 ± 0,36	< LOD	672,52 ± 89,54	15,20 ± 2,33	2,03 ± 0,51	3944,97 ± 307,32
<b>R-S</b>	4,91 ± 2,39	5,67 ± 1,51	1,72 ± 1,01	3,66 ± 0,95	1,99 ± 2,02	< LOD	< LOD	< LOD
<b>K-S</b>	3,16 ± 1,58	2,95 ± 0,50	1,91 ± 1,27	2,09 ± 0,73	1,12 ± 0,52	< LOD	< LOD	< LOD
<b>DMSO-S</b>	2,92 ± 1,78	3,43 ± 0,63	1,67 ± 0,80	1,53 ± 0,57	2,17 ± 0,69	< LOD	< LOD	2,67 ± 0,89
<b>MeOBAP-S</b>	3,44 ± 0,63	4,78 ± 1,50	1,21 ± 0,40	< LOD	31,66 ± 13,26	3,69 ± 1,56	< LOD	846,65 ± 150,93
<b>MeOBAPM-S</b>	2,34 ± 1,23	8,11 ± 1,46	0,94 ± 0,31	1,67 ± 0,43	1043,53 ± 153,86	49,05 ± 3,05	1,07 ± 0,20	4302,33 ± 159,25