

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv nově připraveného cytokininového derivátu na indukovanou senescenci *Arabidopsis thaliana* s mutacemi v ROS signalingu**

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Karolína Sanitráková</b>
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.</b>
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne ..... Podpis .....

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí, Mgr. Zuzaně Kučerové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při realizaci mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marku Rácovi, Ph.D. za odbornou pomoc v rámci tématu reaktivních forem kyslíku. Samozřejmě nemůžu opomenout nesmírnou podporu ze strany mé rodiny v průběhu celého mého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolína Sanitráková
Název práce	Vliv nově připraveného cytokininového derivátu na indukovanou senescenci <i>Arabidopsis thaliana</i> s mutacemi v ROS signalingu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Klíčová slova	Senescence, cytokininy, reaktivní formy kyslíku, <i>Arabidopsis</i> , chlorofyl, fluorescence, FV/FM
Počet stran	45
Počet příloh	0
Jazyk	Český



## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Karolína Sanitráková
Title	Effect of newly prepared cytokinin derivative on induced senescence of <i>Arabidopsis thaliana</i> knockouts in ROS signaling
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Keywords	Senescence, cytokinins, ROS, <i>Arabidopsis</i> , chlorophyll, fluorescence, $F_v/F_m$
Number of pages	45
Number of appendices	0
Language	Czech

## Abstrakt

Senescence je konečná vývojová fáze rostliny. Jedná se o vysoce regulovaný proces postupné degradace a recyklace živin, během kterého zůstávají buňky živé. Pro senescenci je charakteristický pokles obsahu chlorofylu *a+b* a pokles fotosyntetické aktivity. Pomocí exogenní aplikace cytokininů a cytokininových derivátů lze senescenci oddálit. Z experimentů předcházejících této bakalářské práci vyplývá, že po aplikaci nově připraveného cytokininového derivátu 3MeOBAPA (6-(3-methoxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurin)) dochází k akumulaci ROS, která má signalizační funkci. Z toho důvodu bylo cílem této práce zjistit, jak 3MeOBAPA ovlivňuje senescenci u rostlin deficientních v genech *LOX*, *RBOHF*, *PRX33PRX34*, zapojených do produkce ROS. Oddělené listy *Arabidopsis thaliana* genotypů WT, *LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34* byly inkubovány ve tmě po dobu 6 dní v roztocích BAP a 3MeOBAPA o koncentraci  $10^{-5}$  mol/l. Následně bylo provedeno měření obsahu chlorofylů *a+b* a stanovení maximálního kvantového výtěžku fotosystému II ( $F_v/F_m$ ). Vlivem indukované senescence došlo u listů všech genotypů k výraznému poklesu obsahu chl *a+b* i parametru  $F_v/F_m$ , přičemž nejvyšší pokles byl zjištěn u WT listů. V listech WT, *LOX* a *RBOHF* způsobila aplikace BAP i 3MeOBAPA zachování obsahu chl *a+b* i  $F_v/F_m$ . V případě listů *PRX33PRX34* vykazoval BAP negativní efekt a 3MeOBAPA pouze minimální efekt na funkčnost PSII. Odlišný antisenescenční účinek 3MeOBAPA, v porovnání s WT, který byl zaznamenán u listů *RBOHF*, může naznačovat zapojení *RBOHF* v mechanismu účinku 3MeOBAPA. Pro jednoznačné zhodnocení zapojení *LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34* v mechanismu účinku 3MeOBAPA by bylo potřeba provést další experimenty.

## Summary

Senescence is the final evolutionary stage of plants. It is a highly regulated process of gradual degradation and recycling of nutrients, during which cells remain alive. Both chlorophyll *a+b* content's decrease and decline of photosynthetic activity are characteristic for senescence. It is possible to postpone senescence by applying cytokinins and cytokinin derivatives. Based on the experiments taking place before writing of this bachelor thesis we can say, that application of a newly prepared cytokinin derivative 3MeOBAPA (6-(3-methoxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-arabinofuranosylpurin)) is followed by accumulation of ROS, which has a signaling function. For that reason was this thesis' objective to find out how 3MeOBAPA affects senescence in plants deficient in genes *LOX*, *RBOHF*, *PRX33PRX34*, involved in ROS production. Separated leaves of *Arabidopsis thaliana* of genotypes WT, *LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34* were incubated in darkness for 6 days in solutions of BAP a 3MeOBAPA with concentration of  $10^{-5}$  mol/l. Then followed a measurement of content of chl *a+b* and determination of maximal quantum yield of photosystem II ( $F_V/F_M$ ). Due to the induced senescence, there was a significant decrease in the content of chl *a+b* and the  $F_V/F_M$  parameter in leaves of all genotypes, while the highest decrease was found in WT leaves. In WT, *LOX* and *RBOHF* leaves, the application of BAP and 3MeOBAPA caused the preservation of the content of chl *a+b* and  $F_V/F_M$ . In the case of *PRX33PRX34* leaves, BAP showed a negative effect and 3MeOBAPA had only a minimal effect on PSII functionality. The different antisenesescence effect of 3MeOBAPA, compared to the WT observed in *RBOHF* leaves, may indicate the involvement of *RBOHF* in the mechanism of effect of 3MeOBAPA. Further experiments would be needed to clearly evaluate the involvement of *LOX*, *RBOHF* and *PRX33PRX34* in the mechanism of action of 3MeOBAPA.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky .....</b>	<b>12</b>
2.1	Senescence.....	12
2.1.1	Listová senescence.....	12
2.1.2	Senescence a fotosyntéza.....	13
2.2	Reaktivní formy kyslíku .....	14
2.3	Oxidativní stres u rostlin .....	15
2.3.1	Ochrana proti oxidativnímu poškození.....	16
2.3.2	Působení ROS na senescenci .....	16
2.4	Rostlinné hormony.....	17
2.5	Cytokininy .....	18
2.5.1	Účinek cytokininů na senescenci .....	18
2.5.2	Účinek cytokininových derivátů na senescenci .....	19
<b>3</b>	<b>Materiál a metody.....</b>	<b>23</b>
3.1	Rostlinný materiál .....	23
3.2	Použité metody .....	24
3.2.1	Měření parametrů chlorofylové fluorescence.....	24
3.2.2	Analytické stanovení pigmentů .....	24
3.2.3	Zpracování dat .....	24
<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>26</b>
4.1	Obsah chlorofylu <i>a+b</i> .....	27
4.1.1	Obsah chlorofylu u listů se standardním genotypem (WT).....	27
4.1.2	Obsah chlorofylu u listů <i>LOX</i> .....	28
4.1.3	Obsah chlorofylů u listů <i>RBOHF</i> .....	29
4.1.4	Obsah chlorofylů u listů <i>PRX33PRX34</i> .....	30
4.2	Parametr $F_v/F_m$ .....	31
4.2.1	Standardní genotyp (WT).....	32
4.2.2	<i>LOX</i> .....	33
4.2.3	<i>RBOHF</i> .....	34
4.2.4	<i>PRX33PRX34</i> .....	35
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>40</b>

<b>8 Seznam používaných zkratk</b> .....	<b>45</b>
--	-----------

## Cíle práce

1. Vypracovat přehled problematiky o vlivu cytokininů a cytokininových derivátů na indukovanou senescenci rostlin a roli reaktivních forem kyslíku během senescence.
2. Zvládnout metodiku pěstování a navození indukované senescence u listů *Arabidopsis thaliana*.
3. Zvládnout metodiku stanovení obsahu chlorofylů.
4. Zvládnout metodiku měření chlorofylové fluorescence v ploše listu pomocí přístroje FluorCam včetně zpracování imagingu parametru  $F_V/F_M$ .
5. Provést stanovení obsahu chlorofylu a měření parametru  $F_V/F_M$  u oddělených listů během indukované senescence pod vlivem cytokininu a nově připraveného cytokininového derivátu.
6. Zpracovat výsledky experimentů a zhodnotit vliv aplikovaných látek na indukovanou senescenci u rostlin *Arabidopsis thaliana* s mutacemi v ROS signalingu.

## 1 Úvod

Během senescence dochází v rostlinách ke změnám v buněčné struktuře, metabolismu a genové expresi. Jako první dochází k rozpadu chloroplastů. Asimilace uhlíku při fotosyntéze je nahrazena katabolismem fotosyntetických pigmentů, proteinů, membránových lipidů, nukleových kyselin. Některé z těchto molekul mohou být recyklovány a použity na stavbu nových struktur v rostlině. Přirozená senescence je nejčastěji spojována se stářím rostliny, ale senescenci lze rovněž indukovat. Tento druh senescence je vyvolán různými formami stresu, např. změnou environmentálních podmínek (např. tma, nízká či vysoká teplota, množství živin, sucho či tma) nebo mechanickým poškozením. Při senescenci lze pozorovat postupné žloutnutí listů, které je způsobené přednostní degradací chlorofylu před degradací karotenoidů a xantofylů. Průběh senescence výrazně ovlivňují také rostlinné hormony. Mezi fytohormony, které urychlují senescenci, patří kyselina abscisová a etylen. Naopak cytokininy senescenci oddalují.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) mají duální charakter, vznikají jako signální molekuly při stresech, ale způsobují také oxidativní poškození. ROS vznikají při fotosyntéze v chloroplastech nebo při dýchání v mitochondriích a v peroxizomech. ROS v organismu vznikají jako toxické vedlejší produkty aerobního metabolismu, které jsou odstraňovány pomocí antioxidantů. Kromě toho mohou ROS fungovat jako signální molekuly kontrolující důležité procesy rostlin jako je růst, vývoj, reakce na biotické a abiotické stresory a programovanou buněčnou smrt. Reaktivní formy kyslíku jsou toxické až ve vyšších koncentracích, kdy způsobují oxidační poškození buňky (např. peroxidace lipidů).

V této bakalářské práci byl porovnáván účinek 6-benzylaminopurinu (BAP) a nově připraveného cytokininového derivátu s označením 3MeOBAPA na senescenci oddělených listů rostlin *Arabidopsis thaliana* s mutacemi v ROS signalingu. Byly použity rostliny se standardním genotypem (WT) a rostliny s knock-outovanými geny zapojenými do tvorby ROS (*LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34*). Míra indukované senescence byla stanovována pomocí obsahu chlorofylu  $a+b$  a fluorescence chlorofylu, kdy byl sledován parametr  $F_v/F_m$ , který popisuje účinnost fotosyntetického aparátu II (PSII).

## **2 Současný stav řešené problematiky**

### **2.1 Senescence**

Senescence představuje konečnou vývojovou fázi rostliny (Noodén 1988). Během senescence dochází k rozsáhlým změnám v buněčném metabolismu a k postupné degeneraci rostlinných struktur (Nam 1997). Senescenci ovlivňují nejen endogenní faktory (stárnutí a hormony), ale také různé faktory prostředí (Gan a Amasino 1997; Quirino et al. 2000). V přirozeném prostředí jsou rostliny vystaveny mnoha stresům, patří mezi ně např. dusíková deprivace, nedostatek světla, sucho, chlad, vysoká teplota, zasolení nebo poranění (Becker a Apel 1993).

#### **2.1.1 Listová senescence**

V této práci byl kladen důraz na listovou senescenci. Převážná část fotosyntézy se odehrává v listech rostliny. List na začátku svého vývoje potřebuje přísun živin z rostliny. Po začátku fotosyntetické aktivity listu dochází k tvorbě živin listem. Po produktivní fotosyntetické fázi dochází k senescenci daného listu (Lim et al. 2003). Listová senescence je zásadní pro přežití rostlin a pro adaptaci na nepříznivé vlivy prostředí. Používá se jako modelový systém pro studium regulačních mechanismů u biologických dějů, které jsou regulovány jak věkem, tak i faktory prostředí (Yoshida et al. 2001). Během senescence dochází k vnitrobuněčným změnám, mezi první změny patří degradace chloroplastů (Platt-Aloia a Thomson 1987; Makino a Osmond 1991). Chloroplasty, které obsahují více než 50 % celkového množství listových bílkovin a lipidů (Peoples a Dalling 1988), jsou primárním místem senescence (Platt-Aloia a Thomson 1987). Během listové senescence dochází k postupnému snižování počtu chloroplastů a ke zmenšování jejich velikosti. Snižující se množství chloroplastů má za následek pokles aktivity fotosyntézy (Ono et al. 1995). Senescence představuje vysoce uspořádaný proces, jakým rostliny mobilizují a recyklují živiny z listů do jiných částí rostlin, a to semen, zásobních orgánů nebo vyvíjejících se listů a květů (Thomas et al. 1980). Senescence listů může být zahájena vývojem semen u určitých monokarpických druhů. (Noodén et al. 1997).

Listová senescence bývá někdy označována jako typ programované buněčné smrti (PCD). PCD je sebedestruktivní systém, kdy buňky podporují svoji vlastní smrt. PCD se nevyskytuje pouze při senescenci, ale dochází k ní i při jiných



procesech, jako je xylogeneze, embryogeneze nebo hypersenzitivní reakce na infekci patogeny (Gan a Amasino 1997).

Geny zapojené do katabolismu a remobilizace živin v průběhu senescence jsou označovány, jako geny asociované se senescencí (SAG) (Lohman et al. 1994). Ze všech vývojových fází listu jsou SAG geny nejvíce exprimovány právě při senescenci. (Nam 1997). SAG kódují hlavně katabolické enzymy, jako jsou ribonukleasy (Taylor et al. 1993), proteinasy (Lohman et al. 1994; Drake et al. 1996) a lipasy (Ryu a Wang 1995) a další enzymy, které se podílejí na přeměně živin, jako je gulatanin syntetasa. Glutamin syntetasa je zásadní enzym pro asimilaci amonných iontů a biosyntézu glutaminu v rostlinách (Kawakami a Watanabe 1988). Při zkoumání genové exprese během přirozené senescence bylo objeveno, že některé SAG jsou exprimovány i v jiných procesech než je senescence. Z tohoto důvodu jsou SAG děleny do dvou kategorií, a to SAG, které jsou exprimovány pouze při senescenci anebo SAG, jejichž exprese se během senescence zvyšuje. (Gan a Amasino 1995). Pouze malé množství SAG je vysoce specifické pro senescenci. Jedním z nich je SAG12, který je exprimován během indukované i přirozené senescence u *Arabidopsis thaliana* (Weaver et al. 1998). Gen SAG12 patří mezi cysteinové proteázy (má proteolytickou funkci) a je hojně využíván ke studiu regulace listové senescence (Noh a Amasino 1999).

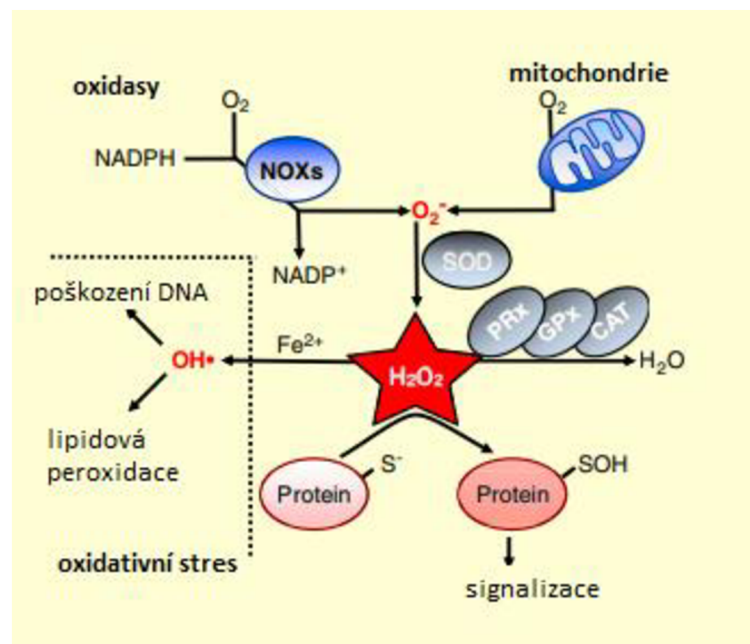
### **2.1.2 Senescence a fotosyntéza**

K poklesu účinnosti fotosyntézy dochází mnohem dříve, než se objeví první viditelné známky degradace chlorofylu v listu (Majer et al. 2010). Měření fluorescence chlorofylu je důležitá metoda pro získání kvalitativních a kvantitativních informací o fotosyntéze (Roháček a Barták 1999), která je využívána i při studiu senescence (Špundová et al. 2003). Metody stanovení chlorofylové fluorescence využívají absorpce světelné energie molekulami chlorofylu v listu. Po absorpci energie dochází ke třem jevům: energie může být využita k fotosyntetickým dějům, přebytečná energie může být uvolněna jako teplo nebo může být emitována jako fluorescence chlorofylu. Tyto tři děje jsou na sobě závislé, při změně účinnosti jednoho děje dojde ke změně i u ostatních dějů (Zaman et al. 2018). Metoda je založena na neinvazivním měření účinnosti zejména fotosystému II (PSII), popřípadě lze měřit i účinnost fotosystému I. Pro indikaci fyziologického stavu se používá

nejčastěji parametr  $F_V/F_M$ , který vyjadřuje maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII. Pokud dojde k poškození fotosyntetického aparátu nebo k senescenci, dojde také ke snížení hodnoty  $F_V/F_M$  (např. Špundová et al. 2003). Když je list přizpůsobený tmě, dojde vlivem saturačního záblesku k získání maximální fluorescence chlorofylu ( $F_M$ ). Rozdíl mezi  $F_M$  a  $F_0$  (minimální fluorescence) se označuje jako variabilní fluorescence ( $F_V$ ). Hodnota  $F_V/F_M$  je dána vztahem  $(F_M - F_0) / F_M$  (Bresson et al. 2018).

## 2.2 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) byly vnímány jako toxické vedlejší produkty aerobního metabolismu, které rostlina odstraňuje pomocí antioxidantů. Následně bylo zjištěno, že ROS mají také signální funkci a podílejí se na řízení mnoha procesů, jako jsou např. růst, vývoj, reakce na biotické a abiotické podněty prostředí nebo programovaná buněčná smrt a senescence. Z toho vyplývá, že ROS v rostlinách mají duální funkci (obr. 1). Vysoká koncentrace ROS je toxická, naopak nízká koncentrace může být použita k signalizaci v rostlině (Dat et al. 2000; Bailey-Serres a Mittler 2006).



**Obr. 1** Schéma duálního charakteru ROS v rostlinách. Převzato z Schieber a Chandel (2014) a upraveno

K tvorbě ROS dochází během mnoha biochemických procesů, kdy se z atmosférického kyslíku ( $O_2$ ) vytváří částečně redukováná forma. Mohou nastat dva případy. První, kdy dojde k jednoelektronové redukci, kdy na molekulu kyslíku přechází 1 elektron a vzniká tak superoxidový aniontový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ), na ten může dále přejít 1 elektron za vzniku peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) a následně může přejít 1 elektron i na  $H_2O_2$  za vzniku hydroxylu ( $OH^{\cdot}$ ). V druhém případě dochází k dvouelektronové redukci, zde na molekulu kyslíku přechází 2 elektrony najednou a rovnou vzniká  $H_2O_2$ . Reaktivní formy kyslíku mohou reagovat s různými buněčnými složkami a mohou oxidačně poškodit buňku, tím se liší od atmosférického kyslíku, který takové vlastnosti nemá (Mittler 2002).

### **2.3 Oxidativní stres u rostlin**

Oxidativní stres bývá považován za patologický pro rostlinu, ale zvýšený obsah ROS má význam také jako signální molekuly. Rozdíl mezi oxidativním stresem a signalizací je v koncentraci daných ROS, kdy jejich vysoký obsah může vést k poškození DNA, bílkovin a lipidů, zatímco nízký obsah má opačný efekt (Schieber a Chandel 2014). Je známo, že ROS se zapojují jako signální molekuly do regulace celé řady biologických a fyziologických procesů (Finkel 2011). Rostliny produkují ROS, hlavně superoxid a  $H_2O_2$ , které slouží jako poslové v dějích spojených s růstem a vývojem rostlin (Schroeder et al. 2001). Velmi důležitý způsob, jak rostliny přenáší informace o změně prostředí je také pomocí superoxidového vzplanutí na plazmatické membráně (Foreman et al. 2003). Bylo předpokládáno, že ROS jsou škodlivé pro rostlinu, ale novější poznatky ukazují, že ROS patří mezi mechanismy, díky kterým rostlina může upravovat genovou expresi a buněčné struktury na základě podmětů z okolí. Ukazuje se, že vztah mezi metabolismem a redoxními stavy je složitý. Přestože oxidace proteinů může snížit vitalitu rostliny, bylo zjištěno, že tyto procesy jsou důležité pro vnímání a reakci rostlin na životní prostředí. Dochází k strukturním změnám proteinů při produkci oxilipidů nebo při rozpoznání poškozené DNA prostřednictvím enzymu polyadribosa polymerasa (PARP). Ke strukturním změnám dochází i při oxidaci specifických proteinů, např. glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa, která je zapojená do buněčné signalizace. Bylo prokázáno, že regulace prostřednictvím PARP poskytuje ochranu před abiotickým stresem (Schulz et al. 2012).

### **2.3.1 Ochrana proti oxidativnímu poškození**

Antioxidanty a antioxidační enzymy, které se podílí na odstranění ROS, přerušují kaskády nekontrolované oxidace. Redoxní reakce jsou katalyzované pomocí těchto enzymů, kdy jsou elektrony dodávány z redukčních činidel s nízkou molekulovou hmotností (Noctor a Foyer 1998). První skupina zahrnuje neenzymatické antioxidanty, které chrání rostlinu před oxidativním poškozením. Zde je důležité zmínit kyselinu L-askorbovou (vitamín C), která se nachází ve většině rostlinných buněk. Významně přispívá k odstranění volných radikálů, čímž se snižuje oxidativní poškození. Dále do této skupiny patří karotenoidy, které rychle odstraňují singletní kyslík (Piterková et al. 2005). Glutathion společně se svojí oxidovanou formou udržují redoxní rovnováhu v buňkách, podílí se na regulaci buněčného cyklu a zabraňuje peroxidaci lipidů. Glutathion také pomáhá obnovovat kyselinu askorbovou pomocí askorbát-glutathionového cyklu. Součástí lipidových membrán je antioxidant  $\alpha$ -Tokoferol (vitamin E). Do druhé skupiny patří antioxidační enzymy. Mezi důležité antioxidační enzymy patří superoxidodismutasa a katalasa. Superoxidodismutasa katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na peroxid vodíku (Blokhina et al. 2003). Katalasa se podílí na odstraňování peroxidu vodíku (Dat et al. 2000).

### **2.3.2 Působení ROS na senescenci**

Je známo, že v během senescence dochází k lipidové peroxidaci, která je charakteristická tvorbou volných radikálů (Spiteller 2003). Peroxidace lipidů zahrnuje tři fáze, a to iniciaci, propagaci a terminaci. Během iniciace dochází k odštěpení vodíkového atomu z mastné kyseliny a vzniká tak volný radikál mastné kyseliny a voda. Kvůli odtržení vodíku dojde k přesmyku, kdy dvě dvojnásobné vazby jsou odděleny pouze jednou jednoduchou vazbou namísto dvou jednoduchých vazeb, čímž vznikne konjugovaný dien. Konjugovaný dien reaguje s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu. V propagaci peroxylový radikál dále reaguje se sousední mastnou kyselinou, kdy dochází k odebrání atomu vodíku radikálem a vytváří se lipoperoxid, který může napadat další molekuly a tak dochází ke vzniku řetězové reakce. Lipoperoxidy jsou primární produkty peroxidace lipidů. Jejich další změny, jako cyklizace či polymerace, vedou k tvorbě sekundárních produktů. K terminaci dochází při reakci dvou radikálů, při vyčerpání substrátů nebo působením antioxidantů (Dhindsa et al. 1982).

V této práci byly používány mutantní rostliny *Arabidopsis* (*LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34*), které byly deficientní v jednom či dvou enzymech zapojených v produkci ROS. NADPH oxidázy, mezi které se řadí také *RBOHF*, katalyzují vznik superoxidu jednoelektronovou redukcí z kyslíku, kdy NADPH je zde donorem elektronů (Apel a Hirt 2004). NADPH oxidasy se nachází v cytoplazmatické membráně a jsou považovány za hlavní zdroje apoplastického oxidačního vzplanutí u rostlin napadených mikrobiálními patogeny (Kámán-Tóth et al. 2019). Bylo zjištěno, že knock-out dvou genů *RBOHD* a *RBOHF* u *Arabidopsis thaliana* způsobí zastavení produkce ROS během obranné reakce rostliny na patogeny. To značí, že do obranných reakcí rostliny vůči patogenům jsou tyto dva enzymy zapojeny (Apel a Hirt 2004). Enzymy označené jako lipoxygenázy (*LOX*) mohou oxidovat nenasycené mastné kyseliny, což vede k lipoperoxidaci biologických membrán. Daný proces způsobuje syntézu signálních molekul a vede také ke změnám buněčného metabolismu. *LOX* jsou zapojené také do PCD a reakcí na biotické a abiotické stresové faktory (Umate 2011). Peroxidázy buněčné stěny, mezi které se řadí také *PRX33PRX34*, se podílejí na produkci apoplastického peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) u *Arabidopsis thaliana* (O'Brien et al. 2012) a hrají klíčovou roli v rezistenci rostlin k patogenům (Daudi et al. 2012).

## 2.4 Rostlinné hormony

Kyselina abscisová (*ABA*), gibereliny (*GA*), etylen, brassinosteroidy (*BR*), auxiny, cytokininy a další signální molekuly mají rozsáhlé účinky na vývoj rostlin. Fungují jako chemičtí poslové v mezibuněčné, v tkáňové a orgánové komunikaci. Rostlinné hormony jsou nezbytné také pro regulaci vegetačního klidu a klíčení (Kucera et al. 2005). Etylen, kyselina abscisová a jasmonáty jsou fytohormony, které přispívají k senescenci, naopak auxiny a cytokininy (*CK*) se uplatňují při potlačení senescence (Lim et al. 2003).

Skoro každý krok růstu a vývoje je doprovázen auxinovou signalizací (Stewart a Nemhauser 2010). Auxiny ovlivňují širokou škálu procesů v rostlinách, jako jsou tropismy, morfologie kořenů a výhonků a tvorba cév (Davies, 1995). Auxiny také potlačují transkripci některých genů, které se podílejí na senescenci (Noh a Amasino 1999).

Etylen je plyný hormon, který ovlivňuje klíčení semen, prodlužování buněk, kvetení či zrání plodů (Abeles et al. 1992). Dále má etylen vliv také na listovou senescenci. Při exogenní aplikaci etylenu dochází k poklesu obsahu chlorofylu a proteinů a zvyšuje se

aktivita hydrolytických enzymů (Mattoo a Aharoni 1988). Naopak inhibitory biosyntézy etylenu můžou zpomalit listovou senescenci. (Abeles et al. 1992).

Do skupiny jasmonátů se řadí kyselina jasmonová (JA), methyljasmonát (MeJA) a příbuzné sloučeniny. Uplatňují se v procesech spojených s růstem a vývojem rostlin, jako je klíčivost a vývoj sazenic, listová senescence a zrání. Exogenní aplikace jasmonátů snižuje množství chlorofylu a potlačuje genovou expresi fotosyntetických genů (Ananieva et al. 2004).

## 2.5 Cytokininy

Cytokininy (CK) patří mezi rostlinné hormony a uplatňují se v růstu a vývoji rostlin. Mezi oblasti, kde působí, patří např. apikální dominance, tvorba meristémů u výhonků, stárnutí listů, mobilizace živin, klíčení semen a odpověď na patogeny. Dále se zapojují do procesů regulovaných světlem, jako je deetiolace a diferenciacie chloroplastů (Mok et al. 2005) .

Základní rozdělení CK je na přirozeně se vyskytující a na syntetické. CK, které se přirozeně vyskytují, jsou deriváty adeninu, které na atomu dusíku N<sup>6</sup> nesou postranní řetězec. Tento postranní řetězec může být buď aromatický, nebo isoprenoidní. Z přirozeně se vyskytujících CK jsou nejhojněji zastoupené N<sup>6</sup>-substituované adeninové deriváty s nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem (např. *cis*-zeatin(cZ); *trans*-zeatin (tZ); isopentenyladenin (iP)). Jejich homeostáza je regulována rychlostí *de novo* syntézy a importu, tvorbou a rozpadem cytokininových konjugátů (což jsou hlavně glukosidy) a rychlostí exportu a katabolismu (Mok a Mok 2001). tZ byl v roce 1963 objeven, jako první přirozeně se vyskytující cytokinin v rostlinách (Letham 1963). Zástupci CK s aromatickým postranním řetězcem jsou 6-benzylaminopurin (BAP) a kinetin (K) (Plíhalová et al. 2016). Deriváty fenylničoviny tvoří skupinu syntetických cytokininů, jako je např. (2-chloro-pyridin-4-yl)-N'-fenylničovina (CPPU) a thidiazuron (TDZ) (Mok a Mok 2001).

### 2.5.1 Účinek cytokininů na senescenci

CK mají vliv na mnoho procesů v rostlinách, včetně senescence. V listech a v okvětních listech fungují CK jako negativní regulátoři senescence. V 70. letech 20. století bylo prokázáno, že pokles hladiny CK je spojen se ztrátou zelené barvy listů (Sabater a Rodriguez 1978).

Během listové senescence dochází k poklesu množství CK obsažených v listech, naopak při exogenní aplikaci CK bylo zaznamenáno zpomalení listové senescence. Byl proveden experiment, kdy byl uměle vnesen gen pro isopentenyltransferasu (IPT) z *Agrobacterium tumefaciens* pod promotor *Arabidopsis* SAG12. IPT je enzym důležitý pro syntézu CK. Takto byly vytvořeny transgenní rostliny tabáku s autoregulovaným systémem pro tvorbu CK během senescence, což vedlo k prodloužení fotosyntetického období rostliny (Gan a Amasino 1995). Na základě dalších experimentů, které byly prováděny na listech bavlníku, bylo zjištěno, že CK mohou během senescence regulovat transkripci mnoha genů spojených s různými metabolickými cestami, jako je syntéza flavonoidů, metabolismus argininu a prolinů, glyoxalový cyklus či degradace RNA (Zhao et al. 2013).

### **2.5.2 Účinek cytokininových derivátů na senescenci**

Listová senescence je velmi důležitý proces, protože má zásadní vliv na zemědělství a především na produkci plodin (Noodén et al. 1997). BAP je jedním z nejčastěji používaných CK. Při jeho exogenní aplikaci dochází k účinnému zpomalení senescence. Zásadní je ale zvolit správnou koncentraci, protože při příliš vysoké koncentraci může naopak dojít k urychlení senescence. Vysoká koncentrace BAP může mít také negativní vliv na tvorbu primárních kořenů a jejich větvení (Rulcová a Pospíšilová 2001). Z tohoto důvodu se začaly syntetizovat nové sloučeniny, které jsou odvozené od 6-benzylaminopurinu.

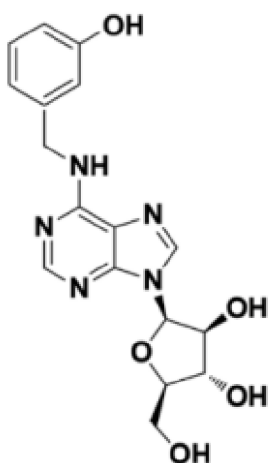
Doležal et al. (2007) syntetizovali 48 derivátů 6-benzylaminopurinu, substituovaných atomy halogenů v pozicích ortho, meta, para. Dále bylo pracováno také s hydroxy a methoxy deriváty. Biologická aktivita těchto derivátů byla testována pomocí kalusového, senescenčního a amarantového testu. Vysoká biologická aktivita byla prokázána u většiny syntetizovaných monosubstituovaných derivátů CK. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v senescenčním testu, ve kterém některé nové látky dosahovaly až o 220 % větší aktivity než BAP, a skoro 50 % nových derivátů bylo aktivnější než BAP. Bylo také zjištěno, že methoxy deriváty adeninu v poloze *ortho* nebo *meta* měly dvakrát vyšší antisenescenční aktivitu než BAP (Doležal et al. 2007). V amarantovém testu vykazovaly vysokou aktivitu sloučeniny, které obsahovaly v postranním řetězci atom fluoru. Značné rozdíly mezi aktivitou v jednotlivých testech byly pozorovány i u disubstituovaných derivátů, což ukazuje, že i malá změna v substituci benzylového kruhu může mít zásadní vliv na cytokininovou aktivitu. Cytokininové receptory CRE1/AHK4 ani AHK3 nebyly úplně

aktivovány žádným z nově připravených benzyladenosinových derivátů, i když tyto receptory dokáží rozpoznat jak isoprenoidní CK, tak odpovídající ribosidy. Na základě těchto poznatků, se autoři domnívají, že v rostlinách existuje ještě jiný systém na rozpoznávání cytokininů, který interaguje s aromatickými analogy (Doležal et al. 2007).

Holub et al. (1998) provedli sérii pokusů, ve kterých byl kromě účinku CK derivátů na senescenci hodnocen také způsob aplikace CK derivátů. K experimentu byly použity roztoky BAP, tZ, *meta*-topolinu, *ortho*-topolinu (o koncentracích  $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  mol/l). *Trans*-zeatin byl použit jako modelová sloučenina, protože je považován za nejaktivnější přirozeně se vyskytující CK. Všechny výše zmíněné roztoky byly exogenně aplikovány na listy pšenice, které byly danou látku postříkány, umístěny do roztoku celou plochou listu nebo pouze řezem. Po oddělení byly listy inkubovány po 4 dny ve tmě. Následně byla hodnocena aktivita látek v rámci senescenčního, amarantového a kalusového testu. Bylo zjištěno, že kromě senescenčního testu, u kterého byly segmenty ponořeny do CK roztoků řezem, dosahoval BAP lepších výsledků než tZ (Holub et al. 1998).

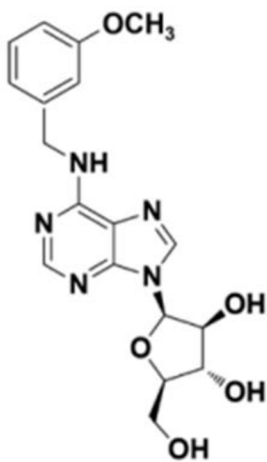
Kučerová et al. (2020) porovnávali antisenescenční aktivitu BAP a dvou nově připravených CK derivátů, arabinosidů, a to konkrétně 3OHBAPA (obr. 2) a 3MeOBAPA (obr. 3) aplikovaných na listové segmenty pšenice a na listy *Arabidopsis thaliana*. Bylo hodnoceno, mimo jiné, množství chlorofylu a maximální kvantový výtěžek fotoústému II. U pšenice vykazoval nejvyšší antisenescenční aktivitu 3OHBAPA a u *Arabidopsis thaliana* byl nejaktivnější 3MeOBAPA. (Kučerová et al. 2020).





6-(3-hydroxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-arabinofuranosylpurin (3OHBAPA)

**Obr. 2** Chemická struktura 3OHBAPA



6-(3-methoxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-arabinofuranosylpurin (3MeOBAPA)

**Obr. 3** Chemická struktura 3MeOBAPA

Z výše uvedených informací vyplývá, že se CK uplatňují v mnohých procesech od klíčení až po senescenci. Při senescenci dochází k poklesu množství CK, což má za následek také snížení obsahu pigmentů a pokles fotosyntetické aktivity. Při exogenní aplikaci CK dochází k oddálení projevů senescence, což lze využít např. v zemědělství pro zvýšení výnosů plodin. Rozdíly v účinnosti mezi jednotlivými CK jsou způsobeny jejich odlišnou chemickou strukturou. Jedním z nejhodněji používaných CK je BAP, který však při exogenní aplikaci může mít nežádoucí účinky mj. na kořeny rostlin. Z tohoto důvodu jsou syntetizovány a testovány nové CK deriváty, které tyto nežádoucí účinky nemají. Na základě výsledků publikovaných Bryksovou et al. (2020) a Kučerovou et al. (2020), byl pro experimenty v této bakalářské práci vybrán derivát 6-(3-methoxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-arabinofuranosylpurin, označovaný také jako 3MeOBAPA. V předchozích experimentech s 3MeOBAPA bylo zjištěno, že krátce po jeho aplikaci dochází k akumulaci ROS, ale u senescentních listů *Arabidopsis* ošetřených 3MeOBAPA nebylo zaznamenáno oxidativní poškození. Produkce ROS má tedy funkci v signalingu (Bryksová et al. 2020, Kučerová et al. 2020). Z tohoto důvodu byli v této bakalářské práci použiti knock-out mutanti *LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34*, tyto geny jsou zapojené do tvorby ROS. Sledován byl vliv 3MeOBAPA na indukovanou senescenci těchto mutantů *Arabidopsis thaliana* L. a bylo zkoumáno, jestli knockout těchto genů ovlivňuje průběh senescence. Hodnocení bylo prováděno pomocí parametru chlorofylové fluorescence ( $F_v/F_m$ ) a obsahu fotosyntetických pigmentů.

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Rostlinný materiál

Pro praktickou část byly použity rostliny *Arabidopsis thaliana* L., a to WT ekotypu Columbia 0 a mutantní rostliny *LOX*, *PRX33PRX34* a *RBOHF* (NASC ID: N3749, N68901 a N675268).

Byla provedena stratifikace semen v destilované vodě v chladničce při teplotě 4 °C po dobu 3 dnů, následoval výsev do půdního substrátu. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu (PSI, Drásov, ČR) za podmínek, které jsou uvedeny v tab. 1. Po šesti týdnech byly z rostlin odděleny páté a/nebo šesté listy.

**Tab. 1** Podmínky pěstování

Fotoperioda	8 h světlo / 16 h tma
Intenzita PAR	110 mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>
Teplota	22 °C den / 20 °C noc

Listy byly umístěny spodní stranou do 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), roztoku 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo jeho derivátu 6-(3-methoxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurinu (3MeOBAPA) (obr. 4) o koncentraci 10<sup>-5</sup> mol/l. BAP a 3MeOBAPA byly rozpuštěny v 0,1% DMSO, který byl z tohoto důvodu použit jako kontrolní. Derivát 3MeOBAPA byl připraven na oddělení Chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a poskytnut Mgr. Karlem Doležalem, Dr., DSc. Do 6-jamkové mikrotitrační destičky byly roztoky pipetovány po 5 ml. Do každého roztoku bylo umístěno 5 až 6 listů. Následně byla destička s listy v roztocích uzavřena víkem a zabalena do černé folie a skladována při teplotě 24 °C po dobu 6 dní. Kontrolní listy byly odděleny a po 30 minut adaptovány na tmu, poté následovalo měření parametru  $F_v/F_m$  pomocí přístroje FluorCam 800-0 (PSI, Drásov, ČR). Po měření listů byly listy vyfoceny a obkresleny. Dané listy byly následně přeneseny do 2 ml mikrozkušavek a zamraženy v tekutém dusíku. Nakonec byly listy uskladněny do hlubokomrazícího boxu při teplotě – 80 °C.

## 3.2 Použité metody

V této práci bylo prováděno měření chlorofylové fluorescence prostřednictvím přístroje FluorCam 800-0, dále bylo analyticky stanovováno množství pigmentů v listech *Arabidopsis thaliana* L..

### 3.2.1 Měření parametrů chlorofylové fluorescence

U kontrolních listů bylo měření uskutečněno hned po oddělení a 30-minutovém zatemnění. Měření bylo prováděno na fluorescenčním zobrazovacím přístroji FluorCam 800-0. Pro měření byl použit protokol s předdefinovanými hodnotami: 10% senzitivita, 50% saturační pulz (relativní intenzita saturačního PAR, která odpovídala ozáření 900  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  v místě vzorků). Na listech byl měřen parametr maximální ( $F_M$ ) a minimální ( $F_0$ ) fluorescence, z těchto parametrů byl následně vypočítán maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $F_V/F_M$ ).

$$(F_M - F_0)/F_M = F_V/F_M$$

### 3.2.2 Analytické stanovení pigmentů

Listy byly homogenizovány s uhlíčanem hořečnatým v třecí misce a následně byl přidán 2 ml vychlazeného 80% acetonu. Takto připravené extrakty byly centrifugovány po dobu 12 min při 3600 g a 4 °C. Byl zaznamenán celkový objem a popřípadě byl přidán aceton ke vzorkům, u kterých byla absorbance u vlnové délky 663,2 nm vyšší než 0,8. Následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení absorbance chlorofylového extraktu při vlnových délkách 470 nm; 648,6 nm; 663,2 nm a 750 nm. Celkový obsah chlorofylu  $a+b$  byl poté vypočítán podle rovnice dle Lichtenthalera (1987):

Vypočet obsahu chlorofylů  $a+b$ :

$$\text{CHF } (A+B) = 7,15 * (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 * (A_{664,8} - A_{750})$$

Hodnoty  $A_{663,2}$ ;  $A_{664,8}$  a  $A_{750}$  jsou absorbance extraktu pigmentů v daných vlnových délkách. Takto získané hodnoty se dále násobí objemem extraktu a dělí listovou plochou [ $\text{cm}^2$ ].

### 3.2.3 Zpracování dat

Pro vyhodnocení parametru  $F_V/F_M$  byl použit imaging parametru  $F_V/F_M$ . K výpočtu plochy listů byl použit program ImageJ. Obsah chlorofylů  $a+b$  byl vztažen k celkové ploše listu. Data

byla zpracována pomocí programu MS Excel. Ke grafickému vyhodnocení obsahu chlorofylu  $a+b$  byly použity sloupcové grafy, které představují medián hodnoty obsahu chlorofylu  $a+b$  a chybové úsečky znázorňující horní a dolní kvartil.

U analytického stanovení chlorofylů  $a+b$  byl použit T-test v programu Excel pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi kontrolními listy a listy, na které byly aplikovány roztoky DMSO, BAP a 3MeOBAPA. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) byly v grafech označeny rozdílnými písmeny (a až d), jestliže se hodnoty významně nelišily ( $p > 0,05$ ), byly tyto sloupce označeny stejným písmenem.

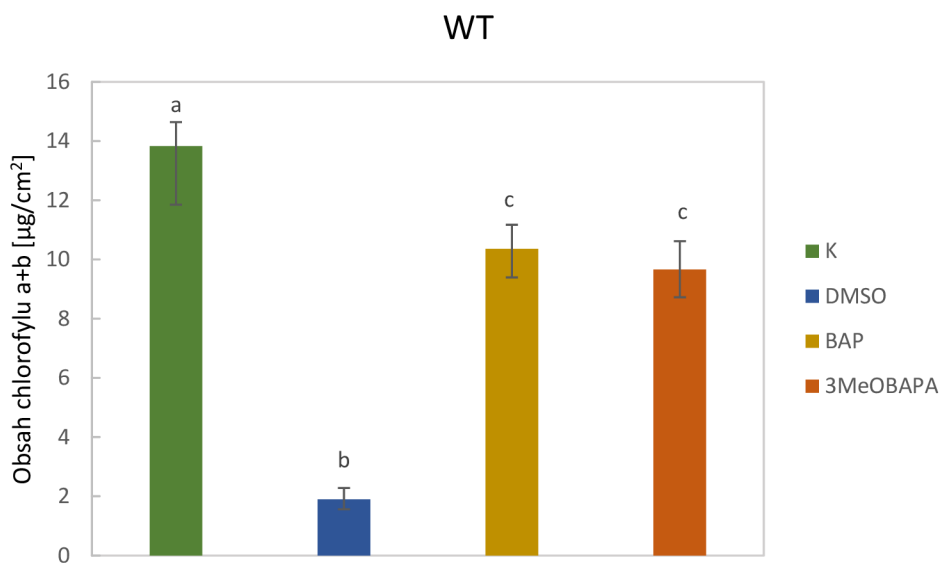
#### 4. Výsledky

V rámci této bakalářské práce bylo pracováno se standardním genotypem (WT) a mutantními genotypy *LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34* rostlin *Arabidopsis thaliana*. Bylo provedeno analytické stanovení obsahu chlorofylu *a+b* a měření chlorofylové fluorescence (parametr  $F_v/F_m$ ) na oddělených listech, které byly ošetřeny roztokem BAP nebo od něj odvozeným derivátem 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l. Naměřené hodnoty byly srovnány s hodnotami naměřenými u kontrolních listů nebo u listů ošetřených 0,1% DMSO. DMSO byl použit jako rozpouštědlo k ředění použitých cytokininů.

## 4.1 Obsah chlorofylu *a+b*

### 4.1.1 Obsah chlorofylu u listů se standardním genotypem (WT)

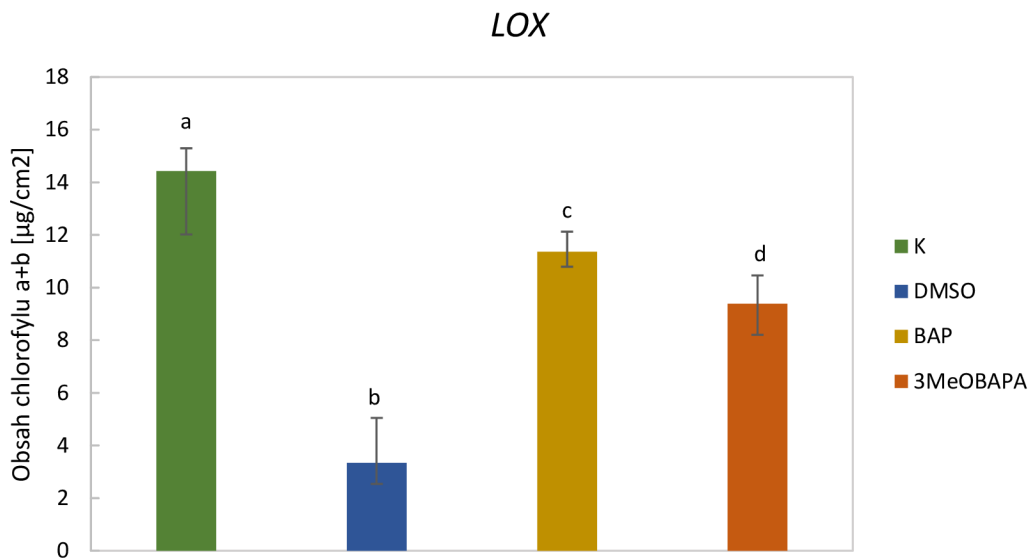
Vlivem indukované senescence došlo u všech listů inkubovaných v roztocích k poklesu obsahu chl *a+b* při srovnání s kontrolou (obr. 4). K velmi výraznému poklesu obsahu chl *a+b* došlo u listů uchovaných v DMSO, a to na přibližně 15 % hodnoty naměřené u kontrolních listů. Pokles obsahu chl *a+b* byl srovnatelný u listů inkubovaných v roztocích BAP a 3MeOBAPA, v obou případech byl obsah chl *a+b* přibližně na 70 % hodnoty naměřené u kontrolních listů.



**Obr. 4** Obsah chlorofylu *a+b* [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] v listech *Arabidopsis thaliana* L. (WT) naměřený ihned po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od BAP odvozeného derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l. V grafu jsou uvedeny mediány obsahu chlorofylu *a+b*, chybové úsečky znázorňují horní a dolní kvartil. Rozdílná písmena označují statisticky významný rozdíl mezi kontrolou, DMSO, BAP a 3MeOBAPA,  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2 Obsah chlorofylu u listů *LOX*

U oddělených listů genotypu *LOX* došlo rovněž vlivem indukované senescence ke snížení obsahu chl *a+b* ve všech roztocích (obr. 5). Množství zachovaného chl *a+b* v DMSO bylo však přibližně o 50 % vyšší než u WT. Obsah chl *a+b* se lišil napříč všemi listy inkubovanými ve všech roztocích. Nejnižší pokles obsahu chl *a+b* byl u listů inkubovaných v roztoku BAP (přibližně 70 % hodnoty kontrolních listů). Listy ošetřené roztokem 3MeOBAPA měly nižší obsah chl *a+b* (přibližně 60 % hodnoty kontrolních listů) než listy ošetřené roztokem BAP.

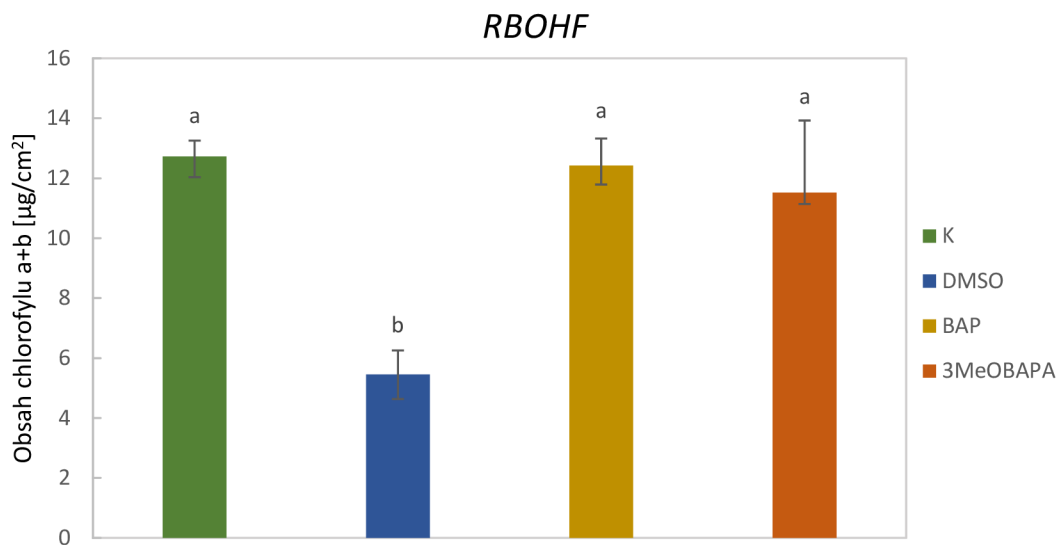


**Obr. 5** Obsah chlorofylu *a+b* [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] v listech *Arabidopsis thaliana* L. (*LOX*), naměřený ihned po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od BAP odvozeného derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l. V grafu jsou uvedeny mediány obsahu chlorofylu *a+b*, chybové úsečky znázorňují rozdíl mezi horní a dolní kvartil. Rozdílná písmena označují statisticky významný rozdíl mezi kontrolou, DMSO, BAP a 3MeOBAPA,  $p < 0,05$ .



#### 4.1.3 Obsah chlorofylů u listů *RBOHF*

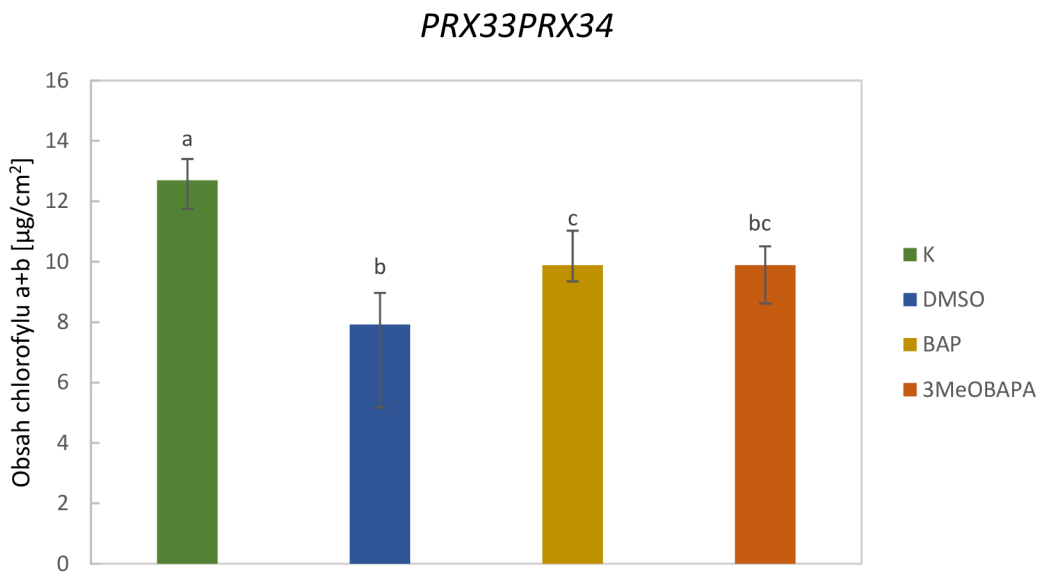
V případě listů *RBOHF* inkubovaných v DMSO došlo k poklesu chl *a+b* (přibližně na 40 % hodnoty kontrolních listů), který byl zapříčiněn indukovanou senescencí (obr. 6). Obsah chl *a+b* je u listů inkubovaných v roztocích BAP a 3MeOBAPA srovnatelný s kontrolou. Oproti genotypům WT a *LOX* je u listů *RBOHF* inkubovaných ve všech použitých roztocích zachováno více sledovaných pigmentů.



**Obr. 6** Obsah chlorofylu *a+b* [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] v listech *Arabidopsis thaliana* L. (*ROBHF*), naměřený ihned po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od BAP odvozeného derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l. V grafu jsou uvedeny mediány obsahu chlorofylu *a+b*, chybové úsečky znázorňují rozdíl mezi horní a dolní kvartil. Rozdílná písmena označují statisticky významný rozdíl mezi kontrolou, DMSO, BAP a 3MeOBAPA,  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Obsah chlorofylů u listů PRX33PRX34

Vlivem indukované senescence došlo u listů inkubovaných v DMSO k poklesu obsahu chl  $a+b$ , který byl ale nejméně výrazný v porovnání s ostatními sledovanými genotypy (přibližně 60 % hodnoty kontrolních listů (obr. 7). Vlivem inkubace listů v roztocích BAP i 3MeOBAPA došlo ke zpomalení poklesu obsahu chl  $a+b$ , přičemž obsah chl  $a+b$  u listů ošetřených 3MeOBAPA byl mírně nižší a srovnatelný s DMSO (78 % hodnoty kontrolních listů u BAP, 76% v případě 3MeOBAPA).



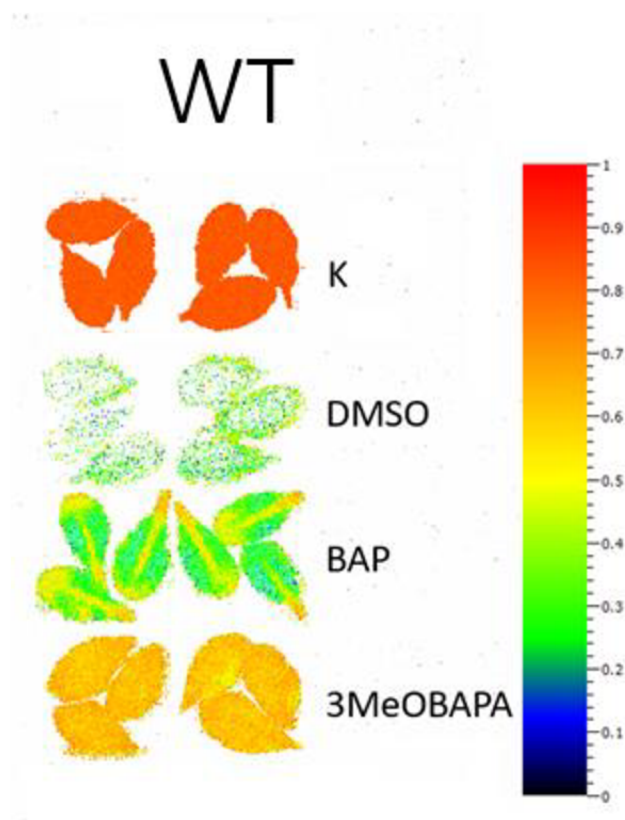
**Obr. 7** Obsah chlorofylu  $a+b$  [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] v listech *Arabidopsis thaliana* L. (*PRX33PRX34*), naměřený ihned po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) nebo od BAP odvozeného derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l. V grafu jsou uvedeny mediány obsahu chlorofylu  $a+b$ , chybové úsečky znázorňují rozdíl mezi horní a dolní kvartil. Rozdílná písmena označují statisticky významný rozdíl mezi kontrolou, DMSO, BAP a 3MeOBAPA,  $p < 0,05$ .

## 4.2 Parametr $F_V/F_M$

Parametr  $F_V/F_M$  u kontrolních listů byl změřen okamžitě po oddělení a adaptaci na tmu. Hodnota parametru  $F_V/F_M$  se u všech genotypů pohybovala okolo 0,82, to odpovídá zdravým listům s plně funkčním fotosystémem II.

#### 4.2.1 Standardní genotyp (WT)

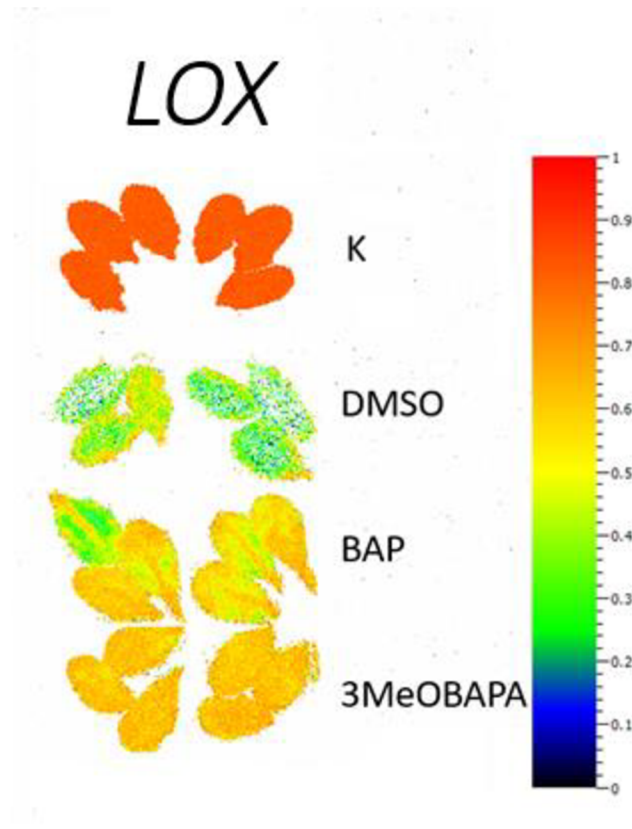
Velmi výrazný pokles parametru  $F_V/F_M$  nastal u listů inkubovaných v roztoku DMSO. Velká část plochy listu je nefunkční, je bez fluorescenčního signálu, což je na snímku viditelné jako bílé plochy (obr. 8). Roztok BAP výrazně zpomalil pokles parametru  $F_V/F_M$  způsobený indukovanou senescencí. Hodnota  $F_V/F_M$  u listů inkubovaných v BAP dosahovala přibližně 70 % hodnoty kontrolních listů. Roztok 3MeOBAPA dokázal, ve srovnání s roztokem BAP, ještě výrazněji oddálit indukovanou senescenci. Parametr  $F_V/F_M$  dosahoval u listů inkubovaných v roztoku 3MeOBAPA přibližně 90 % hodnoty kontroly.



**Obr. 8** Imaging parametru  $F_V/F_M$  během indukované senescence u oddělených listů *Arabidopsis thaliana* L. (WT) bezprostředně po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1 % dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) a jeho derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l.

#### 4.2.2 LOX

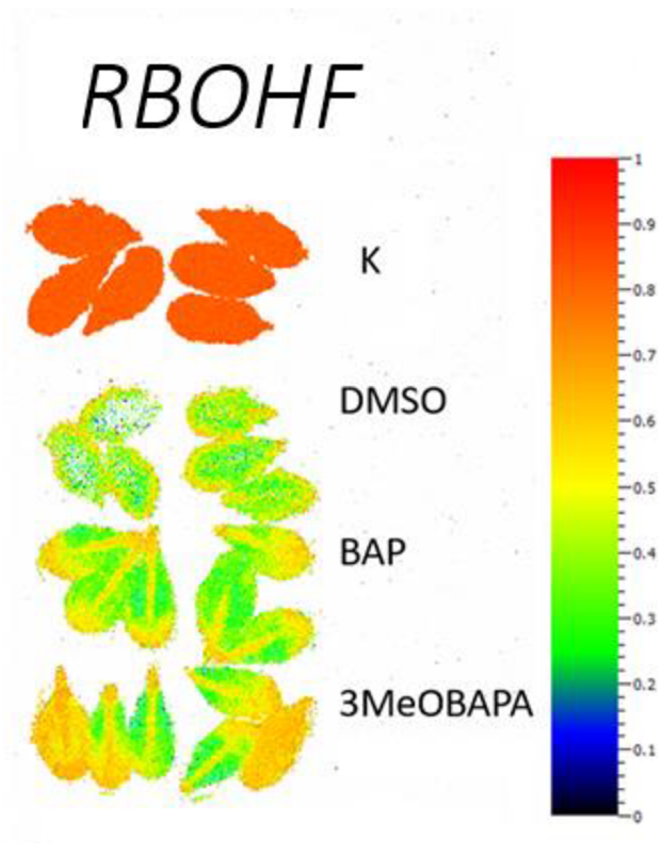
U listů *LOX* inkubovaných v DMSO došlo vlivem indukované senescence k poklesu parametru  $F_V/F_M$  (obr. 9), který byl srovnatelný s WT. Inkubace listů v BAP tento pokles výrazně zpomalila, přičemž v případě *LOX* byl parametr  $F_V/F_M$  vyšší než u WT. U 3MeOBAPA došlo k mírnému zpomalení poklesu parametru  $F_V/F_M$ , ten byl srovnatelný s WT ve stejném roztoku.



**Obr. 9** Imaging parametru  $F_V/F_M$  během indukované senescence u oddělených listů *Arabidopsis thaliana* L. (*LOX*) bezprostředně po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1 % dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) a jeho derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l.

### 4.2.3 *RBOHF*

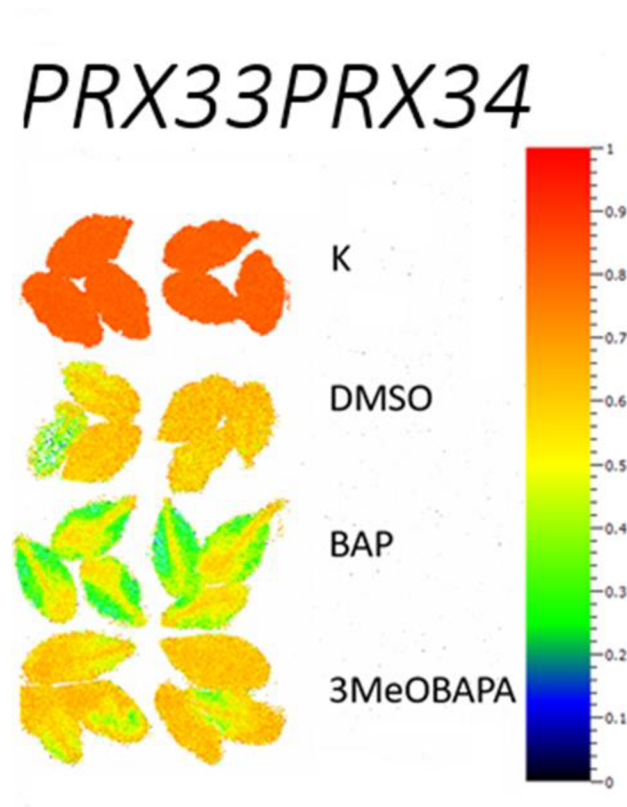
Vlivem indukované senescence došlo u listů *RBOHF* inkubovaných v DMSO k poklesu parametru  $F_V/F_M$  (obr. 10), pokles však nebyl tak výrazný jako v případě WT. U listů ošetřených BAP i 3MeOBAPA byly hodnoty parametru  $F_V/F_M$  jen mírně vyšší než u DMSO. V případě 3MeOBAPA byl  $F_V/F_M$  nižší než u ostatních genotypů.



**Obr. 10** Imaging parametru  $F_V/F_M$  během indukované senescence u oddělených listů *Arabidopsis thaliana* L. (*RBOHF*) bezprostředně po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1 % dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) a jeho derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l.

#### 4.2.4 PRX33PRX34

U listů *PRX33PRX34* inkubovaných v DMSO byl parametr  $F_v/F_m$  výrazně vyšší než u ostatních genotypů, což naznačuje pomalejší průběh senescence. Zatímco u listů *PRX33PRX34* ošetřených BAP byl parametr  $F_v/F_m$  nižší než u listů inkubovaných v DMSO, v případě 3MeOBAPA byl  $F_v/F_m$  srovnatelný s DMSO (obr. 11).



**Obr. 11** Imaging parametru  $F_v/F_m$  během indukované senescence u oddělených listů *Arabidopsis thaliana* L. (*PRX33PRX34*) bezprostředně po oddělení (K) a 6. den po oddělení a uchování ve tmě v roztocích 0,1 % dimethylsulfoxidu (DMSO), 6-benzylaminopurinu (BAP) a jeho derivátu 3MeOBAPA o koncentracích  $10^{-5}$  mol/l.

## 5 Diskuze

Senescence je posledním vývojovým stádiem rostliny. V průběhu senescence dochází k mnohým fyziologickým a biochemickým změnám, které jsou řízeny geneticky a zároveň jsou ovlivňovány environmentálními podmínkami. Dochází ke kontrolovaného rozpadu buněčných složek a jejich recyklaci (Gan a Amasino 1997). V průběhu senescence lze pozorovat degradaci chlorofylu a postupný rozpad fotosyntetického aparátu, což vede k zastavení fotosyntézy.

Je velmi dobře známo, že tyto senescencí indukované změny lze zpomalit či oddálit aplikací CK. Při exogenní aplikaci CK dochází ke zpomalení průběhu senescence, mimo jiné dochází k zpomalení poklesu chl  $a+b$  a zachování účinnosti PSII (parametr  $F_V/F_M$ ). (Holub et al. 1998; Špundová et al. 2003; Vlčková et al. 2006). (Formatting Citation). (2006) zkoumali účinek cytokininu *meta*-topolinu na fotosyntetický aparát u oddělených listových segmentů pšenice. Listové segmenty byly uchovány ve tmě po dobu šesti dnů nebo byly vystaveny kontinuálnímu světlu ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Parametr  $F_V/F_M$  byl měřen šestý den po oddělení a inkubaci v roztoku *meta*-topolinu. Účinek *meta*-topolinu byl u listů inkubovaných na světle zcela jiný než u listů inkubovaných za tmy. Díky *meta*-topolinu byly hodnoty  $F_V/F_M$  skoro stejné jako u čerstvě oddělených listů, ale u listů uchovaných na světle došlo k velmi výraznému poklesu  $F_V/F_M$  (Vlčková et al. 2006). Antisenescenční aktivita CK je závislá na více faktorech. Ovlivňuje ji různá chemická struktura cytokininů, druh rostliny, tak i metoda aplikace CK (Holub et al. 1998; Doležal et al. 2007). Bylo zjištěno, že vysoká koncentrace BAP může mít negativní účinky na růst a vývoj rostlin (Rulcová a Pospíšilová 2001), proto jsou syntetizovány sloučeniny od BAP odvozené, které ale nemají tyto negativní účinky. Zároveň bylo zjištěno, že některé nově připravené cytokininové deriváty mohou mít silnější antisenescenční účinek než BAP, jedná se např. o methoxy deriváty BAP (Doležal et al. 2007; Kučerová et al. 2020). 3MeOPABA, použitý v rámci této práce, se řadí mezi methoxyderiváty a bylo zjištěno, že oddaluje senescenci u oddělených listů *Arabidopsis* efektivněji než BAP.

Bryksová et al. (2020) zkoumali vliv derivátů BAP (včetně 3MeOBAPA) na oddálení senescence. Ve své práci použili oddělené listy *Arabidopsis thaliana* (WT), které byly inkubovány ve tmě po dobu šesti dní v roztocích CK a poté byl měřen parametr  $F_V/F_M$ . Listy, které byly inkubovány v DMSO, měly pouze velmi nízkou hodnotu parametru  $F_V/F_M$ .



Při aplikaci 3MeOBAPA o koncentraci  $10^{-5}$  mol/l došlo ke zpomalení poklesu  $F_V/F_M$ , které bylo výraznější než při použití BAP. Při měření akumulace ROS po aplikaci 3MeOBAPA bylo zjištěno, že po 3 hodinách od aplikace došlo k prudkému nárůstu ROS, který byl následován pomalým snižováním obsahu ROS, a to až na hodnoty před aplikací 3MeOBAPA (po 16 hodinách) (Bryksová et al. 2020). Zároveň bylo zjištěno, že 3MeOBAPA má ochranný účinek proti oxidativnímu poškození u senescenčních listů *Arabidopsis thaliana* (Kučerová et al. 2020). Z těchto výsledků lze usuzovat, že zvýšená akumulace ROS po aplikaci 3MeOBAPA má signalizační funkci.

Na základě těchto výsledků byli v této bakalářské práci použiti knock-out mutanti *Arabidopsis thaliana* *LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34*. *LOX*, *RBOHF* a *PRX33PRX34* jsou geny zapojené do tvorby ROS (Apel a Hirt 2004). V rámci této práce byl testován dopad absence těchto oxidáz na průběh senescence u oddělených listů *Arabidopsis thaliana* inkubovaných ve tmě po dobu šesti dnů v roztocích DMSO, BAP a 3MeOBAPA, a to prostřednictvím analyticky stanoveného množství chlorofylu *a+b* a parametru chlorofylové fluorescence  $F_V/F_M$ , který stejně jako obsah chlorofylu v průběhu senescence klesá (Janečková et al. 2018). U listů WT inkubovaných v roztoku DMSO došlo k velmi výraznému poklesu obsahu chl *a+b* (obr. 4) i parametru  $F_V/F_M$  (obr. 8). Dále byl zaznamenán velmi výrazný efekt zpomalení senescence u WT v 3MeOBAPA, což odpovídá výsledkům publikovaným v Bryksová et al (2020). K výraznému poklesu obsahu chl *a+b* i  $F_V/F_M$  došlo i u genotypů *LOX*, *PRX33PRX34* a *RBOHF*, přičemž nejvyšších hodnot dosahovaly oba parametry u listů *PRX33PRX34*, což naznačuje pomalejší průběh senescence u tohoto genotypu. Pokles obsahu chl *a+b* i parametru  $F_V/F_M$  indukovaný senescencí byl vlivem aplikace BAP zpomalen, a to jak u WT tak i u *LOX* a *RBOHF*. V případě *PRX33PRX34* byl parametr  $F_V/F_M$  u listů ošetřených BAP nižší než u listů inkubovaných v DMSO (obr. 11), což svědčí o negativním efektu BAP na funkci PSII. Srovnatelný účinek na udržení obsahu chl *a+b* jako BAP měl i 3MeOBAPA, s výjimkou mutanta *LOX* (obr. 6), kde byl obsah chl *a+b* u listů inkubovaných v 3MeOBAPA nižší než v případě BAP. Zatímco u mutanta *LOX* (obr. 9) byl tento efekt srovnatelný s WT (obr. 8), u *RBOHF* (obr. 10) a *PRX33PRX34* (obr. 11) byl  $F_V/F_M$  mírně nižší.

He et al. (2002) se zabývali vlivem kyseliny jasmínové na listovou senescenci. Působení JA urychluje senescenci. U rostlin *coi1*, které byly rezistentní na působení JA, to naznačuje existenci signálních drah JA v souvislosti se senescencí. Přepokládá se, že geny

*LOX11*, *LOX2* a *LOX3* vytváří signální dráhy pro tvorbu JA a tím dochází k urychlení senescence. (He et al. 2002).

V rámci mých experimentů bylo zjištěno, že indukovaná senescence probíhala obecně u *LOX* mutantů (obr. 5) mírně pomaleji než u listů WT (obr. 4). To potvrzuje teorii He et al (2002) o zapojení *LOX* genů do průběhu senescence. Zatímco na účinek 3MeOBAPA neměla absence genu *LOX* žádný vliv, v případě BAP byl jeho antisenesenční účinek u *LOX* vyšší než u WT. Senescence u mutantů *RBOHF* (obr. 6 a 10) probíhala pomaleji než v případě WT (obr. 4 a obr. 8), nicméně hodnoty  $F_V/F_M$  u listů *RBOHF* ošetřených 3MeOBAPA byly mírně nižší (obr. 10) a naopak obsah chl *a+b* vyšší (obr. 6) než v případě WT listů, což může naznačovat možné zapojení genu *RBOHF* v mechanismu účinku 3MeOBAPA. V případě listů *PRX33PRX34* byla senescence výrazně pomalejší než u ostatních genotypů (obr. 7 a 11), ale  $F_V/F_M$  u listů ošetřených 3MeOBAPA je srovnatelný s DMSO, z čehož vyplývá, že 3MeOBAPA nemá v případě *PRX33PRX34* výrazný antisenesenční účinek. V rámci této bakalářské práce nebylo provedeno dostatečné množství experimentů, které by umožňovalo jednoznačné zhodnocení efektu absence oxidázy na průběh senescence u listů ošetřených 3MeOBAPAA mechanismus účinku tohoto nově připraveného cytokininového derivátu.

## 6 Závěr

Senescence představuje konečnou vývojovou fázi rostliny. Tento proces je vysoce geneticky regulovaný a je ovlivnitelný řadou vnitřních i vnějších faktorů. Během senescence dochází k poklesu obsahu chlorofylu v listech a dochází k poklesu parametru  $F_v/F_m$ . Cytokininů se uplatňují v celé řadě vývojových procesů včetně senescence. Exogenní aplikací cytokininů lze pokles obsahu chl  $a+b$  a parametru  $F_v/F_m$  účinně zpomalit. Antisenescenční aktivita byla prokázána i u CK derivátů, jejichž schopnost oddálit senescenci je závislá na více faktorech, jako je chemická struktura, druh rostliny nebo metoda aplikace CK. Kučerová et al. (2020) zjistili, že dochází k akumulaci ROS na začátku působení cytokininového derivátu, ale následně při senescenci nedochází k žádnému oxidativnímu poškození. Proto v této bakalářské práci byl zkoumán efekt absence genů *LOX*, *RBHOF* a *PRX33PRX34* zapojených v produkci ROS na průběh senescence u oddělených listů *Arabidopsis thaliana* inkubovaných ve tmě v roztocích BAP a 3MeOBAPA, a to prostřednictvím stanovení obsahu chl  $a+b$  a parametru chlorofylové fluorescence  $F_v/F_m$ . Vlivem indukované senescence došlo u všech genotypů k výraznému poklesu obsahu chl  $a+b$  a parametru  $F_v/F_m$ , přičemž nejpomaleji senescence probíhala u listů *PRX33PRX34* a *RBOHF*. Inkubace oddělených listů v BAP i 3MeOBAPA měla za následek zachování obsahu chl  $a+b$  i funkčnosti PSII u listů WT, *LOX* a *RBOHF*. U listů *RBOHF* se antisenescenční účinek 3MeOBAPA lišil od ostatních genotypů, což může naznačovat zapojení *RBOHF* v mechanismu účinku 3MeOBAPA. V případě listů *PRX33PRX34* byl zaznamenán negativní efekt BAP a pouze minimální efekt 3MeOBAPA na funkčnost PSII. Pro jednoznačné zhodnocení zapojení *LOX*, *RBHOF* a *PRX33PRX34* v mechanismu účinku 3MeOBAPA by bylo potřeba provést další experimenty.

## 7 Literatura

- ABELES, Frederick B., Page W. MORGAN a Mikal E. SALTVEIT, 1992. *Ethylene in Plant Biology: Second Edition*. Academic Press, New York, U.S.A. 414 stran.
- ANANIEVA, Kalina, Jiří MALBECK, Miroslav KAMÍNEK a Johannes VAN STADEN, 2004. Methyl jasmonate down-regulates endogenous cytokinin levels in cotyledons of Cucurbita pepo (zucchini) seedlings. *Physiologia Plantarum*. **122**(4), 496–503.
- APEL, Klaus a Heribert HIRT, 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. **55**, 373–399.
- BAILEY-SERRES, Julia a Ron MITTLER, 2006. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*. **141**(2), 311.
- BECKER, Walter a Klaus APEL, 1993. Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta*. **189**(1) 74-79.
- BLOKHINA, Olga, Eija VIROLAINEN a Kurt V. FAGERSTEDT, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany*. **91**, 179-194.
- BRESSON, Justine, Stefan BIEKER, Lena RIESTER, Jasmin DOLL a Ulrike ZENTGRAF, 2018. A guideline for leaf senescence analyses: From quantification to physiological and molecular investigations. *Journal of Experimental Botany*. **69**(4), 769–786.
- DAT, J., S. VANDENABEELE, E. VRANOVÁ, M. VAN MONTAGU, D. INZÉ a F. VAN BREUSEGEM, 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **57**(5), 779–795.
- DHINDSA, Rajinder S., Pamela L. PLUMB-DHINDSA a David M. REID, 1982. Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiologia Plantarum*. **56**(4), 453–457.
- DOLEŽAL, Karel, Igor POPA, Eva HAUSEROVÁ, Lukáš SPÍČHAL, Kuheli CHAKRABARTY, Ondřej NOVÁK, Vladimír KRYŠTOF, Jiří VOLLER, Jan HOLUB a Miroslav STRNAD, 2007. Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **15**(11), 3737–3747.
- DRAKE, R., I. JOHN, A. FARRELL, W. COOPER, W. SCHUCH a D. GRIERSON, 1996. Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Molecular Biology*. **30**, 755–767 .
- Davies PJ. 1995. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- FINKEL, Toren, 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*. **194**(1), 7–15.
- FOREMAN, Julia, Vadim DEMIDCHIK, John H.F. BOTHWELL, Panaglota MYLONA, Henk MIEDEMA, Miguel ANGEL TORRES, Paul LINSTREAD, Silvia COSTA, Colin BROWNLEE, Jonathan D.G. JONES, Julia M. DAVIES a Liam DOLAN, 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. **22**(3), 442-446.
- GAN, Susheng a Richard M. AMASINO, 1995. CKs in senescence gan 1995. *Science*.

- GAN, Susheng a Richard M. AMASINO, 1997. Making sense of senescence: Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*. **113**(2), 313–319.
- HE, Yuehui, Hirotada FUKUSHIGE, David F. HILDEBRAND a Susheng GAN, 2002. Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiology*. **128**(3), 876–884.
- HENSEL, Linda L., Vojislava GRBIĆ, David A. BAUMGARTEN a Anthony B. BLEECKER, 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *Plant Cell*. **5**(5), 553–564.
- HOLUB, Jan, Jan HANUŠ, David E. HANKE a Miroslav STRNAD, 1998. Biological activity of cytokinins derived from Ortho- and Meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation*. **26**(2), 109–115.
- KÁMÁN-TÓTH, Evelin, Tamás DANKÓ, Gábor GULLNER, Zoltán BOZSÓ, László PALKOVICS a Miklós POGÁNY, 2019. Contribution of cell wall peroxidase- and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola*-induced oxidative burst in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*. **20**(4), 485–499.
- KAWAKAMI, Naoto a Akira WATANABE, 1988. Change in gene expression in radish cotyledons during dark-induced senescence. *Plant and Cell Physiology*. **29**(1), 33–42.
- KUCERA, Birgit, Marc Alan COHN a Gerhard LEUBNER-METZGER, 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*. **15**(4), 281–307.
- KUČEROVÁ, Zuzana, Marek RÁC, Jaromír MIKULÍK, Ondřej PLÍHAL, Pavel POSPÍŠIL, Magdaléna BRYKSOVÁ, Michaela SEDLÁŘOVÁ, Karel DOLEŽAL a Martina ŠPUNDOVÁ, 2020. The anti-senescence activity of cytokinin arabinosides in wheat and Arabidopsis is negatively correlated with ethylene production. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**(21), 1–18.
- LETHAM, D. S., 1963. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences*. **2**(8), 569–573.
- LIM, Pyung Ok, Hye Ryun WOO a Hong Gil NAM, 2003. Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. **8**(6), 272–278.
- LOHMAN, Karin N., Susheng GAN, Manorama C. JOHN a Richard M. AMASINO, 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum*. **92**(2), 322–328.
- MAJER, Petra, László SASS, Gábor V. HORVÁTH a Éva HIDEG, 2010. Leaf hue measurements offer a fast, high-throughput initial screening of photosynthesis in leaves. *Journal of Plant Physiology*. **167**(1), 74–76. ISSN 01761617.
- MAKINO, Amane a Barry OSMOND, 1991. Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology*. **96**(2) 355–362.
- MATTOO, Autar K. a Nehemia AHARONI, 1988. Ethylene and Plant Senescence. In: *Senescence and Aging in Plants*. 241–280.
- MITTLER, Ron, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant*

*Science*. **7**(9), 405–410.

MOK, David W.S. a Machteld C. MOK, 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Biology*. **52**, 89-118.

MOK, Machteld C., Ruth C. MARTIN, Petre I. DOBREV, Radomira VANKOVÁ, P. Shing HO, Yonekura Sakakibara KEIKO, Hitoshi SAKAKIBARA a David W.S. MOK, 2005. Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiology*.

NAM, Hong Gil, 1997. The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology*. **8**(2), 200–207.

NOCTOR, Graham a Christine H. FOYER, 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annual Review of Plant Biology*. **49**, 249–279.

NOH, Yoo Sun a Richard M. AMASINO, 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology*. **41**(2), 181–194.

NOODÉN, L.D., 1988. The Phenomena of Senescence and Aging. In: *Senescence and Aging in Plants*. 1-50.

NOODÉN, Larry D., Juan J. GUIAMÉT a Isaac JOHN, 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*. **101**(4) 746-753.

O'BRIEN, Jose A., Arsalan DAUDI, Paul FINCH, Vernon S. BUTT, Julian P. WHITELEGGE, Puneet SOUDA, Frederick M. AUSUBEL a G. Paul BOLWELL, 2012. A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiology*. **158**(4), 2013–2027.

ONO, Kiyomi, Haruki HASHIMOTO a Sakae KATOH, 1995. Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant and Cell Physiology* . **36**(1), 9–17.

PEOPLES, Mark B. a Michael J. DALLING, 1988. The Interplay between Proteolysis and Amino Acid Metabolism during Senescence and Nitrogen Reallocation. In: *Senescence and Aging in Plants* Academic Press, 181-217.

PITERKOVÁ, Jana, Kateřina TOMÁNKOVÁ, Lenka LUHOVÁ, Marek PETŘIVALSKÝ a Pavel PEČ, 2005. Oxidative stress: Localisation of reactive oxygen species formation and degradation in plant tissue. *Chemické Listy*.

PLATT-ALOIA, K. A. a W. W. THOMSON, 1987. Freeze fracture evidence for lateral phase separations in the plasmalemma of chilling-injured avocado fruit. *Protoplasma*. **136**, 71–80.

PLÍHALOVÁ, Lucie, Hana VYLÍČILOVÁ, Karel DOLEŽAL, Lenka ZAHAJSKÁ, Marek ZATLOUKAL a Miroslav STRNAD, 2016. Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology*. **33**(5), 614–624.

QUIRINO, Betania F., Yoo Sun NOH, Edward HIMELBLAU a Richard M. AMASINO, 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science*. **5**(7), 278–282.

ROHÁČEK, K. a M. BARTÁK, 1999. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence:

- Basic concepts, useful parameters, and some applications. **37**(3), 339-363.
- RULCOVÁ, J. a J. POSPÍŠILOVÁ, 2001. Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biologia Plantarum*. **44**(1) 75-81.
- RYU, Stephen B. a Xuemin WANG, 1995. Expression of phospholipase D during castor bean leaf senescence. *Plant Physiology*. **108**(2), 713–719.
- SABATER, B. a M. a.T. RODRIGUEZ, 1978. Control of Chlorophyll Degradation in Detached Leaves of Barley and Oat through Effect of Kinetin on Chlorophyllase Levels. *Physiologia Plantarum*, **43**(3) 274-276.
- SCHIEBER, Michael a Navdeep S. CHANDEL, 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. **24**(10), R453–R462.
- SCHROEDER, Julian I., Gethyn J. ALLEN, Veronique HUGOUVIEUX, June M. KWAK a David WANER, 2001. Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. **52**, 627-658.
- SCHULZ, Philipp, Jenny NEUKERMANS, Katrien VAN DER KELEN, Per MÜHLENBOCK, Frank VAN BREUSEGEM, Graham NOCTOR, Markus TEIGE, Michael METZLAFF a Matthew A. HANNAH, 2012. Chemical PARP inhibition enhances growth of arabidopsis and reduces anthocyanin accumulation and the activation of stress protective mechanisms. *PLoS ONE*, **7**(5).
- ŠPUNDOVÁ, Martina, Hana POPELKOVÁ, Petr ILÍK, Jiří SKOTNICA, Radko NOVOTNÝ a Jan NAUŠ, 2003. Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology*. **160**(9), 1051–1058.
- STEWART, Jodi L. a Jennifer L. NEMHAUSER, 2010. *Do trees grow on money? Auxin as the currency of the cellular economy*.
- TAYLOR, C. B., P. A. BARIOLA, S. B. DELCARDAYRE, R. T. RAINES a P. J. GREEN, 1993. RNS2: A senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**(11), 5118-5122.
- THOMAS, HOWARD, JOHN L. STODDART a J. F. POTTER, 1980. Temperature responses of membrane-associated activities from spring and winter oats. *Plant, Cell & Environment*. **3**(4) 271-277.
- UMATE, Pavan, 2011. Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in arabidopsis and rice. *Plant Signaling and Behavior*. **6**(3), 335–338.
- VLČKOVÁ, Alexandra, Martina ŠPUNDOVÁ, Eva KOTABOVÁ, Radko NOVOTNÝ, Karel DOLEŽAL a Jan NAUŠ, 2006. Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum*. **126**(2), 257–267.
- WEAVER, Louis M., Susheng GAN, Betania QUIRINO a Richard M. AMASINO, 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology*. **37**(3), 455–469.
- YOSHIDA, S., M. ITO, I. NISHIDA a A. WATANABE, 2001. Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in Arabidopsis

thaliana. *Plant and Cell Physiology*. **42**(2), 170–178.

ZAMAN, Nadzariah Kamarul, Mohd Yusoff ABDULLAH, Sariam OTHMAN a Nadzirah Kamarul ZAMAN, 2018. Growth and Physiological Performance of Aerobic and Lowland Rice as Affected by Water Stress at Selected Growth Stages. *Rice Science*. **25**(2), 82–93.

ZHAO, P., N. ZHANG, Z. J. YIN, Y. D. LIU a F. F. SHEN, 2013. Analysis of differentially expressed genes in response to endogenous cytokinins during cotton leaf senescence. *Biologia Plantarum*. **57**(3), 425–432.



## 8 Seznam používaných zkratek

3MeOBAPA	6-(3-methoxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-arabinofuranosylpurin
3OHBAPA	6-(3-hydroxybenzylamino)-9- $\beta$ -D-arabinofuranosylpurin
ABA	kyselina abscisová
AHK3	<i>Arabidopsis histidine kinase 3</i>
BR	brassinosteroidy
CK	cytokininy
CRE1/AHK4	<i>cytokinin response 1/ Arabidopsis histidine kinase 3</i>
CPPU	(2-chloro-pyridin-4-yl)-N'-fenylmočovina
cZ	<i>cis</i> -zeatin
F <sub>0</sub>	minimální fluorescence chlorofylu (vzorek adaptovaný na tmu)
F <sub>M</sub>	maximální fluorescence chlorofylu (vzorek adaptovaný na tmu)
iP	isopentenyladenin
DMSO	dimethylsulfoxid
BAP	6-benzylaminopurin
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
GA	gibereliny
Chl	chlorofyl
IPT	isopentenyltransferasa
JA	kyselina jasmínová
K	kinetin
MeJA	methyljasmonát
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> , fotosynteticky aktivní záření
PCD	<i>programmed cell death</i> , programovaná buněčná smrt
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SAG	senescence associated genes, geny spojené se senescencí
tZ	<i>trans</i> -zeatin
TDZ	thidiazuron