

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský  
výzkum**



**Vliv derivátů cytokininů odvozených od močoviny na změny  
fotosyntetických parametrů během indukované senescence**

Autor:

Bc. Zuzana Kučerová

Studijní obor:

Fyziologie rostlin

Vedoucí práce:

RNDr. Martina Špundová, Ph.D.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Zuzana Kučerová
Název práce	Vliv derivátů cytokininů odvozených od močoviny na změny fotosyntetických parametrů během indukované senescence
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Klíčová slova	Cytokininy, pšenice, senescence, fotosyntéza, fluorescenční imaging, světlo
Počet stran	74
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Zuzana Kučerová
Title of thesis	Effect of phenylurea cytokinin derivatives on photosynthetic changes during induced senescence
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Keywords	Cytokinins, wheat, senescence, photosynthesis, fluorescence imaging, light
Number of pages	74
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a pod vedením RNDr. Martiny Špundové, Ph.D.

V Olomouci dne:.....

Podpis:.....

Za trpělivost, věnovaný čas a cenné rady při realizaci této diplomové práce děkuji RNDr. Martině Špundové, Ph.D, za veškerou poskytnutou pomoc Pavle Ocvirkové a Mgr. Heleně Melkovičové a Mgr. Lukáši Noskovi za provedení nativní elektroforézy pigment proteinových komplexů z thylakoidních membrán. Za zázemí, podporu a pomoc poskytnutou během celého mého studia děkuji svým rodičům a manželovi.

## Abstrakt

Senescence je přirozeným a vysoce organizovaným procesem probíhajícím v rostlinném organismu, který lze oddálit exogenní aplikací cytokininů a jejich derivátů. Cytokiny jsou negativními regulátory senescence, ale jejich vysoké koncentrace v kombinaci s vysokou ozářeností mohou proces senescence urychlit. V této práci byl studován vliv *trans*-zeatinu, N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu a thidiazuronu a dvou nových fenylnmočovinyových derivátů s označením UR21 a TDZ-CZ-OMe na průběh indukované senescence u oddělených listových segmentů pšenice. Cytokiny a cytokininové deriváty byly použity v koncentracích 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup> a jejich vliv byl posuzován při různých světelných podmínkách – ve tmě a při PAR o intenzitě 100 a 300 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Průběh senescence byl sledován na základě obsahu chlorofylu, fotochemického reflektančního indexu (PRI) a parametrů chlorofylové fluorescence měřených šestý a devátý den po oddělení listů. S výjimkou *trans*-zeatinu všechny použité látky zpomalily změny měřených parametrů odrážející postupnou inhibici fotosyntetického aparátu, a to zejména ve tmě. Ve většině případů nebyla pozorována koncentrační závislost účinku látek. Výjimkou bylo působení UR21, kdy byla v případě nejnižší použité koncentrace (10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>) pozorována nízká účinnost ve tmě u všech sledovaných parametrů a při použití nejvyšší koncentrace (10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>) na PAR byl pozorován negativní efekt na parametry chlorofylové fluorescenční indukce. U jiných látek tento negativní efekt pozorován nebyl. Při vzájemném srovnání obou derivátů působil ve tmě TDZ-CZ-OMe účinněji na zpomalení poklesu obsahu chlorofylu, PRI a F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, v případě ostatních parametrů a variant bylo působení obou derivátů srovnatelné (kromě negativního efektu UR21 na PAR). Působení TDZ-CZ-OMe bylo kvalitativně i kvantitativně podobné působení thidiazuronu.

## Summary

Senescence is naturally occurring and highly organised ongoing process in plant organism which can be delayed by exogenous application of cytokinins and its derivatives. Cytokinins are negative regulators of senescence but their high concentrations combined with high irradiation can accelerate senescence. In this work effect of *trans*-zeatin, thidiazuron and N<sup>6</sup>-benzylaminopurine and two novel phenylurea derivatives UR21 and TDZ-CZ-OMe on induced senescence was investigated in detached wheat leaves. Cytokinins and its derivatives were applied on the leaves at concentrations 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> and 10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup> and the leaves were incubated in dark or under photosynthetically active radiation of two intensities (100 and 300 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). The extent of senescence was quantified by chlorophyll content, photochemical reflectance index and chlorophyll fluorescence parameters measured on 6<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> day after detachment. Except of *trans*-zeatin all used cytokinins and its derivatives slowed changes of measured parameters reflecting the gradual inhibition of photosynthetic apparatus, especially in the dark. In most cases concentration-dependence of the effect of substances was not observed. The exception was the effect of UR21 derivative, the lowest concentration (10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>) showed low efficacy in all measured parameters in the dark and the highest concentration (10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>) under PAR showed negative effect on the parameters of the chlorophyll fluorescence induction. For other substances the negative effect was not observed. When comparing the two novel cytokinin derivatives, TDZ-CZ-OMe was more effective in deceleration of the decrease in chlorophyll content, PRI and F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> in the dark. In the case of other parameters and light regimes effects of both derivatives were comparable (except of the negative effect of UR21). Action of TDZ-CZ-OMe was similar to thidiazuron.

## Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
ARF	<i>auxin responsive factor</i> , auxinový transkripční faktor
BAP	N <sup>6</sup> -benzylaminopurin
CK	cytokinin, cytokininový
CKX	cytokinin oxygenasa/dehydrogenasa
CPPU	N-(2-chloro-pyridin-4-yl)-N'-fenylmočovina
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>de novo</i>	nově, od začátku
dpo	dny po oddělení
DPU	difenylmočovina
HMBPP	4-hydroxy-3-methyl-2( <i>E</i> )-butenyldifosfát
F <sub>0</sub>	minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F <sub>m</sub>	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F' <sub>m</sub>	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na světlo
F <sub>t</sub>	fluorescence v čase t při aktinickém světle
Φ <sub>f,D</sub>	kvantový výtěžek konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení
Φ <sub>NPQ</sub>	kvantový výtěžek regulačního nefotochemického zhášení
Φ <sub>P</sub>	aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII vzorků adaptovaných na světlo
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII
<i>in vitro</i>	mimo živé tělo, ve zkumavce
iP	N <sup>6</sup> -(2-isopentenyl)adenin
IPT	isopentenyltransferasa
LHCII	<i>light harvesting complexes II</i> , světlosběrné komplexy fotosystému II
mT	<i>meta</i> -topolin
MEP	methylerythritolfosfát
NPQ	nefotochemické zhášení
oT	<i>ortho</i> -topolin



PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> , fotosynteticky aktivní záření
PRI	fotochemický reflektanční index
P <sub>SAG12</sub>	promotor genu SAG12
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
qP	fotochemické zhášení
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa
SAG	<i>senescence-associated genes</i> , geny aktivované při senescenci
TDZ	thidiazuron, N-fenyl-N'-(1,2,3-thidiazol-5-yl)močovina
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TDZ-CZ-OMe	fenylmočovinný derivát
UR21	fenylmočovinný derivát
100	varianta vzorků oddělených listů inkubovaných při PAR 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
300	varianta vzorků oddělených listů inkubovaných při PAR 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
4-PU-30	1-(2-chloropyridin-4-yl)-3-fenylmočovina

# Obsah

1 Úvod.....	12
2 Cíle práce .....	13
3 Současný stav řešené problematiky .....	14
3.1 Senescence.....	14
3.1.1 Faktory ovlivňující senescenci .....	17
3.2 Cytokininy .....	20
3.2.1 Struktura cytokininů.....	21
3.2.2 Biosyntéza a degradace cytokininů.....	22
3.2.3 Cytokininové receptory .....	24
3.3 Cytokininy a senescence.....	26
3.3.1 Cytokininové deriváty .....	29
4 Materiál a metody .....	32
4.1 Rostlinný materiál .....	32
4.2 Použité metody .....	33
4.2.1 Měření fotochemického reflektančního indexu .....	33
4.2.2 Měření obsahu chlorofylu .....	33
4.2.3 Parametry chlorofylové fluorescence.....	34
4.3 Statistické zpracování dat .....	35
4.4 Grafické zpracování dat.....	35
5 Výsledky .....	36
5.1 DMSO.....	36
5.2 <i>trans</i> -Zeatin .....	37
5.3 Thidiazuron.....	42
5.4 TDZ-CZ-OMe .....	46
5.5 UR21.....	50

5.6 N <sup>6</sup> -benzylaminopurin .....	55
6 Diskuze .....	59
7 Závěr .....	63
8 Literatura.....	64

# 1 Úvod

Senescence je přirozeným a vysoce organizovaným procesem probíhajícím v rostlinném organismu. Jedná se o konečnou fázi vývoje rostlin, která je řízena genetickým programem rostliny a současně regulována vnějšími podmínkami. Právě změnou vnějších faktorů je mimo jiné možné tento proces indukovat. V průběhu senescence v rostlinné buňce dochází k celé řadě strukturních a metabolických změn, např. k aktivaci či inaktivaci příslušných genů, změnám v buněčné kompartmentaci, degradaci membránových lipidů, proteinů a nukleových kyselin, změnám tvaru a rozpadu chloroplastů a s tím souvisejícímu poklesu rychlosti fotosyntézy. Viditelným projevem senescence je změna zbarvení listů, zejména jejich žloutnutí.

Cytokininů jsou skupinou rostlinných hormonů, které hrají důležitou roli ve vývoji a růstu rostlin. Jsou nezbytné pro buněčné dělení, ovlivňují habitus rostliny - snižují apikální dominanci, inhibují prodlužování buněk kořene či stimulují tvorbu karotenoidů. Těchto jejich vlastností je využíváno např. při vývoji ekologických hnojiv, jejichž aplikace umožňuje zvýšení výnosů zemědělských plodin při minimálním zatížení životního prostředí. Velice podstatnou vlastností cytokininů je jejich schopnost oddalovat senescenci. Zatímco jiné fytohormony jako ethylen nebo kyselina abscisová jsou považovány za promotory senescence, cytokininů jsou jejími negativními regulátory. Působení cytokininů má v rámci senescence za následek např. potlačení strukturních změn chloroplastů a s tím související zpomalení poklesu obsahu chlorofylu. Při působení v kombinaci s vysokou ozářeností či ve vysokých koncentracích mohou ale naopak senescenci urychlit.

V rámci této práce byl srovnáván vliv cytokininů trans-zeatinu, thidiazuronu a N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu a cytokininových derivátů UR21 a TDZ-CZ-OMe odvozených od fenylničoviny na průběh senescence u listových segmentů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) během indukované senescence. Průběh senescence byl sledován na základě obsahu chlorofylu, fotochemického reflektančního indexu a parametrů chlorofylové fluorescence.

## 2 Cíle práce

1. Vypracovat přehled problematiky vlivu cytokininů na senescenci zaměřený na srovnání vlivu různých typů cytokininů a jejich derivátů.
2. Zvládnout metodiky pěstování a navození indukované senescence listů modelových rostlin, stanovení obsahu chlorofylů pomocí chlorofylmetru SPAD a chlorofylové fluorescenční indukce pomocí přístroje FluorCam včetně analýzy dat, vyhodnocování parametrů a zpracování obrázků.
3. Provést měření obsahu chlorofylu a chlorofylové fluorescenční indukce u oddělených listů modelových rostlin během indukované senescence pod vlivem různých derivátů cytokininů.
4. Na základě získaných výsledků zhodnotit vliv různých derivátů cytokininů na změny fotosyntetických parametrů během indukované senescence.

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Senescence

Senescence je vysoce řízeným vývojovým procesem programované degradace vedoucí ke smrti, který je iniciován různými vnitřními a vnějšími faktory. Během tohoto procesu zůstávají buňky životaschopné a dochází k expresi specifických genů. (Smart 1994). Senescence však rovněž zahrnuje některé děje typické pro programovanou buněčnou smrt jako je například kondenzace jaderného chromatinu (Simeonova a kol. 2000) nebo fragmentace DNA (Coupe a kol. 2004). Listová senescence je finální fází vývoje listu (Gan a Amasino 1997), která je provázena transportem dusíku, uhlíku a minerálů ze senescentního listu do jiných částí rostliny a při níž dochází k zastavení fotosyntézy, rozpadu chloroplastů a proteinů společně s poklesem obsahu chlorofylu a aminokyselin (např. Buchanan-Wollaston 1997, Hörtensteiner a Feller 2001). Fotosyntéza je tedy nahrazena procesy katabolickými, degradací chlorofylu a proteinů, membránových lipidů a RNA, čímž je umožněna recyklace živin a stavebních látek z těchto struktur a jejich využití v jiných částech rostliny (Gan a Amasino 1997). Viditelným projevem senescence a jedním z jejích indikátorů je pak změna barvy listu, zpravidla žloutnutí, vyvolaná degradací chlorofylu (Noodén a kol. 1997). Chlorofyl však není jediným rostlinným pigmentem, k jehož degradaci v průběhu přirozené i indukované senescence dochází. Degradovány jsou rovněž karotenoidy – karoteny a xantofyly, ale v případě chlorofylu probíhá rozklad zpravidla ve větší míře, což má za následek žluté zbarvení senescentních listů (Biswal 1995). V průběhu senescence dochází také ke změně tvaru chloroplastů z elipsoidního na sférický, změně v organizaci thylakoidních membrán a akumulaci plastoglobulí (např. Vlčková a kol. 2006).

Jedním z prvních projevů senescence je akumulace reaktivních forem kyslíku, které společně s proteolytickými enzymy způsobují degradaci proteinů, zejména velké podjednotky ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxygenasy (Rubisco), která je během senescence selektivně degradována (Desimone a kol. 1996, Desimone a kol. 1998, Khanna-Chopra 2012). Přítomnost zvýšeného množství reaktivních forem kyslíku (ROS) v senescentních pletivech může mít dvě příčiny, jejich zvýšenou produkci či pokles efektivity nejrůznějších obranných mechanismů, které normálně tvorbu a množství ROS redukuje a poskytují tak ochranu proti oxidativnímu poškození (Thompson a kol. 1987).

V průběhu listové senescence dochází ke kumulativní membránové degradaci způsobené zvýšenou lipidovou peroxidací, která je řízena mimo jiné aktivitou superoxid dismutasy a katalasy (Dhindsa a kol. 1981, Zimmermann a Zentgraf 2005). Membránová deteriorace má za následek zvýšení permeability membrán a snížení funkčnosti membránových proteinů (Thompson a kol. 1998). Spojitostí mezi oxidativním stresem a stárnutím rostlin se zabývali Munné-Bosch a Allegre (2002). V průběhu stárnutí dochází k progresivnímu nárůstu oxidativního poškození v chloroplastech a k inhibici fotosyntézy. Munné-Bosch a Allegre (2002) došli k následujícím poznatkům o oxidativním poškození: je spojeno se stárnutím rostlin před nástupem senescence, k jeho akumulaci dochází postupně, čím je rostlina starší, tím více je její stárnutí oxidativním stresem ovlivněno a k jeho působení v rámci stárnutí dochází, mimo jiné, v chloroplastech (Munné-Bosch a Allegre 2002). Souhrnně je tedy senescence charakteristická zastavením fotosyntézy, rozpadem organel, degradací chlorofylu a proteinů společně se zvýšením lipidové peroxidace a propustnosti membrán (Buchanan-Wollaston 1997, Río a kol. 1998).

Energie fotonů absorbovaná anténním systémem fotosystému II (PSII) je dále distribuována třemi možnými cestami: fotochemickou, fluorescenční a termální disipací. Tyto procesy si vzájemně konkurují, kdy pokles jednoho znamená vzrůst zastoupení jiného (např. Roháček a Barták 1999, Lazár 2015). Změny fotosyntézy indukované senescencí lze stanovit na základě změn parametrů chlorofylové fluorescence jako je maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII označovaný jako  $F_v/F_m$ . Jedná se o nejčastěji používaný fluorescenční parametr, měří se u vzorků adaptovaných na tmou, přičemž je využíván jako indikátor fotoinhibice či jiného poškození PSII.  $F_v/F_m$  je výrazně redukován u stresovaných rostlin a s postupující senescencí klesá. (Roháček a Barták 1999, Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006, Prokopová a kol. 2010). Dalšími používanými parametry jsou fotochemické (qP) a nefotochemické zhášení (NPQ) fluorescence chlorofylu, které se měří při přechodu listů ze stavu adaptovaného na tmou do stavu adaptovaného na fotosynteticky aktivní záření (PAR). Parametr qP, který odráží fungování fotochemie, během senescence postupně klesá. Parametr NPQ, který odráží míru disipace absorbované energie na teplo, v průběhu senescence nejprve narůstá a v poslední fázi života listů klesá (Roháček a Barták 1999, Roháček 2002, Dai a kol. 2004, Hendrickson a kol. 2004). Tepelná disipace energie je velmi efektivní proces ochrany fotosyntetického aparátu proti fotopoškození. Pokud nemůže být absorbovaná energie využita pro syntézu, dochází k nárůstu acidifikace lumenu, která aktivuje nefotochemické zhášení. Na počátku senescence zpravidla dochází

k nárůstu nefotochemického zhášení souvisejícího s xantofylovým cyklem, s postupující senescencí však účinnost tohoto procesu klesá a tudíž klesá i ochrana před fotopoškozením (Dai a kol. 2004). Mezi parametry chlorofylové fluorescence používané při studiu stresu se řadí také aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), který ukazuje, jak velké množství energie absorbované anténami PSII je přeměněno na fotochemickou energii (Kalaji a kol. 2014). Tento parametr v průběhu senescence poměrně výrazně klesá (Dai a kol. 2004) a může být substituován parametrem  $\Phi_P$ , označovaným jako aktuální či efektivní kvantový výtěžek fotochemie PSII vzorků adaptovaných na světlo (Hendrickson a kol. 2004, Lazár 2015). Kvantový výtěžek konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{f,D}$ ) udává, jak velká část absorbované energie je ztracena konstitutivní tepelnou disipací a fluorescencí, přičemž větší část tvoří tepelná disipace (Hendrickson a kol. 2004). Bylo zjištěno, že parametr  $\Phi_{PSII}$  pozitivně koreluje s tzv. fotochemickým reflektančním indexem (PRI), který zároveň odráží i aktivitu výše zmíněného xantofylového cyklu (např. Gamon a Bond 2013). Index PRI koreluje také s poklesem obsahu chlorofylu (Gamon a Surfus 1999). Obecně lze tedy říci, že PRI při senescenci klesá, i když příčiny tohoto poklesu mohou být různé nebo se mohou vzájemně různě kombinovat.

Nezastupitelnou úlohu v procesu senescence mají geny označované jako SAG (*senescence-associated genes*), které byly izolovány a identifikovány v celé řadě rostlinných druhů a jejichž produkty ve většině případů plní enzymatickou funkci (Gan a Amasino 1997). SAG lze definovat jako geny, jejichž exprese se během přirozené listové senescence, v porovnání s ostatními vývojovými fázemi listu, zvyšuje (Nam 1997). Bylo prokázáno, že oxidativní stres je jednou z příčin exprese SAG (Buchanan-Wollaston 1994, Navabpour a kol. 2003). Některé ze SAG jsou z důvodu své vysoké specifity pro senescenci využívány jako senescenční markery, jedná se např. o SAG12 z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) (Gan a Amasino 1995) nebo LS54 z brukve řepky olejky (*Brassica napus* L.), který je možné využívat také pro detekci oxidativního stresu u rostlin (Navabpour a kol. 2003).



### 3.1.1 Faktory ovlivňující senescenci

Listová senescence je ovlivněna celou řadou faktorů, které lze rozdělit na vnitřní a environmentální. Mezi faktory vnitřní se řadí např. hladiny rostlinných hormonů a růstových regulátorů, reprodukce, stáří rostliny nebo její fyziologický stav. Environmentální faktory pak zahrnují fotosynteticky aktivní záření (PAR), teplotu, dostupnost vody, množství živin či infekci patogeny. Při překročení metabolického prahu těchto signálů dochází k expresi SAG, což má za následek spuštění senescence v rostlinném organismu a případně i jeho úhyn (Smart 1994, Weaver a kol. 1998, Guo a Gan 2005).

Mezi nejvýznamnější environmentální faktory ovlivňující senescenci se řadí PAR (např. Smart 1994). Vliv světla na indukovanou senescenci oddělených listů ječmene (*Hordeum vulgare* L.) studovali Špundová a kol. (2005). Zatímco u segmentů uchovávaných při kontinuálním bílém PAR ( $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se hodnoty obsahu chlorofylu i fotochemie PSII ( $F_v/F_m$ ) během inkubace příliš nezměnily, u segmentů uchovávaných ve tmě byl pozorován jejich výrazný pokles. Bylo tedy zaznamenáno výrazné oddálení senescence vlivem PAR (Špundová a kol. 2005). Působení PAR na senescenci je však silně závislé na jeho intenzitě (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006) či na celistvosti rostlin (Weaver a Amasino 2001). Oddělení listů od rostliny a jejich inkubace ve tmě je jedním z nejsilnějších induktorů senescence. (Weaver a kol. 1998). Rozdílný vliv PAR na senescenci byl pozorován u oddělených listů a u celistvých rostlin *Arabidopsis thaliana* L. Zatímco při oddělení listů a jejich umístění do tmy došlo k indukci senescence, v případě celistvých rostlin umístěných do tmy senescence indukována nebyla (nebyla patrná degradace chlorofylu ani exprese SAG). Naopak tma v případě celistvých rostlin může senescenci oddalovat. Pokud jsou ale některé listy na rostlině zakryté a rostlina samotná je vystavena PAR, dojde k indukci senescence v zakrytých částech rostliny (tj. k degradaci chlorofylu a expresi SAG). Tyto výsledky naznačují, že senescence individuálního listu je závislá na tom, v jakých světelných podmínkách se nachází samotná rostlina (Weaver a Amasino 2001).

Obecně lze říci, že listy zůstávají déle zelené na PAR než ve tmě, ale při vystavení nadměrné ozáření dochází ke žloutnutí listů vyvolanému fotoinhibicí a degradací chlorofylu (Smart 1994). Vyšší světelné dávky způsobují, že k senescenci dojde dříve než při ozáření nižší dávkou PAR (Noodén a kol. 1996). Okada a kol. (1992) pozorovali

u oddělených listů rýže (*Oryza sativa* L.) umístěných tři dny ve tmě degradaci chlorofylu a proteinů thylakoidní membrány. Ozáření listových segmentů kontinuálním PAR o nízké intenzitě (do  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) degradaci potlačilo. Při použití intenzity PAR vyšší než  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  tento efekt s rostoucí intenzitou světla klesal (Okada a kol. 1992). Působení PAR může mít za následek zvýšení lipidové peroxidace a rizika fotooxidativního poškození včetně fotodestrukce pigmentových molekul. Špundová a kol. (2003) pozorovali u oddělených listů ječmene negativní efekt kontinuálního PAR o intenzitě  $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  na strukturální změny v chloroplastech indukované senescencí a velmi vysokou lipidovou peroxidací u ozářených listových segmentů. Zároveň byl ale zaznamenán výrazně pozitivní efekt světla na zachování funkčnosti fotosystému II (Špundová a kol. 2003). Mae a kol. (1993) srovnávali obsah fotosyntetických proteinů u ozářených a zastíněných listů jílku mámivého (*Lolium temulentum*, L.). U listů ozářených  $360 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR byl pozorován postupný pokles obsahu fotosyntetických proteinů, např. Rubisco, proteinu 65 kDa fotosystému I (PSI), cytochromu *f* nebo světlosběrných komplexů PSII (LHCII). U zastíněných listů zaznamenali zpoždění poklesu obsahu LHCII a proteinu 65 kDa PSI až do pozdních fází senescence, ale v případě cytochromu *f* došlo k prudkému poklesu jeho obsahu bezprostředně po zastínění. Tyto výsledky naznačují, že obsah chloroplastových proteinů je regulován individuálně tak, aby během senescence došlo k přizpůsobení fotosyntézy na dané světelné podmínky (Mae a kol. 1993). Působení PAR na senescenci souvisí také s metabolismem peroxidu vodíku. Při senescenci na PAR dochází k akumulaci peroxidu vodíku vlivem poklesu obsahu kalatasy, která je zodpovědná za odbourávání  $\text{H}_2\text{O}_2$ . U listů vystavených světlu byl pozorován nárůst obsahu malondialdehydu, markeru lipidové peroxidace, ale nebylo pozorováno zvýšení propustnosti membrán. Tato zjištění naznačují, že na PAR dochází k peroxidaci lipidových rezerv, která funguje jako detoxikační mechanismus a má za následek ochranu membrán a oddálení senescence (Chang a Kao 1998).

Jedním z významných vnitřních faktorů ovlivňujících senescenci jsou rostlinné hormony a regulátory. Zatímco cytokininy jsou zapojeny v oddálení senescence a jejich vliv v tomto procesu je popsán samostatně v kapitole 3.3, nezanedbatelnými činiteli jsou i ostatní rostlinné hormony jako gibbereliny, auxiny, ethylen či jasmonáty. Stejně jako cytokininy i gibbereliny senescenci oddalují (např. Jordi a kol. 1995). Ethylen ovlivňuje listovou senescenci opačně než cytokininy, tedy stimuluje procesy spojené se senescencí (Smart 1994). Vztahem mezi listovou senescencí a ethylenem u *Arabidopsis thaliana* L. se

zabývali např. Grbić a Bleecker (1995) s použitím mutantů *etr1-1* necitlivých k ethylen. Bylo zjištěno, že *etr1-1* žije o 30 % déle než *wild-type* rostliny. U *wild-type* rostlin exogenní aplikace ethylen urychlila indukci exprese SAG, zatímco u mutantních rostlin byla indukce exprese SAG zpožděná vlivem jejich necitlivosti k ethylen, což mělo za následek zpoždění senescence. Ethylen není nezbytně nutný pro proces senescence jako takový, podílí se pouze na načasování jeho nástupu (Grbić a Bleecker 1995).

V průběhu senescence dochází ke zvýšení endogenní hladiny kyseliny jasmonové. Její exogenní aplikace způsobila předčasný nástup senescence u oddělených i neoddělených listů *Arabidopsis thaliana* L. (He a kol. 2002). Stejně jako ethylen, sucho, tma nebo oddělení listů je i kyselina abscisová (ABA) obecně považována za faktor vyvolávající senescenci a viditelné žloutnutí listů. ABA není tak efektivní v samotné indukci senescence jako ostatní faktory, je však schopná urychlit senescenci u rostlin, u kterých již tento proces začal (Weaver a kol. 1998). Vliv auxinů na senescenci ještě nebyl zcela objasněn, i když jsou obecně považovány spíše za její supresory. Roli auxinů v procesu senescence studovali např. Kim a kol. (2011), a to za pomoci transgenních rostlin *yuc6-ID* se zvýšenou expresí flavin-monooxygenasových proteinů YUCCA6 zapojených v *de novo* biosyntéze auxinů. Tito mutantů produkovali zvýšené množství volných auxinů, čemuž odpovídal i jejich fenotyp, zároveň u nich došlo k oddálení senescence indukované tmou a rostlinnými hormony. Pokud byla u těchto mutantů spojená nadměrná exprese YUCCA6 s mutací ve vazebném místě pro NADPH, k žádnému z uvedených jevů nedošlo, stejně jako v případě konjugace volného auxinu s lysinem. Vzhledem k tomu, že u mutantů *yuc6-ID* byl současně s vyšší hladinou volných auxinů pozorován také nižší obsah transkriptů SAG, dospěli autoři k názoru, že se volné auxiny podílí na oddálení senescence tím, že přímo či nepřímo regulují expresi SAG (Kim a kol. 2011). Navzdory tomu Lim a kol. (2010) prokázali, že ARF2 (*auxin responsive factor*), který se podílí na regulaci genové exprese indukované auxinem, je pozitivním regulátorem senescence (urychluje senescenci) u *Arabidopsis thaliana* L. (Lim a kol. 2010).

## 3.2 Cytokininy

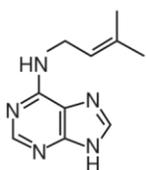
Cytokininy (CK) jsou evolučně staré a velmi konzervativní látky, které byly identifikovány téměř ve všech známých organismech (Spíchal 2012). Prvním objeveným cytokininem byl kinetin, a to v 50. letech 20. století v autoklávovaném sledím spermatu (Miller a kol. 1955). Prvním objeveným rostlinným cytokininem byl pak *trans*-zeatin (tZ) v nezralém endospermu kukuřice v 60. letech 20. století (Letham a Miller 1965). U rostlin se CK vyvinuly ve velice důležitou skupinu rostlinných hormonů, které ovlivňují celou řadu vývojových a fyziologických procesů (Spíchal 2012) jako je buněčné dělení, vznik a regenerace orgánů, apikální dominance, de-etiolizace, metabolismus živin, obrana vůči patogenům a listová senescence (např. Mok a Mok 2001). Limitujícím faktorem působení cytokininů v rostlinném organismu je jejich dostupnost ve vhodné koncentraci ve správný čas a na správném místě pro interakci se specifickým receptorem (Frébort a kol. 2011).

Velice podstatné je zapojení cytokininů ve vztazích mezi rostlinami a mikroorganismy. Cytokininový receptor CRE1 hraje velmi důležitou roli v symbiotické interakci rostlin *Medicago truncatula* L. s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, která má za následek nodulaci a fixaci dusíku. U rostlin s nefunkčními receptory CRE1 byla pozorována výrazná redukce nodulace (Gonzales-Rizzo a kol. 2006). V obraně proti patogenům jsou velice důležité nejen enzymy regulující obsah endogenních cytokininů, ale lze k ní využít i exogenní aplikace cytokininů na napadené rostliny. Zvýšená exprese genů pro cytokinin oxygenasu/dehydrogenasu, enzym katalyzující degradaci cytokininů, byla pozorována po infekci rostlin bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, která produkuje cytokininy na podporu růstu *crown gall* nádorů (např. Werner a kol. 2006, Novák a kol. 2013). Zvýšený obsah endogenních cytokininů (následkem zvýšené exprese genu *ipt*, kódujícího isopentenyltransferasu, enzym biosyntézy CK) měl u transgenních rostlin tabáku za následek vznik symptomů hypersenzitivní reakce - nekróz, inhibici fotosyntézy, zvýšení obsahu stresových hormonů, oxidativní poškození membrán a zavření průduchů. Hypersenzitivní reakce je obranou rostlin proti patogenům, kdy je smrtí infikovaných buněk a buněk v blízkosti místa infekce zabráněno šíření patogenu do rostlinného těla. Cytokininy tedy mohou být signály a/nebo mediátory rostlinné obrany proti patogenům (Novák a kol. 2013). Exogenní aplikace cytokininů na rostliny infikované patogeny má za následek zpomalení sporulace patogenu bez viditelných negativních účinků na fotosyntetický aparát hostitelské rostliny (Prokopová a kol. 2010).

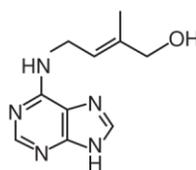
### 3.2.1 Struktura cytokininů

Přírozně se vyskytující cytokininy jsou deriváty adeninu s N<sup>6</sup>-aromatickým či isoprenoidním řetězcem. Převládající skupinou jsou cytokininy s *trans*-hydroxylovaným N<sup>6</sup> řetězcem, mezi které patří např. *trans*-zeatin a jeho deriváty (Mok a Mok 2001). Typickým představitelem isoprenoidních CK je N<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenin označovaný jako iP a jeho hydroxylované formy, zeatin a dihydrozeatin. Zeatin má podle pozice terminální hydroxylové skupiny na isoprenoidním řetězci dva různé izomery, *trans*-zeatin a *cis*-zeatin (cZ) (Obr. 1). Zatímco tZ vykazuje značnou biologickou aktivitu, v případě cZ je uváděno, že má velmi slabý biologický účinek. Přesná biologická funkce cZ zatím není známa, ačkoliv jde o látku přítomnou v celé řadě rostlinných materiálů. Bylo zjištěno, že v průběhu ontogeneze u *Arabidopsis thaliana* L. se mění hladiny cZ a tZ, přičemž cZ převládá v těch částech vývoje, kdy je omezen růst (Gajdošová a kol. 2011). Typickým zástupcem aromatických CK jsou kinetin či N<sup>6</sup>-benzyladenin a jeho hydroxylované formy topoliny, *ortho*-topolin (oT) a biologicky aktivnější *meta*-topolin (mT) (Obr. 1).

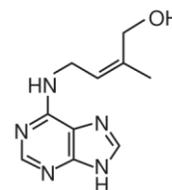
#### Isoprenoidní cytokininy



N<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenin

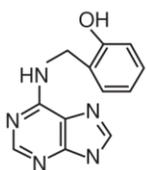


*trans*-zeatin

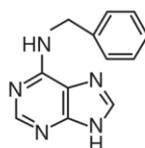


*cis*-zeatin

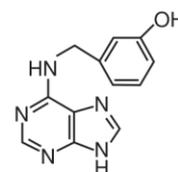
#### Aromatické cytokininy



*ortho*-topolin



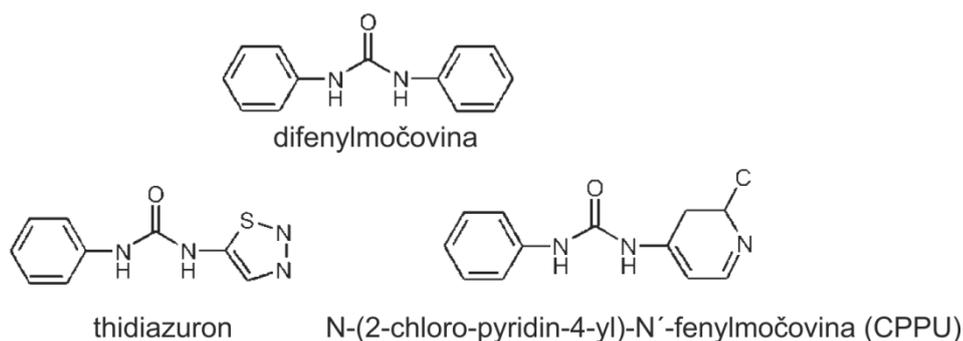
N<sup>6</sup>-benzylaminopurin



*meta*-topolin

**Obr. 1** Chemická struktura vybraných isoprenoidních a aromatických cytokininů, převzato ze Sakakibara (2006) a upraveno.

Na základě přirozeného výskytu cytokininů v rostlinách lze cytokininy rozdělit do dvou základních skupin, přirozeně se vyskytující cytokininy adeninového typu, kam patří již zmíněný iP, tZ, cZ, benzyladenin nebo topoliny, a syntetické cytokininy fenyльмоčovinnového typu zahrnující difenyльмоčovinu (DPU), thidiazuron (TDZ) či N-(2-chloro-pyridin-4-yl)-N'-fenyльмоčovinu (CPPU) (Obr. 2) (Mok a Mok 2001).



**Obr. 2** Chemická struktura vybraných cytokininů fenyльмоčovinnového typu. Převzato z Kopečný a kol. (2010) a upraveno.

Ke studiu aktivity cytokininů jsou používány nejčastěji tři biotesty - kalusový biotest, spočívající ve stimulaci růstu tabákového kalusu cytokininem, amarantový biotest založený na syntéze betacyaninu indukované tmou v kotyledonech laskavce v přítomnosti cytokininu a senescenční biotest využívající schopnosti cytokininů zpomalit degradaci chlorofylu během indukované senescence u oddělených listů pšenice (např. Holub a kol. 1998).

### 3.2.2 Biosyntéza a degradace cytokininů

Prvním krokem v biosyntéze isoprenoidních cytokininů je přenos isopentenyllového řetězce na N<sup>6</sup>-pozici adenin nukleotidu katalyzovaný enzymem isopentenyltransferasou (IPT). Tento enzym se vyskytuje v organismech ve dvou formách. První z nich, tRNA IPT, modifikuje isopentenyllovým řetězcem tRNA. Druhá forma, adenylátová IPT pak připojuje isopentenyllovou skupinu na adeninmono-, di-, tri- fosfát, ale nikoli na adenin či adenosin. Prekurzory pro biosyntézu cytokininů jsou dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) a 4-hydroxy-3-methyl-2(*E*)-butenyldifosfát (HMBPP) (Frébort a kol. 2011, Spíchal 2012). Syntéza DMAPP probíhá dvěma různými cestami, mevalonátovou v cytosolu a přes

methylethritolfosfát (MEP) v plastidech. Zatímco DMAPP využívaný pro syntézu *trans*-zeatinu vzniká zejména cestou přes MEP, DMAPP ze kterého vychází biosyntéza *cis*-zeatinu a isopentenyladeninu vzniká primárně mevalonátovou cestou (Kasahara a kol. 2004). HMBPP je intermediátem v MEP syntéze DMAPP a rovněž může sloužit jako prekurzor pro syntézu tZ (Sakakibara a kol. 2005). Hydroxylace v biosyntéze *trans*-zeatinu závislé na isopentenyladeninu je katalyzována enzymem P450 monooxygenasou (Sakakibara 2006). Biosyntéza *trans*-zeatinu se tedy skládá z několika kroků: transferu isopentenylové skupiny z DMAPP na mono-, di-, tri- adenosin-fosfát, což má za následek vznik isopentenyladenosin 5'-mono-, di-, tri-fosfátu. Hydroxylací těchto sloučenin cytochrom P450 monooxygenasou pak dochází ke vzniku tZ a dalších CK derivátů (Werner a kol. 2006).

Irreversibilní degradace cytokininů v rostlinách je katalyzována enzymem cytokinin oxidasou/dehydrogenasou (CKX) (Galuszka a kol. 2001). CKX katalyzuje štěpení cytokininů na adenin a příslušný aldehyd. Jedná se o jediný enzym schopný irreversible inaktivace cytokininů (např. Frébort a kol. 2011). V jednotlivých druzích rostlin jsou proteiny CKX kódovány multigenovými rodinami s rozdílným množstvím genů, např. u *Arabidopsis thaliana* L. se jedná o sedm genů s označením AtCKX1 - AtCKX7, u rýže bylo identifikováno minimálně jedenáct homologů (OsCKX1 - OsCKX11). Genová exprese CKX je ovlivněna různými biotickými a abiotickými faktory. Příkladem je zvýšení transkripce genů pro CKX cytokininy, což poskytuje negativní zpětnou vazbu řídicí homeostázu CK či snížení transkripce CKX genů kyselinou abscisovou nebo zvýšená exprese některých CKX genů po infekci rostliny bakterií *Agrobacterium tumefaciens* pravděpodobně na obranu proti cytokininům produkovaným touto bakterií (Werner a kol. 2006). Inhibicí CKX dochází ke zvýšení obsahu endogenních cytokininů. Mezi známé inhibitory CKX patří mimo jiné syntetické močovinné cytokininy thidiazuron (Chatfield a Armstrong 1986, Hare a van Staden 1994) a CPPU společně s jejich různými deriváty (např. Kopečný a kol. 2010).

Mezi aktivitou CKX a senescencí byla zjištěna pozitivní korelace, kdy CKX podporuje senescenci tím, že způsobuje degradaci cytokininů. Vliv světla na aktivitu CKX studovali Schlüter a kol. (2011). V průběhu senescence docházelo k nárůstu *in vitro* aktivity CKX u oddělených listů ječmene (*Hordeum vulgare* L.) uchovávaných ve tmě. U listových segmentů inkubovaných při světelném režimu 18 h. PAR ( $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a 6 h. tma

docházelo, pravděpodobně vlivem působení PAR, k pomalejšímu poklesu obsahu chlorofylu a karotenoidů než ve tmě. Navzdory tomu aktivita CKX vykazovala při působení PAR výraznější nárůst než u segmentů uchovávaných ve tmě. Exprese genů pro CKX je tedy u oddělených listů silně podporována PAR. Naopak u listů celistvých rostlin byla aktivita CKX na světle nižší než ve tmě, což může souviset s exportem látek z listů (Schlüter a kol. 2011).

Cytokininy mohou být glukosylovány na pozicích N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> enzymem N-glukosyltransferasou za vzniku N<sup>7</sup>- a N<sup>9</sup>-glukosidů. N-glukosylace je ireversibilní deaktivací cytokininů. Naopak O-glukosylace zprostředkovaná enzymem O-glukosyltransferasou je deaktivací reversibilní. O-glukosylované cytokininy mohou být opět aktivovány prostřednictvím β-glukosidasy. Enzym O-glukosyltransferasa se vyskytuje ve formách specifických pro *trans* nebo *cis* konformace molekul (např. Frébort a kol. 2011, Spíchal 2012).

### 3.2.3 Cytokininové receptory

V cytoplazmatické membráně *Arabidopsis thaliana* L. se vyskytují tři vysoce homologní receptorové histidin kinasy (Ueguchi a kol. 2001a) zapojené v přenosu cytokininového signálu, AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4 (Inoue a kol. 2001, Suzuki a kol. 2001, Ueguchi a kol. 2001b, Yamada a kol. 2001). K identifikaci CRE1 jako cytokininového receptoru byl použit *Arabidopsis cre1* s mutovaným genem *CRE1* kódujícím histidin kinasu. *Arabidopsis cre1* vykazoval redukovanou odpověď na isopentenyllové, aromatické i syntetické fenylnmočovinné cytokininy (Inoue a kol. 2001). Obdobných výsledků dosáhli i Ueguchi a kol. (2001b) v případě AHK4 (= CRE1), když zjistili, že AHK4 je pozitivním regulátorem v cytokininové signalizaci (Ueguchi a kol. 2001b). Cytokininové histidin kinasy mají různý podíl na zprostředkování působení cytokininů na rostlinný organismus. Všechny tři receptory ovlivňují fertilitu, velikost semen, klíčení a cytokininový metabolismus. Vliv na větvení kořene a dělení buněk listů je zprostředkováván zejména AHK2 a AHK3. V prodlužování primárního kořene a v reakci kořene na aplikaci exogenních cytokininů hraje hlavní roli CRE1/AHK4. Fotomorfogeneze indukovaná cytokininy a retence chlorofylu je zprostředkována především receptorem AHK3 (Riefler a kol. 2006). Kim a kol. (2006) prokázali, že klíčovým receptorem zapojeným v oddálení senescence způsobeném cytokininy je histidin kinasa AHK3, která specificky zprostředkovává fosforylaci genu *ARR2*. Mutant *ore12-1* se získanou AHK3 funkcí

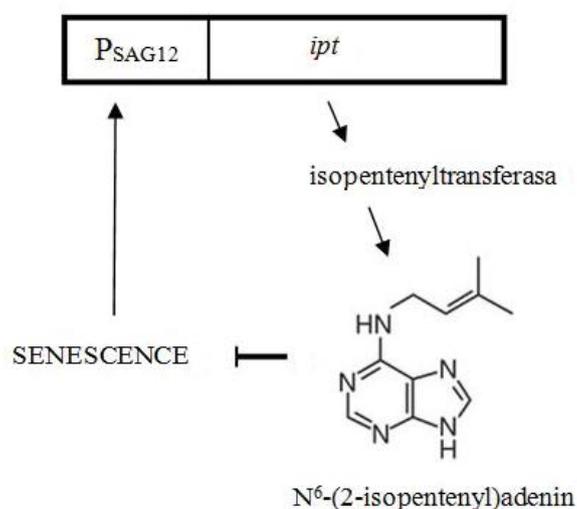


vykazoval prodlouženou životnost listů, u transgenních rostlin *AHK3* se zvýšenou expresí *ahk3* bylo pozorováno oddálení indukované senescence. Naopak u mutanta *ahk3* s nefunkčním AHK3 byl nástup senescence urychlen a po exogenní aplikaci cytokininů vykazoval pouze redukovanou odpověď oproti wild-type rostlinám, u kterých došlo vlivem exogenní aplikace CK k oddálení senescence (Kim a kol. 2006).

Různé cytokininy mají v závislosti na své struktuře specifické funkce v procesech, které jsou cytokininy regulovány, což závisí na aktivaci různých receptorů a jejich signálních drah. Relativní senzitivita receptorů k různým cytokininům byla studována Spíchálem a kol. (2004) za pomoci bakterií *Escherichia coli* exprimujících cytokininové receptory CRE1/AHK4 a AHK3 z *Arabidopsis thaliana* L. Senzitivita k cytokininům se u jednotlivých receptorů liší. Receptory AHK3 a CRE1/AHK4 obecně vykazují nejvyšší senzitivitu k isoprenoidním cytokininům *trans*-zeatinu a isopentenyladeninu. V případě ostatních CK se senzitivita receptorů velice liší, např. receptor AHK3 byl schopen rozpoznat *trans*-zeatin, *cis*-zeatin i dihydrozeatin, zatímco CRE1/AHK4 pouze *trans*-zeatin. Thidiazuron byl u obou receptorů aktivní, v případě AHK3 vykazoval 120 % aktivity tZ a u CRE1/AHK4 aktivitu 80%. V případě obou těchto receptorů vykazovaly aromatické cytokininy pouze velmi nízkou aktivitu, která je pravděpodobně zprostředkovávána zejména receptorem AHK2 (Spíchal a kol. 2004).

### 3.3 Cytokininy a senescence

V průběhu senescence dochází ke snížení obsahu cytokininů v rostlinách. Exogenní aplikací či zvýšením jejich endogenní hladiny je možné senescenci oddálit (např. Balibrea Lara a kol. 2004). Gan a Amasino (1995) prokázali, že endogenně produkované cytokininy potlačují senescenci. Sestrojili chimerický genový konstrukt  $P_{SAG12}$ -IPT obsahující promotor genu SAG12 ( $P_{SAG12}$ ) a kódující sekvenci genu pro IPT, klíčový enzym v biosyntéze cytokininů. Pomocí *Agrobacterium tumefaciens* provedli transformaci rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) zavedením tohoto konstruktů a vytvořili tak u transgenních rostlin autoregulační systém inhibice senescence. Na počátku senescence dojde vlivem  $P_{SAG12}$  k expresi genu pro IPT, čímž se zvýší obsah endogenních cytokininů, které senescenci zabrání. Zastavení senescence zase zmírní expresi genového konstruktů, čímž je zabráněno nadprodukcí cytokininů (Obr. 3). Listy transgenních rostlin na rozdíl od stejně starých listů *wild-type* rostlin nevykazovaly žádné známky senescence. Obdobných výsledků bylo dosaženo i u oddělených listů (Gan a Amasino 1995).



**Obr. 3:** Autoregulační systém inhibice senescence, upraveno podle Gan a Amasino (1995).

Exogenní aplikací cytokininů je rovněž možné senescenci oddálit. Vlivem takto aplikovaných cytokininů jsou zpomaleny senescenční změny jako je pokles obsahu chlorofylu (např. Holub a kol. 1998, Selivankina a kol. 2001), karotenoidů a Rubisco (Chernyad'ev a Monakhova 2003), pokles rychlosti asimilace oxidu uhličitého, inhibice fotochemie PSII (např. Vlčková a kol. 2006) a nárůst aktivity RNas (např. Sergiev a kol.

2007) a proteas (např. Pavalan-Ünsal a kol. 2002). Mechanismus, kterým je zprostředkováno oddálení senescence vlivem působení cytokininů, studovali Balibrea Lara a kol. (2004). U transgenních rostlin tabáku s autoregulovanou produkcí CK (Obr. 3) zjistili zvýšenou aktivitu extracelulární invertasy, enzymu zapojeného ve vykládání floému a indukovaného cytokininu. Transgenní rostliny exprimující tento enzym pod P<sub>SAG12</sub> vykazovaly oddálení senescence. K ověření závěru, že cytokininové působení na oddálení senescence souvisí s extracelulární invertasou, byly vytvořeny transgenní rostliny inhibující invertasu v přítomnosti CK. U těchto rostlin oddálení senescence nebylo pozorováno. Extracelulární invertasa je tedy zřejmě klíčovým elementem v regulaci senescence vlivem CK a tedy, regulace senescence vlivem působení cytokininů je zprostředkováváno vztahy zdroj-sink (Balibrea Lara a kol. 2004).

Efekt exogenně aplikovaných cytokininů na indukovanou senescenci je silně ovlivněn působením PAR. Zatímco u listových segmentů pšenice uchovávaných ve tmě a ošetřených mT docházelo k výraznému zpomalení projevů senescence (nedocházelo ke změnám tvaru a organizace chloroplastů ani k poklesu hodnot parametru  $F_v/F_m$  a byla výrazně snížena lipidová peroxidace), při současném působení kontinuálního PAR způsoboval mT nárůst deepoxidace pigmentů xantofylového cyklu odrážející nadbytek excitací ve fotosyntetickém aparátu, který se posléze projevil výrazným nárůstem peroxidace lipidů (Vlčková a kol. 2006). Dalším faktorem ovlivňujícím efekt exogenně aplikovaných cytokininů je jejich koncentrace, čímž se zabývala Melkovičová (2012) ve své bakalářské práci. Melkovičová (2012) studovala vliv různých koncentrací BAP a mT ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$  mol.l.<sup>-1</sup>) na obsah chlorofylu a na stav fotosyntetického aparátu (pomocí parametru  $F_v/F_m$ ) oddělených listových segmentů ječmene (*Hordeum vulgare* L.) během indukované senescence ve tmě a při různém PAR. Bylo použito kontinuální a periodické (16 h. PAR/8 h. tma) PAR o intenzitě  $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a přibližně  $370 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . U listových segmentů inkubovaných v 0,5% roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) byl ve tmě pozorován velmi výrazný pokles obsahu chlorofylu a  $F_v/F_m$  s rostoucí dobou po oddělení. Při působení PAR zpravidla docházelo ke zpomalení průběhu senescence. Nejvýraznější zpomalení bylo zaznamenáno při působení periodického PAR o nižší intenzitě ( $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), naopak při kontinuálním PAR o vyšší intenzitě ( $370 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) bylo zpomalení pozorováno jen do šestého dne po oddělení, poté byl průběh senescence srovnatelný s variantou tma. Melkovičová (2012) uvádí, že vliv PAR je závislý na jeho dávce. Při nižší dávce dochází ke zpomalení senescence, při použití dávky vyšší

(vzhledem k určité hraniční hodnotě) je průběh senescence urychlen. Autorka dále uvádí, že tato hraniční hodnota intenzity PAR je zřejmě do jisté míry určena tím, na jakou dávku PAR je rostlina aklimatizovaná. Při exogenní aplikaci roztoků CK bylo u listových segmentů umístěných ve tmě pozorováno zpomalení senescence u všech koncentrací CK, přičemž vyšší koncentrace ( $10^{-4}$  a  $3 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>) byly zpravidla účinnější. Při působení kontinuálního i periodického PAR o nižší intenzitě bylo nejvýraznější zpomalení pozorováno u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> v případě BAP a u koncentrace  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> u mT. Při působení PAR o vyšší intenzitě bylo pozorováno urychlení poklesu obsahu chlorofylu u nejvyšší použité koncentrace ( $3 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>) v případě obou CK. Na základě těchto výsledků Melkovičová (2012) uvádí, že s rostoucí dávkou světla dochází k posunu optimální koncentrace CK. Ve tmě byla nejúčinnější koncentrace BAP  $3 \cdot 10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> u mT. Při PAR o nižší intenzitě byla optimální koncentrace BAP  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> u mT. Optimální koncentrace se tedy u jednotlivých CK ve tmě i na PAR liší. Autorka dále uvádí, že cytokininy (stejně jako PAR) zpomalují senescenci jen do určité koncentrace označené jako hraniční. Po překročení této koncentrace se snižuje zpomalující vliv cytokininů na změny spojené se senescencí, s dalším zvýšením koncentrace dochází k urychlení senescence a daná koncentrace CK je pro rostlinu toxická. Při kombinaci nižších koncentrací CK a nižší intenzity PAR je průběh senescence do určité hodnoty zpomalen a po jejím překročení je naopak senescence urychlena (Melkovičová 2012). Účinek cytokininů na senescenci se tedy liší v závislosti na použité intenzitě PAR a na koncentraci exogenně aplikovaného cytokininu. Při dlouhotrvajícím vystavení rostlinných pletiv vysoké koncentraci cytokininů nebo při kombinaci s vysokou ozářeností dochází k redukci obsahu fotosyntetických pigmentů a inhibici fotochemie fotosystému II (pokles parametru  $F_v/F_m$ ) a elektronového transportu (např. Prokopová a kol. 2010).

### 3.3.1 Cytokininové deriváty

Výsledky celé řady studií ukazují, že nejen přirozeně se vyskytující cytokininy isoprenoidní (např. Holub a kol. 1998) a aromatické (Doležal a kol. 2006) a syntetické močovinné cytokininy (např. Ferrante a kol. 2002, Karavaiko a kol. 2004) jsou schopné oddálit senescenci u jednoděložných (např. Vlčková a kol. 2006) a dvouděložných rostlin (např. Sergiev a kol. 2007), ale i jejich uměle připravené deriváty mají tuto schopnost. Některé z těchto cytokininových derivátů vykazují v biotestech vyšší aktivitu než cytokininy, od kterých byly odvozeny (např. Mik a kol. 2011b) a nemají vedlejší účinky na růst kořenů či buněčnou proliferaci (Podlešáková a kol. 2012).

Biologickou aktivitu isopentenylových derivátů se substitucí na atomu N<sup>9</sup> isopentenyldeninu studovali např. Mik a kol. (2011a). Isopentenyldenin vykazoval v senescenčních testech pouze nízkou aktivitu a jeho nově syntetizované deriváty byly v tomto testu prakticky neaktivní. Autoři uvádí, že antisenescenční aktivita látek je lokalizována spíše na N<sup>6</sup> pozici purinového cyklu. Nicméně krátké alkyhalogenové substituce na pozici N<sup>9</sup> výrazně omezily negativní vliv vysokých koncentrací cytokininů na buněčnou proliferaci (Mik a kol. 2011b). Na rozdíl od výsledků získaných u N<sup>9</sup> derivátů iP byla u některých N<sup>9</sup> derivátů kinetinu s halogenalkylovým řetězcem zjištěna vyšší antisenescenční aktivita než u kinetinu samotného. Typ halogenového atomu a délka alkylového řetězce se ukázaly být určujícími pro zpomalení degradace chlorofylu během indukované senescence. Deriváty, s kratším alkylovým řetězcem byly aktivnější a současně deriváty obsahující v alkylovém řetězci chlor byly aktivnější než deriváty obsahující brom. Nejaktivnějším derivátem v senescenčním testu provedeném ve tmě i za kontinuálního světla o intenzitě 100  $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  byl furfurylamino-9-(2-chloroethyl)purin, tedy derivát kinetinu s krátkým alkylovým řetězcem obsahujícím atom chloru. Vlivem tohoto derivátu byla výrazně snížena lipidová peroxidace u listových segmentů pšenice uchovávaných ve tmě. Na světle však byla pozorována pozitivní korelace mezi vlivem derivátu na zpomalení degradace chlorofylu a lipidovou peroxidací (obdobné výsledky jako u Vlčková a kol. 2006), tzn. že efekt derivátu byl spíše negativní (Mik a kol. 2011b).

Vztahem mezi strukturou a aktivitou aromatických CK se zabývali Doležal a kol. (2006). Vytvořili velké množství různých derivátů N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu (BAP) se substitucemi na fenylovém kruhu jejichž aktivita byla zkoumána ve třech biotestech, kalusovém,

amarantovém a senescenčním. Jako referenční byl použit vysoce aktivní BAP. Velmi aktivními látkami v senescenčním testu byly di- a tri-fluoro deriváty a dvojnásobnou aktivitu oproti BAP vykazovaly také methoxytopoliny (Doležal a kol. 2006). Velmi vysoká antisenescenční aktivita N<sup>6</sup>-(2-methoxybenzylamino)purinu (*ortho*-methoxytopolin) a N<sup>6</sup>-(3-methoxybenzylamino)purinu (*meta*-methoxytopolin), které jsou souhrnně označovány jako methoxytopoliny, byla zjištěna už při jejich identifikaci, kdy přesahovala aktivitu BAP a zeatinu o 200 % (Tarkowská a kol. 2003). U některých látek bylo v senescenčním testu prováděném Doležalem a kol. (2006) dosaženo výrazně rozdílných výsledků než v ostatních biotestech, např. derivát N<sup>6</sup>-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin byl v kalusovém a amarantovém testu neaktivní, ale v senescenčním testu byla jeho aktivita vyšší než aktivita BAP. Ačkoliv látky obecně vykazovaly v biotestech vysokou aktivitu, jen velmi malé množství z nich bylo schopno interakce s AHK receptory. Tyto výsledky naznačují existenci jiného receptoru a/nebo signální dráhy zprostředkovávající působení aromatických CK na senescenci než je dráha zprostředkovávající jejich vliv na růst a dělení buněk (Doležal a kol. 2006).

Antisenescenční aktivita cytokininů se může vzájemně lišit nejen na základě struktury, ale i na základě metodiky použité v senescenčním testu. Holub a kol. (1998) k exogenní aplikaci na oddělené listové segmenty pšenice použili *trans*-zeatin, N<sup>6</sup>-benzylaminopurin, *meta*-topolin a *ortho*-topolin o koncentracích 10<sup>-8</sup> až 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>. Aplikace cytokininů byla provedena pomocí tří různých metod: 1) ve formě kapiček nastříkaných na listový segment, 2) umístěním do roztoků CK celým povrchem listu a 3) umístěním segmentů do roztoků řezem. Segmenty ošetřené cytokininy byly následně inkubovány při teplotě 25°C ve tmě po dobu čtyř dnů. Ke stanovení aktivity byl použit také biotest amarantový a kalusový. Ve všech biotestech byl BAP mnohem efektivnější než tZ, s výjimkou senescenčního testu, kdy byly segmenty umístěny do roztoků řezem. V posledně jmenovaném testu bylo dosaženo následujících výsledků: antisenescenční aktivita tZ a *meta*-topolinu byla vzájemně srovnatelná a vyšší než aktivita BAP, nejméně aktivním byl *ortho*-topolin. Nejlepších výsledků bylo v případě *trans*-zeatinu dosaženo u nejvyšší použité koncentrace, 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>, kdy obsah chlorofylu po čtyřech dnech po oddělení činil přibližně 60 % hodnoty obsahu chlorofylu naměřené u čerstvých listů. Také bylo zjištěno, že hydroxylové substituce v poloze *meta*- jsou obecně výhodnější než substituce v poloze *ortho*-. Ve všech použitých biotestech dosahovaly *meta*-topoliny výrazně lepších výsledků než *ortho*-topoliny (Holub a kol. 1998).

Je známo, že močovinové cytokininové deriváty jsou stejně jako cytokininy adeninového typu schopné oddalovat degradaci chlorofylu během indukované senescence a výrazně tak prodloužit životnost listů (např. Lee a kol. 1981, Ferrante a kol. 2002). Sergiev a kol. (2007) sledovali vliv N<sup>6</sup>-benzyladeninu a 1-(2-chloropyridin-4-yl)-3-fenylmočoviny (4-PU-30) na indukovanou senescenci u oddělených listů *Arabidopsis thaliana* L., kdy byla kromě obsahu chlorofylu sledována také aktivita RNAs, pro kterou je charakteristický nárůst během senescence u vyšších rostlin. Po aplikaci obou použitých cytokininů bylo pozorováno snížení aktivity RNAs a zpomalení poklesu obsahu chlorofylu (Sergiev a kol. 2007). Močovinové cytokininové deriváty také stimulují aktivitu superoxiddismutasy, antioxidačního enzymu katalyzujícího přeměnu superoxidových radikálů na peroxid vodíku, která je velmi důležitým faktorem v toleranci rostlin ke stresům (Genkov a Ivanova 1995).

Z uvedených informací vyplývá, že cytokininy mají celou řadu biologických účinků. Mezi nejvýznamnější z nich bezpochyby patří jejich antisenescenční aktivita, která byla pozorována nejen u přirozeně se vyskytujících a syntetických cytokininů, ale i u jejich nejrozličnějších derivátů. Oddálení senescence působením cytokininů je ovlivněno velkým množstvím faktorů, jako je intenzita a doba působení PAR nebo koncentrace a struktura použitých cytokininů a jejich derivátů, ale i druh a celistvost studovaných rostlin. V Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci byly vyvinuty nové cytokininové deriváty odvozené od fenylmočoviny s označením TDZ-CZ-OMe a UR21. U obou těchto látek byla pozorována velmi vysoká antisenescenční aktivita (u TDZ-CZ-OMe asi 20x silnější než u UR21), která byla v použitém senescenčním testu vyšší než aktivita *trans*-zeatinu, thidiazuronu a N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu (ústní sdělení Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D.), které jsou obecně považovány za velmi efektivní v oddálení senescence a jsou k tomuto účelu v laboratorních podmínkách běžně používány. Vzhledem k tomu, že senescenční testy jsou standardně prováděny pouze ve tmě, bylo cílem této práce zjistit, jak tyto deriváty ovlivňují obsah chlorofylu a funkci fotosyntetického aparátu při indukované senescenci a zda-li se jejich vliv bude lišit při použití PAR o různé intenzitě. Jejich působení bylo srovnáváno s působením tZ, TDZ a BAP. Cytokininy i cytokininové deriváty byly použity v koncentracích 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Rostlinný materiál

Při prováděných experimentech byly použity rostliny pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka). Semena byla vyseta do perlitu a umístěna do fytokomory s definovanými podmínkami (22 °C, světelný režim 16 h. PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ /8 h. tma). Po sedmi dnech byly z rostlin odděleny listové segmenty o délce 4 cm od špičky. Primární listy, ze kterých byly segmenty oddělovány, byly vybrány pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonsko) na základě obsahu chlorofylu a to tak, aby se naměřené hodnoty chlorofylu u jednotlivých listů od sebe nelišily o více než 5 %. Po oddělení bylo provedeno měření fotochemického reflektančního indexu PRI pomocí přístroje PlantPen PRI 200 (PSI, Drásov, ČR) a následně byly segmenty umístěny řezem do jamek mikrotitrační destičky naplněných 200  $\mu\text{l}$  roztoků cytokininů a cytokininových derivátů. K tomuto účelu byl použit *trans*-zeatin, thidiazuron a  $\text{N}^6$ -benzylaminopurin společně s novými deriváty označenými jako UR21 a TDZ-CZ-OMe (bis-substituované deriváty močoviny, laskavě poskytnuty dr. Nislerem), a to v koncentracích  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jako kontrola bylo použito 200  $\mu\text{l}$  0,2% dimethylsulfoxidu (DMSO). Pro každou variantu roztoku bylo použito pět listových segmentů. Poté byly segmenty adaptovány na tmu po dobu 20 min. a následně bylo provedeno měření obsahu chlorofylu pomocí chlorofylmetru SPAD-502 a fluorescenční indukce chlorofylu pomocí přístroje FluorCam (PSI, Drásov, ČR). Následovalo umístění segmentů zpět do roztoků cytokininů a cytokininových derivátů. Destičky se segmenty byly posléze uchovávány ve fytokomoře Algaetron (PSI, Drásov) při teplotě 22 °C a světelné periodě 16 h. PAR/8 h. tma. Sada vzorků s označením „100“ byla ve fytokomoře vystavena fotosynteticky aktivnímu záření o intenzitě  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Sada vzorků s označením „300“ byla vystavena PAR o intenzitě  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Sada vzorků s označením „TMA“ pak byla do fytokomory umístěna zabalená v černém plastovém pytli tak, aby bylo zabráněno průniku PAR, ale aby byly segmenty vystaveny stejné teplotě jako ostatní sady vzorků. Šestý a devátý den po oddělení bylo opět provedeno měření PRI pomocí PlantPen PRI, následovala 20min. adaptace na tmu a poté měření obsahu chlorofylu chlorofylmetrem SPAD-502 a chlorofylové fluorescenční indukce přístrojem FluorCam. Během 20 min. adaptace na tmu před samotným měřením byly listové segmenty umístěny v jamkách mikrotitrační desky naplněných 100  $\mu\text{l}$  deionizované vody. Aby byl zajištěn kontinuální přísun roztoků



cytokininů a cytokininových derivátů v průběhu uchovávání vzorků byly tyto roztoky podle potřeby průběžně doplňovány dávkou 100 µl tak, aby nedošlo k jejich vyschnutí.

## **4.2 Použité metody**

V rámci této práce bylo provedeno měření fotochemického reflektančního indexu PRI, obsahu chlorofylu a parametrů chlorofylové fluorescence u oddělených listových segmentů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) během indukované senescence pod vlivem různých derivátů cytokininů.

### **4.2.1 Měření fotochemického reflektančního indexu**

K měření fotochemického reflektančního indexu PRI byl použit přístroj PlantPen PRI (PSI, Drásov, ČR), který provádí měření reflektance ve dvou vlnových délkách, 525 a 592 nm. PRI je poté stanoven na základě vzorce  $PRI = (R_{525} - R_{592}) / (R_{525} + R_{592})$ . Měření bylo prováděno vždy ve vzdálenosti 2 cm od špičky uprostřed listu z adaxiální strany. V den oddělení byl PRI měřen bezprostředně po odříznutí segmentu z primárního listu, v ostatní dny po vyjmutí mikrotitračních destiček se vzorky z fytokomory. Po dokončení měření PRI byly segmenty umístěny na Petriho misku s navlhčeným filtračním papírem.

### **4.2.2 Měření obsahu chlorofylu**

K měření relativního obsahu chlorofylu byl použit přístroj SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonsko), který provádí měření transmitance ve dvou vlnových délkách, 650 nm a 940 nm. Před samotným měřením byly listové segmenty přeneseny na Petriho misce do tmy k adaptaci. Adaptace probíhala vždy po dobu 20 min., aby byl eliminován vliv pohybu chloroplastů. Segmenty byly po tuto dobu umístěny do jamek mikrotitrační destičky s 200 µl deionizované vody. Měření obsahu chlorofylu bylo prováděno ve stejném místě listu jako měření PRI, tedy 2 cm od špičky uprostřed listu na adaxiální straně. Aby nedošlo k ovlivnění měřených hodnot SPAD, probíhalo celé měření při slabém zeleném světle.

### 4.2.3 Parametry chlorofylové fluorescence

Bezprostředně po stanovení obsahu chlorofylu bylo provedeno měření parametrů chlorofylové fluorescence pomocí fluorescenčního zobrazovacího systému FluorCam 700MF (PSI, Drásov, ČR). Podmínky, za kterých bylo měření prováděno byly definovány použitým protokolem s následujícími parametry: senzitivita 40 %, irradiance 60 % (relativní intenzita aktinického PAR, odpovídala ozáření 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  v místě vzorků), superradiance 100 % (relativní intenzita saturačního pulzu, odpovídala ozáření 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  v místě vzorků), shutter 0. Segmenty byly položeny na desku z černého papíru a přilepeny na krajích (přes špičky a v místě řezu) průhlednou lepicí páskou tak, aby nedošlo k nežádoucím pohybům segmentů a zároveň páska nepřekrývala místo, ve kterém bylo prováděno měření PRI a obsahu chlorofylu (2 cm od špičky uprostřed listu na adaxiální straně). Měřením byly získány parametry  $F_0$  (minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu),  $F_m$  (maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu),  $F_t$  (fluorescence v čase  $t$  při aktinickém světle) a  $F'_m$  (maximální fluorescence vzorku adaptovaného na světlo). Parametry  $F_t$  a  $F'_m$  byly měřeny během 6 min působení aktinického PAR, poslední naměřené hodnoty (po 6 min. PAR) pak byly následně použity k výpočtům:

- maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII ( $F_v/F_m$ ),  
 $(F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$
- aktuálního kvantového výtěžku fotochemie PSII vzorků adaptovaných na světlo ( $\Phi_P$ ),  
 $(F'_m - F_t)/F'_m = \Phi_P$
- kvantového výtěžku konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{f,D}$ ),  
 $F_t/F_m = \Phi_{f,D}$
- kvantového výtěžku regulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ),  
 $F_t/F'_m - F_t/F_m = \Phi_{NPQ}$ ,

kdy zároveň platí  $\Phi_P + \Phi_{f,D} + \Phi_{NPQ} = 1$  (Lazár 2015).

Po provedení měření parametrů chlorofylové fluorescence byly listové segmenty vráceny zpět do příslušného roztoku a umístěny do fytokomory s definovanou ozářeností a teplotou.

### 4.3 Statistické zpracování dat

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit program Origin (verze 8.5, OriginLab Corporation, USA). Ke zjištění statistické významnosti rozdílů mezi jednotlivými koncentracemi látek a kontrolou (DMSO) v rámci dne a světelné varianty byla provedena jednocestná analýza variance (ANOVA), Tukeyho test. Statisticky významné rozdíly jsou v grafickém zpracování výsledků uvedeny rozdílnými písmeny.

### 4.4 Grafické zpracování dat

Ke grafickému zpracování dat byl rovněž použit program Origin (verze 8.5, OriginLab Corporation, USA). Pro lepší názornost byly získané hodnoty obsahu chlorofylu a parametru  $F_v/F_m$  uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení. Použity byly mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil. V případě PRI nebyla tato úprava dat vzhledem k přítomnosti záporných hodnot vhodná, v grafickém znázornění jsou proto použity absolutní hodnoty mediánů, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil. V případě parametrů chlorofylové fluorescenční indukce  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$  bylo pro lepší znázornění vzájemných vztahů mezi parametry využito vzorce  $\Phi_P + \Phi_{f,D} + \Phi_{NPQ} = 1$ . Protože součet mediánů těchto parametrů se v některých případech nerovnal jedné, byly použity průměry hodnot naměřených v příslušný den a chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.

## 5 Výsledky

V rámci této práce bylo provedeno měření obsahu chlorofylu, fotochemického reflektančního indexu PRI a parametrů chlorofylové fluorescence u oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) během indukované senescence pod vlivem různých derivátů cytokininů. V rámci chlorofylové fluorescence byly sledovány parametry  $F_v/F_m$ ,  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{NPQ}$  a  $\Phi_{f,D}$ . Měření bylo provedeno tak, jak je uvedeno v kapitole 4 Materiál a metody. Hodnoty obsahu chlorofylu a parametru  $F_v/F_m$  naměřené v den oddělení listových segmentů u jednotlivých variant jsou uvedeny v Tab. 1.

### 5.1 DMSO

Hodnoty parametrů naměřených u vzorků inkubovaných v DMSO jsou uvedeny v rámci obrázků prezentujících parametry naměřené u listových segmentů pod vlivem testovaných látek. Dimethylsulfoxid je rozpouštědlo používané k ředění roztoků cytokininů. Vzhledem k tomu, že získané výsledky u DMSO a vody bývají obdobné (např. Prokopová a kol. 2010), byl jako kontrolní použit právě roztok 0,2% DMSO.

U kontrolních vzorků umístěných ve tmě byl šestý den po oddělení pozorován velmi výrazný pokles obsahu chlorofylu na zhruba 20 % hodnoty naměřené v den oddělení. Devátý den po oddělení pak byla hodnota 10% oproti hodnotě původní (Obr. 4A). Vzorky vystavené světlu také vykazovaly pokles naměřených hodnot, ale ne tak výrazný. V případě vzorků vystavených intenzitě světla  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  došlo šestý den k poklesu na asi 60 % původní hodnoty, devátý den pak na 15 %. Obsah chlorofylu u vzorků vystavených světlu o intenzitě  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  poklesl šestý den na zhruba 80 % a osmý den na 20 %. Konkrétní hodnoty naměřené v den oddělení jsou uvedeny v Tab. 1.

U kontrolních vzorků inkubovaných ve tmě byl pozorován postupný pokles hodnot PRI, a to z přibližně 0,025 na -0,1 (šestý den) a na -0,15 (devátý den) (Obr. 4B). U vzorků inkubovaných za působení PAR došlo rovněž k poklesu naměřených hodnot v čase, ale tento pokles byla méně výrazný: u varianty 100 z přibližně 0,05 na -0,03 šestý den a na -0,085 devátý den. U varianty 300 byla v den oddělení i šestý den naměřena hodnota kolem 0,025, osmý den došlo k mírnému poklesu na přibližně 0,01. Z uvedených výsledků

je patrný zpomalující vliv světla na pokles PRI během indukované senescence. S rostoucí intenzitou světla bylo zpomalení výraznější.

U varianty tma dosahoval parametr  $F_v/F_m$  šestý den po oddělení přibližně 45 % původní hodnoty a devátý den 15 % (Obr. 5A). U světelných variant byl pokles  $F_v/F_m$  výrazně zpomalen. V případě varianty 100 poklesla šestý den hodnota na přibližně 85 % původní hodnoty a devátý den na 80 %. U varianty 300 dosahoval parametr nejvyšších hodnot, šestý den poklesl přibližně na 95 % původní hodnoty a osmý den na 90 %. Konkrétní hodnoty naměřené v den oddělení jsou uvedeny v Tab. 1.

$\Phi_P$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$  jsou parametry chlorofylové fluorescenční indukce, jedná se o kvantové výťažky procesů využívajících či deaktivujících absorbovanou energii fotosynteticky aktivního záření. Zároveň platí, že  $\Phi_P + \Phi_{f,D} + \Phi_{NPQ} = 1$  (Lazár 2015). U kontrolních vzorků inkubovaných ve tmě došlo k velmi výraznému poklesu  $\Phi_P$  v čase po oddělení (z přibližně 55 % na 15 % šestý den a přibližně 1 % devátý den) (Obr. 5B). Tento pokles byl doprovázen výrazným nárůstem  $\Phi_{f,D}$  a devátý den i nárůstem  $\Phi_{NPQ}$ . U světelných variant došlo šestý den k obdobným změnám, které ale nebyly tak výrazné jako u varianty tma. Devátý den nebyl na rozdíl od varianty tma zaznamenán nárůst  $\Phi_{NPQ}$ , hodnoty všech tří parametrů byly obdobné jako šestý den.

## 5.2 *trans*-Zeatin

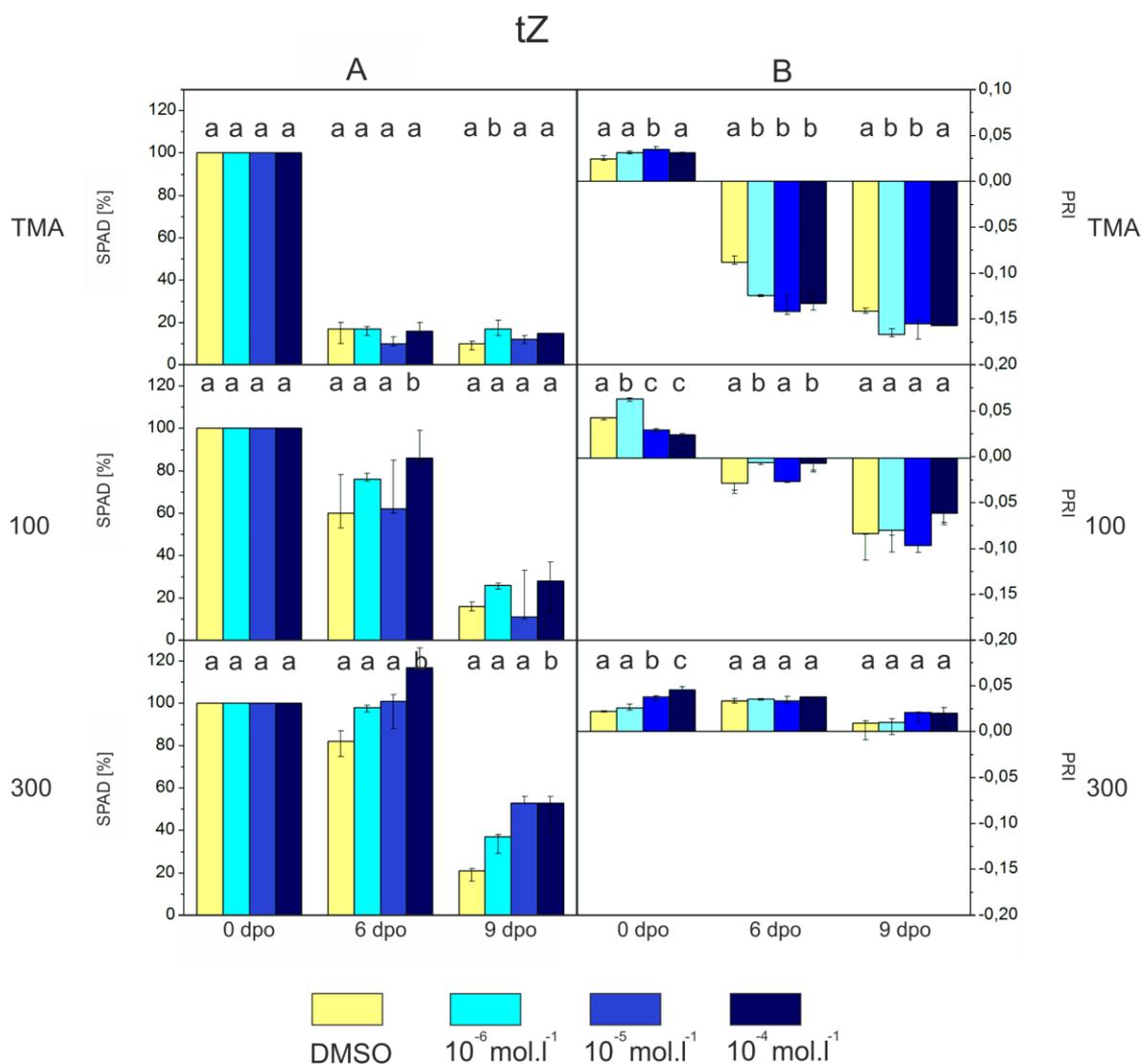
U vzorků umístěných ve tmě byl obsah chlorofylu srovnatelný s hodnotami zjištěnými u kontrolních segmentů (Tab. 1, Obr. 4A). Jediný statisticky významný rozdíl byl zaznamenán devátý den u segmentů ponořených v roztoku *trans*-zeatinu o koncentraci  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>, kdy byl obsah chlorofylu vyšší než u DMSO a dalších koncentrací tZ (kolem 15 % původní hodnoty, Obr. 4A). Obdobné výsledky jako u kontrolních segmentů byly získány také u vzorků v tZ uchovávaných na světle. U obou světelných variant bylo významnější zpomalení poklesu obsahu chlorofylu oproti kontrole pozorováno jen u tZ o koncentraci  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>.

V porovnání s kontrolními vzorky došlo ve tmě u segmentů ošetřených tZ k mírně výraznějšímu poklesu hodnot PRI (Obr. 4B). Snížení hodnot PRI oproti kontrole bylo 6. den u všech koncentrací tZ statisticky významné. U varianty 100 nebylo na rozdíl od tmy pozorováno urychlení poklesu hodnot oproti kontrole, u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>

byly naměřené hodnoty vyšší než u kontroly. U varianty 300 byly získané výsledky srovnatelné s kontrolními vzorky.

**Tab. 1:** Výchozí hodnoty obsahu chlorofylu a parametru  $F_v/F_m$  naměřené pomocí přístrojů SPAD-502 a FluorCam u listových segmentů uchovávaných ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300) v den oddělení listových segmentů u jednotlivých látek a jejich příslušných koncentrací.

látka [ $\text{mol.l}^{-1}$ ]		obsah chlorofylu			$F_v/F_m$		
		tma	100	300	tma	100	300
<b>DMSO</b>	<b>0,2%</b>	48,1	44,7	45,6	0,799	0,801	0,799
<b>TZ</b>	<b><math>10^{-6}</math></b>	47,3	43,7	44,2	0,780	0,802	0,779
	<b><math>10^{-5}</math></b>	47,1	45,3	44,2	0,784	0,773	0,781
	<b><math>10^{-4}</math></b>	47,2	45,5	44,4	0,790	0,783	0,785
<b>TDZ</b>	<b><math>10^{-6}</math></b>	47,6	44,3	44,2	0,784	0,785	0,771
	<b><math>10^{-5}</math></b>	47,1	43,8	44,1	0,778	0,773	0,782
	<b><math>10^{-4}</math></b>	48,1	45,6	44,8	0,782	0,771	0,795
<b>UR21</b>	<b><math>10^{-6}</math></b>	47,3	44,7	45,3	0,800	0,777	0,787
	<b><math>10^{-5}</math></b>	48,3	43,4	45,1	0,777	0,778	0,797
	<b><math>10^{-4}</math></b>	48,5	45,4	44,8	0,785	0,799	0,782
<b>TDZ-CZ-OMe</b>	<b><math>10^{-6}</math></b>	48	44,2	46,2	0,791	0,784	0,794
	<b><math>10^{-5}</math></b>	48,8	44,9	44,2	0,780	0,783	0,790
	<b><math>10^{-4}</math></b>	48,3	44,3	44,3	0,778	0,778	0,803
<b>BAP</b>	<b><math>10^{-6}</math></b>	46,6	43,8	44	0,782	0,773	0,782
	<b><math>10^{-5}</math></b>	46,3	45,1	44,7	0,784	0,775	0,783
	<b><math>10^{-4}</math></b>	45,9	44,2	43,5	0,798	0,794	0,782



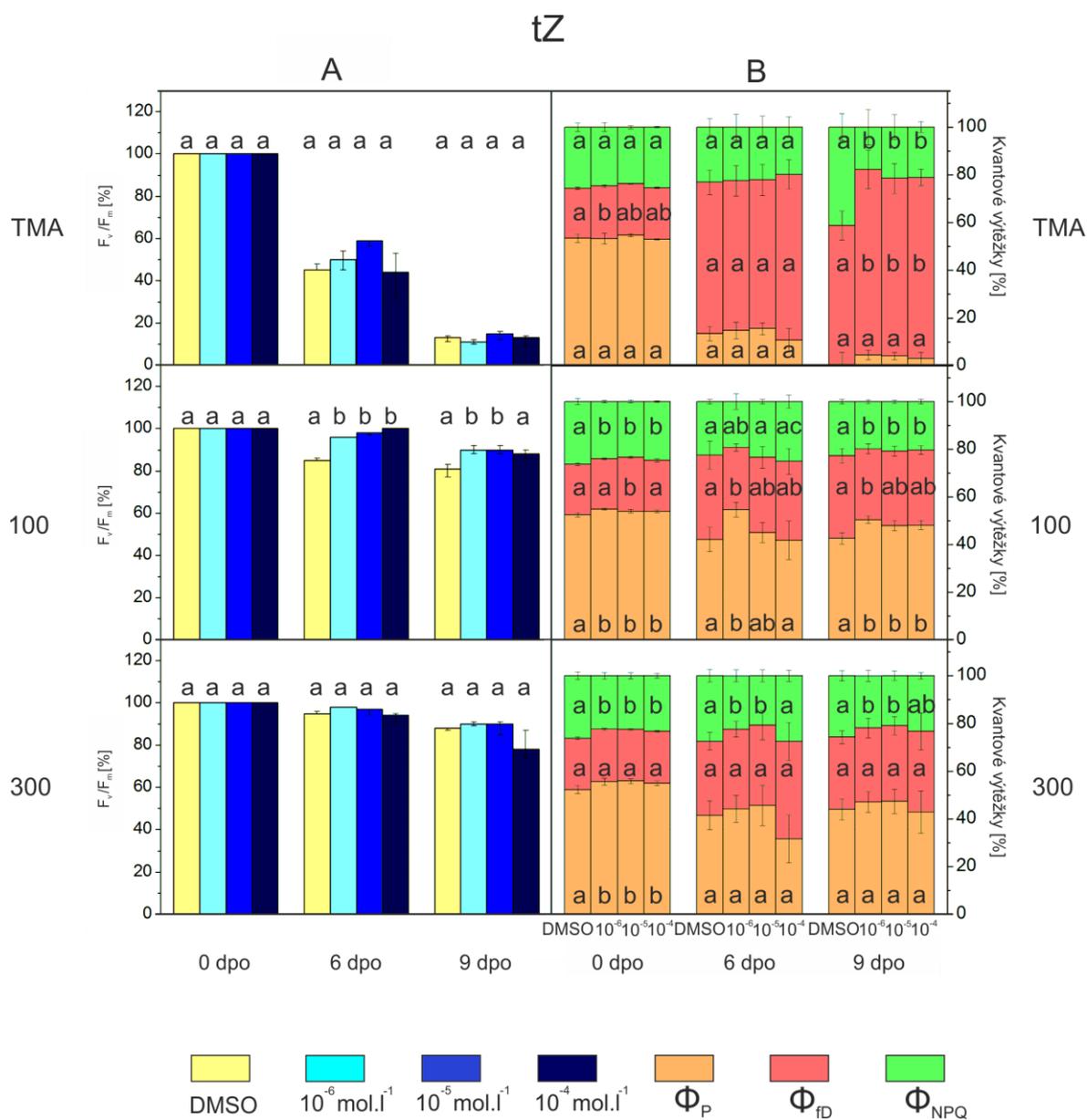
**Obr. 4:** Obsah chlorofylu (A) a fotochemický reflektanční index PRI (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků *trans*-zeatinu o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístrojů SPAD-502 a PlantPen PRI v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo). V případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení. Hodnoty obsahu chlorofylu jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 48,1; tZ  $10^{-4}$  47,2; tZ  $10^{-5}$  47,1;  $10^{-6}$  47,3; 100: DMSO 44,7; tZ  $10^{-4}$  45,5; tZ  $10^{-5}$  45,3; tZ  $10^{-6}$  43,7; 300: DMSO 45,6; tZ  $10^{-4}$  44,4; tZ  $10^{-5}$  44,2; tZ  $10^{-6}$  44,2). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot,  $n = 5$ . Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

Výchozí hodnoty  $F_v/F_m$  u segmentů inkubovaných v tZ odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). Výsledky získané u variant tma a 300 jsou obdobné jako u kontrolních vzorků, bez ohledu na použitou koncentraci tZ (Obr. 5A). V případě varianty 100 byly šestý den po oddělení hodnoty  $F_v/F_m$  u všech koncentrací tZ mírně vyšší než u kontroly. Devátý den dosahoval parametr při použití koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> srovnatelných hodnot jako u kontrolních vzorků, při použití ostatních koncentrací byl vyšší asi o 10 %.

U vzorků varianty tma byly šestý den u všech tří parametrů chlorofylové fluorescenční indukce získány výsledky srovnatelné s kontrolními vzorky. Devátý den byly ve srovnání s kontrolou hodnoty  $\Phi_{f,D}$  vyšší a  $\Phi_{NPQ}$  výrazně nižší (přibližně 20 % oproti 40 % u kontroly) (Obr. 5B). U varianty 100 bylo šestý den u ošetřených segmentů  $\Phi_{NPQ}$  obdobné jako u kontroly. U koncentrace tZ  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> bylo zaznamenáno mírně vyšší  $\Phi_P$  a nižší  $\Phi_{f,D}$ . Devátý den bylo u všech koncentrací tZ vyšší  $\Phi_P$  a nižší  $\Phi_{NPQ}$  oproti kontrole. U varianty 300 bylo šestý i devátý den u všech koncentrací tZ  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_P$  srovnatelné s kontrolou. V případě  $\Phi_{NPQ}$  byly hodnoty u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> nižší než u kontrolních segmentů.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že tZ neměl výraznější zpomalující účinek na pokles obsahu chlorofylu, PRI a  $F_v/F_m$ , a to v žádné použité koncentraci a světelné variantě. Ve variantě tma bylo vlivem tZ pozorováno 9. den po oddělení potlačení nárůstu parametru  $\Phi_{f,D}$  a poklesu  $\Phi_P$ . Mírně pozitivní vliv byl zaznamenán u obou světelných variant na obsah chlorofylu 6. den po oddělení (u nejvyšší koncentrace) a ve variantě 100 na parametr  $F_v/F_m$  a na PRI (6. den po oddělení u koncentrace  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>).



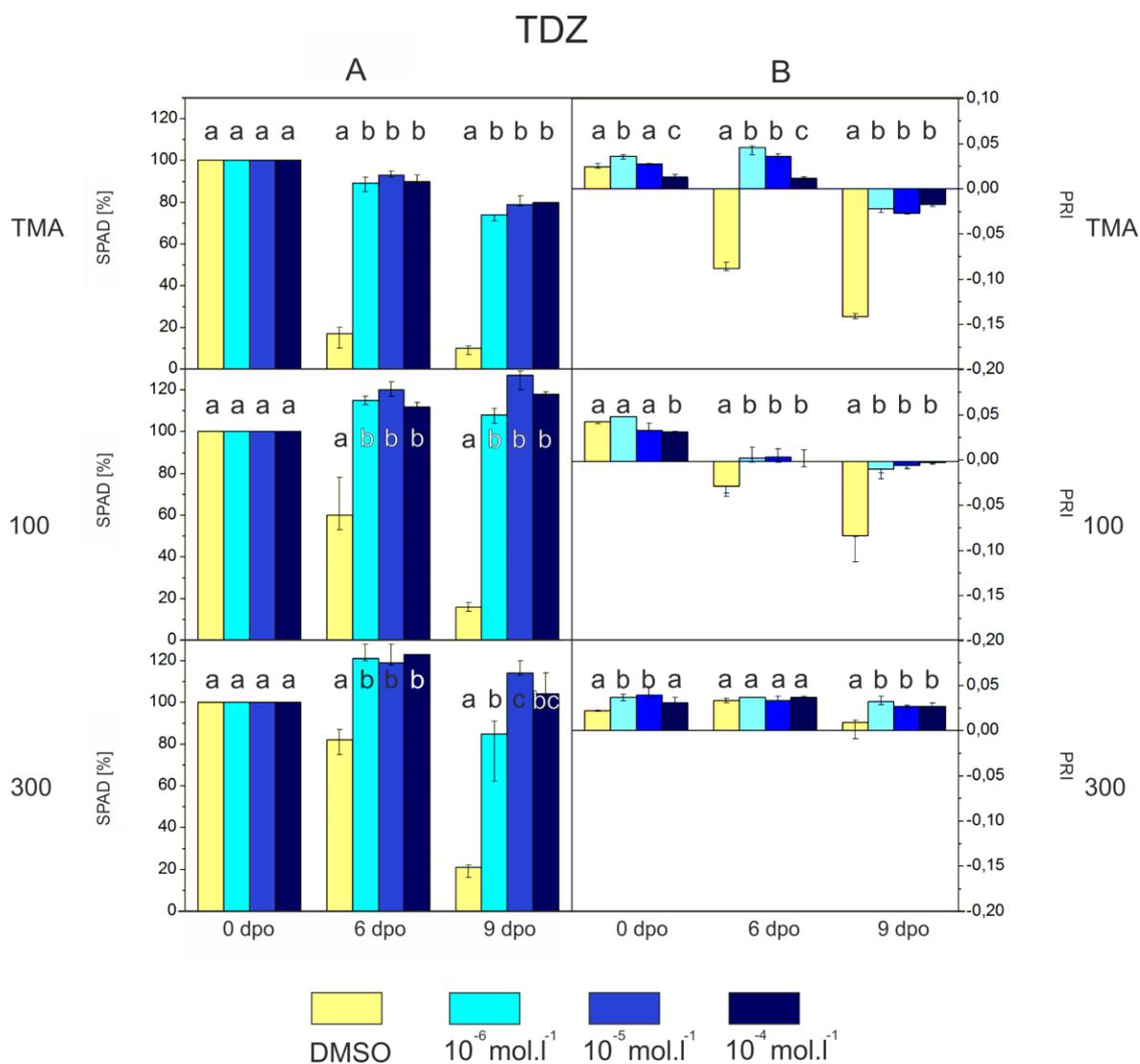


**Obr. 5:** Parametr  $F_v/F_m$  (A) a parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{fD}$  a  $\Phi_{NPQ}$  po šesti minutách působení aktinického světla (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků *trans*-zeatinu o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l $^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístroje FluorCam v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo), v případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení,  $n=5$ . Hodnoty  $F_v/F_m$  jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 0,799; tZ  $10^{-4}$  0,780; tZ  $10^{-5}$  0,784;  $10^{-6}$  0,790; 100: DMSO 0,801; tZ  $10^{-4}$  0,802; tZ  $10^{-5}$  0,773; tZ  $10^{-6}$  0,783; 300: DMSO 0,799; tZ  $10^{-4}$  0,779; tZ  $10^{-5}$  0,781; tZ  $10^{-6}$  0,785). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot. U parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{fD}$  a  $\Phi_{NPQ}$  bylo pro grafické znázornění využito vztahu  $\Phi_P + \Phi_{fD} + \Phi_{NPQ} = 1$ . Uvedeny jsou průměry, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

### 5.3 Thidiazuron

Výchozí hodnoty obsahu chlorofylu odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). U všech variant byl obsah chlorofylu u vzorků ošetřených TDZ výrazně vyšší než u kontroly, a to šestý i devátý den (Obr. 6A). Ve tmě poklesl obsah chlorofylu u segmentů inkubovaných v TDZ šestý den přibližně na 90 % původní hodnoty (kontrola 20 %) a devátý den pak na 80 % (kontrola 10 %). U světelných variant se v případě segmentů vystavených působení TDZ obsah chlorofylu šestý den dokonce zvýšil na přibližně 120 % hodnoty naměřené v den oddělení (9. den u varianty 300 na přibližně 105 %).

U vzorků inkubovaných ve tmě pod vlivem TDZ byly šestý i devátý den zaznamenány výrazně vyšší hodnoty PRI než u kontroly. U koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> došlo šestý den k mírnému nárůstu této hodnoty a u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> zůstaly hodnoty přibližně stejné jako v den oddělení, zatímco u kontrolních vzorků došlo k výraznému poklesu (Obr. 6B). U varianty 100 byl šestý i devátý den u vzorků v TDZ pozorován pokles hodnot, který však byl méně výrazný než u kontroly. Mezi jednotlivými koncentracemi TDZ nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly ani u jedné ze světelných variant. V případě varianty 300 byly šestý den hodnoty PRI srovnatelné s kontrolou a osmý den mírně vyšší než u kontroly.

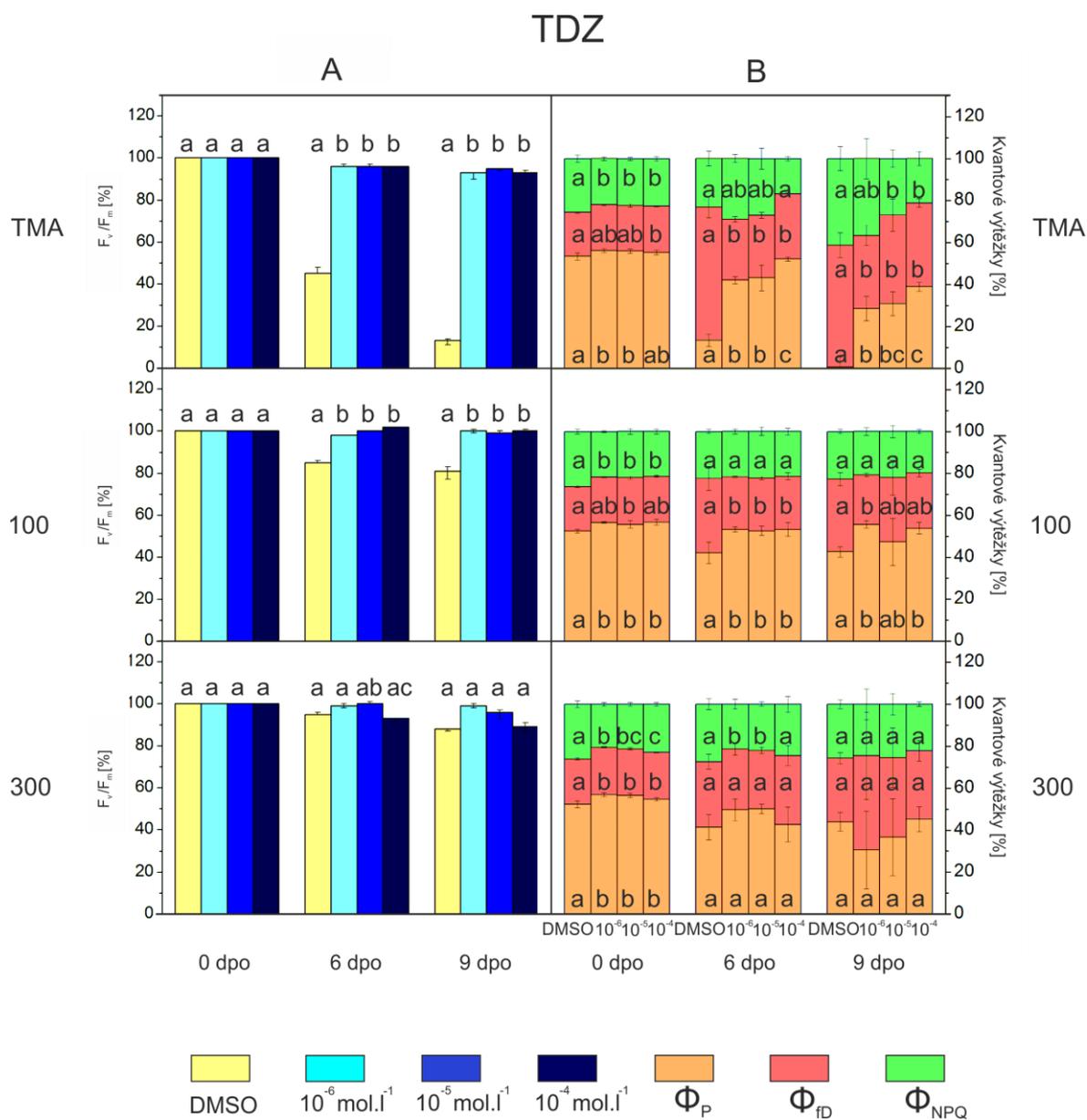


**Obr. 6:** Obsah chlorofylu (A) a fotochemický reflektanční index PRI (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků thidiazuronu o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístrojů SPAD-502 a PlantPen PRI v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo). V případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení. Hodnoty obsahu chlorofylu jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 48,1; TDZ  $10^{-4}$  48,1; TDZ  $10^{-5}$  47,1; TDZ  $10^{-6}$  47,6; 100: DMSO 44,7; TDZ  $10^{-4}$  45,6; TDZ  $10^{-5}$  43,8; TDZ  $10^{-6}$  44,3; 300: DMSO 45,6; TDZ  $10^{-4}$  44,8; TDZ  $10^{-5}$  44,1; TDZ  $10^{-6}$  44,2). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot,  $n = 5$ . Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

Výchozí hodnoty  $F_v/F_m$  u segmentů inkubovaných v TDZ odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). Ve srovnání s kontrolními vzorky bylo u segmentů uchovávaných ve tmě a ponořených v TDZ patrné velmi výrazné zpomalení poklesu parametru  $F_v/F_m$  (Obr. 7A). Šestý den byla hodnota nižší jen o přibližně 5 % (u kontroly o 55%), devátý den pak o přibližně 10 % (u kontroly 85 %) než hodnota naměřená v den oddělení segmentů. Mezi jednotlivými koncentracemi TDZ nebyl statisticky významný rozdíl. U varianty 100 bylo zpomalení poklesu  $F_v/F_m$  také zaznamenáno, hodnota parametru byla šestý i devátý den srovnatelná s hodnotou původní. U varianty 300 nebyl ani při jednom z měření pozorován významný rozdíl mezi kontrolou a jednotlivými koncentracemi.

Ve srovnání s kontrolou bylo u segmentů ošetřených TDZ a inkubovaných ve tmě výrazně vyšší  $\Phi_P$ , a to zejména u koncentrace  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , kdy šestý den dosahoval  $\Phi_P$  přibližně 50 % (kontrola 15%) a devátý den 40 % (kontrola 1 %) (Obr. 7B). U všech koncentrací TDZ byl  $\Phi_{f,D}$  šestý i devátý den nižší než u kontrolních vzorků. Parametr  $\Phi_{NPQ}$  byl šestý den u všech koncentrací srovnatelný s kontrolou a devátý den pak u koncentrací  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  nižší než u kontroly. U varianty 100 byla v případě  $\Phi_P$  hodnota šestý den vyšší než u kontroly, což bylo doprovázeno nižším  $\Phi_{f,D}$ . Devátý den byl  $\Phi_P$  u koncentrace TDZ  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  srovnatelný s kontrolou, zatímco u ostatních koncentrací byl vyšší. V případě  $\Phi_{f,D}$  byly naměřené hodnoty u nejnižší koncentrace nižší než u kontroly a u ostatních koncentrací obdobné. Parametr  $\Phi_{NPQ}$  byl šestý i devátý den srovnatelný s kontrolou. U varianty 300 byl statisticky významný rozdíl zaznamenán pouze šestý den v  $\Phi_{NPQ}$  u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , u kterých byla hodnota  $\Phi_{NPQ}$  mírně nižší než u kontroly. Ostatní naměřené hodnoty byly srovnatelné s kontrolou.

Z uvedených výsledků vyplývá, že TDZ měl výrazně zpomalující účinek na pokles obsahu chlorofylu ve tmě, na světle došlo dokonce k nárůstu obsahu chlorofylu u segmentů ošetřených TDZ. U všech variant, zejména ve tmě, měl TDZ výrazně zpomalující účinek na pokles PRI. V případě parametrů chlorofylové fluorescence měl TDZ velmi výrazný účinek na zpomalení poklesu  $F_v/F_m$  a  $\Phi_P$  a způsobil pokles hodnoty  $\Phi_{f,D}$ , a to zejména ve tmě (při PAR  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  měl TDZ uvedený účinek také, ale mírnější).

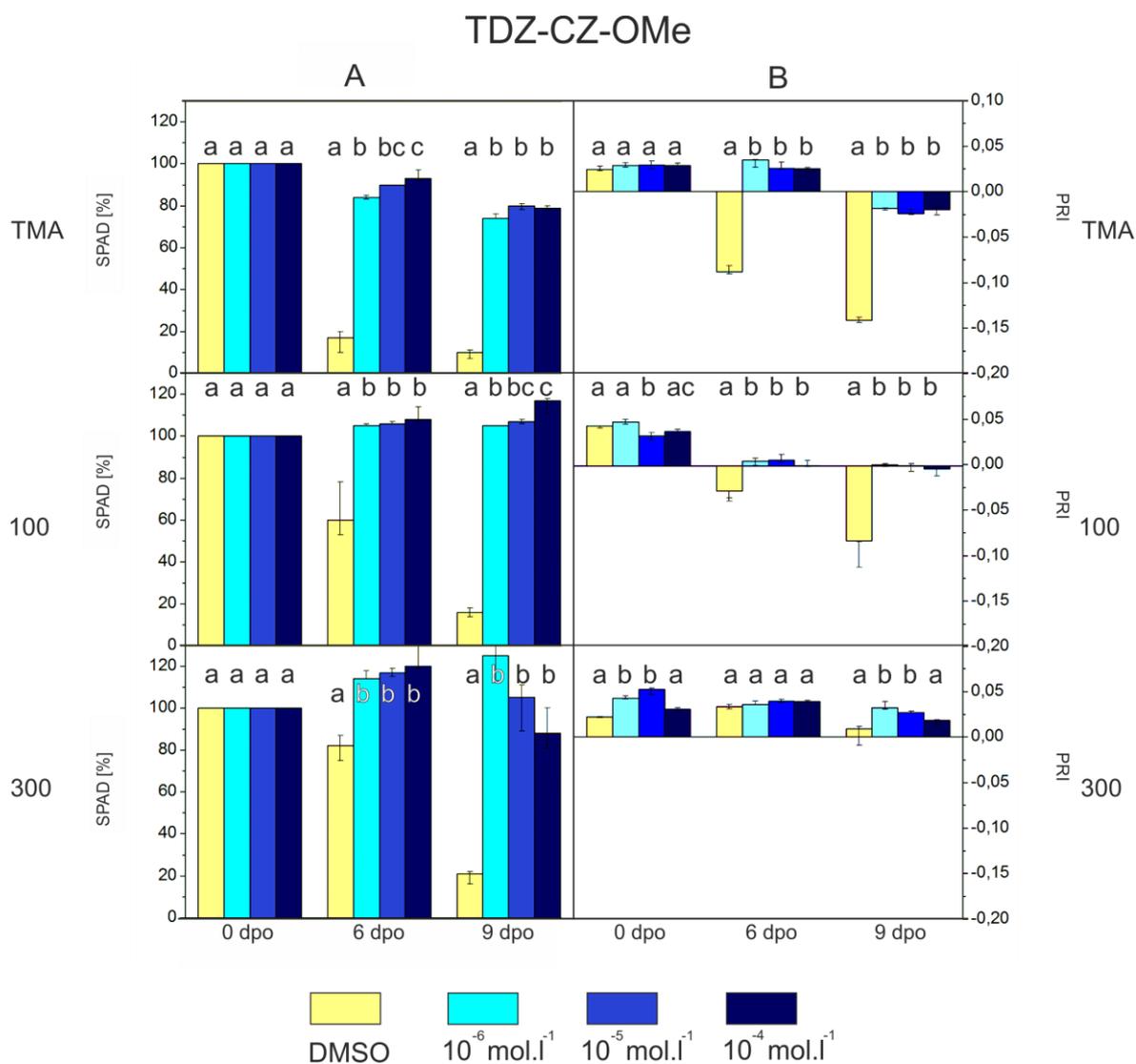


**Obr. 7:** Parametr  $F_v/F_m$  (A) a parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{FD}$  a  $\Phi_{NPQ}$  po šesti minutách působení aktinického světla (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků thidiazuronu o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístroje FluorCam v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo), v případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení,  $n = 5$ . Hodnoty  $F_v/F_m$  jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 0,799; TDZ  $10^{-4}$  0,784; TDZ  $10^{-5}$  0,778; TDZ  $10^{-6}$  0,782; 100: DMSO 0,801; TDZ  $10^{-4}$  0,785; TDZ  $10^{-5}$  0,773; TDZ  $10^{-6}$  0,771; 300: DMSO 0,799; TDZ  $10^{-4}$  0,771; TDZ  $10^{-5}$  0,782; TDZ  $10^{-6}$  0,795). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot. U parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{FD}$  a  $\Phi_{NPQ}$  bylo pro grafické znázornění využito vztahu  $\Phi_P + \Phi_{FD} + \Phi_{NPQ} = 1$ . Uvedeny jsou průměry, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

## 5.4 TDZ-CZ-OMe

Výchozí hodnoty obsahu chlorofylu odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). Během indukované senescence byl obsah chlorofylu u segmentů ponořených v TDZ-CZ-OMe u všech světelných variant výrazně vyšší ve srovnání s kontrolními vzorky (Obr. 8A). U varianty tma byl obsah chlorofylu šestý den přibližně 90 % původní hodnoty (kontrola 20 %) a devátý den 80 % (kontrola 10 %). V případě varianty 100 se obsah chlorofylu pohyboval šestý den kolem 105 % původní hodnoty. Devátý den byly u nejvyšší koncentrace TDZ-CZ-OMe hodnoty přibližně 120%. U varianty 300 byl velice výrazný rozdíl mezi kontrolou a TDZ-CZ-OMe pozorován osmý den, kdy byly naměřené hodnoty u segmentů ošetřených jednotlivými koncentracemi derivátu průměrně o 85 % vyšší.

U segmentů umístěných ve tmě byly naměřené hodnoty PRI výrazně vyšší než u kontroly, a to šestý i devátý den (Obr. 8B). U varianty 100 byl tento rozdíl mezi kontrolou a TDZ-CZ-OMe také pozorován, ale byl méně výrazný než u varianty tma. Nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi TDZ-CZ-OMe. V případě varianty 300 byly hodnoty naměřené osmý den u kontroly a nejvyšší koncentrace srovnatelné, u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> mírně vyšší.



**Obr. 8:** Obsah chlorofylu (A) a fotochemický reflektanční index PRI (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků TDZ-CZ-OMe o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístrojů SPAD-502 a PlantPen PRI v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo). V případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení. Hodnoty obsahu chlorofylu jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 48,1; TDZ-CZ-OMe  $10^{-4}$  48,3; TDZ-CZ-OMe  $10^{-5}$  48,8; TDZ-CZ-OMe  $10^{-6}$  48,0; 100: DMSO 44,7; TDZ-CZ-OMe  $10^{-4}$  44,3; TDZ-CZ-OMe  $10^{-5}$  44,9; TDZ-CZ-OMe  $10^{-6}$  44,2; 300: DMSO 45,6; TDZ-CZ-OMe  $10^{-4}$  44,3; TDZ-CZ-OMe  $10^{-5}$  44,2; TDZ-CZ-OMe  $10^{-6}$  46,2). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot,  $n = 5$ . Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

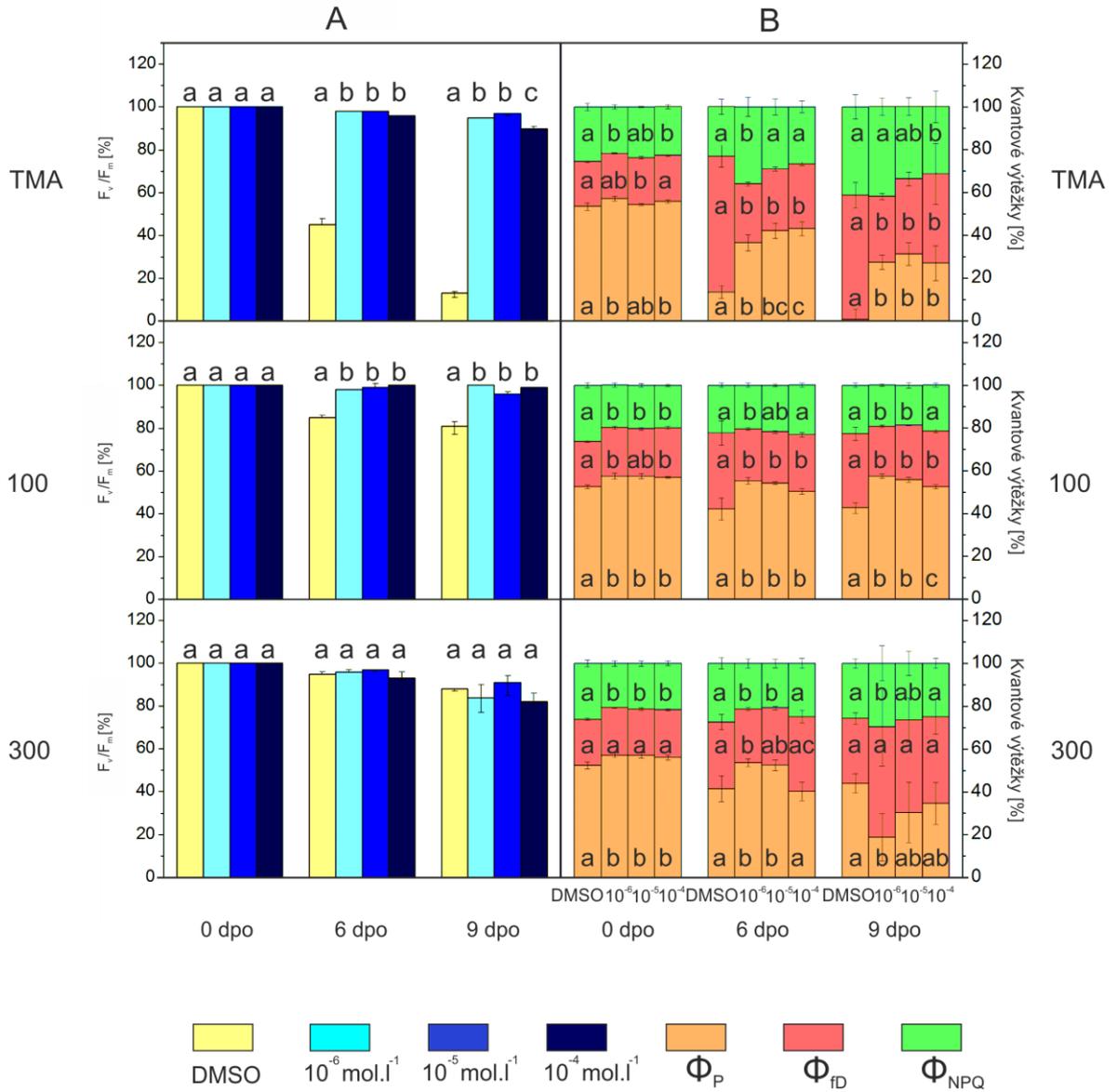
Výchozí hodnoty  $F_v/F_m$  u segmentů inkubovaných v TDZ-CZ-OMe odpovídaly hodnotám naměřeným u kontrolních vzorků (Tab. 1). Velmi výrazný rozdíl byl po oddělení listů pozorován ve variantě tma mezi hodnotami  $F_v/F_m$  u kontrolních segmentů a segmentů ošetřených derivátem (Obr. 9A). V případě TDZ-CZ-OMe dosahoval parametr šestý den přibližně 95 % (u kontroly 45 %) původní hodnoty. Devátý den se pak pohyboval kolem 90 % (u kontroly 15 %) hodnoty naměřené v den oddělení segmentů. V případě varianty 100 byly naměřené hodnoty  $F_v/F_m$  u segmentů ošetřených derivátem vyšší než u segmentů kontrolních a zůstaly šestý i devátý den prakticky nezměněny. V případě varianty 300 byly výsledky obdobné jako u kontroly. Mezi jednotlivými koncentracemi nebyl významný rozdíl ani u jedné ze světelných variant.

Hodnoty  $\Phi_P$  u ošetřených segmentů uchovávaných ve tmě byly ve srovnání s kontrolou vyšší, a to zejména u koncentrace TDZ-CZ-OMe  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ , kdy se šestý den hodnota  $\Phi_P$  pohybovala kolem 40 % (u kontroly 15 %) (Obr. 9B). Výrazně nižších hodnot dosahoval oproti kontrole  $\Phi_{f,D}$ , který šestý den dosahoval u všech použitých koncentrací přibližně 30 % (kontrola 60 %). V případě  $\Phi_{NPQ}$  byly hodnoty u koncentrace  $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  šestý den vyšší než u kontrolních segmentů, ale u ostatních koncentrací srovnatelné s kontrolou. Devátý den byl  $\Phi_P$  v porovnání s kontrolou vyšší,  $\Phi_{f,D}$  nižší a v případě  $\Phi_{NPQ}$  byla hodnota parametru nižší u koncentrace  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . U varianty 100 byl u koncentrace  $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$   $\Phi_{NPQ}$  mírně nižší, a to šestý i devátý den po oddělení. V porovnání s kontrolními vzorky vykazovaly segmenty ošetřené TDZ-CZ-OMe vyšší hodnoty  $\Phi_P$  (devátý den byl  $\Phi_P$  u nejvyšší koncentrace mírně nižší než u ostatních koncentrací) a nižší hodnoty  $\Phi_{f,D}$ . V případě varianty 300 byl šestý den po oddělení u koncentrace  $10^{-6}$  a  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$   $\Phi_P$  vyšší a  $\Phi_{NPQ}$  nižší než u kontroly. Osmý den se od kontroly nejvíce lišila koncentrace TDZ-CZ-OMe  $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ , kdy se  $\Phi_P$  pohyboval kolem 20 % (kontrola 45 %),  $\Phi_{f,D}$  kolem 50 % (kontrola 30 %) a  $\Phi_{NPQ}$  kolem 30 % (kontrola 25 %).

Z uvedených výsledků vyplývá, že aplikace TDZ-CZ-OMe výrazně zpomalila pokles obsahu chlorofylu ve tmě a u osvětlených variant způsobila jeho nárůst. Vlivem TDZ-CZ-OMe došlo u variant tma a 100 ke zpomalení poklesu PRI,  $F_v/F_m$  a  $\Phi_P$  a ke zpomalení nárůstu  $\Phi_{f,D}$ .



## TDZ-CZ-OMe

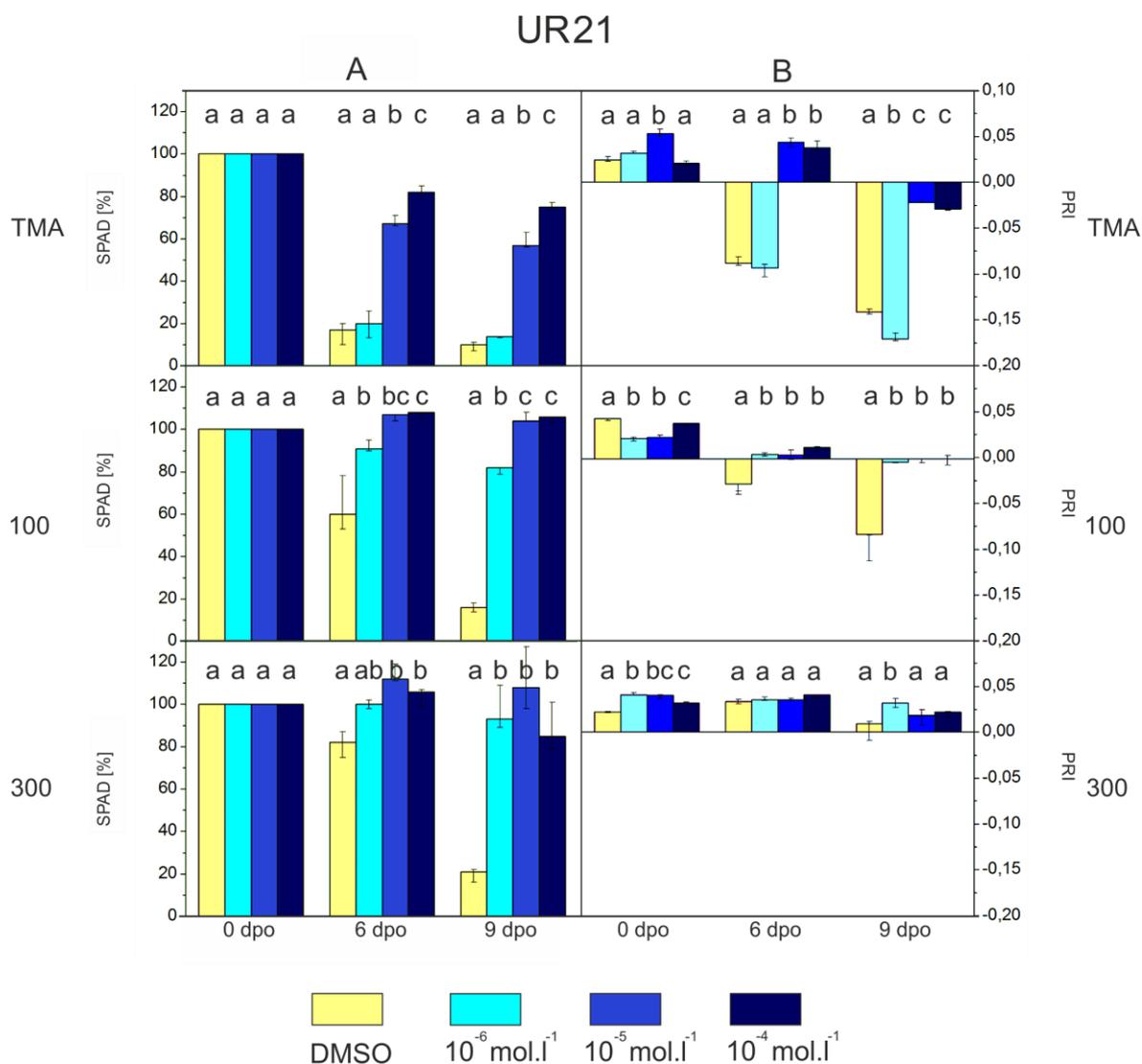


**Obr. 9:** Parametr  $F_v/F_m$  (A) a parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{fD}$  a  $\Phi_{NPQ}$  po šesti minutách působení aktinického světla (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků TDZ-CZ-OMe o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístroje FluorCam v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo), v případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení,  $n = 5$ . Hodnoty  $F_v/F_m$  jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 0,799; TDZ-CZ-OMe  $10^{-4}$  0,791; TDZ-CZ-OMe  $10^{-5}$  0,780; TDZ-CZ-OMe  $10^{-6}$  0,778; 100: DMSO 0,801; TDZ-CZ-OMe  $10^{-4}$  0,784; TDZ-CZ-OMe  $10^{-5}$  0,783; TDZ-CZ-OMe  $10^{-6}$  0,778; 300: DMSO 0,799; TDZ-CZ-OMe  $10^{-4}$  0,794; TDZ-CZ-OMe  $10^{-5}$  0,790; TDZ-CZ-OMe  $10^{-6}$  0,803). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot. U parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{fD}$  a  $\Phi_{NPQ}$  bylo pro grafické znázornění využito vztahu  $\Phi_P + \Phi_{fD} + \Phi_{NPQ} = 1$ . Uvedeny jsou průměry, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

## 5.5 UR21

Výchozí hodnoty obsahu chlorofylu odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). V případě segmentů uchovávaných ve tmě a ošetřených cytokininovým derivátem UR21 o koncentraci  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> došlo k poklesu obsahu chlorofylu srovnatelnému s kontrolními vzorky (Obr. 10A). U ostatních koncentrací UR21 byl obsah chlorofylu výrazně vyšší než u kontroly, zejména pak u nejvyšší koncentrace (šestý den přibližně 80 % původní hodnoty, u kontroly 20 %). Ve tmě byly tedy zaznamenány vyšší hodnoty obsahu chlorofylu s rostoucí koncentrací UR21. U světelných variant byl pozorován významný rozdíl oproti kontrolním vzorkům u všech koncentrací derivátu, a to zejména devátý den po oddělení. V případě varianty 100 se šestý i devátý den obsah chlorofylu u koncentrací  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> pohyboval kolem 110 % původní hodnoty. U varianty 300 byl obsah chlorofylu u těchto koncentrací přibližně 110 % šestý den (kontrola 80 %) a u všech koncentrací průměrně 95 % osmý den (kontrola 20 %).

U segmentů varianty tma v roztoku UR21 o koncentraci  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> byla šestý den hodnota PRI srovnatelná s kontrolními vzorky a devátý den pak nižší než u kontroly (Obr. 10B). U ostatních koncentrací byl PRI velmi výrazně vyšší. V případě varianty 100 byly hodnoty PRI vyšší než u kontroly, přičemž devátý den byl rozdíl mezi kontrolou a UR21 výraznější. Mezi jednotlivými koncentracemi tohoto derivátu nebyly statisticky významné rozdíly. U varianty 300 nebyly zaznamenány výrazné rozdíly oproti kontrolním vzorkům, s výjimkou mírně vyšší hodnoty u nejnižší koncentrace v osmý den měření.



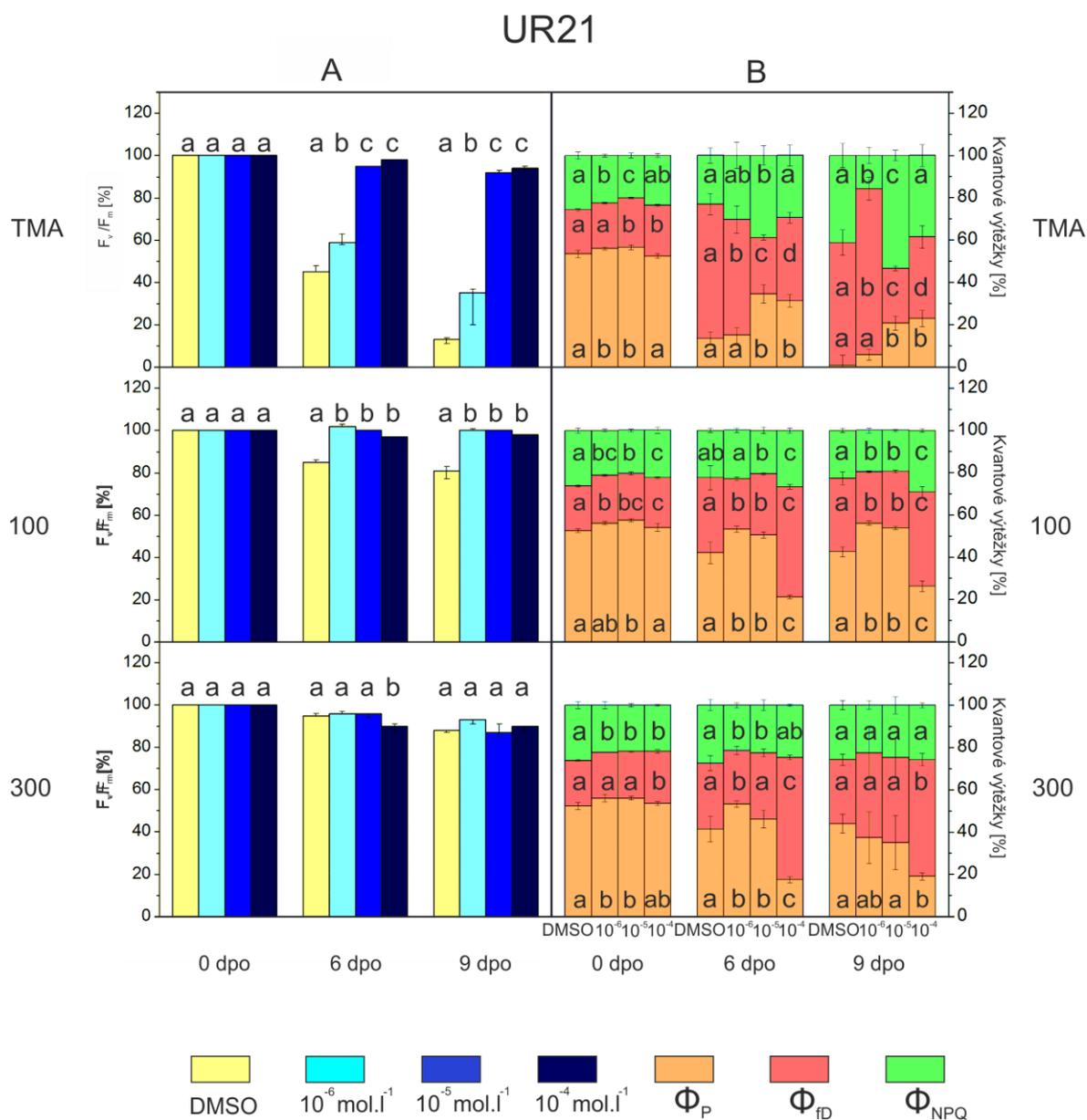
**Obr. 10:** Obsah chlorofylu (A) a fotochemický reflektanční index PRI (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků UR21 o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístrojů SPAD-502 a PlantPen PRI v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo). V případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení. Hodnoty obsahu chlorofylu jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 48,1; UR21  $10^{-4}$  48,5; UR21  $10^{-5}$  48,3; UR21  $10^{-6}$  47,3; 100: DMSO 44,7; UR21  $10^{-4}$  45,4; UR21  $10^{-5}$  43,4; UR21  $10^{-6}$  44,7; 300: DMSO 45,6; UR21  $10^{-4}$  44,8; UR21  $10^{-5}$  45,1; UR21  $10^{-6}$  45,3). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot,  $n = 5$ . Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

Výchozí hodnoty  $F_v/F_m$  u segmentů inkubovaných v UR21 odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). Nejvýraznější rozdíl v hodnotě parametru  $F_v/F_m$  u kontrolních a ošetřených segmentů byl pozorován v případě varianty tma, a to konkrétně u koncentrací UR21  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (Obr. 11A). Pokles  $F_v/F_m$  u těchto koncentrací činil jen přibližně 5 % šestý den (u kontroly 55%) a do 10 % devátý den (u kontroly 85 %) hodnoty naměřené v den oddělení. U varianty 100 byl u všech koncentrací zaznamenán pouze nepříliš výrazný rozdíl v hodnotách  $F_v/F_m$  oproti kontrole. U varianty 300 byly získané výsledky srovnatelné s kontrolou s výjimkou  $F_v/F_m$  šestý den u nejvyšší koncentrace, kdy byla naměřena hodnota mírně nižší než u kontrolních vzorků.

U vzorků uchovávaných ve tmě byly zaznamenány největší rozdíly v parametrech chlorofylové fluorescenční indukce, a to mezi kontrolou a UR21 i mezi jednotlivými použitými koncentracemi (Obr. 11B). Šestý i devátý den byla hodnota  $\Phi_P$  u nejnižší koncentrace srovnatelná s kontrolou, u ostatních koncentrací byla hodnota vyšší. Výrazné rozdíly byly pozorovány u parametru  $\Phi_{f,D}$ . U koncentrace  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> se hodnota  $\Phi_{f,D}$  pohybovala kolem 55 % (kontrola 60 %) šestý den a kolem 80 % devátý den (kontrola 60 %). U koncentrace  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> byl  $\Phi_{f,D}$  šestý i devátý den přibližně 25 % a u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> šestý den přibližně 40 % a devátý den 35 %. V případě  $\Phi_{NPQ}$  byl šestý den největší rozdíl mezi kontrolou (25 %) a koncentrací  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> (40 %). Devátý den pak byl  $\Phi_{NPQ}$  u nejvyšší koncentrace srovnatelný s kontrolou (40 %), u koncentrace  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> vyšší (55 %) a u koncentrace  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> výrazně nižší (15 %). V případě světelné varianty 100 byl  $\Phi_P$  šestý den u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> přibližně 55 %, tedy vyšší než u kontroly (40 %) a u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> 20 %, tedy naopak nižší než u kontroly. Devátý den byly výsledky obdobné. U  $\Phi_{f,D}$  byly hodnoty šestý den u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> přibližně 25 %, tedy nižší než u kontroly (40 %) a u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> přibližně 50 %, tedy naopak vyšší než u kontroly. Devátý den byly získané výsledky obdobné. U parametru  $\Phi_{NPQ}$  byla šestý den hodnota u nejvyšší koncentrace mírně vyšší, přibližně 25 % oproti 20 % u kontroly, u ostatních koncentrací byly hodnoty srovnatelné s kontrolou. Devátý den byly hodnoty u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> mírně nižší a u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> naopak vyšší (30 %) než u kontroly (20 %). V případě varianty 300 byly šestý den u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> naměřeny hodnoty  $\Phi_P$  kolem 50 % (kontrola 40 %), devátý den už byly hodnoty srovnatelné s kontrolou. U koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> byl naopak  $\Phi_P$  nižší v porovnání s kontrolními segmenty, přibližně 20 % šestý

i devátý den. Výrazný rozdíl vůči kontrole byl v případě  $\Phi_{f,D}$  naměřen u nejvyšší koncentrace UR21, kdy se šestý den hodnota pohybovala kolem 60 % a devátý den kolem 55 % (30 % u kontroly v obou dnech). V případě  $\Phi_{NPQ}$  byly šestý den hodnoty u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> mírně nižší než u kontroly, ale osmý den už byly hodnoty získané u všech koncentrací srovnatelné s kontrolními vzorky.

Z uvedených výsledků je patrný různý vliv použitých koncentrací a světelných podmínek na působení UR21. Zatímco ve tmě byl nejvýraznější zpomalující efekt změny obsahu chlorofylu, PRI i parametry chlorofylové fluorescence pozorován u dvou nejvyšších koncentrací a nejnižší koncentrace byla srovnatelná s kontrolou nebo se od ní lišila jen mírně, při PAR 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  bylo u obsahu chlorofylu, PRI a  $F_v/F_m$  už její působení srovnatelné s ostatními koncentracemi. V případě parametrů chlorofylové fluorescenční indukce je u obou osvětlených variant patrný negativní vliv nejvyšší koncentrace, tj. urychlení jejich změn v důsledku indukované senescence.

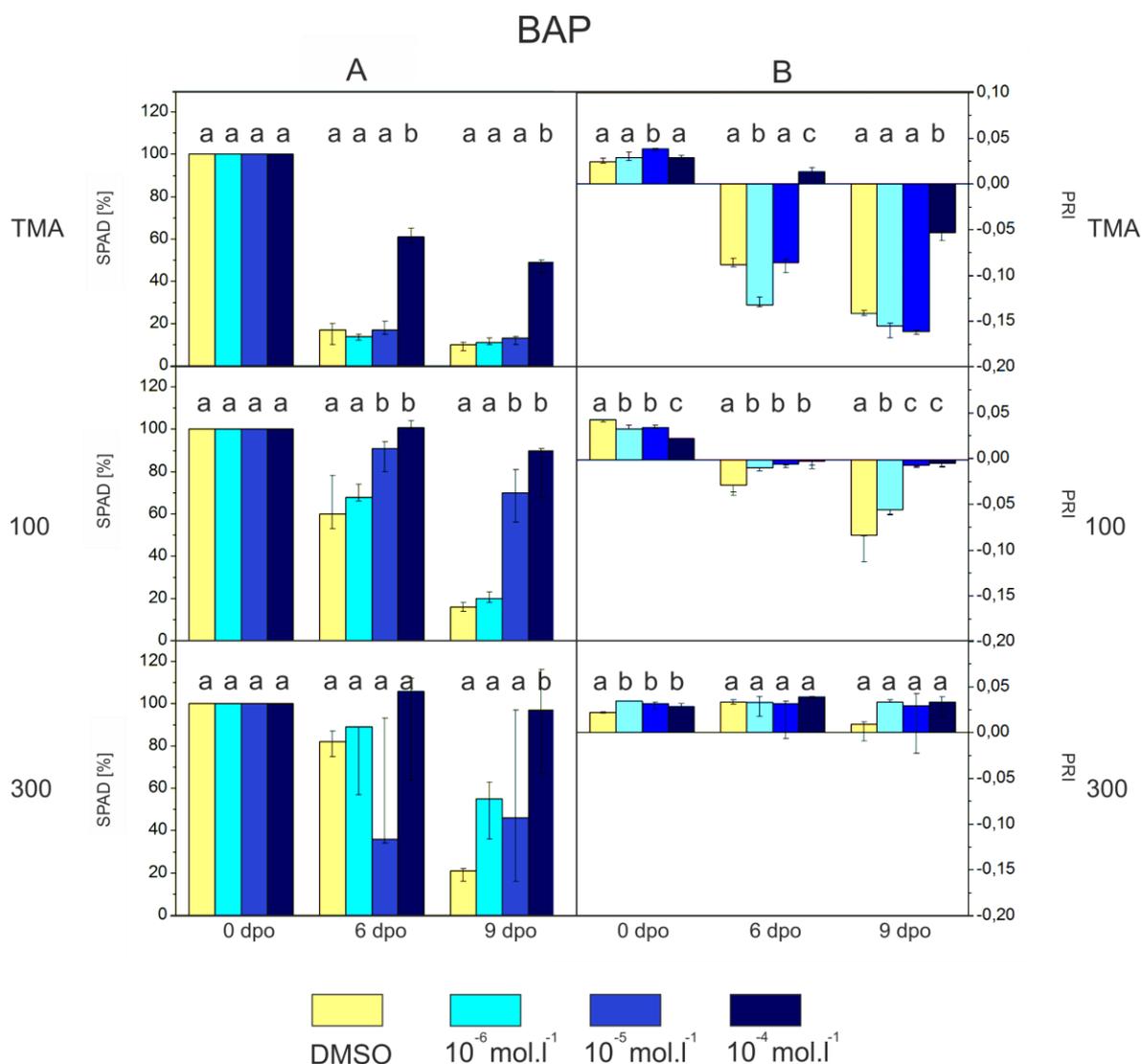


**Obr. 11:** Parametr  $F_v/F_m$  (A) a parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$  po šesti minutách působení aktinického světla (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků UR21 o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Měření bylo provedeno pomocí přístroje FluorCam v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo), v případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení,  $n = 5$ . Hodnoty  $F_v/F_m$  jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 0,799; UR21  $10^{-4}$  0,800; UR21  $10^{-5}$  0,777; UR21  $10^{-6}$  0,785; 100: DMSO 0,801; UR21  $10^{-4}$  0,777; UR21  $10^{-5}$  0,778; UR21  $10^{-6}$  0,799; 300: DMSO 0,799; UR21  $10^{-4}$  0,787; UR21  $10^{-5}$  0,797; UR21  $10^{-6}$  0,782). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot. U parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$  bylo pro grafické znázornění využito vztahu  $\Phi_P + \Phi_{f,D} + \Phi_{NPQ} = 1$ . Uvedeny jsou průměry, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

## 5.6 N<sup>6</sup>-benzylaminopurin

Výchozí hodnoty obsahu chlorofylu odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). Ve srovnání s kontrolními vzorky byl u varianty tma pozorován vliv pouze u koncentrace BAP  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (Obr. 12A). Obsah chlorofylu byl šestý den přibližně 60 % původní hodnoty (kontrola a ostatní koncentrace přibližně 20 %) a devátý den 50 % (kontrola a ostatní koncentrace 10 %). U varianty 100 se od kontroly významně lišily hodnoty naměřené u koncentrací  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>, a to zejména devátý den, kdy byl obsah chlorofylu u těchto koncentrací přibližně 80 % původní hodnoty (kontrola a nejnižší koncentrace přibližně 15 %). V případě varianty 300 byla u listových segmentů zaznamenána poměrně vysoká heterogenita, což pravděpodobně způsobilo velké rozdíly mezi naměřenými hodnotami.

U varianty tma byly výrazně vyšší hodnoty PRI než u kontrolních vzorků zaznamenány pouze u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (Obr. 12B). V případě varianty 100 byl u roztoků BAP šestý den PRI mírně vyšší než u kontroly. Mezi jednotlivými koncentracemi nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Devátý den po oddělení byl PRI u koncentrací  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> vyšší než u kontroly i nejnižší koncentrace. U varianty 300 nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi kontrolou a jednotlivými koncentracemi BAP.



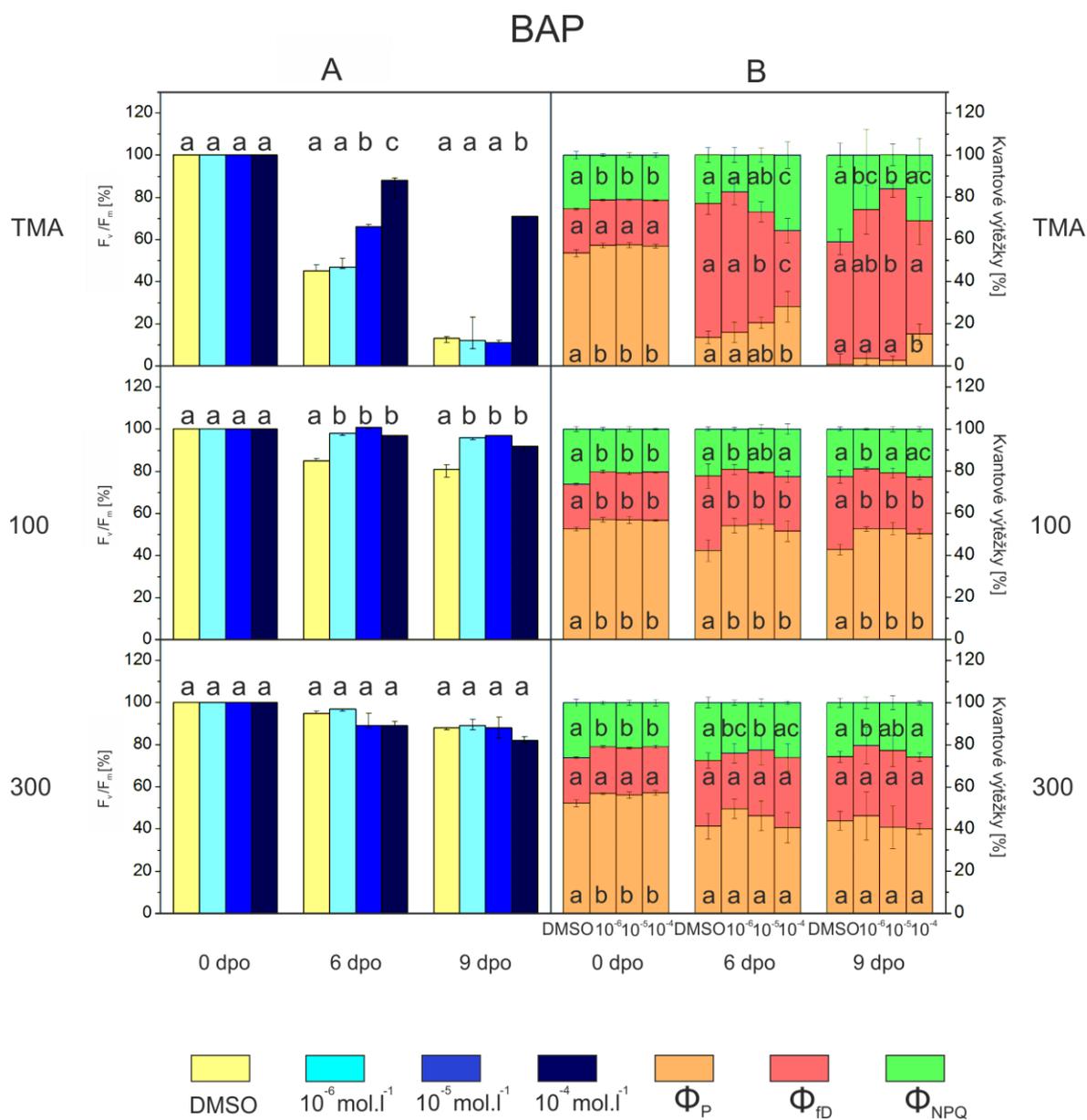
**Obr. 12:** Obsah chlorofylu (A) a fotochemický reflektanční index PRI (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pomocí přístrojů SPAD-502 a PlantPen PRI v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo). V případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení. Hodnoty obsahu chlorofylu jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 48,1; BAP  $10^{-4}$  45,9; BAP  $10^{-5}$  46,3; BAP  $10^{-6}$  46,6; 100: DMSO 44,7; BAP  $10^{-4}$  44,2; BAP  $10^{-5}$  45,1; BAP  $10^{-6}$  43,8; 300: DMSO 45,6; BAP  $10^{-4}$  43,5; BAP  $10^{-5}$  44,7; BAP  $10^{-6}$  44,0). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot, n = 5. Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.



Výchozí hodnoty  $F_v/F_m$  u segmentů inkubovaných v BAP odpovídaly hodnotám u kontrolních vzorků (Tab. 1). Nejvýraznější vliv BAP na parametr  $F_v/F_m$  ve tmě byl zaznamenán u koncentrace  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (Obr. 13A). Ve srovnání s kontrolou došlo k poklesu parametru pouze o 15 % šestý den (u kontroly o 55 %) a o 30 % devátý den (u kontroly o 85 %). U varianty 100 byly šestý a devátý den u segmentů ošetřených BAP hodnoty  $F_v/F_m$  obdobné jako v den oddělení, asi o 15 - 20 % vyšší než u kontroly. U varianty 300 byly získané výsledky srovnatelné s kontrolou.

U vzorků inkubovaných ve tmě v BAP o koncentraci  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> byly ve srovnání s kontrolou zjištěny vyšší hodnoty  $\Phi_P$ , šestý den přibližně 30 % (u kontroly 15 %) a devátý den přibližně 15 % (1 % u kontroly) (Obr. 13B). U nejnižší koncentrace byl  $\Phi_{f,D}$  srovnatelný s kontrolou. Šestý den byl u koncentrací  $10^{-5}$  (přibližně 55 %) a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (přibližně 35 %)  $\Phi_{f,D}$  nižší než u kontroly (60 %), ale devátý den byly hodnoty  $\Phi_{f,D}$  u koncentrace  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> naopak vyšší (kolem 70 %) než u kontroly (60 %). U nejvyšší koncentrace byl  $\Phi_{f,D}$  srovnatelný s kontrolou. Výrazný rozdíl v  $\Phi_{NPQ}$  mezi ošetřenými a kontrolními vzorky byl pozorován šestý den u koncentrace BAP  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (35 %, u kontroly 25 %) a devátý den u koncentrace  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> (15 %, u kontroly přibližně 40 %). U varianty 100 byl šestý i devátý den  $\Phi_P$  vyšší u segmentů ponořených v BAP (přibližně 55 %) než u kontroly (40 %), s čímž souvisela nižší hodnota  $\Phi_{f,D}$  u ošetřených segmentů (kolem 35 %) než u kontroly (40 %). Šestý i devátý den byl  $\Phi_{NPQ}$  u nejnižší koncentrace nižší než u kontroly, ostatní použité koncentrace byly s kontrolou srovnatelné. V případě varianty 300 byly parametry  $\Phi_P$  a  $\Phi_{f,D}$  srovnatelné s kontrolou a  $\Phi_{NPQ}$  byl v porovnání s kontrolou mírně nižší u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> (Obr. 12B).

Ze získaných výsledků je patrný výrazně zpomalující vliv nejvyšší koncentrace BAP na pokles obsahu chlorofylu, PRI a  $F_v/F_m$  ve tmě. Při PAR 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  byl tento vliv pozorován u koncentrací  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> (v případě  $F_v/F_m$  u všech koncentrací BAP). U parametrů chlorofylové fluorescenční indukce došlo ve variantě tma k největšímu zlepšení 6. den po oddělení u nejvyšší koncentrace a v případě varianty 100 došlo k mírnému zlepšení, tedy zpomalení poklesu  $\Phi_P$  a nárůstu  $\Phi_{f,D}$ , u všech koncentrací BAP.



**Obr. 13:** Parametr  $F_v/F_m$  (A) a parametry  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$  po šesti minutách působení aktinického světla (B) během indukované senescence oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě, na PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (100) a  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (300). Listové segmenty byly ponořeny řezem do 0,2% roztoku DMSO (kontrola) a do roztoků N<sup>6</sup>-benzylaminopurinu o koncentraci  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Měření bylo provedeno pomocí přístroje FluorCam v den oddělení (0 dpo) a šestý (6 dpo) a devátý den po oddělení (9 dpo), v případě varianty 300 bylo poslední měření prováděno osmý den po oddělení, n = 5. Hodnoty  $F_v/F_m$  jsou uvedeny v % hodnoty naměřené v den oddělení (tma: DMSO 0,799; BAP  $10^{-4}$  0,782; BAP  $10^{-5}$  0,784; BAP  $10^{-6}$  0,798; 100: DMSO 0,801; BAP  $10^{-4}$  0,773; BAP  $10^{-5}$  0,775; BAP  $10^{-6}$  0,794; 300: DMSO 0,799; BAP  $10^{-4}$  0,782; BAP  $10^{-5}$  0,783; BAP  $10^{-6}$  0,782). Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí horní a dolní kvartil naměřených hodnot. U parametrů  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$  bylo pro grafické znázornění využito vztahu  $\Phi_P + \Phi_{f,D} + \Phi_{NPQ} = 1$ . Uvedeny jsou průměry, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku. Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci světelné varianty a v rámci dne po oddělení.

## 6 Diskuze

Je známo, že v průběhu senescence dochází k poklesu obsahu chlorofylu (např. Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006) a ke změnám parametrů chlorofylové fluorescence jako je maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II označovaný jako  $F_v/F_m$ , který s postupující senescencí klesá. (Roháček a Barták 1999, Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006, Prokopová a kol. 2010) nebo parametr NPQ, který odráží míru disipace absorbované energie na teplo, který v průběhu senescence nejprve narůstá a v poslední fázi života listů klesá (Roháček a Barták 1999, Roháček a kol. 2002, Dai a kol. 2004, Hendrickson a kol. 2004). V průběhu senescence dochází také ke změnám aktuálního kvantového výtěžku fotochemie PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), který ukazuje, jak velké množství energie absorbované anténami PSII je přeměněno na fotochemickou energii (např. Kalaji a kol. 2014). Tento parametr je na stresy zpravidla citlivější než parametr  $F_v/F_m$  a také v průběhu senescence poměrně výrazně klesá (Dai a kol. 2004). V literatuře je používán také pod označením  $\Phi_P$  (Hendrickson a kol. 2004, Lazár 2015). Kvantový výtěžek konstitutivního neregulačního nefotochemického zhášení ( $\Phi_{f,D}$ ) udává jak velká část absorbované energie je ztracena konstitutivní tepelnou disipací a fluorescencí, přičemž větší část tvoří tepelná disipace (Hendrickson a kol. 2004). Další parametr, který je možno použít při posouzení míry senescence, je fotochemický reflektanční index (PŘI). Tento parametr při senescenci klesá, jednak z důvodu poklesu obsahu chlorofylu (Gamon a Surfus 1999), jednak z důvodu poklesu  $\Phi_{PSII}$  (např. Gamon a Bond 2013).

V rámci této práce byl sledován vliv různých koncentrací cytokininů a cytokininových derivátů na obsah chlorofylu, fotochemický reflektanční index a parametry chlorofylové fluorescence ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_P$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$ ) během indukované senescence u oddělených listů pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) ve tmě a na PAR o různé intenzitě. Jako kontrolní byl použit roztok DMSO (o koncentraci  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>) využívaný jako rozpouštědlo při přípravě roztoků cytokininů.

U vzorků inkubovaných v DMSO a uchovávaných ve tmě byl s postupující dobou od oddělení listových segmentů pozorován velmi výrazný pokles obsahu chlorofylu, hodnot PRI,  $F_v/F_m$  a  $\Phi_P$  doprovázený nárůstem  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$ . Tyto získané výsledky jsou v souladu s literaturou (např. Špundová a kol. 2003, Dai a kol. 2004, Hendrickson a kol. 2004, Vlčková a kol. 2006, Prokopová a kol. 2010), kde je také uvedeno, že působení PAR do

určité intenzity průběh senescence zpomaluje. Stejných výsledků bylo dosaženo i u kontrolních vzorků inkubovaných při PAR o intenzitě  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy bylo pozorováno zpomalení poklesu obsahu chlorofylu, hodnot PRI,  $F_v/F_m$  a  $\Phi_P$  doprovázené zpomalením nárůstu parametrů  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$ . V literatuře (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006) je rovněž uvedeno, že působení PAR o vyšší intenzitě může mít negativní efekt na průběh senescence, tedy nedojde ke zpomalení senescence, ale naopak k jejímu urychlení. U kontrolních vzorků uchovávaných při PAR o intenzitě  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , nebyl tento efekt pozorován. V případě obsahu chlorofylu, PRI a  $F_v/F_m$  bylo naopak pozorováno výraznější zpomalení poklesu těchto hodnot v porovnání s nižší použitou intenzitou PAR. U parametrů chlorofylové fluorescenční indukce bylo dosaženo obdobných výsledků jako u varianty 100. Je pravděpodobné, že použitá ozáření byla u varianty 300 relativně nízká vzhledem k tomu, že pěstební ozáření byla  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Melkovičová ve své bakalářské práci (2012) uvádí, že v reakci rostlin na působení PAR hraje roli právě i intenzita PAR, na kterou jsou rostliny aklimatizované.

Schopnosti cytokininů a cytokininových derivátů oddalovat senescenci se věnovala celá řada autorů a jedná se o téma, které je poměrně dobře zdokumentováno (Gan a Amasino 1995, Holub a kol. 1998, Ferrante a kol. 2002, Karavaiko a kol. 2004, Doležal a kol. 2006, Vlčková a kol. 2006, Prokopová a kol. 2010, Sergiev a kol. 2007, Mik a kol. 2011a, b). Antisenescenční aktivita CK je nejčastěji stanovována za pomoci senescenčního testu probíhajícího ve tmě na oddělených listech pšenice, který je založen na schopnosti CK oddálit degradaci chlorofylu v průběhu indukované senescence. V naší práci byly na oddělené listové segmenty sedmidenní pšenice exogenně aplikovány roztoky cytokininů tZ, TDZ a BAP a nových cytokininových derivátů odvozených od fenylnmočoviny s označením TDZ-CZ-OMe a UR21. U vzorků v TDZ a TDZ-CZ-OMe umístěných ve tmě byl zaznamenáno velmi výrazné zpomalení změn spojených s indukovanou senescencí, a to u všech použitých koncentrací. Obdobných výsledků bylo dosaženo i u roztoků UR21, ale pouze ve vyšších použitých koncentracích ( $10^{-5}$  a  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a u BAP v případě nejvyšší použité koncentrace ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Výrazně pozitivní vliv TDZ-CZ-OMe na zachování fotosyntetického aparátu listů inkubovaných ve tmě byl potvrzen také výsledky testovacích měření nativní elektroforézy pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán: v roztoku TDZ-CZ-OMe o koncentraci  $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo 6. dpo toto složení nezměněno oproti čerstvě odděleným listům (nepublikovaná data). Při použití tZ byly získané výsledky srovnatelné s kontrolou a tedy se výrazně liší od informací uváděných

v literatuře, např. Holub a kol. (1998) uvádí u tZ vyšší antisenescenční aktivitu než u BAP po čtyřdenní inkubaci ve tmě. V testovacích experimentech předcházejících experimentům popsaným v rámci této práce bylo také pozorováno výrazné zpomalení senescence ve tmě vlivem tZ. Ztráta antisenescenční aktivity roztoku tZ by mohla souviset s delší dobou (několik měsíců), která uběhla mezi přípravou a použitím roztoku tZ v experimentu.

Vzhledem k tomu, že působení PAR do určité intenzity samo o sobě zpomaluje senescenci, nebyl za použití PAR efekt působení cytokininů na senescenci tak výrazný jako u experimentů prováděných ve tmě. V případě tZ byly získané výsledky opět srovnatelné s kontrolou, a tedy nebyl pozorován jeho pozitivní vliv na oddálení senescence. Mírně pozitivní vliv tZ byl zaznamenán pouze v případě  $F_v/F_m$  (u obou variant) a 6. den po oddělení ve variantě 100 na obsah chlorofylu u nejvyšší koncentrace a na PRI u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>. Vlivem TDZ a derivátu TDZ-CZ-OMe byl u varianty 100 zaznamenán nárůst obsahu chlorofylu, u TDZ 6 dpo na 120 % hodnoty naměřené v den oddělení a u TDZ-CZ-OMe na 105 % šestý den a na 120 % devátý den po oddělení. Ostatní změny provázející senescenci (pokles PRI,  $F_v/F_m$  a  $\Phi_P$  doprovázený nárůstem  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$ ) byly těmito látkami zpomaleny také, ale méně výrazně než u segmentů uchovávaných ve tmě. Při aplikaci BAP bylo výrazné zpomalení poklesu obsahu chlorofylu zaznamenáno u koncentrací  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> a v případě PRI devátý den po oddělení u koncentrací  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>. Pozitivní vliv všech koncentrací BAP byl zaznamenán v případě parametrů chlorofylové fluorescence ( $\Phi_{NPQ}$  byl u vyšších koncentrací srovnatelný s kontrolou).

V literatuře (např. Prokopová a kol. 2010, Melkovičová 2012) se uvádí, že působení CK za přítomnosti PAR je ovlivněno nejen intenzitou použitého PAR, ale i koncentrací roztoku použitého cytokininu. Koncentrace vyšší než určitá hraniční koncentrace může mít za následek negativní efekt cytokininu na průběh senescence, kdy je senescence namísto zpomalení urychlena. Tato hraniční koncentrace se u jednotlivých cytokininů liší. Z výsledků získaných při exogenní aplikaci nového cytokininového derivátu s označením UR21 je patrný vliv koncentrace a světelných podmínek na působení UR21. Ve tmě bylo největší zpomalení senescence (pozitivní vliv na obsah chlorofylu, PRI i parametry chlorofylové fluorescence) pozorováno u dvou nejvyšších koncentrací ( $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup>). Působení nejnižší koncentrace ( $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>) bylo srovnatelné s kontrolou nebo se od ní lišilo jen mírně. Ve variantě 100 už bylo u nejnižší koncentrace zpomalení poklesu obsahu

chlorofylu, PRI a  $F_v/F_m$  srovnatelné s ostatními koncentracemi. V případě parametrů chlorofylové fluorescenční indukce byl u varianty 100 i 300 zaznamenán negativní vliv nejvyšší koncentrace na průběh senescence (pokles  $\Phi_P$  doprovázený nárůstem  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{NPQ}$ ). Výsledky získané při použití UR21 jsou v souladu se závěry o kombinovaném působení koncentrace CK a PAR na senescenci uváděnými v literatuře.

Vlčková a kol. (2006) uvádí, že vlivem příliš vysoké intenzity a doby působení PAR je senescence výrazně urychlena vlivem přeexcitování fotosyntetického aparátu a fotooxidativního poškození. Tento negativní efekt je spojen také s vyššími koncentracemi cytokininů (např. Prokopová a kol. 2010). Ve variantě 300 by tedy měl být patrný negativní vliv působení vysokého PAR v kombinaci s cytokininy, k čemuž však, s výjimkou derivátu UR21 v nejvyšší koncentraci, nedošlo. U většiny použitých látek se jejich účinky při PAR o intenzitě  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  příliš nelišily od kontroly, nebyl tedy patrný žádný negativní efekt působení cytokininů na senescenci v této variantě. Výsledky byly většinou srovnatelné s variantou 100 nebo došlo ještě k mírnému zlepšení (např. u obsahu chlorofylu, PRI nebo  $F_v/F_m$ ) ve srovnání s nižší použitou intenzitou PAR. V případě vzorků inkubovaných v TDZ-CZ-OMe bylo ve variantě 300 zaznamenáno velmi výrazné zpomalení poklesu obsahu chlorofylu, kdy byly devátý den po oddělení u segmentů ošetřených derivátem hodnoty obsahu chlorofylu průměrně o 85 % vyšší než u kontrolních segmentů. Příčinou tohoto rozporu mezi získanými výsledky a literaturou by mohla být nedostatečně vysoká intenzita PAR, ve které byly vzorky inkubovány vzhledem k pěstební intenzitě PAR a dále také skutečnost, že při inkubaci segmentů bylo použito PAR periodické a ne kontinuální, a tedy použitá dávka PAR byla relativně nízká. V práci Melkovičové (2012) se negativní účinek PAR na senescenci projevoval zejména u variant, kde bylo použito PAR kontinuální. Dalším důvodem také může být použití nižších koncentrací, než jsou koncentrace tzv. hraniční.

## 7 Závěr

Cytokinininy jsou rostlinné hormony, které mají celou řadu biologických účinků. Mezi nejvýznamnější z nich patří jejich antisenescenční aktivita, která byla pozorována nejen u přirozeně se vyskytujících a syntetických cytokininů, ale i u jejich nejrůznějších derivátů. Oddálení senescence působením cytokininů je ovlivněno velkým množstvím faktorů, jako je intenzita a doba působení PAR nebo koncentrace a struktura použitých cytokininů a jejich derivátů. V rámci této práce bylo srovnáváno působení dvou nově připravených cytokininových derivátů odvozených od fenylmočoviny s označením TDZ-CZ-OMe a UR21 s cytokininou *trans*-zeatinem, thidiazuronem a N<sup>6</sup>-benzylaminopurinem na průběh indukované senescence u oddělených listových segmentů pšenice seté (*Triticum aestivum* L.). Antisenescenční aktivita byla srovnávána mezi roztoky o koncentracích 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> ve tmě a za působení fotosynteticky aktivního záření o intenzitě 100 a 300 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, a to na základě obsahu chlorofylu, hodnoty fotochemického reflektančního indexu a parametrů chlorofylové fluorescence. U většiny použitých cytokininů a cytokininových derivátů byl zaznamenán pozitivní účinek na zpomalení sledovaných změn spojených se senescencí, a to zejména ve tmě. Výjimkou byl *trans*-zeatin, u kterého byly, navzdory očekávání, získané výsledky zpravidla obdobné jako u kontroly neošetřené cytokinininy. Efekt testovaných koncentrací byl ve většině případů kvalitativně i kvantitativně velmi podobný. Při inkubaci listových segmentů za působení PAR nebyl účinek cytokininů tak výrazný jako u segmentů uchovávaných ve tmě, vzhledem k pozitivnímu účinku, jaký mělo PAR na oddálení senescence. V případě derivátu UR21 byl u parametrů chlorofylové fluorescenční indukce ve variantách inkubovaných při působení PAR pozorován negativní vliv nejvyšší použité koncentrace na průběh senescence. U jiných látek tento efekt zaznamenán nebyl. Při exogenní aplikaci derivátu TDZ-CZ-OMe bylo zjištěno velmi výrazné zpomalení senescence. Při působení PAR společně s TDZ-CZ-OMe byl zaznamenán dokonce nárůst obsahu chlorofylu oproti hodnotám naměřeným v den oddělení, přičemž obdobné výsledky byly získány také v případě thidiazuronu a UR21. Vzhledem k negativnímu účinku UR21 na fotosyntetický aparát v nejvyšší použité koncentraci (10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup>) při současném působení PAR bylo nejvyšší antisenescenční aktivity dosaženo v případě derivátu TDZ-CZ-OMe.

## 8 Literatura

- Balibrea Lara ME, Gonzales Garcia MC, Fatima T, Ehness R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell* 16: 1276-1287
- Biswal B (1995) Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 30: 3-13
- Buchanan-Wollaston V (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiology* 105: 839-846
- Buchanan-Wollaston V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181-199
- Coupe SA, Watson LM, Ryan DJ, Pinkney TT, Eason JR (2004) Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. *Journal of Experimental Botany* 55: 59-68
- Chang JC, Kao CH (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. *Plant Growth Regulation* 25: 11-15
- Chatfield JM, Armstrong DJ (1986) Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues *Phaseolus vulgaris* L. cv. Great northern. *Plant Physiology* 80: 493-499
- Chernyad'ev II, Monakhova OF (2003) Effect of cytokinin preparations on the pools of pigments and proteins of wheat cultivars differing in their tolerance to water stress. *Applied Biochemistry and Microbiology* 39: 524-531
- Dai J, Gao H, Dai Y, Zou Q (2004) Changes in activity of energy dissipating mechanisms in wheat flag leaves during senescence. *Plant Biology* 6: 171-177



- Desimone M, Henke A, Wagner E (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylaseoxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiology* 111: 789–796
- Desimone M, Wagner E, Johanningmeier U (1998) Degradation of active-oxygen modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylaseoxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta* 205: 459–466
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101
- Doležal K, Popa I, Kryštof V, Spíchal L, Fojtíková M, Holub J, Lenobel R, Schmölling T, Strnad M (2006) Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 875-884
- Ferrante A, Hunter DA, Hackett WP, Reid MS (2002) Thidiazuron – a potent inhibitor of leaf senescence in *Alstroemeria*. *Postharvest Biology and Technology* 25: 333-338
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* 62: 2431-2452
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev IP, Galuszka P, Klíma P, Gaudinová A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, Vaňková R, Strnad M, Motyka V (2011) Distribution, biological activities, metabolism and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinis in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 2827-2840
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, Sauer P, Jacobsen S, Peč P (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* 268: 450-461

- Gamon JA, Bond B (2013) Effects of irradiance and photosynthetic downregulation on the photochemical reflectance index in Douglas-fir and ponderosa pine. *Remote Sensing of Environment* 132: 141-149.
- Gamon JA, Surfus JS (1999) Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143: 105-117
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986-1988
- Gan S, Amasino RM (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319
- Genkov T, Ivanova I (1995) Effect of cytokinin-active phenylurea derivatives on shoot multiplication, peroxidase and superoxide dismutase activities of *in vitro* cultured carnation. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 21: 73-83
- Gonzales-Rizzo S, Crespi M, Frugier F (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Synorhizobium meliloti*. *The Plant Cell* 18: 2680-2693
- Grbić V, Bleecker AB (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 8: 595-602
- Guo Y, Gan S (2005) Leaf senescence: signals, execution and regulation. *Current Topics in Developmental Biology* 71: 83-112
- Hare PD, van Staden J (1994) Inhibitory effect of thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant and Cell Physiology* 35: 1121-1125
- He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* 128: 876-884

- Hendrickson L, Furbank RT, Chow WS (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 82: 73-81
- Holub J, Hanuš J, Hanke DE, Strnad M (1998) Biological activity of cytokinins derived from Ortho- and Meta-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* 26: 109-115
- Hörtensteiner S, Feller U (2001) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Biology* 53: 927-937
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063
- Jordi W, Stoopen GM, Kelepouris K, van der Krieken WM (1995) Gibberellin-induced delay of leaf senescence of *Alstroemeria* cut flowering stems is not caused by an increase in the endogenous cytokinin content. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 121-127
- Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Dąbrowski P, Elsheery NI, Ferroni L, Guidi L, Hogewoning SW, Jajoo A, Misra AN, Nebauer SG, Pancaldi S, Penella C, Poli DB, Pollastrini M, Romanowska-Duda ZB, Rutkowska D, Serôdio J, Suresh K, Szulc W, Tambussi E, Yanniccari M, Zivcak M (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research* 122: 121-158
- Karavaiko NN, Selivankina SY, Kudryakova NV, Maslova GG, Burkhanova EA, Zubkova NK, Kulaeva ON (2004) Is a 67-kD cytokinin binding protein from barley and *Arabidopsis thaliana* leaves involved in the leaf responses to phenylurea derivatives? (A Review). *Russian Journal of Plant Physiology* 51: 878-886

- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H (2004) Distinct isoprenoid origins of cis- and trans- Zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 14049-14064
- Khanna-Chopra R (2012) Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma* 249: 469-481
- Kim JI, Murphy AS, Baek D, Lee SW, Yun DJ, Bressan RA, Narasimhan ML (2011) YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62: 3981-3992
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 814-819
- Kopečný D, Briozzo P, Popelová H, Šebela M, Končítiková R, Spíchal L, Nisler L, Madzak C, Frébort I, Laloue M, Houba-Hérin N (2010) Phenyl- and benzylurea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: A structural study. *Biochimie* 92: 1052-1062
- Lazár D (2015) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* 175: 131-147
- Lee ED, Bennett JH, Heggestad HE (1981) Retardation of senescence in red clover leaf disks by a new antiozonant, N-[2-(2-oxo-imidazolidinyl)ethyl]-N'-phenylurea. *Plant Physiology* 67: 347-350
- Letham DS, Miller CO (1965) Identity of kinetin-like factors from *Zea mays*. *Plant and Cell Physiology* 6: 355-359

- Lim PO, Lee IC, Kim J, Kim HJ, Ryu JS, Woo HR, Nam HG (2010) Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of Experimental Botany* 61: 1419-1430
- Mae T, Thomas H, Gay AP, Makino A, Hidema J (1993) Leaf development in *Lolium temulentum*. Photosynthesis and photosynthetic proteins in leaves senescing under different irradiances. *Plant and Cell Physiology* 34: 391-399
- Melkovičová H (2012) Koncentračná závislosť účinkov cytokinínov na indukovanú senescenciu rastlín. Bakalárska práca. Univerzita Palackého v Olomouci
- Mik V, Szüčová L, Spíchal L, Plíhal O, Nisler J, Zahajská L, Doležal K, Strnad M (2011a) N9-substituted N<sup>6</sup>-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]purine derivatives and their biological activity in selected cytokinin bioassays. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 7244-7251
- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad L, Spíchal L (2011b) N9-substituted derivatives of kinetin: effective antisenescent agents. *Phytochemistry* 72: 821-831
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of American Chemical Society* 77: 1392-1392
- Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin degradation and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118
- Munné-Bosch S, Allegre L (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* 214: 608-615
- Nam HG (1997) The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 200-207

- Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, A-H-Mackerness S, Buchanan-Wollaston V (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 54: 2285-2292
- Noodén LD, Hillsberg JW, Schneider MJ (1996) Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiologia Plantarum* 96: 491-495
- Noodén LD, Giuamét JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* 101: 746-753
- Novák J, Pavlů J, Novák O, Nožková-Hlaváčková V, Špundová M, Hlavinka J, Koukalová Š, Skalák J, Černý M, Brzobohatý B (2013) High cytokinin levels induce hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of Botany* 112: 41-55
- Okada K, Inoue Y, Satoh K, Katoh S (1992) Effect of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. *Plant Cell Physiology* 33: 1183-1191
- Pavalan-Ünsal N, Çağ S, Çetin E, Büyüktunçer D (2002) Retardation of senescence by *meta*-topolin in wheat leaves. *Journal of Cell and Molecular Biology* 1: 101-108
- Podlešáková K, Zalabák D, Čudejková M, Plíhal O, Szüčová L, Doležal K, Spíchal L, Strnad M, Galuszka P (2012) Novel cytokinin derivatives do not show negative effect on root growth and proliferation in submicromolar range. *PLoS ONE* 7: e39293
- Prokopová J, Špundová M, Sedlářová M, Husičková A, Novotný R, Doležal K, Nauš J, Lebeda A (2010) Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 716-723

- Riefler M, Novák O, Strnad M, Schmülling T (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell* 18:40-54
- Río LA del, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E, Hernández JA (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195-1200
- Roháček K, Barták M (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339-363
- Roháček K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29
- Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, Hishiyama S, Asami T, Okada K, Kamuya Y, Yamaya T, Yamaguchi S (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9972-9977
- Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449
- Schlüter T, Leide J, Conrad K (2011) Light promotes an increase of oxidase/dehydrogenase activity during senescence of barley leaf segments. *Journal of Plant Physiology* 168: 694-698
- Selivankina SY, Karavaiko NN, Kuiper D, Novikova GV, Kulaeva ON (2001) Cytokinin activity of zeatin allylic phosphate, a natural compound. *Plant Growth Regulation* 33: 157-164

- Sergiev I, Todorova D, Somleva M, Alexieva V, Karanov E, Stanoeva E, Lachkova V, Smith A, Hall M (2007) Influence of cytokinins and novel cytokinin antagonists on the senescence of detached leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 51: 377-380
- Simeonova E, Sikora A, Charzyllska M, Mostowska A (2000) Aspects of programmed cell death during leaf senescence of mono- and dicotyledonous plants. *Protoplasma* 214: 93-101
- Smart CM (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* 126: 419-448
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmölling T (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3 differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* 45: 1299-1305
- Spíchal L (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* 39: 267-284
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H, Mizuno T (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology* 42:107-113
- Špundová M, Popelková H, Ilík P, Skotnica J, Novotný R, Nauš J (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescencing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* 160: 1051-1058
- Špundová M, Strzałka K, Nauš J (2005) Xantophyll cycle activity in detached barley leaves senescing under dark and light. *Photosynthetica* 43: 117-124



- Tarkowská D, Doležal K, Tarkowski P, Ástot C, Holub J, Fuksová K, Schmölling T, Sandberg G, Strnad M (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
- Thompson JE, Legge LR, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist* 105: 317-344
- Thompson E, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research* 37: 119-141
- Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T (2001a) Novel family of of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 42: 231-235
- Ueguchi C, Sato S, Kato T, Tabata S (2001b) The *AHK4* gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 42: 751-755
- Vlčková A, Špundová M, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nauš J (2006) Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126: 257-267
- Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* 37: 455–469
- Weaver LM, Amasino RM (2001) Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* 127: 876-886
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmölling T (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* 8: 371-381

Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T (2001) The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* 42: 1017-1023

Zimmerman P, Zentgraf U (2005) The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10: 515-534