



**UNIVERZITA PALACKÉHO  
V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů**

**Účinek nově syntetizovaných cytokininových derivátů na  
parametry fluorescence chlorofylu *a*, optické odrazivosti listů  
a obsahu chlorofylu v oddělených listech ječmene**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Zuzana Švestková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2023

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zuzana Švestková
Název práce	Účinek nově syntetizovaných cytokininových derivátů na parametry fluorescence chlorofylu <i>a</i> , optické odrazivosti listů a obsahu chlorofylu v oddělených listech ječmene
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra chemické biologie
Vedoucí práce	Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>V bakalářské práci byly testovány účinky šesti nově syntetizovaných derivátů cytokininů na obsah chlorofylu, parametry optické odrazivosti listu a velmi rychlé a pomalé fluorescenční indukce při umělé senescenci tmou v oddělených listech ječmene. V teoretické části práce je shrnuta problematika zabývající se senescencí, vlivem cytokininů na fotosyntézu při umělé senescenci a aplikovanými metodami měření fluorescence chlorofylu <i>a</i>, difúzní odrazivosti listu a relativního obsahu chlorofylu. Exogenní aplikace derivátů cytokininů ponořením oddělených listů ječmene do příslušných roztoků odhalila mírné protektivní účinky látky 2 a 6 v závislosti na době jejich působení a době tmy. V porovnání s DMSO byl u těchto látek pozorován vyšší kvantový výtěžek fotochemie PSII, pomalejší redukce <math>Q_A^-</math>, menší relativní zastoupení antén PSII, větší obsah chlorofylu a větší kvantový výtěžek a účinnost elektronového transportu k PSI. Nicméně žádná z látek nevykazovala protektivní účinky lepší než pozitivní kontrola BAP. Byla také odhalena heterogenita plochy listů v souvislosti s působením jednotlivých látek poukazující na význam použití více metod při testování látek.</p>
Klíčová slova	Senescence, senescence vyvolána tmou, fotosyntéza, deriváty cytokininů, fluorescence chlorofylu, odrazivost a propustnost listu
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Zuzana Švestková
Title of thesis	Effect of new cytokinin derivatives on chlorophyll <i>a</i> fluorescence parameters, indexes of optical reflectance and chlorophyll content in detached barley leaves
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Chemical Biology
Supervisor	Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	<p>In the bachelor thesis the effects of six newly synthesized cytokinin derivatives on chlorophyll content, leaf optical reflectance parameters and very fast and slow fluorescence induction under artificial dark senescence in detached barley leaves were tested. The theoretical part of the thesis summarizes the issues related to senescence, the effect of cytokinins on photosynthesis under artificial senescence and the applied methods for measuring chlorophyll <i>a</i> fluorescence, diffuse leaf reflectance and relative chlorophyll content. Exogenous application of cytokinin derivatives by immersion of detached barley leaves in the respective solutions revealed moderate protective effects of compounds 2 and 6 depending on their exposure time and darkness period. Compared with DMSO, higher quantum yield of PSII photochemistry, slower <math>Q_A^-</math> reduction, lower relative abundance of PSII antennas, higher chlorophyll content, and higher quantum yield and efficiency of electron transport to PSI were observed for these substances. However, none of the compounds showed protective effects better than the positive BAP control. Heterogeneity of leaf area in relation to the effects of each substance was also revealed, indicating the importance of using multiple methods when testing substances.</p>
Keywords	Senescence, dark-induced senescence, photosynthesis, cytokinin derivatives, chlorophyll fluorescence, leaf reflectance and transmittance
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne \_\_\_\_\_

#### Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D. za ochotu a čas strávený při práci na experimentech a za odborné vedení při vypracování bakalářské práce. Také bych ráda vyjádřila své poděkování paní Mgr. Magdaléně Bryksové, Ph.D. za syntézu látek pro experimentální část práce.

# OBSAH

1	Současný stav řešené problematiky .....	1
1.1	Senescence .....	1
1.1.1	Senescence vyvolána tmou (umělá senescence) .....	2
1.2	Fotosyntéza a senescence .....	2
1.3	Cytokininy .....	4
1.4	Cytokininy a jejich vliv na fotosyntézu při umělé senescenci .....	5
1.5	Fluorescence chlorofylu <i>a</i> .....	6
1.5.1	Velmi rychlá a pomalá fluorescenční indukce .....	7
1.6	Propustnost a odrazivost listu .....	9
2	Experimentální část .....	12
2.1	Rostlinný materiál a jeho příprava .....	12
2.2	Chemikálie a roztoky .....	13
2.3	Přístrojová technika .....	15
2.4	Programové vybavení .....	15
2.5	Použité metody .....	15
2.5.1	Velmi rychlá fluorescenční indukce .....	15
2.5.2	Pomalá fluorescenční indukce .....	15
2.5.3	Propustnost a odrazivost listu .....	17
2.6	Vyhodnocení dat a statistická analýza .....	17
3	Výsledky .....	18
3.1	Velmi rychlá fluorescenční indukce .....	18

3.2 Pomalá fluorescenční indukce .....	26
3.3 Propustnost a odrazivost listu .....	28
4 Diskuze .....	30
5 Závěr .....	33
6 Literatura.....	34

## Abecední seznam zkratk a symbolů

A	rychlost asimilace CO <sub>2</sub>
(dV/dt) <sub>0</sub>	parametr počátečního sklonu nárůstu fluorescence O-J
ABS/RC	zdánlivá velikosti antény aktivního PSII
ARCK	aromatické cytokininy
BAP	6-benzylaminopurin
CAB	vazebné proteiny fotosystému II
cZ	ciz-zeatin
DMSO	dimethylsulfoxid
E1-E3	experiment 1-3
F <sub>0</sub>	minimální hodnoty fluorescence při stavu přizpůsobenému tmě
F' <sub>0</sub>	minimální hodnoty fluorescence při stavu přizpůsobenému světlu
F <sub>M</sub>	maximální hodnoty fluorescence při stavu přizpůsobenému tmě
F' <sub>M</sub>	maximální hodnoty fluorescence při stavu přizpůsobenému světlu
F <sub>t</sub>	stabilní hodnota zhášecí fluorescence
F <sub>V</sub>	variabilní fluorescence při stavu přizpůsobenému tmě
F' <sub>V</sub>	variabilní fluorescence při stavu přizpůsobenému světlu
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII v temnotně adaptovaném stavu
I (F <sub>I</sub> )	intenzita fluorescence ve vlně I (30ms) OJIP
iP	6-(2-isopentenylamino)purin
ISCK	isoprenoidní cytokininy
J (F <sub>J</sub> )	intenzita fluorescence ve vlně J (2-3 ms) OJIP
Kin	kinetin
Látka č. 1	(2R,3R,4R,5R)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-5-(6-((3-methoxybenzyl)amino)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol
Látka č. 2	(2R,3R,4R,5R)-4-fluoro-5-(6-((3-hydroxybenzyl)amino)-9H-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol
Látka č. 3	(2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-((3-hydroxyphenethyl)amino)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol
Látka č. 4	(2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-((3-methoxyphenethyl)amino)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol



Látka č. 5	N-phenethyl-9 <i>H</i> -purin-6-amine
Látka č. 6	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-5-(6-((3-methoxybenzyl)amino)-9 <i>H</i> -purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol
NDVI	normalizovaný rozdílový vegetační index
NIR	blízké infračervené světlo
NPQ	nefotochemické zhášení
O ( $F_0$ )	nejnižší hodnota fluorescence v počátku O (40-50 $\mu$ s) OJIP
OJIP	0-J-I-P křivka velmi rychlé fluorescenční indukce
P ( $F_P$ )	maximální hodnota fluorescence v bodě P (200-300 ms) OJIP
PRI	fotchemický index odrazivosti listů
PSI (P700)	fotosystém I
PSII (P680)	fotosystém II
$Q_A^-$	redukovaný plastochinon A
$Q_B^-$	redukovaný plastochinon B
qP	parametr fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu <i>a</i>
RC	reakční centra
RE <sub>0</sub> /ABS	kvantový výtěžek přenosu elektronů z $Q_A^-$ na konečné akceptory PSI
RH	relativní vlhkost
ROS	reaktivní kyslíkový derivát
TR <sub>0</sub> /RC	maximální tok zachycené excitační energie na aktivní PSII
tZ	trans-zeatin
$V_I$	parametr variabilní fluorescence počítaný 30 ms po osvětlení
$V_J$	parametr variabilní fluorescence počítaný 2-3 ms po osvětlení
$\delta R_0$	parametr účinnosti přenosu elektronů na PSI
$\Phi_{f,D}$	parametr kvantového výtěžku neregulovaného nefotochemického zhášení
$\Phi_{NPQ}$	parametr kvantového výtěžku regulovaného nefotochemického zhášení
$\Phi_P$	maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII při stavu přizpůsobenému světlu
$\Phi_{PSII}$	aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII při stavu přizpůsobenému světlu

## Úvod

Cytokininy jsou látky, které se přirozeně vyskytují v rostlinách a ovlivňují mnoho fyziologických procesů. Jedním z jejich účinků je regulace procesu stárnutí (Plihalova et al. 2016). Senescence je přirozeně se vyskytující vývojový proces programované degradace, při které rostlina remobilizuje důležité živiny ze stárnoucích do aktivně se rozvíjejících pletiv a tím přispívá ke zvýšení celkového růstu a reprodukčního úspěchu rostliny (Sade et al. 2018). Mimo postupný proces stárnutí může být rostlina vystavena stresu vnějšího prostředí, který se podílí na předčasné senescenci listů (Gan 2018). U obilovin hlavním podílem na produktivitě a plnění zrna má zejména fotosyntéza v praporcovitých listech (Quirino et al. 2000). Nedostatek světla v podobě silného zastínění listů vede k urychlení senescence, což má za následek pokles produkce a značnou ztrátu na úrodě (Zwicke et al. 2015).

Fluorescence chlorofylu slouží pro měření aktivity fotosystému II (PSII) a je hojně používanou metodou ve fyziologii rostlin díky snadnému a rychlému sběru dat. Díky citlivosti aktivity PSII na biotické a abiotické stresy lze hodnotit stav fotosyntetického aparátu rostlin a posoudit vliv různých faktorů na fotosyntézu (Murchie et al. 2013). Jeden z hlavních faktorů pro růst a výnos plodin je obsah chlorofylu v rostlinách. Pomocí neinvazivních optických metod založených na odrazivosti či propustnosti listů lze stanovit relativní obsah chlorofylu, který odráží stres a fyziologický stav rostliny (Cassol et al. 2008). Pomocí neinvazivních biofyzikálních metod lze tak poměrně rychle a přesně odhalit protektivní efekt cytokininů na fotosyntézu, působení stresu případně urychlení senescence u rostlin.

## Cíle práce

V teoretické části práce:

- Zpracovat přehled problematiky zabývající se vlivem cytokininů na senescenci rostlin, účinky exogenně aplikovaných cytokininů na fotosyntézu a vysvětlit princip aplikovaných metod pro měření fotosyntetické aktivity a optických vlastností listu.

V praktické části práce:

- Naučit se ovládat metodiku měření pomalé a velmi rychlé fluorescenční indukce pomocí zařízení FluorCam 800 MF firmy Photon System Instruments (Drásov, Česká republika) a Plant Efficiency Analyser (PEA) firmy Hansatech Instruments (Anglie).
- Ovládat měření relativního obsahu chlorofylu prostřednictvím chlorofylmetru SPAD 502 firmy Konica Minolta Sensing (Osaka, Japonsko) a měření spekter odrazivosti pomocí přístroje PolyPen firmy Photon System Instruments (Drásov, Česká republika).
- Realizovat měření pomocí výše uvedených zařízení na oddělených listech ječmene jarního, u kterých byla uměle vyvolána senescence tmou po exogenní aplikaci cytokininových derivátů.
- Zpracovat data z experimentů, vyhodnotit a diskutovat míru protektivních vlastností použitých derivátů cytokininů během senescence listů ve srovnání s kontrolními látkami a neošetřenými listy ječmene.

# 1 Současný stav řešené problematiky

## 1.1 Senescence

Senescence je přirozený proces stárnutí, kdy se snižuje schopnost organismu reagovat na stres. Tento vysoce řízený vývojový proces programované degradace, který vede ke smrti, je ovlivněn různými faktory. Senescence, kromě stáří rostliny, může být iniciována různými faktory prostředí (vnější faktory) i endogenními (vnitřními) faktory. Například stresy jako je sucho, podmáčení půdy, extrémní teplota, infekce patogeny a nedostatek živin, mohou snadno vyvolat senescenci listů (Gan 2018).

V nepřítomnosti environmentálních stresorů bude senescence přesto probíhat, tento proces se nazývá přirozená nebo vývojová senescence. Rostliny pěstované za ideálních podmínek ve fytokelebrách budou zpravidla procházet přirozenou senescencí, která je primárně řízena vývojově (Gan 2018). Postupný proces vývojové senescence je obtížné kvantifikovat. Mechanismy, které řídí vývojovou senescenci jsou stále málo známé a při studiích se často používají různé metody měření, což ztěžuje porovnání výsledků. Objasnění mechanismů senescence je důležité pro vědecké a praktické využití při snaze o syntézu látek s protektivními vlastnostmi vůči různým stresovým faktorům (Balazadeh et al. 2008).

V závislosti na druhu rostliny a fázi jejího vývoje se uplatňují různé strategie, které rostliny využívají k přizpůsobení se abiotickému stresu. Obecné platí, že jednoleté a víceleté rostliny používají odlišné strategie ke zmírnění stresu prostředí. Jednoleté rostliny využívají stresově-indukovanou senescenci, která zahrnuje urychlení přechodu do reprodukční fáze a zvýšenou alokaci biomasy a živin pro reprodukci semen (Schippers et al. 2015) I když tento mechanismus zajišťuje přežití následující generace rostliny, zároveň vede k poklesu produkce a značným ekonomickým ztrátám. Víceleté rostliny se snaží stresu předejít tím, že vyvíjejí větší a hlubší kořenový systém a mají jiný způsob alokace biomasy a živin, přičemž prioritou je vegetativní růst (tj. růst kořenů a výhonků) (Zwicke et al. 2015).

Ve vývoji rostlin hraje senescence zásadní roli tím, že recykluje a remobilizuje mnoho důležitých mikro- a makroživin, jako je dusík, síra, fosfor a draslík. Během procesu stárnutí dochází k poklesu fotosyntézy a změně metabolismu listu z anabolismu na katabolismus. Tento proces zahrnuje rozklad chlorofylů, proteinů, lipidů a RNA. V

pozdějších fázích senescence dojde k viditelné změně barvy listů ze zelené na žlutou, což je způsobeno ztrátou chlorofylů a rozpadem chloroplastů (Sade et al. 2018).

### **1.1.1 Senescence vyvolána tmou (umělá senescence)**

U rostlin hraje světlo zásadní roli v růstu a vývoji rostlin. Světlo plní klíčovou úlohu v procesu fotosyntézy a v souladu s významem listů má zásadní vliv na regulaci senescence listů. Pokud je intenzita světla vyšší nebo nižší než optimální, může to vést k urychlení senescence listů. Rostliny jsou fotoautotrofní organizmy, které se spoléhají při podpoře svého růstu především na listy (Paluch-Lubawa et al. 2021). Listy jsou orgány, které jsou optimalizovány pro co nejefektivnější využití světelné energie a syntézu cukrů s co nejnižšími anabolickými náklady. U mnoha druhů rostlin vede nedostatek světla v podobě silného zastínění k rychlé senescenci, zejména pokud jsou zasaženy pouze části rostliny (Liebsch et al. 2016). Často se proto při výzkumu využívá proces tzv. umělé senescence, kdy je vystavena rostlina nebo její oddělené orgány stresu tmou (Balazadeh et al. 2008). Při senescenci vyvolané tmou dochází podobně jako u přirozené senescence ke značnému úbytku chlorofylu, inhibici fotosyntetické činnosti a rozpadu buněčných složek. Dlouhodobě se používá tato uměle navozená senescence jako model, s jehož pomocí se studují biochemické, fyziologické a molekulární mechanismy senescence listů u rostlin (Paluch-Lubawa et al. 2021).

Senescence u obilovin je obecně regulována na úrovni jednotlivých listů. Živiny, které jsou uloženy ve starších listech jsou remobilizovány do mladších listů a nakonec do praporcového listu, čímž přispívají k živinám nezbytným pro vývoj zrna. Listy obilovin mají meristémovou bázi, špička listu se skládá převážně ze starších buněk a mladší se nacházejí v blízkosti báze listu. Pochopení senescence vyvolané tmou i stínem má velký hospodářský význam, protože může výrazně prodloužit dobu skladovatelnosti po sklizni a vést ke zvýšení výnosů (Paluch-Lubawa et al. 2021).

## **1.2 Fotosyntéza a senescence**

Hlavním zdrojem recyklace uhlíku nebo dusíku při senescenci jsou chloroplasty, protože obsahují většinu živin. Chloroplastové bílkoviny představují 75-80 % celkového dusíku v listech C<sub>3</sub> rostlin (Quirino et al. 2000). Fotosyntetická aktivita v listech je nejvyšší ve zralé fázi listu a postupně klesá během stárnutí. Úbytek chlorofylu je nejpatrnějším parametrem senescence, čemuž předchází přestavba fotosyntetického

elektronového transportního řetězce vyvolaná změnami ve složení proteinů fotosyntetického aparátu (Park et al. 2007). Během poklesu fotosyntézy dochází k úbytku buněčného cukru. Pro průběh senescence je třeba energie a listy mají proto tendenci shromažďovat cukry z jiných zdrojů, aby udržely energetickou homeostázu. Toto přeprogramování vyvolané ztrátou cukru zahrnuje fungování složité katabolické sítě. Přesný molekulární mechanismus indukce a regulace této sítě však není zcela vyřešen (Biswal et al. 2018).

Fotosyntéza během stárnutí závisí nejen na změnách ve fotosyntetickém přenosu elektronů, ale také na Calvinově-Bensonově cyklu. Ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa (Rubisco) je enzym zajišťující fotosyntetickou asimilaci oxidu uhličitého a fotorespiraci, je také jednou z důležitých fotosyntetických složek degradovaných během senescence listů. Zhruba polovina dusíku v chloroplastech je vázána na Rubisco, což naznačuje, že degradace Rubisco sehrává klíčovou úlohu při remobilizaci dusíku (Krieger-Liszkay et al. 2019). Uvádí se, že degradace Rubisco je pomalejší než degradace fotosyntetických komponent transportu elektronů včetně PSII, PSI a Cyt b6f (Krupinska et al. 2012).

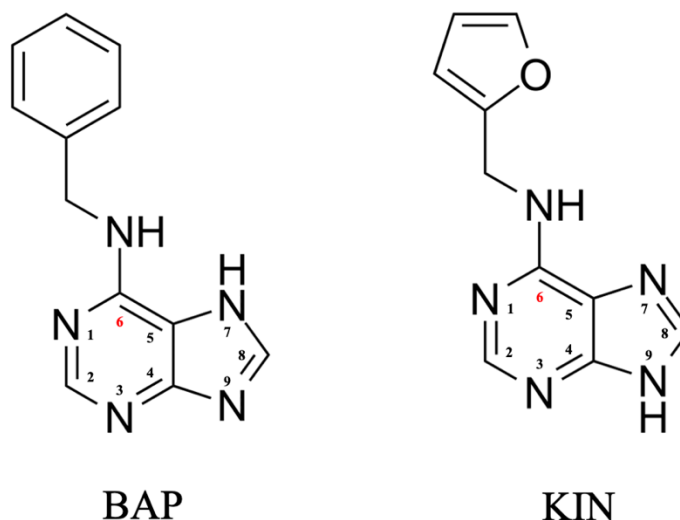
Prvními příznaky senescence je degradace chloroplastů a s ní spojený pokles fotosyntézy. Nejranější účinky indukované senescence zatemněním listů jsou patrné již během několika dnů pobytu rostliny ve tmě na ultrastruktuře chloroplastů. Je pozorováno žloutnutí listů jako důsledek degradace chlorofylu (Paluch-Lubawa et al. 2021). U pšenice bylo prokázáno, že úbytek chlorofylu indikuje remobilizaci dusíkatých sloučenin a nárůst flavonoidů. Flavonoidy se nachází zejména ve vakuolách epidermálních buněk, ale jsou přítomny i v mezofylu listů. Flavonoidy patří do skupiny polyfenolů, které slouží jako chemická obrana vůči patogenům, chrání proti oxidačnímu stresu i volným radikálům a díky svým absorpčním vlastnostem chrání rostlinu před UV zářením (Cartelat et al. 2005). Studie zabývající se indukovanou senescencí tmou u ječmene poukazují na postupnou degradaci tylakoidního systému, nárůst velikosti a počtu plastoglobulů a v důsledku toho rozpad chloroplastů (Spundova et al. 2003). Plastoglobuly jsou přítomné ve všech typech plastidů a v chloroplastech jsou spojeny s thylakoidní membránou. Jejich úloha spočívá v ukládání lipidů a účastní se metabolických drah isoprenoidních lipidů. Také byla prokázána pevná metabolická vazba mezi enzymatickou aktivitou plastoglobulů a rozpadem thylakoidů během senescence. U zelených chloroplastů jsou plastoglobuly jednoduché lipidové kapičky zatímco u senescentních chloroplastů bývají mnohem větší a tvoří vzájemně propojené hroznovité

shluky. Pravděpodobně se na těchto shlucích podílí sekundární partikuly rostoucí na povrchu existujících plastoglobulů. Strukturální spojení mezi thylakoidní membránou a plastoglobuly vypovídá o obousměrném pohybu lipidů (Besagni et al. 2013).

### 1.3 Cytokininy

Cytokininy jsou molekuly na bázi purinů, které se vyskytují přirozeně v rostlinách a podporují buněčné dělení, regulují růst a diferenciaci a ovlivňují mnoho fyziologických procesů. Cytokininy mimo jiné regulují reakci rostlin na biotické a abiotické stresy a potlačují proces stárnutí (Bryksova et al. 2020a).

Molekuly cytokininů jsou na svém atomu C6 substituovány buď izoprenoidním postranním řetězcem (ISCK), nebo aromatickým jádrem (ARCK). Mezi přirozeně se vyskytující ISCK patří trans-zeatin (tZ), cis-zeatin (cZ) a 6-(2-isopentenylamino)puriny (iP). ARCK zahrnují 6-benzylaminopurin (BAP), 6-furfurylaminopurin (kinetin, Kin) a methoxylované nebo o-, m- a p-hydroxylované deriváty BAP, tzv. topoliny (Strnad 1997). BAP a Kin sice nejsou tradičně považovány za přirozeně se vyskytující cytokininy, ale vlivem exogenního působení prokázaly silné účinky na rostlinná pletiva. Tyto molekuly se často využívaly v experimentech a staly se základem první generace syntetických ARCK (Plíhalova et al. 2016).



Obr. 1: Strukturální vzorce cytokininů BAP (6-benzylaminopurin) a KIN (6-furfurylaminopurin).

Cytokininy se v rostlinách mohou vyskytovat ve formě volné báze (nejvíce biologicky aktivní), glykosidů, nukleosidů nebo nukleotidů. U konjugované formy glykosidů dochází k navázání glukózy přes glykosidickou vazbu na adeninové jádro. Nukleosidy

vznikají navázáním ribózy v pozici N9 a jsou součástí nukleotidů, které obsahují navíc fosfátovou skupinu (Sakakibara 2006). Aktivita a obsah cytokininů jsou přísně kontrolovány enzymatickou degradací nebo glykosylací volných bází. Terminální metabolity vznikají konjugací glukózy s cytokininy na purinových atomech N3, N7 nebo N9 (N-glykosylace) nebo na kyslíku postranního řetězce zeatinu/dihydrozeatinu (O-glykosylace). Zatímco N-glykosidy cytokininů se považují za ireverzibilně deaktivované, O-glykosidy mohou být přeměněny zpět na aktivní volné báze pomocí  $\beta$ -glykosidasy (Bryksova et al. 2020a).

## 1.4 Cytokiny a jejich vliv na fotosyntézu při umělé senescenci

Při aplikaci exogenních cytokininů je možné oddálit stárnutí rostlin vyvolané různými vlivy. Senescence listů je obvykle spojována s poklesem hladiny aktivních forem cytokininů. Příčinou může být inhibice biosyntézy cytokininů, jejich rychlejší degradace nebo inaktivace (Janeckova et al. 2018).

Světlo, důležitý faktor v procesu senescence, reguluje senescenci prostřednictvím fotosyntézy, ale má také signalizační úlohu. Dochází k snížení obsahu chlorofylu, fotosyntetické aktivity a zvýšení oxidativního stresu spolu s peroxidací lipidů. Na růst a vývoj rostliny jsou účinky cytokininů a světla podobné a vzájemně se ovlivňují v mnoha aspektech. Světlo se podílí na regulaci biosyntézy, degradace a transportu endogenních cytokininů (Janeckova et al. 2018).

Cytokiny ovlivňují funkční i strukturální aspekty fotosyntézy na různých úrovních a podílejí se na buněčném dělení a diferenciaci již v raných fázích vývoje listů (Honig et al. 2018). Průduchy jsou další struktury úzce spojené s fotosyntézou na úrovni listů. Cytokiny mohou zvýšit průduchovou vodivost, protože působí jako antagonisté kyseliny abscisové. Mohou tak regulovat výměnu plynů a dostupnost oxidu uhličitého, který je základním substrátem pro fotosynteticky aktivní pletivo (Gan 2018). Cytokiny mají na buněčné úrovni zásadní vliv na chloroplasty. Zvyšují množství chloroplastů, podporují diferenciaci etioplastů, jejich přechod na chloroplasty (Chory et al. 1994) a dělení chloroplastů (Okazaki et al. 2009). Na úrovni thylakoidní membrány cytokiny podporují tvorbu gran a zvyšují obsah fotosynteticky aktivních pigmentů (Zavaleta-Mancera et al. 1999). Cytokiny interagují s receptorovými proteiny a dochází k přenosu signálu na geny primární odpovědi a k indukci syntézy mRNA a proteinů souvisejících s fotosyntézou, chlorofyl-proteinovými komplexy, metabolismem uhlíku a s klíčovým



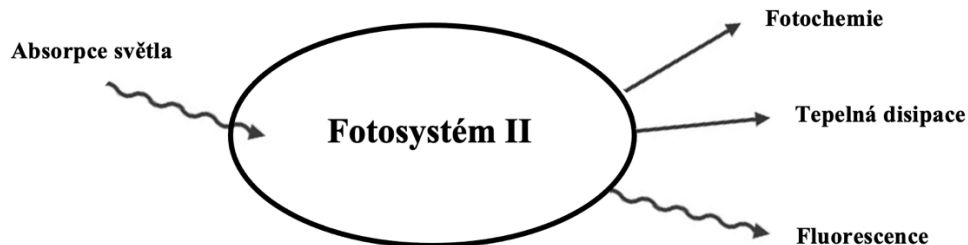
enzymem Rubisco (Chernyad'ev 2009). Cytokininy regulují některé plastidové geny. Mezi nejrozšířenější zdokumentované geny patří ty, které kódují světlosběrné chlorofyly *a/b*, vazebné proteiny fotosystému II (CAB) a velké a malé podjednotky RUBISCO (Chory et al. 1994). Efekt cytokininů není spojen pouze s aktivací exprese genů pro biosyntézu a ochranu, ale také se snížením exprese genů aktivovaných senescencí (Weaver et al. 1998) a s cytokininy zprostředkovanou inhibicí degradačních enzymů např. aktivita chlorofylázy, Mg-dechelatózy a chlorofyl degradaující peroxidázy. Za stresových podmínek tak cytokininy chrání strukturu a funkci fotosyntetického aparátu (Costa et al. 2005).

Senescence představuje poslední fázi vývoje listů a je doprovázena poklesem obsahu cytokininů. Během temnotní senescence dochází k poklesu koncentrace aktivních forem cytokininů spolu se zvýšením zásobních cytokininů O-glykosidů (Janeckova et al. 2018). S nástupem senescence souvisí zvýšené množství reaktivních forem kyslíku (ROS) v rostlinných buňkách (BuchananWollaston 1997). ROS vznikají jako vedlejší produkty aerobního energetického metabolismu. Obvykle je v buňkách produkce ROS udržována antioxidačními enzymy v nízkých hladinách. Důsledkem abiotického stresu dochází k akumulaci ROS, což vede k oxidativnímu stresu a následně k destrukci buněčných složek a k zvýšení peroxidace lipidů (Costa et al. 2005). Cytokininy mohou zpomalit stárnutí tím, že vychytávají volné radikály nebo s nimi interferují (Synkova et al. 2006). Aplikací exogenních cytokininů je možné zpomalit typické změny vyvolané stárnutím, např. pokles obsahu chlorofylu, tvorbu plastoglobulů a pokles klíčových fotosyntetických parametrů, jako je rychlost asimilace CO<sub>2</sub> (A), fotochemické zhášení (qP) a maximální fotochemická účinnost PSII ( $F_V/F_M$ ) (Honig et al. 2018).

## **1.5 Fluorescence chlorofylu *a***

Fluorescence chlorofylu představuje jev, který vzniká excitací molekul chlorofylu energií dopadajícího záření a následnou emisí části této energie do okolí ve formě záření s delší vlnovou délkou. Energetický rozdíl mezi excitovaným a základním stavem molekuly chlorofylu je využit na separaci náboje nebo je energie vyzářena ve formě červeného světla s vlnovou délkou větší než 650 nm (fluorescence chlorofylu *a*) nebo se energie fotonů vyzáří na teplo (Obr. 2). Tyto procesy jsou ve vzájemné kompetici a pokles účinnosti jednoho z procesů se projeví vzrůstem účinnosti druhého. Fluorescence chlorofylu *a* je tedy komplementární jev k fotochemii PSII (potažmo k tepelným

ztrátám), tzn. jestliže je intenzita fluorescence nízká, tak účinnost fotochemie PSII případně tepelné ztráty jsou obvykle vyšší a naopak. Většina chlorofylové fluorescence je emitována z reakčního centra PSII, kde je navázán chl *a* v pigment-proteinových komplexech (da Silva et al. 2007, Stirbet et al. 2014, Lazar 2015).



Obr. 2: Schématické znázornění základního rozdělení absorbované světelné energie probíhající ve PSII. Při přechodu molekuly chlorofylu z excitovaného do základního stavu může dojít ke 3 vzájemně si konkurujícím procesům. Energie fotonů je využita ve světelné fázi fotosyntézy (fotochemie) nebo je vyzářena ve formě tepla či fluorescence (Převzato a modifikováno od Lazar 2015).

V případě procesu kompetice fluorescence a fotochemie mohou nastat dvě situace. Stav, kdy je možné zaznamenat minimální výtěžek fluorescence ( $F_0$ ), jestliže jsou plastochinony A na akceptorové straně PSII reoxidovány. V druhém případě, kdy jsou všechna aktivní reakční centra PSII uzavřena a dojde k úplné redukci plastochinonu A ( $Q_A^-$ ), je možné zaznamenat maximální výtěžek fluorescence ( $F_M$ ). Redukovaný  $Q_A^-$  již nemůže přijmout další elektron z P680 a z toho důvodu se excitační energie vyzáří fluorescencí. Výpočtem rozdílu mezi hodnotami  $F_0$  a  $F_M$  je možné vypočítat variabilní fluorescenci ( $F_V$ ) a maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $F_V/F_M$ ).

- $F_V = F_M - F_0$
- $F_V/F_M = \frac{F_M - F_0}{F_M}$  [1]

Optimální hodnota  $F_V/F_M$  je uváděna okolo 0,83, nízké hodnoty svědčí o přítomnosti stresu na úrovni PSII (da Silva et al. 2007, Lazar 2015).

### 1.5.1 Velmi rychlá a pomalá fluorescenční indukce

Rychlý nárůst (několik s) fluorescence po zapnutí silného aktinického světla je označován jako OJIP test, neboli velmi rychlá fluorescenční indukce. Záznam křivky se skládá ze 4 charakteristických fází. Vlna O odpovídá nejnižší hodnotě fluorescence ( $F_0$ ) naměřené při otevřených RC PSII obvykle v délce 40-50 $\mu$ s. Vlna J ( $F_J$ , 2-3 ms) a I ( $F_I$ , 30 ms) zpravidla

odráží postupnou redukci chinonů ( $Q_A^-$ ,  $Q_B^-$ ). Vlna J odráží akumulaci redukovaného  $Q_A^-$ , zatímco vlna I je měřítkem akumulace  $Q_A^-$ ,  $Q_B^{2-}$ . P vlna ( $F_P$ ) reprezentující  $F_M$  je obvykle měřena v čase 200-300 ms a odpovídá fluorescenci, kdy jsou všechna RC PSII zavřena. Vystihuje tak maximální hodnotu fluorescence, kterou je možné dosáhnout při daném ozáření (Lazar 2003, Lazar 2006).

Z křivky OJIP lze vyhodnotit relativní výšku J a I vln za použití vztahů:

- $(dV/dt)_0 = M_0 = \left(\frac{\Delta V}{\Delta t}\right)_0 \approx \frac{4 \cdot (F_{0,3ms} - F_{0,05ms})}{F_V}$  [2] (tečna k nárůstu fluorescence O-J)

(Janeckova et al. 2019)

- $V_J = \frac{F_J - F_0}{F_M - F_0}$  [3] (relativní výška vlny J)

- $V_I = \frac{F_I - F_0}{F_M - F_0}$  [4] (relativní výška vlny I)

Pro sledování změn ve fotosyntetickém aparátu lze vyhodnotit další parametry odvozené z OJIP:

- $TR_0/RC = \frac{M_0}{V_J}$  [5] (maximální tok zachycené excitační energie na aktivní PSII)

- $ABS/RC = \frac{M_0/V_J}{F_V/F_M}$  [6] (zdánlivá velikost antén aktivních PSII)

- $RE_0/ABS = \frac{F_V}{F_M} \cdot (1 - V_I)$  [7] (kvantový výtěžek přenosu elektronů z  $Q_A^-$  na konečné akceptory PSI)

- $\delta R_0 = \frac{1 - V_I}{1 - V_J}$  [8] (účinnost, s níž se elektron z PSII přenáší ke koncovým PSI akceptorům) (Stirbet et al. 2018)

Pomalá fluorescenční indukce neboli zhášení fluorescence chlorofylu nastává po saturačním pulzu, kdy fluorescenční signál rychle vzroste (OJIP) a poté postupně klesá („zháší se“), až dosáhne stabilní hodnoty ( $F_t$ ). Fluorescenční zhášení souvisí s postupným přechodem fotosyntetického aparátu adaptovaného na tmu do stavu přizpůsobenému světlu.

Pro kvantifikaci pomalé fluorescence jsou na počátku vyhodnoceny hodnoty  $F_0$  a  $F_M$ . Hodnoty maximální fluorescence pro vzorky adaptované na světlo ( $F'_M$ ), jsou poté měřeny během aktinického světla a aplikací saturačních pulzů. Měření minimální fluorescence u adaptovaných vzorků na světlo ( $F'_0$ ) spočívá v konečném vypnutí aktinického světla a rozsvícení dlouhovlnného červeného světla. Dlouhovlnné červené světlo je z velké části absorbované PSI, což zapříčiní oxidaci elektronového transportního

řetězce před PSI. Následkem toho vznikne stav otevřeného PSII, čímž je umožněno správně a rychle stanovit minimální fluorescenci v porovnání s tím, kdy je aktinické světlo pouze vypnuto (Maxwell et al. 2000, Lazar 2015). Při výpočtu rozdílu mezi  $F'_M$  a  $F'_0$  lze určit variabilní fluorescenci ( $F'_V$ ) pro stav přizpůsobený světlu.

Z uvedených naměřených hodnot lze vypočítat parametry zhášení fluorescence:

- $qP = \frac{(F'_M - F_t)}{F'_V}$  (parametr fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu *a*)
- $\Phi_P = \frac{F'_V}{F'_M}$  (maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII pro adaptovaný stav na světlo)
- $\Phi_{PSII} = \frac{(F'_M - F_t)}{F'_M}$  [9] (aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII pro adaptovaný stav na světlo)

Fotochemické zhášení ( $qP$ ) nastává, pokud excitovaná molekula chlorofylu předá svou energii do reakčního centra PSII. Nefotochemické zhášení (NPQ) vznikne přeměnou excitační energie na energii tepelnou. Koeficienty pro rozlišení nefotochemických ztrát lze rozlišit na dva procesy. Neregulovaný proces se skládá z emise fluorescence a disipace tepla charakterizované kvantovým výtěžkem  $\Phi_{f,D}$  a světlem indukované regulované nefotochemické zhášení popisuje kvantový výtěžek  $\Phi_{NPQ}$ .

- $\Phi_{f,D} = \frac{F_t}{F_M}$  [10]
- $\Phi_{NPQ} = \frac{F_t}{F'_M} - \frac{F_t}{F_M}$  [11] (Lazar 2015)

## 1.6 Propustnost a odrazivost listu

Měření obsahu chlorofylu lze provést destruktivní metodou založenou na extrakci chlorofylu a kvantifikaci jeho obsahu spektrofotometricky. Relativní obsah chlorofylu v listech rostlin lze také stanovit neinvazivně využitím optických spektrálních vlastností listu, kdy je měřena difúzní odrazivost a propustnost (Cassol et al. 2008).

Zařízení chlorofylmetr SPAD-502 využívá difúzní propustnost listu pro změření celkové koncentrace chlorofylu a tím i nepřímo pro odhad dusíkatého stavu rostlin, který odráží degradaci chlorofylu (Martinez et al. 2004). Propustnost listu je měřená při vlnových délkách 650 nm a 940 nm (Hunt et al. 2014). Červené světlo (650 nm) chlorofyly absorbují maximálně (projde málo světla), zatímco infračervená (940 nm) oblast elektromagnetického spektra je referenční vlnová délka používána k úpravě

nespecifických rozdílů mezi vzorky, při které chlorofyly absorbují minimálně (projde maximum světla). Přístroj používá hodnoty transmitance (propustnosti) k výpočtu relativní hodnoty SPAD metru (obvykle v rozmezí od 0,0 do 50,0), která je úměrná množství chlorofylu ve vzorku (Ling et al. 2011). U řady různých druhů rostlin byl testován vztah mezi hodnotami SPAD a koncentrací chlorofylu. Výsledky vykazovaly značné inter-specifické rozdíly a jsou pravděpodobně způsobeny strukturální variabilitou mezi listy různých druhů (Uddling et al. 2007).

Zařízení založené na odrazivosti listů jsou schopné měřit celá spektra odrazivosti a vypočítat konkrétní indexy odrazivosti pro posouzení obsahu chlorofylu, fotoprotektivních karotenoidů a dalších vlastností listů. NDVI je normalizovaný rozdílový vegetační index, který je měřítkem poměru odrazivosti v blízkém infračerveném (NIR) a červeném vlnovém pásmu. Princip měření spočívá v míře absorpce červeného světla a odrazivosti NIR buněčnými strukturami. Chlorofyl silně absorbuje červené vlnové délky a listy s vysokým obsahem chlorofylu pohlcují více červeného světla a odrážejí více NIR. Hodnoty NDVI jsou standardizovány v rozsahu od -1 do 1. U listů s menším obsahem chlorofylu v důsledku stresu nebo stárnutí se hodnoty budou blížit k 0. NDVI lze stanovit podle následujícího vzorce:

$$\blacksquare \quad NDVI = \frac{(R_{780} - R_{630})}{(R_{780} + R_{630})} \quad [12] \quad (\text{Stamford et al. 2023})$$

Fotochemický index odrazivosti listů (PRI) je vypočítán ze dvou vlnových délek spekter odrazivosti, tj. 531 a 570 nm, které mimo jiné souvisí s obsahem pigmentů xantofylového cyklu (Garbulsky et al. 2011). Pigmenty xantofylového cyklu mají fotoprotektivní roli již během raného vývoje listu. Přejít ze tmy adaptovaného vzorku na světlo způsobí konverzi xantofylových pigmentů z epoxidovaného stavu (violaxanthin) do deepoxidovaného (antheraxanthin a zeaxanthin). Listy adaptované na tmu nevyužívají žádné pigmenty ze svého xantofylového cyklu na rozdíl od intenzivně osvětlených listů, které přeměňují většinu svých pigmentů do fotoprotektivní (deepoxidované) formy. Zejména zeaxanthin přijme přebytečnou energii z chlorofylu a tím chrání fotosystémy před poškozením. Hodnoty PRI jsou přisuzovány k přeměně pigmentů xantofylového cyklu a s tím spojenému nefotochemickému zhášení (531 nm). PRI je definován podle rovnice:

$$\blacksquare \quad PRI = \frac{R_{531} - R_{570}}{R_{531} + R_{570}} \quad [13] \quad (\text{Penuelas et al. 1995, Gamon et al. 1997, Gamon et al. 1999})$$

Skutečnost, že měření PRI listů v průběhu stárnutí může poskytnout informace o fyziologickém stavu rostliny, podpořila práce Cordona z roku 2016. V této práci bylo také prokázáno, že optické vlastnosti na úrovni porostu (snímání fotosyntetické aktivity celé koruny) lze popsat optickými vlastnostmi jednotlivých listů i v případě přítomnosti senescentního materiálu. Pozitivní korelaci ukazuje vztah mezi PRI,  $F_V/F_M$  a  $\Phi_{PSII}$ , v souvislosti s nárůstem odrazivosti při vlnové délce 570 nm v důsledku degradace chlorofylu (pokles hodnot PRI) během senescence a pokles jejich fotosyntetické aktivity (pokles  $F_V/F_M$  a  $\Phi_{PSII}$ ). Souvislost byla zjištěna i mezi poměrem celkového Chl/Car (poměr chlorofylů a karotenoidů) a  $F_V/F_M$  a  $\Phi_{PSII}$ . Během procesu senescence dochází k poklesu fotochemické aktivity, která je doprovázena úbytkem celkového chlorofylu, zatímco dochází k nárůstu fotoprotektivních karotenoidů (zeaxanthin). Spolu s těmito vlivy je také uvedeno, že dálkovým monitorováním průběhu NDVI na úrovni porostu souvisel se změnami ve struktuře korun, ale nikoliv s obsahem pigmentů. Vzorce PRI na úrovni porostu naznačovaly změny jak z hlediska struktury korun, tak z hlediska obsahu pigmentů v listech (Cordon et al. 2016).

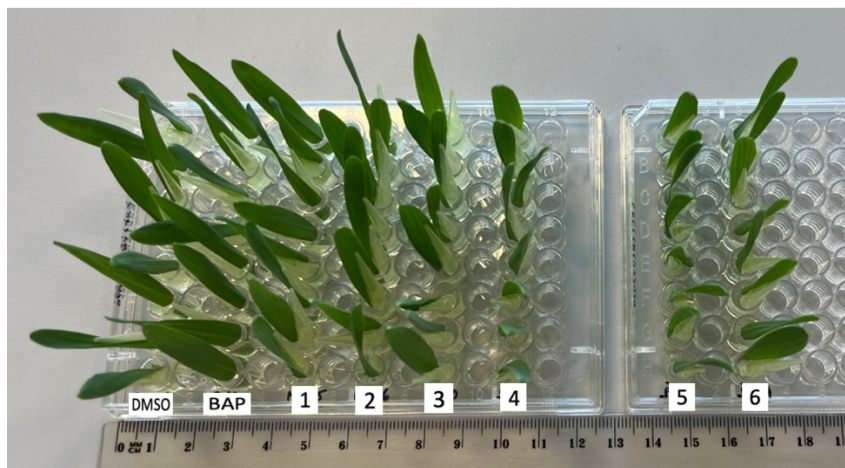
## 2 Experimentální část

### 2.1 Rostlinný materiál a jeho příprava

Na experiment byl použit dvouřadý sladovnický jarní ječmen (*Hordeum vulgare L. conv. Distichon*)

#### Experiment 1 (E1)

Do 3 květináčů s perlitem bylo vyseto po 30 semenech ječmene jarního. Květináče byly zalaty 300 ml naředěným Hoaglandovým roztokem (ředění 1:9) a umístěny do fytokomory s teplotou 21°C, vlhkostí RH 60%, fotoperiodou 16h světlo o intenzitě 100  $\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a 8h tmy. Po 7 dnech byly první vyrostlé listy z každé rostliny ustřiženy a všechny zkráceny na 5 cm. Byla použita 96 jamková mikrotitrační destička, do které bylo do sloupců napipetováno 8x 250  $\mu\text{l}$  každé látky (DMSO, BAP, látka 1-6) (Obr. 3). Pro podporu listů ve vzpřímené poloze, byly ustřiženy pipetovací špičky a vloženy spolu s listy do jamek.



Obr. 3: Mikrotitrační destičky s ošetřenými listy připravené na vložení do tmy. 5 cm dlouhé listy ječmene vloženy do jamek destičky s roztoky příslušných látek a podepřeny pipetovacími špičkami.

Destičky s ošetřenými listy byly vloženy do polystyrenové krabice zabalené do černé fólie pro navození umělé senescence. Krabice byla uložena ve fytokomoře s pěstebními podmínkami. V ten samý den (7. den po výsevu) bylo provedeno měření na neošetřených kontrolních listech ihned po ustřižení pro získání kontrolních dat. Měření ošetřených listů proběhlo 4. den indukované senescence tmou.

## Experiment 2 (E2) a 3 (E3)

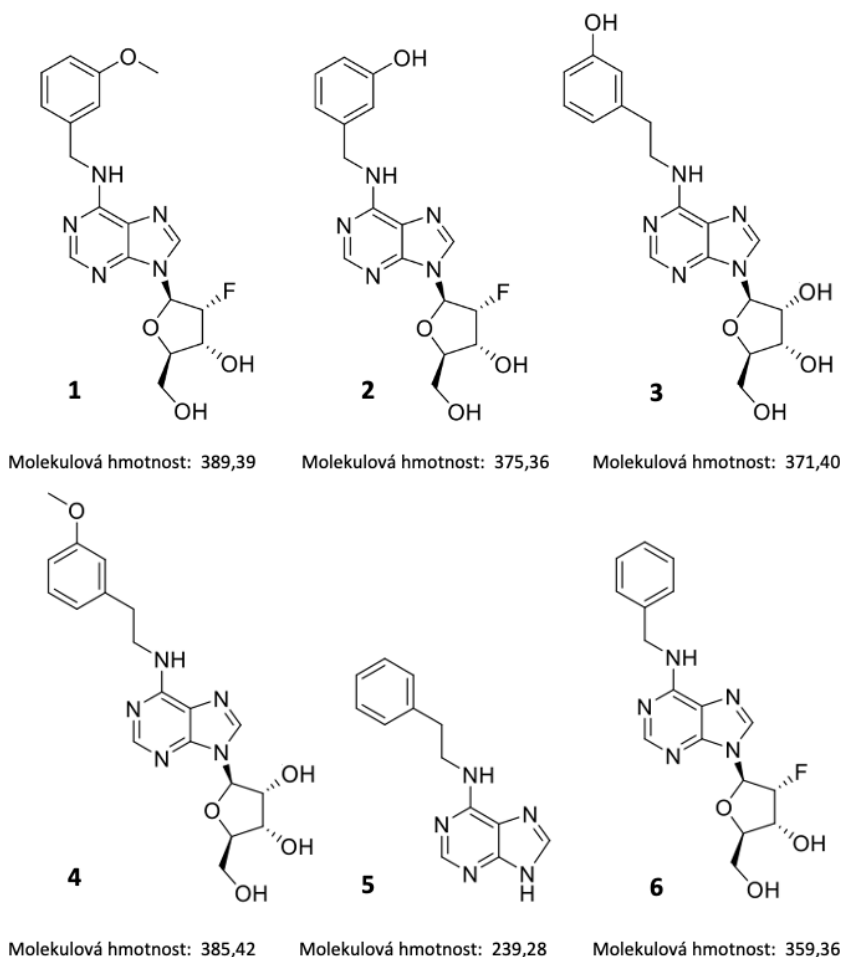
Oba experimenty probíhaly obdobně jako první experiment (E1) až na níže uvedené odlišnosti za účelem vylepšení prvního experimentu. V E2 bylo vyseto 4x40 semen (pro výběr vzrostlejších listů pro měření), 7. den od zasetí bylo ke květináčům přilito 75 ml naředěného Hoaglandova roztoku. 8. den po zasetí ječmene byly změřeny kontroly, ustrženy listy v délce 5 cm a testovány byly 4 látky (dvě látky z E1 z důvodu zanedbatelného efektu vyřazeny, DMSO, BAP, látka 1, 2, 3 a 6). Měření ošetřených listů proběhlo 5. den po aplikaci látek a zatemnění. E3 se shodoval s E2 pouze měření ošetřených a zatemněných listů proběhlo 6. den po aplikaci látek a zatemnění. Vzhledem k nevratnému poškození listů, které v některých případech nebylo měřitelné, byly výsledky E3 prezentovány pouze na obr. 10.

## 2.2 Chemikálie a roztoky

Deionizovaná voda; voda z řadu; dimethylsulfoxid (**DMSO**); 6-benzylaminopurin (**BAP**); (2R,3R,4R,5R)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-5-(6-((3-methoxybenzyl)amino)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol (**látka 1**); (2R,3R,4R,5R)-4-fluoro-5-(6-((3-hydroxybenzyl)amino)-9H-purin-9-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (**látka 2**); (2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-((3-hydroxyphenethyl)amino)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol (**látka 3**); (2R,3S,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-((3-methoxyphenethyl)amino)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol (**látka 4**); N-phenethyl-9H-purin-6-amine (**látka 5**); (2R,3R,4R,5R)-5-(6-(benzylamino)-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (**látka 6**);

- **Všechny látky byly rozpuštěny v 0.1% DMSO a zředěny do koncentrace  $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ .** (Tato koncentrace byla stanovena na základě výsledků studie Tarkowské z roku 2003, kde koncentrace  $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$  BAP byla nejúčinnější pro retenci chlorofylu v listech pšenice.)





Obr. 4: Strukturální vzorce nově nasyntetizovaných látek 1-6 testovaných v bakalářské práci.

### Hoaglandův roztok

- Složení:

- Makroprvky:  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2; \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}; \text{KNO}_3; \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4; \text{H}_2\text{SO}_4]$

- Mikroprvky:  $[\text{H}_3\text{BO}_3; \text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}; \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}; \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}; (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

- Roztok železa:  $[\text{Na}_2\text{EDTA}; \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$

- Postup přípravy:

Pro přípravu 1000 ml Hoaglandova roztoku bylo vždy zvlášť v destilované vodě rozpuštěno 940 mg  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 520 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 660 mg  $\text{KNO}_3$  a 120 mg  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Mikroprvky byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody (280 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 340 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 220 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) a 10 ml bylo přimícháno do roztoku. Poté bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Roztok železa byl připraven zvlášť (370 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  a 270 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a přimíchán.

## 2.3 Přístrojová technika

Chlorofylmetr SPAD 502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japonsko); Fluorometr PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Anglie); PolyPen (Photon System Instruments, Drásov, Česká republika); Fluorometr FluorCam 800 MF (Photon System Instruments, Drásov, Česká republika); Fytokomora Percival AR-100L3 (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA)

## 2.4 Programové vybavení

Biolzyer 3.0 (Ronald M. Rodriguez, Laboratoř bioenergetiky, Geneva, Švýcarsko); FluorCam 7 verze 1.5.0.46 (Photon System Instruments, Drásov, Česká republika); SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., San Jose, California, USA)

## 2.5 Použité metody

### 2.5.1 Velmi rychlá fluorescenční indukce

Velmi rychlá fluorescenční indukce byla monitorována pomocí fluorometru PEA (Plant Efficiency Analyser) firmy Hansatech Instruments (Anglie). Intenzita excitačního záření byla nastavena na  $1200 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  po dobu 2s. Pro měření byly použité svorky firmy Hansatech. Listy byly před měřením po dobu 30 min adaptovány na tmu. Fluorescenční signál byl snímán na adaxiální straně ve střední části listu. U každé varianty proběhlo měření na 8 listech. Měření probíhalo při slabém zeleném světle, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Z naměřené OJIP křivky byly spočítány vybrané parametry  $F_V/F_M$ ,  $RE_0/ABS$  a  $\delta R_0$  (viz vzorce 1, 7, 8 kapitoly 1.5 a 1.5.1). Parametry  $(dV/dt)_0$ ,  $V_I$ ,  $TR_0/RC$  a  $ABS/RC$  (viz vzorce 2-6 kapitoly 1.5.1) byly vyhodnoceny fluorometrem a výsledky byly zpracovány.

### 2.5.2 Pomalá fluorescenční indukce

Zhášecí analýza byla provedena pomocí zobrazovacího systému FluorCam 800 MF firmy Photon System Instruments (Drásov, Česká republika). Měřené listy byly temnotně adaptované po dobu 30 min. Ustřižené listy byly přemístěny na desku s navlhčeným filtračním papírem vodou z řadu a uspořádány adaxiální stranou směrem ke kameře (Obr. 5).



Obr. 5: Oddělené listy ječmene variant DMSO a BAP přemístěny z roztoků v mikrotitrační destičce na desku s navlhčeným filtračním papírem (vlevo); komora FluorCamu 800 při ozáření vzorků červeným světlem (vpravo).

Detekce fluorescence chlorofylu emitovanou listy probíhala definovaným měřícím protokolem. Pomocí pulzů červeného světla v délce trvání 10  $\mu\text{s}$  byla stanovena v temnotně adaptovaných listech minimální fluorescence chlorofylu ( $F_0$ ). Nízká intenzita světla z měřících pulzů umožnila měření fluorescenčního signálu bez uzavření reakčních center PSII. Maximální fluorescence chlorofylu ( $F_M$ ) byla měřena pro stav adaptovaný na tmu při pulsu silného modrého světla ( $2000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) po dobu 800 ms. Parametry analýzy zhášení byly vypočteny po 90 s relaxaci vzorků ve tmě, kdy byly vzorky vystaveny aktinickému světlu ( $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) po dobu 23 min. Během ozáření aktinickým světlem bylo použito 17 saturačních pulzů pro změření maximální fluorescence ve stavu vzorku přizpůsobeném světlu ( $F'_M$ ). V intervalu 30 s bylo aplikováno prvních 6 saturačních pulzů, 7. až 11. pulz byl aplikován v intervalu 60 s, 12. až 15. pulz byl aplikován v intervalu 2 min a dva poslední záblesky byly aplikovány v intervalu 3 min 40 s. Zhášecí koeficienty  $\Phi_{\text{PSII}}$ ,  $\Phi_{f,D}$  a  $\Phi_{\text{NPQ}}$  byly spočítány dle vzorců 9-11 v kapitole 1.5.1.

### **2.5.3 Propustnost a odrazivost listu**

Pro stanovení relativního obsahu chlorofylu nedestruktivní metodou byl použit chlorofylmetr SPAD 502 firmy Konica Minolta Sensing (Osaka, Japonsko). Listy byly před měřením adaptovány na tmu po dobu 30 minut. Propustnost listu byla měřena pro každou variantu na 8 listech a u každého listu byl počítán průměr z 5 SPAD hodnot změřených ve střední části adaxiální strany listu. Měření probíhalo při slabém zeleném světle.

Pomocí přístroje PolyPen firmy Photon System Instruments (Drásov, Česká republika) byla změřena spektra odrazivosti listu a spočítáno mnoho indexů odrazivosti listů. Pro účely BP byly vyhodnoceny vegetační indexy NDVI a PRI viz vzorce 12-13 kapitoly 1.6. Listy byly před měřením adaptované na tmu po dobu 30 min. Na zařízení byl vyroben z černého papíru zúžený otvor, který byl nalepen na detekční okénko. Díky tomu byla práce s příliš úzkými senescentními listy usnadněna a zpřesněna. Odrazivost byla zaznamenána na adaxiální straně listu ve středové části čepele. Měření proběhlo pro každou variantu na 8 listech. Během měření bylo rozsvícené slabé zelené světlo.

### **2.6 Vyhodnocení dat a statistická analýza**

Vyhodnocení dat bylo provedeno v tabulkovém procesoru Microsoft Excel a pomocí programu pro statistickou analýzu dat SigmaPlot 11. Statistická analýza byla počítána párovým Studentovým T-testem nebo Mann-Whitney Rank Sum Testem.

### 3 Výsledky

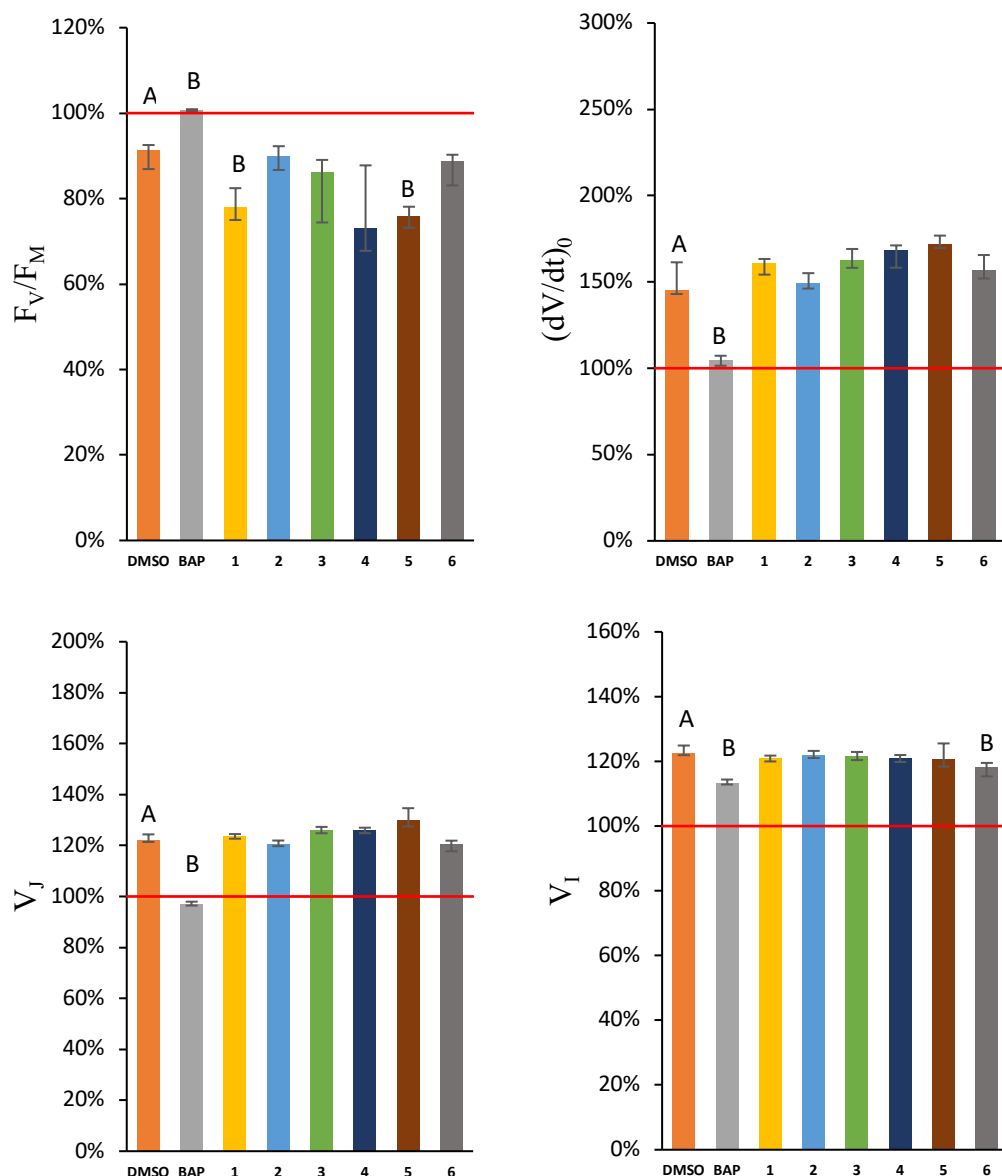
#### 3.1 Velmi rychlá fluorescenční indukce

Výsledky naznačují, že aplikované látky neměly významný protektivní vliv na fotochemickou aktivitu listů po indukci umělé senescence tmou po dobu čtyř i pěti dnů (Obr. 6 a 7), což je zaznamenáno změnami hodnot  $F_V/F_M$ . V obou experimentech byly nejvyšší hodnoty  $F_V/F_M$  naměřeny u listů ošetřenými BAP (pozitivní kontrola), kde BAP dokázal působit po tuto dobu dostatečně protektivně pro zachování kontrolních hodnot parametru  $F_V/F_M$  v listech. Listy ošetřené BAP vykazovaly hodnoty podobné kontrolním i u ostatních parametrů spočítaných z OJIP křivky (Obr. 6 a 7).

U všech látek byl prokázán nárůst (kromě  $F_V/F_M$ ) v analyzovaných parametrech spočítaných z OJIP křivky podobný ošetření DMSO. U E1 listy ošetřené látkami 1-6 vykazují v některých případech dokonce vyšší hodnoty než DMSO (Obr. 6). Nejvíce se kontrolním hodnotám blížily látky 2 a 6, hodnota  $V_I$  látky 6 byla dokonce signifikantně lepší (nižší) oproti DMSO variantě po čtyřech dnech ve tmě (Obr. 6). V E2 (o den delší indukce senescence) lze již pozorovat mírné účinky u aplikovaných látek, především u látky 2, kde v parametru  $V_I$  je signifikantní rozdíl oproti DMSO odrážející pomalejší akumulaci  $Q_B^{2-}$  (Obr. 7).  $V_J$  i  $(dV/dt)_0$  dosahovaly též nižších hodnot u látky 2 oproti ostatním látkám indikující pomalejší uzavírání RC PSII neboli rychlost redukce  $Q_A$  a tedy akumulaci redukovaného  $Q_A^-$  (Obr. 7). Látka 2 měla též největší maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve srovnání s ostatními testovanými látkami (Obr. 6 a 7). V porovnání se všemi ošetřeními dosahovala varianta BAP nejlepších hodnot počítaných parametrů velmi rychlé fluorescenční indukce, z nově testovaných pouze látka 6 v prvním a látka 2 v druhém experimentu vykazovaly mírně protektivní účinek při senescenci ve tmě (Obr. 6 a 7).

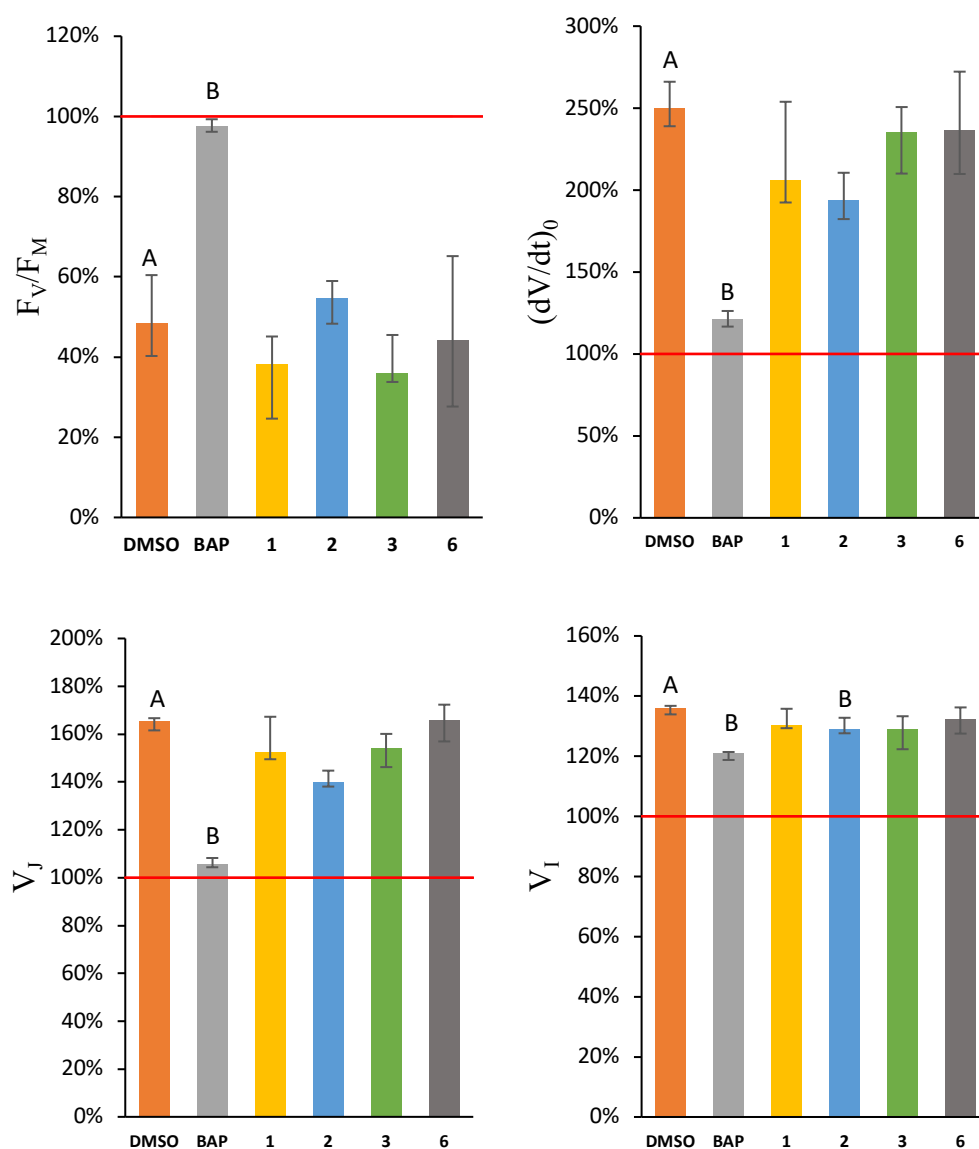
Parametry citlivými k postupující senescenci se zdají být zejména  $F_V/F_M$ ,  $(dV/dt)_0$  a  $V_J$ , zejména parametr  $F_V/F_M$  klesl 5. den senescence na polovinu své hodnoty naměřené 4. den působení senescence u všech variant kromě BAP (Obr. 6 a 7). Postupující poškozující působení umělé senescence na fotosyntetický aparát ječmene je demonstrován na zobrazení parametru  $F_V/F_M$  na celých listech 4., 5. a 6. den ponechání ve tmě (Obr. 10).

## EXPERIMENT 1 (senescence iniciovaná tmou 4 dny)



Obr. 6: Vybrané parametry  $F_V/F_M$ ,  $(dV/dt)_0$ ,  $V_j$  a  $V_i$  spočítané z naměřené křivky OJIP u oddělených listů ječmene. Měření provedeno po čtyřech dnech ošetření listů uvedenými látkami (DMSO, BAP, látka 1-6) a kultivaci ve tmě. Přepočítáno na % vztažené ke kontrolním hodnotám neošetřených listů (100%) změřených ihned po ustřižení (červená vodorovná úsečka). Statisticky signifikantní rozdíly (T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum Test) jednotlivých variant od DMSO jsou znázorněny písmenem B,  $n=5-8$ , počítány mediány a kvartily.

## EXPERIMENT 2 (senescence iniciovaná tmou 5 dnů)



Obr. 7: Vybrané parametry  $F_v/F_M$ ,  $(dV/dt)_0$ ,  $V_J$  a  $V_I$  spočítané z naměřené křivky OJIP u oddělených listů ječmene. Měření provedeno po pěti dnech ošetření listů uvedenými látkami (DMSO, BAP, látka 1-6) a kultivaci ve tmě. Přepočítáno na % vztažené ke kontrolním hodnotám neošetřených listů (100%) změřených ihned po ustrižení (červená vodorovná úsečka). Statisticky signifikantní rozdíly (T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum Test) jednotlivých variant od DMSO jsou znázorněny písmenem B,  $n=5-8$ , počítány mediány a kvartily.

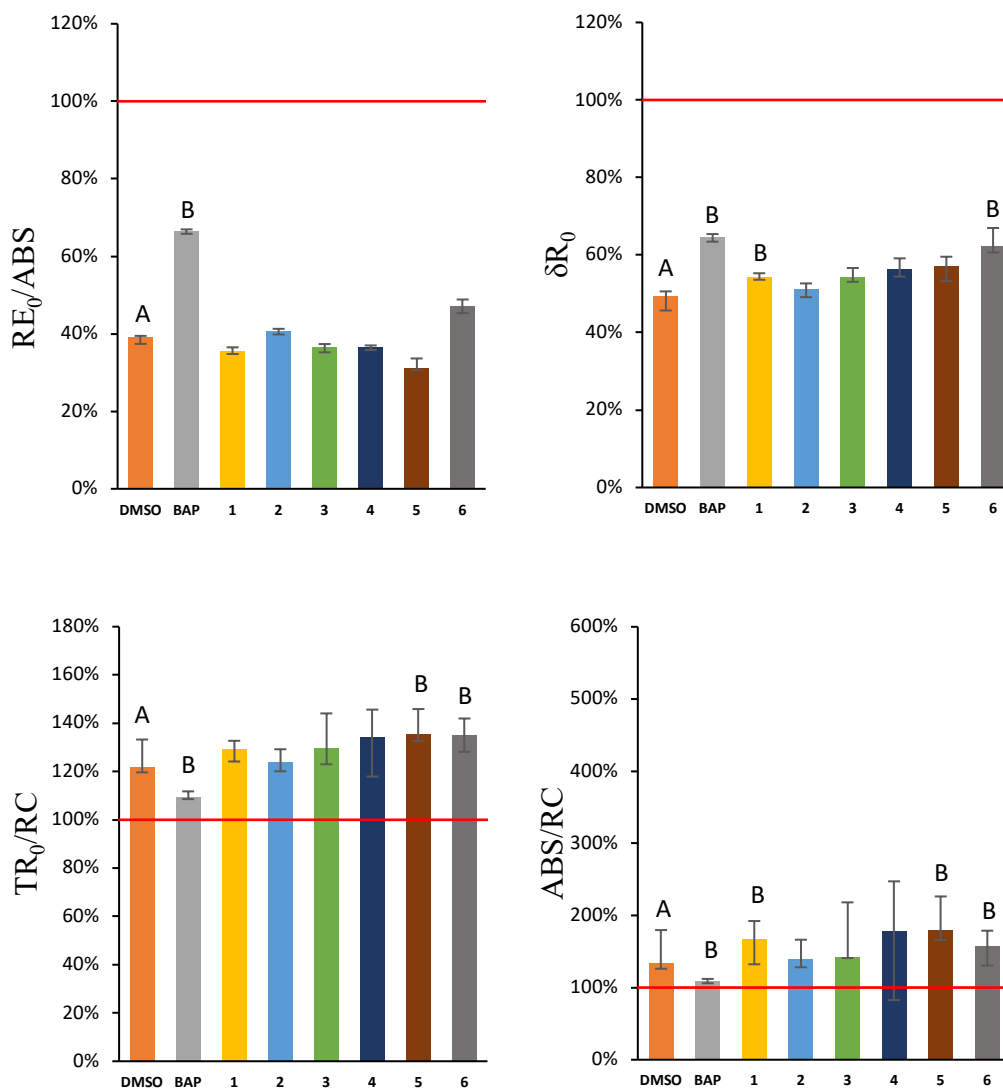
I v dalších parametrech spočítaných z křivky velmi rychlé fluorescenční indukce bylo zřejmé progresivní působení senescence v závislosti na délce uložení listů ve tmě (Obr. 8 a 9). V E1 dosahovala až průkazně vyšších hodnot látka 6 a 1 u parametrů  $\delta R_0$  a ABS/RC ve srovnání s DMSO indikující větší účinnost elektronového transportu z redukovaného plastochinonu ke koncovým akceptorům v PSI a větší relativní zastoupení anténních systémů v poměru k aktivním RC PSII (Obr. 8). ABS/RC dosahovalo ještě vyšších hodnot u látky 5 odrážející pravděpodobně nedostatečné protektivní působení těchto látek na funkčnost RC PSII. Látky 5 a 6 navíc vykazovaly oproti DMSO průkazně vyšší maximální tok zachycené excitační energie v PSII ( $TR_0/RC$ ) a u látky 6 byl patrný také vyšší kvantový výtěžek elektronového transportu z  $Q_A^-$  k finálním PSI akceptorům ( $RE_0/ABS$ ). Přestože v E1 byl zřejmý nejlepší efekt látky 6 (Obr. 6, 8), o den prodloužený interval zatemnění v E2 již neprokázal její protektivní účinek (Obr. 7, 9).

Podobně jako v předchozích parametrech OJIP 5. den inkubace potmě byl největší účinek látky 2, byť nebyl tak silný jako v případě pozitivní kontroly (Obr. 9). Analyzované parametry u látky 2 se nejvíce blížily pozitivní kontrole ve srovnání s ostatními látkami, kdy tok zachycené excitační energie v aktivním PSII ( $TR_0/RC$ ) byl významně nižší ve srovnání s DMSO. Kvantový výtěžek přenosu elektronů k PSI akceptorům ( $RE_0/ABS$ ) byl též pozorován nejvyšší u látky 2 (za pozitivní kontrolou). Efektivita přenosu elektronů z plastochinonového poolu k PSI akceptorům ( $\delta R_0$ ) byla lepší u všech testovaných látek oproti DMSO, u látek 1 a 3 dokonce průkazně poukazující na možné protektivní působení látek na úrovni PSI.

Výše zmíněné parametry vykazují přednostní poškození na úrovni RCII než u anténního systému PSII 4. i 5. den působení umělé senescence. Parametry  $RE_0/ABS$  a  $\delta R_0$  byly velmi citlivé k působení senescence, kdy ani působení BAPu nedokázalo naměřené hodnoty přiblížit k nesenescentní kontrole v obou termínech měření (Obr. 8 a 9).

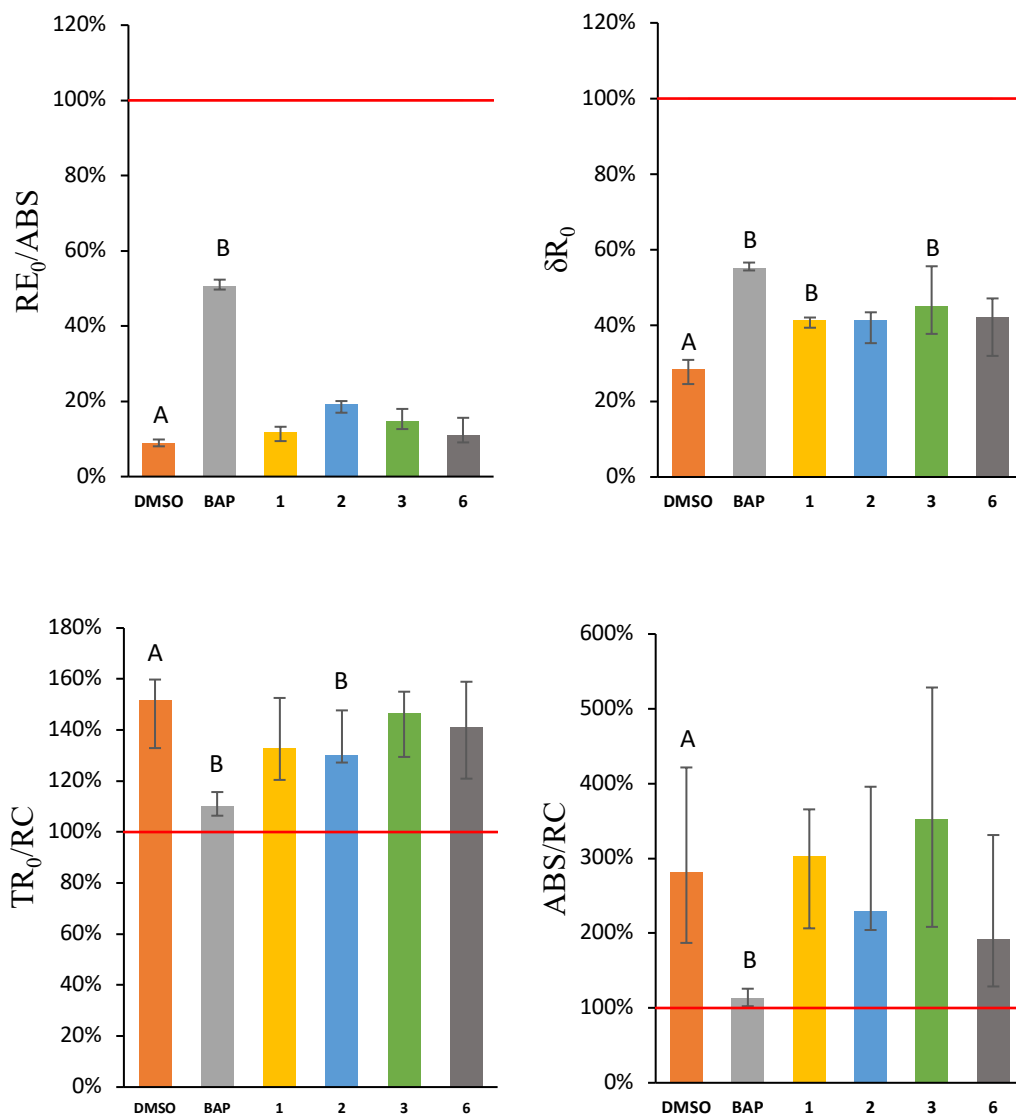


## EXPERIMENT 1 (senescence iniciovaná tmou 4 dny)



Obr. 8: Fluorescenční parametry spočítané z OJIP křivky ( $RE_0/ABS$ ,  $\delta R_0$ ,  $TR_0/RC$ ,  $ABS/RC$ ) měřené po čtyřech dnech ošetření listů uvedenými látkami (DMSO, BAP, látka 1-6) a kultivaci ve tmě. Přepočítáno na % vztažené ke kontrolním hodnotám neošetřených listů (100%) změřených ihned po ustřížení (červená vodorovná úsečka). Statisticky signifikantní rozdíly (T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum Test) jednotlivých variant od DMSO jsou znázorněny písmenem B, n=5-8, počítány mediány a kvartily.

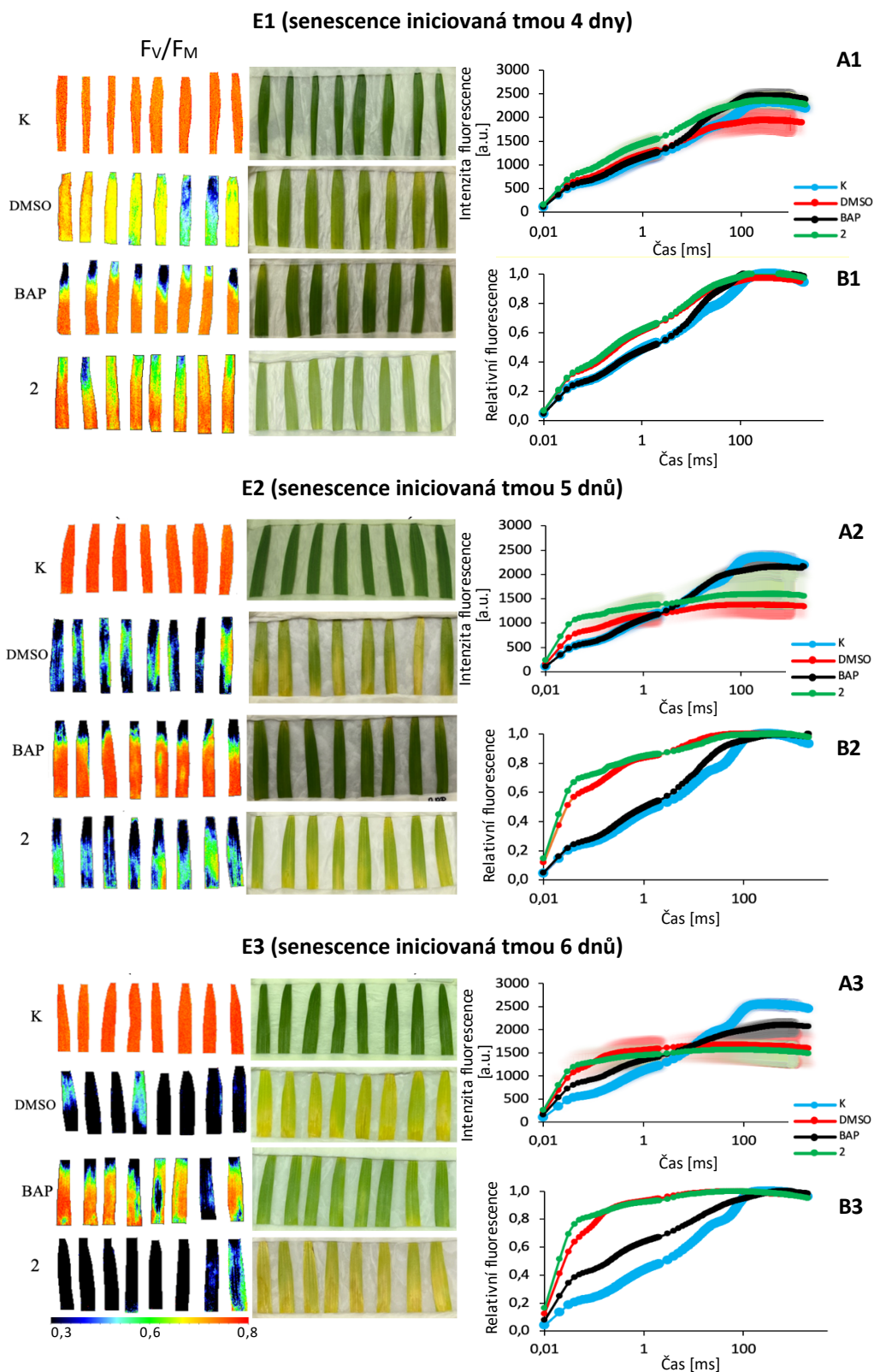
## EXPERIMENT 2 (senescence iniciovaná tmou 5 dnů)



Obr. 9: Fluorescenční parametry spočítané z OJIP křivky ( $RE_0/ABS$ ,  $\delta R_0$ ,  $TR_0/RC$ ,  $ABS/RC$ ) měřené po pěti dnech ošetření listů uvedenými látkami (DMSO, BAP, látka 1-6) a kultivaci ve tmě. Přepočítáno na % vztažené ke kontrolním hodnotám neošetřených listů (100%) změřených ihned po ustřižení (červená vodorovná úsečka). Statisticky signifikantní rozdíly (T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum Test) jednotlivých variant od DMSO jsou znázorněny písmenem B,  $n=5-8$ , počítány mediány a kvartily.

Z obrázku 10 je patrné postupné zhoršení stavu fotosyntetického aparátu 4. - 6. den senescence tmou. Zobrazení celých ploch listů odhalilo heterogenitu, která nebyla patrná při konvenčním bodovém měření přístrojem PEA. Rozdíly vynikly zejména 4. den senescence tmou, kdy u látky 2 bylo zřejmé zachování vyšších hodnot  $F_v/F_m$  u staršího pletiva na špičkách listů oproti BAP (Obr. 10, levý panel). Vzhledem k tomu, že se přístrojem PEA měřila středová část listu u všech variant, tento nejhorší stav špiček listů u BAP variant nebyl přístrojem PEA zachycen a varianty BAP vykazovaly zdánlivě nejlepší hodnoty  $F_v/F_m$  (Obr. 6, 7). Ze zobrazení celých listů je evidentní nejhorší maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII u varianty DMSO, kde jsou hodnoty  $F_v/F_m$  nejnižší téměř homogenně na celé ploše listů. Látka 2 působila protektivně na celou plochu listu, ale nebyla natolik účinná, neb byl pozorován mírný pokles parametru  $F_v/F_m$  v celé horní polovině listu. S postupující senescencí (E2 a E3) byly zmíněné poškozující procesy více viditelné nejen v parametru  $F_v/F_m$ , ale též na vyfocených listech (Obr. 10, prostřední panel). 5. den senescence byl ještě zřejmý výrazný protektivní účinek BAPu, 6. den již i u BAP varianty byl zřetelný heterogenní pokles parametru  $F_v/F_m$ .

Progrese poškozujícího efektu senescence během měřených třech dní byla zřejmá ve stavu adaptovaném na tmou, jak již bylo zmíněno výše. Spočítané parametry odráží jednotlivé vlny a tvar křivky OJIP, jejíž průběh (hodnoty mediánu pro každou variantu) je zobrazen na obr. 10 (pravý panel). Z průběhu celých křivek v E1 můžeme usoudit, že pokles parametru  $F_v/F_m$  u DMSO a látky 2 byl způsoben poklesem  $F_m$ . U obou těchto variant je již patrný nárůst vln J a I viditelný zejména u nanormovaných křivek (Obr. 10, B1). Zvedání těchto vln se zvýraznil v E2 a E3, takové změny křivky OJIP jsou typické pro postupující stres rostlin (Fan et al. 2014). V E3 je již viditelný pokles  $F_m$  (Obr. 10, B3) i u BAP varianty, který se odráží i v nižší hodnotě  $F_v/F_m$  (Obr. 10, levý panel).



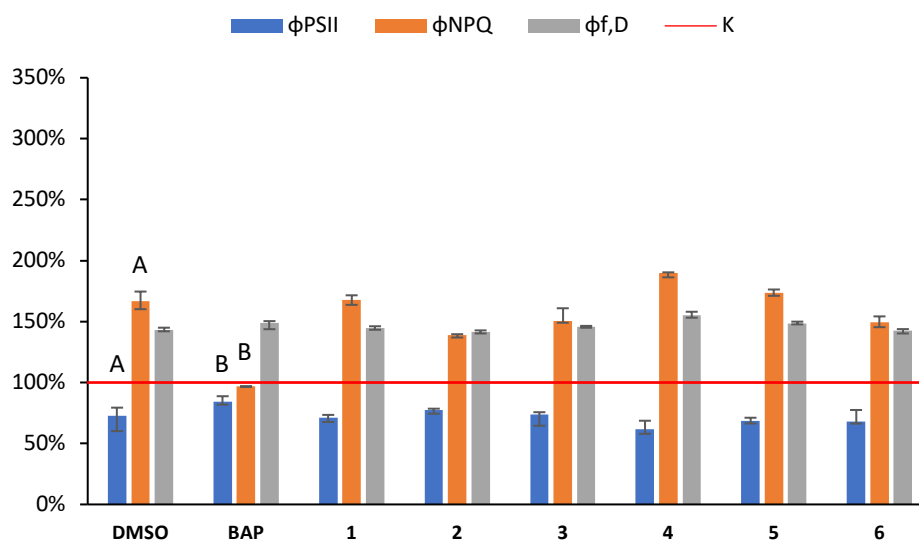
Obr. 10: Fluorescenční zobrazování a průběh OJIP křivek pro neošetřenou kontrolu (K) a pro vybrané ošetření (DMSO, BAP a látky 2) po 4-6 denní iniciované senescenci tmou. Zobrazení maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII ( $F_V/F_M$ ) na celých plochách listů (levý panel), odpovídající fotografie měřených oddělených listů ječmene (prostřední panel) a křivky OJIP velmi rychlé fluorescenční indukce chlorofylu *a* (A, změřené křivky OJIP; B, normalizované křivky OJIP) (pravý panel, logaritmické měřítko osy x, uvedeny mediány a kvartily,  $n=7-8$ ).

### 3.2 Pomalá fluorescenční indukce

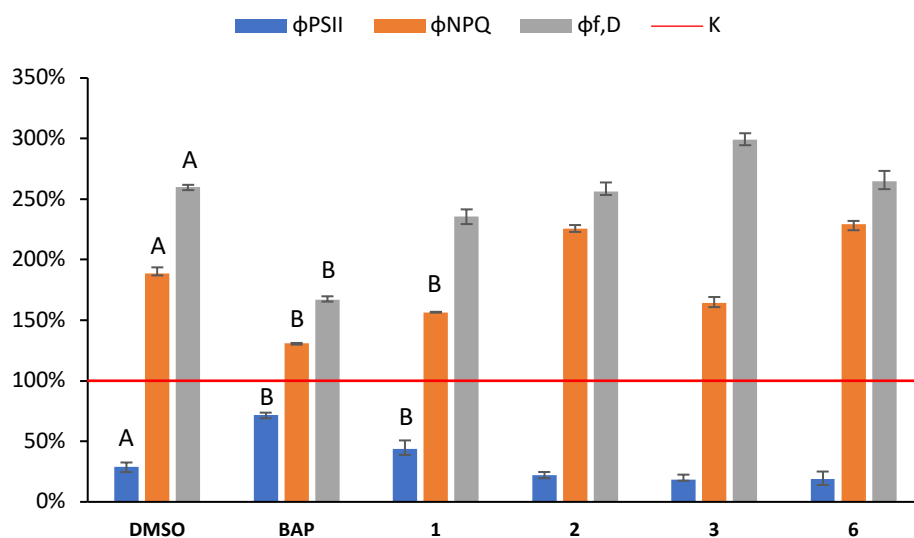
Měřením pomalé fluorescenční indukce bylo potvrzeno poškození fotochemie PSII u listů s uměle indukovanou senescencí po dobu čtyř i pěti dnů umístění ve tmě (Obr. 11). Značný pokles parametru  $\Phi_{PSII}$  u variant ošetřených DMSO a látkami 1-6 odráží nižší účinnost využití světelné energie k primárním fotochemickým procesům v PSII ve stavu adaptovaném na světlo. Důsledkem toho došlo k přesměrování určité části absorbované energie do nefotochemických disipačních procesů. V E1 zůstaly konstitutivní neregulované disipační procesy ( $\Phi_{f,D}$ ) u všech ošetření téměř konstantní ale výrazně zvýšené oproti nesenescentní kontrole (Obr. 11, A). Výrazně vyšších hodnot dosahovalo regulované světlem indukované nefotochemické zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ) u všech variant, v porovnání s BAP nebo s nesenescentní kontrolou, odrážející aktivaci ochranných zhášecích procesů.

5. den inkubace potmě (Obr. 11, B) byly již zřejmé nevratné změny ve fotosyntetickém aparátu, které se obvykle projevují výrazným nárůstem ( $\Phi_{f,D}$ ) a poklesem  $\Phi_{PSII}$  pozorovaným u všech variant oproti BAP a nesenescentní kontrole. Pouze u látky 1 byl zřejmý mírný protektivní efekt, kdy byl pozorován průkazně vyšší aktuální kvantový výtěžek fotochemie PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) a nižší kvantový výtěžek nefotochemického zhášení ( $\Phi_{NPQ}$ ) ve srovnání s DMSO. Tomu odpovídala také nejnižší hodnota neregulovaného zhášení u látky 1 ( $\Phi_{f,D}$ ) ze všech testovaných látek (Obr. 11, B)

### EXPERIMENT 1 (senescence iniciovaná tmou 4 dny)



### EXPERIMENT 2 (senescence iniciovaná tmou 5 dnů)



Obr. 11: Parametry spočítané v ustáleném stavu zhášecí analýzy pomalé fluorescenční indukce. Parametry ( $\Phi_{PSII}$ ), ( $\Phi_{NPQ}$ ) a ( $\Phi_{f,D}$ ) spočítány během měření oddělených listů po čtyřech a pěti dnech ošetření uvedenými látkami (DMSO, BAP, látka 1-6) a kultivaci ve tmě. Přepočítáno na % vztahované ke kontrolním hodnotám neošetřených listů (100%) změřených ihned po ustrižení (červená vodorovná úsečka). Statisticky signifikantní rozdíly (T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum Test) jednotlivých variant od DMSO jsou znázorněny písmenem B, n=5-8, počítány mediány a kvartily.

### 3.3 Propustnost a odrazivost listu

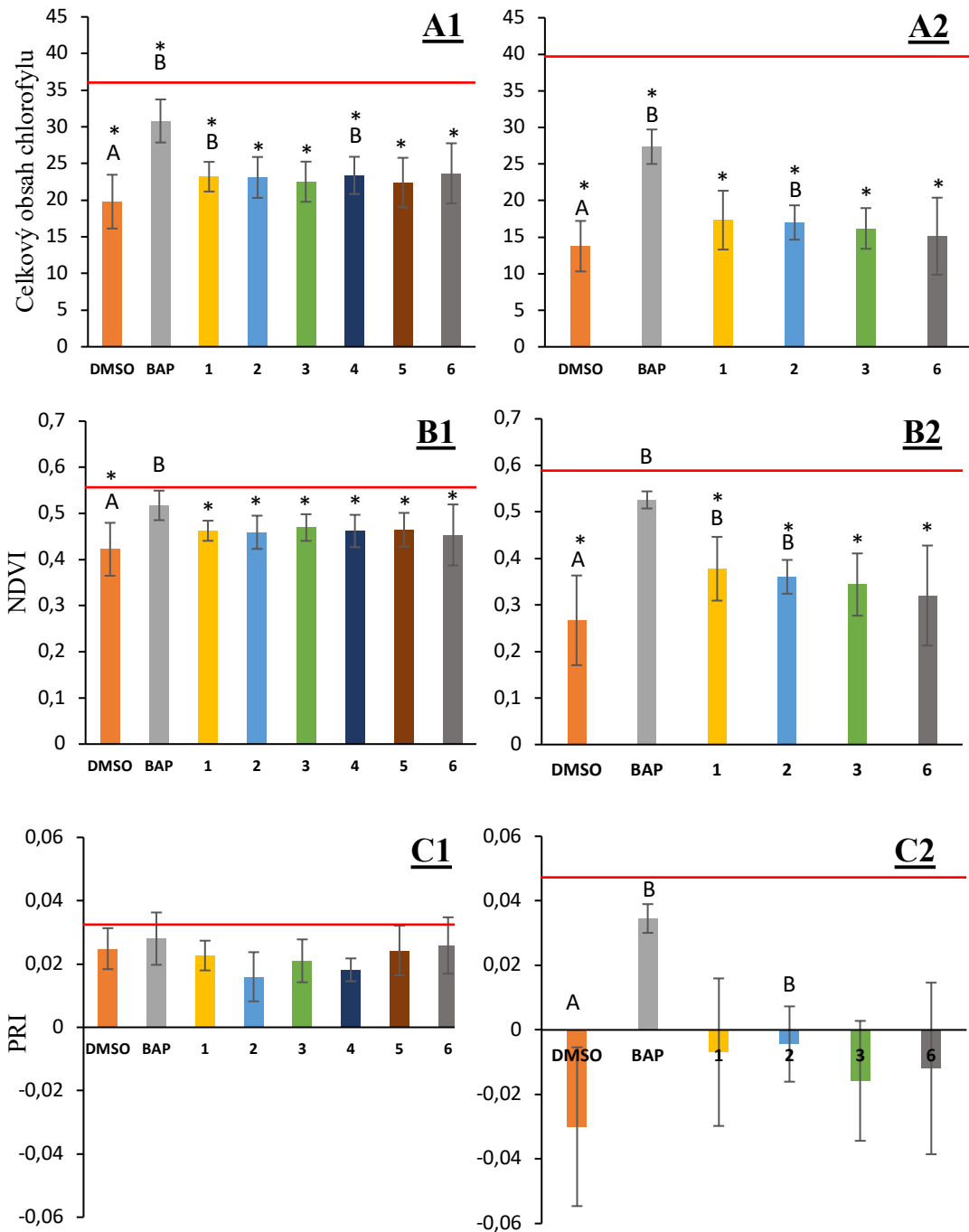
Měření relativního obsahu chlorofylu po umělé indukci senescence tmou po dobu čtyř dnů v E1 (obr. 12, A1) a po dobu pěti dnů v E2 (obr. 12, A2) odhalilo výrazný postupující pokles u negativní kontroly DMSO. Naopak je vidno, že u pozitivní kontroly BAP významně inhiboval degradaci chlorofylu v listech. U látek 1-6 byly zaznamenány hodnoty SPAD mírně vyšší než u DMSO. Listy ošetřené látkami 1, 4 v E1 (Obr. 12, A1) a látkou 2 v E2 (Obr. 12, A2) dokonce vykazovaly průkazně vyšší zachování obsahu chlorofylu oproti DMSO. Z porovnání hodnot SPAD v E1 a E2 je zřejmé, že celkový obsah chlorofylu během 24h významně poklesl u všech variant.

Parametr NDVI potvrzuje obdobné trendy v celkovém obsahu chlorofylu v uvedených variantách (obr. 12, B1 a B2). Lze tedy předpokládat, že vyšší obsah chlorofylu v listech měly varianty ošetřené BAP na rozdíl od DMSO, kde byl rozklad chlorofylu největší. Hodnoty NDVI v E1 u listů ošetřenými všemi testovanými látkami byly srovnatelné, opět se pohybovaly mezi pozitivní a negativní kontrolou (Obr. 12, B1). Podobně tomu bylo u E2, kde látky 1 a 2 vykazovaly dokonce průkazně vyšší obsah chlorofylu oproti DMSO (Obr. 12, B2). I u parametru NDVI byly potvrzeny průkazně nižší hodnoty pátý den působení tmy oproti dni čtvrtému.

Hodnoty PRI nepřímo odrážející míru deepoxidace pigmentů xantofylového cyklu vykazovaly značný rozptyl (obr. 12, C1 a C2). Významný rozdíl je též zřejmý mezi oběma experimenty, kdy nejvyšší hodnoty PRI byly dosaženy v obou experimentech pro pozitivní kontrolu a BAP. V E2 byly hodnoty pro všechny ostatní varianty dokonce záporné, což koresponduje s nárůstem nefotochemického zhášení (obr. 11 a 12, C2). Záporný parametr PRI je doprovázen i velmi nízkým aktuálním kvantovým výtěžkem fotochemie PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) (obr. 11, B), korelace mezi těmito dvěma parametry již byla prokázána i pro douglasku vystavenou několika světelným intenzitám (Gamon et al. 2013). Vysoké rozpětí směrodatných odchylek naznačuje heterogenitu listů co do jejich specifické reflektance v rámci jednotlivých variant. Heterogenita listů byla demonstrována již pro parametr  $F_v/F_M$  pomocí fluorescenčního zobrazování celé plochy listu měřené pro všechny tři experimenty (Obr. 10).

**EXPERIMENT 1**  
(senescence iniciovaná tmou 4 dny)

**EXPERIMENT 2**  
(senescence iniciovaná tmou 5 dnů)



Obr. 12: Parametry optických vlastností listu. Celkový obsah chlorofylu (A) a spočítané vegetační indexy NDVI (B) a PRI (C). Měření provedeno po čtyřech a pěti dnech ošetření listů uvedenými látkami (DMSO, BAP, látka 1-6) a kultivaci ve tmě. Vodorovná červená úsečka znázorňuje hodnoty neošetřených kontrolních listů měřených ihned po ustřižení. Statisticky signifikantní rozdíly (T-test nebo Mann-Whitney Rank Sum Test) jednotlivých variant od DMSO jsou znázorněny písmenem B a rozdíly mezi variantami experimentů 1 a 2 jsou znázorněny \*, n=5-8, počítány průměry a SD.



## 4 Diskuze

Již dříve bylo dokázáno, že senescence listů je doprovázena degradací chlorofylu a významným poškozením fotosyntetické činnosti (Janeckova et al. 2018) a že CK včetně jejich uměle nasyntetizovaných derivátů mohou chránit před tímto poškozením (Janeckova et al. 2019). Odolnost plodin vůči stresu patří k nejdůležitějším vlastnostem, které významně přispívají k výnosu plodin (Chernyad'ev 2009). Aromatický cytokinin 6-benzylaminopurin (BAP) je již několik desetiletí používán v rostlinných biotechnologiích kvůli své účinnosti a dostupné ceně (Bryksova et al. 2020a).

Naše práce potvrzuje, že BAP chrání u ječmene primární fotochemické procesy fotosyntézy v procesu umělé senescence. BAP dokázal působit protektivně po dobu čtyř, pěti i šesti dnů během zatemnění listů. Avšak aplikace BAP je spojena i s negativními účinky. Po jeho aplikaci dochází k přirozené N9-glykosylaci, která může vést k hromadění neaktivních N9-CK glukosidů (Werbrouck et al. 1995), které mohou stimulovat produkci ethylenu a ethylenovou signální dráhu, což způsobuje inhibici růstu kořenů (Podlešáková et al. 2012). Tato zjištění vedla k hledání aromatických derivátů CK, které by nevykazovaly tyto negativní účinky na růst a vývoj rostlin. Jednou z možností, jak zabránit negativním účinkům N9-glukosylace, je potlačit tuto reakci navázáním vhodné substituce na N9 purinu v BAP nebo hydroxylací jeho benzylového kruhu. Očekává se, že záměna 2' nebo 3' hydroxylové skupiny nukleosidu atomem fluoru v bioaktivní molekule způsobí nejen změnu biologické aktivity, ale také zvýší stabilitu nukleosidů (Pitzer 1960). Vzhledem k výhodám fluoru při nahrazování vodíku v bioaktivní molekule se očekává, že tato změna ovlivní minimálně způsob vazby molekuly na receptory nebo enzymy.

V minulosti bylo testováno jen několik fluorovaných derivátů cytokininů na biologickou aktivitu u rostlin. Deriváty nesoucí atom fluoru na benzylovém kruhu mají obecně silnou biologickou aktivitu (Dolezal et al. 2007), která byla zaznamenána v práci Vyličilové z roku 2016, kde 2-chlor-6-(4-fluorobenzylamino)purin-9-ribosid, byl neúčinnější látkou, jež prodloužil 50% degradaci chlorofylu na téměř dvojnásobek času oproti BAP. Nedávno byly syntetizovány některé sloučeniny s podobnou strukturou, jako jsou 6-benzylaminopuriny s  $\beta$ -D-arabinózou v poloze N9. U těchto sloučenin byl prokázán silný protektivní účinek v porovnání s BAP v biologickém testu senescence oddělených listů pšenice. Také bylo uvedeno, že ošetření semen (priming) N9-substituovanými deriváty CK mělo pozitivní vliv na zachování homogennější

populace a potlačení degradace chlorofylu u stresovaných rostlin (Bryksova et al. 2020b). Navíc poslední experimenty ukazují, že cytokininová aktivita ethyl derivátů CK může být vysoká a ethyl deriváty by tak mohly být dalšími slibnými protektivními látkami používanými v rostlinné fyziologii (Mgr. Karel Doležal Dr., ústní sdělení). V této BP bylo testováno 6 nově nasyntetizovaných CK derivátů s fluorovanou ribózou ( $\beta$ -D-modifikace), s hydroxylací či methylací benzylového kruhu či s etylovým můstkem (Obr. 4) s předpokladem, že kombinace těchto strukturních změn v molekule, které jednotlivě působí v rostlinách protektivně, povede k sečtení pozitivního efektu a dojde k výraznému zvýšení biologické aktivity dané molekuly spojené s její antisenescenční aktivitou.

Přestože bylo testováno 6 slibných látek, mírné protektivní účinky jsme pozorovali pouze u dvou z nich a ani jedna z látek nevykazovala lepší parametry než pozitivní kontrola BAP. Ze třech experimentů provedených 4.-6. den senescence tmou a působení látek bylo zřejmé, že na těchto parametrech záleží co do působení jednotlivých látek i reakce rostliny. 4. den byl největší protektivní účinek látky 6 a méně látky 2 zatímco 5. den vykazovala protektivní účinky zejména látka 2. Protektivní účinky se projeví zejména ve větším kvantovém výtěžku fotochemie PSII pozorovaném u těchto látek oproti DMSO, pomalejší redukcí  $Q_A^-$ , menším relativním zastoupením anténních systémů, větším kvantovým výtěžkem a účinností elektronového transportu ke koncovým akceptorům PSI. Z výsledků je zřejmé, že RC PSII jsou poškozena umělou senescencí ve větší míře než antény PSII a nebo také než RC PSI. Nicméně pro potvrzení této hypotézy by bylo třeba v další práci zjištění současného stavu PSI pomocí měření P700 přístrojem Dual-PAM-100 (Walz, Effeitrich, Německo). Protektivní účinky látky dvě změřené pomocí velmi rychlé fluorescenční indukce byly doprovázeny také naměřeným vyšším obsahem chlorofylu v E2 oproti DMSO. Z naší práce vyplývá, že optimální doba působení látek i tmy je 4 dny, v případě velmi biologicky aktivních látek (jako zde byl BAP) je možné tuto dobu prodloužit o jeden den.

Naše práce také poukázala na význam použití více metod k popisu fotosyntetického stavu rostlin, kdy fluorescenční imaging odhalil zanedbatelné působení BAPu ve starších částech listu, zatímco látka 2 v těchto místech působila mírně protektivně. Na rozdíl od heterogenního působení BAP či látky 2 na celé ploše listu, po aplikaci DMSO byla fotochemie PSII inhibována homogenně.

Je třeba poznamenat, že účinky zkoumaných látek na senescenci rostlin mohou být ovlivněny druhem testované rostliny. Zdá se, že některé CK deriváty, jako například

BAP, projevují antisenescenční účinky na listy ječmene, kukuřice a pšenice (Yang et al. 2018, Ren et al. 2018, Janeckova et al. 2019). Na druhou stranu, při aplikaci na salát byl zjištěn pouze slabý nebo žádný účinek (Prokopova et al. 2010). Podobně v práci Kučerové z roku 2020 byly zjištěny odlišné účinky látek MeOBAPA a OHBAPA, v pšenici měl 3OHBAPA vyšší ochranný účinek než 3MeOBAPA, zatímco v Arabidopsis byl účinnějším derivátem 3MeOBAPA.

Naše práce otestovala antisenescenční účinnost 6ti cíleně vybraných látek na vybraných fotosyntetických parametrech během třech nezávislých senescenčních testech. Mírné protektivní účinky vykazovaly pouze dvě látky, žádná z nich nebyla lepší než BAP. Nicméně otestováním látek se otevírají další otázky k řešení v další práci. Zejména by měly být látky otestovány na jiných rostlinných druzích, také v jiných koncentracích a v neposlední řadě lze stanovit jejich možný účinek na PSI. V práci jsme také stanovili, že nejlepší dobou působení senescence i látek je 4-5 dní dle účinnosti testovaných látek.

## 5 Závěr

Teoretická část bakalářské práce poskytuje přehled o vlivu cytokininů na senescenci rostlin a jejich účincích na fotosyntézu. Byly také popsány a vysvětleny metody pro měření fotosyntetické aktivity a optických vlastností listu, které byly v praktické části práce úspěšně aplikovány na ječmen jarní.

V práci byly testovány protektivní vlastnosti šesti cíleně vybraných cytokininových derivátů během uměle iniciované senescence tmou na oddělených listech ječmene jarního, a to prostřednictvím měření spekter odrazivosti a propustnosti listu, a také pomocí měření pomalé a velmi rychlé fluorescenční indukce. Výsledky experimentů ukázaly, že exogenní aplikace látek 2 a 6 mírně potlačila uměle iniciovanou senescenci tmou listů ječmene v závislosti na době působení, což bylo prokázáno pozitivními výsledky zejména z měření velmi rychlé fluorescenční indukce a obsahu chlorofylu. Nicméně žádná z látek neměla lepší účinky než pozitivní kontrola BAP, který ale nepůsobil protektivně v nejstarších špičkách listů.

Bylo úspěšně otestováno působení vybraných látek na oddělených listech ječmene při senescenci tmou, standardizoval se postup a trvání senescenčních testů pro dané látky a byly navrženy další možné experimenty pro detekci větší biologické aktivity látek.

## 6 Literatura

- Balazadeh, S., S. Parlitz, B. Mueller-Roeber & R. C. Meyer (2008) Natural developmental variations in leaf and plant senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 10, 136-147.
- Besagni, C. & F. Kessler (2013) A mechanism implicating plastoglobules in thylakoid disassembly during senescence and nitrogen starvation. *Planta*, 237, 463-470.
- Biswal, B. & J. K. Pandey (2018) Loss of photosynthesis signals a metabolic reprogramming to sustain sugar homeostasis during senescence of green leaves: Role of cell wall hydrolases. *Photosynthetica*, 56, 404-410.
- Bryksova, M., S. Dabravolski, Z. Kucerova, F. Z. Kokas, M. Spundova, L. Plihalova, T. Takac, J. Gruz, M. Hudecek, V. Hlouskova, R. Koprna, O. Novak, M. Strnad, O. Plihal & K. Dolezal (2020a) Aromatic cytokinin arabinosides promote PAMP-like responses and positively regulate leaf longevity. *Acs Chemical Biology*, 15, 1949-1963.
- Bryksova, M., A. Hybenova, A. E. Hernandez, O. Novak, A. Pencik, L. Spichal, N. De Diego & K. Dolezal (2020b) Hormopriming to mitigate abiotic stress effects: A case study of N-9-Substituted cytokinin derivatives with a fluorinated carbohydrate moiety. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- BuchananWollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 48, 181-199.
- Cartelat, A., Z. G. Cerovic, Y. Goulas, S. Meyer, C. Lelarge, J. L. Prioul, A. Barbottin, M. H. Jeuffroy, P. Gate, G. Agati & I. Moya (2005) Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, 91, 35-49.
- Cassol, D., F. S. P. De Silva, A. R. Falqueto & M. A. Bacarin (2008) An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. *Photosynthetica*, 46, 634-636.
- Chernyad'ev, II (2009) The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45, 351-362.
- Chory, J., D. Reinecke, S. Sim, T. Washburn & M. Brenner (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* - *det* mutants have an altered response to cytokinins. *Plant Physiology*, 104, 339-347.
- Cordon, G., M. G. Lagorio & J. M. Paruelo (2016) Chlorophyll fluorescence, photochemical reflective index and normalized difference vegetative index during plant senescence. *Journal of Plant Physiology*, 199, 100-110.
- Costa, M. L., P. M. Civello, A. R. Chaves & G. A. Martinez (2005) Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 degrees C. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 191-199.
- da Silva, J. M., A. B. da Silva & M. Padua (2007) Modulated chlorophyll a fluorescence: a tool for teaching photosynthesis. *Journal of Biological Education*, 41, 178-183.

- Dolezal, K., I. Popa, E. Hauserova, L. Spichal, K. Chakrabarty, O. Novak, V. Krystof, J. Voller, J. Holub & M. Strnad (2007) Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N-6-benzyladenosines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 3737-3747.
- Fan, X. L., Z. S. Zhang, H. Y. Gao, C. Yang, M. J. Liu, Y. T. Li & P. M. Li (2014) Photoinhibition-like damage to the photosynthetic apparatus in plant leaves induced by submergence treatment in the dark. *Plos One*, 9.
- Gamon, J. A. & B. Bond (2013) Effects of irradiance and photosynthetic downregulation on the photochemical reflectance index in Douglas-fir and ponderosa pine. *Remote Sensing of Environment*, 135, 141-149.
- Gamon, J. A., L. Serrano & J. S. Surfus (1997) The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia*, 112, 492-501.
- Gamon, J. A. & J. S. Surfus (1999) Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist*, 143, 105-117.
- Gan, S. S. (2018) concepts and types of senescence in plants. *Plant Senescence: Methods and Protocols*, 1744, 3-8.
- Garbulsky, M. F., J. Penuelas, J. Gamon, Y. Inoue & I. Filella (2011) The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies A review and meta-analysis. *Remote Sensing of Environment*, 115, 281-297.
- Honig, M., L. Plihalova, A. Husickova, J. Nisler & K. Dolezal (2018) Role of cytokinins in senescence, antioxidant defence and photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19.
- Hunt, E. R. & C. S. T. Daughtry (2014) Chlorophyll meter calibrations for chlorophyll content using measured and simulated leaf transmittances. *Agronomy Journal*, 106, 931-939.
- Janeckova, H., A. Husickova, U. Ferretti, M. Prcina, E. Pilarova, L. Plackova, P. Pospisil, K. Dolezal & M. Spundova (2018) The interplay between cytokinins and light during senescence in detached Arabidopsis leaves. *Plant Cell and Environment*, 41, 1870-1885.
- Janeckova, H., A. Husickova, D. Lazar, U. Ferretti, P. Pospisil & M. Spundova (2019) Exogenous application of cytokinin during dark senescence eliminates the acceleration of photosystem II impairment caused by chlorophyll b deficiency in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 136, 43-51.
- Krieger-Liszkay, A., K. Krupinska & G. Shimakawa (2019) The impact of photosynthesis on initiation of leaf senescence. *Physiologia Plantarum*, 166, 148-164.
- Krupinska, K., M. Mulisch, J. Hollmann, K. Tokarz, W. Zschiesche, H. Kage, K. Humbeck & W. Bilger (2012) An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high-yield variety of barley. *Physiologia Plantarum*, 144, 189-200.

- Kucerova, Z., M. Rac, J. Mikulik, O. Plihal, P. Pospisil, M. Bryksova, M. Sedlarova, K. Dolezal & M. Spundova (2020) The anti-senescence activity of cytokinin arabinosides in wheat and Arabidopsis is negatively correlated with ethylene production. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- Lazar, D. (2003) Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology*, 220, 469-503.
- Lazar, D. (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology*, 33, 9-30.
- Lazar, D. (2015) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology*, 175, 131-147.
- Liebsch, D. & O. Keech (2016) Dark-induced leaf senescence: new insights into a complex light-dependent regulatory pathway. *New Phytologist*, 212, 563-570.
- Ling, Q. H., W. H. Huang & P. Jarvis (2011) Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in Arabidopsis thaliana. *Photosynthesis Research*, 107, 209-214.
- Martinez, D. E. & J. J. Guiamet (2004) Distortion of the SPAD 502 chlorophyll meter readings by changes in irradiance and leaf water status. *Agronomie*, 24, 41-46.
- Maxwell, K. & G. N. Johnson (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668.
- Murchie, E. H. & T. Lawson (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64, 3983-3998.
- Okazaki, K., Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Mori, T. Ichikawa, M. Matsui, H. Nakanishi & S. Miyagishima (2009) The plastid division1 and 2 components of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. *Plant Cell*, 21, 1769-1780.
- Paluch-Lubawa, E., E. Stolarska & E. Sobieszczuk-Nowicka (2021) Dark-induced barley leaf senescence - a crop system for studying senescence and autophagy mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Park, S. Y., J. W. Yu, J. S. Park, J. Li, S. C. Yoo, N. Y. Lee, S. K. Lee, S. W. Jeong, H. S. Seo, H. J. Koh, J. S. Jeon, Y. I. Park & N. C. Paek (2007) The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell*, 19, 1649-1664.
- Penuelas, J., I. Filella & J. A. Gamon (1995) Assessment of photosynthetic radiation-use efficiency with spectral reflectance. *New Phytologist*, 131, 291-296.
- Pitzer, K. S. (1960) The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals: an introduction to modern structural chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 82(15), 4121-4121.
- Plihalova, L., H. Vylicilova, K. Dolezal, L. Zahajska, M. Zatloukal & M. Strnad (2016) Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology*, 33, 614-624.

- Podlesaková, K., D. Zalabak, M. Cudejkova, O. Plihal, L. Szucova, K. Dolezal & P. Galuszka (2012) Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicromolar range. *PLoS One*, 7(6), e39293.
- Prokopova, J., M. Spundova, M. Sedlarova, A. Husickova, R. Novotny, K. Dolezal, J. Naus & A. Lebeda (2010) Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 716-723.
- Quirino, B. F., Y. S. Noh, E. Himelblau & R. M. Amasino (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science*, 5, 278-282.
- Ren, B., J. Zhang, S. Dong, P. Liu & B. Zhao (2018) Exogenous 6-benzyladenine improves antioxidative system and carbon metabolism of summer maize waterlogged in the field. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 204, 175-184.
- Sade, N., M. D. Rubio-Wilhelmi, K. Umnajkitikorn & E. Blumwald (2018) Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 69, 845-853.
- Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449.
- Schippers, J. H. M., R. Schmidt, C. Wagstaff & H. C. Jing (2015) Living to die and dying to Live: The survival strategy behind leaf senescence. *Plant Physiology*, 169, 914-930.
- Spundova, M., H. Popelkova, P. Ilik, J. Skotnica, R. Novotny & J. Naus (2003) Ultrastructural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1051-1058.
- Stamford, J. D., S. Violet-Chabrand, I. Cameron & T. Lawson (2023) Development of an accurate low cost NDVI imaging system for assessing plant health. *Plant Methods*, 19.
- Stirbet, A., G. Y. Riznichenko, A. B. Rubin & Govindjee (2014) Modeling chlorophyll a fluorescence transient: Relation to photosynthesis. *Biochemistry-Moscow*, 79, 291-323.
- Stirbet, A., D. Lazar, J. Kromdijk & Govindjee (2018) Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica*, 56, 86-104.
- Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101, 674-688.
- Synkova, H., S. Semoradova, R. Schnablova, E. Witters, M. Husak & R. Valcke (2006) Cytokinin-induced activity of antioxidant enzymes in transgenic Pssu-ipt tobacco during plant ontogeny. *Biologia Plantarum*, 50, 31-41.
- Tarkowska, D., K. Dolezal, P. Tarkowski, C. Astot, J. Holub, K. Fuksova, T. Schmulling, G. Sandberg & M. Strnad (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus x canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*, 117, 579-590.



- Uddling, J., J. Gelang-Alfredsson, K. Piikki & H. Pleijel (2007) Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research*, 91, 37-46.
- Vylicilova, H., A. Husickova, L. Spichal, J. Srovnal, K. Dolezal, O. Plihal & L. Plihalova (2016) C2-substituted aromatic cytokinin sugar conjugates delay the onset of senescence by maintaining the activity of the photosynthetic apparatus. *Phytochemistry*, 122, 22-33.
- Weaver, L. M., S. S. Gan, B. Quirino & R. M. Amasino (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology*, 37, 455-469.
- Werbrouck, S. P. O., B. Vanderjeugt, W. Dewitte, E. Prinsen, H. A. Vanonckelen & P. C. Debergh (1995) The metabolism of benzyladenine in *spathiphyllum-floribundum schott-petite* in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Reports*, 14, 662-665.
- Yang, D. Q., Y. L. Luo, W. H. Dong, Y. P. Yin, Y. Li & Z. L. Wang (2018) Response of photosystem II performance and antioxidant enzyme activities in stay-green wheat to cytokinin. *Photosynthetica*, 56, 567-577.
- Zavaleta-Mancera, H. A., B. J. Thomas, H. Thomas & I. M. Scott (1999) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1683-1689.
- Zwicke, M., C. Picon-Cochard, A. Morvan-Bertrand, M. P. Prud'homme & F. Volaire (2015) What functional strategies drive drought survival and recovery of perennial species from upland grassland? *Annals of Botany*, 116, 1001-1015.