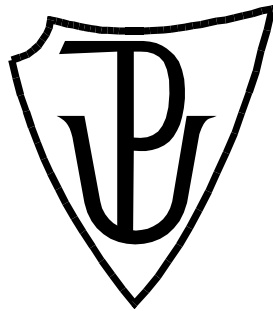


**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv nově připravených cytokininových derivátů na
indukovanou senescenci *ahk* mutantů *Arabidopsis
thaliana***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Michaela Šišková
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.
Rok:	2021

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

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Zuzaně Kučerové, Ph.D. za veškerou její pomoc, vstřícný přístup a čas, který mi během vypracovávání této bakalářské práce věnovala. Mé poděkování patří také mé rodině a blízkým za obrovskou podporu v průběhu celého studia na této vysoké škole.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michaela Šišková
Název práce	Vliv nově připravených cytokininových derivátů na indukovanou senescenci <i>ahk</i> mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Klíčová slova	cytokininy, senescence, <i>Arabidopsis</i> , AHK receptory, chlorofyl, F_v/F_m
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Michaela Šišková
Title of the thesis	Effect of newly prepared cytokinin derivatives on induced senescence of <i>Arabidopsis thaliana ahk</i> mutants
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Zuzana Kučerová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Key words	cytokinins, senescence, <i>Arabidopsis</i> , AHK receptors, chlorophyll, F_v/F_m
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

Abstrakt

Poslední vývojové stádium rostliny označujeme jako senescenci. Dochází při ní k řadě fyziologických i metabolických změn a končí úhynem buď celé rostliny, či jejích částí. Nástup a průběh senescence ovlivňují kromě vnitřních faktorů, také faktory vnější. Listovou senescenci můžeme posuzovat například podle klesajícího obsahu chlorofylu a snižující se fotosyntetické aktivity. Projevy senescence mohou být oddáleny či zpomaleny působením rostlinných hormonů cytokininů. Rostliny cytokininový signál přijímají pomocí histidin kinasových AHK receptorů. V rámci této bakalářské práce byly zkoumány účinky derivátu 6-benzylaminopurinu (BAP) s označením 3MeOBAPA (6-(3-methoxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurin) na indukovanou senescenci. U derivátu 3MeOBAPA byla již dříve zjištěna schopnost oddálit senescenci při *in vivo* testech, *in vitro* však nebyl schopen aktivovat receptor AHK3 ani AHK4. Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jaký dopad mají chybějící AHK receptory na účinek 3MeOBAPA. Antisenescenční aktivita této sloučeniny byla srovnávána s 6-benzylaminopurinem a testována na oddělených listech *Arabidopsis thaliana* L. genotypů WT, *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4* (dvojití mutanti s deficientními histidin kinasovými receptory). Listy byly uloženy v příslušných roztocích o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ ve tmě a po šesti dnech byl stanoven obsah chlorofylu *a+b* a maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m). Obsah chlorofylu *a+b* byl více zachován při aplikaci roztoku BAP, a to u všech genotypů. V zachování parametru F_v/F_m u WT rostlin byl mírně účinnější 3MeOBAPA, u *ahk3ahk4* BAP a v případě *ahk2ahk4* bylo působení obou roztoků srovnatelné. V případě rostlin *ahk2ahk3* nebyl efekt použitých roztoků jednoznačný. Na základě získaných dat zatím nelze s jistotou vyloučit ani potvrdit roli AHK receptorů v přenosu signálu 3MeOBAPA. Pro formulování jednoznačných závěrů bude třeba provést další experimenty.

Summary

Senescence is the final stage of plant development during which many of physiological and metabolic alterations occur. This process results in death of the whole plant or its parts. The onset and progression is affected by both internal and external factors. Visually, in leaves senescence is accompanied by yellowing and disintegration of tissues. Leaf senescence can be evaluated by the decrease in chlorophyll *a+b* content and photosynthetic activity. The process of senescence can be slowed down or delayed by the action of the plant hormones cytokinins. Cytokinin signal is transmitted by histidine kinase AHK receptors. In this work, the effect of 6-benzylaminopurine (BAP) derivative, 3MeOBAPA (6-(3-methoxybenzylamino)-9-β-d-arabinofuranosylpurine), on delaying induced leaf senescence was tested. The ability of 3MeOBAPA to delay senescence has been previously showed, although the compound was not able to activate AHK3 or AHK4 receptor *in vitro*. The aim of this work was to find out how non-functioning AHK receptors affect the 3MeOBAPA action. The antisenescence activity of 3MeOBAPA was compared with BAP and investigated by measuring parameters such as chlorophyll *a+b* content and maximum quantum yield of photochemistry of photosystem II (F_v/F_m) in detached leaves that were incubated in the solutions at a concentration 10^{-5}mol.l^{-1} in the dark for six days. The wild type *Arabidopsis thaliana* plants and its double mutants with deficient histidin kinase receptors (*ahk2ahk3*, *ahk2ahk4*, *ahk3ahk4*) were used. The leaves treated with BAP maintained higher chlorophyll *a+b* content, in all genotypes. Application of 3MeOBAPA led to slightly higher maintenance of F_v/F_m in WT plants. In *ahk3ahk4* leaves higher F_v/F_m was measured when incubated in BAP and in the case of *ahk2ahk4* the effects of both solutions were comparable. The effect of used compounds was not clear in the case of *ahk2ahk3*. For now, based on the obtained results we can not exclude nor confirm the role of AHK receptors in 3MeOBAPA signaling. To decide further experiments need to be done.

Obsah

1	Úvod	10
2	Současný stav řešené problematiky	11
2.1	Senescence	11
2.1.1	Listová senescence	11
2.1.2	Senescence na genetické úrovni	13
2.1.3	Indukovaná senescence.....	14
2.2	Cytokininy	16
2.2.1	Rozdělení cytokininů a jejich struktura	16
2.2.2	Úloha cytokininů v rostlině	18
2.2.3	Syntéza cytokininů	20
2.2.4	Přenos cytokininového signálu a histidin kinasové receptory.....	20
2.2.5	Mutantní <i>ahk</i> rostliny	22
2.2.6	Antisenescenční aktivita cytokininů a jejich derivátů	24
3	Experimentální část	29
3.1	Materiál a metody	29
3.1.1	Rostlinný materiál	29
3.1.2	Použité metody	30
4	Výsledky	32
4.1	Obsah chlorofylů <i>a+b</i>	33
4.1.1	Obsah chlorofylů <i>a+b</i> v kontrolních listech.....	33
4.1.2	Obsah chlorofylů <i>a+b</i> v senescentních (DMSO) listech.....	34
4.1.3	Obsah chlorofylů <i>a+b</i> v listech ošetřených roztokem BAP	35
4.1.4	Obsah chlorofylů <i>a+b</i> v listech ošetřených roztokem 3MeOBAPA.....	37
4.2	Parametr F_v/F_m	39
4.2.1	Parametr F_v/F_m u kontrolních listů	39
4.2.2	Parametr F_v/F_m u senescentních (DMSO) listů	40
4.2.3	Parametr F_v/F_m u senescentních u listů ošetřených roztokem BAP	41
4.2.4	Parametr F_v/F_m u senescentních u listů ošetřených roztokem 3MeOBAPA .	42
5	Diskuze	43
6	Závěr	47
7	Literatura	48
8	Seznam použitých zkratk	55

Cíle práce

1. Vypracovat přehled problematiky o vlivu cytokininů a cytokininových derivátů na senescenci rostlin a mechanismu jejich účinku.
2. Zvládnout metodiku pěstování a navození indukované senescence listů modelových rostlin *Arabidopsis thaliana*.
3. Zvládnout metodiku stanovení obsahu chlorofylů.
4. Zvládnout metodiku měření parametrů chlorofylové fluorescence v ploše listu pomocí přístroje FluorCam (PSI, Brno, ČR) včetně zpracování obrázků.
5. Provést stanovení obsahu chlorofylu a měření parametrů chlorofylové fluorescence (FluorCam) u modelových rostlin během indukované senescence pod vlivem různých derivátů cytokininů.
6. Zpracovat výsledky experimentů a zhodnotit vliv různých derivátů cytokininů na změny obsahu chlorofylu a funkce fotosystému II během indukované senescence.

1 Úvod

Senescence je posledním vývojovým stádiem rostliny. Její počátek a průběh je ovlivněn nejen stářím rostliny, ale také rostlinnými hormony a vnějšími faktory, jako je například světlo, teplota a dostupnost vody. Senescence je pro rostlinu důležitá zejména kvůli remobilizaci živin, a proto pokud začne dříve či je urychlena, může být ohrožena produkce semen a biomasy, což představuje problém zejména v zemědělství. Senescence je doprovázena poklesem fotosyntetické aktivity a degradací rostlinných pletiv. První známkou stárnutí, které si lze všimnout pouhým okem je ztráta zelené barvy listů způsobená poklesem obsahu chlorofylu. Mimo jiné dochází také ke snížení obsahu endogenních fytohormonů cytokininů. Ty se v rostlině podílejí na řízení řady důležitých procesů, jako je například formování chloroplastů, klíčení či růst prýtu a kořenů. Exogenní aplikace cytokininů či umělé zvýšení jejich endogenního obsahu v transgenních rostlinách může vést k oddálení či zpomalení senescence. Cytokininový signál je přenášen pomocí histidin kinasových receptorů, u *Arabidopsis thaliana* se vyskytují tři: AHK2, AHK3 a AHK4. Tyto receptory se liší nejen svým zapojením ve vývojových procesech, ale také citlivostí vůči cytokininům a jejich derivátům.

V této bakalářské práci byly zkoumány účinky cytokininového derivátu 3MeOBAPA na oddálení senescence u oddělených listů rostlin *A. thaliana* L. standardního genotypu (ekotyp Columbia 0) a rostlin s nefunkčními cytokininovými receptory: *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4*. Míra senescence byla posuzována podle obsahu chlorofylu $a+b$ a maximálního kvantového výtežku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m). Schopnost derivátu 3MeOBAPA zpomalit senescenci *in vivo* byla již dříve prokázána, i když v *in vitro* testech nebyl schopen aktivovat AHK3 ani AHK4 receptory. Cílem této práce bylo pomocí dvojitých *ahk* mutantů zjistit, jaký dopad mají chybějící AHK receptory na účinek 3MeOBAPA.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Senescence

Senescencí označujeme poslední vývojovou fází rostliny, která předchází smrti, a to buď celé rostliny, či jejích částí. Můžeme rozlišovat senescenci na úrovni orgánů, například listovou, květů a plodů, nebo celorostlinnou senescenci. Senescence zahrnuje celou řadu cytologických a biochemických změn. U rostlin se zpomaluje růst a jsou náchylnější ke změnám okolních podmínek, jako je například nedostatek vody a živin. Mezi senescentní změny, které lze pozorovat pouhým okem, patří kromě zrání a opadu plodů, také ztráta původní zelené barvy a abscise listů (Leopold, 1961). Lze ji také charakterizovat jako stádium, kdy rostlina přechází z asimilace živin na jejich remobilizaci (Masclaux *et al.*, 2000). Při senescenci totiž nedochází pouze k rozkladným procesům zahrnujícím například degradaci chlorofylu, proteinů, lipidů a RNA, ale živiny obsažené ve stárnoucích pletivech mohou být recyklovány a využity při reprodukci či uloženy jako zásobní látky, což je důležité zejména u víceletých rostlin (Gan a Amasino, 1997; Hörtensteiner a Feller, 2002). Pokud senescence začne opožděně, je remobilizace živin ohrožena. Naopak předčasný nástup vede ke snížení množství asimilovaného oxidu uhličitého. Proto je pro rostlinu důležité správné načasování senescence (Wingler *et al.*, 2006). Roli v nástupu a trvání senescence hrají kromě vnitřních faktorů, jako je věk rostliny a obsah fytohormonů, i vnější faktory, mezi které patří například teplota, světlo, sucho, nedostatek živin a také biotický stres (Smart, 1994; Gan a Amasino, 1997). Pokud je vlivem působení stresových faktorů vyvolána senescence předčasně, může dojít ke snížení produkce biomasy a semen, což představuje problém hlavně v zemědělství (Gregersen *et al.*, 2013; Schippers *et al.*, 2015).

2.1.1 Listová senescence

V průběhu svého života list projde třemi stádii. Mladý list představuje sink, do kterého proudí asimiláty ze zbytku rostliny, a poté, co dosáhne své plné fotosyntetické kapacity, se sám stává jejich zdrojem. Následuje stádium senescence, během kterého je většina uložených látek z listu odvedena a recyklována (Hörtensteiner a Feller, 2002; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Vizuelně se listová senescence projevuje změnou barvy a následným rozkladem pletiv. Zežloutnutí je způsobeno ztrátou zeleného pigmentu chlorofylu vedoucí k odkrytí přítomných

karotenoidů, které jsou ve srovnání s chlorofylem degradovány pomaleji (Thomas a de Villiers, 1996; Matile *et al.*, 1999). Senescence nejprve postihuje okraje listové čepele a postupuje ke středu a bázi listu. Řapík je využíván k transportu látek i v pokročilejších stádiích senescence, a proto jsou jeho pletiva degradována pomaleji (Hensel *et al.*, 1993). Na buněčné úrovni je první známkou stárnutí rozklad chloroplastů, které obsahují až 70 % listových proteinů (Gan a Amasino, 1997). Jádra buněk a mitochondrie jsou naopak mezi posledními organelami, k jejichž rozkladu dochází, a umožňují tak dokončení procesu senescence (Smart, 1994).

Ke studiu listové senescence se často používají oddělené listy či listové segmenty (Hensel *et al.*, 1993; Špundová *et al.*, 2003; Levey a Wingler, 2005). Špundová *et al.* (2003) porovnávali průběh senescence u segmentů listů ječmene (*Hordeum vulgare* L.), které byly po oddělení na dobu pěti dnů uloženy buď ve tmě, nebo na kontinuálním světle (PAR (*photosynthetically active radiation*) o intenzitě $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). V obou případech byl pozorován rozklad chloroplastů spojený se změnami v uspořádání gran a struktuře tylakoidů. U segmentů uložených ve tmě byl navíc zaznamenán zvýšený výskyt plastoglobulí, zatímco v segmentech uložených na světle byla zaznamenána zvýšená přítomnost škrobových zrn. Ta byla způsobena pravděpodobně tím, že v segmentech dále probíhala fotosyntéza, ale vzhledem k jejich oddělení nemohly uložené asimiláty putovat do zbytku rostliny (Špundová *et al.*, 2003).

Významným parametrem, pomocí něhož lze sledovat počátek a průběh senescence je obsah chlorofylu (Hensel *et al.*, 1993; Brouwer *et al.*, 2012; Janečková *et al.*, 2018). V průběhu přirozené senescence v listech dochází k poklesu obsahu chlorofylu, což bývá doprovázeno snížením fotosyntetické aktivity (Hensel *et al.*, 1993). Obsah chlorofylu klesá také v listech, které jsou po oddělení uloženy do tmy. Pokud jsou listy naopak uloženy na světle, může být obsah tohoto pigmentu zachován i šestý, resp. osmý den po oddělení (Bouwer *et al.*, 2012; Janečková *et al.*, 2018). Degradace chlorofylu je doprovázena funkčními změnami, jako je například snížení fixace oxidu uhličitého, která v případě přirozené senescence, začíná společně s obsahem chlorofylu klesat v době, kdy list dosáhne své maximální velikosti (Hensel *et al.*, 1993; Lu a Zhang 1998). Dále například klesá aktivita enzymu D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy (Rubisco), jehož degradace je také spojena s poklesem fotosyntetické aktivity (Crafts-Brandner *et al.*, 1990; Hensel *et al.*, 1993).

Během senescence dochází k rozkladu proteinů zapojených do elektronového transportního řetězce a syntézy adenosintrifosfátu (ATP), což vede k rozložení fotosystémů I a II a ATP syntasy (Humbeck *et al.*, 1996; Guiamet *et al.*, 2002). Ke zhodnocení fotosyntetické aktivity fotosystému II (PSII) se často používá parametr F_v/F_m , který vyjadřuje maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (PSII). Hodnota F_m odpovídá maximální chlorofylové fluorescenci vzorku adaptovaného na tmu. Variabilní fluorescence F_v je rozdíl mezi F_m a F_0 , minimální (basální) fluorescencí (Genty *et al.*, 1989). Měření F_v/F_m se provádí potom, co jsou listy adaptovány na tmu. Nejprve je změřena minimální fluorescence a po ozáření krátkým saturačním zábleskem světla je změřena maximální fluorescence. U zdravých listů *A. thaliana* se hodnota F_v/F_m blíží 0,83 a během senescence postupně klesá (např. Špundová *et al.*, 2003; Janečková *et al.*, 2018).

2.1.2 Senescence na genetické úrovni

Při senescenci dochází k inaktivaci některých genů, které byly až doposud v rostlině aktivní. Jedná se například o geny kódující enzymy zapojené do fotosyntézy jako například Rubisco, NADH-dependentní hydroxypyruvátreduktasa, plastidová fruktosa-1,6-bisfosfatasa, plastidová aldolasa, NADP-dependentní glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa a další (Wingler *et al.*, 1998). Naopak se zvyšuje exprese jiných genů. Geny, jejichž exprese v průběhu senescence roste, jsou označovány jako *SAG* (*senescence-associated genes*). Patří mezi ně například geny kódující RNasy, proteasy, lipasy a proteiny potřebné pro translokaci živin. Geny patřící k *SAG* můžeme dělit na dvě skupiny. První z nich označujeme jako geny specifické pro senescenci, protože jsou exprimovány pouze v této vývojové fázi. Druhou skupinu tvoří geny, jejichž transkripty jsou detekovatelné i u mladých listů a se stářím jejich exprese roste (Gan a Amasino, 1997). Některé *SAG*, mezi nimi zejména *SAG12*, se často využívají jako molekulární markery senescence (Weaver *et al.*, 1998; Guo a Gan, 2011).

Zentgraf *et al.* (2004) ve svých experimentech prováděných na senescentních listech pěti- až osmítýdenních rostlin *A. thaliana* pozorovali změnu v expresi asi 20 % genů z celkem 8200 analyzovaných genů (Zentgraf *et al.*, 2004). Aktivita těchto genů je regulována pomocí transkripčních faktorů, což jsou proteiny, které se vážou na DNA a ovlivňují tak expresi genů podle aktuálních podmínek. Dvě hlavní skupiny transkripčních faktorů hrajících roli při senescenci tvoří WRKY a NAC, přičemž jejich zvýšenou transkripcí může kromě věku způsobit abiotický stres, útok patogenu či

působení hormonů (Jehanzeb *et al.*, 2017). U *A. thaliana* se nachází asi 75 *WRKY* a kolem 117 *NAC* genů (Eulgem *et al.*, 2000, Eulgem *et al.*, 2007; Nuruzzaman *et al.*, 2010). Zástupce *NAC*, *AtNAP*, patří k transkripčním faktorům, jejichž geny jsou v průběhu senescence hojně exprimovány a hraje klíčovou úlohu při regulaci listové senescence u *A. thaliana*. Pokud je exprese *AtNAP* zvýšena, vede to k předčasné senescenci, naopak jeho vyřazením z funkce dochází k oddálení senescence (Guo a Gan, 2006).

2.1.3 Indukovaná senescence

Počátek a průběh přirozené, neboli vývojové, senescence jsou v listu zakódovány geneticky. Většinou jsou však ovlivňovány také vnějšími faktory. Jako reakce na působení nepříznivých faktorů může být v rostlině senescence spuštěna předčasně a je tak zahájena remobilizace živin do reprodukčních orgánů (Gan a Amasino, 1997). Biotický a abiotický stres může vést až k programované buněčné smrti (PCD, z anglického *programmed cell death*), což je geneticky programovaný proces vedoucí ke zničení buňky (Carimi *et al.*, 2003). Jako reakce na stres jsou aktivovány podobné regulační dráhy jako u přirozené senescence spojené s věkem. Jsou zde však přítomny rozdíly v genové expresi (Gan a Amasino, 1997, Guo a Gan, 2011).

Weaver *et al.* (1998) porovnávali expresi jedenácti *SAG* v oddělených i neoddělených listech *A. thaliana* během přirozené senescence a senescence vyvolané různými způsoby: nedostatkem vody, zastíněním, aplikací rostlinných hormonů. Bylo zjištěno, že největší podobnost s přirozenou senescencí má senescence vyvolaná oddělením listů, které je následováno jejich uložením do tmy. Míra exprese sledovaných *SAG* se přitom lišila podle stáří listů, přičemž u starších byla vyšší (Weaver *et al.*, 1998). Mezi hormony, které jsou schopné zvýšit expresi *SAG* a tím vyvolat či urychlit senescenci patří například kyseliny abscisová či jasmonová a ethylen (Weaver *et al.*, 1998; He *et al.*, 2002).

Vlivem světla na senescenci se zabývali například Levey a Wingler (2005) a zjistili, že při osvětlení o stejné intenzitě (PAR o intenzitě $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) trvajícím 16 hodin senescence u některých testovaných ekotypů *A. thaliana* pokročila více než při 12hodinovém osvětlení. Dřívější nástup senescence mohl být podle autorů způsoben nahromaděním cukrů, spíše než foto-oxidativním stresem, protože při experimentu byla použita nízká intenzita záření (Levey a Wingler, 2005). Zvýšený

obsah cukrů totiž může vést ke snížení obsahu chlorofylu i fotosyntetické aktivity, jak dokazují experimenty provedené na transgenních rostlinách rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), ve kterých byla uměle zvýšena exprese hexokinas AtHXK1, které svým působením zvyšovaly množství sacharidů (Dai et al., 1999). Kromě fotoperiody, hraje v průběhu senescence roli také intenzita světla. U oddělených listů uložených na světle o intenzitě, která je pro růst rostliny přirozená, může být senescence oddálena i naopak indukována, neboť výsledky různých autorů se liší (Špundová et al., 2003; Vlčková et al., 2006; Brouwer et al., 2012; Janečková et al., 2018). Pokud jsou rostliny vystaveny záření o vysoké intenzitě (PAR o intenzitě $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 10 hod) je u nich stárnutí pletiv rychlejší než při ozařování nižší intenzitou světla (PAR o intenzitě $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / 16 hod) (Noodén et al., 1996). Nízké intenzity světla také indukují senescenci, dochází k tomu však pomaleji než při úplném zatemnění, a to i v případě velmi nízkých intenzit jako je $0,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Brouwer et al., 2012).

Působení vysoké teploty může taktéž vyvolat senescenci. U rostlin pšenice (*Triticum aestivum* L.), které rostly při vyšší teplotě (32/27 °C den/noc), byla senescence pokročilejší než u rostlin rostoucích při nižší teplotě (27/17 °C den/noc). Vysoká teplota u rostlin způsobila snížení fotosyntetické aktivity a produkce biomasy a semen (Al-Khatib a Paulsen, 1990). Ze studie, ve které byly sledovány každoroční produkce kukuřice, rýže, sóji a pšenice několika zemí mezi roky 1961 a 2014, vyplývá, že na výnos má nejhorší vliv kombinace vysoké teploty a sucha (Matiu et al., 2017). V neposlední řadě senescenci ovlivňuje také dostupnost živin. Pokud je rostlina přemístěna z média, které obsahuje dostatečné množství potřebných živin, do vody, dochází k indukci senescence (Thomas a de Villiers, 1996). Důležitou roli hraje zejména dusík. Například u rostlin slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) vedl jeho nedostatek k dřívějšímu a výraznějšímu poklesu fotosyntetické aktivity v porovnání s rostlinami, které ho měly dostatek (Agüera et al., 2010).

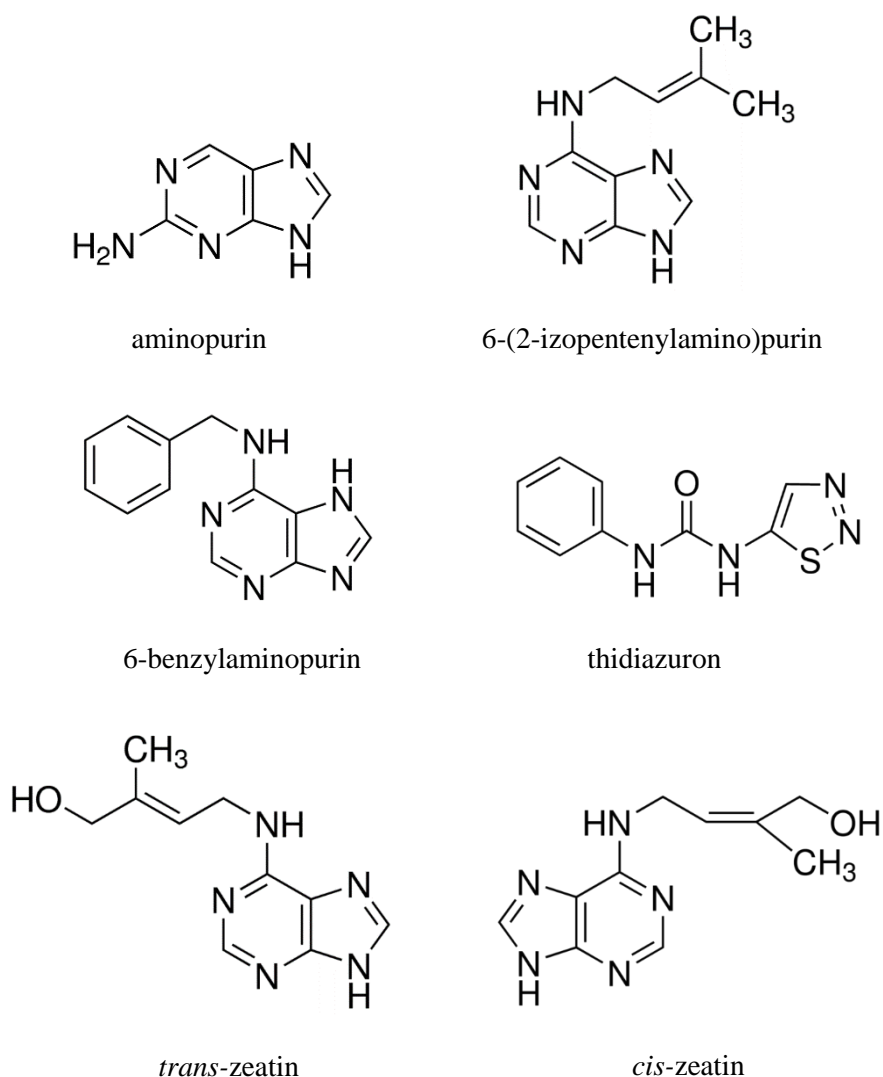
2.2 Cytokininy

2.2.1 Rozdělení cytokininů a jejich struktura

Cytokininy jsou rostlinné hormony stimulující buněčnou proliferaci a diferenciaci. První cytokinin byl izolován roku 1955, kdy se jej Millerovi *et al.* podařilo získat z DNA autoklávovaného sledího spermatu. Tato látka byla díky své schopnosti podporovat cytokinesi nazvána kinetin (Miller *et al.*, 1955). Jeho struktura byla objasněna o rok později. Jednalo se o 6-furfurylaminopurin (Miller *et al.*, 1956). Výskyt kinetinu v rostlinném materiálu, a to v endospermu kokosu (*Cocos nucifera* L.), byl dokázán až o mnoho let později (Barciszewski *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2005). Nedlouho po objevu kinetinu byla zjištěna jeho schopnost pozitivně ovlivňovat obsah chlorofylu v listech a oddalovat senescenci (Richmond a Lang, 1957). Další objevené sloučeniny s podobnou biologickou aktivitou jako má kinetin, byly souhrnně nazvány kininy. Tato skupina byla později přejmenována na cytokininy, přičemž název kininy zůstal zachován pouze pro hormony živočišného původu (Skoog *et al.*, 1965). Mezi prvními identifikovanými přirozeně se vyskytujícími cytokininy byl zeatin, pojmenovaný podle kukuřice (*Zea mays* L.), v jejímž endospermu byl poprvé objeven (Letham, 1963).

Dnes se mezi cytokininy řadí jak přírodní N6 substituované deriváty aminopurinu s postranním isoprenoidním nebo aromatickým řetězcem, tak i celá řada synteticky připravených cytokininů (Mok a Mok, 2001). Jejich purinový heterocyklus může být substituován v polohách C2, C6, N1, N3, N7 a N9 (Plíhalová *et al.*, 2016). Mezi nejběžněji se vyskytující isoprenoidní cytokininy patří *trans*-hydroxylované N6 deriváty adeninu, jako jsou 6-(*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enylaminopurin neboli *trans*-zeatin (*tZ*) a jeho deriváty, například dihydrozeatin, a 6-(2-izopentenyloamino)purin (*iP*) (Mok a Mok, 2001, Obr.1). Kinetin, 6-benzylaminopurin (BAP) a 6-(3-hydroxybenzylamino)purin, známý též jako *meta*-topolin (*mT*), jsou zástupci cytokininů s aromatickým postranním řetězcem (Mok a Mok, 2001). BAP a jeho deriváty byly dlouho pokládány pouze za syntetické sloučeniny. Roku 1973 byl však izolován první aromatický cytokinin, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin, triviálně nazvaný topolin podle topolu (*Populus x robusta*), v jehož listech byl poprvé objeven (Horgan *et al.*, 1975). Mezi synteticky připravené látky s cytokininovou aktivitou spadají sloučeniny odvozené od fenyločoviny, například 1-(2-chloropyridin-4-yl)-3-fenyločovina, 1,3-difenyločovina a thidiazuron (TDZ), z nichž právě poslední

zmíněný vykazuje největší cytokininovou aktivitu (Strnad, 1997; Mok a Mok, 2001). Biologická aktivita cytokininů se odvíjí od jejich struktury a konformace. Například zeatin se vyskytuje ve dvou konformacích – *trans* a *cis*, přičemž *tZ* je považován za biologicky aktivnější než *cis*-zeatin (*cZ*), který je zapojen zejména ve fázích vývoje spojených s limitovaným růstem (Gajdošová *et al.*, 2011; Janečková *et al.*, 2018).



Obr. 1 Chemická struktura aminopurinu a vybraných cytokininů.

Cytokinininy se mohou vyskytovat jako volné báze, nukleosidy nebo nukleotidy a mohou přecházet z jedné formy na druhou. Nejvyšší cytokininovou aktivitu vykazují volné báze, které mohou podléhat různým modifikacím. Například enzym glykosyltransferasa je zodpovědná za jejich glykosylaci, při které vznikají O-glykosidy, což jsou zásobní formy cytokininů. Při konjugaci volných bází s ribosou

vznikají ribosidy, které jsou transportní formou cytokininů (Strnad, 1997; Mok a Mok, 2001). Ireverzibilní inaktivace katalyzovaná uridin-difosfát glykosyltransferasou vede ke vzniku N-glykosidů. Při senescenci v listech klesá množství aktivních volných bází a naopak roste podíl neaktivních forem. To může být způsobeno inhibicí biosyntézy aktivních forem nebo také jejich rychlejší inaktivací a degradací (Perilli *et al.*, 2010). Cytokinin a jejich metabolity jsou rozkládány pomocí cytokinin oxidas/dehydrogenas (CKX). V *A. thaliana* jich můžeme najít sedm a jsou značeny AtCKX1-AtCKX7 (Werner *et al.*, 2003). Aromatické cytokinin jsou oproti cytokininům s isoprenoidním řetězcem odolnější vůči degradaci CKX (Galuszka *et al.*, 2007). Vysoká antisenescenční aktivita TDZ také nejspíš souvisí s jeho odolností proti působení CKX (Whitty a Hall 1974; Brownlee *et al.*, 1975). Navíc je schopen CKX inhibovat a nemůže být ani inaktivován O-glykosylací (Chatfield a Armstrong, 1986; Kopečný *et al.*, 2010; Nisler *et al.*, 2016).

2.2.2 Úloha cytokininů v rostlině

Cytokinin jsou skupina fytohormonů, která spolu s auxiny ovlivňuje řadu vývojových procesů v rostlinách (Schaller *et al.*, 2015). Werner *et al.* použili ke zkoumání úlohy cytokininů mutanty *A. thaliana* se zvýšenou expresí genů *AtCKX* pro cytokinin oxidasy/dehydrogenasy, které jsou schopny degradovat cytokinin s nenasyceným postranním řetězcem. Deficience těchto hormonů měla za následek snížení počtu a velikosti meristémových buněk. V důsledku redukce počtu listových buněk byla negativně ovlivněna také velikost listové plochy. Mutanti měli oproti rostlinám standardního genotypu (wild type, WT) větší primární kořen a více laterálních a adventivních kořenů. Obecně lze o cytokininech říci, že podporují rozvoj nadzemní části rostliny a potlačují růst části podzemní. Jsou zodpovědné za apikální dominanci stonku a proliferaci jeho meristému (Werner *et al.*, 2003).

Cytokinin se uplatňují také ve vývoji chloroplastů, podporují formaci gran, diferenciaci etioplastů v chloroplasty a zvyšují aktivitu enzymů zapojených ve fotosyntéze (Harvey *et al.*, 1974). Spolu se světlem cytokinin stimuluje biosyntézu chlorofylu (Sugiura, 1963). Exogenní aplikace BAP ji navíc dokáže urychlit, neboť v etiolovaných listech po vystavení světlu podporuje syntézu kyseliny 5-aminolevulové, která je prekurzorem chlorofylu (Fletcher *et al.*, 1973). Cytokinin hrají roli také v odpovědi rostliny na environmentální stres (Ha *et al.*, 2012) a jsou schopné chránit pletiva před poškozením oxidativním stresem způsobeným

reaktivními formami kyslíku (ROS, z anglického *reactive oxygen species*), jejichž nárůst doprovází senescenci. Dokazují to například experimenty Zavaleta-Mancery *et al.* (2007), při kterých aplikace BAP na listy pšenice uložené ve tmě vedla ke zvýšené syntéze enzymů katalasy a askorbát peroxidasy, což mělo za následek snížení obsahu ROS a tím omezení oxidace membrán chloroplastů a fotosyntetického aparátu (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007).

Cytokininy jsou syntetizovány převážně v kořenech (Short a Torrey, 1972; Chen *et al.*, 1985). Na vývoji kořenového systému se podílí spolu s auxiny a fungují zde jako jejich antagonisté (Schaller *et al.*, 2015). Synergický vztah těchto hormonů byl zaznamenán také, a to při formaci apikálního meristému stonku (Zhao *et al.*, 2010). V různých částech rostliny se obsah cytokininů liší. Experimenty s oddělenými kořeny, stonky a listy hrachu setého (*Pisum sativum* L.) kultivovanými na médiu prokázaly, že cytokininy jsou syntetizovány ve všech těchto pletivech, nejvíce však v kořenech (Chen *et al.*, 1985). Cytokininy mohou působit v místě syntézy nebo mohou být transportovány do jiných částí rostliny prostřednictvím floému a xylému (Kudo *et al.*, 2010).

Se stárnutím dochází v listech k úbytku aktivních forem cytokininů, který může být spojen s degradací chlorofylu a poklesem fotosyntetické aktivity. Nástup senescence lze oddálit manipulací některých genů hrajících roli v syntéze těchto fytohormonů, například genu pro isopentenyltransferasu (IPT). Gan a Amasino (1995) jako první zkombinovali promotor genu *SAG12 A. thaliana*, který je exprimován při senescenci, s genem *IPT* bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a tento konstrukt vložili do rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Vznikly tak transgenní rostliny s autoregulačním systémem pro biosyntézu cytokininů řízenou senescencí, u nichž zvýšená exprese *IPT* vedla k prodloužení fotosynteticky aktivního období (Gan a Amasino, 1995). Vyšší obsah cytokininů má pozitivní vliv také na zvládání nedostatku vody. Velmi vysoká tolerance k suchu byla zaznamenána u transgenních rostlin tabáku, které over-exprimovaly *IPT* pod promotorem genu *SARK*, který je exprimován při nedostatku vody. Tyto rostliny navzdory zalévání přibližně třetinovým množstvím vody oproti kontrolním rostlinám vykazovaly jen minimální ztráty v produkci biomasy a semen (Rivero *et al.*, 2007). Senescenci je možné oddálit také exogenní aplikací cytokininů, a to jak v celých rostlinách, tak i oddělených listech (Manian *et al.*, 1987; Singh *et al.*, 1992; Janečková *et al.*, 2018). Exogenní aplikaci cytokininů je podrobněji věnována kapitola 2.2.6.

2.2.3 Syntéza cytokininů

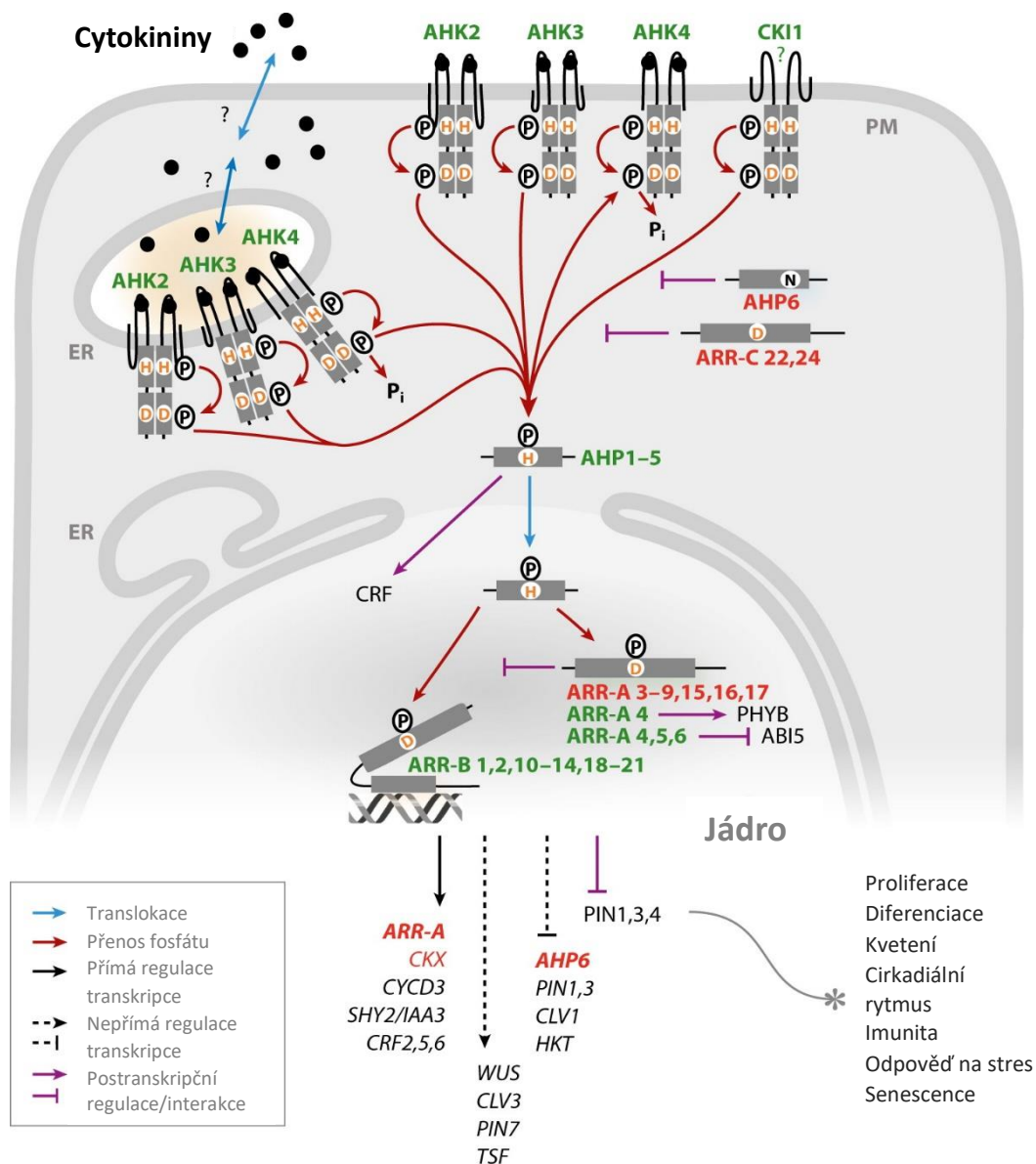
Klíčovou roli v biosyntéze cytokininů hrají enzymy IPT. V rostlinách *A. thaliana* se vyskytují dva typy – ATP/ADP-IPT neboli adenosinfosfát-IPT a tRNA-IPT. Adenosinfosfát-IPT katalyzuje připojení isopentenylového postranního řetězce na ATP či adenosindifosfát (ADP), tRNA-IPT katalyzuje jejich připojení na adenin v tRNA. Donorem isopentenylu je dimethylallylpyrofosfát (DMAPP), který může být syntetizován v různých částech buňky (Kakimoto, 2001). V chloroplastech se tak děje pomocí methylethylpyrofosfátové dráhy, která je zodpovědná za syntézu isopentenylové skupiny *tZ* a *iP*. V cytosolu je DMAPP syntetizován především pro *cZ*, a to mevalonátovou dráhou (Kasahara *et al.*, 2004). Genom *Arabidopsis* obsahuje celkem devět genů, které kódují syntézu IPT, sedm pro ATP/ADP-IPT (*AtIPT1*, *AtIPT3* – 8) a dva pro tRNA-IPT (*AtIPT2* a *AtIPT9*) (Takei *et al.*, 2001; Kakimoto, 2001). Bylo zjištěno, že tyto geny jsou místně specifické. Například *AtIPT1* je exprimován v kořenové špičce, zárodečném vaku a nezralých semenech, *AtIPT3* v doprovodných buňkách floému stejně jako *AtIPT7*, který je navíc exprimován také v prodlužovací zóně kořene, trichomech mladých listů a pylových láčkách (Sakakibara, 2006). Adenosinfosfát-IPT je zodpovědná za syntézu *iP* a *tZ*. Za tvorbu *cZ* je naopak zodpovědná tRNA-IPT. Dokazují to například pokusy Miyawakiho *et al.* (2006) prováděné na mutantních rostlinách *A. thaliana*, při kterých bylo v mutantech *atipt1atipt3atipt5atipt7* syntetizováno jen velmi malé množství *iP* a *tZ* cytokininů, zatímco v mutantech *atipt2atipt9* byl přítomen nízký obsah *cZ* (Miyawaki *et al.*, 2006). Existuje také ještě AMP-IPT. Syntézu cytokininů prostřednictvím přenosu isopentenylové skupiny na AMP však rostliny nevyužívají. Týká se pouze některých bakterií, například *A. tumefaciens* (Kakimoto, 2001).

2.2.4 Přenos cytokininového signálu a histidin kinasové receptory

Přenos cytokininového signálu se u *A. thaliana* děje pomocí dvoukomponentové dráhy, která byla poprvé objevena u bakterií a později také u některých eukaryot (Schaller *et al.*, 2008). Cytokininy se vážou na transmembránové CHASE (*cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular*) domény histidin kinasových receptorů AHK (*Arabidopsis histidine kinase*), které se vyskytují v cytoplasmatické membráně a endoplasmatickém retikulu. Po navázání cytokininu dochází k autofosforylaci histidinového zbytku receptoru. Fosfát je pak dále přenesen na aspartát, který se nalézá v přijímací doméně AHK. Následně je fosfát přenesen na

histidin AHP (*Arabidopsis histidine phosphotransfer*) proteinu v cytoplasmě, čímž dojde k jeho aktivaci a přenesení fosfátu na aspartát regulátoru odpovědi ARR (*Arabidopsis response regulator*), nacházejícího se v jádře. ARR typu B fungují jako transkripční faktory a jsou pozitivními regulátory transkripce. Váží se na DNA a umožňují transkripci některých genů, mezi nimi např. *CRF* (*cytokinin response factor*) a ARR typu A (Obr. 2). Poslední jmenované jsou negativními zpětnovazebnými regulátory cytokininové odpovědi v buňce (Hwang *et al.*, 2012). Zejména AHK3 receptory hrají spolu s regulátorem odpovědi typu B, ARR2, který je jejich prostřednictvím fosforylován, významnou roli při regulaci senescence (Kim *et al.*, 2006). Mezi geny, jejichž exprese je transkripčními faktory ARR na základě působení cytokininů ovlivněna, patří například *clavata1* (*CLV1*). Aplikace BAP vede ke snížené expresi genu *CLV1*, což vede ke zvýšení exprese genu *wuschel* (*WUS*), který je *CLV1* reprimován. Tyto geny se spolupodílejí na diferenciaci orgánů a zachování aktivity buněk v apikálním stonkovém meristému (Lindsay *et al.*, 2006).

V genomu *A. thaliana* bylo zatím objeveno osm genů kódujících histidin kinasy, které si zachovaly svou enzymatickou aktivitu, a další proteiny podobné histidin kinasám. Histidin kinasy AHK4, nazývaná též CRE1 (*cytokinin response 1*) či WOL (*wooden leg*), AHK2 a AHK3 jsou cytokininovými receptory, ETR1 a ERS1 jsou receptory pro etylen a u AHK1, CKI1 a CKI2 zatím nebyly zjištěny jejich ligandy (Schaller *et al.*, 2008). Receptory AHK4 i AHK3 preferují jako ligandy volné báze iP a tZ, ale v percepci ostatních cytokininů se odlišují (Yamada *et al.*, 2001; Spíchal *et al.*, 2004). V kořenech převládá exprese *AHK4*, v nadzemní části exprese *AHK2* a *AHK3* (Higuchi *et al.*, 2004). Funkce jednotlivých histidin kinas mohou být zkoumány *knock out* mutacemi genů, které je kódují, či zvýšením jejich exprese (Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006; Janečková *et al.*, 2018). Experimentálně bylo zjištěno, že jednotlivé histidin kinasy se odlišují svou úlohou ve vývoji rostliny a také v percepcirůzných sloučenin (Spíchal *et al.*, 2004; Doležal *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006).

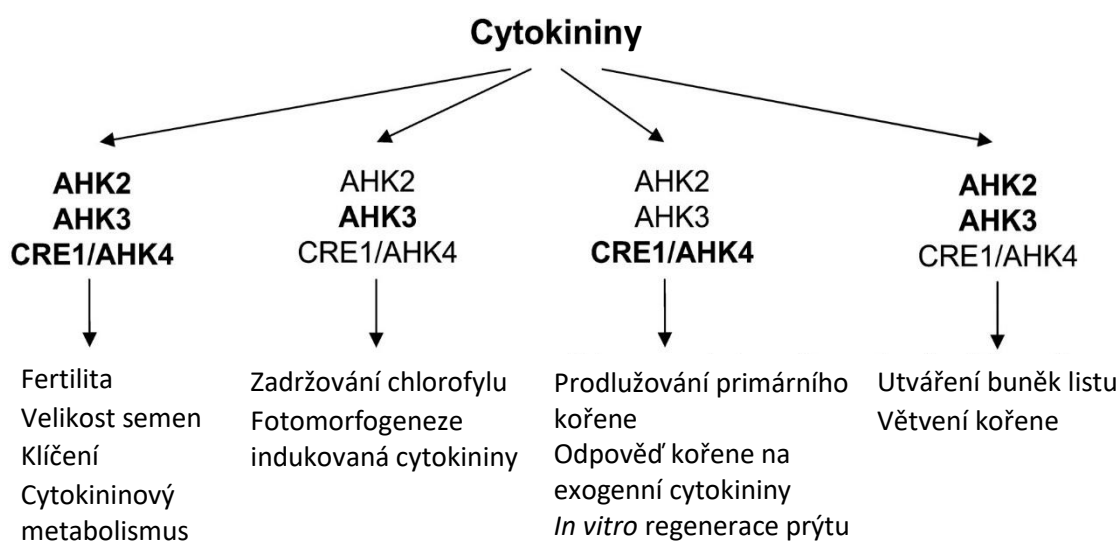


Obr. 2 Percepce cytokininového signálu. Převzato z Hwang *et al.* (2012) a upraveno.

2.2.5 Mutantní *ahk* rostliny

Jako *single ahk* mutanty označujeme rostliny, u kterých byl inaktivován jeden AHK receptor. Pokud jsou z funkce vyřazeny dva AHK receptory, hovoříme o tzv. *double* neboli dvojitých mutantech. U *single* mutantů se fenotyp výrazně neliší od WT rostlin. U *double* mutantů jsou již rozdíly pozorovatelné, neboť je u nich ve větší míře snížena schopnost percepce cytokininového signálu. *Double ahk2ahk3* mutace způsobuje u *A. thaliana* redukci růstu nadzemní části. Oproti WT rostlinám je jejich nadzemní růžice zhruba poloviční. Naopak dvojitě mutace *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4* její

fenotyp nijak výrazně neovlivňují. Znamená to, že AHK4 receptor nepřispívá k uplatnění cytokininů v růstu nadzemní části tolik jako AHK2 a AHK3. Snížená schopnost přenášet cytokininový signál u mutantů vede ke zvýšené tvorbě laterálních kořenů, kterou u rostlin cytokininy běžně omezují. *Triple* (trojití) mutanti *ahk2ahk3ahk4*, kteří jsou nejméně senzitivní vůči cytokininům, jsou trpasličího vzrůstu, mají v průměru čtvrtinový počet listů a tvoří květy s dvou- až třítydenním zpožděním ve srovnání s WT rostlinami. Navíc jsou téměř či zcela infertilní (Riefler *et al.*, 2006).



Obr. 3 Úloha AHK receptorů v životních procesech rostlin. Receptory, které v daném ději mají převážný vliv jsou znázorněny tučným písmem. Přejato z Riefler *et al.* (2006) a upraveno.

Janečková *et al.* (2018) se zabývali endogenním obsahem cytokininů a jejich spojitostí s obsahem chlorofylu v listech a efektivitou fotosystému II ve dvojitých *ahk* mutantech *A. thaliana*. V čerstvě oddělených listech rostlin obou genotypů s nefunkčním receptorem AHK3 (*ahk2ahk3* a *ahk3ahk4*) byl naměřený obsah chlorofylu asi o 15-20 % nižší než v listech WT a *ahk2ahk4* rostlin. Nižší obsah chlorofylu u rostlin s *loss-of-function* mutací *AHK3* genu lze vysvětlit tím, že tento receptor je klíčový pro stimulaci biosyntézy chlorofylu prostřednictvím cytokininů. Mezi WT ani mutanty nicméně nebyly v experimentech Janečkové *et al.* (2018) zaznamenány výraznější rozdíly v parametrech chlorofylové fluorescence F_v/F_m a $\Phi PSII$ (maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII vzorku adaptovaného na tmu, resp. světlo), což znamená, že funkce PSII nebyla u mutantů ovlivněna. Obsah

cytokininů se u mutantních rostlin lišil od WT. U obou mutantů s vyřazeným genem pro AHK3 byl tento nedostatek pravděpodobně kompenzován zvýšenou produkcí iP a tZ cytokininů, protože obsah těchto fytohormonů byl v jejich listech asi o polovinu větší oproti WT. Naopak mírný nárůst endogenního obsahu iP a tZ cytokininů u mutantu *ahk2ahk4* se zřejmě odvíjel od přítomnosti aktivního AHK3 receptoru (Kim *et al.*, 2006; Janečková *et al.*, 2018).

Umístění oddělených listů do tmy na dobu šesti dnů způsobilo u rostlin všech genotypů pokles obsahu chlorofylu, přičemž jeho úbytek byl nejpomalejší u mutantu s funkčním AHK3 receptorem (*ahk2ahk4*). Nejmenší obsah chlorofylu byl na konci experimentu naměřen u *ahk2ahk3* mutantu, pravděpodobně díky tomu, že tento mutant nemá aktivní receptory AHK2 ani AHK3, a tak i přes vysoké množství endogenních cytokininů nedošlo k udržení obsahu chlorofylu. Parametry F_v/F_m a $\Phi PSII$ byly nejvyšší v listech *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4*. Hodnoty těchto parametrů byly u těchto dvou genotypů srovnatelné, a to i navzdory tomu, že v listech *ahk3ahk4* byl přibližně o polovinu nižší obsah chlorofylu (Janečková *et al.*, 2018). V rámci publikace Janečková *et al.* (2018) byla u *ahk* mutantů stanovována i lipidová peroxidace, a to v závislosti na vznikajícím malondialdehydu (MDA), který je produktem oxidace polynenasycených mastných kyselin membrán (Del Rio *et al.*, 2005; Janečková *et al.*, 2018). U genotypu *ahk2ahk3* byla zaznamenána nejnižší lipidová peroxidace. Naopak vysoký obsah MDA byl naměřen u mutantu s inaktivovanými geny pro AHK2 i AHK4 (*ahk2ahk4*), což vypovídá o zapojení těchto dvou receptorů v ochraně před peroxidací membrán (Janečková *et al.*, 2018).

2.2.6 Antisenescenční aktivita cytokininů a jejich derivátů

Zatímco ethylen a kyseliny abscisová a jasmonová podporují senescenci, cytokininy se spolu s auxiny a gibereliny řadí k fytohormonům, které mají schopnost ji oddálit (Smart, 1994). První důkaz o schopnosti cytokininů oddalovat senescenci podali Richmond a Lang (1957), kteří ve svém experimentu s oddělenými listy *Xanthium pennsylvanicum* L. dokázali aplikací kinetinu oddálit jejich zežloutnutí (Richmond a Lang, 1957). Exogenně aplikované cytokininy jsou schopny do určité míry zpomalovat projevy senescence jako je degradace pletiv a chlorofylu, stejně tak i expresi SAG.

Ne všechny cytokininy jsou však schopné oddalovat senescenci ve stejné míře. Například Holub *et al.* (1998) porovnávali schopnost volných bází cytokininů a jejich N9 derivátů (ribosidů a glykosidů) udržovat obsah chlorofylu v oddělených listech pšenice (senescenční test). Aktivita nově připravených derivátů (o koncentracích v rozmezí 10^{-8} až 10^{-4} $\mu\text{mol.l}^{-1}$) byla porovnáována s *tZ*, jenž je pokládán za nejaktivnější přirozeně se vyskytující cytokinin. Při senescenčním testu byly oddělené listy pšenice po ošetření cytokininy uloženy na čtyři dny do tmy a poté byl změřen obsah chlorofylu. Nejúčinnějšími v zachování obsahu chlorofylu byly ribosidy, zejména ty odvozené od *tZ* a *mT*. Ribosidy BAP a *ortho*-topolinu (*oT*) vykazovaly nižší efektivitu. Volné báze vykazovaly nižší antisenescenční aktivitu než příslušné ribosidy, přičemž obsah chlorofylu v listech ošetřených *oT* byl srovnatelný s kontrolními, neošetřenými, listy a podobné výsledky jako u *oT* byly zaznamenány také u glykosidů (Holub *et al.*, 1998).

Cytokininová aktivita derivátů je ovlivněna nejen přítomnými funkčními skupinami a jejich počtem, ale i jejich polohou (Matsubara, 1980; Doležal *et al.*, 2006; Doležal *et al.*, 2007). Například antisenescenční aktivitu BAP lze měnit řadou substitucí. Doležal *et al.* (2006) porovnávali biologickou aktivitu BAP a jeho 38 derivátů (s Cl-, F-, Br-, CH₃-, CH₃O- a NO₂- substituenty). Deriváty s methoxy skupinou v poloze *ortho* a *meta* měly v senescenčním biotestu dvakrát vyšší aktivitu než BAP. Nejvyšší obsah chlorofylu byl na konci experimentu naměřen v listech ošetřených deriváty substituovanými fluorem v poloze *ortho* či *meta*. Oproti tomu fluor v poloze *para* způsobil mírný pokles antisenescenční aktivity. Di- a trifluoroderiváty také vykazovaly vysokou aktivitu, a to i pokud se substituent nacházel v poloze *para*. I přes vysokou biologickou aktivitu ve standardních biotestech (senescenční, kalusový, amarantový), nebyla většina z testovaných látek schopna dostatečně aktivovat receptor AHK4 *in vitro*. Receptor AHK3 byl sice schopen rozpoznat více látek, ale ve všech případech byla citlivost receptoru nižší než pro *tZ* (Doležal *et al.*, 2006). Jak *tZ*, tak i jeho ribosidy, jsou totiž schopny aktivovat AHK3 ve velké míře (Kim *et al.*, 2006). Podobně jako v předchozích experimentech nebyly receptory AHK3 ani AHK4 aktivovány ani substituovanými benzyladenosiny připravenými v rámci studie Doležala *et al.* (2007), a to navzdory jejich vysoké aktivitě v biotestech. Na základě čehož autoři předpokládají existenci jiného mechanismu percepce pro aromatické cytokininy v rostlinách (Doležal *et al.*, 2007).

Pro studium aktivity cytokininů lze využít také test využívající schopnost transgenní bakterie *Escherichia coli* exprimovat *AHK* geny. To umožňuje zrychlení testu a výsledky navíc nejsou ovlivněny metabolickými pochody rostlin, v jejichž tkáních jsou cytokininy rychle metabolizovány (Suzuki *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001) Spíchal *et al.* (2004) pomocí tohoto testu porovnávali aktivity různých cytokininů o koncentracích 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Nejvíce byly receptory AHK3 a AHK4 aktivovány isoprenoidními cytokininy *tZ* a *iP*. Naopak *cZ* a dihydrozeatin byly rozpoznány pouze receptorem AHK3. Aromatické sloučeniny (BAP, kinetin, *oT*) v tomto testu vykazovaly nízkou aktivitu. Výjimkou byl *mT*, který byl schopen aktivovat obě histidin kinasy. Syntetický TDZ vykazoval velmi vysokou schopnost aktivovat oba receptory a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, přičemž v případě AHK3 receptoru dokonce převýšil *tZ*. Při testování O- a N-glykosidů nebyla vyvolána žádná odpověď. Při testu prováděném *in vivo* na rostlinách *A. thaliana* byla aktivita volných bází aromatických cytokininů srovnatelná s *tZ*. Podle autorů to mohlo být způsobeno například tím, že aromatické cytokininy aktivují spíše receptor AHK2, který nebyl v experimentu *in vitro* zahrnut, nebo odlišným mechanismem působení v rostlině ve srovnání s isoprenoidními cytokininy. Glykosidy a zejména O-glykosidy byly v rostlinách také aktivní, pravděpodobně z důvodu jejich přeměny na volné báze (Spíchal *et al.*, 2004).

Důležité je zvolit také správnou koncentraci cytokininů, neboť roztoky o příliš vysoké koncentraci mohou senescenci podporovat, namísto aby ji zpomalovaly, jak dokazují např. experimenty Carimiho *et al.* (2003). Aplikace BAP o vysoké koncentraci (27 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) na pětidenní buněčné kultury *A. thaliana* blokovala proliferaci a indukovala u buněk PCD (Carimi *et al.*, 2003). Účinek cytokininů a jejich derivátů na průběh senescence může být ovlivněn také světelnými podmínkami. Například *mT* sice ve studii Vlčkové *et al.* (2006) oddálil degradaci chlorofylu v oddělených listech pšenice uložených ve tmě i na kontinuálním světle (PAR o intenzitě 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), v prvním případě byl však účinnější. V osvětlených listech byl navíc naměřen nižší F_v/F_m oproti listům inkubovaným ve tmě, u kterých F_v/F_m i po uplynutí šesti dnů od oddělení poklesl jen minimálně (Vlčková *et al.*, 2006).

Bryksová *et al.* (2020) porovnávali vliv derivátů 6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (3MeOBAPA), který byl použit také v rámci této bakalářské práce, a 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (3OHBAPA) o různých koncentracích (100 nmol.l^{-1} , 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) na

udržení obsahu chlorofylu v oddělených listech pšenice a *A. thaliana*. Oba deriváty byly účinnější ve vyšší koncentraci, přičemž u *A. thaliana* byl vyšší obsah chlorofylu naměřen v listech ošetřených 3MeOBAPA a u pšenice 3OHBAPA. Oba deriváty byly účinné také v zachování fotosyntetické aktivity. U listů pšenice inkubovaných po dobu šesti dnů v 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ roztoku 3MeOBAPA a 1 a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ roztoku 3OHBAPA byla naměřena hodnota parametru F_v/F_m vyšší než 0,6. U listů *A. thaliana* měl podobný efekt pouze 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ roztok 3MeOBAPA. Ani jeden z derivátů však neaktivoval AHK3 ani AHK4 receptory *in vitro*. Analýza genové exprese v listech *A. thaliana* ošetřených 3MeOBAPA poukázala na sníženou transkripci genů spojených s fotosyntézou a zvýšenou transkripci genů zapojených do obranných reakcí proti patogenům a stresu (Bryksová *et al.*, 2020). Ke snížení exprese genů zapojených do fotosyntézy a nástupu obranné reakce dochází také v počátcích infekce patogenem (Bilgin *et al.*, 2010). Vzhledem k této podobnosti je možné, že udržení chlorofylu a zachování fotosyntetické aktivity listů souvisí se schopností testovaných derivátů aktivovat PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) imunitní odpověď, do které jsou zapojeny MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) signální kaskády (Bryksová *et al.*, 2020). Účinek stejných derivátů o koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ na indukovanou senescenci zkoumali také Kučerová *et al.* (2020). V jejich experimentech byla navíc měřena také produkce ethylenu, hormonu urychlujícího senescenci, v ošetřených listech pšenice a *A. thaliana* (Kučerová *et al.*, 2020). Již v minulosti totiž bylo dokázáno, že exogenní aplikace cytokininů podporuje syntézu ethylenu (Cary *et al.*, 1995; Carimi *et al.*, 2003). Zkoumané deriváty na rozdíl od BAP produkci ethylenu zvyšovaly pouze v krátkých časech po aplikaci a jeho produkce tak byla srovnatelná s listy uloženými v DMSO. U *A. thaliana* byla produkce ethylenu nejnižší v případě listů ošetřených roztokem 3MeOBAPA a u pšenice v listech ošetřených 3OHBAPA (Kučerová *et al.*, 2020).

Zvýšení obsahu cytokininů v rostlině, ať už jejich exogenní aplikací, či pomocí technologií genového inženýrství, vede ke zpomalení či oddálení projevů senescence, jako je například pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_m . Podobných výsledků lze dosáhnout také aplikací cytokininových derivátů, i když mechanismus jejich účinku se zřejmě liší. V percepci cytokininového signálu hrají důležitou roli AHK receptory. Naopak antisenesenční aktivita cytokininových derivátů může souviset například s jejich schopností aktivovat PAMP imunitní odpověď rostlin a tím, že jejich aplikace není spojena se zvýšenou produkcí ethylenu v rostlinách. Účinek cytokininů a jejich

derivátů je přitom ovlivněn řadou faktorů, například použitou koncentrací, světelnými podmínkami a v neposlední řadě také stářím rostliny. Díky svým antisenescenčním schopnostem jsou tyto fytohormony předmětem celé řady studií s cílem zvýšení výnosu, popř. snížení jeho ztrát spojených s předčasnou senescencí. V rámci této bakalářské práce byl zkoumán účinek 3MeOBAPA na udržení obsahu chl $a+b$ a parametru F_v/F_m během indukované listové senescence. Derivát 3MeOBAPA je schopen účinně oddalovat listovou senescenci, a to i přes to, že testy *in vitro* prokázaly, že není schopen aktivovat AHK3 ani AHK4 receptory (Bryksová *et al.*, 2020). Zda-li je působení 3MeOBAPA na indukovanou senescenci ovlivněno AHK receptory bylo zkoumáno v rámci praktické části této práce na oddělených listech rostlin *A. thaliana* deficientních v cytokininových AHK receptorech (*ahk2ahk3*, *ahk2ahk4*, *ahk3ahk4*).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty byla použita modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* L., a to WT rostliny (ekotyp Columbia 0), a rostliny deficientní v cytokininových AHK receptorech: dvojití mutanti *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4*. Semínka byla zasetá do substrátu Potgrond H (Klasmann-Deilmann, Geeste, Německo) a umístěna do fytotronu (PSI, Drásov, ČR) s definovanými podmínkami (světelný režim 8 h PAR o intenzitě $110 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplota $22^\circ\text{C}/16$ h tma a teplota 20°C).

Šesté a/nebo sedmé listy šestitýdenních rostlin byly odděleny a následně uloženy do 0,1% roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO) v destilované vodě, nebo do roztoku 6-benzylaminopurinu (BAP) či 6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (3MeOBAPA) o koncentraci $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěného v 0,1% DMSO. BAP i 3MeOBAPA byly připraveny na oddělení Chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Roztoky byly pipetovány do 6-jamkové mikrotitrační destičky po 5 ml. Do každé jamky byly umístěny 2-3 listy rostlin příslušných genotypů tak, že v každém z roztoků bylo pět listů od každého genotypu. Takto připravené vzorky byly uloženy do plastové nádoby, která byla následně zabalena do černé fólie a uložena do fytokomory (Algaetron, PSI, Drásov, ČR) na šest dnů při teplotě 24°C . Poté byl změřen maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) pomocí přístroje FluorCam FC 800-0 (PSI, Drásov, ČR). Následně byly listy přeneseny na světlo a vyfoceny. Po jejich obkreslení na průhlednou fólii, která byla použita ke zjištění obsahu listových ploch, byly po jednom uloženy do mikrozkuavek, zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80°C . Následně byl stanoven obsah chlorofylů (chl) $a+b$.

Jako kontrolní byly použity čerstvě oddělené listy, které byly ihned po oddělení umístěny do mikrotitrační destičky naplněné destilovanou vodou, aby nedošlo k jejich vysychání, a uloženy na dvacet minut do tmy. Poté byl stanoven parametr F_v/F_m pomocí přístroje FluorCam. Po skončení měření byly listy přeneseny na světlo, vyfoceny a obkresleny na průhlednou fólii. Poté byly vloženy do mikrozkuavek, zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80°C . Také u těchto listů byl následně změřen obsah chl $a+b$.

Celkem byly provedeny dva experimenty s mutanty *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4*. Semínka mutantů *ahk2ahk4* velice špatně klíčila, a proto byl v jejich případě proveden pouze jeden experiment. Při každém opakování experimentu byly zároveň s mutanty měřeny také WT rostliny.

3.1.2 Použité metody

Obsah chl v připravených extraktech byl stanoven pomocí spektrofotometru Unicam UV 500 (Thermo Spectronic, Cambridge, Velká Británie). Fluorescence chl v oddělených listech adaptovaných na tmu byla měřena pomocí přístroje FluorCam FC 800-0.

3.1.2.1 Měření obsahu chlorofylů a+b

Listy byly před samotným měřením uloženy v hlubokomrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Každý list byl rozetřen v misce s přidavkem uhličitanu hořečnatého. Po důkladné homogenizaci bylo přidáno 750 μl vychlazeného 80% acetonu a vzorek byl nalit do mikrozkušavky. Třecí miska i tlouček byly poté opláchnuty dalšími 750 μl 80% acetonu, který byl spolu se zbytky homogenátu také přidán do mikrozkušavky. Následovala centrifugace v centrifuze vychlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 3600 g po dobu 12 minut. Supernatant byl přelit do čisté zkumavky se stupnicí, vhodně naředěn, jeho celkový objem zaznamenán a poté byla stanovena jeho absorbance při vlnových délkách: 470; 646,8; 663,2 a 750 nm (vlnové délky odpovídají absorpčním maximům karotenoidů, resp. chl *b*, a chl *a*). Obsah jednotlivých pigmentů byl spočten pomocí rovnic dle Lichtenthalera (1987). Pro výpočet obsahu chl *a+b* byla použita následující rovnice:

$$\text{chl } (a + b) = 7,15 \times (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 \times (A_{646,8} - A_{750})$$

kde A_{470} ; $A_{663,2}$; $A_{646,8}$ a A_{750} jsou naměřené hodnoty absorbance extraktu při daných vlnových délkách. Hodnota získaná pomocí rovnice byla vynásobena celkovým objemem extraktu a vypočtený obsah chl *a+b* [μg] byl vztažen na listovou plochu [cm^2] daného listu. Ta byla z obrysů na průhledných fóliích zjištěna pomocí programu ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA).

3.1.2.2 Měření parametru F_v/F_m

Ke změření parametrů chlorofylové fluorescence listů byl použit přístroj FluorCam FC 800-0. U čerstvě oddělených (kontrolních) listů bylo měření provedeno krátce po jejich oddělení a adaptaci na tmu (20 min), listy se při tom stále nacházely v mikrotitrační destičce naplněné destilovanou vodou. U zbylých listů proběhlo měření až po šesti dnech, během kterých byly uloženy ve tmě a v příslušných roztocích. Protokol, který byl při měření použit, definoval tyto podmínky: senzitivita 10 % a saturační pulz 50 % (relativní intenzita saturačního pulzu odpovídala ozáření 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ v místě vzorků). Měřením byla zjištěna maximální (F_m) a minimální (F_0) fluorescence chl, ze kterých byl vypočten maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (F_v/F_m) podle vzorce:

$$(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$$

3.1.2.3 Grafické a statistické zpracování dat

Získaná data byla zpracována pomocí počítačového programu MS Excel. Ke grafickému vyhodnocení obsahu chl $a+b$ byly použity sloupcové grafy znázorňující medián hodnot obsahu chl $a+b$ v kontrolních listech a jeho změnu vůči kontrole (v %) v případě senescentních listů. Chybové úsečky představují první a třetí kvartil. Pomocí Studentova t-testu byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi listy jednotlivých genotypů v rámci varianty (kontrolní listy; senescentní listy ošetřené DMSO, BAP nebo 3MeOBAPA). Za statisticky rozdílné byly považovány ty soubory dat, jejichž hodnota p byla menší než 0,05. V grafu byly označeny rozdílnými písmeny (a, b, popřípadě c). Pokud se množiny dat významně statisticky nelišily ($p > 0,05$), pak byly označeny stejnými písmeny. Parametr F_v/F_m byl prezentován ve formě imagingu.

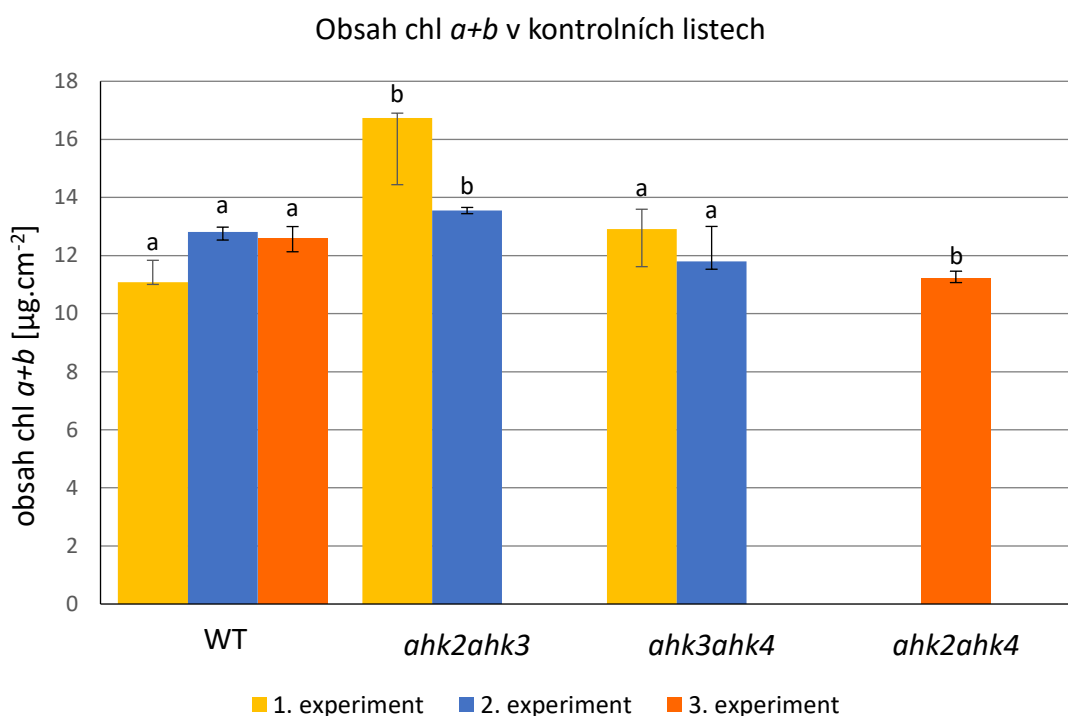
4 Výsledky

V experimentální části této bakalářské práce byl sledován vliv roztoků BAP a 3MeOBAPA na zachování obsahu chl $a+b$ a parametru F_v/F_m v oddělených listech *A. thaliana*. Použity byly rostliny čtyř genotypů, a to WT, *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4*. Obsah chl $a+b$ a funkčnost fotosyntetického aparátu (F_v/F_m) u listů jednotlivých genotypů ošetřených roztoky BAP a 3MeOBAPA byly porovnávány s kontrolními a senescentními listy (DMSO). Presentovány jsou výsledky tří experimentů (označené jako 1., 2. a 3. experiment), přičemž v prvním a druhém experimentu byly použity oddělené listy WT, *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* rostlin. Ve třetím experimentu pak samostatně listy WT a *ahk2ahk4* rostlin.

4.1 Obsah chlorofylů *a+b*

4.1.1 Obsah chlorofylů *a+b* v kontrolních listech

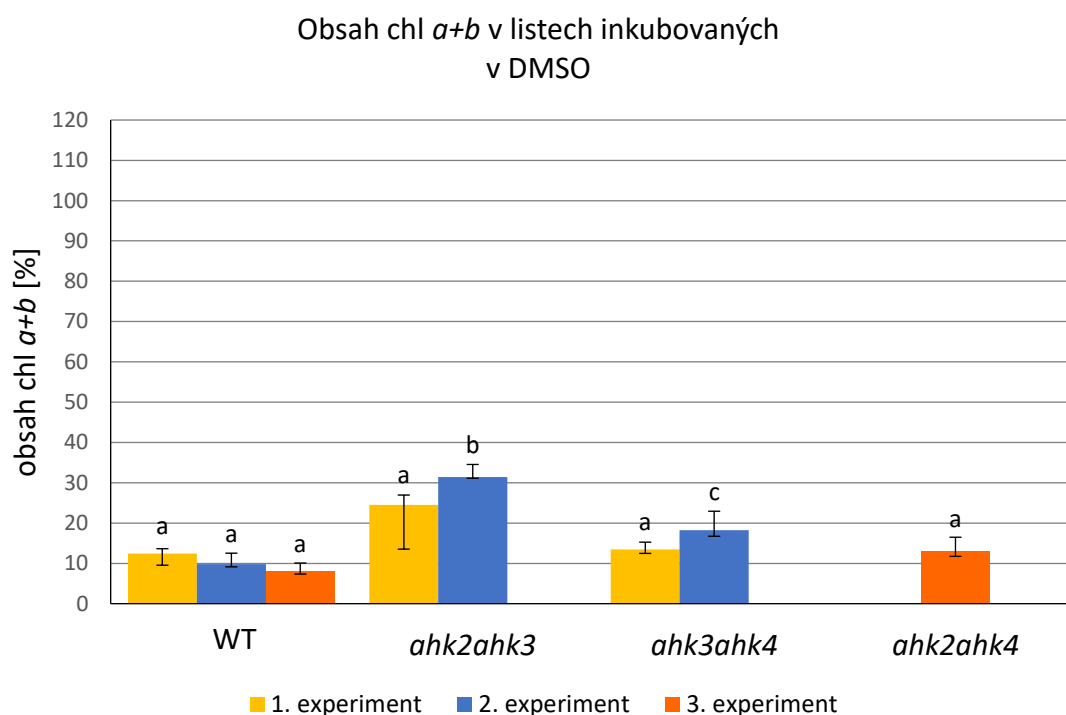
V prvním experimentu byl medián hodnot obsahu chl *a+b* v kontrolních (čerstvě oddělených) listech WT rostlin 11 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, v listech *ahk2ahk3* 17 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a v listech *ahk3ahk4* 13 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Obr. 4). Ve druhém experimentu byl medián hodnot obsahu chl *a+b* u listů WT rostlin 13 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, u *ahk2ahk3* 14 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a u *ahk3ahk4* 12 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Obsah chl *a+b* v listech *ahk2ahk3* byl v obou experimentech vyšší než u zbylých dvou genotypů. V kontrolních listech WT rostlin byl ve třetím experimentu medián hodnot obsahu chl *a+b* 13 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a v *ahk2ahk4* listech 11 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.



Obr. 4 Obsah chlorofylu (chl) *a+b* v $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ naměřený u čerstvě oddělených (kontrolních) listů WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil ($n = 3-5$). Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci jednotlivých experimentů ($p \leq 0,05$).

4.1.2 Obsah chlorofylů $a+b$ v senescentních (DMSO) listech

V provedených experimentech došlo vlivem senescence u všech sledovaných listů uložených do DMSO k poklesu obsahu chl $a+b$ (Obr. 5). V prvním experimentu byl v listech všech genotypů obsah sledovaných pigmentů zachován ve srovnatelné míře, přičemž v listech *ahk2ahk3* byl mírně vyšší (přibližně 20 % hodnoty kontrolních listů). Ve druhém experimentu byl obsah chl $a+b$ zachován opět nejvíce u *ahk2ahk3* listů (30 % hodnoty čerstvě oddělených listů). Ve třetím experimentu byl obsah sledovaných pigmentů v listech WT i *ahk2ahk4* rostlin uložených v DMSO srovnatelný (10-15 % hodnoty kontrolních listů).



Obr. 5 Obsah chlorofylu (chl) $a+b$ vyjádřený v % hodnoty naměřené u čerstvě oddělených (kontrolních) listů WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. uložených po dobu šesti dnů ve tmě v 0,1% roztoku DMSO. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil ($n = 3-5$). Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci jednotlivých experimentů ($p \leq 0,05$).

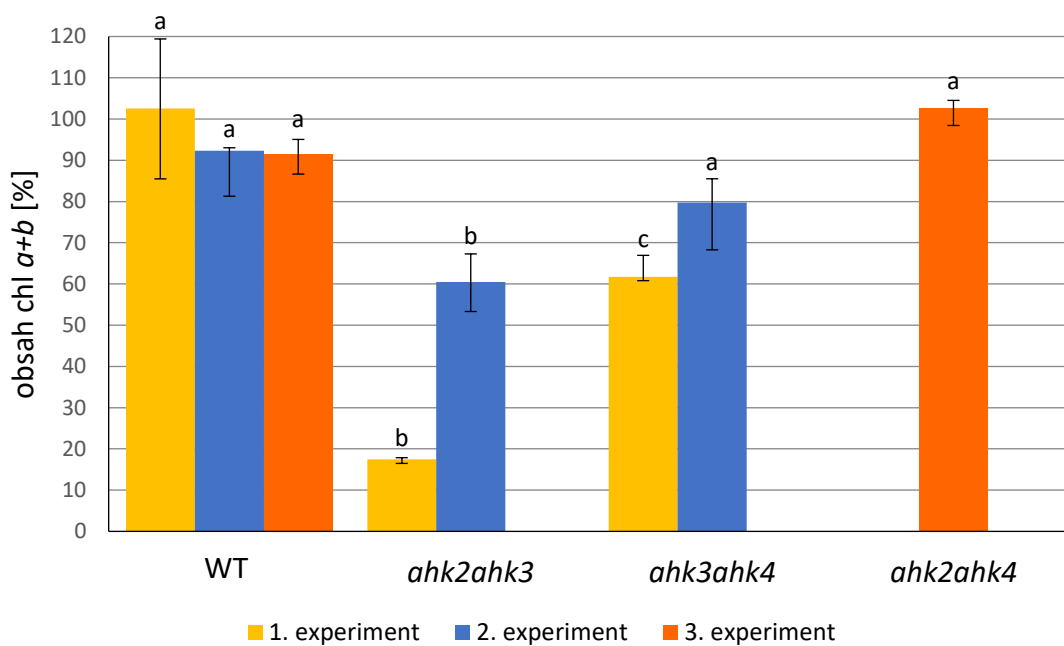
4.1.3 Obsah chlorofylů $a+b$ v listech ošetřených roztokem BAP

Inkubace v roztoku BAP vedla v prvním experimentu u listů sledovaných genotypů k udržení obsahu sledovaných pigmentů ve značně rozdílné míře (Obr. 6). U listů WT rostlin byl obsah chl $a+b$ srovnatelný s čerstvými listy. U listů *ahk3ahk4* byl zaznamenán pokles obsahu sledovaných pigmentů (přibližně 60 % ve srovnání s kontrolou) a u *ahk2ahk3* listů byla senescence nejpokročilejší (15-20 % hodnoty čerstvých listů). U WT a *ahk3ahk4* listů ošetřených BAP byl zaznamenán výrazně vyšší obsah chl $a+b$ ve srovnání s listy uloženými v DMSO (Obr. 5). V případě *ahk2ahk3* listů však BAP neměl účinek na udržení obsahu sledovaných pigmentů (obsah chl $a+b$ byl v *ahk2ahk3* listech nižší než v listech inkubovaných v DMSO).

Ve druhém experimentu byl v listech WT a *ahk3ahk4* rostlin inkubovaných v BAP zachován obsah chl $a+b$ ve srovnatelné míře (80-90 % hodnoty kontrolních listů, Obr. 6). V *ahk2ahk3* listech byl pokles obsahu chl $a+b$ výraznější (60 % hodnoty kontrolních listů) Nicméně oproti prvnímu experimentu byl obsah chl $a+b$ v druhém experimentu v případě *ahk2ahk3* výrazně vyšší, a to až trojnásobně. Oproti listům inkubovaným v DMSO (Obr. 5) byl ve druhém experimentu u listů všech genotypů ošetřených BAP naměřen vyšší obsah sledovaných pigmentů.

Ve třetím experimentu vedla inkubace v roztoku BAP u listů WT i *ahk2ahk4* rostlin k výraznému udržení obsahu chl $a+b$ (u WT listů přibližně 90 % hodnoty kontroly a *ahk2ahk4* listy byly srovnatelné s kontrolními, Obr. 6). Ve srovnání s listy uloženými v DMSO byl obsah sledovaných pigmentů zachován výrazně více (Obr. 5).

Obsah chl $a+b$ v listech inkubovaných
v BAP



Obr. 6 Obsah chlorofylu (chl) $a+b$ vyjádřený v % hodnoty naměřené u čerstvě oddělených (kontrolních) listů u WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. uložených po dobu šesti dnů ve tmě v roztoku BAP o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil (n = 3-5). Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci jednotlivých experimentů ($p \leq 0,05$).

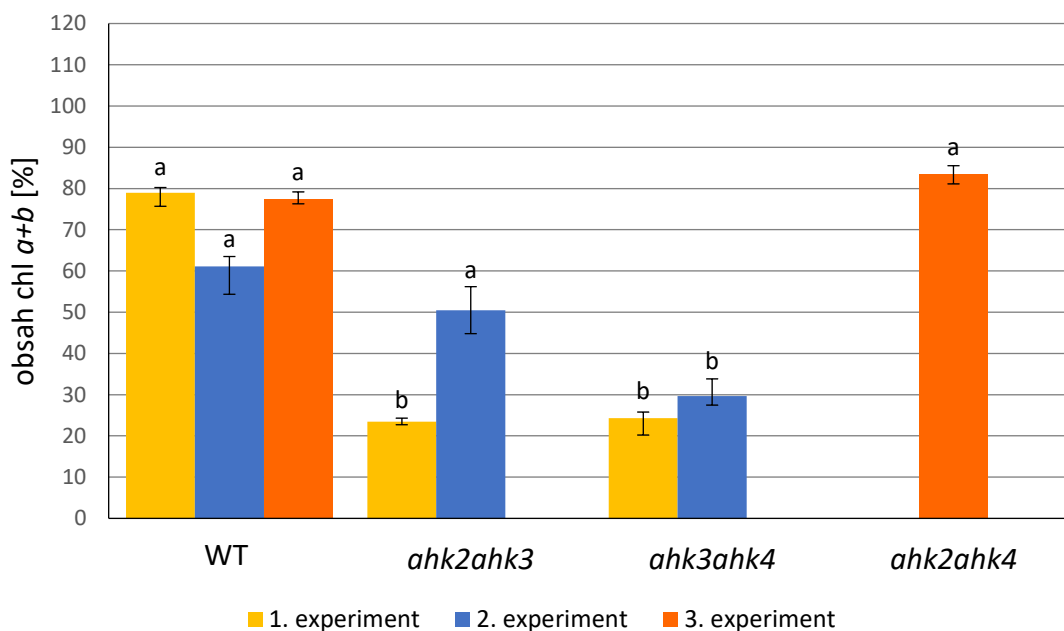
4.1.4 Obsah chlorofylů $a+b$ v listech ošetřených roztokem 3MeOBAPA

V prvním experimentu vedla aplikace 3MeOBAPA u WT listů k zachování obsahu chl $a+b$ v poměrně vysoké míře (80 % hodnoty kontrolních listů, Obr. 7). V listech obou mutantů (*ahk2ahk3*, *ahk3ahk4*) inkubovaných v roztoku 3MeOBAPA byl obsah chl $a+b$ asi 25% ve srovnání s příslušnými kontrolami. Obsah chl $a+b$ byl u WT listů výrazně vyšší než u listů inkubovaných v DMSO (Obr. 5). V případě listů *ahk2ahk3* byl obsah sledovaných pigmentů srovnatelný se senescentními listy (DMSO) a v případě *ahk3ahk4* byl pouze mírně vyšší.

Ve druhém experimentu došlo vlivem aplikace 3MeOBAPA ke zpomalení poklesu obsahu chl $a+b$ u listů všech tří genotypů, přičemž senescence nejvíce pokročila u *ahk3ahk4* rostlin. Obsah chl $a+b$ byl u listů WT a *ahk2ahk3* srovnatelný (60 %, resp. 50 % hodnoty kontrolních listů). U listů *ahk3ahk4* byl obsah chl $a+b$ nejnižší (30% ve srovnání s kontrolními listy).

Vlivem působení 3MeOBAPA došlo ve třetím experimentu u WT i *ahk2ahk4* listů k zachování obsahu chl $a+b$ v podobné míře (přibližně 80 % hodnoty kontrolních listů, Obr. 7). Ve srovnání s listy inkubovanými v DMSO (Obr. 5) byl obsah chl $a+b$ v listech inkubovaných v roztoku 3MeOBAPA výrazně vyšší.

Obsah chl $a+b$ v listech inkubovaných
v 3MeOBAPA

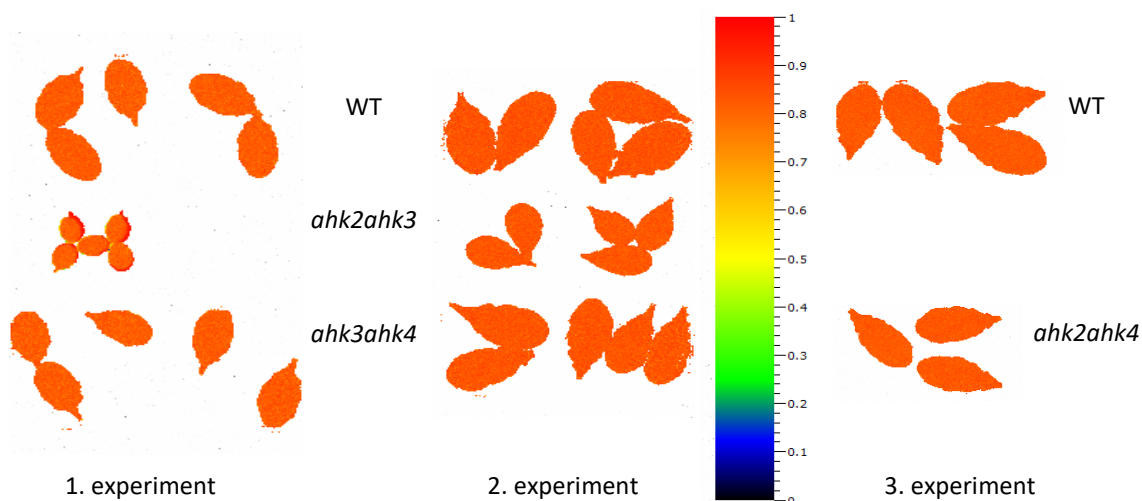


Obr. 7 Obsah chlorofylu (chl) $a+b$ vyjádřený v % hodnoty naměřené u čerstvě oddělených (kontrolních) listů u WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. uložených po dobu šesti dnů ve tmě v roztoku 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹. Uvedeny jsou mediány, chybové úsečky značí první a třetí kvartil (n = 3-5). Rozdílná písmena značí statisticky významný rozdíl v rámci jednotlivých experimentů ($p \leq 0,05$).

4.2 Parametr F_v/F_m

4.2.1 Parametr F_v/F_m u kontrolních listů

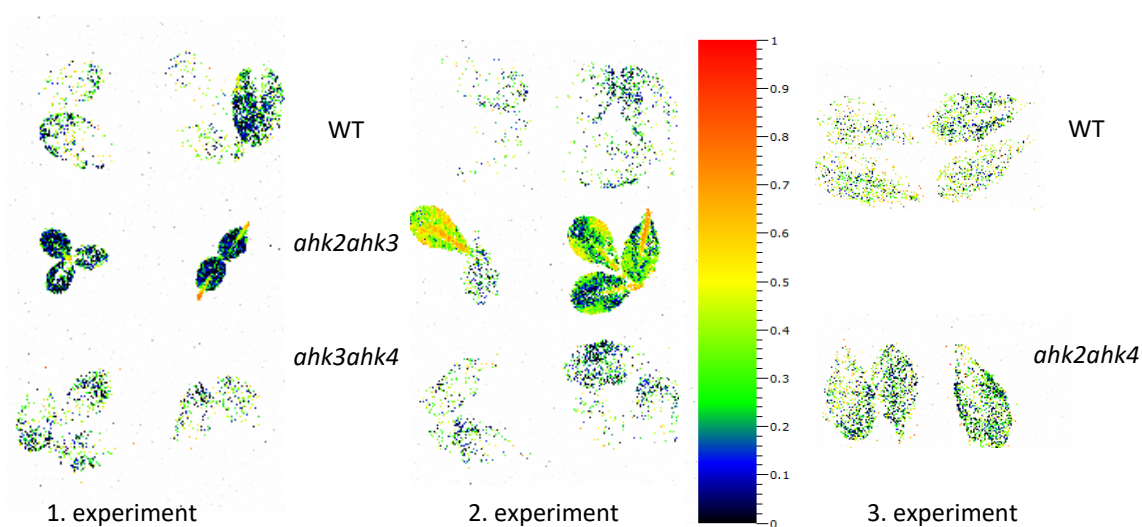
Hodnoty parametru F_v/F_m u kontrolních listů, které byly změřeny ihned po oddělení a adaptaci na tmou, se v prvním experimentu pohybovaly kolem hodnoty 0,82 (Obr. 8). Při druhém experimentu se hodnoty parametru F_v/F_m pohybovaly v rozmezí 0,83 až 0,84 a ve třetím experimentu kolem 0,83.



Obr. 8 Imaging parametru F_v/F_m v oddělených listech WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. ihned po oddělení a adaptaci na tmou.

4.2.2 Parametr F_v/F_m u senescentních (DMSO) listů

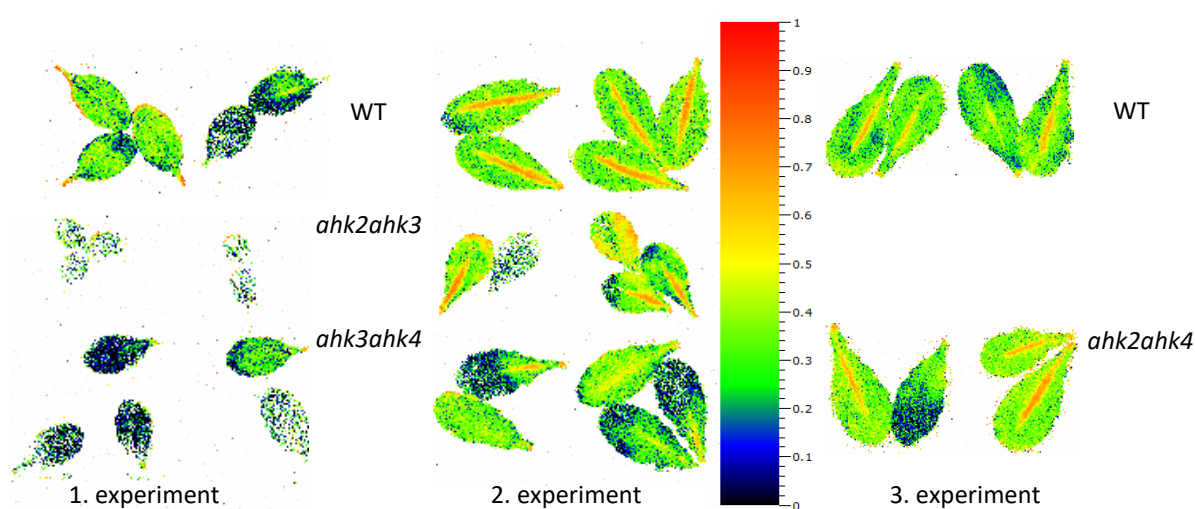
U listů byla jejich oddělením a uložením do tmy indukována senescence. To mělo za následek velmi výrazný pokles parametru F_v/F_m u listů uložených v DMSO (Obr. 9; většina plochy listu byla již nefunkční, a tudíž bez fluorescenčního signálu, jak je patrné z bílých ploch v imagingu). V prvním i druhém experimentu byl parametr F_v/F_m nejvyšší u listů *ahk2ahk3*. Ve třetím experimentu byl F_v/F_m u listů WT a *ahk2ahk4* srovnatelný.



Obr. 9 – Imaging parametru F_v/F_m v oddělených listech WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. uložených po dobu šesti dnů ve tmě a v 0,1% roztoku DMSO.

4.2.3 Parametr F_v/F_m u senescentních u listů ošetřených roztokem BAP

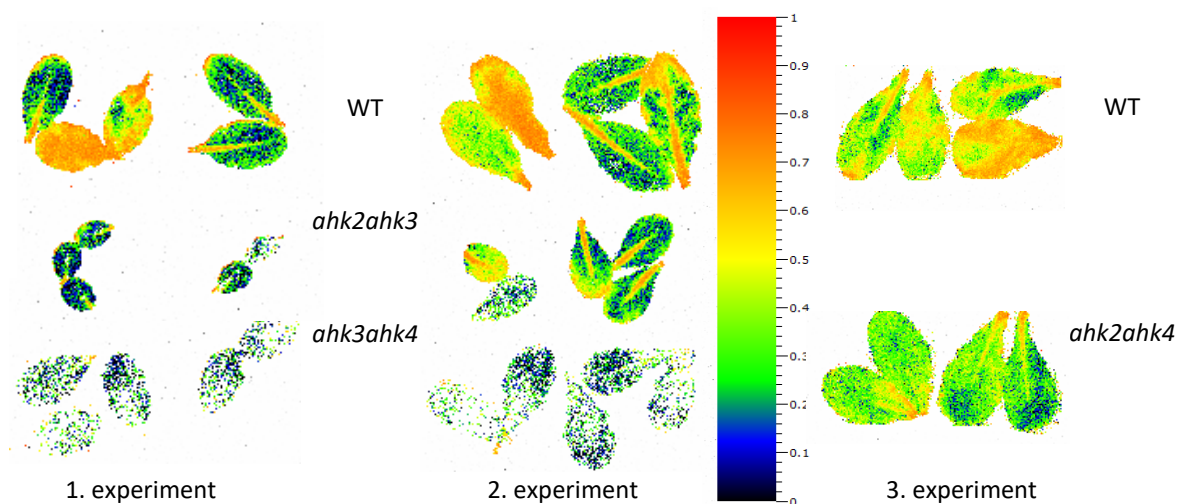
V prvním experimentu vedla aplikace roztoku BAP k zachování parametru F_v/F_m u listů WT rostlin přibližně ze 40 % oproti kontrole, u listů *ahk3ahk4* přibližně z 30 % a u *ahk2ahk3* byl F_v/F_m nejnižší (10 % hodnoty kontrolních listů, Obr. 10). Ve druhém experimentu byl parametr F_v/F_m u listů všech genotypů vyšší než v prvním experimentu. Zatímco u WT a *ahk2ahk3* byl F_v/F_m přibližně 50% ve srovnání s čerstvě oddělenými listy, u listů *ahk3ahk4* byla hodnota parametru F_v/F_m nižší (přibližně 30 % ve srovnání s kontrolními listy). V případě *ahk2ahk4* (třetí experiment) byl F_v/F_m srovnatelný s WT (40-50 % hodnoty kontrolních listů).



Obr. 10 – Imaging parametru F_v/F_m v oddělených listech WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. uložených po dobu šesti dnů ve tmě a v v roztoku BAP o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹.

4.2.4 Parametr F_v/F_m u senescentních u listů ošetřených roztokem 3MeOBAPA

Ošetření roztokem 3MeOBAPA vedlo v prvním experimentu k zachování parametru F_v/F_m u listů WT rostlin ve vyšší míře (35 % hodnoty kontroly) než u zbylých genotypů (Obr. 11). V listech obou mutantů byl parametr F_v/F_m zachován z 20-25 % oproti čerstvě odděleným listům. Ve druhém experimentu byl F_v/F_m , podobně jako v případě listů ošetřených BAP, výrazně vyšší než v prvním experimentu. U WT listů byl F_v/F_m přibližně 55% oproti kontrole u listů *ahk2ahk3* byla jeho hodnota nižší (40 % oproti čerstvě odděleným listům) a v případě *ahk3ahk4* nejnižší (20 % hodnoty kontroly). Ve třetím experimentu byl v případě WT rostlin parametr F_v/F_m vyšší (55 % ve srovnání s kontrolními listy) než u *ahk2ahk4* (přibližně 45 % hodnoty kontrolních listů).



Obr. 11 – Imaging parametru F_v/F_m v oddělených listech WT rostlin a *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4* mutantů *Arabidopsis thaliana* L. uložených po dobu šesti dnů ve tmě a v roztoku 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹.

5 Diskuze

Listová senescence je doprovázena řadou fyziologických změn a také změn v genové expresi. Dochází při ní k postupnému poklesu fotosyntetické aktivity, degradaci pletiv a končí smrtí listu (Hensel *et al.*, 1993; Gan a Amasino, 1997; Špundová *et al.*, 2003). V jejím nástupu a průběhu hrají roli jak vnitřní, tak vnější faktory (Smart, 1994). Mezi první projevy stárnutí listu patří rozpad chloroplastů doprovázený poklesem obsahu chl, což je jeden z parametrů, pomocí nichž lze hodnotit průběh senescence (Hensel *et al.*, 1993; Gan a Amasino, 1997; Brouwer *et al.*, 2012; Janečková *et al.*, 2018). Dalším parametrem sloužícím k tomuto účelu je maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII (F_v/F_m), který stejně jako obsah chl v průběhu senescence klesá (Špundová *et al.*, 2003; Janečková *et al.*, 2018; Bryksová *et al.*, 2020).

Oddálit senescenci lze například aplikací rostlinných hormonů cytokininů, což bylo v minulosti mnohokrát dokázáno (např. Manian *et al.*, 1987; Singh *et al.*, 1992; Janečková *et al.*, 2018). Cytokininy a jejich deriváty přitom vykazují odlišnou antisenescenční aktivitu v závislosti na své struktuře, koncentraci a také například druhu rostliny či jejím stáří (Holub *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 1998; Doležal *et al.*, 2006; Doležal *et al.*, 2007; Bryksová *et al.*, 2020). Tato bakalářská práce se zabývala porovnáním účinku 6-benzylaminopurinu (BAP) a jeho derivátu 6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (3MeOBAPA) na zachování obsahu chl $a+b$ a parametru F_v/F_m v listech, u nichž byla indukována senescence jejich oddělením a uložením do tmy. Oba parametry byly měřeny po šesti dnech inkubace ve tmě v příslušných roztocích a jejich hodnoty byly porovnávány s čerstvě oddělenými listy a listy uloženými v roztoku DMSO. Experimenty byly prováděny na šestých a/nebo sedmých listech šestitýdenních rostlin *A. thaliana*. K testování byly použity WT rostliny (ekotyp Columbia 0) a mutantní rostliny s deficiencí v histidin kinasových receptorech (AHK): *ahk2ahk3*, *ahk2ahk4* a *ahk3ahk4*.

Detailní analýzu toho, jak AHK receptory ovlivňují vývoj rostliny, provedl například Riefler *et al.* (2006). Uvádí, že pro správný vývoj je potřeba vzájemná spolupráce všech tří receptorů. Například receptory AHK2 a AHK3 hrají důležitou roli v regulaci syntézy chl a růstu nadzemní růžice. Pokud jsou tyto receptory vyřazeny z funkce, je v mutantních rostlinách nižší obsah chl a růst nadzemní části je značně omezen (Riefler *et al.*, 2006). V této práci byl však u kontrolních listů genotypu

ahk2ahk3 obsah chl *a+b* mírně vyšší ve srovnání s jinými genotypy (Obr. 4). Ve studiích Rieflera *et al.* (2006) i Janečkové *et al.* (2018) byl naopak nejvyšší obsah těchto pigmentů naměřen v listech mutantů *ahk2ahk4* (Riefler *et al.* 2006, Janečková *et al.*, 2018). Rozdílné hodnoty obsahu chl *a+b* mohly být způsobeny například rozdílnými růstovými podmínkami. V experimentech provedených v rámci této bakalářské práce byly rostliny pěstovány při tzv. krátkodenním režimu (8 h PAR o intenzitě $110 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/16 \text{ h tma}$), zatímco Riefler *et al.* (2006) použili rostliny pěstované při dlouhodobém režimu (16 h PAR o intenzitě $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}/8 \text{ h tma}$). Rozdílné bylo také stáří použitých rostlin. V publikaci Janečková *et al.* (2018) byly experimenty prováděny s oddělenými listy pětítýdenních rostlin, avšak v této bakalářské práci s oddělenými listy šestitýdenních rostlin. U oddělených listů inkubovaných v 0,1% roztoku DMSO došlo po šesti dnech ve tmě k výraznému poklesu obsahu chl *a+b* u všech sledovaných genotypů, přičemž nejpomaleji senescence postupovala u *ahk2ahk3* mutantu (Obr. 5). V experimentech Janečkové *et al.* (2018) byly rostliny inkubovány ve tmě v 0,2% DMSO a nejmenší pokles obsahu chl byl naměřen u mutantních rostlin *ahk2ahk4*, pravděpodobně díky funkčnímu AHK3 receptoru (Janečková *et al.*, 2018).

V experimentech prováděných Rieflerem *et al.* (2006) měla inkubace oddělených listů ve tmě v roztocích BAP o koncentraci 0,1 a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ za následek udržení obsahu chl u většiny genotypů. Při použití vyšší koncentrace BAP byl na konci experimentu vyšší i obsah chl v listech. Roztoky BAP nebyly účinné pouze v případě *ahk2ahk3* listů (Riefler *et al.*, 2006). V této bakalářské práci byl použit roztok BAP s o řád vyšší koncentrací ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). U listů *ahk2ahk3* byl obsah chl *a+b* zachován nejméně, přičemž v prvním experimentu byl obsah chl *a+b* nižší než v neošetřených listech, podobně jako v experimentech Rieflera *et al.* (2006). U *ahk2ahk4* bylo těchto pigmentů naopak nejvíce, což se opět shoduje s výsledky zmíněné studie. Z výsledků získaných v rámci této bakalářské práce je tedy patrné, že s výjimkou receptoru AHK3, nebyl žádný samostatně fungující receptor schopen zprostředkovat přenos cytokininového signálu v podobné míře jako u WT rostlin. Tato zjištění jsou v souladu s literaturou, kde je uváděno, že receptor AHK3 a s ním spojený regulátor odpovědi typu B ARR2 mají zásadní úlohu v uchování obsahu chl v listech ošetřených cytokininu během indukované senescence ve tmě (Kim *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2012; Janečková *et al.*, 2018). Riefler *et al.* (2006) také uvádí, že receptor AHK2 hraje v percepci CK signálu menší roli než AHK3 a role AHK4 je minimální. Autoři také

poukázali na spojitost mezi nefunkčními AHK receptory a zvýšeným obsahem endogenních cytokininů, a to zejména pokud je neaktivní AHK3. Rostliny se tak pravděpodobně snaží kompenzovat omezený přenos cytokininového signálu. To ve svých experimentech potvrdili také Janečková *et al.* (Riefler *et al.*, 2006; Janečková *et al.*, 2018).

Bryksová *et al.* (2020) zkoumali účinek derivátu BAP, 3MeOBAPA, o různých koncentracích (100 nmol.l⁻¹, 1 μmol.l⁻¹, 10 μmol.l⁻¹) na zachování obsahu chl *a+b* v oddělených listech *A. thaliana*. Obsah chl *a+b* byl měřen po šesti dnech působení roztoků na oddělené listy uložené ve tmě. Roztok o koncentraci 10 μmol.l⁻¹ byl v zachování obsahu chl *a+b* nejúčinnější. Nicméně roztok BAP o stejné koncentraci byl účinnější než 3MeOBAPA. Skutečnost, že tento derivát nepůsobí na zachování obsahu chl *a+b* v listech *A. thaliana* tak efektivně jako BAP, potvrdily také experimenty provedené v rámci této bakalářské práce (Obr. 6 a 7). Nejvíce byl obsah chl *a+b* zachován u listů s funkčním AHK3 receptorem (WT a *ahk2ahk4*), přičemž ve druhém experimentu byl poměrně vysoký obsah chl *a+b* také v *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* listech ošetřených BAP. V rámci studie Bryksové *et al.* (2020) bylo dále zjištěno, že navzdory svým antisenescenčním vlastnostem, 3MeOBAPA není *in vitro* schopen aktivovat AHK3 ani AHK4 receptor.

Hodnoty parametru F_v/F_m byly u čerstvě oddělených listů všech genotypů velmi podobné (Obr. 8). U listů uložených po dobu 6 dnů od oddělení v 0,1% DMSO byla aktivita PSII minimální (Obr. 9), podobně jako v experimentech provedených Janečkovou *et al.* (Janečková *et al.*, 2018). V této bakalářské práci vedlo ošetření roztoky BAP a 3MeOBAPA v určité míře k zachování F_v/F_m , avšak jejich účinky se u různých genotypů lišily (Obr. 10 a 11). U WT rostlin byl v zachování F_v/F_m mírně účinnější 3MeOBAPA. V experimentech provedených Bryksovou *et al.* (2020) byl F_v/F_m u WT listů ošetřených 3MeOBAPA až dvakrát vyšší než v listech inkubovaných v BAP (Bryksová *et al.*, 2020). Zhodnocení působení 3MeOBAPA a BAP na oddělené listy *ahk2ahk3* je problematické vzhledem k tomu, že v prvním experimentu byl F_v/F_m vyšší u listů inkubovaných v 3MeOBAPA a ve druhém experimentu u listů inkubovaných v BAP. V případě *ahk3ahk4* byl F_v/F_m mírně vyšší při inkubaci v BAP. V listech *ahk2ahk4* mutantních rostlin bylo působení obou roztoků na zachování parametru F_v/F_m srovnatelné. Schopnost 3MeOBAPA zachovat obsah chl *a+b* a také parametr F_v/F_m v oddělených listech je pravděpodobně spojena s jeho schopností aktivovat PAMP imunitní odpovědi rostlin a omezit produkci ethylenu, který

podporuje senescenci (Bryksová *et al.*, 2020; Kučerová *et al.*,2020). Vzhledem k nedostačujícímu množství dat nelze zatím s jistotou vyloučit ani potvrdit roli AHK receptorů v percepci signálu 3MeOBAPA. Pro formulování jednoznačných závěrů bude třeba provést další experimenty.

6 Závěr

V průběhu senescence u rostlin dochází k řadě změn a doprovází ji například pokles fotosyntetické aktivity, obsahu chl i aktivních forem endogenních fytohormonů cytokininů. Tyto hormony se mimo jiné vyznačují svou schopností oddálit či zpomalit senescenci a stejná schopnost byla prokázána také u jejich derivátů, přičemž jednotlivé sloučeniny se mohou svými antisenescenčními účinky lišit. Rozdíly jsou mezi nimi přítomny také ve schopnosti aktivovat histidin kinasové receptory. Například aplikace 3MeOBAPA vede v oddělených listech k zachování obsahu chl $a+b$ i parametru F_v/F_m , i navzdory tomu, že *in vitro* není schopen aktivovat receptory AHK3 a AHK4. Jeho antisenescenční vlastnosti jsou pravděpodobně spojeny s tím, že v rostlině aktivuje PAMP imunitní odpověď a omezuje produkci ethylenu, který senescenci podporuje (Bryksová *et al.*, 2020; Kučerová *et al.*, 2020).

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jaký dopad mají chybějící AHK receptory na schopnost 3MeOBAPA zachovat obsah chl $a+b$ a F_v/F_m při indukované senescenci. V experimentech byl použit 3MeOBAPA o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹ a jeho účinek na oddálení indukované senescence listů byl srovnáván s účinkem BAP. Jako modelový organismus byly použity rostliny *A. thaliana* (ekotyp Columbia 0) standardního genotypu a její dvojité *ahk* mutanti (*ahk2ahk3*, *ahk2ahk4*, *ahk3ahk4*). Na základě provedených experimentů lze říci, že ošetření roztokem 3MeOBAPA vedlo v oddělených listech k zachování obsahu chl $a+b$, avšak v nižší míře než při inkubaci v roztoku BAP. Pokles obsahu chl $a+b$ i parametru F_v/F_m byl nejpomalejší u rostlin s funkčním AHK3 receptorem (WT a *ahk2ahk4*). U WT listů inkubovaných v roztoku 3MeOBAPA byl F_v/F_m mírně vyšší a u *ahk2ahk4* bylo působení obou roztoků na zachování parametru F_v/F_m srovnatelné. V případě *ahk3ahk4* listů byl účinnější BAP, zatímco u *ahk2ahk3* nebyl výsledek jednoznačný. Jak a zda-li vůbec AHK receptory ovlivňují působení 3MeOBAPA *in vivo* nelze zatím vzhledem k nedostatečnému množství experimentů s jistotou říci.

7 Literatura

Agüera E., Cabello P., de la Haba P. (2010): Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. *Physiologia Plantarum* **138**, 256-267.

Al-Khatib K. a Paulsen, G. M. (1990): Photosynthesis and productivity during high-temperature stress of wheat genotypes from major world regions. *Crop Science* **30**, 1127.

Bilgin D. D., Zavala J. A., Zhu J. I., Clough S. J., Ort D. R., DeLucia E. H (2010): Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, cell & environment* **33**, 1597-613.

Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F. C., Rattan S. I. S. (1996): Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Letters* **393**, 197-200.

Brouwer B., Ziolkowska A., Bagard M., Keech O., Gardeström P. (2012): The impact of light intensity on shade-induced leaf senescence. *Plant Cell Environ* **35**, 1084-98.

Brownlee B. G., Hall R. H., Whitty C. D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: An enzymatic degradation product of the cytokinin, N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37-41.

Bryksová M., Dabravolski S., Kučerová Z., Zavadil Kokáš F., Špundová M., Plíhalová L., Tkáč T., Grúz J., Hudeček M., Hloušková V., Koprna R., Novák O., Strnad M., Plíhal O., Doležal K. (2020): Aromatic cytokinin arabinosides promote PAMP-like responses and positively regulate leaf longevity. *ACS Chemical Biology* **15**, 1949-1963.

Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. (2003): The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 3-22.

Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Schiavo F. L. (2003): Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**, 413-421.

Cary J. A., Liu W., Howell S. H. (1995): Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* **107**, 1075-1082.

Crafts-Brandner S. J., Salvucci M. E., Egli D. B. (1990): Changes in ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and ribulose 5-phosphate kinase abundance and photosynthetic capacity during leaf senescence. *Photosynthesis Research* **23**, 223-230.

Dai N., Schaffer A., Petreikov M., Shahak Y., Giller Y., Ratner K., Levine A., Granot, D. (1999): Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell* **11**, 1253-1266.

Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N. (2005): A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **15**, 316-328.

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

Doležal K., Popa I., Hauserová E., Spíchal L., Chakrabarty K., Novák O., Kryštof V., Voller J., Holub J., Strnad M. (2007): Preparation, biological activity and endogenous occurrence of N6-benzyladenosines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 3737-3747.

Eulgem T., Rushton P. J., Robatzek S., Somssich, I. E. (2000): The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**, 199-206.

Eulgem T., Somssich I. E. (2007): Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 366-371.

Fletcher R. A., Teo C., Ali A. (1973): Stimulation of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by benzyladenine. *Canadian Journal of Botany* **51**, 937-939.

Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P. I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J. (2011): Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2827-2840.

Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmölling T., Frébort, I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255-267.

Gan S., Amasino R. M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.

Gan S., Amasino R. M. (1997): Making sense of senescence – Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* **113**, 313-319.

Ge L., Yong J. W. H., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N., Ong E. S. (2005): Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **829**, 26-34.

Genty B., Briantais J-M., Baker N. R. (1989): The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects* **990**, 87-92.

Gregersen P. L., Culetic A., Boschian L., Krupinska K. (2013): Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* **82**, 603-622.

Guiamet J. J., Tyystjärvi E., Tyystjärvi T., John I., Kairavuo M., Pichersky P., Noodén L. D. (2002): Photoinhibition and loss of photosystem II reaction center proteins during senescence of soybean leaves. Enhancement of photoinhibition by the “stay-green” mutation cytG. *Physiologia Plantarum* **115**, 468-478.

Guo Y., Gan S. (2006): AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* **46**, 601-612.

Guo Y., Gan S. (2011): Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant, Cell & Environment* **35**, 644-655.

- Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Lam-Son Phan T. (2012): Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science* **17**, 172-179
- Harvey B. M. R., Lu B. C., Fletcher R. A. (1974): Benzyladenine accelerates chloroplast differentiation and stimulates photosynthetic enzyme activity in cucumber cotyledons. *Canadian Journal of Botany* **52**, 2581-2586.
- He Y., Fukushige H., Hildebrand D. F., Gan S. (2002): Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* **128**, 876-884.
- Hensel L. L., Grbić V., Baumgarten D. A., Bleecker A. B. (1993): Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**, 553-564.
- Higuchi M., Pischke M. S., Mahonen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004): *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8821-8826.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109-115.
- Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G., Wareing P. F. (1975): New cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry* **14**, 1005-1008.
- Hörtensteiner S., Feller, U. (2002): Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**, 927-937.
- Humbeck K., Quast S., Krupinska K. (1996): Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant, Cell and Environment* **19**, 337-344.
- Hwang I., Sheen J., Muller B. (2012): Cytokinin signaling networks. *The Annual Review of Plant Biology* **63**, 353-380.
- Chatfield J. M., Armstrong D. J. (1986): Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv Great northern. *Plant Physiology* **80**, 493-499.
- Chen C. M., Ertl J. R., Leisner S. M., Chang C. C. (1985): Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. *Plant Physiology* **78**, 510-513.
- Janečková H., Husičková A., Ferretti U., Prčina M., Pilařová E., Plačková L., Pospíšil P., Doležal K., Špundová M. (2018): The interplay between cytokinins and light during senescence in detached *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell & Environment* **41**, 1870-1885.
- Jehanzeb M., Zheng X. Z., Miao Y. (2017): The role of the S40 gene family in leaf senescence. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2152.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.

- 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**, 14049-14054.
- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Sheen J., Nam H. G., 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., Popelková H., Šebela M., Končítíková R., Spíchal L., Nisler J., Madzak C., Frébort I., Laloue M., Houbá-Hérin N. (2010): Phenyl- and benzylurea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: A structural study. *Biochimie* **92**, 1052-1062.
- Kučerová Z., Rác M., Mikulík J., Plíhal O., Pospíšil P., Bryksová M., Sedlářová M., Doležal K., Špundová M. (2020): The anti-senescence activity of cytokinin arabinosides in wheat and *Arabidopsis* is negatively correlated with ethylene production. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 8109.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010): Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 53–60.
- Leopold A. C. (1961): Senescence in plant development. *Science* **134**, 1727-1732.
- Letham D. S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Science* **8**, 569-573.
- Levey S., Wingler A. (2005): Natural variation in the regulation of leaf senescence and relation to other traits in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **28**, 223-231.
- Lim P. O., Kim H. J., Nam G. H. (2007): Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-136.
- Lindsay D. L., Sawhney V. K., Bonham-Smith P. C. (2006): Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Science* **170**, 1111-1117.
- Lu C., Zhang J. (1998): Changes in photosystem II function during senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **104**, 239-247.
- Manian K., Natarajaratnam N., Ramasamy P., Mohanasundaram, K. (1987): Senescence and its role in soybean productivity. *Journal of Agronomy and Crop Science* **159**, 202-205.
- Masclaux C., Valadier M. H., Brugière N., Morot-Gaudry J. F., Hirel B. (2000): Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**, 510-518.
- Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H. (1999): Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 67-95.
- Matiu M., Ankerst D. P., Menzel A. (2017): Interactions between temperature and drought in global and regional crop yield variability during 1961-2014. *PLoS One* **12**, e0178339.

Matsubara S. (1980): Structure-activity relationships of cytokinins. *Phytochemistry* **19**, 2239-2253.

Miller C. O., Skoog F., Vonsaltza M. H., Strong F. M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392-1392.

Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 1375-1380.

Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowská D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 16598-16603.

Mok D. W. S., Mok M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.

Nisler J., Kopečný D., Končítiková R., Zatloukal M., Bazgier V., Berka K., Zalabák D., Briozzo P., Strnad M., Spíchal L. (2016): Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Plant Molecular Biology* **92**, 235-248.

Noodén L. D., Hillsberg J. W., Schneider M. J. (1996): Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiologia Plantarum* **96**, 491-495.

Nuruzzaman M., Manimekalai R., Sharoni A. M., Satoh K., Kondoh H., Ooka H., Kikuchi S. (2010): Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* **456**, 30-44.

Perilli S., Moubayidin L., Sabatini S. (2010): The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 21-26.

Plíhalová L., Vylíčilová H., Doležal K., Zahajská L., Zatloukal M., Strnad M. (2016): Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology* **33**, 614-624.

Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmölling 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.

Richmond A. E., Lang A. (1957): Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**, 650-651.

Rivero R. M., Kojima M., Gepstein A., Sakakibara H., Mittler R., Gepstein S., Blumwald E. (2007): Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19631-19636.

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

Short K. C., Torrey J. G. (1972): Cytokinins in seedling roots of pea. *Plant Physiology* **49**, 155-160.

Schaller G. E., Kieber J. J., Shiu S. H. (2008): Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *The Arabidopsis Book* **6**, e0112.

Schaller G. E., Bishopp A., Kieber, J. J. (2015): The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* **27**, 44-63.

Schippers J. H. M., Schmidt R., Wagstaff C., Jing H. C. (2015): Living to die and dying to live: The survival strategy behind leaf senescence. *Plant Physiology* **169**, 914-930.

Singh S., Letham D. S., Palni L. M. S. (1992): Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiologia Plantarum* **86**, 388-397.

Skoog F., Strong F. M., Miller C. O. (1965): Cytokinins. *Science* **148**, 532-533.

Smart C. M. (1994): Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419-448.

Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., 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.

Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.

Sugiura M. (1963): Promotion of chlorophyll synthesis by kinetin. *Botanical Magazine Tokyo* **76**, 309-310.

Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., Mizuno, T. (2001): The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant 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 senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1051-1058.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.

Thomas H., de Villiers L. (1996): Gene expression in leaves of *Arabidopsis thaliana* induced to senesce by nutrient deprivation. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1845-1852.

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 L. M., Gan S., Quirino B., Amasino, R. M. (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.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmölling T. (2003): Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* **15**, 2532-2550.

- Whitty C. D., Hall R. H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry* **52**, 789-799.
- Wingler A., von Schaewen A., Leegood R. C., Lea P. J., Quick W.P. (1998): Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effect on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology* **116**, 329-335.
- Wingler A., Purdy S., MacLean J. A., Pourtau N. (2006): The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 391-399.
- Woo N. S., Badger M. R., Pogson B. J. (2008): A rapid, non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. *Plant Methods* **4**, 27.
- 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 Cell Physiology* **42**, 1017-1023.
- Zavaleta-Mancera, H. A., López-Delgado, H., Loza-Tavera, H., Mora-Herrera, M., Trevilla-García, C., Vargas-Suárez, M., Ougham, H. (2007): Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1572-1582.
- Zentgraf U., Jobst J., Kolb D., Rentsch D. (2004): Senescence-related gene expression profiles of rosette leaves of *Arabidopsis thaliana*: Leaf age versus plant age. *Plant Biology* **6**, 178-183.
- Zhao Z., Andersen S. U., Ljung K., Doležal K., Miotk A., Schultheiss S. J., Lohmann J. U. (2010): Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* **465**, 1089-1092.

8 Seznam použitých zkratek

3MeOBAPA	6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurin
3OHBAPA	6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurin
ADP	adenosindifosfát
AHK	<i>Arabidopsis histidine kinase</i>
AHP	<i>Arabidopsis histidine phosphotransfer</i>
AMP	adenosinmonofosfát
ARR	<i>Arabidopsis response regulator</i>
AtHXK1	<i>Arabidopsis thaliana hexokinase 1</i>
AtNAP	zástupce NAC transkripčních faktorů
ATP	adenosintrifosfát
BAP	6-benzylaminopurin
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
CLV1	<i>Clavata1</i>
CRE1	<i>cytokinin response 1</i>
CRF	<i>cytokinin response factor</i>
<i>cZ</i>	<i>cis-zeatin</i>
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
F ₀	minimální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _m	maximální fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _v	variabilní fluorescence vzorku adaptovaného na tmu
F _v /F _m	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II adaptovaného na tmu
ΦPSII	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II adaptovaného na světlo

chl	chlorofyl
CHASE	<i>cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular</i>
iP	6-(2-izopentenylamino)purin
IPT	isopentenyltransferasa
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MDA	malondialdehyd
<i>mT</i>	<i>meta-topolin</i>
NAC	skupina transkripčních faktorů
NADH	redukována forma nikotinamidadenin dinukleotidu
NADP	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
<i>oT</i>	<i>ortho-topolin</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> (fotosynteticky aktivní záření)
PCD	<i>programmed cell death</i> (programovaná buněčná smrt)
PSII	fotosystém II
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktivní formy kyslíku)
Rubisco	D-ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa
SAG	<i>senescence-associated genes</i> (geny aktivované senescencí)
TDZ	thidiazuron
<i>tZ</i>	<i>trans-zeatin</i>
WOL	<i>wooden leg</i>
WRKY	skupina transkripčních faktorů
WT	<i>wild type</i> (standardní genotyp)
WUS	<i>Wuschel</i>