

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Vliv exogenní aplikace cytokininů na senescenci listů ječmene se sníženým obsahem endogenních cytokininů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Eva Szczyrbová
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Alexandra Husičková, Ph.D.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Eva Szczyrbová
Název práce:	Vliv exogenní aplikace cytokininů na senescenci listů ječmene se sníženým obsahem endogenních cytokininů
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, oddělení biofyziky; Laboratoř růstových regulátorů PřF UP
Vedoucí práce:	Mgr. Alexandra Husičková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	Již dlouhou dobu jsou známy pozitivní účinky cytokininů na oddálení senescence rostlin. Zajímavé ovšem je, že tomu tak je pouze do určité koncentrace aplikovaných cytokininů. Cílem této práce bylo zkoumat vliv exogenně aplikovaných cytokininů a světla na senescenci listů ječmene jarního se sníženým obsahem těchto hormonů. Senescenční testy byly provedeny s oddělenými listy transgenní linie ječmene s overexpresí proteinu CKX1 a s WT rostlinami jako kontrolou. Byla použita řada experimentálních metod, jako měření obsahu cytokininů, analýza obsahu chlorofylu analyticky i pomocí chlorofylmetru či stanovení aktivity fotosyntetického aparátu. Byl prokázán vliv zvyšující se koncentrace cytokininů na snížení degradace chlorofylu za současného snížení fotosyntetické aktivity fotosystému II.
Klíčová slova:	cytokinin, BAP, senescence, ječmen, indukovaná fluorescence chlorofylu a
Počet stran:	75
Počet příloh:	3
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author's first name and Suriname: Bc. Eva Szczyrbová

Title of thesis: Effect of exogenous cytokinins application on senescence of barely leaves with decreased endogenous cytokinins levels

Type of thesis: Diploma

Department: The Center of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, department of Biophysics; Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University

Supervisor: Mgr. Alexandra Husíčková, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: It is known for a long time that cytokinins have positive effects on delay of plant senescence. Interestingly, this is true only up to certain concentration of applied cytokinins. The aim of this thesis was to investigate the effect of exogenously applied cytokinins and light on senescence of spring barely leaves with decreased levels of those hormones. Senescence assays were performed on detached leaves of transgenic barley with CKX1 protein overexpression and WT plants as a control. Several experimental methods were used, such as estimation of cytokinins content, analysis of chlorophyll content analytically as well as using chlorophyllmeter, and measurement of activity of photosynthetic apparatus. The effect of increasing cytokinin concentration on the reduction of chlorophyll degradation has been demonstrated, while the photosynthetic activity of photosystem II was reduced.

Keywords: cytokinin, BAP, senescence, barley, induction of chlorophyll a fluorescence

Number of pages: 75

Number of appendices: 3

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Alexandry Husičkové, Ph.D. s použitím literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 15. 5. 2020

.....

podpis

Ráda bych poděkovala Mgr. Alexandře Husičkové, Ph.D. za odborné vedení této práce, věnovaný čas, rady a vstřícný přístup. Dále pak Mgr. Lence Plačkové, Ph.D. za stanovení obsahu cytokininů a Veronique Héléne Bergougnoux-Fojtik, Ph.D. za poskytnutí rostlinného materiálu. V neposlední řadě také děkuji rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	12
2 Teoretická část	13
2.1 Cytokininy	13
2.2 Fotosyntéza	16
2.2.1 Fotosyntéza a cytokininy	16
2.2.2 Vztah cytokininů a chloroplastů	17
2.3 Světlo	20
2.4 Senescence	22
2.4.1 Vliv cytokininů na senescenci rostlin	24
2.4.2 Vliv světla na senescenci rostlin	26
2.5 Užité experimentální metody	27
2.5.1 Indukovaná fluorescence chlorofylu a	27
2.5.1 Hmotnostní spektrometrie	30
3 Experimentální část	33
3.1 Materiál a chemikálie	33
3.2 Přístrojové vybavení	34
3.3 Experimentální metody	34
3.3.1 Výsadba rostlinného materiálu	34
3.3.2 Stanovení obsahu cytokininů v transgenních liniích ječmene	35
3.3.3 Výběr linie ječmene pro senescenční testy	36
3.3.4 Senescenční testy	37
3.3.5 Určení koncentrace chlorofylu	37
3.3.6 Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu a	39
3.3.7 Měření velmi rychlé indukované fluorescence chlorofylu a	40
3.3.8 Analýza a zpracování dat	40
4 Výsledky	41
4.1 Výběr stárí a linie ječmene pro senescenční testy	41
4.2 Senescenční testy na pěstebním světle	44
4.2.1 Stanovení obsahu chlorofylu	45
4.2.2 Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu a	47
4.3 Senescenční testy na vysoké intenzitě světla I.	48
4.3.1 Stanovení obsahu chlorofylu	48
4.3.2 Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu a	51

4.4	Senescenční testy na vysoké intenzitě světla II.....	52
4.4.1	Stanovení obsahu chlorofylu	52
4.4.2	Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu <i>a</i>	55
4.4.3	Měření velmi rychlé indukované fluorescence chlorofylu <i>a</i>	56
5	Diskuze.....	57
6	Závěr.....	64
	Seznam literatury	65
Přílohy		
	Příloha A	
	Příloha B	
	Příloha C	

Seznam zkratk

ABA	kyselina abcisová
ABCG14	protein ABC transportér rodiny G člen 14
ABI5	kyselinou absicosou-indukovaný transkripční faktor
AHK	histidin protein kináza (Arabidopsis histidine kinases)
AHP	histidin fosfotransférový protein (Arabidopsis histidine kinase)
APT	adeninfosforibosyltransferáza
ARR	regulátor jaderné odpovědi (Arabidopsis response regulator)
ATAF1–2	Arabidopsis thaliana activating factor
BAP	benzylaminopurin
bZIP	basic leucine zipper transkripční faktor
C3	linie s overexpresí cytozolárních CKX1 enzymů (cytAtCKX1 B2/3)
C5	linie s overexpresí cytozolárních CKX1 enzymů (cytAtCKX P2/5)
CDPK	kalcium dependentní proteinkináza
CGA1	GNC-like/cytokinin-responsive gata factor 1
CK	cytokinin
CKX	cytokinin dehydrogenáza/oxidáza
CPPU	N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridil)urea
CRF2	cytokinin response faktor 2
CUC2	cup-shaped cotyledon
cZ	cis-zeatin
DHZ	dihydrozeatin
DPU	N,N'-fenylurea
EIN3	ethylenem indukovaný transkripční faktor
ELF3	early flowering; brzké kvetení
ESI	ionizace elektrosprejem

F	fluorescence
F ₀	minimální fluorescence
F ₀ '	minimální fluorescence chlorofylu ve stavu adaptovaném na světlo
F _m	maximální fluorescence
FR	dlouhovlnné červené světlo
F _t	ustálená hodnota fluorescence
F _v	variabilní fluorescence
F _v /F _m	maximální kvantový výtěžek fotochemické reakce fotosystému II
GCN	gata, nitrate-inducible, carbon-metabolism involved
Glc	glukóza
GLK2	golden2-like
HY5	elongated hypocotyl 5
IC	interní konverze
IFCH	indukovaná fluorescence chlorofylu a
iP	N6-(Δ ² -izopentenyl)adenin
IPT	izopentenyltransferáza
ISC	inter-system crossing
LOG	LONELY GUY
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
meta-topolin	N6-(3-hydroxybenzyl)adenin
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MYB	myeloblastózní transkripční faktor
NAC	pojem pro tři transkripční faktory (NAM, ATAF1–2 a CUC2)
NAM	no apical meristem
NG	N-glukosidy
NPQ	nefotochemické zhášení

NT	nukleotid
OG	O-glukosidy
ortho-topolin	N6-(2-hydroxybenzyl)adenin
P	fosforescence
PDV2	plastid division 2
PhyA-E	fytochrom A-E
PIF4, 5	s fytochromy interagující transkripčních faktor 4, 5
POR	NADPH-dependentní protochlorofylid oxidoreduktáza
PRB	prolamelární tělíska
PSI	reakční centrum fotosystému I
PSII	reakční centrum fotosystému II
PUP	purinpermeáza
qP	fotochemické zhášení
Re	červené světlo
R	ribotidy
ROS	reaktivní formy kyslíku
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
S0	základní energetický stav
S1, 2	vyšší energetické hladiny
SAG	se senescencí asociované geny
SAG12	pro senescenci specifický promotor
SIG	sigma faktor
T	thylakoidní membrána
T1	tripletní excitovaný stav
TDZ	N-fenyl-N'-(1, 2, 3-thiadiazol-5-yl)urea (thidiazuron)
TF	transkripční faktor

TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
<i>tZ</i>	trans-zeatin
UGT	uridindifosfátglykosyltransferáza
UHPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
VB	linie s overexpresí vakuolárních CKX1 enzymů (vAtCKX1 F)
VF	linie s overexpresí vakuolárních CKX1 enzymů (vAtCKX1 B6)
VR	vibrační relaxace
WRKY	Zinc-finger typ transkripčního faktoru obsahující specifickou WRKYGQK sekvenci AMK
WT	wild type
$\phi_{f,D}$	nefotochemické zhášení dané přeměnou na teplo
ϕ_{NPQ}	světlem indukované nefotochemického zhášení
ϕ_{PSII}	efektivní kvantový výtěžek fotosystému II

1 Úvod a cíle práce

Rostlinná senescence je přirozený a vysoce regulovaný proces vedoucí ke smrti buňky, orgánu či celého organismu. Obdobně jako celý život rostlin je také senescence ovlivňována mnoha exogenními i endogenními faktory. Jako příklady exogenních faktorů můžeme uvést vysušení, přemokření, zasolení, nedostatek určité živiny nebo vystavení rostliny nadměrnému sluneční záření. Vnitřními faktory vedoucí k senescenci jsou věk a zdravotní stav rostlin či vliv fytohormonů.

Studium tohoto stěžejního procesu je nyní, ve světě rychle se měnících klimatických podmínek a růstu počtu obyvatel planety, důležitější než kdy dříve. Pokud budou senescence a možnosti jejího ovlivnění dobře prozkoumány, bude možné tyto poznatky aplikovat k dosažení vyšších výnosů v zemědělské produkci.

K výzkumu senescence je používána řada modelových rostlin (například *Arabidopsis thaliana*). Významnou kulturní plodinou užívanou k výzkumu senescence je ječmen setý (*Hordeum vulgare*), který je pěstován především k výrobě sladu, potravin, krmiv, ale i farmaceutických produktů.

Již dlouhou dobu jsou známy pozitivní účinky fytohormonů cytokininů na oddálení rostlinné senescence. Zajímavé ovšem je, že tento efekt je patrný pouze do jejich určité koncentrace. Při jejím překročení nastává účinek opačný a dochází k podpoření senescence. V této práci byla použita linie ječmene se sníženým endogenním obsahem cytokininů pro výzkum vlivu exogenní aplikace těchto hormonů a světelných podmínek na senescenci rostlin.

Cíle práce byly stanoveny jako:

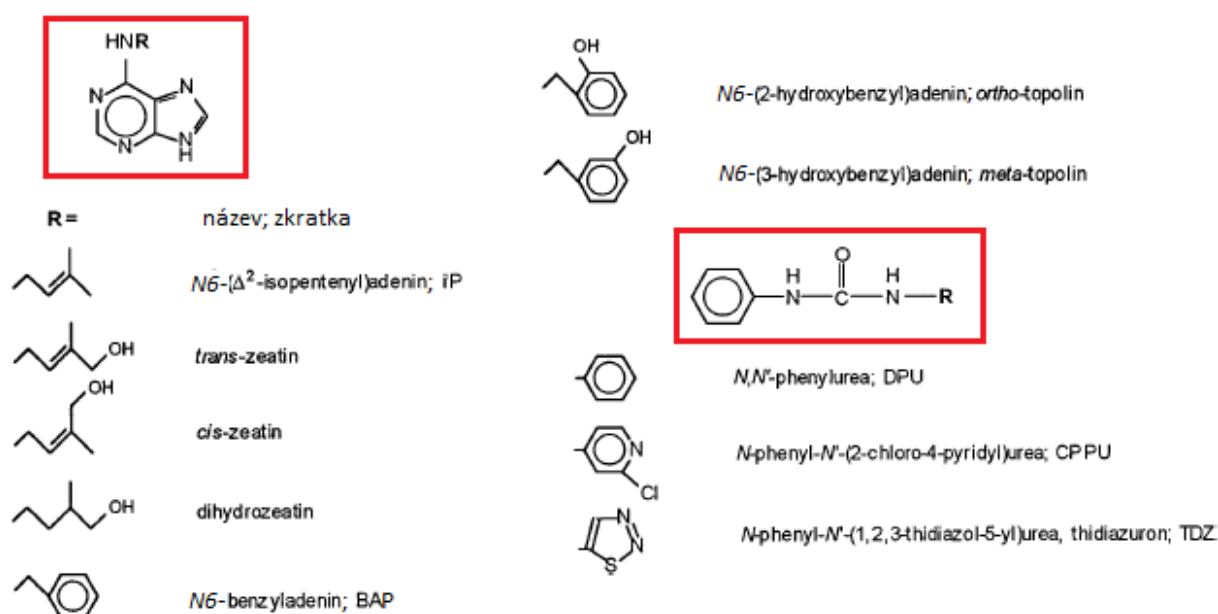
- extrakce a purifikace cytokininů z listových segmentů transgenních linií ječmene v různých dobách po zasetí;
- na základě stanovených endogenních hladin cytokininů výběr linie se sníženým obsahem cytokininů a vhodného stáří rostlin pro senescenční testy;
- zvládnutí metodiky stanovení obsahu chlorofylů analyticky a pomocí chlorofylmetru SPAD (Konica, Minolta, Japonsko), metodiky měření pomalé a velmi rychlé indukce chlorofylové fluorescence pomocí přístrojů FluorCam a Plant Efficiency Analyser včetně analýzy dat, vyhodnocování parametrů a zpracování obrázků;
- provedení měření pomocí výše uvedených metod na oddělených listech ponechaných v roztocích cytokininů pod osvětlením o různé intenzitě;
- zpracování výsledků experimentů a jejich porovnání s dostupnou literaturou.

2 Teoretická část

2.1 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou evolučně starou a vysoce konzervovanou skupinou nízkomolekulárních látek, které byly nalezeny v různých živých organismech (Spíchal, 2012). V rostlinách tvoří významnou skupinu fytohormonů podílející se na kontrole procesů jako buněčná proliferace a diferenciace, které jsou stěžejní pro správný růst a vývoj rostlinného organismu.

Chemicky se jedná o deriváty adeninu v pozici *N6*, které můžeme rozdělit dle typu postranního řetězce do dvou základních skupin: izoprenoidní a aromatické. Mezi izoprenoidní CK řadíme *cis*- a *trans*-zeatin (*cZ*, *tZ*), dihydrozeatin (DHZ) a *N6*-(Δ^2 -izopentenyl)adenin (*iP*). Do druhé skupiny cytokininů řadíme benzylaminopurin (BAP), kinetin nebo topoliny. Kromě výše uvedených CK byla připravena i řada CK syntetických, jako jsou například deriváty fenyльмоčoviny (obr. 1; Shantz et Steward, 1955; Spíchal, 2012).



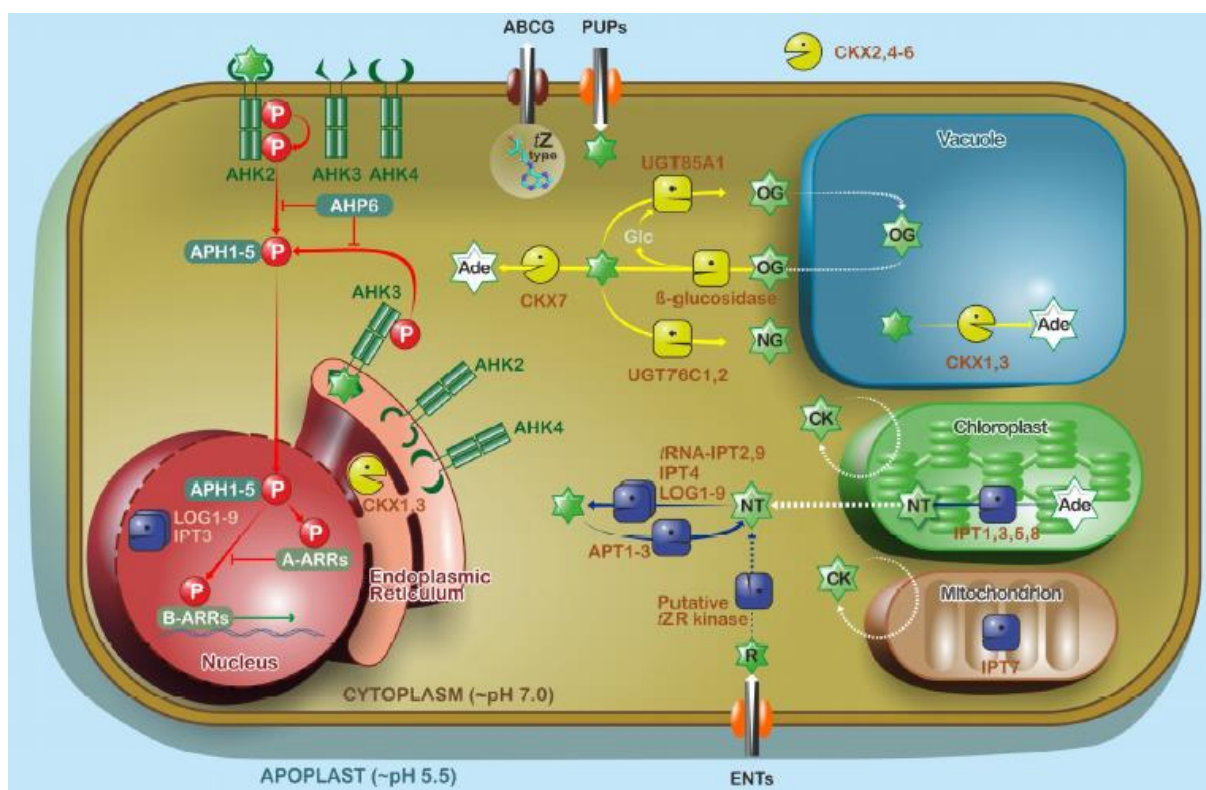
Obr. 1: Struktury přirozeně se vyskytujících a syntetických CK (převzato a upraveno, Mok et Mok, 2001).

Klíčovými enzymy biosyntézy cytokininů jsou izopentenyltransferázy (IPT), které katalyzují vznik adeninových ribotidů vazbou izopentenyllové skupiny do *N*6 pozice ATP či ADP (Taya et al., 1978). Vzniklý produkt je hydroxylován na izopentenyllovém řetězci cytochromem P450 monooxygenázou CYP735A1 nebo CYP735A2 (Takei et al., 2004). Produkt této reakce je ovšem stále ve formě ribotidu, a proto je cytokinin málo aktivní. Aktivaci CK zajišťují enzymy rodiny LONELY GUY (LOG) odštěpením cukerné části a fosfátů (Kurawa et al., 2007).

Aktivní cytokininy vyvolávají buněčnou reakci skrze spouštění signálních drah vazbou na příslušné receptory. V *A. thaliana* jsou známy tři transmembránové receptory z rodiny histidin protein kináz (*Arabidopsis* histidine kinases, AHK) a to AHK2, AHK3 a AHK4 (také znám jako CRE1 či WOL; Suzuki et al., 2001; Yamada et al., 2001; Mähönen et al., 2000; Inoue et al., 2001). Signál je z AHK proteinů předáván přes histidin fosfotransférové proteiny (*Arabidopsis* histidine kinases, AHP) na regulátory jaderné odpovědi (*Arabidopsis* response regulators, ARR), které mohou tlumit či aktivovat expresi cílových genů (Hwang et al., 2012).

Aby byla v rostlině udržena homeostáza, existují cesty dočasné či trvalé deaktivace CK skrze připojení cukerných zbytků v různých pozicích molekuly CK. Reverzibilní konjugace CK s cukry je dána aktivitou enzymů uridindifosfátglykosyltransferáz (UGT) a enzymů metabolismu purinů jako adeninfosforibosyltransferázy (APT). Vzniklé *O*-glykosidy slouží jako zásoba CK, která může být rychle převedena do aktivní formy odštěpením cukerného zbytku enzymy β -glukosidázami či enzymy LOG (Brzobohatý et al., 1993). Ireverzibilní inaktivace CK je dána přímou glykosylací purinového kruhu CK v pozici *N*7 nebo *N*9 enzymy UGT76C1 či UGT76C2 za vzniku trvale inaktivních *N*-glykosidů (Mok et Mok, 2001).

Degradaci CK zajišťují enzymy cytokinin dehydrogenázy/oxidázy (CKX), které katalyzují odštěpení nenasyceného postranního řetězce CK v pozici *N*6 za vzniku odpovídajícího aldehydu a adeninu či adenosinu (Pačes et al., 1971; Skalický et al., 2018). Preferovanými substráty CKX jsou volné CK a CK ve formě ribotidů. Substituce funkčních skupin CK na purinovém kruhu nebo *O*- či *N*-glykosylace zabraňují štěpení CK pomocí enzymů CKX. V *A. thaliana* bylo identifikováno sedm CKX enzymů, které se liší aktivitou, intracelulární lokalizací a mírou exprese (Schmülling et al., 2003). Exprese různých enzymů CKX může být indukována exogenní aplikací CK (Bhargava et al., 2013). Overexprese enzymů CKX v *A. thaliana* vede ke snížení hladin endogenních CK a k rozličným defektům ve vývoji rostlin (Kieber et Schaller, 2014). Metabolismus a signální dráhy CK jsou shrnuty v obr. 2.



Obr. 2: De novo syntéza CK je v *A. thaliana* zprostředkována izopentenyltransferázami (IPT) hlavně v chloroplastech, také v mitochondriích, cytosolu a jádře. LONELY GUY (LOG) enzymy se nacházejí v cytosolu a jádře (Noh et al, 2003). Biosyntéza je ve schématu značena modrými šipkami. Enzymy adeninfosforibosyltransferázy (APT) katalyzují opačnou reakci. Většina aktivních CK může být modulována uridindifosfátglykosyltransferázami (UGT) nebo β -glukosidázami (žluté šipky značí reverzibilní či nereverzibilní inaktivaci). Konečným degradačním produktem je adenin (Ade), který vzniká funkcí enzymu cytokinin dehydrogenázou/oxidázou (CKX). Transport (bílé šipky), je zajišťován purinpermeázami (PUP) a proteiny ENT. Protein ABC transportér rodiny G člen 14 (ABCG14) je exportér *trans*-zeatinových forem CK (Miller et al, 1955). Pro signalizaci (červené šipky) jsou stěžejní histidin protein kinázy (Arabidopsis histidine kinases AHK). Přenos signálu zprostředkovávají histidin fosfotransférové proteiny 1-5 (Arabidopsis histidine kinases, AHP) na regulátory jaderné odpovědi (Arabidopsis response regulators, ARR) typu A nebo B. Inhibiční funkci plní histidin fosfotransférový protein 6 (AHP6). Aktivace B-ARR vede k transkripci cílových genů včetně A-ARR, které tvoří zpětnovazebnou smyčku (Galichet et al, 2008). Zelená hvězda představuje typy CK, Glc – glukóza; NT – nukleotidy; NG – N-glukosidy; OG – O-glukosidy; P – fosfát; R – ribotidy. Přímá čára náleží dobře prozkoumaným, potvrzeným procesům, přerušovaná čára pak méně jasným procesům (převzato, Skalický et al., 2018).

V dnešní době je známá celá řada procesů ovlivňovaných cytokininy. Pro příklad uveďme regulaci buněčného cyklu, aktivity kořenových a stonkových meristémů, vývoje chloroplastů, indukci kvetení nebo regulaci senescence (Werner et Schmülling, 2009; Hwang et al., 2012; El-Showk et al., 2013; Kieber et Schaller, 2014). Cytokininy také hrají roli v reakci na environmentální stres, jako je sucho, chlad, zasolení či stres vyvolaný světlem (Argueso et al., 2009; Vanstraelen et Benková, 2012; Cortleven et Schmülling, 2015). V této práci se zaměříme na vliv cytokininů na fotosyntézu a senescenci rostlin.

2.2 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších procesů probíhajících na naší planetě. Jedná se o proces přeměny světelné energie na energii chemickou, složený ze dvou fází.

Primární fáze je závislá na světle. Probíhá na tylakoidní membráně chloroplastů, která obsahuje transmembránové komplexy proteinů a barviv zvané fotosystémy. Fotosystémy jsou složeny z reakčních center a ze světlosběrných antén. Molekula chlorofylu interaguje s fotony světla, čímž dochází k přechodu elektronů chlorofylu na vyšší energetickou hladinu. Tyto excitované stavy jsou přenášeny z periferních oblastí antény do přilehlého reakčního centra. V reakční centru fotosystému II (PSII) dojde k předání vysokoenergetického elektronu elektronovému transportnímu řetězci. Donor elektronu je regenerován elektronem získaným z molekuly vody. Její hydrolýzou vznikají protony a také plynný kyslík, který je vedlejším produktem fotosyntézy.

Během přenášení vysokoenergetického elektronu do fotosystému I (PSI) dochází ke generaci gradientu H^+ iontů na tylakoidní membráně a ke vzniku elektrochemického potenciálu umožňujícího syntézu ATP. Energie excitovaného elektronu je využita k produkci NADPH. V sekundární fázi fotosyntézy jsou vyrobené ATP a NADPH použity k fixaci uhlíku z CO_2 do molekul sacharidů (Alberts et al., 2001).

2.2.1 Fotosyntéza a cytokininy

Krátce po objevení cytokininů byl pozorován jejich vliv na redukci degradace chlorofylu (Richmond et Lang, 1957) a poté rovněž na jeho biosyntézu (Sugiura, 1963). To vedlo k otázkám, zda CK ovlivňují samotný proces fotosyntézy.

V roce 1977 došli Buschmann a Lichtenthaler ve své práci v závěru, že CK v ředkvi podněcují vznik elektronového transportního řetězce zvyšováním aktivity kyslík-vyvíjecího komplexu, množství P700 (reakční centrum PSI) a zastoupení plastochinonu. Řada experimentů s jinými druhy rostlin však tento závěr nepotvrdila (např. Zerbe et Wild, 1980). Obecně převládají práce dokládající pozitivní účinky CK.

Potvrzen je ovšem negativní vliv vysoké koncentrace CK na primární fázi fotosyntézy. U transgenních rostlin se zvýšenou tvorbou CK docházelo k nepatrnému či žádnému zvýšení fotosyntetické aktivity. Při překročení určité koncentrace CK ovšem nastal útlum fotosyntézy (Ondrej et al., 1990; Šiffel et al., 1992; Čatský et al., 1993). Dále v práci Synkové et al. roku 1999 byl na transgenních rostlinách tabáku *Pssu-IPT*

prokázán rozdíl v ovlivnění transportních řetězců PSI a PSII vysokými koncentracemi CK. Zatímco PSII nebyl téměř vůbec inhibován, u PSI došlo k inhibici ze 70 %.

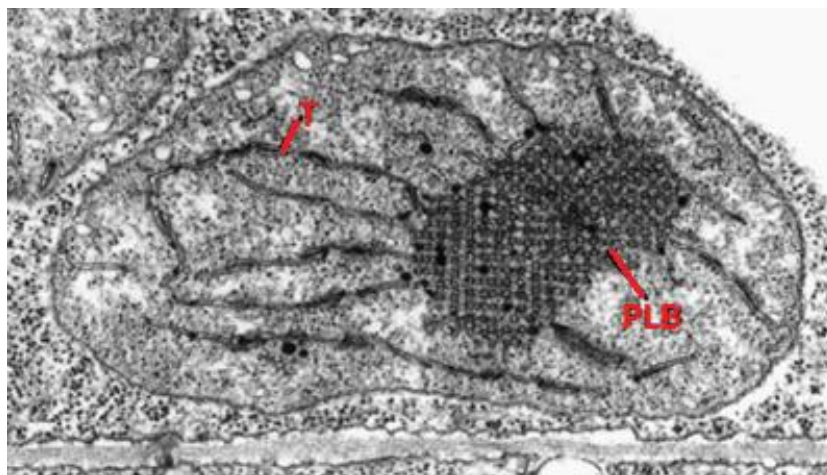
Dnes již tedy víme, že CK fotosyntézu jako takovou ovlivňují. Zda je jejich efekt pozitivní či negativní závisí na jejich koncentraci. Cytokininy regulují expresi velké řady genů. V různých druzích rostlin (tabák, okurka, huseníček) byla po aplikaci CK pozorována silná up-regulace genů kódujících obě podjednotky enzymu RUBISCO a genů kódujících protein vázající chlorofyl a ve fotosystému II (Lerbs et al., 1984; Ohya and Suzuki, 1991; Chory et al., 1994). Do světelné části fotosyntézy CK pravděpodobně zasahují skrze strukturální změny různých částí elektronového transportního řetězce (Cortleven et Valcke, 2012). Konkrétní mechanismy však zatím čekají na objevení (Cortleven et Schmülling, 2015). Věnujme se proto nyní prozkoumanější oblasti, vztahu CK s organelami, ve kterých fotosyntéza probíhá.

2.2.2 Vztah cytokininů a chloroplastů

Chloroplasty jsou významné semiautonomní orgány rostlinných buněk umožňující autotrofní způsob výživy. Kromě fotosyntézy v těchto organelách dochází také k biosyntéze mnoha primárních a sekundárních metabolitů (Lopez-Juez et Pyke, 2005).

Nezbytné je připomenout, že právě v chloroplastech jsou lokalizovány některé enzymy biosyntézy CK (viz. obr. 2). V *A. thaliana* se v chloroplastech nachází většina proteinů IPT (IPT1, IPT3, IPT5 a IPT8) katalyzujících první krok biosyntézy CK. Chloroplasty také obsahují specifickou sadu metabolitů cytokininů, včetně volných bází, ribosidů a ribotidů jako *N*-glukosidy (Benková et al., 1999). Jsou proto důležitým místem podílejícím se na regulaci homeostázy CK.

Obdobně jako všechny ostatní plastidy se chloroplasty vyvíjejí z proplastidů přítomných v meristematických buňkách. Stěžejní roli během diferenciací proplastidů hrají vnější i vnitřní faktory, jako jsou světlo a fytohormony. Při růstu rostliny ve tmě vznikají etioplasty, které mají semikrystalickou strukturu (prolamelární tělíska složená z lipidů a NADPH-dependentních protochlorofylid oxidoreduktáz, POR; Armstrong et al., 1995; Vinti et al., 2005). Při osvětlení rostliny dochází k procesu de-etiolizace. Rozpadají se prolamelární tělíska za tvorby typického uspořádání tylakoidní membrány (obr. 3). Dále je akumulovaný protochlorofylid konvertován na chlorofyl. Je rovněž spouštěna syntéza chlorofylu de novo. Ve výsledku je formován plně funkční chloroplast (von Arnim et Deng, 1996).

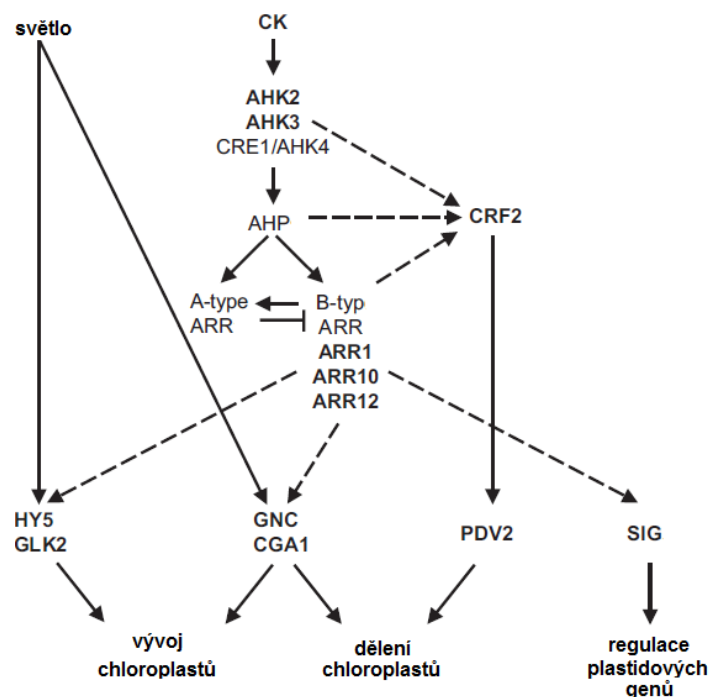


Obr. 3: Snímek buňky pšenice z elektronového mikroskopu zachycující ranou fázi de-etiolizace. PLB jsou prolamelární tělíska, T je již formovaná tylakoidní membrána (převzato a upraveno, Staehelin, 2003).

Cytokiny zasahují do vývoje a diferenciac chloroplastů na několika místech skrze transkripční faktory (Werner et Schmülling, 2009). Stimulační efekt cytokininů na tvorbu chloroplastů je závislý na intaktních prolamelárních těliscích a na stabilitě enzymů POR, která je ovlivňovaná právě cytokiny (Kusnetsov et al., 1998).

Během de-etiolizace CK podporují rozpad prolamelárních tělísek a formování vnitřní struktury chloroplastů, která je nezbytná pro jejich správnou funkci (Parthier, 1979; Chory et al., 1994). Efekt CK byl pozorován také u rostlin okurky (*Cucumis sativus*) ovlivněných cytokiny rostoucích na světle, ve kterých se vytvořil vyšší počet tylakoidů na granu (Farineau et Rousseaux, 1975).

Zajímavé je, že cytokiny mají také vliv na počet chloroplastů. V *A. thaliana* regulují jejich dělení skrze ovlivňování hladiny proteinu plastid division 2 (PDV2; Okazaki et al., 2009; Cortleven et Schmülling, 2015). Vliv CK na chloroplasty je shrnut v obr. 4.



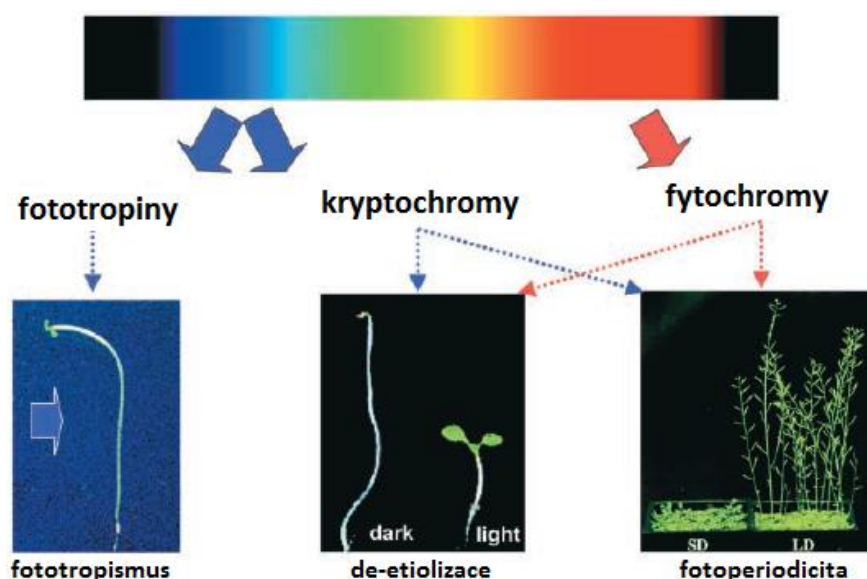
Obr. 4: Schéma popisující signální dráhy CK v *A. thaliana* vedoucí k ovlivnění chloroplastů skrze transkripční faktory (TF). Plnou čarou jsou vyznačeny experimentálně potvrzené kroky signální dráhy, přerušovanou čarou pak části signální dráhy, které zatím nejsou zcela jasné. Stimulace receptorů histidin protein kináz 2, 3 (*Arabidopsis* histidine kinases, AHK2, AHK3) či různých B-typů regulátorů jaderné odpovědi (*Arabidopsis* response regulators, ARR1, ARR10, ARR12) cytokininem vede k transdukci transkripčních faktorů a následně k ovlivnění vývoje či funkce chloroplastu. Není jasné, zda je cytokinin response faktor 2 (CRF2) zapojen do signální dráhy po ARR proteinech či zda je přímo aktivován boční cestou signální dráhy CK (Rashotte et al., 2006). Transkripční faktor elongated hypocotyl 5 (HY5) je zodpovědný za zelenání stonku indukované CK. Jeho funkce je podporována TF Golden2-like GLK2 (Kobayashi et al., 2012). Další TF gata, nitrate-inducible, carbon-metabolism involved (GCN) a GNC-like/cytokinin-responsive gata factor 1 (CGA1) regulují množství procesů vývoje chloroplastů a dělení plastidů (Richter et al., 2010; Köllmer et al., 2011; Chiang et al., 2012). Protein CRF2 zvyšuje množství proteinu plastid division 2 (PDV2) odpovědného za dělení plastidů (Okazaki et al., 2009). Sigma faktory (SIG) jsou nezbytné během veškeré odezvy chloroplastů na CK, jelikož obecně regulují rychlost transkripce (převzato a upraveno Cortleven et Schmülling, 2015).

Expresse mnoha jaderných i chloroplastových genů spojených s fotosyntézou je indukována současně světlem a cytokininy (jak napovídá výše uvedený obr. 4). Dnešní modely nasvědčují tomu, že signální dráhy světla a CK mohou být v určitých bodech propojeny, díky čemuž spouští obdobnou odpověď, například skrze ARR4 či fytochrom B (Chory et al., 1994; Hwang et Sheen 2001; Sweere et al., 2001).

2.3 Světlo

Světlo je část elektromagnetického záření v rozsahu vlnových délek přibližně 400-700 nm. Pro fotosyntetizující organismy má zásadní význam coby zdroj energie pro fotosyntézu v podobě fotosynteticky aktivního záření.

Světlo má vliv na růst a vývoj rostlin a podobně jako cytokininy se účastní morfogeneze a de-etiolizace. Regulace vývoje silně závisí na spektrální kvalitě i kvantitě, na směru a také periodicitě světla (Chen et al., 2004; Kami et al., 2010). Vnímání světla zprostředkovávají v rostlinách receptory zaznamenávající rozdílné vlnové délky spektra (Chen et al., 2004; obr 5).



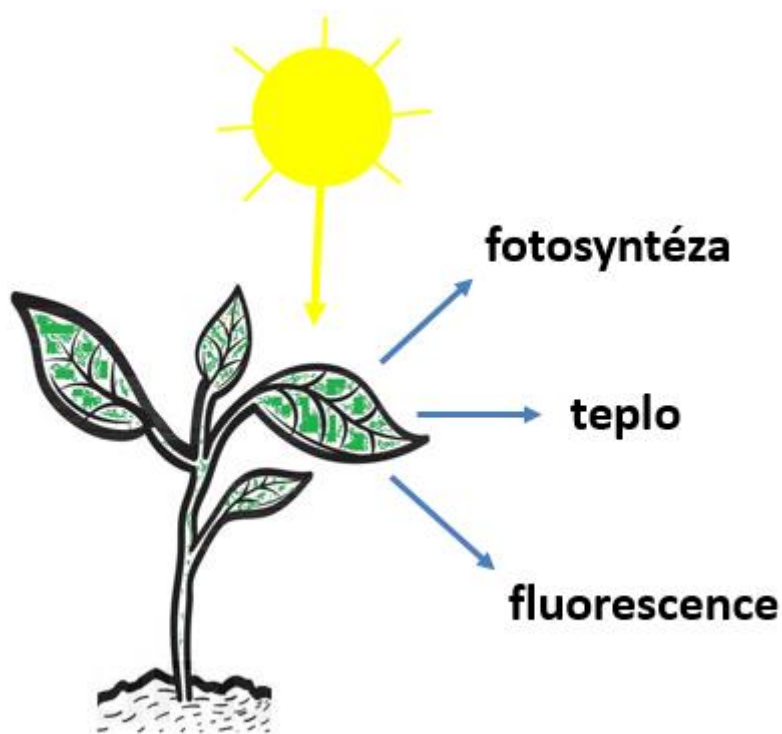
Obr 5: Shrnutí receptorů červeného a modrého světla a příklady fyziologické odpovědi (převzato a upraveno; Lin, 2002).

Za čítí vlnových délek odpovídajících modré barvě zodpovídají krytochromy, fototropiny a také zeaxantin. Krytochromy zprostředkovávají rovněž reakci na UV-A záření. Fytochromy jsou receptory červeného (Re, 660 nm) a dlouhovlnného červeného světla (FR, do 730 nm). Jsou funkční v podobě homodimerů, přičemž každá monomerní jednotka se skládá z části proteinové a k ní kovalentně vázané části chromoforové tvořené lineárním tetrapyrole. Tento tetrapyrol existuje ve dvou konformačních formách (P_{Re} a P_{FR}) a reaguje buď na Re či FR světlo (Quail, 1997). Existuje pět typů fytochromů PhyA – E (Mathews et Sharrock, 1997).

Fotoreceptory hrají důležitou roli v mnoha vývojových stádiích rostlin. Velmi podstatná je úloha fytochromů během de-etiolizace, při klíčení a při uhýbavé reakci během zastínění rostliny. Fytochrom PhyB zajišťuje supresi prodlužování hypokotylu po jeho osvětlení, díky degradaci s fytochromy interagujících transkripčních faktorů PIF4

a PIF5 (Quail, 2002; Lorrain et al., 2008). Kryptochromy společně s fototropiny regulují fotomorfogenetickou odpověď, včetně načasování kvetení a regulace prodlužování buněk (Lin, 2002).

Kapacita fotosyntetických reakčních center je limitována, proto nedochází k využití veškerého světla, které je absorbováno listem. Nezpracované světlo způsobuje produkci kyslíkových radikálů, které oxidují lipidy i proteiny tylakoidní membrány, včetně proteinů účastnících se fotosyntézy, což může mít pro rostlinu fatální následky. Protože rostliny na rozdíl od živočichů nemůžou reagovat na vysokou intenzitu světla změnou stanoviště, došlo u nich k vyvinutí fotoprotektivních mechanismů (Demmig-Adams et Adams, 1992). Část záření absorbovaného listem je použita k fotosyntéze, část je re-emitována ve formě fluorescence a část vyzářená v podobě tepla fotoprotektivními mechanismy (obr. 6).



Obr. 6: Schéma využití světelné energie po jejím absorbování listem.

2.4 Senescence

Senescenci můžeme definovat jako programovanou degradaci a degeneraci na úrovni buněk, pletiv, orgánů či celého organismu vedoucí ke smrti (Lim et al., 2007). Jedná se o komplexní a vysoce regulovaný proces zahrnující morfologické, fyziologické a biochemické změny stejně jako změny v genové expresi (Gan et Amasino, 1997; Smart, 1994; Zhang et Zhou, 2013).

Senescence mitotická je stav, kdy buňka již není schopná podstoupit další dělení z důvodu stáří (Jeyapalan et Sedivy, 2008). V případě rostlin hovoříme o post-mitotické senescenci. Příkladem, kdy dochází k zániku celého organismu, je senescence u rýže, kukuřice či obilovin. Nejznámější je senescence na úrovni orgánů, listová senescence, projevující se degradací chlorofylu a fascinujícím vybarvením podzimních listů opadavých dřevin (obr. 7; Whoo et al., 2013).

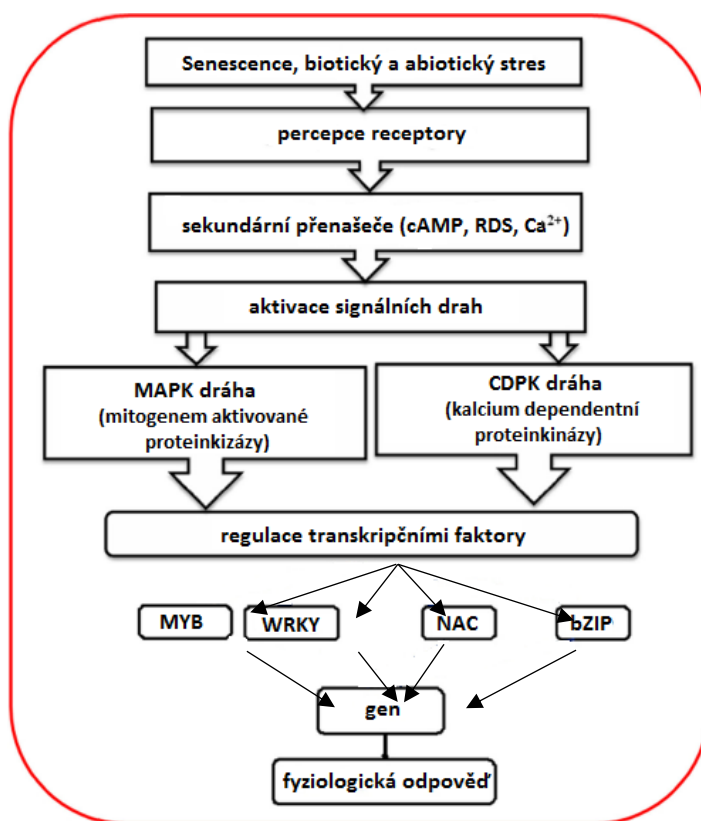


Obr. 7: Vybarvení podzimních listů opadavých dřevin jakožto projev senescence.

Během listové senescence dochází k rozsáhlým změnám buněčné struktury, metabolismu i genové exprese. Již od počátku senescence běží degradační procesy v chloroplastech, pro rostliny životně důležitých organelách obsahujících 70 % listových proteinů. Naproti tomu struktura jádra a mitochondrií se mění až ve finálním stádiu toho procesu. Degradace chloroplastů je nejvýraznější změnou buněčné struktury projevující se žloutnutím listů a poklesem aktivity fotosyntézy (Biswal et Biswal, 1988; Nooden et al., 1997). Dalšími projevy senescence jsou zvýšená peroxidace lipidů a vyšší propustnost membrán pro ionty, které jsou způsobeny zvýšenou produkcí kyslíkových radikálů (Leshem, 1988).

Změny metabolismu zahrnují zpomalení fixace uhlíku do makromolekul a rozsáhlé katabolické procesy rozkládající chlorofyl ale i makromolekuly jako proteiny, lipidy a ribonukleové kyseliny. Produkty rozkladných procesů jsou následně transportovány do jiných částí rostlinného těla, kde mohou sloužit jako stavební materiál či zdroj energie.

Se senescencí asociované geny (SAG) jsou skupinou genů, které společně s množstvím rozličných transkripčních faktorů zajišťují genovou regulaci senescence (Barth et al., 2006). Byly identifikovány u mnoha druhů rostlin a zasahují do syntézy široké škály proteinů zodpovědných za degradaci karbohydrátů, lipidů, proteinů a nukleových kyselin, jako jsou proteázy, lipázy, ribonukleázy, regulátory proteáz, malát syntáza, xantin dehydrogenáza, 1-amino cyklopronan-1-karboxyláza oxidáza, glutaminsyntetáza a další (Barth et al., 2006; Buchanan-Wollaston 1994). Model přenosu signálu během senescence shrnuje obr. 8.



Obr. 8: Dráha přenosu signálu během senescence rostlin. Vnější a vnitřní faktory jsou zaznamenány receptory, což vede k zesílení signálu a ke spuštění MAPK či CDPK signální dráhy. Transkripčními faktory (TF) regulují transkripci se senescencí asociovaných (SAG) genů, čtyři hlavní skupiny TF: MYB (myeloblastózní TF obsahující konzervovanou MYB DNA-vazebnou doménu), WRKY (pro rostliny specifický Zinc-finger typ TF obsahující specifickou WRKYGQK sekvenci aminokyselin), NAC (rodina TF účastnící se regulace vývoje orgánů a reakce na napadení patogeny) a bZIP (basic leucine zipper, rodina TF obsahující DNA vazebnou bZIP doménu). Transkripci SAG genů následuje fyziologická reakce s projevy senescence. (převzato a upraveno, Thakur et al., 2016).

Senescence je přirozený proces, který hraje důležitou roli v životním cyklu rostlin. Je nezbytný pro správnou formaci orgánů, ale také pro recyklaci živin. Pro zemědělskou produkci a zvyšování výnosu z polí v době neustále rostoucí potřeby potravin hraje pochopení tohoto procesu a možností jeho ovlivnění zásadní význam (Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim et al. 2007).

V dnešní době je známá celá řada faktorů ovlivňující senescenci rostlin. První skupinou jsou faktory vnitřní. Zde můžeme zahrnout věk a zdravotní stav rostliny, přítomnost kyslíkových radikálů, ale také produkci fytohormonů. Rostlinné hormony hrají v regulaci senescence velmi významnou roli. Expres genů asociovaných s různými fytohormony je během senescence pozměněná. Obecně můžeme účinek hormonů rozdělit na aktivační a inhibiční. Aplikace ethylenu, kyseliny abcisové (ABA) či kyseliny jasmonové vede k urychlení senescence. Cytokiny jsou považovány za fytohormony senescenci oddalující (Thomas et Stoddart 1980; Thakur et al., 2016).

Vnější, environmentální faktory ovlivňující senescenci můžeme rozdělit na abiotické a biotické. Mezi abiotické zařadíme nedostatek vláhy, vysoké či nízké teploty, limitaci v množství živin, oxidativní stres způsobený UV-B radiací, nadměrné množství světla, zasolení půdy a další. Mezi faktory biotické řadíme napadení patogenem či nedostatek světla způsobený stíněním jinou rostlinou (Lim et al., 2003).

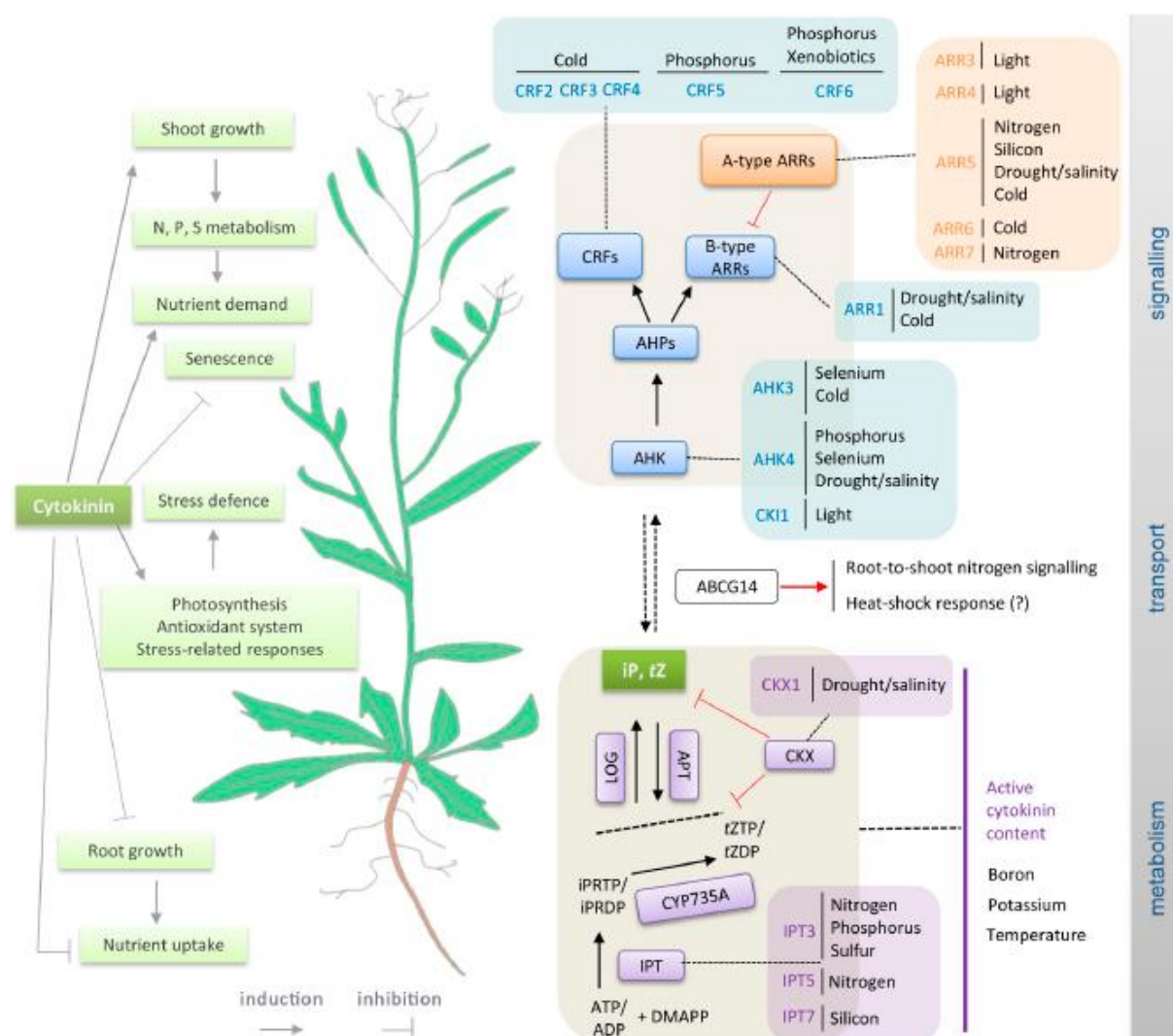
2.4.1 Vliv cytokininů na senescenci rostlin

Cytokiny jsou po dlouhou dobu známy jako senescenci oddalující hormony. Během senescence dochází k poklesu hladin CK a exogenní aplikace CK či endogenní zvýšení produkce CK, například užitím pro senescenci specifického SAG12 promotoru, vedou k oddálení listové senescence (Gan et Amasino, 1995). Molekulární analýzy prokázaly, že během senescence dochází ke snížení exprese proteinů zapojených v biosyntéze CK jako jsou enzymy IPT při současném zvýšení produkce enzymů CKX odpovědných za degradaci CK (Buchanan-Wollaston et al., 2005). Regulaci senescence zajišťují CK převážně skrze receptory AHK3 ve spojení s fosforylací vedoucí k aktivaci proteinů ARR2 typu B (Riefler et al., 2006).

Hormony jsou látky, které vyvolávají biologické účinky již ve velmi nízkých koncentracích. Při exogenní aplikaci nízké koncentrace CK jsou pozorovány pozitivní účinky na oddálení senescence. Dochází ke zpomalení degradace chlorofylu (Selivankina et al., 2001) a nesnižuje se propustnost membrán (Kraus et al., 1993). Téměř opačný efekt nastává při aplikaci vysokých koncentrací CK. Pojem vysoká koncentrace je v tomto

případě relativní, závisí na druhu rostliny a dalších faktorech. Ku příkladu ošetření suspenzní kultury tabáku hormony iP a BAP v koncentracích 30 μM vedlo k usmrcení buněk apoptózou (Mlejnek et Procházka, 2002; Mlejnek et al., 2003). Urychlení senescence při užití vysoké koncentrace CK byl pozorován v mnoha studiích. Přesný mechanismus účinku není bohužel dodnes znám.

V běžném životě rostliny vede ke spuštění senescence málokdy jediný faktor. Vliv abiotického stresu a CK na rostlinu shrnuje obr. 9.

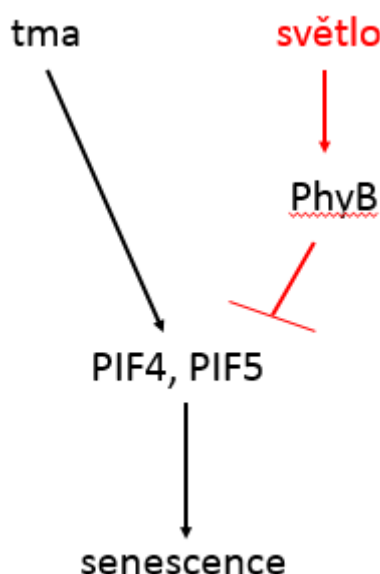


Obr. 9: Vliv abiotického stresu na signalizaci, transport a metabolismus CK vedoucích k rozdílné fyziologické odpovědi rostliny *A. thaliana*. Izopentenyltransferázy (IPT), LONELY GUY (LOG), adeninfosforibosyltransferázy (APT), cytokinin dehydrogenázy/oxidázy (CKX), protein ABC transportér rodiny G člen 14 (ABCG14), histidin protein kinázy (Arabidopsis histidine kinases AHK), histidin fosfotransférové proteiny (Arabidopsis histidine kinases, AHP), regulátory jaderné odpovědi (Arabidopsis response regulators, ARR) typu A nebo B, cytokinin response factors (CRF; převzato a upraveno, Pavlů et al., 2018).

2.4.2 Vliv světla na senescenci rostlin

V předchozích kapitolách bylo shrnuto, že rostliny potřebují světlo jak pro fotosyntézu, tak pro správný růst a vývoj. Jedná se tedy o důležitý zdroj energie a současně o důležitý signál.

Senescence je ovlivňována převážně červeným a dlouhovlnným červeným světlem, jejichž čítí zprostředkovávají fytochromy (Fankhauser, 2001). Zahájení senescence bylo pozorováno ve tmě za účasti s fytochromy interagujících transkripčních faktorů PIF4 a PIF5 (Sakuraba et al, 2014). Naopak při osvětlení rostliny dochází k zastavení senescence aktivitou PhyB receptorů, které inhibují TF PIF4 a PIF5 (obr. 10). Zároveň jsou aktivní transkripční faktory ELF3 (early flowering; brzké kvetení).



Obr. 10: Zapojení fytochromů PhyB a světla v regulaci senescence skrze TF PIF4 a PIF5.

Transkripční faktory PIF4 a PIF5 jsou dokonce zapojeny v signálních drahách hlavních senescenci aktivujících hormonů ethylenu a kyseliny absicové, kdy aktivní PIF4 a PIF5 přímo aktivují expresi s ethylenem spojeného TF EIN3 a s ABA-spojeného TF ABI5. Transkripční faktory PIF4, PIF5, EIN3 a ABI5 dále přímo aktivují expresi hlavní skupiny TF spojených se senescencí, faktorů rodiny NAC (Sharma et Agarwal, 2019).

Na listy, které jsou částečně zastíněné, protože rostou na spodní části stonku, nedopadá jen světlo o nižší intenzitě, ale zároveň světlo o vyšší vlnové délce (Dietzel et Pfannschmid, 2008). Markantní je obohacení o FR světlo u rostlin rostoucích v lese ve stínu stromů. Studie s mutanty v genu pro PhyA naznačují, že tento fytochrom se nepřímo podílí na inhibici senescence při růstu v polostínu (Brouwer et al., 2014).

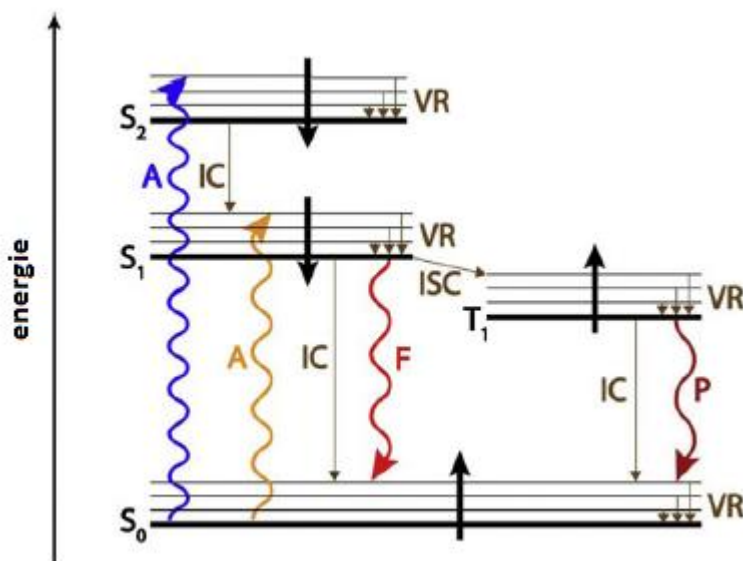
Vystavení rostliny světlu o vysoké intenzitě může rovněž vést ke spouštění senescence, zejména kvůli nadprodukci nebezpečných kyslíkových radikálů.

2.5 Užité experimentální metody

2.5.1 Indukovaná fluorescence chlorofylu a

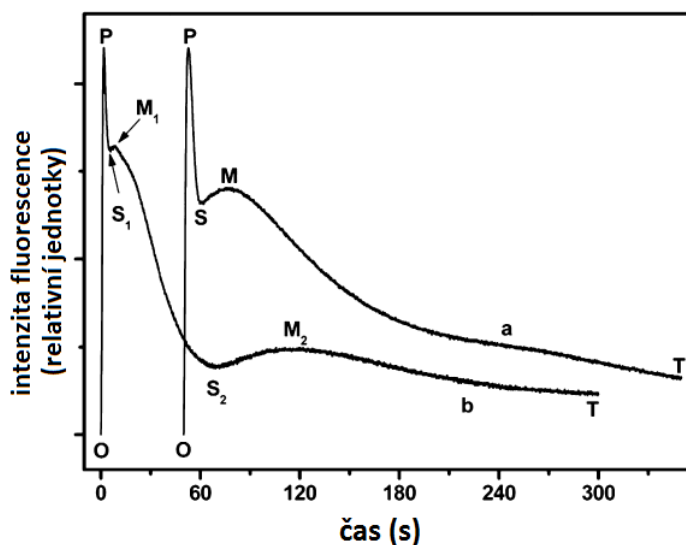
Měření indukované fluorescence chlorofylu a (IFCH) je jednou z nejčastěji používaných moderních biofyzikálních technik ve výzkumu fotosyntézy. Poprvé byla popsána Kautskym a Hirschem v roce 1931. Jedná se o nedestruktivní, neinvazivní, relativně levnou a snadnou metodu, která nám poskytuje velké množství informací jak o aktivitě fotosyntetického aparátu, tak o celkovém zdravotním stavu rostliny, který je do značné části jejím odrazem. Hojně je užívána také k fenotypizaci rostlin (Lazár, 1999).

Po absorbování energie světelného kvanta chlorofylem dojde k excitaci elektronu (obr. 11). Excitované elektrony mohou být použity jako hnací síla fotosyntézy (fotochemické zhášení, qP). Druhou možností je vyzáření přebytečné energie ve formě fluorescence. K tomu dochází pouze v 3-5 % případů. Třetí možností je vyzáření energie ve formě tepla (nefotochemické zhášení, NPQ). Tyto tři procesy jsou ve vzájemné kompetici a nárůst v jednom parametru vede k poklesu v ostatních (Lazár, 2014).



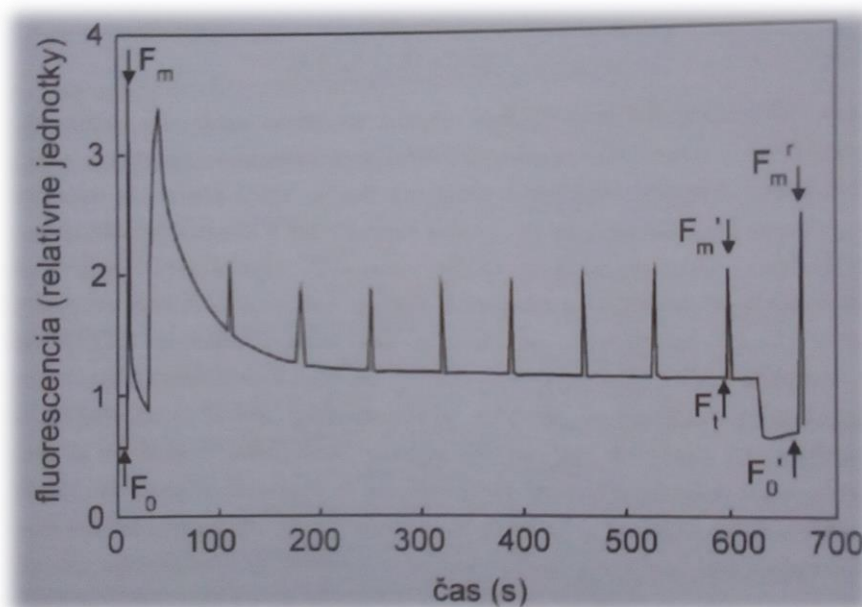
Obr. 11: Jablonského diagram popisující energetické hladiny molekuly chlorofylu. Silné horizontální linie představují energetické hladiny, tenké linie pak vibrační hladiny. S_0 je základní energetický stav. Po absorbování (A) světla rozdílných vlnových délek (kratší s vyšší energií – modrá šipka, delší s nižší energií – oranžová šipka) dojde k excitaci molekuly a k přenosu elektronu na vyšší energetickou hladinu (S_1 , S_2). Zpět do základního stavu se molekula dostane po několika nanosekundách ztrátou energie, buď fluorescencí (F) z S_1 do S_0 nebo fosforescencí (P) z tripletního excitovaného stavu T_1 do S_0 . Tenké vertikální šipky představují neradiativní tranzice jako vibrační relaxaci (VR), interní konverzi (IC) nebo inter-system crossing (ISC), které představují ztrátu energie konverzí na teplo (převzato, Lazar, 2014).

Průběh IFCH se skládá ze dvou fází. V první rychlé fázi dochází k vzestupu intenzity fluorescence, následně ve druhé pomalé fázi k jejímu pozvolnému poklesu přes jedno či dvě lokální maxima a minima do ustáleného stavu (obr. 12; Kautsky et Hirsch, 1931).



Obr. 12: Křivka popisující jednotlivé fáze indukované fluorescence chlorofylu a (IFCH) při měření listů hrachu adaptovaných na tmu (převzato, Lazár, 1999).

Rozlišujeme dva typy měření IFCH. Prvním je měření vzestupu fluorescence s vysokým časovým rozlišením při vysoké intenzitě excitačního světla. Druhým je pak dlouhé měření celého průběhu IFCH při použití excitačního světla o různých intenzitách (analýza zhášení, obr. 13; Lazár, 2014).



Obr. 13: Typický průběh zhášecí analýzy indukované fluorescence chlorofylu a (IFCH) na rostlinném materiálu adaptovaném na tmu (převzato, Pavlovič et Slovákova, 2015).

Při zatemnění listu (20-30 minut) dochází k úplnému otevření reakčních center fotosystémů, k oxidaci všech molekul plastochinonu v elektronovém transportním řetězci a k emisi minimální fluorescence (F_0). Minimální fluorescence může být měřena při nízké intenzitě excitačního světla okolo $0,1 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR.

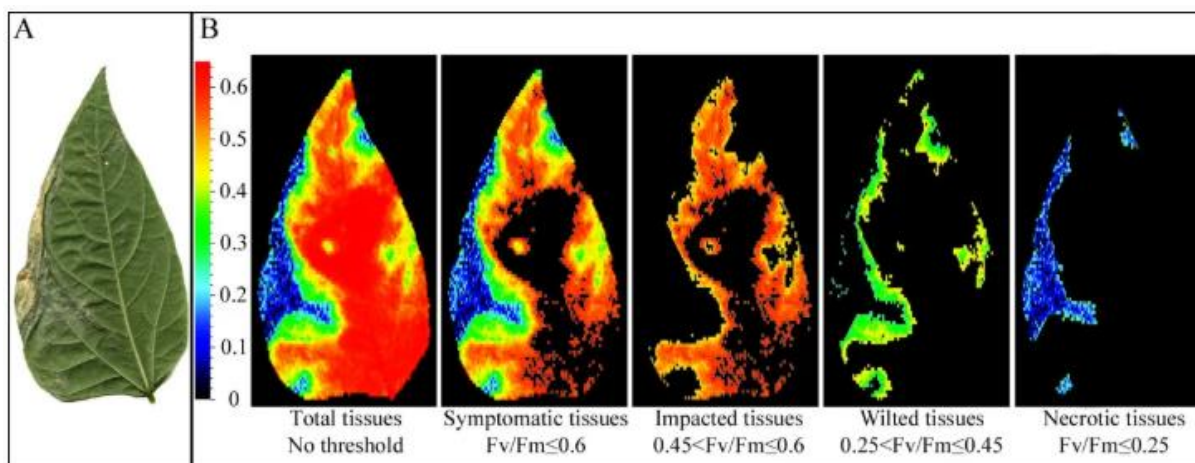
Při osvětlení listu jsou redukovány molekuly plastochinonu. Při naplnění kapacity fotosystémů dochází k zavření funkčních reakčních center, zásoba plastochinonů je v redukovaném stavu, neschopna přijímat další elektrony. Energie je vyzářena formou maximální fluorescence F_m . Maximální fluorescence je měřena při vysoké intenzitě excitačních pulzů (několik tisíc $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR) po dobu asi jedné sekundy.

Získané parametry mohou být využity k výpočtu variabilní fluorescence (F_v) dle vztahu $F_v = F_m - F_0$ a také maximálního kvantového výtěžku fotochemické reakce fotosystému II (F_v/F_m) dle vztahu $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$. Tento parametr výborně koreluje s kvantovým výtěžkem produkce kyslíku a je užíván jako indikátor přítomnosti stresu na úrovni PSII, který se projevuje poklesem pod hodnotu 0,83 (což je maximum parametru F_v/F_m).

Důležitým je, že analýza zhášení fluorescence dokáže rozlišit NPQ od qP. Oba tyto procesy pomáhají minimalizovat tvorbu tripletu excitované molekuly chlorofylu, která dává po reakci s kyslíkem vzniku singletnímu kyslíku, nesmírně reaktivní formě ROS. Po počátečním rychlém nárůstu fluorescence dochází k jejímu poklesu na ustálenou hodnotu (F_t), která je dána právě zhášecími reakcemi. Míru NPQ můžeme stanovit po změření maximální fluorescence chlorofylu ve stavu adaptovaném na světlo (F_m') výpočtem ze vztahu $NPQ = (F_m' - F_t)/F_m'$. Poslední hodnotou, kterou z měření získáváme je minimální fluorescence chlorofylu ve stavu adaptovaném na světlo (F_0'), která bývá využívána ke stanovení qP dle vztahu $qP = (F_m' - F_t)/(F_m' - F_0')$.

Nejpoužívanějším parametrem je efektivní kvantový výtěžek fotosystému II (ϕ_{PSII}), který odráží kolik absorbovaného světla je využito pro fotochemické reakce a koreluje s rychlostí fotosyntézy. Získáváme jej výpočtem $\phi_{PSII} = (F_m' - F_t)/F_m'$. Vhodné je také použití parametrů ϕ_{NPQ} a $\phi_{f,D}$, neboť platí vztah $\phi_{PSII} + \phi_{NPQ} + \phi_{f,D} = 1$. Hodnota $\phi_{f,D}$ vyjadřuje množství bazálního neregulovaného nefotochemického zhášení fluorescence daného přeměnou na tepelnou energii. Hodnotu získáme výpočtem $\phi_{f,D} = F_t/F_m'$. Parametr ϕ_{NPQ} dává informaci o množství regulovaného, světlem indukovaného nefotochemického zhášení. Výpočet je dán vztahem $\phi_{NPQ} = F_t/F_m' - F_t/F_m$. (Lazár, 2014; Pavlovič et Slovákova, 2015).

V této práci bylo použito měření zhášecí kinetiky pomocí přístroje FluorCam. Přístroj se skládá ze zdrojů světla, které vydávají záření definované intenzity, detektoru fluorescence, kterým je citlivá CCD kamera, a softwaru, který umožňuje analýzu naměřených dat. Díky informaci o prostorových souřadnicích fluorescence metoda umožňuje 2D záznam heterogenity signálu. Tím získáváme vizuální představu o velikosti měřených parametrů a jejich distribuci v rámci orgánu (listu; obr. 14) či organismu (celé rostliny).



Obr. 14: Příklad využití záznamu chlorofylové fluorescence k vizualizaci poškození listu fazole patogenem. A – obraz napadeného listu pořízený skenerem. B – sada snímků pořízených přístrojem FluorCam představující distribuci hodnot parametru F_v/F_m (převzato; Rousseau et al, 2013).

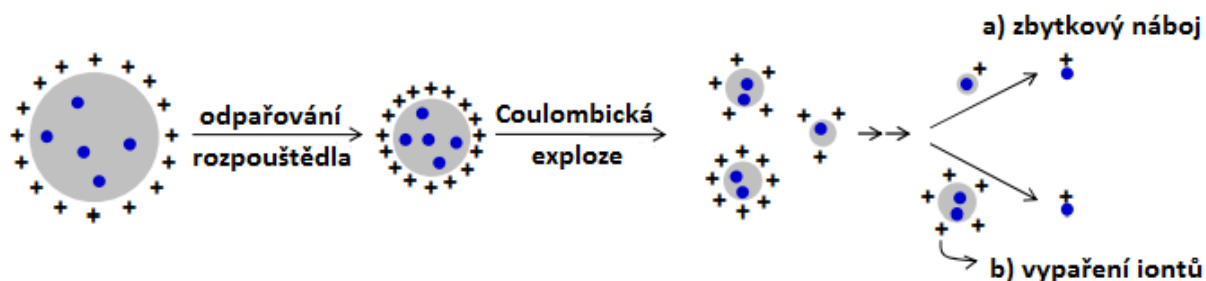
2.5.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) je jednou z nejužívanějších technik detekce v analytické chemii. Má rovněž široké uplatnění v biologických vědách, toxikologii, analýzách kvality životního prostředí a podobně. Je založena na stanovení měrné hmotnosti tedy poměru hmotnosti a náboje (m/z) iontů. Při znalosti počtu nábojů měřené molekuly nám umožňuje určit velmi přesnou hmotnost a z toho i elementární složení analytu. Využívá speciální přístroje, hmotnostní spektrometry.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí. Jak vyplívá ze základního principu, měřit je možné pouze molekuly nesoucí náboj. První částí přístroje je proto iontový zdroj, který ionizuje molekuly vzorku. Rozlišujeme dva základní typy ionizací, a to tvrdé a měkké. Tvrdá ionizace je historicky starším typem. Je nevhodná pro analýzu makromolekul jako DNA či proteinů, protože dochází k přerušení vazeb a ke ztrátě informace o primární struktuře těchto biopolymerů. Obecně jsou v hojnější míře užívány ionizace měkké, zvláště pak ionizace elektrosprejem (ESI). Její výhodou je možnost

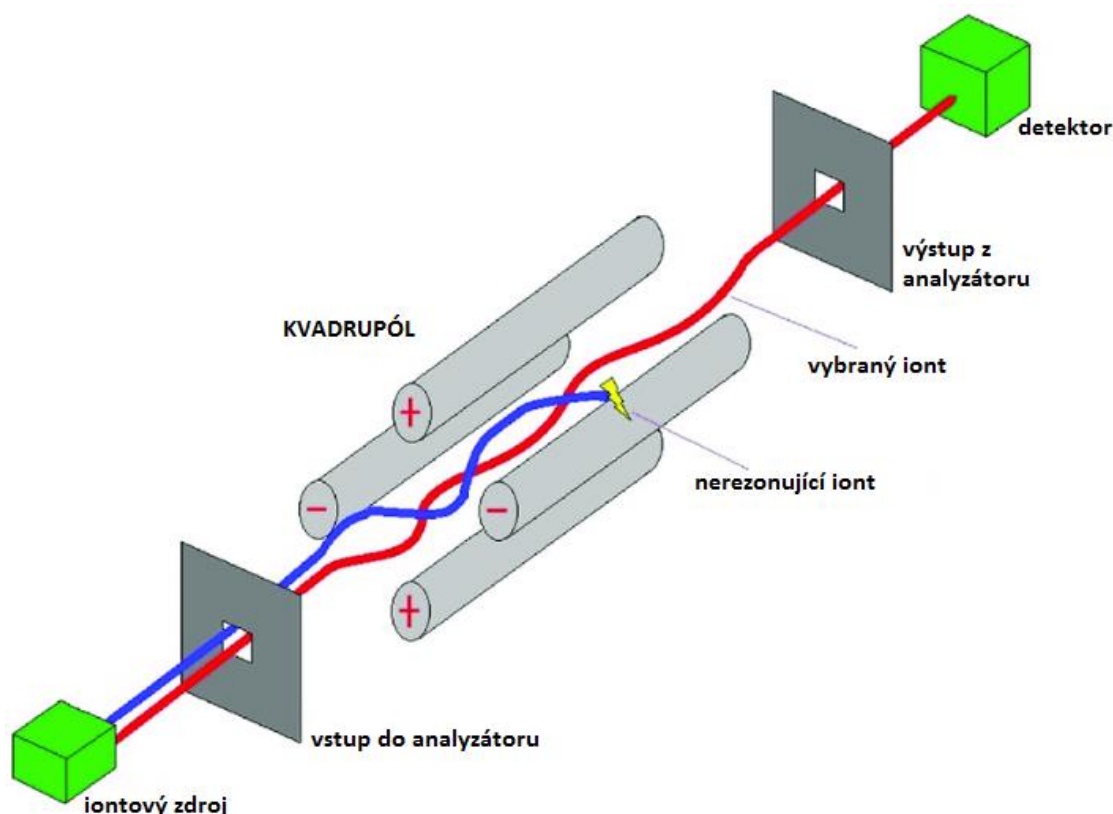
propojení se separační technikami jako vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) či kapilární elektroforézou. Zvláště on-line spojení UHPLC s MS detekcí je velmi citlivé a hojně užívané.

Vzorek je přiváděn do systému v kapalné matrici kapilárou, na kterou je vkládáno vysoké napětí. Kapilára ústí hrotem, kde vlivem vysokého napětí dochází k akumulaci náboje. Do tekutiny je zaváděn inertní plyn (často dusík). Dochází ke vzniku spreje z na povrchu nabitých kapiček obsahujících matrici a analyty. Z kapiček se odpařuje tekutina, což vede ke zvyšování povrchového náboje až se překročí mez (Rayleighův limit) a dojde ke Coulombické explozi. Tím se kapička zmenšuje, dochází k úplnému vypaření matrice a náboj se akumuluje na molekulách analytu, které jsou vedeny do další části hmotnostního spektrometru (obr. 14).



Obr. 14: Převedení molekul analytu z kapalné fáze na ionty v plynné fázi při ESI (převzato a upraveno, Verplaetse et Tytgat, 2011).

Analyzátor je druhou částí hmotnostního spektrometru. Analyzátor nám umožňuje separovat ionty dle jejich hmotnosti či poměru m/z , poté je propustit na detektor. Rozlišujeme celou řadu analyzátorů. Častým typem je kvadrupól, který využívá stabilitu v trajektorii letu iontů v oscilujícím elektrickém poli. Nastavením kvadrupólu (podmínky) nám umožňuje propustit na detektor jen analyty o určité m/z (obr. 15). Běžné jsou také iontové pasti či analyzátory doby letu. Analyzátory doby letu (time of flight, TOF) využívají rozdílné rychlosti letu iontů o vysoké či malé molekulové hmotnosti v elektrickém poli.



Obr. 15: Schéma hmotnostního spektrometru obsahujícího analyzátor kvadrupól umožňující propuštění určitého ionu na detektor (převzato a upraveno, Santoiemma, 2018).

Časté je zapojení více analyzátorů v tandemu. To umožňuje kombinace vlastností více analyzátorů dle typu stanovovaných analytů. Možné je rovněž využití kolizní cely. Jedná se o analyzátor (často kvadrupól či iontová past) naplněný kolizním plynem. Srážka molekuly plynu s molekulou analytu způsobí její fragmentaci. K fragmentaci mohou být na prvním analyzátoru vybrány ionty splňující jistou podmínku či mohou být z kolizní cely dále propuštěny jen určité charakteristické fragmenty. Díky tomu získáváme velké množství informací o analytech a můžeme detailně analyzovat i komplexní vzorky.

Třetí částí přístroje je detektor. Nejčastěji se jedná o násobiče, které využívají efekt násobení elektronů po dopadu iontu analytu na dynodu (Hoffmann et Stroobant 2007).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a chemikálie

Semena ječmene setého kultivar Golden promise wild type a semena s overexpresí cytozolárních CKX1 enzymů (cytAtCKX1 B2/3 a cytAtCKX P2/5, dále jen jako linie C3 a linie C5) a vakuolárních CKX1 enzymů (vAtCKX1 B6 a vAtCKX1 F dále jen jako linie VF a VB) byla poskytnuta paní doktorkou Veronique H  lene Bergougnoux-Fojtik z Odd  len   molekul  rn   biologie, Centrum regionu Han   pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Olomouc,   esk   republika. Tyto transgenních rostliny byly využity v práci Vojta et al., 2016.

Hoaglandův   ivn  y roztok: 1500 μ M dusičnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo), 1000 μ M tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Sigma-Aldrich, Německo), 500 μ M dihydrogenfosforečnan amonný (Sigma-Aldrich, Německo), 250 μ M heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich, Německo), 50 μ M chlorid draselný (Sigma-Aldrich, Německo), 2 μ M síran manganatý (Sigma-Aldrich, Německo), 2 μ M heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich, Německo), 0,5 μ M pentahydrát síranu m  d  nat  ho (Sigma-Aldrich, Německo), 0,5 μ M tetrahydrát heptamolybdenanu hexaamonného (Sigma-Aldrich, Německo), 12,5 μ M kyselina borit   (Sigma-Aldrich, Německo) a 20 μ M chelát železa (FeEDTA; Sigma-Aldrich, Německo), destilovan   voda.

Perlit (Perlit s.r.o.,   esk   republika), ethanol (Sigma-Aldrich, Německo), tekutý dusík, methanol (Merck KGaA, Německo), kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo), interní standard cytokininů (Labora  r růstových regulátorů Univerzity Palackého, Olomouc,   esk   republika), Oasis MCX (30 mg/1 ml; Waters, USA), kyselina dusi  n   (69,0%; VWR Chemicals S. A. S., Francie), hydroxid amonný (25%; Merck KGaA, Německo), redestilovan   voda z Millipore Simplicity, Micro spin filter (0,2 μ M), Micro insert (0,1 ml, 28x6 mm), DMSO (Sigma-Aldrich, Německo), 6-benzylaminopurin (BAP; Labora  r růstových regulátorů, UP Olomouc,   esk   republika), buničina, aceton (Sigma-Aldrich, Německo), led, uhličitan hořečnatý (Sigma-Aldrich, Německo). Modifikovaný Bielesekeho roztok (60% methanol + 10% kyselina mravenčí + 30% destilovan   voda). 0,35M roztok hydroxidu amonného – eluční roztok pro nukleotidovou frakci (25 ml/l hydroxidu amonného + 975 ml/l destilovan   vody). 0,35 M roztok hydroxidu amonného v 60% methanolu – eluční roztok pro frakci bází a O-glukosidů (25 ml/l hydroxidu amonného + 600 ml/l methanolu + 375 ml/l redestilovan   vody).

3.2 Přístrojové vybavení

Fytokomora AR-100L3 (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA), Algaetron (PSI, Brno, Česká republika); kulový mlýnek MM301 (Retsch & Co. KG, Německo), analytické váhy (Sartorius Weighing Technology GmbH, Německo), sonifikační lázeň Transsonic T310 (ELMA Schmidbauer GmbH, Německo), laboratorní rotátor Stuart SB3-BB Scientific (Keison Products Velká Británie), Millipore Simplicity purifikační systém vody (Millipore Corp, USA), centrifuga Avanti 30 (Beckman Coulter, USA), minicentrifuga, Acquity UPLC® I-class systém (Waters, USA) včetně Binary solvent manager a Sample manager spojený s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, Velká Británie) vybavený ionizací elektrosprejem ESI, UHPLC kolony s reverzní fází Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (1,7 μm ; 2,1 x 150 mm; Waters, USA), vakuová rotační odparka Trigon-plus RCT1010 (Thermo Fisher Scientific, USA), zobrazovací metoda měření indukované fluorescence chlorofylu FluorCam 700 MF (PSI, Brno, Česká republika), chlorofylmetr SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko), Li-Cor (LI-COR Biosciences GmbH, Německo), měření velmi rychlých změn v indukované fluorescenci chlorofylu Plant Efficiency Analyser PEA (Hasnatech, King's Lynn, Anglie), spektrofotometr Unicam UV550 (ThermoSpectronic, Velká Británie).

3.3 Experimentální metody

3.3.1 Výsadba rostlinného materiálu

Pro výběr vhodného stáří a typu rostliny bylo vysazeno pět variant rostlin ječmene (WT, C3, C5, VF, VB). Květináče o rozměrech 8x8x8 cm byly naplněny do 3/4 perlitem. Na vrstvu perlitu byla pokladena semena ječmene setého, vždy patnáct semen na jeden květináč pro termín sklizně 8, 11 a 14 dní, pro termíny pozdější pak po devíti semenech/květináč. Pro každou variantu bylo vysazeno 90 rostlin. Semena byla překryta asi 2 cm vrstvou perlitu. Květináče byly umístěny na podtácek naplněný standardním Hoaglandovým živným roztokem a vloženy do fytokomory. Živný roztok byl doléván podle potřeby tak, aby byl perlit neustále vlhký (přibližně co 2 dny).

Rostliny byly pěstovány při světelném režimu 16 h světlo, 8 h tma; intenzita světla 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; vlhkost vzduchu 60 %; teplota 21 °C) po dobu 8, 11, 14, 21 a 28 dní.

Na základě výsledků měření obsahů cytokininů byly pro senescenční testy zvoleny osmi denní rostliny, které byly vysazeny a pěstovány stejným způsobem (90 rostlin určité varianty).

3.3.2 Stanovení obsahu cytokininů v transgenních liniích ječmene

Z rostlin ječmene byly v různé termíny (8, 11, 14, 21 a 28 dní) odděleny primární (pro 8 a 11 dní) nebo sekundární listy (ostatní termíny). Z primárních listů byly žiletkou odděleny 4 cm segmenty. Pro sekundární listy byla použita asi 7 cm horní část listu. Pro vytvoření jednoho vzorku (biologického replikátu) byly použity 3 až 4 listy.

Oddělené listy (3-4) byly rozetřeny na tekutém dusíku v třecí misce, přeneseny do 2 ml mikrozkušavky a zváženy na analytických vahách. Hmotnost byla zaznamenána (okolo 80 mg). Vzorek byl přenesen do tekutého dusíku a poté uskladněn při -80°C. Pro každý genotyp rostlin byly v každý termín odebrány 3 biologické replikáty.

Po nasbírání vzorků ve všech termínech, byl každý biologický replikát rozvážen na tři technické replikáty tak, aby každý obsahoval minimálně 20 mg rostlinného materiálu, přesné hmotnosti byly zaznamenány.

Pro extrakci cytokininů byl využit standardní postup. Ke každému technickému replikátu bylo přidáno 500 µl extrakčního roztoku (modifikovaný Bielského roztok), 3 homogenizační kuličky a 20 µl standardu CK. Vzorek byl krátce zvortexován, poté 3 minuty homogenizován na kulovém mlýnku při 27 Hz a 3 minuty sonifikován, aby došlo k úplnému rozbití rostlinných buněk. Extrakce CK probíhala 30 minut ve 4 °C při pomalém otáčení mikrozkušavek (15 RPM). Před přečištěním byly vzorky centrifugovány 15 minut při 20 000 RPM, 4 °C. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a naředěn přidáním 2 ml 1M kyseliny mravenčí.

Přečištění CK extraktu probíhalo na iontově výměnném sorbentu. V Bielského extrakčním roztoku s kyselým pH nabývají CK kladného náboje. Při použití kationtové výměnné chromatografie dojde k interakci CK se stacionární fází (MCX) a k odstranění ostatních složek extraktu.

Chromatografická kolona byla aktivována promýváním po 2x 1 ml methanolu, destilované vody, 50% kyseliny dusičné, destilované vody a 1 ml kyseliny mravenčí. Poté byl po 1 ml nanesen celý vzorek, který byl následně pomýván po 1 ml 1M kyseliny mravenčí a 100% methanolem. Eluce nukleotidů CK proběhla 1 ml 0,35 M hydroxidu sodného, eluce

bází CK poté 1 ml 0,35 M hydroxidu sodného v 60% methanolu. Elulát byl přenesen na odparku, kde došlo k úplnému odpaření tekutin.

Těsně před analýzou došlo k rozpuštění CK ve 40 ml 10% methanolu, 5 minutové sonifikaci, krátkému zvortexování. Vzorek byl přenesen na 0,2 µm Micro spin filtr, který byl centrifugován 5 minut při 7 500 RPM. Vzorek byl přenesen do inzertu ve vialce a připraven k UHPLC-MS/MS analýze.

Měření probíhalo na Acquity UPLC® I-class systém (Waters, Milford, MA, USA) včetně Binary solvent manager a Sample manager spojený s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem Xevo™ TQ-S MS (Waters MS Technologies, Manchester, UK) vybavený ionizací elektrosprejem ESI. Data byla zpracována MassLynx™ softwarem s TargetLynx™ programem (verze 4.2., Waters, Milford, MA, USA). Pro UHPLC separaci použity kolony s reverzní fází Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (1,7 µm; 2,1 x 150 mm).

Separace na koloně probíhala v gradientu methanolu (A) a 15mM mravenčanu amonném (B; pH 3,95) následovně: 0 min, 5:95 (A:B) – 4 min isokratická eluce, 5:95 (A:B) – 10 min lineární gradient, 20:80 (A:B) – 15 min lineární gradient, 50:50 (A:B) – 15.50 min, 99:1 (A:B) – 16.00 min 99:1 (A:B) – 16.50 min, 5:95 (A:B) – 17.00 min, 5:95 (A:B). Průtok činil 0,4 ml/min a teplota kolony 55 °C. Měření probíhalo v kladném módu ESI+.

Sledovány byly retenční časy separovaných CK ve 4 MRM (MRM – multiple reaction monitoring) oknech: 6.00 – 10.30 minut, 10.30 – 12.60 minut, 12.60 – 13.80 minut, 13.80 – 15.20 minut.

Parametry pro analýzu byly nastaveny následovně: teplota zdroje 150 °C; teplota desolvatačního plynu 600 °C; průtok desolvatačního plynu 600 l/h; napětí v kapiláře 0,75 kV (Novák et al., 2008). Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí software MassLynx (Target Lynx) metodou standardního izotopového ředění.

3.3.3 Výběr linie ječmene pro senescenční testy

Po analýze dat získaných z LC-MS měření obsahu CK byla vybrána linie s nejnižším obsahem aktivních forem CK, linie VB. S touto linií transgenního ječmene společně s ječmenem WT coby kontrolou byly provedeny senescenční testy.

3.3.4 Senescenční testy

Byly připraveny roztoky BAP v 0,5% DMSO o koncentracích 0, 1, 10, 100 a 300 μM . Do mikrotitrační 96 jamkové destičky bylo předloženo 300 μl jednotlivých roztoků (tab. 1).

Tab. 1: rozložení roztoků pro senescenční testy v 96 jamkové mikrotitrační destičce.

řádek	roztok číslo	koncentrace BAP [μM]
1	0	0
2	-	-
3	1	1
4	-	-
5	2	10
6	-	-
7	3	100
8	4	300

Z rostlin WT a VB byly odděleny primární listy. Z nich byly skalpelem odděleny 4 cm segmenty, které byly umístěny řezem do roztoku v příslušní jamce. Vznikly dvě mikrotitrační destičky s listy jedna pro WT a jedna pro VB.

Připravené destičky s listy byly vloženy na navlhčenou buničinu, které bránila vysušení do plastové nádoby. Nádoba byla vložena do igelitového pytle.

Senescenční testy probíhaly při pěstební intenzitě světla ($100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a na světle o 4x vyšší intenzitě ($400 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) vždy po dobu čtyř dní.

V první den senescenčního testu byly také odděleny kontrolní listy, u kterých byla změřena fluorescence chlorofylu a přístrojem FluorCam a rovněž koncentrace chlorofylu přístrojem SPAD a analyticky, stejně jako u listů po senescenčním testu.

3.3.5 Určení koncentrace chlorofylu

U kontrol stejně jako u listů po senescenčním testu byl měřen obsah chlorofylu. Chlorofylmetr SPAD-502 slouží pro rychlou a nedestruktivní analýzu obsahu chlorofylu

v listu. Každý 4 cm segment listu byl zatemněn a následně ponechám minimálně 10 minut při pokojové teplotě a běžném osvětlení. Následně byla změřena na 7 místech transmitance listu při 650 nm a 940 nm. Ze získaných 7 hodnot byl vypočítán průměr, který představoval relativní hodnotu obsahu chlorofylu. Výpočet obsahu chlorofylu (M) byl stanoven dle vzorce

$$M = \log\left(\frac{I'_{940}}{I'_{650}}\right) / \frac{I_{940}}{I_{650}}, \text{ kde } I' \text{ jsou hodnoty transmitance měřené bez vloženého listu, } I \text{ je}$$

změřená transmitance vloženého listu.

Stanovení je velmi rychlé a jednoduché, avšak jsou známy interferující látky (např. antokyany), které mohou měření ovlivňovat. Proto bylo měření doplněno analytickým stanovením obsahu chlorofylu, které je časově i technicky náročnější, avšak poskytuje přesnější výsledky.

Každý list byl obkreslen na fólii, díky čemuž bylo možné stanovit jeho plochu (program Image Analyser) a následně zamrazen v tekutém dusíku a uschován v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby nedošlo k degradaci barviv.

Každý list byl společně s malým množstvím uhličitanu hořečnatého rozmělněn v třecí misce. Následně byl přidán jeden ml 80% acetonu a přenesen do mikrozkušavky. Třecí miska a tlouček byly vymyty druhým ml 80% acetonu, který byl rovněž přenesen do stejné mikrozkušavky. Vzorky byly 10 minut centrifugovány při 4 000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby došlo k oddělení extraktu barviv od pevných částí buněk. Extrakt byl přenesen do skleněné zkumavky a naředěn tak, aby absorbance vzorku při 663,2 nm byla mezi 0,4-0,8. Absorbance byla měřena spektrofotometrem při čtyřech vlnových délkách 470, 646,8, 663,2 a 750 nm. Objem extraktu byl zaznamenán.

Výpočtem dle Lichtenthalera (1987):

$$\text{Chl } (a + b) = 7,15 * (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 * (A_{646,8} - A_{750}) \text{ } [\mu\text{g. ml}^{-1}]$$

byla určena koncentrace chlorofylu, která byla následně přepočtena na plochu listu $[\mu\text{g.cm}^{-2}]$.

3.3.6 Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu a

Listy byly položeny na navlhčenou buničinu a 20 minut zatemněny. Poté byly přeneseny do přístroje FluorCam, kde proběhlo měření indukované fluorescence chlorofylu a. První bylo využito měřicího světla dostatečně slabého, aby nevedlo k uzavírání reakčních center (stanovení F_0). Bylo aplikováno formou několika krátkých (mikrosekundových) záblesků červeného světla aplikovaných ve 20 ms intervalech. Pro měření F_m byl využit 1,6 s trvajícím saturačním pulz o intenzitě světla $2\,500\,\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Následovaly 2 minuty zatemnění. Poté pro stanovení F_m' byly listové segmenty vystaveny červenému aktinickému světlu o intenzitě $230\,\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Po 3 sekundách bylo aktinické světlo doprovázeno sérií devíti saturačních pulzů po dobu 166 s ve 20 s intervalech a dále po dobu 22 minut v 59 s intervalech. Parametry a výpočty jsou shrnuty v tab. 2.

Tab. 2: parametry popisující aktivitu fotosyntetických aparátů získané měřením nebo výpočtem.

parametr	zkratka	výpočet
minimální fluorescence	F_0	měřeno
maximální fluorescence	F_m	měřeno
variabilní fluorescence	F_v	$F_m - F_0$
kvantový výtěžek fotochemické reakce ve fotosystému II	F_v/F_m	$(F_m - F_0)/F_m$
ustálená hodnota fluorescence ve stavu adaptovaném na světlo	F_t	měřeno
maximální fluorescence chlorofylu ve stavu adaptovaném na světlo	F_m'	měřeno
minimální fluorescence ve stavu adaptovaném na světlo	F_0'	měřeno
efektivní kvantový výtěžek fotosystému II	Φ_{PSII}	$(F_m' - F_t)/F_m'$
fotochemická zhášení	qP	$(F_m' - F_t)/(F_m' - F_0')$
regulované nefotochemické zhášení	Φ_{NPQ}	$F_t/F_m' - F_t/F_m$

3.3.7 Měření velmi rychlé indukované fluorescence chlorofylu a

Měření proběhlo přístrojem PEA na listových segmentech přiložením sondy, která měřila kinetiku indukované fluorescence chlorofylu po dobu 1 s za užití intenzity světla 40 % ($\approx 1100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Data byla zpracována v programu Biolyzer 3.

3.3.8 Analýza a zpracování dat

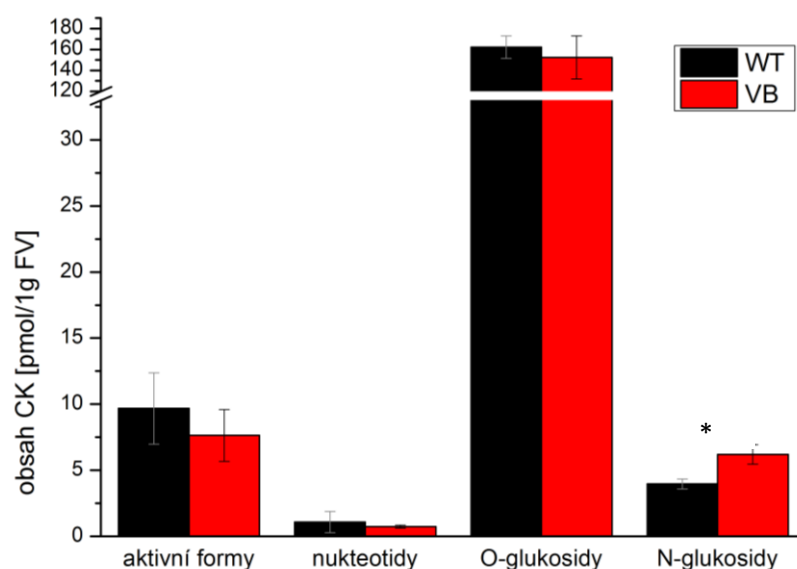
K analýze dat byly využity programy Microsoft Excel 2010 a OriginPro 8.5.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). K určení signifikantnosti dat byl využit studentův t-test.

4 Výsledky

4.1 Výběr linie ječmene pro senescenční testy a jejího stáří

U čtyř transgenních linií ječmene a WT byl stanoven obsah CK v dospělých listech po osmi, jedenácti, čtrnácti, jednadvaceti a osmadvaceti dnech po zasetí. Podrobnou tabulku výsledků měření obsahu CK v listech různě starých rostlin všech sledovaných genotypů naleznete v příloze (příloha A, B, C).

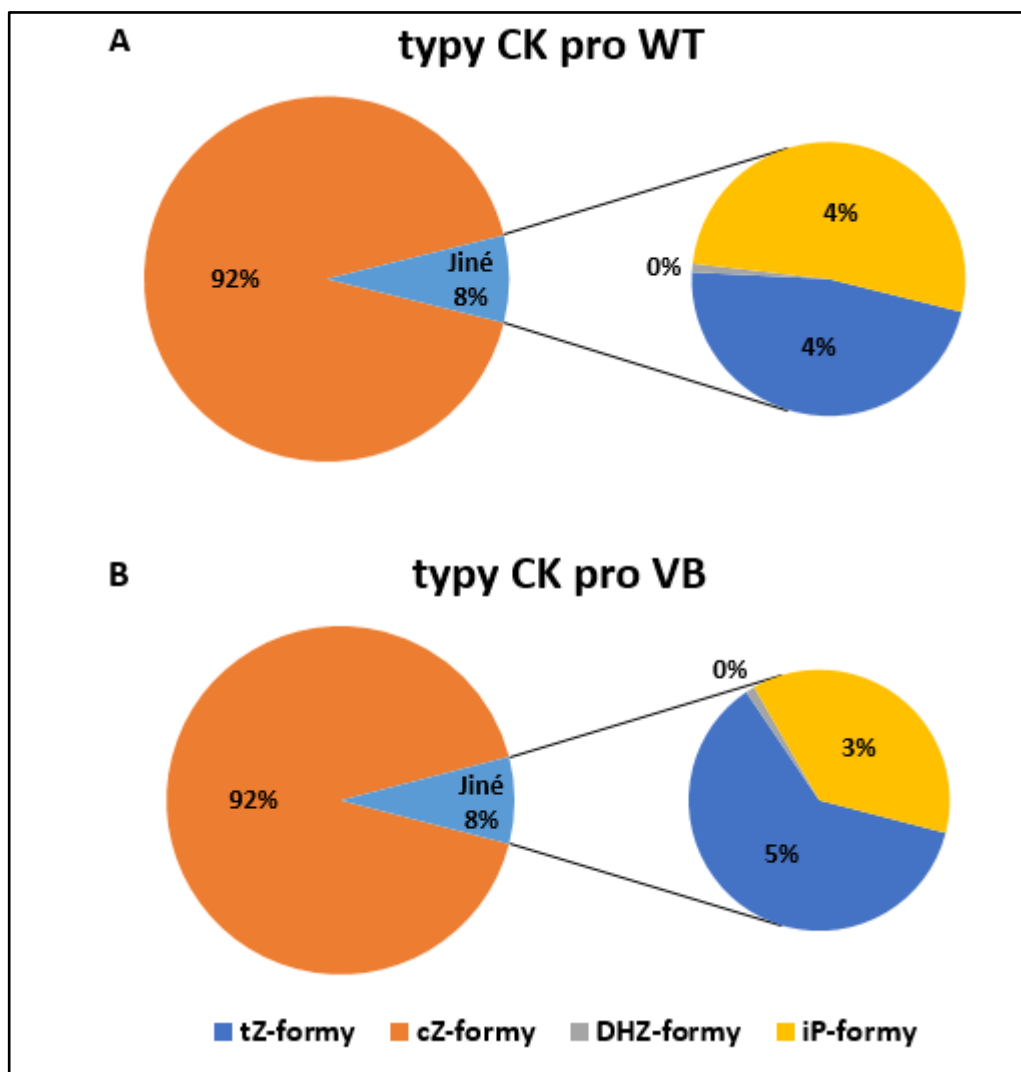
Při stanovení celkového obsahu CK bylo zjištěno, že všechny transgenní linie ječmene mají podobné celkové hladiny CK. Transgenní linie s nejnižším celkovým obsahem CK z porovnání transgenních linií byla osmi denní linie VB, u které byla celková koncentrace CK stanovena jako $139,02 \pm 23,55$ pmol/g FW. Tato hodnota je dokonce vyšší než množství CK ve WT, které činilo $109,91 \pm 2,88$ pmol/g FW. Přesto, že tato linie má celkový obsah CK vyšší, rozhodující v našem výběru byl obsah biologicky aktivních forem, tj. bází a ribotidů. Navíc stáří osm dní odpovídá klasickému uspořádání senescenčních testů. Zastoupení aktivních a neaktivních forem CK zobrazuje graf 1.



Graf 1: Celkový obsah aktivních (báze a ribotidy) a neaktivních forem CK v osmi denních listech linie VB a WT ječmene přepočten na 1 g živé hmoty. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

Aktivních forem CK obsahuje více WT oproti transgenní linii VB a to o 21 %. Nejvyšší množství v obou liniích zaujímají O-glukosidy. Signifikantně vyšší je obsah inaktivních N-glukosidů (o 56 %) stanovený pro linii VB oproti WT, který způsobil i vyšší celkový obsah CK u linie VB.

Kromě rozložení aktivních a inaktivních forem nás zajímaly i endogenní hladiny různých typů CK. Procentuální zastoupení čtyř hlavních typů CK (součet aktivních i neaktivních forem) v linii WT a VB zachycuje graf 2.



Graf 2: Procentuální zastoupení *trans*-zeatinových (tZ), *cis*-zeatinových (cZ), dihydrozeatinových typů (DHZ) a *N*6-(Δ 2-izopentenyl)adeninových (iP) typů CK v osmi denních listech linie WT (A) a transgenní linie VB ječmene (B).

Je zřejmé, že jednotlivé typy CK jsou v obou grafech zastoupeny v obdobném množství. Nejvyšší je podíl *cis*-zeatinových typů CK a to 92 % v obou testovaných liniích. Nejnižší je obsah dihydrozeatinových typů CK (méně než 1 % u obou variant). U linie VB pozorujeme zvýšení *trans*-zeatinových typů CK o více než 1 % oproti WT a pokles forem iP o 1 %. Tato data zobrazují jak aktivní, tak inaktivní formy CK. Při analýze obsahu aktivních forem jednotlivých typů CK pro transgenní linii ječmene VB a pro WT je patrné jiné zastoupení jednotlivých typů CK (tabulka 3).

Tab. 3: Součet obsahu aktivních forem CK tj. *trans*-zeatinových (*tZ*), *cis*-zeatinových (*cZ*) nebo N6-(Δ^2 -izopentenyl)adeninových (*iP*) bází a ribotidů (*tZR*, *cZR*, *iPR*) z měření obsahu CK v osmi denních listech ječmene transgenní linie VB (hodnota zvýrazněná červeně) a kontroly WT. Uvedeny jsou průměry (n=3) v pmol/g čerstvé hmotnosti a SD. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

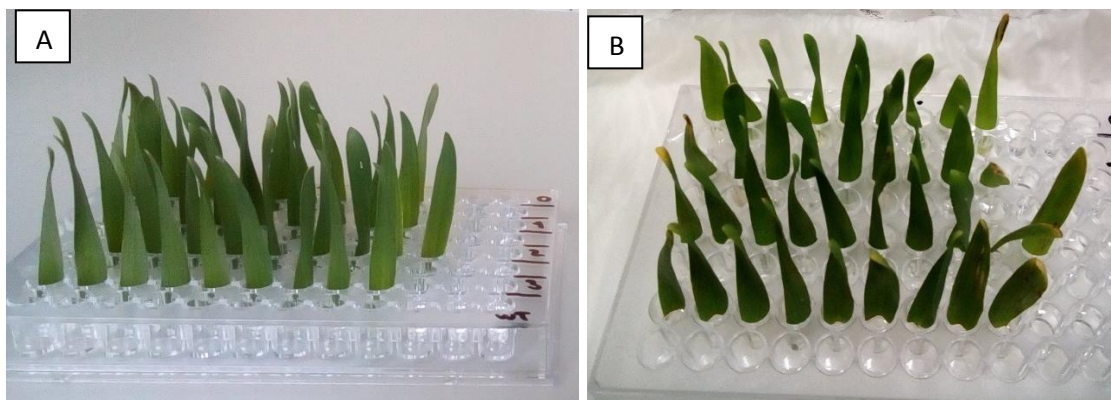
linie	<i>tZ</i>	<i>tZR</i>	<i>cZ</i>	<i>cZR</i>	<i>iP</i>	<i>iPR</i>	součet aktivních forem CK
WT	3,88 ±0,43	-	1,56 ±0,08	0,60 ±0,09	4,42 ±0,10	3,93 ±0,06	14,52 ±0,76
VB	3,10 ±0,14	0,31 ±0,04	1,81 ±0,04	2,49 ±0,12	1,49 ±0,13 *	2,45 ±0,05 *	11,66 ±0,83

Obsah jednotlivých aktivních forem CK je pro obě linie podobný. Zajímavé je zvýšení *cZ* ribotidů i *cZ* bází u linie VB, které však není signifikantní. Statisticky významný je však pokles hladin ribotidů i bází *iP* (o 34 %).

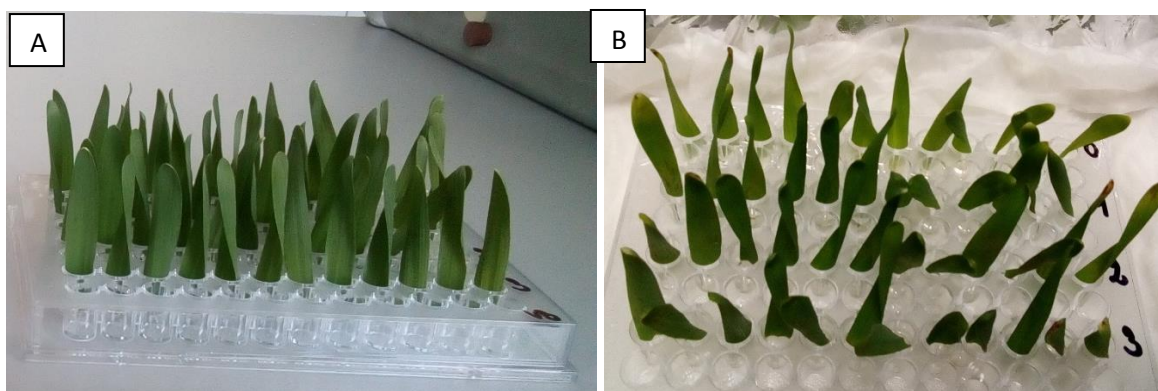
Měření endogenních hladin CK pomocí UHPLC-MS/MS poskytlo data k výběru linie ječmene s nejnižším obsahem aktivních forem CK a jejího stáří pro senescenční testy. Po analýze dat byla vybrána osmi denní linie VB s nejnižším obsahem aktivních forem CK (11,66 pmol/g FW).

4.2 Senescenční testy na pěstebním světle

Transgenní linie ječmene VB, u které bylo zjištěno nejvyšší snížení endogenních hladin aktivních forem CK, byla použita spolu s WT pro senescenční testy (obr. 16 a 17). Ke stanovení míry senescence byla měřena fotochemická účinnost fotosystému II a obsah chlorofylu pomocí dvou experimentálních metod – chlorofylmetrem SPAD a analyticky.



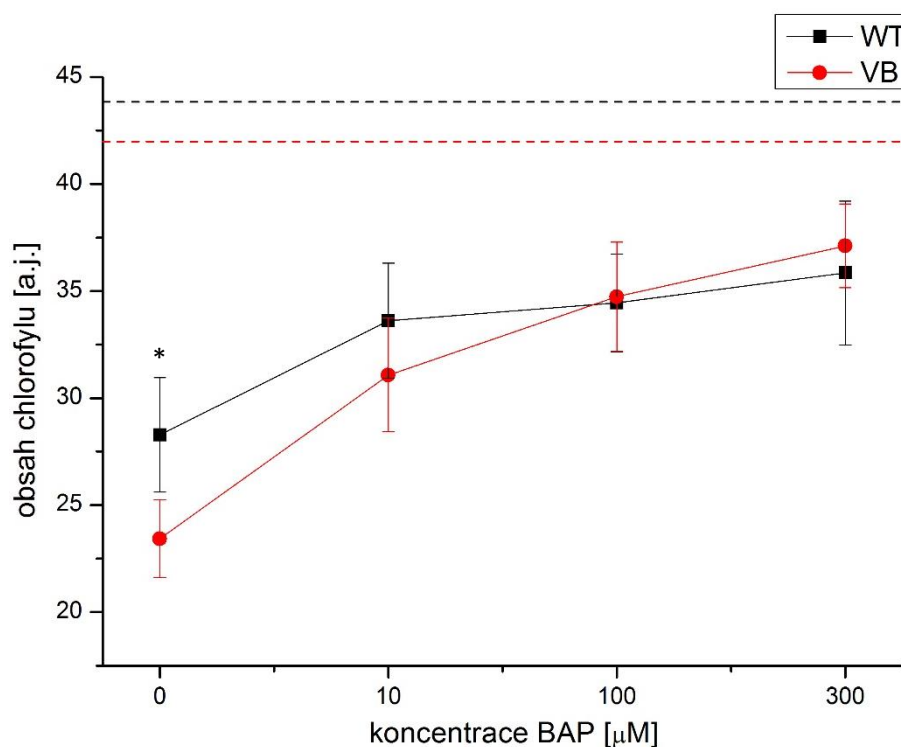
Obr. 16: Listové segmenty rostlin WT před (A) a po (B) senescenčním testu inkubované v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na pěstebním světle o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny.



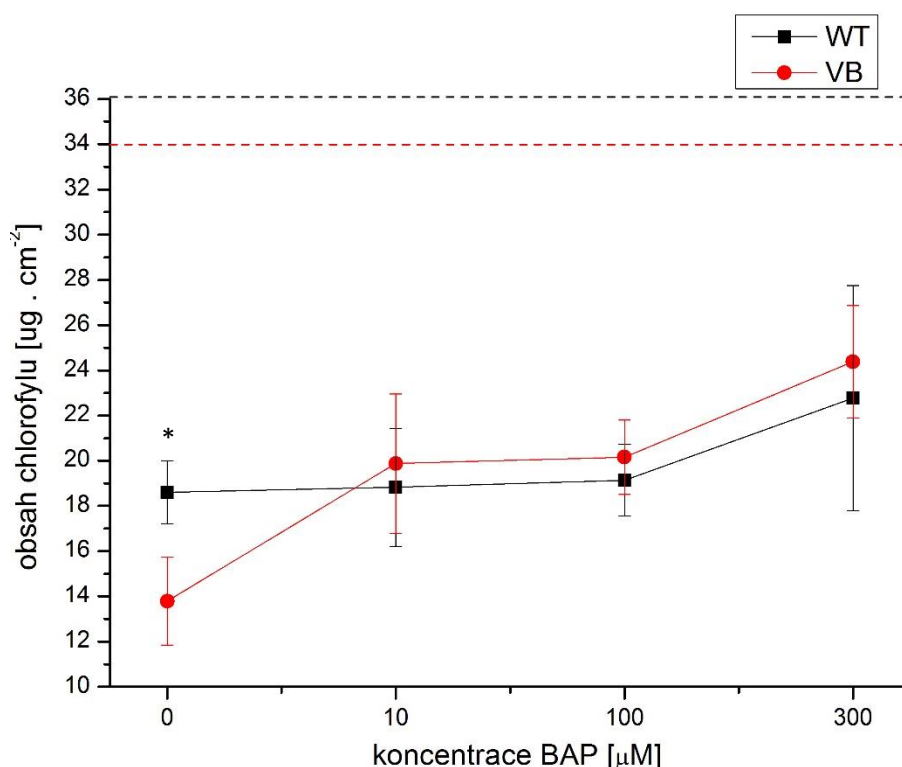
Obr. 17: Listové segmenty rostlin VB před (A) a po (B) senescenčním testu inkubované v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na pěstebním světle o intenzitě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny.

4.2.1 Stanovení obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu byl stanoven u senescentních listů ječmene linie VB a WT pomocí chlorofylmetru SPAD (graf 3) a analyticky (graf 4).



Graf 3: Obsah chlorofylu měřený chlorofylmetrem SPAD v listových segmentech rostlin ječmene WT a linie VB, inkubovaných po dobu čtyř dní v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na pěstebním světle o intenzitě 100 $\mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Přerušovaná čára znázorňuje obsah chlorofylu měřený u kontrolních listů před senescenčním testem (pro WT černá, 44 a. j.; a pro VB červená 42,4 a.j.). Uvedeny jsou průměry a SD; $n=9$. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

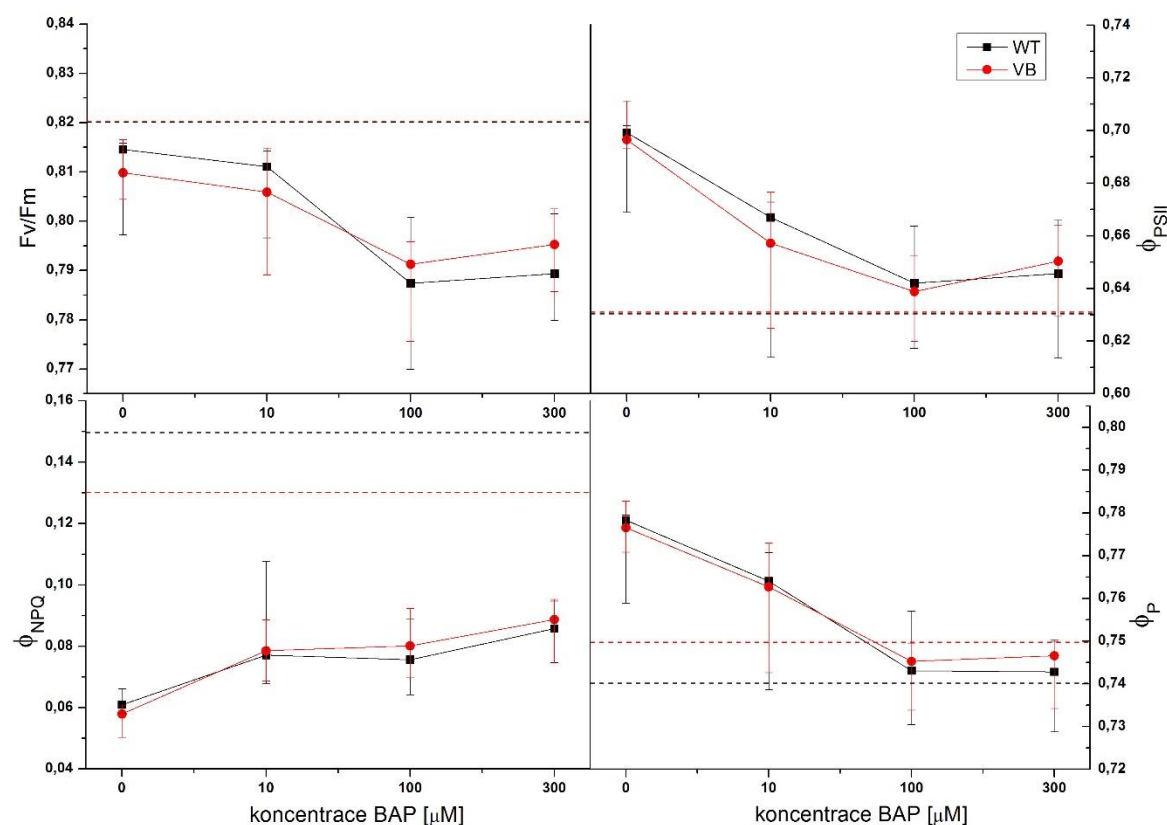


Graf 4: Obsah chlorofylu měřený analyticky v listových segmentech rostlin ječmene WT a linie VB, inkubovaných po dobu čtyř dní v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na pěstebním světle o intenzitě 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Přerušovaná čára znázorňuje obsah chlorofylu měřený u kontrolních listů před senescenčním testem (pro WT černá, 36 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$; a pro VB červená, 34 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uvedeny jsou průměry a SD; $n=9$. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

Pokud nebyl aplikován BAP, WT dosáhl vyšší koncentrace chlorofylu, pravděpodobně díky vyššímu obsahu endogenních CK oproti linii VB. Při aplikaci roztoků CK o vzrůstajících koncentracích byla po čtyřech dnech zaznamenána menší degradace chlorofylu, která byla u obou genotypů rostlin obdobná. Při měření obsahu chlorofylu dvěma experimentálními metodami byly získány dva grafy s podobným průběhem. Avšak rozdíly ve výsledcích svědčí o tom, že metody nejsou zcela srovnatelné. Zatímco při použití rychlé, neinvazivní a nedestruktivní metody měření chlorofylmetrem SPAD se zvyšující se koncentrací BAP roste koncentrace chlorofylu v senescentních listech až k hodnotě 83 % obsahu chlorofylu v kontrole, při užití analytické metody dochází k růstu koncentrace na jen 67 % původního obsahu chlorofylu. Analytické určení je méně přesné, jelikož se jedná o proces s poměrně dlouhou přípravou vzorku, kdy může docházet k degradaci molekul chlorofylu a k jejich ztrátám. Vliv má také kvalita roztěru listu a další faktory.

4.2.2 Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu a

Pomocí přístroje FluorCam byla měřena indukovaná fluorescence chlorofylu a, která nám poskytla množství údajů o stavu fotosyntetického aparátu a míry senescence. V grafu 5 jsou seskupeny parametry: maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (F_v/F_m); a parametry odrážející stav adaptovaný na světlo: maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na světlo (ϕ_{PSII}), fotochemické zhášení (ϕ_P) a nefotochemické zhášení (ϕ_{NPQ}).



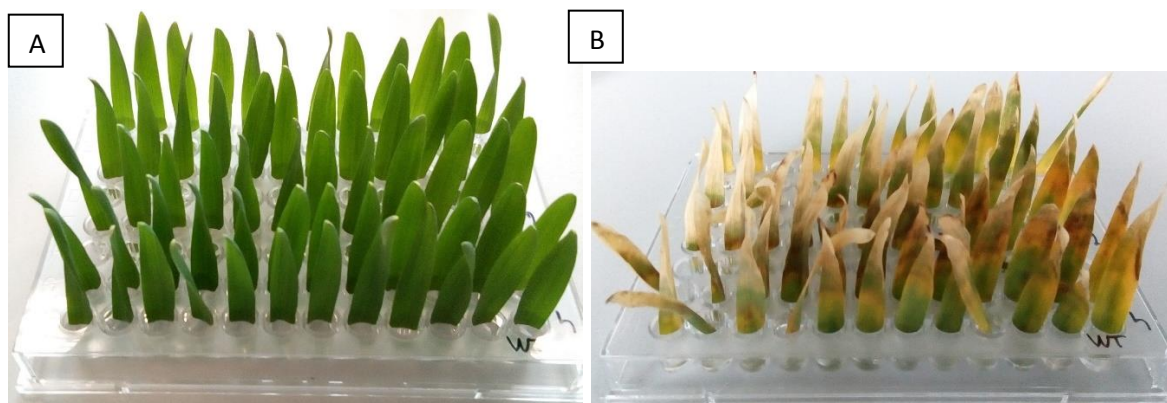
Graf 5: Parametry odrážející maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (F_v/F_m) a ve stavu adaptovaném na světlo (ϕ_{PSII}), fotochemické (ϕ_P) a nefotochemické zhášení (ϕ_{NPQ}) po adaptaci na světlo měřených listových segmentů podrobených čtyř dennímu senescenčnímu testu při exogenní aplikaci roztoků BAP o koncentraci 0, 10, 100 a 300 μM při vystavení pěstebnímu světlu o intenzitě 100 $\mu\text{mol fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Zobrazeny jsou hodnoty mediánů a kvartilů, $n=9$. Černá přerušovaná čára znázorňuje hodnoty naměřené u kontrolních listů WT před senescenčním testem a červená přerušovaná čára hodnoty kontrolních listů linie VB.

Stav fotosyntetického aparátu ve stavu adaptovaném na tmu popisuje parametr F_v/F_m . V grafu 5 s rostoucí koncentrací CK vidíme pokles tohoto parametru z hodnot okolo 8,15 na hodnoty nižší než 7,9. Snižující se nárůst pozorujeme u parametrů ϕ_{PSII} a ϕ_P popisující funkčnost PSII ve stavu adaptovaném na světlo, což ukazuje na snižující se výtěžek fotosyntézy se zvyšující se koncentrací BAP. Zajímavé je srovnání s hodnotami

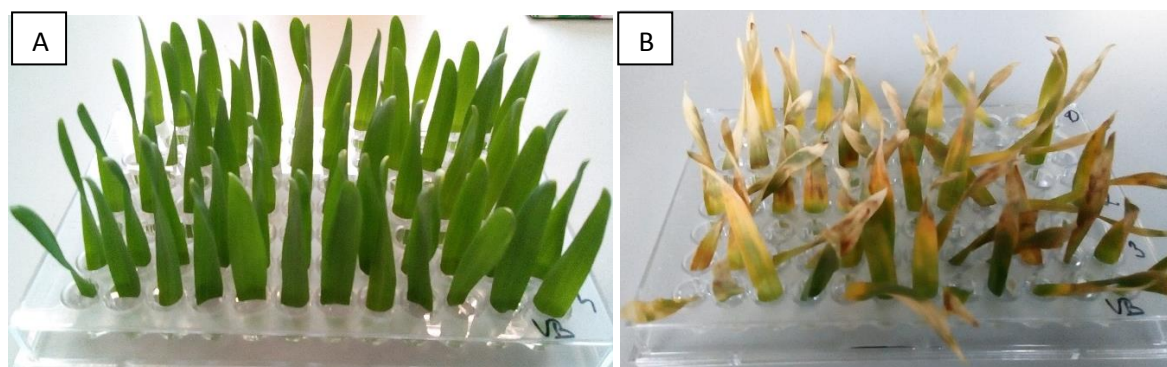
kontrol naměřenými před senescenčním testem, jelikož v případě ϕ_{PSII} a ϕ_P byly naměřeny jejich vyšší hodnoty až po senescenčním testu. Je možné, že senescence v těchto listových segmentech teprve začínala, a proto nedošlo ke snížení funkce fotosyntetického aparátu ve stavu adaptovaném na světlo. Zvýšení je možné také vysvětlit tím, že listy v den oddělování segmentů pro senescenční test nebyly plně vyvinuté. Parametr ϕ_{NPQ} popisuje nefotochemické zhášení, které s rostoucí koncentrací BAP kleslo méně než u nulové koncentrace BAP. Mezi liniemi nejsou výrazné rozdíly.

4.3 Senescenční testy na zvýšené intenzitě světla I

Po provedení senescenčního testu při ponechání listových segmentů na pěstebním světle byly uskutečněny senescenční testy s aplikací 4x vyšší intenzity světla ($400 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Opět byla použita linie VB a WT (obr. 18 a 19). Ke stanovení míry senescence byla jako u předchozího experimentu měřena fotochemická účinnost fotosystému II a obsah chlorofylu pomocí dvou experimentálních metod – chlorofylmetrem SPAD a analyticky.



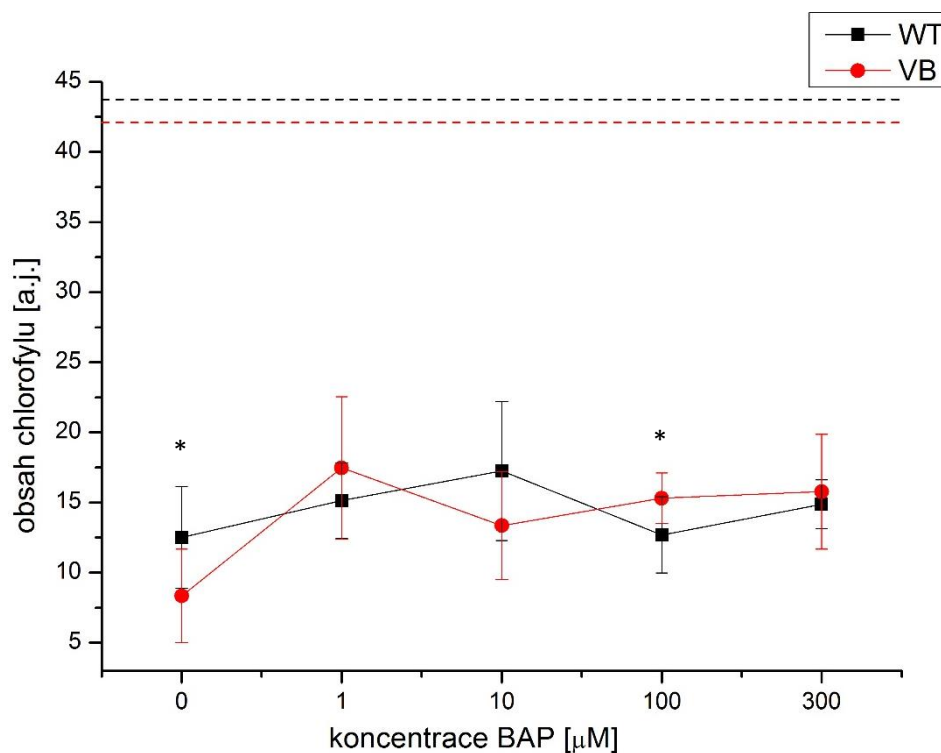
Obr. 18: Listové segmenty rostlin WT před (A) a po (B) senescenčním testu inkubované v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na světle o intenzitě $400 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny.



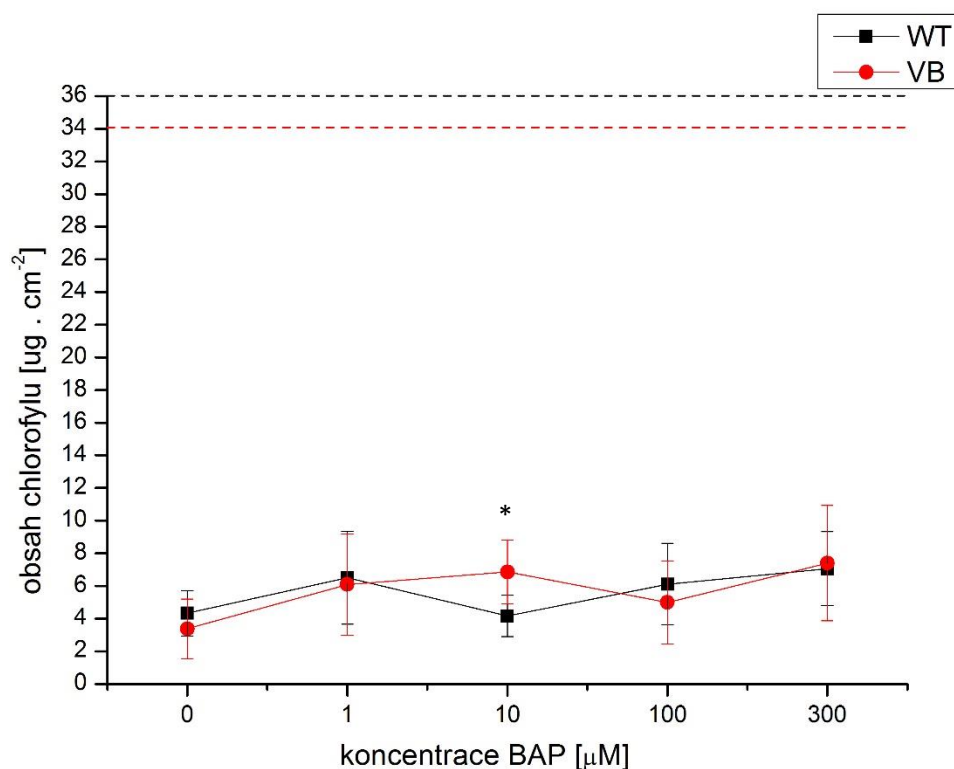
Obr. 19: Listové segmenty rostlin VB před (A) a po (B) senescenčním testu inkubované v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na světle o intenzitě $400 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny.

4.3.1 Stanovení obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu byl stanoven u listů ječmene linie VB a WT po senescenčním testu pomocí chlorofylmetru SPAD (graf 6) a analyticky (graf 7).



Graf 6: Obsah chlorofylu měřený chlorofylmetrem SPAD v listových segmentech rostlin ječmene WT a linie VB se sníženým endogenním obsahem CK, inkubovaných v roztocích BAP o koncentracích 0, 1, 10, 100 a 300 μ M a na světle o zvýšené intenzitě 400 μ mol fotonů. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ čtyři dny. Přerušovaná čára znázorňuje obsah chlorofylu měřený u kontrolních listů před senescenčním testem (pro WT černá, 44 a. j.; a pro VB červená 42,4 a.j.). Uvedeny jsou průměry a SD; n=11. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

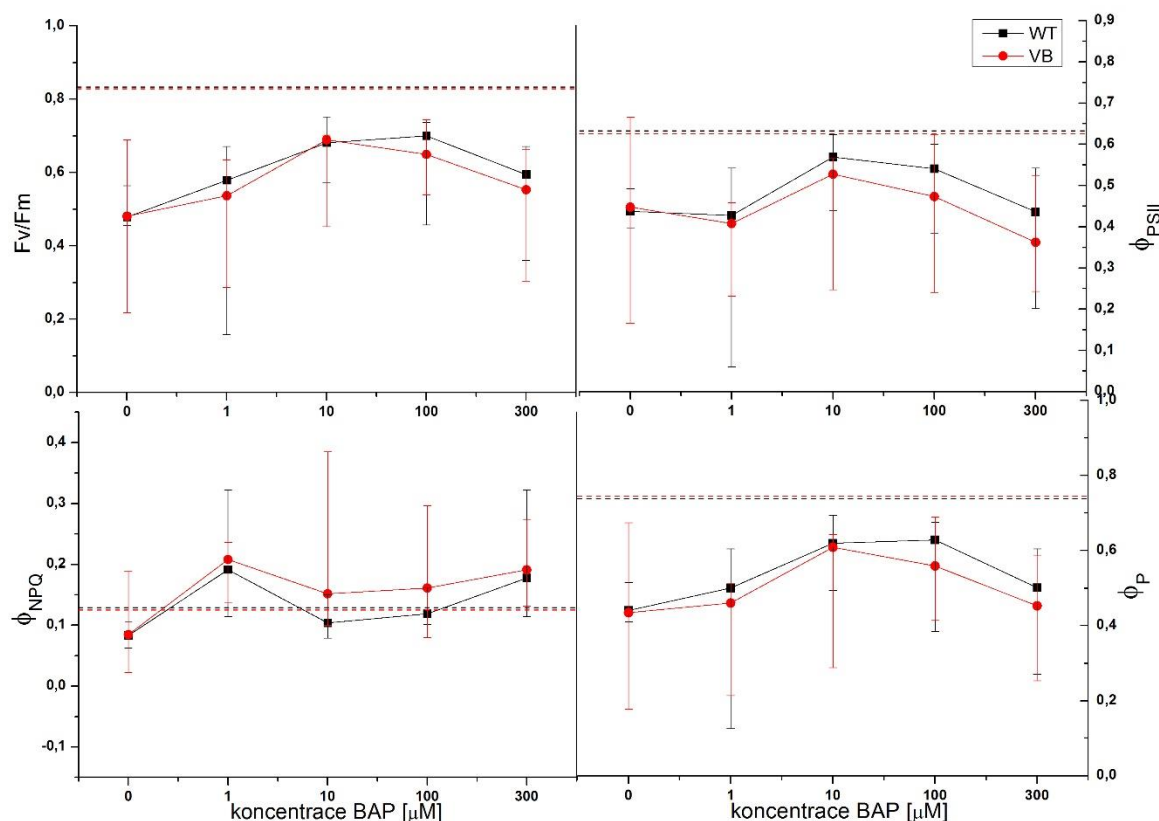


Graf 7: Obsah chlorofylu měřený analyticky v listových segmentech rostlin ječmene WT a linie VB se sníženým endogenním obsahem CK, inkubovaných v roztocích BAP o koncentracích 0, 1, 10, 100 a 300 μM a na světle o zvýšené intenzitě 400 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny. Přerušovaná čára znázorňuje obsah chlorofylu měřený u kontrolních listů před senescenčním testem (pro WT černá, 36 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$; a pro VB červená, 34 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uvedeny jsou průměry a SD; $n=11$. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

U listových segmentů vystavených světlu o zvýšené intenzitě došlo k výrazné degradaci chlorofylu. Při nepodání CK byly hodnoty chlorofylu nejnižší pro obě linie rostlin při stanovení obsahu chlorofylu chlorofylmerem SPAD (graf 6) i analyticky (graf 7). Díky pokročilé senescenci u obou typů rostlin jsou výsledky získané oběma metodami srovnatelné. Zvyšující se koncentrace BAP nevedla k výraznému omezení degradace chlorofylu. Z grafů 6 a 7 je patrné, že listové segmenty vystavené světlu o zvýšené intenzitě podléhají senescenci rychleji než listy vystavené pěstebnímu světlu (graf 3 a 4). Listové segmenty vystavené světlu o zvýšené intenzitě patrně více transpirovaly, což vedlo k nedostatku roztoků a k jejich vysušení. Experiment byl proto zopakován s průběžným doplňováním roztoků (kapitola 4.4).

4.3.2 Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu a

Parametry popisující stav fotosyntetického aparátu při adaptaci na tmu a světlo jsou shrnuty v grafu 8.



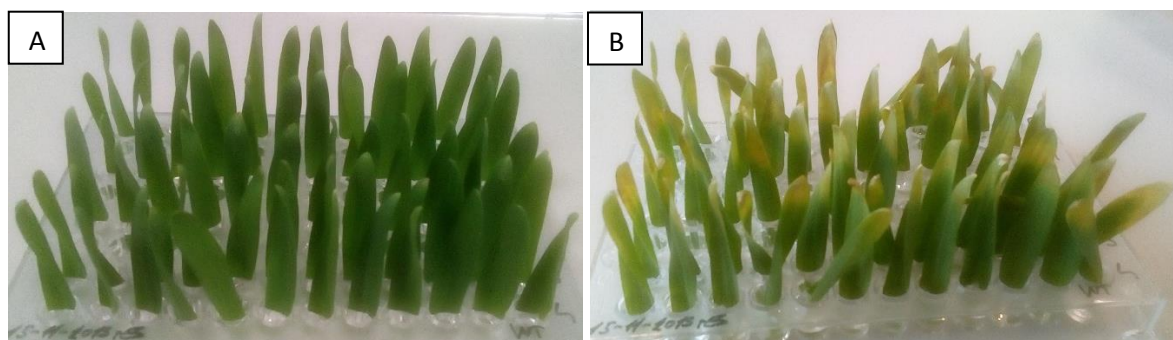
Graf 8: Parametry odrážející maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (F_v/F_m) a ve stavu adaptovaném na světlo (ϕ_{PSII}), fotochemické (ϕ_P) a nefotochemické zhášení (ϕ_{NPQ}) měřených listových segmentů podrobených čtyř dennímu senescenčnímu testu při exogenní aplikaci roztoků BAP o koncentraci 0, 10, 100 a 300 μM při vystavení světlu o zvýšené intenzitě 400 $\mu\text{mol fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Zobrazeny jsou hodnoty mediánů a kvartilů, $n=11$. Černá přerušovaná čára znázorňuje hodnoty naměřené u kontrolních listů WT před senescenčním testem a červená přerušovaná čára hodnoty kontrolních listů linie VB.

Hodnoty parametru F_v/F_m jsou velmi nízké. Zatímco u zdravých kontrolních rostlin dosahují hodnot kolem 0,82 v grafu 8 nepřesahují hodnotu 0,7, častěji se pohybují okolo 0,6. Je možné pozorovat pozitivní efekt aplikace BAP (do koncentrace BAP 10 μM) na snížení poklesu hodnot kvantových výtěžků ve stavu adaptovaném na tmu i na světlo. Při jejím překročení se projevuje negativní efekt CK poklesem hodnot. Díky pokročilému stádiu senescence byla velká variabilita mezi jednotlivými listovými segmenty. Zdá se, že vyšší množství CK v listech WT mohlo mít vliv na dosažení vyšších hodnot kvantového výtěžku i fotochemického zhášení oproti VB, ale rozdíly mezi oběma liniemi jsou minimální.

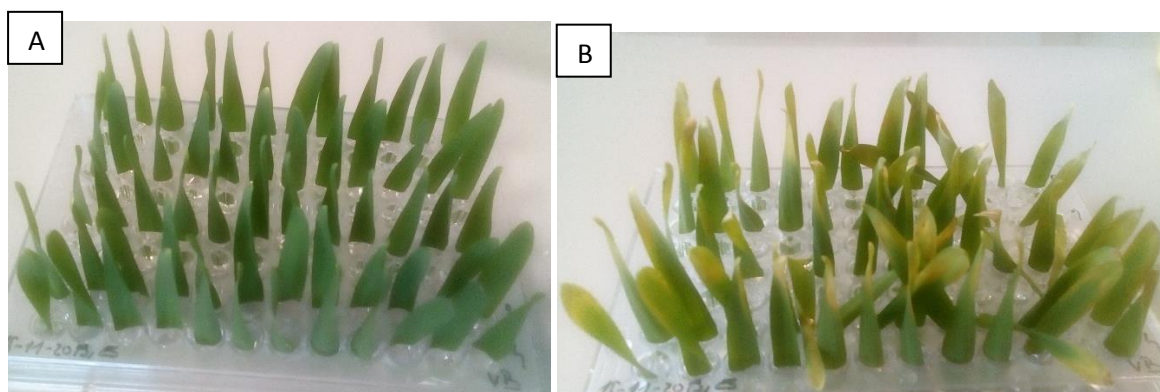
Hodnoty nefotochemického zhášení jsou vyšší než u segmentů vystavených pěstebnímu světlu (graf 5), což koreluje s pokročilejší senescencí listů v tomto experimentu.

4.4 Senescenční testy na zvýšené intenzitě světla II

Kvůli velmi pokročilé senescenci listových segmentů byl experiment se zvýšenou intenzitou světla zopakován. Na rozdíl od předchozího pokusu byly listovým segmentům v průběhu čtyř dnů senescenčního testu průběžně podle potřeby doplňovány příslušné roztoky. Experiment byl proveden opět s linií VB a WT (obr. 20 a 21).



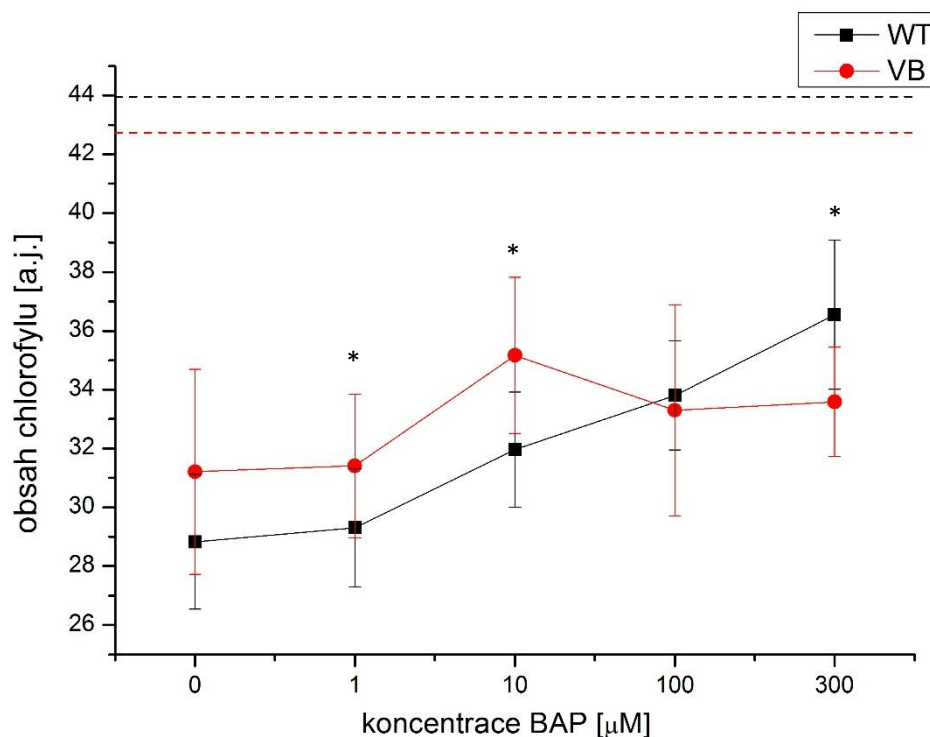
Obr. 20: Listové segmenty rostlin WT před (A) a po (B) senescenčním testu inkubované v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na světle o intenzitě $400 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny.



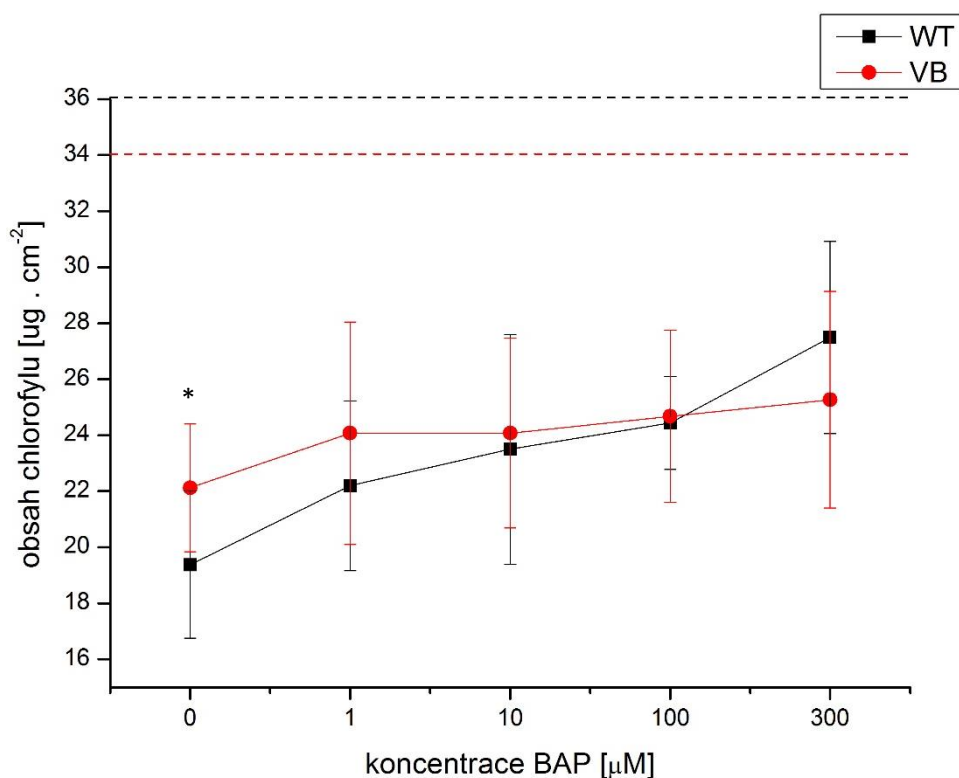
Obr. 21: Listové segmenty rostlin VB před (A) a po (B) senescenčním testu inkubované v roztocích BAP o koncentracích 0, 10, 100 a 300 μM a na světle o intenzitě $400 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny.

4.4.1 Stanovení obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu byl stanoven u senescentních listů ječmene linie VB a WT pomocí chlorofylmetru SPAD (graf 9) a analyticky (graf 10).



Graf 9: Obsah chlorofylu měřený chlorofylmetrem SPAD v listových segmentech rostlin ječmene WT a linie VB se sníženým endogenním obsahem CK, inkubovaných v roztocích BAP o koncentracích 0, 1, 10, 100 a 300 μ M a na světle o zvýšené intenzitě 400 μ mol fotonů.m⁻².s⁻¹ čtyři dny. Přerušovaná čára znázorňuje obsah chlorofylu měřený u kontrolních listů před senescenčním testem (pro WT černá, 44 a. j.; a pro VB červená 42,4 a.j.). Uvedeny jsou průměry a SD; n=11. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

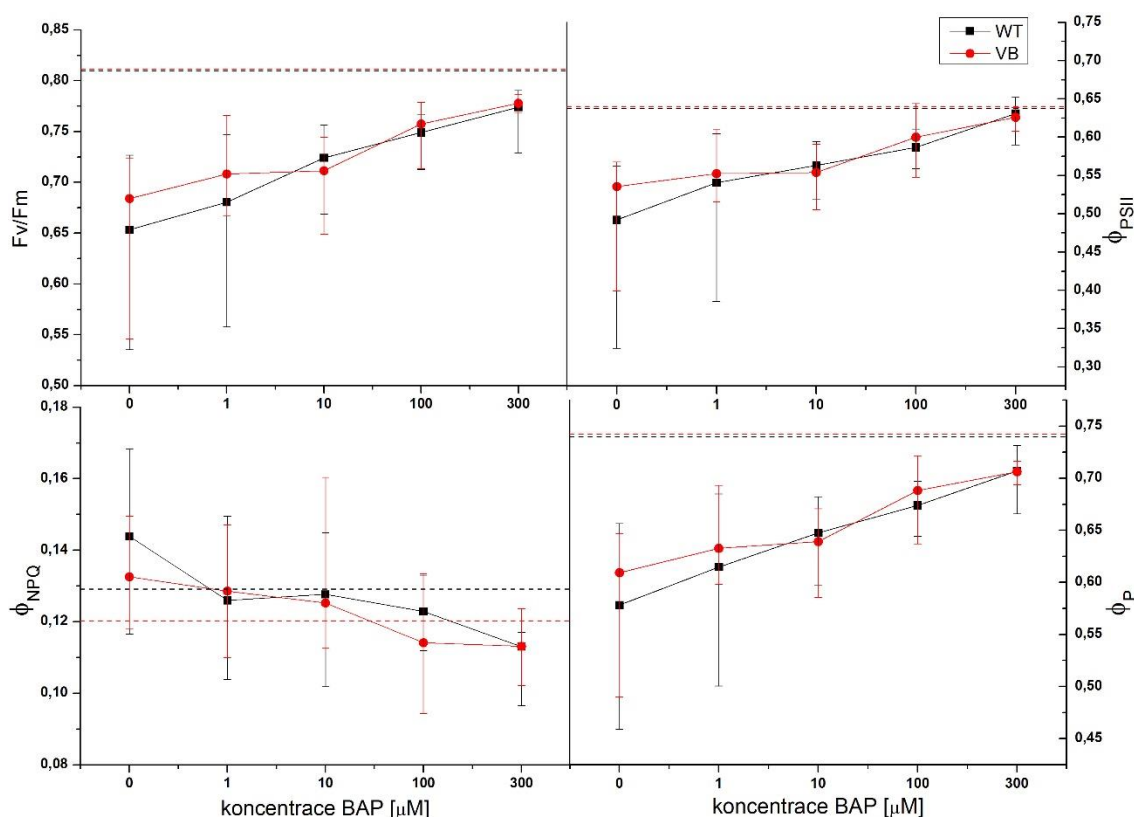


Graf 10: Obsah chlorofylu měřený analyticky v listových segmentech rostlin ječmene WT a linie VB se sníženým endogenním obsahem CK, inkubovaných v roztocích BAP o koncentracích 0, 1, 10, 100 a 300 μM a na světle o zvýšené intenzitě 400 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ čtyři dny. Přerušovaná čára znázorňuje obsah chlorofylu měřený u kontrolních listů před senescenčním testem (pro WT černá, 36 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$; a pro VB červená, 34 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uvedeny jsou průměry a SD; $n=11$. * odpovídá statisticky významnému rozdílu (t-test, $p \leq 0,05$).

V grafu 9 a 10 jsou zachyceny výsledky měření obsahu chlorofylu v listech podrobeným třetímu senescenčnímu testu opět pod zvýšenou intenzitou světla 400 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Nejnižších hodnot v obou grafech dosahují listy, kterým nebyl aplikován žádný CK. Se zvyšující se koncentrací BAP došlo ke zpomalení degradace chlorofylu. S nejvyšší koncentrací 300 μM BAP bylo dosaženo 80 % původní obsahu chlorofylu listů kontroly, při měření chlorofylmetrem SPAD dokonce 88 % (graf 9). Průběh křivek je v obou grafech podobný, což svědčí o srovnatelnosti obou metod. Je zajímavé, že oproti grafům 3 a 4 dosahuje linie VB vyšších hodnot než WT při aplikaci nízkých koncentrací CK a nižších hodnot při překročení 100 μM BAP. Rozdíly mezi výsledky druhého a třetího senescenčního testu jsou dány eliminací vlivu vysušení, který byl při druhém senescenčním testu markantní.

4.4.2 Měření pomalé indukované fluorescence chlorofylu a

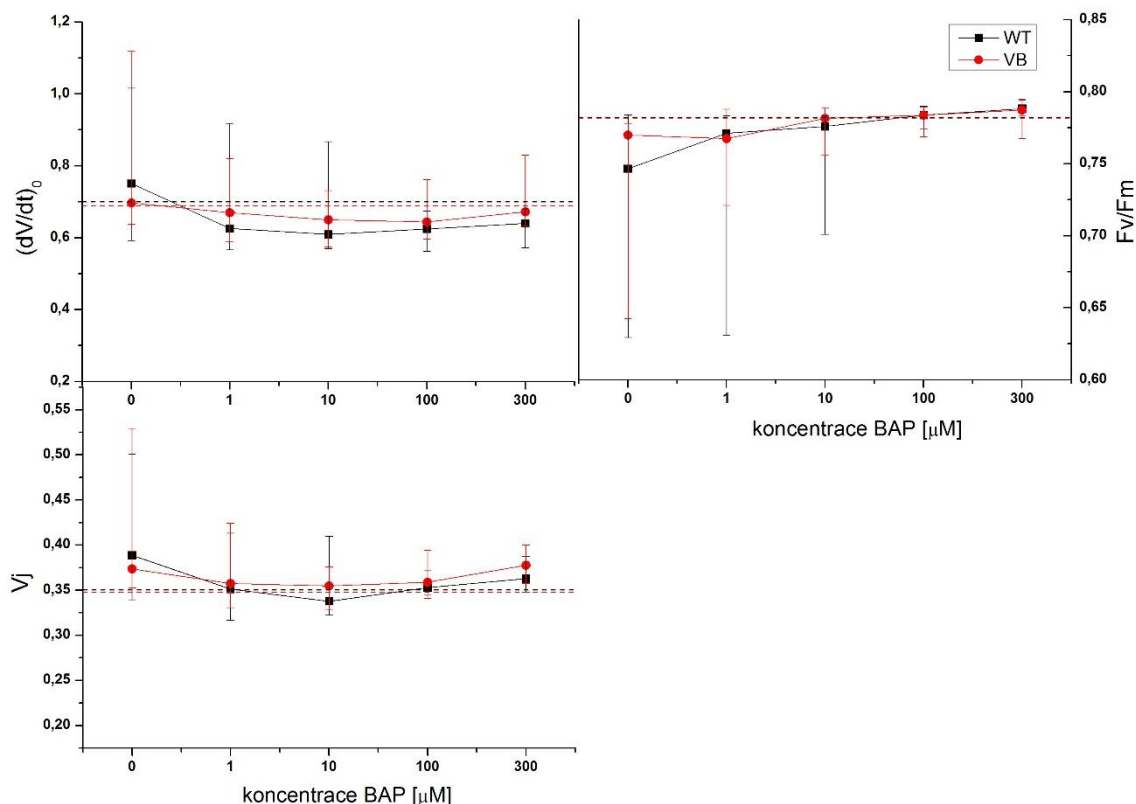
Parametry z měření přístrojem FluorCam popisující stav fotosyntetického aparátu adaptovaného na tmu a světlo shrnuje graf 11.



Graf 11: Parametry odrážející maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu (F_v/F_m) a ve stavu adaptovaném na světlo (ϕ_{PSII}), fotochemické (ϕ_P) a nefotochemické zhášení (ϕ_{NPQ}) měřených listových segmentů podrobených čtyř dennímu senescenčnímu testu při exogenní aplikaci roztoků BAP o koncentraci 0, 10, 100 a 300 μM při vystavení světlu o zvýšené intenzitě 400 $\mu\text{mol fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Zobrazeny jsou hodnoty mediánů a kvartilů, $n=11$. Černá přerušovaná čára znázorňuje hodnoty naměřené u kontrolních listů WT před senescenčním testem a červená přerušovaná čára hodnoty kontrolních listů linie VB.

Parametr F_v/F_m popisující stav adaptovaný na tmu je u obou linií nižší než hodnota zdravých rostlin (0,82). Se zvyšující se koncentrací CK však parametr klesá méně až na hodnotu 0,78. Tento trend nižšího poklesu pozorujeme i pro parametry stavu adaptovaném na světlo (ϕ_{PSII} a ϕ_P). Rozdíly mezi liniemi jsou zanedbatelné. Zajímavé je srovnání s grafem 5, kde při vystavení světlu o intenzitě 100 $\mu\text{mol fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, jsou hodnoty ϕ_{PSII} okolo 0,65 nejnižší z měření při koncentraci BAP 300 μM , zatímco v grafu 11 jsou stejné hodnoty při stejné koncentraci BAP nejvyšší naměřené. Hodnoty ϕ_{NPQ} se zvyšující se koncentrací CK klesají, což odpovídá zvyšujícímu se výtěžku fotosyntézy, a tedy menší potřebě ochrany PSII před nadbytečnými excitacemi.

4.4.3 Měření velmi rychlé indukované fluorescence chlorofylu a



Graf 12: Parametry získané měřením velmi rychlé indukované fluorescence chlorofylu a v listových segmentech podrobených čtyř dennímu senescenčnímu testu při exogenní aplikaci roztoků BAP o koncentraci 0, 1, 10, 100 a 300 μ M a vystavených světlu o zvýšené intenzitě 400 μ mol fotonů. $\cdot$ m⁻².s⁻¹. Zobrazeny jsou mediánové hodnoty a kvartily, n=11. Černá přerušovaná čára znázorňuje hodnoty naměřené u kontrolních listů WT před senescenčním testem a červená přerušovaná čára hodnoty kontrolních listů linie VB.

Zatímco při měření parametru F_v/F_m přístrojem FluorCam (graf 11) je pozorován nárůst parametru se zvyšující se koncentrací BAP, při měření stejného parametru přístrojem PEA (graf 12) je jeho hodnota vyšší a velmi podobná pro všechna opakování a obě varianty rostlin. Také při zvyšující se koncentraci CK nedošlo k výraznému nárůstu hodnot F_v/F_m . Při nízkých koncentracích vidíme značnou směrodatnou odchylku, což ukazuje na vyšší míru senescence u některých měřených segmentů. Rovněž absence CK vedla k vyšší míře senescence. Zato koncentrace 100 a 300 μ M BAP pomohly zvýšit kvantový výtěžek fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu.

5 Diskuze

Pro náš experiment byly vybrány čtyři transgenní linie ječmene jarního s cíleně zvýšenou expresí enzymu CKX1 ve vakuolách (linie VB a VF) nebo v cytosolu (C3 a C5) buněk kořene. Enzym CKX1 je zodpovědný za degradaci CK, a proto jeho zvýšená exprese vede ke snížení endogenních hladin CK v těchto rostlinách oproti WT. V práci Vojta et al. z roku 2016 byly výše uvedené transgenní linie vystaveny stresu suchem, přičemž všechny vykazovaly vyšší odolnost k tomuto typu enviromentálního stresu oproti WT. Během stresu suchem došlo v listech k podpoře exprese genů IPT zodpovědných za biosyntézu CK, k podpoře produkce antioxidačních flavonoidů a antokyanů. Rovněž měly rostliny kvůli jinému poměru auxinů a CK rozsáhlejší, členitější kořenový systém a vyšší obsah ligninu obsaženého v buněčných stěnách. Kombinace těchto faktorů pravděpodobně vedla k lepšímu přečkání nepříznivých podmínek. Rostliny s overexpresí CKX1 lokalizovanou ve vakuolách vykazovaly nižší hodnoty fotochemie PSII i nižší celkový obsah chlorofylu za nestresových podmínek oproti WT, což bylo vhodné pro námi zamýšlené zkoumání vlivu snížených endogenních hladin CK na senescenci. Navíc linie měly cíleně zvýšenou expresi enzymu CKX1 pouze v kořenech, proto by nemělo docházet ke změně hladin CK v oddělených listových segmentech transgenních rostlin oproti WT.

Před uskutečněním senescenčních testů bylo nutné vybrat transgenní linii a její stáří tak, aby listy obsahovaly co nejnižší množství CK oproti WT. Obsah CK byl stanoven u výše uvedených čtyř transgenních linií v různé doby od zasetí (celkem čtyři termíny). Díky zvýšené expresi enzymu CKX1 jsme předpokládali, že bude patrný pokles v obsahu CK při srovnání transgenních linií a kontrolních rostlin. Překvapivě mezi transgenními liniemi a rostlinami WT nebyly patrné výrazné rozdíly v celkovém obsahu CK. Avšak WT měl vyšší obsah aktivních forem CK než osmidenní linie VB, která byla proto vybrána pro senescenční testy.

Pokles obsahu aktivních forem byl u VB rostlin očekáván, kvůli vyššímu počtu degradací přes enzymy CKX1. Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.1 preferovanými substráty enzymů CKX jsou aktivní formy CK, zatímco *O*- či *N*-glukosidy nejsou pomocí CKX enzymů štěpeny (Schmülling et al., 2003). Zásobní formou CK jsou *O*-glukosidy, které mohou být lehce převedeny na aktivní formy (Kieber et Shaller, 2014). Neaktivní zásobní *O*-glukosidy tvořily největší množství CK v obou variantách rostlin (graf 1). Značný byl také stanovený obsah *N*-glukosidů, který byl signifikantně vyšší pro linii VB oproti WT, a který by mohl odpovídat vyšší míře degradace CK v transgenních rostlinách, která není přímo závislá na enzimech CKX.

Za nejzastoupenější typy CK v rostlinách jsou považovány *tZ* a *iP* (Hirose et al., 2007). V případě našeho měření obsahu CK, však největší podíl zaujímaly *cZ* typy CK, a to 92 %, jak u rostlin VB, tak u WT (graf 2). Gajdošová et al. ve své práci z roku 2011 uvádí, že během vegetativního stavu listů *A. thaliana* byl obsah *cZ* pouze 5 %, zatímco *tZ* tvořil 95 % celkového obsahu CK. Ve stejné práci byl zjištěn nárůst množství *cZ* na 30 % celkového obsahu CK u senescentních 65 dní starých listů *A. thaliana*. Rozdíl v obsahu *cZ* a *tZ* typů CK mezi našimi a jejich výsledky bude patrně způsoben užitím jiného druhu rostlin, protože při srovnání rostlin jednoděložných a dvouděložných jsou jiné obsahy typů CK běžné (Ramireddy et al., 2018). U ječmene byly prokázány vysoké koncentrace *cZ* typů CK v raných stádiích vývoje endospermu semen, kdy dochází ke stabilizaci zásob škrobu, ale po přibližně deseti dnech od opylení začínají převažovat *tZ* formy (Powell et al., 2013). U některých jednoděložných rostlin jako je rýže bývá obsah *cZ* typů CK vyšší než obsah *tZ*, a *cZ* typy, které jsou obecně považovány za málo aktivní zde vykazovaly vyšší aktivitu (Lomin et al., 2011; Kudo et al., 2012). Nízké hladiny *tZ* a *iP* v rostlinách VB by mohly být způsobeny vyšší expresí enzymů CKX1, které štěpí právě postranní řetězce těchto typů CK, avšak při porovnání obsahu *tZ* typů CK s WT nejsou patrné výrazné rozdíly.

Změna v zastoupení *tZ* a *iP* typů CK mezi transgenní linií a WT by mohla být způsobena tím, že rostliny VB měly cíleně vyšší expresi degradačních enzymů CKX1 pouze v kořenech (Vojta et al., 2016). Je známo, že biosyntéza *tZ* a *iP* typů CK je v rámci rostlinného těla rozlišně lokalizovaná. Primárním CK tvořeným v kořenech a transportovaným xylémem do nadzemní části je *tZ*, zatímco *iP* je přednostně tvořen v nadzemních částech rostlin a transportován floémem do kořene (Kudo et al., 2010). V listech transgenní linie jsme tedy očekávali snížení obsahu *tZ* typů CK v důsledku jejich zvýšené degradace enzymem CKX v kořenech. V případě *iP*, který je produkován v nadzemních částech byl očekáván spíše nárůst obsahu, jakožto kompenzace snížených hladin *tZ*. Procentuální zastoupení těchto typů CK skutečně bylo mezi linií VB a WT pozměněno, avšak překvapivě. V případě *iP*, došlo v listech rostlin VB k signifikantnímu snížení jeho obsahu a obsah *tZ* nebyl mezi liniemi významně pozměněn.

Cytokinin, který nepodléhá štěpení enzymem CKX, DHZ (Schmülling et al., 2003) a u kterého byl proto předpoklad, že jeho hladiny nebudou mezi liniemi rozlišné, byl v obou genotypech rostlin zastoupen ve velmi malém množství méně než 0,1 % obsahu. K exogenní aplikaci byl vybrán BAP, který není stejně jako DHZ pomocí CKX štěpen (Schmülling et al., 2003) a je známá jeho vysoká účinnost v senescenčních testech s ječmenem (Zacharias et Ried, 1990; Holub et al., 1998; Janečková et al., 2019).

Pro správný vývoj chloroplastů a biosyntézu chlorofylu hrají CK stěžejní roli (Kusnetsov et al., 1998; Parthier, 1979; Chory et al., 1994; Cortleven et Schmülling, 2015;

Yaronskaya et al., 2006). Dobře je v literatuře popsán pozitivní vliv CK na oddálení projevů senescence, jako je právě degradace chlorofylu (Gan et Amasino, 1995; Kim et al., 2006). Jsou ale také publikace, které se zabývají negativním vlivem CK na senescenci rostlin (Ondrej et al., 1990; Šiffel et al., 1992; Čatský et al., 1993). Známý je rovněž značný vliv intenzity aplikovaného světla na senescenci rostlin (Vlčková et al., 2006), jak je ostatně také patrné z teoretické části této práce.

Cortleven et al. v roce 2012 provedli studii s použitím transgenních rostlin tabáku taktéž s overexpresí enzymu CKX1. V jejich práci byl patrný pokles obsahu chlorofylu a karotenoidů v rostlinách transgenní linie oproti WT (karotenoidy o přibližně 52 % a chlorofylu o přibližně 56 %). Je proto zajímavé, že během našich experimentů byl výchozí stav obsahu chlorofylu pro linii VB a WT téměř shodný. Rozdíly mohou být způsobeny tím, že v našem případě byly CKX1 enzymy overexprimovány pouze v kořeni, zato v jejich experimentálním materiálu i v nadzemní části. Nižší obsah chlorofylu v listech byl pak způsoben sníženým výchozím obsahem CK.

Při výzkumu vlivu endogenního obsahu CK a jejich exogenní aplikace na senescenci rostlin byl navržen model účinku CK. Popisuje, že CK mají na oddálení senescence pozitivní vliv jen do určité koncentrace. Při aplikaci nízkých koncentrací CK dochází ke snížení degradace chlorofylu (Selivankina et al., 2001). Při zvyšující se koncentraci nastává efekt opačný, tedy negativní a senescence je podpořena. Pro příklad v práci z roku 1990 Zacharias a Reid pozorovali po aplikaci nízké koncentrace CK (1 μ M BAP) omezení degradace chlorofylu, ale podpoření degradace chlorofylu při zvýšení koncentrace tohoto hormonu nad 100 μ M. Proto kvůli sníženému obsahu aktivních forem CK v linii VB bylo předpokládáno, že bude zjištěn rozdíl mezi účinkem aplikovaných koncentrací BAP na listy linie VB a WT. Na základě výše uvedené studie lze předpokládat, že vyšší koncentrace CK nebudou mít na obsah chlorofylu u WT pozitivní efekt či budou mít efekt přímo negativní, ale stejné množství BAP povede k pozitivnímu efektu na snížení degradace chlorofylu u linie VB (obdobně jako v bakalářské práci Melkovičové z roku 2012). Přesto, že rozdíly v obsahu chlorofylu mezi WT a linií VB nebyly značné, je z výsledků této práce patrný efekt zvyšující se koncentrace CK na omezení degradace chlorofylu pro oba genotypy rostlin, a to na pěstebním světle (grafy 3 a 4) i na světle o zvýšené intenzitě (graf 9). Navrženému modelu rozdílných účinků exogenní aplikace CK na rostliny VB a WT pak odpovídají výsledky měření koncentrace chlorofylu chlorofylmetrem SPAD u pěstebního světla (graf 3). Domníváme se, že díky sníženým endogenním hladinám CK měl BAP pozitivní efekt v nejvyšší aplikované koncentraci na omezení degradace chlorofylu u linie VB, avšak v případě WT došlo již k částečnému projevu negativního efektu.

Při aplikaci světla o zvýšené intenzitě bývají projevy senescence, včetně degradace chlorofylu, podpořeny kvůli vyššímu oxidativnímu poškození fotosyntetického aparátu (Procházková et Wilhelmová, 2007). Proto byl při aplikaci vyšší intenzity světla předpoklad, že budou pozorovány více rozdílné výsledky pro linii VB a WT. Opět bylo zaznamenáno omezení degradace chlorofylu se vzrůstající koncentrací BAP a v případě měření obsahu chlorofylmetrem SPAD došlo ke kýženému signifikantnímu prohloubení rozdílů mezi linií VB a WT u tří aplikovaných koncentrací BAP (graf 9). Výsledky rovněž naznačují, že pokles obsahu chlorofylu je u kontrolních segmentů transgenní linie VB se sníženým endogenním obsahem CK vyšší než u WT (grafy 3, 4 a 6) a při exogenní aplikaci CK dochází k vyššímu omezení degradace chlorofylu než u WT (grafy 7 a 9). V případě testu uvedeného v kapitole 4.3 (grafy 6 a 7) byl vliv vysušení během vystavení listů světlu o zvýšené intenzitě velice značný a byly získány výsledky odpovídající pokročilé senescenci.

Kromě vlivu na celkový obsah chlorofylu nás také zajímal efekt hladin CK na účinnost fotochemie fotosyntetického aparátu. Je známo, že rostliny s nižším endogenním obsahem CK jsou citlivější k vystavení světlu o vysoké intenzitě, které podmiňuje tvorbu světelného stresu a urychlení průběhu senescence. Pro příklad v roce 2014 Cortleven et al. publikovali práci, kde byly použity rostliny *A. thaliana* s overexpresí CKX4, a tudíž se sníženými endogenními hladinami CK. Měřením maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII ve stavu adaptovaném na tmu u těchto rostlin byl zjištěn signifikantní pokles hodnot oproti WT, který byl prohlouben aplikací vysoké intenzity světla ($1000 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Opět lze předpokládat, že vlivem nižších endogenních hladin CK v linii VB budou zjištěny rozdíly v účinku CK na aktivitu fotochemie PSII. Tento předpoklad se nepotvrdil, protože rozdíly mezi linií VB a WT v aktivitě fotosyntetického aparátu nebyly výrazné. Je možné, že při použití ještě vyšší intenzity světla by rozdíly mezi genotypy byly značnější, jelikož v našem případě byla aplikována intenzita světla $400 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ na rozdíl od více než 2x vyšší intenzity ve výše uvedené publikaci.

Při aplikaci pěstebního světla se vzrůstající koncentrací CK bylo dosaženo snižujících se hodnot kvantového výtěžku ve stavu adaptovaném na tmu jak u WT, tak u VB (graf 5). To odpovídalo našemu předpokladu, že vysoké koncentrace BAP nebudou mít na oddálení senescence pozitivní efekt (jako v práci Zacharias et Reid, 1990). Ve výše uvedené studii Cortleven et al. z roku 2014 po vystavení rostlin se sníženým endogenním obsahem CK světlu o vysoké intenzitě ($1000 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) byl zaznamenán velmi výrazný pokles hodnot F_v/F_m oproti WT. Proto bylo v našem experimentu předpokládáno, že při aplikaci světla o vyšší intenzitě bude s rostoucí koncentrací CK kvantový výtěžek PSII také snížen. Skutečně došlo k poklesu hodnot maximálního kvantového výtěžku PSII při aplikaci světla o vyšší intenzitě a jeho vliv je z výsledků dobře patrný (srovnání grafů 5 a 11). Zajímavé je,

že s jeho aplikací došlo k omezení snížení kvantových výtěžků fotochemické reakce se zvyšující se koncentrací BAP. Při prvním senescenčním testu se zvýšenou intenzitou světla došlo vlivem pokročilé senescence a vyschnutí listových segmentů k projevu zvyšující se koncentrace CK na snížení poklesu parametru F_v/F_m (graf 8). Nutné je také zmínit, že výsledky měření (grafy 5, 8 i 11) byly nezanedbatelně ovlivněny biologickou variabilitou listových segmentů. Zatímco jeden listový segment obstál v podmínkách senescenčního testu dobře (byl poměrně zelený, a tedy ne tak senescentní), druhý byl na pokraji smrti. To způsobilo velký rozptyl dat a značné chybové úsečky. Když uvážíme hodnoty horního a dolního kvartilu, tak přesto, že v představených grafech vidíme určitý trend, často nejsou hodnoty parametrů dosažené pro jednotlivé koncentrace BAP statisticky významné.

U výsledků měření hodnot kvantového výtěžku PSII ve stavu adaptovaném na světlo a hodnot fotochemického zhášení je vždy patrná korelace. Tato může být vysvětlena logickou úvahou: čím více energie je rostlinou použito na fotosyntézu, tím je vyšší kvantový výtěžek PSII a tím více energie není emitováno (je zhášeno užitím k fotosyntéze). Proto byly získány obdobné průběhy křivek pro ϕ_{PSII} a ϕ_P během všech měření. Oba parametry popisují kvantový výtěžek fotosystému II ve stavu adaptovaném na světlo, avšak ϕ_{PSII} je efektivním kvantovým výtěžkem, který odráží, kolik absorbovaného světla je aktuálně použito k fotochemické reakci, kdy není redukována celá zásoba plastochinonů, jen některé (Lazár, 2014). Na rozdíl od toho parametr ϕ_P odpovídá stavu, kdy je všechna zásoba plastochinonů v redukovaném stavu a fotosystém již není schopen přijímat další energii k fotochemické reakci a začínají se projevovat fotoprotektivní mechanismy (Lazár, 2014; Pavlovič et Slováková, 2015).

Při aplikaci pěstebního světla oba parametry se vzrůstající koncentrací BAP klesaly a nejvyšších hodnot dosahovaly dokonce listy, kterým nebyl podán žádný CK (graf 5). Je zajímavé, že i přes pokles hodnot jsou výsledky vyšší než u kontrolních listů. Možným vysvětlením je, že fotosystémy nebyly při oddělování listů zcela vyvinuté. Naopak při aplikaci světla o zvýšené intenzitě došlo s aplikací CK ke snížení poklesu jejich hodnot (graf 11). Z toho vyplývá, že koncentrace CK, které měly při pěstebním světle na fotosyntézu negativní efekt, měly efekt opačný při aplikaci světla o zvýšené intenzitě.

V práci Vlčkové et al. byl zkoumán vliv světla a tmy spolu s účinky CK na senescenci listů pšenice. Na kontinuálním světle při aplikaci CK docházelo k omezení degradace chlorofylu, k podpoření fotochemie PSII a k produkci asimilátů. Jejich akumulace v chloroplastech ve formě škrobu pod vlivem CK byla popsána i v pracích Paramonova et al., 2002; Wilhelmová et Kutík, 1995 či Zavaleta-Mancera et al., 1999. Akumulace asimilátů v chloroplastech však vedla ke spuštění zpětnovazebné smyčky a ke snížení své

produkce skrze omezení fotosyntézy. Toto omezení fotosyntézy není okamžité, ale projevuje se až 4. či 6. den senescenčního testu (Vlčková et al. 2006). Je proto možné, že pokud by byl senescenční test se zvýšenou intenzitou světla prodloužen o 1 či více dní, došlo by k inhibici fotochemie PSII vlivem zvyšující se koncentrace CK. Je také možné, že se negativní vliv CK projevil v prvním senescenčním testu se zvýšenou intenzitou světla podporou transpirace listových segmentů, protože CK mohou vést k otevírání průduchů a tím k větším ztrátám vody (Vlčková et al., 2006).

Při aplikaci zvyšující se koncentrace cytokininů a světla o zvýšené intenzitě dochází k nadbytečné excitaci fotosystému a k produkci kyslíkových radikálů, které jsou pro rostlinu život ohrožující a napomáhají senescenci (Vlčková et al., 2006). Proto jsou pro udržení životaschopnosti rostlin nezbytné fotoprotektivní mechanismy. Zahrnují cesty pro potlačení absorpce světla, potlačení produkce reaktivních forem kyslíku a cesty přeměny nadbytečné energie na teplo (Horton et al., 1996; Logan et al., 2014). Při vystavení rostliny vyšší intenzitě světla, než jaká je nutná pro maximální výtěžky fotosyntézy, hrozí buněčné poškození (Li et al., 2009). Ochrana fotosyntetického aparátu deaktivací nadbytečných excitací na teplo je charakterizována nefotochemickým zhášením.

Nefotochemické zhášení je velmi zajímavý parametr, který vypovídá hodně o zdravotním stavu rostliny. Jeho hodnoty by měly doplňovat ostatní měřené parametry a mělo by platit, že čím více světla je použito k fotosyntéze, tím menší je hodnota nefotochemického zhášení. Obdobně pak můžeme říct, že vyšší hodnoty NPQ odpovídají listům zatíženým světelným stresem či listům s probíhající senescencí (Logan et al., 2014).

Z výsledků je patrná korelace mezi hodnotami Φ_{NPQ} a F_v/F_m , Φ_{PSII} , Φ_P , která je běžná, jelikož vychází z jejich definice (Lazár, 2014). V případě aplikace pěstebního světla došlo se zvyšující se koncentrací CK k růstu NPQ, což není s ohledem na výsledky dalších parametrů překvapující (graf 5). Během senescence se hromadí oxidativní poškození a NPQ, které se snaží potlačit další nárůst poškození kvůli nadbytečným excitacím, roste. Při aplikaci světla o zvýšené intenzitě (graf 11) došlo k podpoře senescence, neboť hodnoty NPQ bez CK jsou mnohem nižší než u pěstebního světla, avšak se zvyšující se koncentrací BAP došlo ke snižování NPQ, což může být dáno omezením senescence působením CK.

Souhrnně můžeme konstatovat, že pozitivní účinky zvyšující se koncentrace CK na potlačení projevů senescence ječmene se projevily omezením degradace chlorofylu. Účinky rostoucí koncentrace CK na ovlivnění fotochemie fotosyntetického aparátu silně závisely na intenzitě aplikovaného světla. Pozitivní účinky zvyšující se koncentrace CK na oddálení projevů senescence byly zaznamenány při aplikaci světla o zvýšené intenzitě,

zatímco při aplikaci pěstebního světla byl vliv vyšších hladin CK negativní. Rozdíly mezi linií VB se sníženým endogenním obsahem CK a WT nebyly patrné, proto bychom pro další experimenty, které by mohly ve výzkumu pokračovat doporučili zvolit jiný výchozí materiál, který by měl ještě nižší endogenní hladiny CK. S ohledem na biologickou variabilitu v měření i přes projev určitého trendu, nebyl potvrzen efekt koncentrace CK na ovlivnění fotochemie fotosyntetického aparátu při senescenčním testu.

6 Závěr

Provedení senescenčních testů s listy ječmene setého se sníženou endogenní hladinou cytokininů a WT vedlo k několika zjištěním.

V první řadě byl prokázán vliv zvyšující se koncentrace CK na omezení degradace chlorofylu, a to jak při podmínkách pěstebního světla, tak i při vystavení listových segmentů světlu o zvýšené intenzitě. Nízké koncentrace CK vedly ke zmírnění poklesu jak obsahu chlorofylu, tak funkčnosti fotosyntetického aparátu, na rozdíl od vysokých koncentrací CK, které zmírnily pokles obsahu chlorofylu, avšak na funkčnost fotosyntetického aparátu měly ve srovnání s koncentracemi nižšími inhibiční charakter.

Výsledky této práce také naznačují, že při studiu vlivu CK na fotochemii fotosyntetického aparátu hraje důležitou roli intenzita světla. Koncentrace CK, které měly při pěstebním světle na fotosyntézu negativní efekt, měly efekt opačný při aplikaci světla o zvýšené intenzitě.

Bohužel, předpokládané rozdíly mezi linií s overexpresí proteinu CKX1 a WT nebyly patrné. Pro další experimenty, které by mohly ve výzkumu pokračovat bychom doporučili zvolit jiný výchozí materiál, který by měl ještě nižší endogenní hladiny CK a zvážit rovněž prodloužení senescenčního testu, aby se více projevil negativní vliv CK. I přes nezjištěné rozdíly mezi rostlinami se standardními hladinami CK a rostlinami se sníženým endogenním obsahem těchto hormonů byly všechny cíle práce splněny.

Seznam literatury

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2001) *Základy buněčné biologie, Získávání energie v mitochondriích a chloroplastech*. Pp. 432-436. Espero Publishing, Česká republika.

Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U, Apel K (1995) Identification of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase-a and oxidoreductase-b – a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 108, 1505-1517.

Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ (2009) Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environment* 32, 1147-1160.

Barth C, Tullio MD, Conklin PL (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany*, 57, 8, 1657-1665.

Benková E, Witters E, Van Dongen W, Kolar J, Motyka V, Brzobohaty B, Van Onckelen HA, Machackova I (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts, occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiology* 121, 245-251.

Bhargava A, Clabaugh I, To JP, Maxwell BB, Chiang YH, Schaller GE, Loraine A, Kieber JJ (2013) Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNASeq in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162, 272-294.

Biswal UC, Biswal B (1988) Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. *International Review of Cytology*, 13, 271-321.

Brouwer B, Gardeström P, Keech O (2014) In response to partial plant shading, the lack of phytochromes A does not directly induce leaf senescence but alters the fine-tuning of chlorophyll biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 65, 4037-4049.

Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262, 1051-1054.

Buchanan-Wollaston V (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiology*, 105, 839-846.

Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal* 42, 567-585.

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.

Buschmann C, Lichtenthaler H K (1977) Hill-activity and P700 concentration of chloroplasts isolated from radish seedlings treated with beta-indoleacetic acid, kinetin or gibberellic-acid. *A Journal of Biosciences: Zeitschrift Fur Naturforschung C* 32, 798-802.

Cortleven A, Schmölling T (2015) Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* 66, 16, 4999-5013.

Cortleven A, Valcke R (2012) Evaluation of the photosynthetic activity in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: lessons from cytokinin. *Physiologia Plantarum* 144, 394-408.

Čatský J, Pospíšilová J, Macháčková I, Wilhelmová N, Šesták Z (1993) Photosynthesis and water relations in transgenic tobacco plants with T-DNA carrying gene 4 for cytokinin synthesis. *Biologia Plantarum* 35, 393-399.

Demmig-Adams B, Adams WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 599-626.

Dietzel L, Pfannschmidt T (2008) Photosynthetic acclimation to light gradients in plants stands comes out of shade. *Plant Signaling and Behavior* 3, 1116-1118.

El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* 140, 1373-1383.

Fankhauser C (2001) The phytochromes, a family of red/farred absorbing photoreceptors. *Journal of Biological Chemistry* 276, 11453-11456.

Farineau N, Rousseaux J (1975) Influence de la 6-benzylaminopurine sur la différenciation plastidale dans les cotyledons de cocobre. *Physiologia Plantarum* 33, 194-202.

Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinová A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M,

- Vaňková R, Strnad M, Motyka V (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 8, 2827-2840.
- Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Grissem W (2008) Farnesylation Directs AtIPT3 Subcellular Localization and Modulates Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 146, 1155-64.
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986-1988.
- Gan S, Amasino RM (1997) Making sense of senescence: Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*, 113, 313-319.
- Hoffmann E, Stroobant V (2007) *Mass Spectrometry Principles and Applications*, John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Holub J, Hanuš J, Hanke DE, Strnad M (1998) Biological activity of cytokinins derived from ortho- and meta-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* 26, 109-115.
- Horton, P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 655-684.
- Hwang I, Sheen J, Müller B (2012) Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology* 63, 353-380.
- Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics* 38, 87-117.
- Chiang Y-H, Zubo YO, Tapken W, Kim HJ, Lavanway AM, Howard L, Pilon M, Kieber JJ, Schaller GE (2012) Functional characterization of the GATA transcription factors GNC and CGA1 reveals their key role in chloroplast development, growth, and division in Arabidopsis. *Plant Physiology* 160, 332-348.
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis (det mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology* 104, 339-347.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, 409, 1060-1063.

- Janečková H, Husičková A, Lazár D, Ferretti U, Pospíšil P, Špundová M (2019) Exogenous application of cytokinin during dark senescence eliminates the acceleration of photosystem II impairment caused by chlorophyll b deficiency in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 136, 43-51.
- Jeyapalan JC, Sedivy JM (2008) Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 129, 467-474.
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C (2010) Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology* 91, 29-66.
- Kamínek M, Vaněk T, Motyka V (1987) Cytokinin activities of N6-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Journal of Plant Growth Regulation* 6, 113-120.
- Kautsky H, Hirsch A (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 964.
- Kieber JJ, Schaller GE (2014) Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists 12, 1-35.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103, 814-819.
- Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, Sato M, Toyooka K, Keränen M, Aro EM, Fukaki H, Ohta H, Sugimoto K, Masuda T (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1081-1095.
- Köllmer I, Werner T, Schmülling T (2011) Ectopic expression of different cytokinin-regulated transcription factor genes of *Arabidopsis thaliana* alters plant growth and development. *Journal of Plant Physiology* 168, 1320-1327.
- Kraus TE, Hofstra G, Fletcher RA (1993) Regulation of senescence by benzylaminopurine and uniconazole in intact and excised soybean cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry* 31, 827-834.
- Kudo T, Kiba T, Sakakibara H (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 53-60.

- Kudo T, Makita N, Kojima M, Tokunaga H, Sakakibara H (2012) Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative cis-zeatin-O-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiology* 160, 319-331.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyoizuka J (2007) Direct control of shoot meristem activity by cytokinin activating-enzyme. *Nature* 455, 652-655.
- Kusnetsov V, Herrmann RG, Kulaeva ON, Oelmüller R (1998) Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expression of the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase. *Molecular and General Genetics* 259, 21-28.
- Lazár D (1999) Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412, 1-28.
- Lazár D (2014) Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology* 175, 131-147.
- Lerbs S, Lerbs W, Klyachko NL, Romanko EG, Kulaeva ON, Wollgiehn R, Parthier B (1984) Gene expression in cytokinin-and light-mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 162, 289-298.
- Leshem YY (1988) Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 5, 39-49.
- Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK (2009) Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* 60, 239-260.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids. Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58, 115-136.
- Lim PO, Woo HR, Nam HG (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 8, 272-278.
- Lin Ch (2002) Blue Light Receptors and Signal Transduction. *The Plant Cell Supplement* 207-225.
- Logan BA, Demmig-Adams B, Adams WW, Bilger W (2014) Context, quantification, and measurement guide for non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Non-*

Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 187-201.

Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany* 62, 5149-5159.

Lopez-Juez E, Pyke KA (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *International Journal of Developmental Biology* 49, 557-577.

Lorrain S, Allen T, Duek PD, Whitelam GC, Fankhauser C (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *The Plant Journal* 53, 312-323.

Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes and Development*, 14, 2938-2943.

Mathews S, Sharrock RA (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell and Environment* 20, 666-671.

Melkovičová H, Koncentračná závislosť účinkov cytokinínov na indukovanú senescenciu rastlín. Olomouc, 2012, pp. 61. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biofyziky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Vedoucí práce RNDr. Martina Špundová, Ph.D..

Miller CO, Skoog F, von Saltza MH, Okumura FS, Von Saltza MH, Strong FM (1955) Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* 77, 2662-2663.

Mlejnek P, Procházka S (2002) Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215, 158-166.

Mlejnek P, Doležel P, Procházka S (2003) Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell and Environment* 26, 1723-1735.

Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 89-118.

- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA, Spalding EP, Murphy AS (2003) Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423, 999-1002.
- Nooden LD, Guamet JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Plant Physiology*, 101, 746-753.
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, Doležal K, Strnad M (2008) Cytokinin Profiling in Plant Tissues Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemistry* 69, 11, 2214-2224.
- Ohya T, Suzuki H (1991) The effects of benzyladenine on the accumulation of messenger-RNAs that encode the large and small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase and light harvesting chlorophyll *a/b* protein in excised cucumber cotyledons. *Plant and Cell Physiology* 32, 577-580.
- Okazaki K, Kabeya Y, Suzuki K, Mori T, Ichikawa T, Matsui M, Nakanishi H, Miyagishima SY (2009) The PLASTID DIVISION1 and 2 components of the chloroplast division machinery determine the rate of chloroplast division in land plant cell differentiation. *Plant Cell* 21, 1769-1780.
- Ondrej M, Machačková I, Čatský J, Eder J, Hroudá M, Pospíšilová J, Synková H (1990) Potato transformation by T-DNA cytokinin synthesis gene. *Biologia Plantarum* 32, 401-406.
- Pačes V, Werstiuk E, Hall RH (1971) Conversion of N⁶-(D²-isopentenyl) adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology* 48, 775-778.
- Paramonova NV, Krasavina MS, Sokolova SV (2002) Ultrastructure of chloroplasts in phloem companion cells and mesophyll cells as related to the stimulation of sink activity by cytokinins. *Russian Journal of Plant Physiology* 49, 187-195.
- Parthier B (1979) Role of phytohormones cytokinins in chloroplast development. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 174, 173-214.
- Pavlovič A, Slováková Ľ (2015) *Metódy štúdia fotosyntézy, Fotosyntéza, Univerzita Komenského v Bratislavě*, pp. 76-79, Bratislava, Slovensko.
- Pavlů J, Novák J, Koukalová V, Luklová M, Brzobohatý B, Černý M (2018) Cytokinin at the Crossroads of Abiotic Stress Signalling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2450.

Powell AF, Paleczny AR, Olechowski, H. and Emery, R.J.N. (2013) Changes in cytokinin form and concentration in developing kernels correspond with variation in yield among field-grown barley cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 64, 33–40.

Procházková D, Wilhelmová N (2007) Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biologia plantarum* 51, 3, 401-406.

Quail PH (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell and Environment* 20, 657-665.

Quail PH (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology* 14, 180-188.

Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 11081-11085.

Riefler M, Novák O, Strnad M, Schmülling T (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, 18, 40-54.

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

Richter R, Behringer C, Müller IK, Schwechheimer C (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROMEINTERACTING FACTORS. *Genes and Development* 24, 2093-2104.

Rousseau C, Belin E, Bove E, Rousseau D, Fabre F, Berruyer R, Guillaumès J, Manceau Ch, Jacques MA, Boureau T (2013) High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9, 17, 1-13.

Sakuraba Y, Jeong J, Kang MY, Kim J, Paek NC, Choi G (2014) Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature Communications* 5, 4636.

Santoemma G (2018) Recent methodologies for studying the soil organic matter. *Applied Soil Ecology* 123, 546-550.

- Selivankina SY, Karavaiko NN, Kuiper D, Novikova GV and Kulaeva ON (2001) Cytokinin activity of zeatin allylic phosphate, a natural compound. *Plant Growth Regulation* 33, 157-164
- Shantz EM, Steward FD (1955) The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea. *Journal of the American Chemical Society* 77, 6351-6353.
- Sharma A, Agarwal SK (2019) *Senescence Signalling and Control in Plants, Plant Leaf Senescence: Integrating Multiple Environmental and Internal Cues*, Academic Press, pp. 29-40, Cambridge, USA.
- Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Manns IB (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research* 116, 241-252.
- Skalický V, Kubeš M, Napier R, Novák O (2018) Auxins and Cytokinins – The Role of Subcellular Organization on Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 10, 3115.
- Smart CM (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist*, 126, 419-448.
- Spíchal L (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* 39, 267-284.
- Staehelein L (2003) Advances in Photosynthesis and Respiration. *Photosynthesis research* 76, 185-96.
- 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 and Cell Physiology*, 42, 107-113.
- Synková H, Van Loven K, Pospíšilová J, Valcke R (1999) Photosynthesis of transgenic Pssu-ipt tobacco. *Journal of Plant Physiology* 155, 173-182.
- Šiffel P, Šindelková E, Durčan M, Zajícová M (1992) Photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* L. plants transformed by *Agrobacterium* strains. 1. Pigment apparatus. *Photosynthetica* 27, 441-447.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* 279, 41866-41872.

Taya Y, Tanaka Y, Nimishura S (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 271, 545-547.

Thakur N, Sharma V, Kishore K (2016) Leaf senescence: an overview. *Indian Journal of Plant Physiology* 21, 3, 225-238.

Thomas H, Stoddart JL (1980) Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology* 31, 83-111.

Vanstraelen M, Benková E (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28, 463-487.

Verplaetse R, Tytgat J (2011) Liquid chromatography tandem mass spectrometry in forensic toxicology: what about matrix effects? *TIAFT Bulletin* 41, 8-16.

Vinti G, Fourrier N, Bowyer JR, Lopez-Juez E (2005) *Arabidopsis* mutants with defective plastids are impaired primarily in the photocontrol of expression of photosynthesis-associated nuclear genes. *Plant Molecular Biology* 57, 343-357.

Vlčková A, Špundová M, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nau J (2006) Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126, 257-267.

von Arnim A, Deng XW (1996) A role for transcriptional repression during light control of plant development. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 18, 905-910.

Vojta P, Koka F, Husičková A, Grúz J, Bergougnoux V, Marchetti CF, Jiskrová E, Ježilová E, Mik V, Ikeda Y, Galuszka P (2016) Whole transcriptome analysis of transgenic barley with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress. *New Biotechnology*, 33, 5, 676-691.

Werner T, Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 527-538.

Wilhelmová N, Kutík J (1995) Influence of exogenously applied 6-benzylaminopurine on the structure of chloroplasts and arrangement of their membranes. *Photosynthetica* 31, 559-570.

Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that

transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, 42, 1017-1023.

Zacarias L, Reid SM (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology* 80, 549-554.

Zavaleta-Mancera H A, Thomas B J, Thomas H, Scott I M (1999) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* 50, 1683-1689.

Zhang HS, Zhou CJ (2013) Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 82, 539-545.

Zerbe R, Wild A (1980) The effect of indole-3-acetic-acid on the photosynthetic apparatus of *Sinapis alba*. *Photosynthesis Research* 1, 71-81.

Přílohy

Příloha A: Obsah trans-zeatinových forem CK v různě starých listech ječmene transgenních linií C3, C5, VF, VB a kontroly WT k výběru transgenní linie s nejnižším obsahem CK. Formy: báze (tZ), ribotidy (tZR), O-glukosidy (tZOG), ribosidy-N-glukosidy (tZROG), N-glukosidy (tZ9G), ribosidy-5-monofosfáty (tZR5'MP). Hodnoty aktivních forem CK vybrané osmi denní linie VB jsou zvýrazněné červeně. Jednotky jsou pmol/g FV. Zobrazeny průměry a SD, n=3.

Samples	tZ		tZOG		tZR		tZROG	tZ9G		tZR5'MP
WT 8-denní	3.88 ±	0.43	0.73 ±	0.06	-	-	-	4.71 ±	0.30	-
C3 8-denní	4.17 ±	0.49	0.65 ±	0.06	0.25 ±	0.03	-	4.03 ±	0.11	-
C5 8-denní	3.16 ±	0.12	0.67 ±	0.02	-	-	-	4.23 ±	0.22	-
VF 8-denní	5.04 ±	0.06	0.63 ±	0.01	-	-	-	4.71 ±	0.24	-
VB 8-denní	3.10 ±	0.14	0.75 ±	0.05	0.31 ±	0.04	-	4.27 ±	0.06	-
WT 11-denní	1.22 ±	0.10	0.95 ±	0.07	-	-	-	5.52 ±	0.23	-
C3 11-denní	1.20 ±	0.06	0.84 ±	0.05	-	-	-	5.94 ±	0.40	-
C5 11-denní	1.21 ±	0.08	0.86 ±	0.05	-	-	-	5.36 ±	0.52	-
VF 11-denní	1.48 ±	0.16	0.84 ±	0.02	-	-	-	5.90 ±	0.54	-
VB 11-denní	1.33 ±	0.14	0.85 ±	0.07	-	-	-	5.35 ±	0.14	-
WT 14-denní	2.46 ±	0.11	2.17 ±	0.08	-	-	-	14.50 ±	0.68	-
C3 14-denní	2.57 ±	0.01	2.63 ±	0.10	-	-	-	20.09 ±	0.91	1.15 ± 0.01
C5 14-denní	2.63 ±	0.12	2.32 ±	0.19	-	-	-	18.67 ±	1.52	-
VF 14-denní	2.44 ±	0.16	2.36 ±	0.13	-	-	-	16.52 ±	0.81	-
VB 14-denní	2.78 ±	0.14	2.09 ±	0.12	-	-	-	15.20 ±	1.07	1.42 ± 0.01
WT 21-denní	2.25 ±	0.15	3.18 ±	0.17	-	-	-	12.70 ±	0.87	-
C3 21-denní	1.15 ±	0.08	2.19 ±	0.19	-	-	-	10.92 ±	0.23	-
C5 21-denní	1.33 ±	0.12	3.99 ±	0.42	-	-	-	22.90 ±	2.88	-
VF 21-denní	1.28 ±	0.02	2.65 ±	0.30	-	-	-	11.99 ±	0.70	-
VB 21-denní	1.59 ±	0.10	3.53 ±	0.01	-	-	-	18.74 ±	0.61	-
WT 28-denní	3.29 ±	0.38	3.58 ±	0.06	-	-	-	19.87 ±	1.46	-
C3 28-denní	2.30 ±	0.22	3.29 ±	0.06	-	-	-	19.31 ±	0.14	-
C5 28-denní	2.29 ±	0.05	3.33 ±	0.02	-	-	-	18.84 ±	1.27	-
VF 28-denní	2.70 ±	0.19	3.84 ±	0.20	-	-	-	12.25 ±	0.79	-
VB 28-denní	2.25 ±	0.19	3.42 ±	0.32	-	-	-	11.26 ±	1.11	-

Příloha B: Obsah cis-zeatinových forem CK v různě starých listech ječmene transgenních linií C3, C5, VF, VB a kontroly WT k výběru transgenní linie s nejnižším obsahem CK. Formy: báze (cZ), ribotidy (cZR), O-glukosidy (cZOG), ribosidy-N-glukosidy (cZROG), N-glukosidy (cZ9G), ribosidy-5-monofosfáty (cZR5'MP). Hodnoty aktivních forem CK vybrané osmi denní linie VB jsou zvýrazněné červeně. Jednotky jsou pmol/g FV. Zobrazeny průměry a SD, n=3.

Samples	cZ		cZOG		cZR		cZROG		cZ9G		cZR5'MP	
WT 8-denní	1.56 ±	0.08	86.51 ±	2.51	0.60 ±	0.09	3.76 ±	0.19	-		1.44 ±	0.01
C3 8-denní	1.65 ±	0.14	102.39 ±	1.03	0.68 ±	0.07	3.26 ±	0.34	-		0.90 ±	0.04
C5 8-denní	2.17 ±	0.19	91.44 ±	5.67	1.13 ±	0.08	3.34 ±	0.11	-		1.04 ±	0.03
VF 8-denní	2.08 ±	0.02	95.51 ±	6.09	0.88 ±	0.04	2.59 ±	0.13	-		1.20 ±	0.09
VB 8-denní	1.81 ±	0.04	107.40 ±	8.00	2.49 ±	0.12	3.80 ±	0.02	-		1.09 ±	0.05
WT 11-denní	2.52 ±	0.07	146.57 ±	10.06	3.44 ±	0.29	5.61 ±	0.29	-		1.09 ±	0.12
C3 11-denní	2.13 ±	0.11	109.79 ±	1.73	2.61 ±	0.32	6.48 ±	0.15	-		-	
C5 11-denní	2.53 ±	0.04	111.64 ±	8.26	1.86 ±	0.09	5.72 ±	0.59	-		-	
VF 11-denní	3.08 ±	0.31	117.46 ±	10.32	2.50 ±	0.30	4.95 ±	0.38	0.95 ±	0.05	-	
VB 11-denní	2.24 ±	0.11	106.70 ±	6.61	1.98 ±	0.25	5.46 ±	0.13	-		-	
WT 14-denní	4.48 ±	0.26	151.67 ±	7.14	4.82 ±	0.49	4.15 ±	0.35	-		1.47 ±	0.16
C3 14-denní	7.19 ±	0.66	136.55 ±	1.45	4.00 ±	0.27	5.23 ±	0.13	-		2.19 ±	0.08
C5 14-denní	5.50 ±	0.33	128.22 ±	6.40	3.27 ±	0.44	4.19 ±	0.16	-		2.79 ±	0.09
VF 14-denní	4.66 ±	0.37	126.29 ±	5.70	3.35 ±	0.61	4.50 ±	0.34	2.15 ±	0.04	-	
VB 14-denní	5.07 ±	0.65	120.01 ±	5.31	2.25 ±	0.18	3.51 ±	0.05	-		-	
WT 21-denní	2.56 ±	0.49	99.37 ±	3.43	2.36 ±	0.80	4.44 ±	0.10	-		3.94 ±	0.10
C3 21-denní	1.87 ±	0.16	61.94 ±	4.69	0.74 ±	0.02	3.37 ±	0.26	-		1.37 ±	0.16
C5 21-denní	4.29 ±	0.22	132.39 ±	16.08	2.81 ±	0.13	5.69 ±	0.17	-		-	
VF 21-denní	2.57 ±	0.11	101.52 ±	7.41	2.21 ±	0.13	5.24 ±	0.70	-		2.06 ±	0.08
VB 21-denní	2.95 ±	0.03	109.39 ±	10.44	1.70 ±	0.26	4.77 ±	0.25	-		-	
WT 28-denní	2.07 ±	0.06	102.94 ±	5.45	2.35 ±	0.30	5.17 ±	0.15	-		4.05 ±	0.26
C3 28-denní	2.76 ±	0.17	93.13 ±	0.86	2.73 ±	0.07	5.10 ±	0.25	-		1.32 ±	0.17
C5 28-denní	2.83 ±	0.15	109.19 ±	12.57	3.19 ±	0.04	6.88 ±	0.14	-		1.23 ±	0.09
VF 28-denní	3.48 ±	0.34	112.54 ±	10.12	4.06 ±	0.16	6.56 ±	0.10	-		-	
VB 28-denní	3.25 ±	0.08	123.01 ±	10.03	5.38 ±	0.46	6.54 ±	0.83	-		1.92 ±	0.41

Příloha C: Obsah N6-(Δ^2 -izopentenyl)adeninových forem CK v různě starých listech ječmene transgenních linií C3, C5, VF, VB a kontroly WT k výběru transgenní linie s nejnižším obsahem CK. Formy: báze (iP), ribotidy (iPR), N-glukosidy (iP9G), ribosidy-5-monofosfáty (tZR5'MP). Hodnoty aktivních forem CK vybrané osmi denní linie VB jsou zvýrazněné červeně. Jednotky jsou pmol/g FV. Zobrazeny průměry a SD, n=3.

Samples	iP		iPR		iP9G		iPR5'MP	
WT 8-denní	4.42 ±	0.10	3.93 ±	0.06	-		-	
C3 8-denní	7.21 ±	0.76	4.04 ±	0.20	-		-	
C5 8-denní	10.72 ±	0.15	4.16 ±	0.26	-		-	
VF 8-denní	3.83 ±	0.27	4.05 ±	0.29	-		-	
VB 8-denní	1.49 ±	0.13	2.45 ±	0.05	-		-	
WT 11-denní	11.61 ±	1.06	5.19 ±	0.35	2.20 ±	0.20	-	
C3 11-denní	9.30 ±	0.13	4.77 ±	0.52	1.35 ±	0.00	-	
C5 11-denní	8.92 ±	0.56	4.14 ±	0.02	1.54 ±	0.07	-	
VF 11-denní	15.78 ±	0.67	5.74 ±	0.55	1.44 ±	0.04	-	
VB 11-denní	8.01 ±	0.31	3.40 ±	0.05	-		-	
WT 14-denní	26.35 ±	1.71	10.68 ±	0.53	2.90 ±	0.25	-	
C3 14-denní	79.87 ±	2.34	26.39 ±	3.04	9.05 ±	0.97	4.44 ±	0.35
C5 14-denní	53.46 ±	4.44	21.98 ±	1.71	6.37 ±	0.17	3.47 ±	0.33
VF 14-denní	31.70 ±	2.21	17.65 ±	1.80	2.88 ±	0.18	2.50 ±	0.18
VB 14-denní	58.91 ±	1.87	24.34 ±	0.38	7.21 ±	0.59	5.38 ±	0.08
WT 21-denní	24.69 ±	0.18	10.92 ±	0.52	3.04 ±	0.15	-	
C3 21-denní	33.81 ±	1.83	9.70 ±	0.57	3.03 ±	0.39	1.02 ±	0.03
C5 21-denní	50.35 ±	3.60	21.81 ±	1.16	4.33 ±	0.44	2.33 ±	0.04
VF 21-denní	27.66 ±	1.94	11.44 ±	0.52	1.86 ±	0.20	-	
VB 21-denní	55.01 ±	1.02	20.16 ±	0.95	3.80 ±	0.37	2.26 ±	0.30
WT 28-denní	11.21 ±	1.35	6.01 ±	0.17	1.03 ±	0.11	-	
C3 28-denní	48.48 ±	3.57	20.64 ±	1.90	3.27 ±	0.18	1.48 ±	0.05
C5 28-denní	44.60 ±	3.51	26.72 ±	0.54	2.71 ±	0.10	3.00 ±	0.06
VF 28-denní	32.42 ±	4.04	21.55 ±	1.00	1.50 ±	0.24	2.56 ±	0.41
VB 28-denní	26.08 ±	1.30	16.98 ±	2.00	1.34 ±	0.20	1.86 ±	0.27