

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



Monika Pokorná

Cytokininy a senescence rostlin

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím všech uvedených literárních pramenů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27.8.2012

Podpis

Monika Pokorná

Poděkování

Ráda bych na úvod poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za její nekonečnou trpělivost, nesmírnou obětavost i nezdolnou vytrvalost, které prokázala během vedení této práce. Děkuji za každou šanci, kterou jste mi velkoryse dala, i když já všechny ty předchozí promarnila, za Váš optimismus a srdečný přístup, který mě po celou dobu provázel. Děkuji také svým konzultantkám Mgr. Haně Ševčíkové a RNDr. Petře Maškové, Ph.D. za pomoc při hledání studijních materiálů, cenné rady při psaní a hlavně slova povzbuzení. Mé poděkování patří i celé mé rodině, zvláště mamince a prarodičům, též kamarádkám, protože bez jejich podpory bych to nikdy nedokončila.

Abstrakt

Senescence je přirozený proces, který je součástí vývojového programu rostliny. Nástup senescence ovšem může být výrazně ovlivněn podmínkami prostředí. Důležitou součástí senescence rostliny je senescence listů projevující se mimo jiné rozpadem chloroplastů, což je spojeno s mobilizací dusíku obsaženého v proteinech zajišťujících jejich funkci. Správné načasování přirozené senescence je ovšem pro rostlinu velmi podstatné. Zahájení i průběh senescence je ovlivněn řadou faktorů. Do kontroly senescence jsou různou měrou zapojeny hormony, regulační faktory, probíhá i na úrovni epigenetických procesů. Listová senescence může být vyvolána širokou škálou vnějších (světelné podmínky, teplota, dostupnost vody a minerálů, útok patogena) i vnitřních (hladina cukrů, hormonů, věk, vývojová fáze) podmínek. Stejně jako mnoho dalších vývojových procesů i senescence je výrazně regulována fytohormony. Etylén, kyselina abscisová, kyselina salicylová a metyljasmonát podporují stárnutí listů, naproti tomu cytokininy procesy spojené se senescencí oddalují a zpomalují její průběh. Studium cytokininů bývá spolu s analýzami chlorofylu důležitou součástí každého výzkumu senescence. Tato práce sumarizuje literární data týkající se regulace senescence s akcentem na roli cytokininů v řízení tohoto procesu.

Klíčová slova: senescence, cytokininy, IPT, cukry, metabolismus dusíku a uhlíku

Abstract

Senescence is a natural process, which is a part of plant developmental programme. However, the onset of senescence can be greatly influenced by external conditions. An important part of plant senescence is a senescence of leaves manifested by chloroplasts breakdown. That is connected to mobilization of nitrogen contained in proteins, which provide their function. However, the correct timing of natural senescence is substantive for the plant. The initiation as well as the process of natural senescence is influenced by several factors. Senescence is in varying degrees controlled by phytohormones, regulation factors and it is also driven by epigeneticall processes. Leaf senescence can be caused by several exogenous (light conditions, temperature, water and mineral availability, pathogen attack) and internal (carbohydrate levels, hormones, age, developmental stage) conditions. As well as many other developmental stages, senescence is greatly regulated by phytohormones. Ethylene, abscisic acid, salicyl acid and methyljasmonate support leaf aging, on contrary cytokinins delay senescence associated processes. Studying of cytokinin with chlorophyll analysis is an important part of every study of senescence. This work summarizes literature information of regulation of senescence with an accent on the role of cytokinins in driving of this process.

Key words: senescence, cytokinins, IPT, sugars, metabolism of nitrogen and carbon

Obsah

1. Úvod	7
2. Senescence.....	8
2.1. Listová senescence	9
3. Faktory ovlivňující listovou senescenci.....	12
3.1. Vnější faktory.....	12
3.1.1. Světlo	12
3.1.2. Živiny.....	12
3.2. Vnitřní faktory	13
3.2.1. Cukry.....	13
3.2.2. Hormony	15
3.2.2.1. Etylén	16
3.2.2.2. Kyselina abscisová	17
3.2.2.3. Jasmonáty.....	18
4. Cytokininy	19
4.1. Využití transgenních rostlin s ovlivněným metabolismem cytokininů.....	21
4.1.1. Rostliny transformované <i>IPT</i> genem.....	21
4.1.2. Rostliny transformované <i>CKX</i> genem	23
4.2. Interakce cytokininů s dalšími faktory ovlivňujícími senescenci.....	23
4.2.1. Interakce dusíku a cytokininů.....	23
4.2.2. Interakce cytokininů se světlem	24
4.2.3. Cytokininy a abiotický stres	25
4.2.4. Cytokininy a cukry	25
4.2.5. Interakce cytokininů s dalšími hormony.....	26
5. Závěr	27
6. Přehled použité literatury	28

Seznam použitých zkratk

Rubisco	ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza
HPR	NADH-dependentní hydroxypyruvátreduktáza
SAGs	geny spojené se senescencí (SAG2, SAG12, SAG13)
CKX	cytokininoxidáza/dehydrogenáza
N	dusík
P	fosfor
C	uhlík
NR	nitrátreduktáza
AP	kyselá fosfatáza
HXK	hexokináza
AtHXK1	hexokináza Arabidopsis
T6P	trehalóza-6-fosfát
SnRK1	„sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1“
TOR	„target of rapamycin“
Sir2	„silent information regulator-2“
PSAG	promotor se senescencí spojeného genu
PAGs	geny spojené s fotosyntézou
ACC	kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová
WT	divoký typ rostliny
ABA	kyselina abscisová
MeJA	metyljasmonát
JA	kyselina jasmonová
SA	kyselina salicylová
gin	mutant „glucose insensitive“
etr1	mutant „ethylene resistant“
ein2	mutant „ethylene insensitive“
eti	mutant „ethylene insensitive“
ctr1	mutant „constitutive ethylene responses“
old	mutant „onset of leaf death“
aba	mutant „ABA deficient“
abi	mutant „ABA insensitive“

coi	mutant „JA insensitive“
BA	benzyladenin
iP	izopentenyladenin
IPT	izopentenyltransferáza
ZR	zeatin ribozid
DHZR	dihydrozeatin ribozid
iPR	izopentenyl ribozid
iPRMP	izopentenyl ribozid monofosfát
ZRMP	zeatin ribozid monofosfát
DHZRMP	dihydrozeatin ribozid monofosfát
ZROG	zeatin ribozid O-glykozid
DHZROG	dihydrozeatin ribozid O-glykozid
HvCKX1	cytokininoxidáza/dehydrogenáza ječmene
TrCKX2	cytokininoxidáza/dehydrogenáza jetele

Poznámka: V odborné literatuře se vyskytuje několik způsobů značení genů a jejich jednotlivých produktů. Pro účely této práce je to takto: nemutované geny jsou psány velkými písmeny a kurzívou (*IPT*), mutované malými písmeny a kurzívou (*ein*); proteiny jsou značeny velkými písmeny bez použití kurzívy (*IPT*).

1. Úvod

Senescence rostlin je přirozený vývojový proces, který neodmyslitelně patří k životu každé rostliny, většinou uzavírá její vývoj, končí smrtí. Listová senescence je kritický proces pro fitness rostliny a hraje důležitou roli při evoluci rostlin. Protože jednotlivé rostlinné druhy i jejich jednotliví zástupci stárnou různou rychlostí, neumírají ve stejném okamžiku, z totožné příčiny, délka této fáze je různá. Odpovídá reprodukční strategii a genetickému programu konkrétní rostliny. Senescence nemusí být vždy striktně vázána na úplný závěr života. Během vývoje rostliny se symptomy senescence mohou objevovat a zase mizet v závislosti na prostředí a genotypu jedince. Mohlo by se zdát, že senescence je pro rostlinu zcela nežádoucí, degenerativní proces, kterým všechno končí. Avšak právě díky senescenci, při které dochází k recyklaci a redistribuci řady živin, může rostlina přežít v čase dál (Guiboileau et al., 2010).

2. Senescence

Senescence je složitý komplex rozmanitých dějů, jež jsou spuštěny v reakci na mnoho různých podnětů, a navzájem se od sebe liší nejen nástupem, průběhem, ale i faktory, jež je ovlivňují. Proto existuje několik způsobů klasifikace. Jedním z možných kritérií je okamžik, kdy senescence nastupuje. Pokud je to ve shodě s genetickým programem rostliny, přirozený důsledek jejího stárí, pak se jedná o tzv. vývojovou senescenci (Gan a Amasino et al., 1997). Pokud tomu tak není, rostlina by měla správně pokračovat v jiné vývojové fázi, taková senescence se označuje jako předčasná. Na senescenci se lze dívat jako na proces, který postihuje rostlinu jako celek (tzv. celorostlinná senescence), končí smrtí individua. Konkrétním příkladem může být monokarpická senescence celé řady jednoletých rostlin (např. pšenice, kukuřice). Klíčovým momentem v životním cyklu rostliny je iniciace kvetení. Tento přechod z vegetativní do generativní fáze s sebou nese řadu změn (v rostlinném metabolismu, redistribuci a dělení živin), které slouží jako signál ke spuštění senescence. V důsledku ukončení vegetativního růstu dochází nejprve ke snížení aktivity kambia, což se odráží i na snížení floémové aktivity, distribuci živin (Noodén et al., 1990). Výrazné změny v distribuci živin jsou spojeny s růstem plodů a semen, které představují nové sinky, soutěžící se zbytkem rostliny o živiny. Po produkci plodů celá rostlina (např. pšenice) náhle zežloutne a zemře i v ideálních růstových podmínkách (Sýkorová et al., 2008). O tom, jak významný dopad má kvetení na proces senescence, svědčí i řada experimentů, při kterých bylo oddělením květů, či plodů docíleno obnovy vegetativního růstu, prodloužení života rostliny. Protipólem monokarpické senescence je senescence polykarpických druhů rostlin, kde redistribuce živin, tvorba uhlíkových a dusíkových zásob, hospodaření se zdroji vede k jejich dlouhověkosti. Smrt vytrvalých druhů může být pak zaviněna nedostatkem živin kvůli zvýšenému poměru sink/zdroj, který je způsoben akumulací minerálů, solí a dalších toxických látek během života rostliny. Senescenci rostliny je možné také vnímat jako soubor dílčích senescencí jednotlivých rostlinných orgánů v průběhu celého vývoje rostliny. Protože, co platí pro jednu část rostliny, to nemusí platit pro jinou, i zde se vyčleňuje řada typů (např. senescence květů, senescence kořenů, senescence specializovaných buněčných typů, senescence listů). Příčiny, průběh, projevy a faktory, jež senescenci ovlivňují, budou detailněji probrány na příkladu listové senescence.

2.1. Listová senescence

Listová senescence je nedílnou součástí životního cyklu rostlin. Tento vysoce regulovaný, aktivní proces představuje poslední fázi vývoje listu, která vede k programované buněčné smrti a končí opadem listu (Gan a Amasino, 1995). Nejnápadnější bývá na podzim, kdy se listnaté stromy hromadně zbavují pestrobarevných listů během tzv. sezónní listové senescence. Reagují tak na změnu délky dne a chladnější teploty. Vývojová listová senescence neprobíhá pouze od září do listopadu, ale v průběhu celé vegetační sezóny, a to dokonce i za předpokladu, že rostlina roste v ideálních podmínkách (dostatek živin, optimální fotoperioda a teplota) (Gan a Amasino, 1997). Tato tzv. sekvenční listová senescence postihuje listy v okamžiku, kdy dosáhnou určitého věku, přestanou efektivně plnit svou asimilační funkci, např. z důvodu zastínění mladšími listy. Je tedy výsledkem kompetičního boje mladších a starších listů o zdroje, není nutně podmíněna kvetením jako celorostlinná senescence (Wingler et al., 2010). Ačkoliv senescence patří mezi přirozené procesy dospívání listu, může být vyvolána i předčasně řadou podnětů pocházejících z prostředí (environmentálními stresy jako nedostatek minerálních živin, sucho, zatopení, zima, útok patogenu atd.).

Během této důležité závěrečné etapy, která může být stejně dlouhá jako předchozí dospívání listu, buňky prodělávají řadu pravidelných změn v buněčné struktuře, metabolismu a genové expresi (Buchanan-Wollaston, 1997). Jednou z nejvýznamnějších změn je rozpad chloroplastu. V chloroplastu se vyskytuje většina listových proteinů a metabolických enzymů zapojených do fotosyntézy, fotorespirace, asimilace dusíku a biosyntézy aminokyselin. Proto není divu, že v průběhu senescence obvykle dochází ke snížení hladiny enzymů zapojených do fotosyntetického metabolismu (NADH-dependentní hydroxypyruvátoreduktáza (HPR), ribulóza-1,5-bisfosfátcarboxyláza/oxygenáza (Rubisco), plastidová Fru-1,6-bisfosfatáza, plastidová aldoláza, NADP-dependentní glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, NADP-dependentní malátdehydrogenáza aj.), tím k mobilizaci dusíku obsaženého v těchto fotosyntetických proteinech (Wingler et al., 1998). Rozkladné procesy se netýkají pouze makromolekul (proteinů, RNA a membránových lipidů), ale také chlorofylu. Senescence se projevuje výrazným poklesem množství chlorofylu *a* i *b* v chloroplastech (např. Schlüter et al., 2011). Toho se hojně využívá ve studiích jako měřítka při posuzování, v jakém úseku života listu došlo k pozorované změně (např. zvýšení exprese genu). Změny v obsahu chlorofylu totiž neprobíhají pouze v období senescence, ale postupně během celého vývoje.

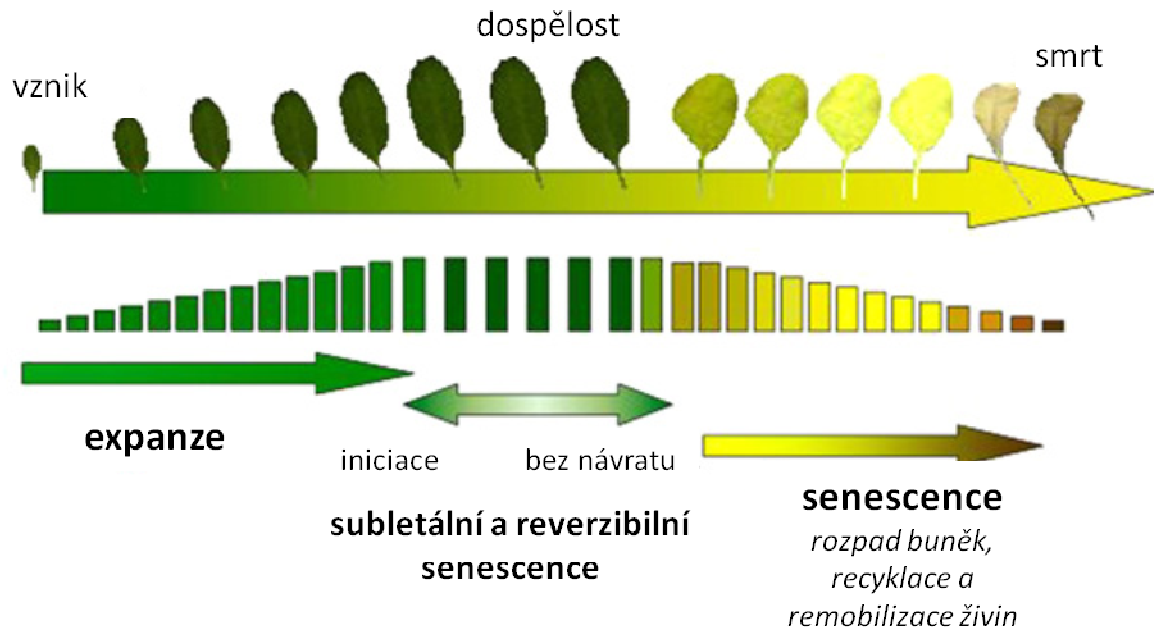
Analýzou chlorofylu se dá zjistit, ve které fázi se list v době zpracování nacházel - ve fázi expanze, dospělosti, nebo senescence (Evans et al., 2012). To, co zůstane po štěpení hydrolytickými enzymy, je následně přepravováno floémem zpět do částí rostliny, kde jsou jednotlivé komponenty využity pro opětovnou syntézu. Díky recyklaci materiálu akumulovaného během růstu a dospívání může rostlina cenné živiny znovu použít např. pro vytvoření nových sinkových orgánů.

Přirozená senescence v listech probíhá koordinovaně na úrovni celého listu, začíná od špičky a krajů směrem k bázi listu. Jak již bylo naznačeno, nemusí probíhat v návaznosti na senescenci jiných orgánů. O tom, že list stárne, probíhá rozpad fotosyntetického aparátu, neklamně informuje typické žloutnutí. Podobně jako u celorostlinné senescence i u senescence listů jednoletých rostlin je klíčový tlak sinkových orgánů (plodů a semen), který umocňuje symptomy senescence. Remobilizace živin ze zdroje do sinku hraje významnou roli i u víceletých rostlin (např. listnatých stromů), kde se živiny získané při listové senescenci uplatňují až v následující vegetační sezóně; nahromaděné živiny v kmeni (organický dusík, minerály a cukry) pomáhají oživení stromů na jaře.

Správné načasování přirozené senescence je pro rostlinu klíčové. Bez těsné koordinace nástupu a doby trvání senescence s vývojem sinku by remobilizace živin nebyla příliš účinná, což by znamenalo tvorbu plodů a semen. Molekulární regulaci zajišťuje velké množství genů, které jsou up-regulovány během senescence. Byly postupně izolovány z cDNA ze senescentních listů celé řady rostlin, dostaly souborné označení *SAGs* (tzv. geny spojené se senescencí) (Lohman et al., 1994; Buchanan-Wollaston, 1997; Quirino et al., 2000). Důkazem o tom, že se opravdu jedná o geny zodpovědné za regulaci mobilizace živin rozpadem molekul, je kromě zvýšené exprese během senescence i fakt, že *SAG2* a *SAG12* patří do skupiny cystein proteáz (proteolytických enzymů) (Lohman et al., 1994). Podobně jako pokles obsahu chlorofylu i změna v expresi a regulaci některých *SAG* genů (*SAG12* a *SAG13*) je hojně využívaným nástrojem k určení nástupu a pokroku senescence (Gan a Amasino, 1995).

Zahájení i průběh senescence je ovlivněn řadou faktorů. Do kontroly senescence jsou různou měrou zapojeny hormony, regulační faktory, probíhá na úrovni epigenetických procesů. Přesnou identifikaci signálů, regulačních mechanismů a genů, které vyvolávají listovou senescenci, komplikuje skutečnost, že u některých rostlinných druhů (např. tabáku) je senescence reverzibilní. Zdá se, že v rámci senescence existuje období adaptace, během

kterého dochází ke střídání projevů senescence a obnovy (viz Obr. 1). Toto časové okno umožňuje rostlinám přizpůsobit se kolísajícím podmínkám prostředí.



Obr. 1: Schematické znázornění hlavních vývojových fází listu-expanze, dospělosti a senescence. Fáze dospělosti listu začíná v okamžiku, kdy je list plně rozvinut, končí ve chvíli, kdy se objeví první viditelné symptomy senescence (např. žloutnutí). Během této doby list postihují epizodní projevy senescence v závislosti na proměnlivosti životních podmínek. Rostlina jim čelí pomocí faktorů dlouhověkosti. Ve chvíli, kdy již není schopna déle vzdorovat, list nenávratně spěje ke smrti. Upraveno podle Guiboileau et al., 2010.

3. Faktory ovlivňující listovou senescenci

Listová senescence může být vyvolána širokou škálou vnějších (environmentálních jako změna světelného toku a jeho kvality, teploty, sucho, nedostatek minerálů, útok patogenu) i vnitřních (fyziologických jako hladiny cukrů a hormonů, věk, reprodukce).

3.1. Vnější faktory

3.1.1. Světlo

Role světla v senescenci listu je zatím nevyjasněná. Brzdí světlo senescenci, nebo ji urychluje? Obecně lze říci, že senescence probíhá rychleji ve tmě než na světle. Pokusy Schlüter et al. (2011) naznačují, že světlo na jednu stranu dokáže mírně zpomalit jinak rychlou degradaci chlorofylu *a*, zapříčinit pomalejší úbytek fotosyntetických proteinů, tj. zmírňuje projevy přirozené senescence, na druhou stranu však rychle odbourává karotenoidy spuštěním oxidačních procesů, a zvyšuje aktivitu CKX (cytokininoxidázy/dehydrogenázy), tím senescenci podporuje. Světlo je hlavním faktorem v regulaci syntézy HPR (NADH-dependentní hydroxypyruvátoreduktáza), enzymu fotorespiračního cyklu uhlíku, který katalyzuje redukci hydroxypyruvátu na glycerát. Dostatečná ozáření (PDF=250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vede k rychlé syntéze HPR, zpomaluje senescenci (Wingler et al., 1998). Naopak příliš vysoké dávky světla vedou k předčasné senescenci (Noodén et al., 1996).

3.1.2. Živiny

Jednou z příčin předčasné senescence může být nedostatek dusíku (N) nebo fosforu (P), způsobený nízkou dostupností těchto prvků v půdě, či nízkou asimilační kapacitou rostliny. Tento deficit vede k zastavení vegetativního růstu, listové senescenci (Jordi et al., 2000; Sýkorová et al., 2008), tvorbě listových chloróz, může skončit smrtí rostliny. Klíčovými enzymy, které ovlivňují efektivní využívání zmíněných prvků, jsou nitrátoreduktáza (NR), která katalyzuje redukci dusičnanů na dusitany při asimilaci dusíku, a kyselá fosfatáza (AP). Při nedostatku N a P aktivita NR klesá. U P deficiencie je to asi nedostatek ATP, který limituje NR. V případě hladovění P dochází ke zvýšení exprese AP, která může urychlit remobilizaci fosforu ze starších do mladších listů. Nedostatek dusíku senescenci dokáže nejen vyvolat, ale zřejmě i urychlit (Jordi et al., 2000; Pourtau et al., 2004). Avšak důležitým parametrem, který podléhá složité regulaci a je pro růst a vývoj rostliny klíčový, je rovnováha mezi dostupností

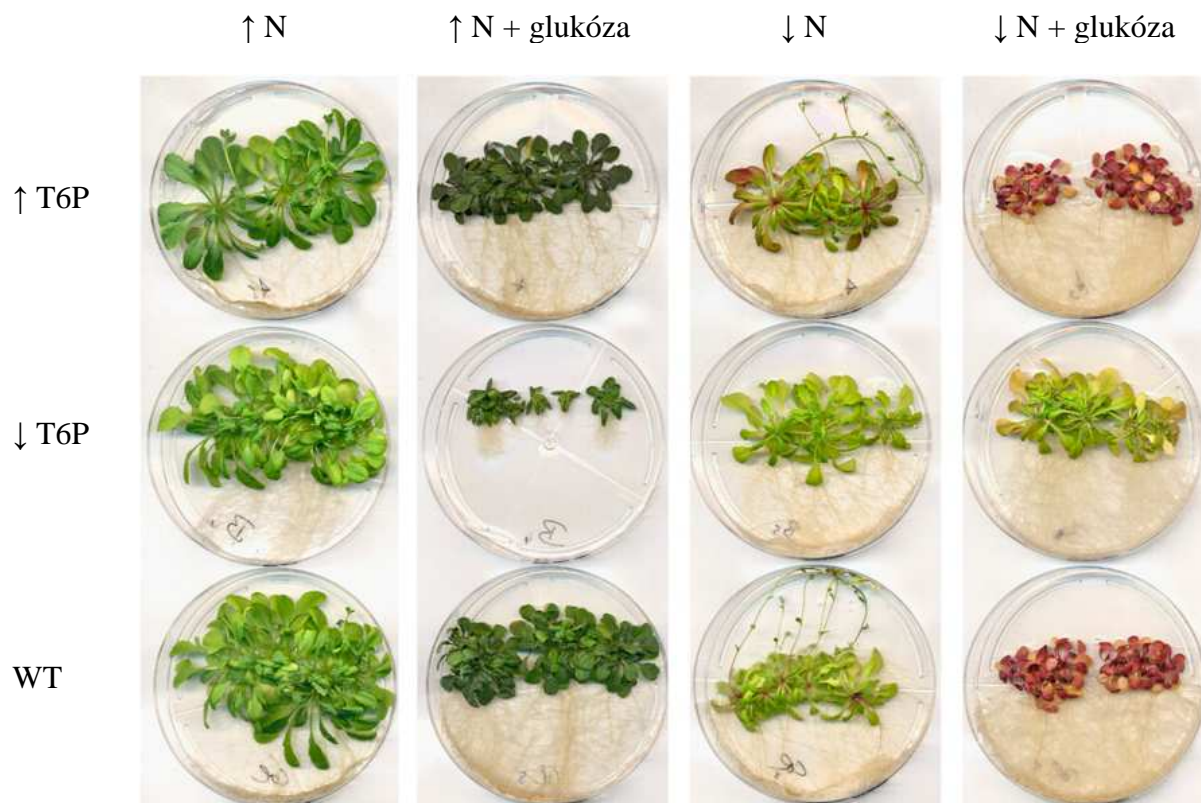
jednotlivých živin. Nepřekvapí tedy, že dalším faktorem ovlivňujícím senescenci je dostupnost uhlíku (C). Během senescence se díky degradaci složek fotosyntetického aparátu snižuje fixace uhlíku, roste obsah dusíku. Spíše než absolutní hodnoty dostupnosti C a N je skutečným signálem pro spuštění senescence jejich poměr. Vysoká hladina uhlíku v poměru k hladině dusíku může spustit proces senescence, neboť vysoké poměry C/N v listech signalizují snížený požadavek na investici dusíku do fotosyntetického aparátu (viz Pourtau et al., 2004).

3.2. Vnitřní faktory

3.2.1. Cukry

Svůj nemalý podíl na regulaci senescence listů mají i cukry. S přibývajícím věkem rostlin se zvyšují obsahy glukózy a fruktózy v listech. Zvyšující se hladiny sacharidů jsou doprovázeny symptomy senescence, typicky žloutnutím. Příčinou hromadění cukrů během senescence je rozklad akumulovaného škrobu nebo preferenční export N z listu (Wingler et al., 1998). Obsah dusíku ovlivňuje akumulaci cukrů i během růstu na médiu obsahujícím glukózu, a sice cukry se hromadí více v podmínkách bez N. Tato zvýšená akumulace při nedostatku N je pravděpodobně způsobena sníženým využitím cukru pro syntézu aminokyselin a bílkovin. Účinek limitace dusíku na akumulaci cukrů může být silnější v senescentních listech (Pourtau et al., 2004). Senescenci kontroluje hexokináza (HXK), enzym, který katalyzuje fosforylaci glukózy a fruktózy, současně působí jako senzor dostupnosti glukózy, schopný generovat signál řídicí celou řadu procesů v rostlině (Dai et al., 1999; Moore et al., 2003). Spojení mezi HXK a senescencí bylo poprvé dokázáno na rostlinách rajčete (*Solanum lycopersicum*), u kterých se projevila zrychlená senescence listů, a to v souvislosti s nadměrnou expresí a aktivitou genu *AtHXK1* (*Arabidopsis* hexokináza) (Dai et al., 1999). Další podpora pro regulační roli *AtHXK1* v senescenci byla nalezena ve studiích s *gin2* mutanty (glucose insensitive). Tyto rostliny *Arabidopsis* s mutací v *AtHXK1* vykazovaly opožděnou listovou senescenci v přítomnosti glukózy v růstovém médiu i při vysokém ozáření (Moore et al., 2003). Hexokináza není jediná, která vnímá hladiny cukrů a předává tuto informaci dál. Snímání a generování cukerného signálu probíhá i přes trehalóza-6-fosfát (viz obr. 2; Wingler et al., 2012) či stěnovou invertázu (Balibrea Lara et al., 2004). Je také možné, že akumulace cukrů spouští rostlinné obranné reakce proti patogenům, které vedou k iniciaci senescence (Yoshida et al., 2002).

Cukry ale nemusí být vždy přímou příčinou stárnutí. Cukerná signalizace je totiž součástí komplexní signalizační sítě, ve které se uplatňují signalizační dráhy dostupnosti živin, ale také řada dalších signálů např. vyplývajících z biotického a abiotického stresu (Wingler a Roitsch, 2008). Glukóza v kombinaci s nízkou hladinou dusíku vyvolává žloutnutí a měnění (způsobem specifickým pro senescenci) expresi genů v listech *Arabidopsis* (Pourtau et al., 2004). Interakce cukrů a dusíku v regulaci listové senescence jsou způsobeny buď komunikací mezi jejich signalizačními dráhami, nebo metabolickými interakcemi (viz vliv dodávek dusíku na akumulaci cukrů; Pourtau et al., 2004). Při velmi nízké ozáření glukóza způsobuje pokles v HPR (Wingler et al., 1998). U izolovaných heterotrofních rostlinných pletiv, jako jsou pletiva kořenové špičky (James et al., 1993), je naopak stárnutí cukry zpomaleno. Sacharidy u autotrofních a heterotrofních rostlinných pletiv spouští různé signální odpovědi. Jednou z nich může být i autofagie.



Obr. 2: Interakce cukerné signalizace a hladin dusíku.

↓ T6P-mutant se sníženou expresí T6P, ↑ T6P-mutant se zvýšenou expresí T6P, ↓ N-nízký obsah dusíku v médiu, ↑ N-vysoký obsah dusíku v médiu. Převzato a upraveno z Wingler et al., 2012.

Autofagie je evolučně konzervovaný proces, který přispívá k degradaci makromolekul u zvířat, kvasinek a rostlin. U zvířat a kvasinek slouží k odstraňování poškozených bílkovin a organel, je alternativou apoptózy (tzv. buněčná smrt typ II). U rostlin se uplatňuje také při programované buněčné smrti, která je součástí řady vývojových procesů, včetně senescence (Wingler et al., 2009). Pravděpodobně je nutná pro degradaci Rubisco během senescence (Ishida et al., 2008). Autofagie je zároveň zapojená do imunitní odpovědi rostlin na patogeny, pomáhá listům přežít v podmínkách nedostatku živin. Není tedy divu, že regulace autofagie je dalším faktorem, který může ovlivnit průběh senescence. Ukázalo se, že mutace v autofágických genech u *Arabidopsis* vyvolávají příznaky předčasného žloutnutí listů. Avšak pouze u nejstarších listů v růžici (Thompson et al., 2005). Někteří autoři se domnívají, že autofagie ovlivňuje remobilizaci živin a odstranění odpadu před i během senescence podobně jako v živočišných buňkách (Wingler et al., 2009). Proces nemusí být vyvolán jen cukerným hladověním, ale též samotnou senescencí, tmou i glukózou v kombinaci s nízkým obsahem dusíku (s vysokým obsahem dusíku to neplatí). Zdá se, že i zde se uplatňuje C/N bilance; mutanti v autofágických genech jsou hypersenzitivní na nedostatek uhlíku (Thompson et al., 2005). Do odpovědi na vyčerpání C je zapojena i SnRK1 (sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1). Nadměrná exprese její katalytické podjednotky KIN10 zvyšuje expresi genů běžně potlačovaných cukry, vede k indukci autofágických genů, dovede opozdit kvetení i senescenci. Metabolické regulace neplatí pouze pro rostliny, možné paralely můžeme nalézt i u heterotrofních organismů-kvasinek, bezobratlých i savců, kterým mohou různá dietní omezení (např. zředění růstového média, snížení dostupnosti potravy), snížení TOR (target of rapamycin) signalizace, NAD/NADH poměru či aktivace Sir2 (silent information regulator-2) prodloužit život.

3.2.2. Hormony

Stejně jako mnoho dalších vývojových procesů i senescence je pod hormonální kontrolou. Zatímco etylén, kyselina abscisová, kyselina salicylová a metyljasmonát podporují stárnutí listů a děloh (Grbić et al., 1995; Pourtau et al., 2004; Naik et al., 2002, Ananieva et al., 2004), cytokininy naopak procesy spojené se senescencí oddalují (Sýkorová et al., 2008). S opožděním senescence bývají spojovány i další fytohormony-auxiny a gibbereliny. Nicméně jejich přesný účinek není objasněn.

O fytohormonech lze obecně říci, že jejich efekt na růstové a vývojové procesy závisí na schopnosti buněk rozeznat signál pomocí specifických receptorů a reagovat na něj. Zda bude signál rozpoznán nebo ne, zda buňka zareaguje či nikoliv, je dáno citlivostí buňky (množstvím receptorů pro daný signál), stavem buňky (např. stupněm diferenciaci, trofickými poměry), také silou signálu (koncentrací fytohormonu). Konkrétní hladina fytohormonu v určitém okamžiku je výsledkem několika procesů a řady interakcí. Odpovídá intenzitě biosyntézy a degradace v místě vzniku fytohormonu, rychlosti jeho transportu do místa odpovědi a intenzitě odbourávání nebo reverzibilní inaktivaci v místě působení v dané chvíli. Odráží vzájemné působení fytohormonů.

Koncept „senescence window“ říká, že pro kontrolu každé ze tří fází listové senescence jsou typické interakce jiných hormonů. Zatímco na počátku vývoje listu, kdy senescence neprobíhá, význam poměru hladin jednotlivých hormonů není tak výrazný, další fáze adaptivní senescence je na něm závislá. S přibývajícím věkem klesá účinek hormonů, které senescenci oddalují, roste vliv hormonů zesilujících senescenci.

3.2.2.1. Etylén

Etylén je v širokém povědomí veřejnosti znám jako hormon, který ovlivňuje dozrávání ovoce. Avšak jeho vliv na růst a vývoj rostlin je mnohem rozsáhlejší. Hladina etylénu se zvyšuje také při stresu, po poranění, během senescence a opadu listů. Exogenní aplikace etylénu nebo jeho prekurzoru ACC (kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová) urychluje listovou senescenci (Grbić et al., 1995; Kudryakova et al., 2001). Zvýšená produkce etylénu se pak na první pohled projevuje blednutím (snížením obsahu barviv) a ztrátou chlorofylu, tj. znaky typickými pro květní i listovou senescenci. O významu etylénu v senescenci svědčí i fakt, že inhibitory syntézy či působení etylénu senescenci květů a listů zpomalují (Abeles et al., 1992). Konkrétní důkazy o zapojení etylénu do listové senescence pocházejí z experimentů s mutanty *Arabidopsis* necitlivými na etylén *etr1-1* (ethylene-resistant1) a *ein2/ore3* (ethylene-insensitive2). Oba dva mutantní si udrželi chlorofyl i další složky chloroplastů po delší dobu než WT (divoký typ rostliny) (Oh et al., 1997). Tyto projevy odpovídaly opožděné indukci *SAG* genů a vyšší úrovni exprese *PAGs* (genů spojených s fotosyntézou) u mutantů *etr1-1*. Při exogenní aplikaci etylénu u WT tomu bylo přesně naopak. Byla zaznamenána rychlejší indukce *SAG* genů a snížená exprese *PAG* genů. To vede k názoru, že etylén urychluje senescenci prostřednictvím indukce *SAG* genů (Grbić et al., 1995). Jak se ukázalo analýzou sbírky *old* mutantů (onset of leaf death), tento vliv etylénu

koreluje se stářím listu; s věkem listu se účinek etylénu na senescenci zvyšuje (Jing et al., 2005), v dospělých listech etylén indukuje mnohem vyšší hladiny *SAG* genů (Grbić et al., 1995). Nicméně výsledný dopad etylénu na senescenci nemusí být vždy stejný. Je-li koncentrace etylénu udržována přirozeně (např. *ctr1* mutanti (constitutive ethylene responses)) či uměle (nepřetržitá přítomnost exogenního etylénu) dlouhodobě vysoká, listy se stanou odolnými vůči etylénu. V takovém případě k urychlení senescence etylénem nedojde (Kieber et al., 1993).

3.2.2.2. Kyselina abscisová

Listovou senescenci může spustit i exogenní aplikace kyseliny abscisové (ABA) (Pourtau et al., 2004). Určení přesné signalizační dráhy, kterou se tak děje, komplikuje skutečnost, že v jedné buňce se nachází několik typů receptorů ABA, signál ABA je přenášen pomocí vícero drah a ovlivňuje expresi řady genů. Mezi geny řízené signálem ABA patří mimo jiné i ty kódující enzymy sacharidového metabolismu. Existuje celá řada mutantů *Arabidopsis*, kteří mají sníženou citlivost na cukry během raného vývoje. Většina z nich pak patří buď mezi mutanty *abi* (ABA insensitive), nebo mutanty *aba* (ABA deficient). Při hledání cesty, jakou ABA na senescenci působí, bylo provedeno několik experimentů s těmito mutanty s cílem zjistit vztah mezi cukernou signalizací a ABA. Mutanti *abi4-1* stárli rychleji než WT. Podobně na tom byli i *aba1-1* a *aba2-1* mutanti ve srovnání s WT na médiu s glukózou a nízkým obsahem dusíku, ačkoliv ABA deficiencie vede k omezení citlivosti na vnímání hladiny cukrů. Naproti tomu u mutantů *abi5-1* se projevy senescence objevily později než u WT. Je možné, že ABI5, transkripční faktor typu b-ZIP (leucinový zip), je na rozdíl od ABI4 zapojen do cukerné odpovědi v průběhu listové senescence (Pourtau et al., 2004), může být indukován glukózou (Buchanan-Wollaston et al., 2005). Ze studií dále vyplývá, že syntéza ABA pro vyvolání senescence cukernou signalizací není nutná. K urychlení senescence u *aba* mutantů stačí pouze ABA deficiencie. Akumulace cukrů pravděpodobně zvyšuje stres u dospělých rostlin *aba1-1* a *aba2-1* mutantů. V důsledku toho se spustí program předčasné senescence (Pourtau et al., 2004). Podpůrný účinek ABA na senescenci může mít ještě další dopad. Zdá se, že nepřímo zvyšuje tvorbu etylénu, a tím stimuluje opad senescentních orgánů.

3.2.2.3. Jasmonáty

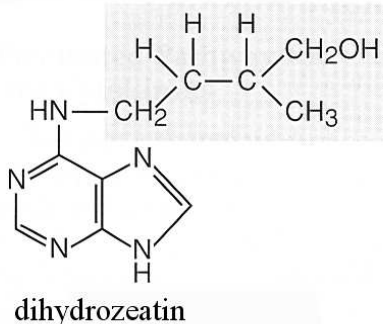
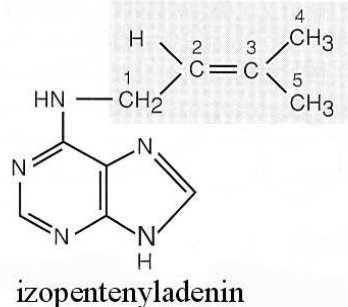
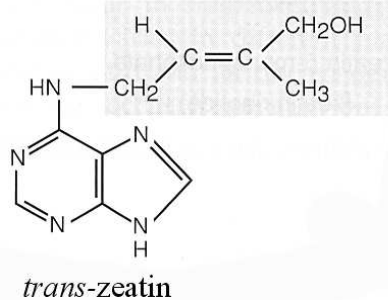
Další skupinou fytohormonů zapojených do regulace senescence jsou jasmonáty. Methyljasmonát (MeJA), stejně jako kyselina jasmonová (JA) a další jim příbuzné látky (jasmonáty) podporují senescenci rostlin. Jak dokázali Ananieva et al. (2004) na sazenicích cukety (*Cucurbita pepo L.*), aplikace MeJA se projevuje ztrátou chlorofylu a poškozením struktury chloroplastů již jeden den po ošetření. Pokud však aplikace MeJA není zopakována, projevy senescence jsou vratné. Během 5 dnů rostlina chloroplasty obnoví. Přesný mechanismus účinku MeJA ještě není znám. Avšak autoři ho dávají do souvislosti s pozorovaným poklesem celkového obsahu endogenních cytokininů (Ananieva et al., 2004). Naproti tomu další zástupce jasmonátů kyselina jasmonová působí pouze přes svou signalizační dráhu (He et al., 2002). Tuto teorii potvrzuje studie provedená na rostlinách *Arabidopsis* a *coi* (JA-insensitive) mutantech; aplikace JA urychlila senescenci na oddělených i neoddělených listech WT, avšak u *coi* mutantů předčasnou senescenci nevyvolala (He et al., 2002).

Kyselinou jasmonovou výčet hormonů zapojených do senescence rostlin nekončí. Předmětem výzkumů jsou i kyselina salicylová, brassinosteroidy, auxin, gibereliny a cytokininy. Zatímco u prvních čtyř jmenovaných je výzkum na počátku, o jejich roli v senescenci se ví zatím málo, cytokininy jsou léta považovány za stěžejní hráče v opoždění procesu senescence. Protože jsou hlavním předmětem této práce, budou probrány v samostatné kapitole.

4. Cytokininy

Cytokininy hrají klíčovou roli v regulaci senescence. Oddalují nástup a zpomalují její průběh. Tento vliv na opoždění senescence byl poprvé prokázán Richmondem a Langem (1957). Později se ukázalo, že jako hlavní inhibitory senescence rostlin potlačují expresi genů spojených se senescencí (*SAGs*), v některých případech dokážou senescenci dokonce zvrátit (Gan a Amasino, 1995). Studium cytokininů bývá spolu s analýzami chlorofylu důležitou součástí každého výzkumu senescence. Jak zjistili Noodén et al. (1990), pokud cytokininy v listech neklesnou pod prahovou úroveň, senescence nemůže být iniciována.

Cytokininy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fytohormonů. První z nich (kinetin) byl objeven v 50. letech 20. století v telecím brzlíku a sledím mlíčí jako látka, která podporuje buněčné dělení-cytokinezi. Dnes jich je známo několik set. Některé cytokininy se vyskytují přirozeně, jiné pouze jako látky s cytokininovou aktivitou synteticky připravené v laboratoři. Jejich společným rysem je chemická povaha; cytokininy jsou N^6 deriváty adeninu. Klasifikace přirozených cytokininů je založena na konfiguraci postranního řetězce v pozici N^6 . Na základě jeho struktury se dělí do dvou základních skupin- na cytokininy izoprenoidní a aromatické. Toto členění bývá někdy rozšířeno ještě o deriváty fenyльмоčoviny, které mají podobné účinky jako cytokininy. Izoprenoidní formy jsou v rostlinách častější než formy aromatické, proto jsou více zkoumány (Aremu et al., 2012). Základním přírodním cytokininem je zeatin, aminopurin (adenin) substituovaný na pozici N^6 pětiuhlíkatým řetězcem. Jeho název je odvozen od latinského jména kukuřice (*Zea*), kde byl poprvé nalezen v nezralém endospermu. Díky dvojně vazbě v postranním řetězci tvoří *cis/trans* izomery. Přestože jsou obě formy přírodní a konvertovatelné, fyziologicky efektivnější *trans*-zeatin je v rostlinách hojnější. Ačkoliv zeatin nebyl objeven jako první, stal se měřítkem pro ostatní látky, jež jsou řazeny do skupiny cytokininů. Cytokininy bývají někdy označovány jako sloučeniny, které mají podobný biologický účinek jako zeatin. Mezi izoprenoidní cytokininy patří kromě zmíněného zeatinu např. také prekurzor jeho syntézy izopentenyladenin (iP) a derivát zeatinu dihydrozeatin (DHZ). Aromatické cytokininy byly dlouho pokládány za pouhé artefakty syntézy, byly připravovány uměle. Jedním z umělých analogů cytokininů je i benzyladenin (BA), který se od zeatinu liší pouze aromatickým jádrem. Jeho další modifikací vznikl cytokinin topolin (3-hydroxybenzyladenin)(viz Obr. 3) (přehledně např. Frébort et al., 2011).



obr. 3: Vzorce základních cytokininů. Převzato z Pavlová, 2005.

Cytokiny jsou schopné působit jako signální molekuly i při nízkých koncentracích. Hladiny cytokininů jsou podobně jako u ostatních hormonů řízeny na několika úrovních (hlavně biosyntézy a degradace). Biosyntéza cytokininů probíhá v kořenech, embryích, mladých listech a plodech, stručně ve všech pletivech, kde se buňky dělí. Avšak procentně nejvýznamnější je produkce v kořenovém apikálním meristému, odkud jsou cytokiny (respektive jejich transportní formy ribozidy a ribotidy) rozváděny xylémem do nadzemní části rostliny. Velmi zjednodušeně biosyntéza zeatinu vychází z ATP nebo ADP (u bakterií z AMP) a izoprenu. Na bázi pocházející z ATP nebo ADP je v pozici N⁶ jako postranní řetězec navázána izopentenyllová skupina. Reakci katalyzuje enzym izopentenyltransferáza (IPT). Od produktu jsou odvozeny nejen izopentenyladenin a zeatin, ale i další cytokiny (přehledně v Frébort et al., 2011).

U cytokininů rozhoduje o aktuální koncentraci také poměr aktivních a neaktivních forem. Cytokiny se vyskytují v rostlinách ve volné nebo konjugované formě. Pouze volné cytokiny, tj. cytokininové báze (např. *trans*-zeatin, DHZ, iP) jsou hormonálně aktivní. Při konjugaci s cukry dochází k jejich reverzibilní inaktivaci. Konjugací cytokininových bází s ribózou vznikají ribozidy (např. zeatin ribozid (ZR), dihydrozeatin ribozid (DHZR), izopentenyl ribozid (iPR)), které mají na pozici N⁹ na adeninovém jádru navázanou ribózu, a

ribotidy, kde navázaná ribóza nese ještě fosfát. Další konjugovanou formou jsou glukozidy, které se liší od volných cytokininů glukózou na pozici N³, N⁷ nebo N⁹. Podle charakteru konjugátu mohou být z různých konjugovaných forem různou rychlostí uvolňovány volné cytokininy. Cytokininové nukleotidy (ribotidy-iPRMP, ZRMP, DHZRMP) jsou považovány za základní fyziologicky neaktivní produkty biosyntézy cytokininů a prekurzory jejich aktivních forem. Stejně tak i ze zásobních O-glukozidů (např. zeatin O-glukozid (ZOG), zeatin ribozid O-glukozid (ZROG), dihydrozeatin ribozid O-glukozid (DHZROG)) mohou hydrolýzou vzniknout volné cytokininy. Pouze N7- a 9-glukozidy zůstávají natrvalo neaktivní, nemohou být převedeny zpět na aktivní formy. Velkou neznámou je zatím fyziologická funkce *cis*-zeatinu a jeho konjugovaných forem (např. Frébort et al., 2011; Sýkorová et al., 2008).

Díky velkému počtu zástupců, již zmíněné rozmanitosti struktur cytokininy neplní v rostlinách pouze jednu regulační funkci, ale jsou zapojeny do velkého množství růstových a vývojových procesů. Vedle senescence a dělení buněk ovlivňují např. tvorbu axilárních pupenů, apikální dominanci, prodlužování kořenů a internodií, růst listové plochy, podílejí se na diferenciaci vodivých pletiv kořenů a diferenciaci chloroplastů při deetiolaci, působí při fotosyntéze i klíčení semen a mnohém dalším.

4.1. Využití transgenních rostlin s ovlivněným metabolismem cytokininů

4.1.1. Rostliny transformované *IPT* genem

Výzkum role cytokininů v procesu listové senescence probíhal léta prostřednictvím exogenní aplikace hormonu na list. V poslední době se však pro studium regulačních rolí a mechanismů ovládní listové senescence cytokininy stále více využívají transgenní rostliny, konkrétně rostliny transformované bakteriálním genem *IPT* (kódujícím enzym izopentenyltransferázu). Gen *IPT*, který je klíčový pro *de novo* biosyntézu cytokininů, pocházející z bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, bývá do rostlin vnášen pod kontrolou různých promotorů (např. genů spojených se senescencí *SAG12*, *SAG13*, které byly izolovány poprvé z *Arabidopsis thaliana*). První transgenní rostliny typu P_{SAG12} : *IPT* vytvořili Gan a Amasino v roce 1995. Docílili tak prodloužení fotosyntetické aktivity u transgenních rostlin tabáku. Tento od té doby hojně využívaný P_{SAG12} : *IPT* transgenní systém se vyznačuje zpětnovazebnou smyčkou, ve které senescence spouští transkripci genu *IPT* vázaného na *SAG12* promotor; produkovaný *IPT* enzym pak katalyzuje syntézu cytokininů, jež mj. zpomalují senescenci; to vede ke snížení *IPT* transkripce (regulované *SAG12*) a k omezení

produkce cytokininů. Následkem toho nastoupí opět senescence, znovu se spustí syntéza cytokininů a celý cyklus se opakuje. (Gan a Amasino, 1995). Velikou výhodou této autoregulační smyčky je, že u rostlin je dosaženo výrazného opoždění listové senescence bez dalších vývojových abnormalit (Gan a Amasino, 1997). Účinnost metody byla posléze ověřena i u jiných rostlinných druhů (např. pšenici, rajčatech, rýži, manioku) (Sýkorová et al., 2008; Swartzberg et al., 2010; Liu et al., 2010; Zhang et al., 2010). Studie provedené na různých *IPT* transgenních dvouděložných i jednoděložných rostlinách poskytly řadu důkazů o působení cytokininů v senescenci. Potvrdily, že zvýšené hladiny cytokininů mohou opozdit či potlačit listovou senescenci (např. Wingler et al., 1998; Jordi et al., 2000; Sýkorová et al., 2008), zároveň způsobit vyšší odolnost vůči stresu. Indukovaná exprese *IPT* má dopad na fotosyntézu, alokaci cukrů a distribuci dusíku (Zhang et al., 2010).

Autoregulovaná syntéza cytokininů v transgenních rostlinách může přímo ovlivnit množství enzymů zapojených do fotosyntetického metabolismu různými mechanismy. Některé působí na rychlost syntézy, jiné pak na degradaci proteinů. Akumulace cytokininů ve stárnoucích listech zpomaluje pokles v obsahu fotosyntetických enzymů (HPR, Rubisca atd.), brání rozkladu chlorofylu (Jordi et al., 2000), čímž prodlužuje fotosyntetickou aktivitu listů, rostlina tak stárne pomaleji (déle zelené listy než WT). Nicméně na zastavení senescence to nestačí (Wingler et al., 1998). Cytokininy inhibují transkripci *SAG* genů (Buchanan-Wollaston, 1997). Ke zpoždění listové senescence cytokininy je potřeba extracelulární invertáza. Pokud je invertáza inhibována, cytokininy nemůžou listovou senescenci u transgenních rostlin dlouhodobě brzdit (Balibrea Lara et al., 2004). To naznačuje, že cytokinin kontroluje listovou senescenci při přechodu listu ze sinku na zdroj.

I přesto, že autoregulační smyčka v hlavních rysech funguje u všech druhů rostlin stejně, existují zde rozdíly. U dvouděložných rostlin (např. tabák) ektopická exprese genu *IPT* zvyšuje obsah zeatinu a zeatin ribozidu (Jordi et al., 2000). U jednoděložných rostlin (např. pšenice) je zvýšení obsahu reprezentováno hlavně akumulací cytokininů ze skupiny bází bioaktivních cytokininů a ribozidů, a skupiny zásobních O-glukozidů (Sýkorová et al., 2008). Naopak hladiny *cis*-zeatinů zůstaly prakticky nezměněny, *IPT* exprese je neovlivnila. Obecně by se dalo říct, že *IPT* exprese nemá na hladiny cytokininů *SAG12 : IPT* pšenice zdaleka takový vliv jako u některých *SAG12 : IPT* transformovaných druhů dvouděložných rostlin. Na vině může být fakt, že *SAG12* promotor z *Arabidopsis* není plně funkční v heterologním prostředí jednoděložné rostliny. Účinky cytokininů se liší i v jednotlivých listech. Zatímco cílená syntéza cytokininů v nejstarších listech prodlužuje jejich životnost, u mladších listů

působí opačně (dochází k poklesu obsahu chlorofylu, Rubisco aj.). Jedná se asi o nepřímý účinek cytokininů na fungování mladých listů v důsledku změn v distribuci N mezi jednotlivými částmi rostliny (Jordi et al., 2000).

4.1.2. Rostliny transformované CKX genem

Z četných studií vyplývá, že specifické hladiny cytokininů v rostlinných pletivech by mohly být alespoň částečně regulovány expresí enzymu cytokininoxidáza/dehydrogenáza (CKX) (např. Schlüter et al., 2011; Evans et al., 2012). Cytokininoxidáza/dehydrogenáza je hlavním enzymem, který katalyzuje nevratnou degradaci cytokininů odštěpením postranního řetězce (Werner et al., 2006). Je kódována geny z multigenové rodiny CKX. Jak dokázali Schlüter et al. (2011) na čepelích a apikálních segmentech ječmene, kukuřice a rákosu, aktivita enzymu v průběhu listové senescence stoupá. Tento nárůst odpovídal u ječmene zvýšené úrovni přepisu genu *HvCKX1* (CKX ječmene), vedl k vyššímu podílu glykosylované/neglykosylované CKX, stejně jako snížení obsahu cytokininových bází a ribozidů. Protože ve většině případů byla nalezena pozitivní korelace mezi aktivitou CKX a senescencí, je pravděpodobné, že enzym řídí senescenci tím, že degraduje cytokininy, jež pomáhají rostlinám udržet listy zelené (Schlüter et al., 2011). Zdá se, že však samotná exprese genu CKX pro spuštění senescence nestačí. To dokazuje nejen Schlüter et al. (2011) u ječmene, ale i práce Evans et al. (2012) na jetelu plazivém (*Trifolium repens*). Autoři pozorovali nárůst exprese *TrCKX2* (CKX jetele) v oblasti stolonu jetele pouze během vývoje listu. V období nástupu a rozvoje senescence byla míra exprese stále stejná, což nasvědčuje tomu, že *TrCKX2* nebyla iniciátorem listové senescence. Nicméně stabilní-vysoká exprese genu mohla její postup usnadnit (Evans et al., 2012). Analýzy ostatních členů CKX genové rodiny by mohly odhalit další aktivní role CKX během senescence.

4.2. Interakce cytokininů s dalšími faktory ovlivňujícími senescenci

4.2.1. Interakce dusíku a cytokininů

V podmínkách, kdy je dostupnost N limitována, SAG12 : *IPT* rostliny posílají více N do starých, senescentních listů než do mladých. Výsledkem je převrácený vertikální profil N v koruně SAG12 : *IPT* rostlin v porovnání s WT. Následkem toho může být snížena i účinnost využití světla a živin (Jordi et al., 2000; Sýkorová et al., 2008). Rostliny při deficienci N a P

vykazují snížené hladiny cytokininů, protože nedostatek N inhibuje jejich syntézu (Sakakibara et al., 2006). Oproti WT rostlinám *IPT* transformanty jsou schopny udržet vyšší hladinu cytokininů i při N a P hladovění. Pokud je obsah dusíku nízký, rostliny reagují rychleji na nárůst cytokininů v listech, způsobený aplikací exogenních cytokininů či ektopickou expresí genu *IPT* (isopentenyltransferáza) (Sýkorová et al., 2008).

Zhang et al. (2010) prokázali, že zvýšená hladina cytokininů (*Z/ZR*, *DHZ/DHZR* a *iP/iPR*) vyvolaná expresí *SAG12 : IPT* pomáhá rostlinám udržet více chlorofylu a vyšší fotosyntetickou aktivitu, tím zpomaluje, až potlačuje listovou senescenci způsobenou nedostatkem N nebo P u C3 vytrvalých druhů trav (např. *Agrostis stolonifera*). Cytokiny konkrétně zpomalují pro senescenci typický pokles příjmu dusičnanů rostlinou, tím prodlužují i aktivitu nitrátreduktázy (NR), která je ovlivňována dusičnany i cytokininy (viz Sýkorová et al., 2008). Aktivita NR je citlivější k N a P deficienci než hladina cytokininů a potlačení senescence u *IPT* rostlin není spojeno s regulací aktivity NR cytokininy. Je možné, že při vyšších hladinách cytokininů je lepší metabolismus organického N, nebo lepší remobilizace N, ale to se musí ještě zjistit (Zhang et al., 2010). Autoři se domnívají, že zvýšení cytokininů v *SAG12 : IPT* linii pomáhá udržet aktivitu kyselé fosfatázy (AP) při nedostatku P nebo N, a tak podporuje účinnější využívání P v kořenech.

4.2.2. Interakce cytokininů se světlem

Důležitým faktorem ovlivňujícím aktivitu CKX je světlo. Z pokusů prováděných na ječmeni (Schlüter et al., 2011) vyplývá, že světlo zvyšuje aktivitu CKX. Dopad této pozitivní stimulace exprese genů z rodiny *CKX* na urychlení senescence nemusí být až tak jednoznačný. Světlo může podporovat nejen degradaci cytokininů, ale také tvorbu bioaktivních cytokininů (zeatinu, zeatin ribozidu) v listových segmentech, tím mírnit celkový dopad zvýšené aktivity CKX na proces senescence (Schlüter et al., 2011). Tyto závěry jsou podpořeny i experimenty s transgenními rostlinami tabáku (Eklöf et al., 1996) a *Arabidopsis* (Werner et al., 2001, 2003). Během tmou vyvolané senescence si transgenní *SAG : IPT* rostliny manioku (oddělené zralé listy) udržely vysoké hladiny chlorofylu ve srovnání s WT (Zhang et al., 2010).

4.2.3. Cytokininy a abiotický stres

Expres IPT nepůsobí úspěšně jen proti senescenci vyvolané tmou, ale také proti senescenci indukované nepříznivými podmínkami jako je sucho či zaplavení. Studie provedená na transgenních rostlinách manioku poskytla důkazy, že i v extrémních podmínkách sucha exprese IPT prodlužuje životnost listu, zvyšuje odolnost vůči stresu ze sucha a mění metabolismus cytokininů. Dochází k výrazné akumulaci *trans*-zeatinu a jeho ribozidu uchovávaného ve formě zásobních O-glukozidů k udržení homeostáze (Zhang et al., 2010).

4.2.4. Cytokininy a cukry

Způsob, jakým cytokininy a cukry interagují při řízení procesu senescence, byl nejprve studován prostřednictvím exogenní aplikace glukózy a cytokininů na listové disky divokého tabáku. Jak dokázali Wingler et al. (1998), cytokininy nedokážou zastavit senescenci indukovanou aplikací glukózy. Jinými slovy glukóza zabraňuje nejen expresi celé řady genů včetně klíčových genů kódujících Rubisco, Fru-1,6-bisfosfatázu a NADP-dependentní glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenázu, ale také inhibuje účinky cytokininů na senescenci rostlin. Avšak o míře urychlení senescence rozhoduje světlo (Wingler et al., 1998). Zda-li to platí i pro celistvé rostliny a endogenně produkované cytokininy a cukry, ověřovali Swartzberg et al. (2010) na dvojitých mutantech rajčete exprimujících *AtHXK1* a některý z $P_{SAG12} : IPT$, $P_{SAG13} : IPT$. V transgenních rostlinách transformovaných genem *IPT* je akumulace cukrů během stárnutí rostliny výraznější než u WT. Autoři zjistili, že ani *IPT* exprese ve dvojitě transgenních rostlinách nedovedla zabránit zrychlené senescenci, vyvolané nadměrnou expresí *AtHXK1*. Jako vysvětlení nabídli, že *AtHXK1* zprostředkované vnímání hladiny intracelulárního cukru je dominantní nad vnímáním hladiny extracelulárního cukru. Tuto domněnku vyslovili na základě zjištění, že cytokininy brání senescenci skrze expresi apoplastické invertázy, která produkuje extracelulární hexózy (glukózu, fruktózu). Ty slouží jako substráty hexokinázám v symplastu a jako signál zralým listům o přechodu ze senescentního pletiva zdroje do sinkového pletiva, tímto způsobem oddalují senescenci. Naproti tomu *AtHXK1* je intracelulární hexokináza, která vnímá zvyšující se hladiny intracelulární glukózy, stimuluje senescenci. Zdá se, že ačkoliv intra- i extracelulární hexózy musí být fosforylovány hexokinázami, spouští každá jinou signální kaskádu (Swartzberg et al., 2010).

4.2.5. Interakce cytokininů s dalšími hormony

Působení cytokininů při listové senescenci je ovlivňováno také hladinami jiných hormonů. Zejména těch, jejichž exogenní aplikace, případně přirozeně zvýšená hladina žene senescenci kupředu. Mezi ně patří metyljasmonáty. Výzkumy Ananieva et al. (2004) na sazenicích *Cucurbita pepo L.* ukázaly, že exogenní aplikace MeJA výrazně snižuje hlavně hladiny fyziologicky aktivních cytokininů (*trans*-zeatinu a jeho ribozidu), cytokininových nukleotidů a fyziologicky inaktivních 7- a 9-glukozidů. Obsahy O-glukozidů a *cis*-izomerů (*cis*-zeatinu) klesají v jeho přítomnosti pomalu, což naznačuje, že nedochází k jejich přeměně na aktivní formy. Zdá se tedy, že MeJA urychluje senescenci prostřednictvím celkové down-regulace nejen hladin endogenních cytokininů, ale i jejich vnitřních přeměn mezi aktivními a neaktivními formami. Kdyby tomu tak nebylo, aktivní formy cytokininů (zvláště *trans*-zeatinu), vzniklé z přeměn inaktivních forem, by senescenci nadále oddalovaly. Jak se ukázalo po odeznění účinků ošetření, rostoucí hladina aktivních cytokininů usnadňuje regeneraci poškozeného fotosyntetického aparátu. V průběhu obnovy vznikají aktivní cytokininy přeměnou *cis*-zeatinu a hydrolýzou zásobních O-glukozidů, avšak nedochází k jejich biosyntéze (Ananieva et al., 2004). Dalším hormonem, o kterém se soudí, že má primárně opačný účinek na senescenci než cytokininy, je etylén. Interakce etylénu a cytokininů (reprezentovaných BA) během senescence byla ověřována na WT rostlinách *Arabidopsis* a *eti-5* mutantech (ethylene insensitive), respektive jejich oddělených listech držných ve tmě (Kudryakova et al. (2001). *eti-5* mutanti jsou zvláštní tím, že nevykazují typickou odezvu na etylén, exogenní aplikace etylénu nijak neovlivní růst jejich etiolovaných sazenic. Kudryakova et al. (2001) zjistili, že hladiny etylénu u *eti-5* mutantů se sice zvyšují, avšak jejich vliv na urychlení senescence je rušen opačně působícími cytokininy. Během experimentu obsah endogenních cytokininů v listech mutantů rostl rychleji než u WT. Třítýdenní rostliny obsahovaly dokonce sedmnáckrát více zeatinu a ZR než WT. Tento nadbytek dokázal zpomalit senescenci *eti-5* mutantů ve větší míře než exogenní aplikace cytokininů. Je možné, že necitlivost *eti-5* mutantů zesílila přímo nebo nepřímo biosyntézu cytokininů. Následně zvýšené hladiny nejen zpomalily senescenci, ale také omezily reakci rostlin na ošetření exogenními cytokininy. Rozdíly v obsahu endogenních cytokininů u mutantních a WT rostlin se však postupně zmenšovaly, u sedmitýdenních sazeniček byly nulové. Spolu s tímto rozdílem v obsahu mizely i ty v rychlostech senescence a reakci na aplikaci exogenních cytokininů. U WT rostlin ke zpoždění senescence nedošlo, naopak etylén

senescenci urychlil. Opačný účinek u mutantních rostlin, i přes zjištěný růst hladin etylénu, naznačuje, že rostliny *Arabidopsis* využívají jiné cesty vnímání a vedení signálu vyvolaného etylémem v různých fázích vývoje v závislosti na hladinách endogenních cytokininů. Je celkem pravděpodobné, že změny v obsahu cytokininů u mladých rostlin eti-5 mutantů jsou zodpovědné za jejich necitlivost na etylén (Kudryakova et al., 2001).

5. Závěr

V souboru procesů, které zajišťují růst a vývoj rostliny v konkrétních podmínkách prostředí, představuje senescence důležitou složku. Dosavadní výzkum senescence ukazuje na klíčovou roli cytokininů v zahájení tohoto procesu i jeho dalšího průběhu. Cytokininy ovšem nejsou jediným regulačním principem, uplatňuje se zde ještě řada dalších signalizačních drah. Právě interakce a vzájemná provázanost těchto drah s již zmíněnou signalizací cytokininů zůstává hlavním problémem pro další studium.

6. Přehled použité literatury

Aremu, A. O., Bairu, M. W., Doležal, K., Finnie, J. F., Van Staden, J. (2012) Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges?, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 108, 1-16

Ananieva, K., Malbeck, J., Kamínek, M., van Staden, J. (2004) Methyl jasmonate down-regulates endogenous cytokinin levels in cotyledons of *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings, *Physiologia Plantarum* 122, 496–504.

Balibrea Lara, M. E., Gonzalez Garcia, M. C., Fatima, T., Ehness, R., Lee, T. K., Proels, R., Tanner, W., Roitsch T. (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence, *Plant Cell* 16, 1276–1287.

Buchanan-Wollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf-senescence, *Journal of Experimental Botany* 48, 181–199.

Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J. F., Wu, S. H., Swidzinski, J., Ishizaki, K., Leaver, C. J. (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 42, 567-585.

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

Eklöf, S., Astot, C., Moritz, T., Blackwell, J., Olsson, O., Sandberg, G. (1996) Cytokinin metabolites and gradients in wild type and transgenic tobacco with moderate cytokinin overproduction. *Physiologia Plantarum* 98,333–44.

Evans, T., Song, J., Jameson, P. E. (2012) Micro-scale chlorophyll analysis and developmental expression of a cytokinin oxidase/dehydrogenase gene during leaf development and senescence, *Plant Growth Regulation* 66, 95-99.

Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., Galuszka, P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation, *Journal of Experimental Botany* 62, 2431-2452.

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

Gan, S., Amasino, R. M. (1997) Making sense of senescence, *Plant Physiology* 113, 313–319.

Grbić, V., Blecker, A. B. (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 8, 595-602.

- Guiboileau, A., Sormani, S., Meyer, C., Masclaux-Daubresse, C. (2010)** Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation, *Comptes rendus biologiques* 333, 382-391
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D. F., Gan, S. (2002)** Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf-senescence, *Plant Physiology* 128, 876–884.
- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R., Mae, T. (2008)** Mobilization of rubisco and stromalocalized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process, *Plant Physiology* 148, 142–155.
- James, F., Broquisse, R., Pradet, A., Raymond, P. (1993)** Changes in proteolytic activities in glucose-starved maize root tips: regulation by sugars, *Plant Physiology and Biochemistry* 31, 845–856.
- Jing, H. C., Sturre, M. J., Hille, J., Dijkwel, P. P. (2002)** *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf-senescence, *Journal of Experimental Botany* 32, 51–63.
- Jordi, W., Schapendonk, A., Davelaar, E., Stoopen, G. M., Pot, C. S., De Visser, R., Van Rhijn, J. A., Gan, S., Amasino, R. M. (2000)** Increased cytokinin levels in transgenic P-SAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning, *Plant, Cell and Environment* 23, 279–289.
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., Ecker, J.R. (1993)** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases, *Cell* 72, 427-441.
- Kudryakova, N. V., Burkhanova, E. A., Rakitin, V. Y., Yakovleva, L. A., Smith, A., Hall, M. A., Kulaeva, O. N. (2001)** Ethylene and Cytokinin in the Control of Senescence in Detached Leaves of *Arabidopsis thaliana eti-5* Mutant and Wild-Type Plants *Russian Journal of Plant Physiology* 48, 624-627.
- Liu, L., Zhou, Y., Szczerba, M. W., Li, X., Lin, Y. (2010)** Identification and application of a rice senescence-associated promoter, *Plant Physiology* 153, 1239-1249.
- Lohman, K., Gan, S., John, M., Amasino, R. M. (1994)** Molecular analysis of natural senescence in *Arabidopsis thaliana*, *Physiologia Plantarum* 92, 322–328.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. (2003)** Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling, *Science* 300, 332–336.
- Naik, G. R., Mukherjee, I., Reid, D. M. (2002)** Influence of cytokinins on methyl jasmonate-promoted senescence in *Helianthus annuus* cotyledons. *Plant Growth Regulation* 38, 61–68.
- Noodén, L. D., Singh, S., Letham, D. S. (1990)** Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean, *Plant Physiology* 93, 33–39.

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

Oh, S. A., Park, J. H., Lee, G. I., Paek, K. H., Park, S. K., Nam, H. G. (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf-senescence in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal* 12, 527–535.

Pavlová, L. (2005) Fyziologie rostlin, Karolinum.

Pourtau, N., Marès, M., Purdy, S., Quentin, N., Ruël, A., Wingler, A. (2004). Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence, *Planta* 219, 765–772.

Quirino, B. F., Noh, Y-O., Himelblau, E., Amasino, R. (2000) Molecular aspects of leaf senescence, *Trends in Plant Science* 5, 278–282.

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

Sakakibara, H., Takei, K., Hirose, N. (2006) Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development, *Trends in Plant Science* 11, 440–448.

Schlüter, T., Leide, J., Conrad K. (2011) Light promotes an increase of cytokinin oxidase/dehydrogenase activity during senescence of barley leaf segments, *Journal of Plant Physiology* 168, 694–698.

Swartzberg, D., Hanael, R., Granot, D. (2010) Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination, *Plant Biology* 13, 439–444.

Sýkorová, B., Kuresová, G., Daskalova, S., Trcková, M., Hoyerová, K., Raimanová, I., Motyka, V., Trávníčková, A., Elliott, M. C., Kamínek, M. (2008) Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens* ipt gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield, *Journal of Experimental Botany* 59, 377–387.

Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A., Vierstra, R. D. (2005) Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways, *Plant Physiology* 138, 2097–2110.

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., van Onckelen, H., Schmulling, T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity, *Plant Cell* 15, 2532–50.

Werner, T., Kollmer, I., Bartrina, I., Holst, K., Schmulling, T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation, *Plant Biology* 8, 371–81.

Wingler, A., von Schaewen, A., Leegood, R. C., Lea, P. J., Quick, W.P. (1998) Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effect on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase, *Plant Physiology* 116, 329–335.

Wingler, A., Brownhill, E., Pourtau, N. (2005) Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence, *Journal of Experimental Botany* 56, 2897–2905.

Wingler, A., Roitsch, T. (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses, *Plant Biology* 10, 50–62.

Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C., Fischer, A. M. (2009) Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms, *Journal of Experimental Botany* 60, 1063–1066.

Wingler, A., Purdy, S., Edwards, S., Chardon, F., Masclaux-Daubresse, C. (2010) QTL analysis for sugar-regulated leaf-senescence supports flowering-dependent and -independent senescence pathways, *New Phytologist*, 185, 420–33.

Wingler, A., Delatte, T. L., O’Hara, L. E., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., Paul, M. J., Schluepmann, H. (2012) Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability, *Plant Physiology* 158, 1241-1251.

Yoshida, S., Ito, M., Nishida, I., Watanabe, A. (2002) Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal* 29, 427–437

Zhang, P., Wang, W-Q., Zhang, G-L., Kamínek, M., Dobrev, P., Xu, J., Gruijssem, W. (2010) Senescence-inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava, *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 653-669.

Zhang, Y., Liang, C., Xu, Y.,Giangfanga, T., Huang, B. (2010) Effects of ipt gene expression on leaf senescence induced by nitrogen or phosphorous deficiency in creeping bentgrass, *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135, 108-115.