

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

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



**Koncentrační závislost účinků cytokinínů na
indukovanou senescenci rostlin**

Vypracovala: Helena Melkovičová
Obor: Biofyzika
Vedúci bakalárskej práce: RNDr. Martina Špundová, Ph.D.

Ďakujem vedúcej bakalárskej práce RNDr. Martine Špundovej, Ph.D., za pedagogickú a odbornú pomoc a čas. Ďalej ďakujem Mgr. Alexandre Husičkovej, Ph.D., za cenné rady a čas pri spracovávaní a tvorení mojej bakalárskej práce a tiež Mgr. Jozefíne Provalilovej za všetku pomoc.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením RNDr. Martiny Špundovej, Ph.D., a za použitia odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov uvedených v zozname literatúry na konci práce.

V Olomouci dňa: _____

SÚHRN

Cytokiníny (CK) sú dobre známe pre ich schopnosť spomaliť senescenciu, avšak bolo zistené, že u istých okolností sú cytokiníny schopné naopak urýchliť tento proces. Takýto zvrat v účinku CK bol zaznamenaný u vysokých koncentrácií a/alebo pri vystavení listov vyššej intenzite alebo dávke svetla.

V predkladanej práci bol študovaný vplyv cytokinínov 6-benzylaminopurínu (BAP) a *meta*-topolinu (mT; N⁶-(*meta*-hydroxybenzyl)adenín) u oddelených listových segmentov tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) a jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) z hľadiska koncentračnej a svetelnej závislosti. Miera indukovanej senescencie bola stanovovaná cez obsah chlorofylu a hodnotu maximálneho kvantového výťažku fotochémiu fotosystému II (F_v/F_p). Boli použité tri koncentrácie cytokinínov mT a BAP (10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 3·10⁻⁴ M). U tabaku bol vplyv koncentrácie CK a svetelných podmienok (tma a periodické svetlo 90 μmol·m⁻²·s⁻¹) sledovaný na rastlinách typu wild type a typu s overexpresiou cytokinín oxidázy/dehydrogenázy (CKX). U jačmeňa bolo použitých päť svetelných režimov (tma, periodické svetlo 70 μmol·m⁻²·s⁻¹, kontinuálne svetlo 70 μmol·m⁻²·s⁻¹, periodické svetlo 370 μmol·m⁻²·s⁻¹, kontinuálne svetlo 370 μmol·m⁻²·s⁻¹).

U kontrolných segmentov (bez CK) umiestnených v tme bol po oddelení zaznamenaný výrazný pokles obsahu chlorofylu i F_v/F_p. Svetlo vo väčšine prípadov tento pokles spomalilo. U segmentov umiestnených v tme mali CK očakávaný pozitívny účinok (tj. spomalili pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_p) vo všetkých použitých koncentráciách. Avšak pozitívny účinok CK sa znižoval s nárastom svetelnej dávky a pri kontinuálnom svetle (370 μmol·m⁻²·s⁻¹) sa dokonca zmenil na negatívny (tj. CK urýchlili pokles v oboch parametroch). Tento trend bol viac výrazný v prípade vyšších koncentrácií CK.

SUMMARY

Cytokinins (CK) are well known for their ability to retard or slow down senescence but there is also some evidence that cytokinins can, under certain circumstances, accelerate it. This reversal of cytokinin action has been linked to high cytokinin concentration and/or the exposure of leaves to extensive light.

In our work, the concentration- and light-dependence of effect of cytokinin of 6-benzylaminopurine (BAP) and meta-topolin (mT; N6-(meta-hydroxybenzyl)adenine) was studied in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) leaf segments after their detachment. The chlorophyll content and maximal efficiency of photosystem II photochemistry (F_V/F_P) were used to evaluate an extent of senescence. Three concentration (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) of mT and BAP were used. In the case of tobacco, the effect of cytokinin concentration and light conditions (dark and periodic light $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) was evaluated in wild type plants and plants with overexpressed CKX. In the case of barley, five “light“ regimes (dark, periodic light $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, continual light $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, periodic light $370 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, continual light $370 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) were used.

There was a pronounced decrease in chlorophyll content and F_V/F_P in control leaf segments (without CK) senescing in dark. Light slowed down this decrease in most cases. In dark senescing leaves, CK had the expected positive effect (i. e. slowed down the decrease in chlorophyll content and F_V/F_P) in all concentrations used. However, the positive effect of CK decreased with increasing light dose, and at continual light ($370 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) even changed to negative ones (i. e. CK accelerated the decrease in both parameters). This trend was more pronounced in case of higher CK concentrations.

ZOZNAM SKRATIEK

| | |
|-----------------------|---|
| ATP | - adenzín-3-fosfát |
| BAP | - N ⁶ -benzylaminopurin |
| CK | - cytokinín(y) |
| CKX | - cytokinínoxidáza/dehydrogenáza |
| „CKX“ | - varianta tabaku virgínskeho so zníženým obsahom cytokinínov použitá v experimente I |
| CO ₂ | - oxid uhličitý |
| CPPU | - N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-fenylurea |
| Cyt b ₆ /f | - cytochróm b ₆ /f komplex |
| DMSO | - dimetylsulfoxid |
| FI | - fluorescenčná indukcia |
| F _m | - maximálna intenzita fluorescencie chlorofylu |
| F _o | - minimálna intenzita fluorescencie chlorofylu |
| F _p | - intenzita fluorescencie vo vlne P krivky veľmi rýchlej fluorescenčnej indukcie |
| F _v | - variabilná fluorescencia |
| Chl | - chlorofyl |
| IK | - varianta vzoriek na intenzívnom kontinuálnom svetle o intenzite v intervale (370 ± 40) μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ |
| IP | - varianta vzoriek na intenzívnom periodickom svetle (16 h svetlo/8 h tma) o intenzite v intervale (370 ± 40) μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ |
| iP | - izopentenyldenín |
| ipt | - izopentetyltransferáza |
| Kin | - kinetin |
| MDA | - malondialdehyd |
| mT | - <i>meta</i> -topolin |
| NK | - varianta vzoriek na kontinuálnom svetle o nižšej intenzite s hodnotou 70 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ |
| NP | - varianta na periodickom svetle (16 h svetlo/8 h tma) o nižšej intenzite s hodnotou 70 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ |
| PEA | - Plant Efficiency Analyser, prístroj k meraniu kriviek vrFIJ |
| PSI | - fotosystém I |

| | |
|-------|---|
| PSII | - fotosystém II |
| q_p | - fotochemické zhášanie fluorescence chlorofylu |
| ROS | - reaktívne formy kyslíku (reactive oxygen species) |
| vrFIJ | - veľmi rýchly fluorescenčný indukčný jav |
| WT | - wild type |
| Z | - zeatin |

OBSAH

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | ÚVOD | 1 |
| 2. | PREHLAD PROBLEMATIKY | 2 |
| 2.1 | Senescencia rastlinného organizmu | 2 |
| 2.1.2 | Svetlo a senescencia | 3 |
| 2.2 | Cytokiníny | 5 |
| 2.2.1 | Transgénne rastliny so zníženým obsahom endogénnych CK | 6 |
| 2.2.2 | Vplyv rôznych koncentrácií CK na senescenciu | 8 |
| 2.2.3 | Svetlo a cytokiníny | 10 |
| 3. | CIEĽ PRÁCE | 13 |
| 4. | MATERIÁL A METÓDY | 14 |
| 4.1 | Experiment I | 14 |
| 4.1.1 | Rastlinný materiál | 14 |
| 4.1.2 | Použité metódy | 15 |
| 4.2 | Experiment II | 16 |
| 4.2.1 | Rastlinný materiál | 16 |
| 4.2.2 | Použité metódy | 17 |
| 4.3 | Kalibračná krivka pre chlorofylmeter SPAD-502 | 17 |
| 4.4 | Štatistická analýza | 18 |
| 5. | VÝSLEDKY | 19 |
| 5.1 | Experiment I | 19 |
| 5.2 | Experiment II | 24 |
| 6. | DISKUSIA | 40 |
| 7. | ZÁVER | 45 |
| 8. | ZOZNAM LITERATÚRY | 47 |
| | PRÍLOHY | 50 |

1. ÚVOD

Cytokiníny sú trieda rastlinných hormónov, ktoré hrajú centrálnu úlohu počas bunčného cyklu a ovplyvňujú procesy vývoja. Cytokiníny boli objavené v 50. rokoch 20. storočia (ako prvý bol identifikovaný kinetin) a od tej doby sa postupne objasňuje ich fungovanie vo väčšine procesov rastlinného vývoja a rastu. V súčasnosti sú problematiky spojené s fungovaním rastlinných hormónov riešené nejednou vedeckou skupinou či vedeckým pracoviskom. Štúdium pôsobenia a účinkov rastových regulátorov rastlín, akými sú cytokiníny, poskytuje možnosť rôznych aplikácií v rámci biotechnológií či poľnohospodárstva pre ovplyvňovanie výnosov.

Cytokiníny sú všeobecne známe svojou schopnosťou spomaliť proces starnutia (senescencie) rastlín.

Senescencia rastlín je vývojovým procesom kontrolovaným vonkajšími (napr. množstvo svetla alebo vody) i vnútornými faktormi (napr. rastlinné hormóny). Starnutie môže byť urýchlené či spomalené pomocou zmien týchto faktorov.

Ako bolo spomenuté vyššie, všeobecne platí, že cytokiníny (CK) sú schopné spomaliť proces senescencie. Avšak v literatúre je doložené, že tento účinok závisí na koncentrácii a na svetelných podmienkach pri senescencii. Bolo ukázané, že pri vyšších koncentráciách CK a pri vyšších intenzitách svetla môže dochádzať naopak k urýchleniu senescencie. Na základe vlastných výsledkov a informácií o pôsobení rôznych koncentrácií cytokinínov i intenzít svetla na senescenciu uvedených v literatúre bol vytvorený Husičkovou a kol. (2012) model popisujúci závislosť vplyvu účinkov CK na ich koncentrácii a na svetelných podmienkach. Model predpokladá, že do určitej koncentrácie CK rastie ich „pozitívny“ účinok (tj. zvyšuje sa ich spomaľujúci účinok na senescenciu) a od tejto určitej („hraničnej“) koncentrácie potom CK majú opačný – „negatívny“ účinok (tzn. urýchľujú senescenciu). Model ďalej predpokladá, že podobný efekt ako rast koncentrácie CK má na senescenciu i narastajúca intenzita (dávka) svetla, pričom čím vyššia intenzita (dávka) svetla pri senescencii pôsobí pri súčasnom pôsobení CK, tým nižšia je „hraničná“ koncentrácia CK, pri ktorej dochádza ku zmene „pozitívneho“ účinku CK na „negatívny“.

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo overovanie platnosti vyššie uvedeného modelu: bol študovaný vplyv cytokinínov mT a BAP na indukovanú (umelo vyvolanú) senescenciu rastlín z hľadiska koncentračnej a svetelnej závislosti.

2. PREHĽAD PROBLEMATIKY

2.1 Senescencia rastlinného organizmu

Senescencia alebo proces starnutia je vývojový proces, ktorý v sebe zahrňuje programovanú bunecnú smrť (PCD). Senescencia je spojená s degeneráciou bunecných organel ako sú chloroplasty, endoplazmatické retikulum, v neskorších štádiách i mitochondrie či samotné jadro. Je sprevádzaná syntézou hydrolytických enzýmov ako sú proteázy, nukleázy, lipázy či enzýmy degradujúce chlorofyl. Behom senescencie dochádza taktiež k zmenám tylakoidnej membrány, k deštrukcii tylakoidných proteínov a deštrukcii enzýmov v stromate u chloroplastov.

Pretože degradácia chlorofylu (Chl) a chloroplastov je primárnym procesom v starnutí, je listová senescencia obecné charakterizovaná pomocou obsahu Chl. So senescenciou sa znižuje obsah Chl (Zacharias a Reid 1990, Noodén a kol. 1997, Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006), mení sa ultraštruktúra, usporiadanie a tvar chloroplastov z elipsovitého na viac sférický a dochádza k neusporiadanosti tylakoidnej membrány v chloroplastoch spolu s akumuláciou plastoglobúl (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006). Samotný rozpad tylakoidov začína s degradáciou komplexu Cyt b_6/f , ktorý zaisťuje prenos elektrónov medzi fotosystémom II (PSII) a fotosystémom I (PSI), nasleduje rozpad PSII a PSI a neskôr i ATP syntázy (Lawlor 2001). Enzýmy, ktoré degradujú niektoré kľúčové zložky chloroplastov (napr. Chl), sú lokalizované v membráne samotných chloroplastov alebo v ich okolí.

So senescenciou sa ďalej menia aj parametre fotosyntézy, akými sú fotochemické zhášanie fluorescencie chlorofylu (q_p) či maximálny fotochemický výťažok PSII, ktorý sa najčastejšie vyjadruje ako pomer F_v/F_m , pričom s nárastom doby senescencie dochádza k poklesu hodnôt parametrov q_p či pomeru F_v/F_m (Vlčková a kol. 2006). Samotný proces fotosyntézy je pod pevným riadením tisícov génov lokalizovaných v chloroplastoch a v jadre a je ovplyvnený radou enviromentálnych faktorov ako je napríklad sucho, chlad, ozón a UV-B. Enviromentálne stresy majú priamy vplyv na fotosyntetický aparát, tým, že sú schopné poškodiť dôležité procesy fotosyntézy, zahrňujúc tylakoidný elektrónový transport a Calvinov cyklus spolu so zvýšenou akumuláciou karbohydrátov a peroxidatívnym poškodením lipidov.

Behom senescencie dochádza tiež k nárastu miery peroxidácie membránových lipidov (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006, Mik a kol. 2011). Peroxidácia

membránových lipidov je typickým znakom senescencie, je dôsledkom účinku reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a ich zvýšenej tvorby (Mik a kol. 2011). Tieto formy sa síce tvoria počas celého rastlinného rastu a vývoja, avšak zreteľne sa akumulujú v pletivách počas listovej senescencie. S lipidovou peroxidáciou sú úzko spojené aj rastlinné hormóny cytokiníny, ktoré sú schopné za určitých okolností chrániť membrány voči lipidovej peroxidácii. Príkladom je cytokinín kinetin (Kin), ktorý môže chrániť proteíny voči oxidatívne a glyoxidatívne poškodeniu (Verbeke a kol. 2000 cit. v Mik a kol. 2011) (*vid' 2.2. Cytokiníny*).

Celkovo je senescencia riadená geneticky, avšak jej priebeh je ovplyvňovaný i vonkajšími podmienkami (vrátane svetelných), v akých sa rastlina nachádza. A preto treba u senescencie brať do úvahy aj tieto vplyvy a hlavne úlohu svetla, kde vysoké intenzity žiarenia môžu spôsobiť oxidatívne poškodenie rastlín a nízke intenzity napríklad neefektívnu činnosť fotosyntézy a tým nedostatočnú tvorbu energeticky bohatých organických látok, dôležitých pre metabolizmus rastliny.

2.1.2 Svetlo a senescencia

Svetlo je elektromagnetické žiarenie, ktoré je základným energetickým zdrojom pre väčšinu biologických procesov na Zemi. Počas života rastlín je svetlo potrebným zdrojom energie. Svetlo hrá taktiež dôležitú signálnu úlohu vo vývoji rastlín (Briggs a Olney 2001), ktorý reguluje pomocou systému zahŕňajúceho svetelnú percepciu, transdukciiu energie na signál a párovania signálu do génovej expresie a následnú reguláciu produktov (Lawlor 2001). Svetlo je absorbované molekulami fotoreceptorov, ktoré sú lokalizované v rastlinnej bunke (Kreslavski a kol. 2009). U rastlín sa vyskytuje viacero druhov fotoreceptorov (Lawlor 2001). Receptory na červené svetlo (tzv. fytochrómy) po absorpcii svetla podstúpia konformačnú zmenu. Táto fyzikálna zmena z formy absorbujúcej červené svetlo na formu absorbujúcu vzdialené červené svetlo vyúsťuje do selektívnych zmien v regulácii génov zúčastňujúcich sa rastu a vývoja. Všeobecne červené svetlo (660 nm) vyvoláva odpovede kontrolované fytochrómami, zatiaľ čo vzdialené červené svetlo (730 nm) tlmí tieto odpovede. Na červené a vzdialené červené svetlo v *Arabidopsis thaliana* reaguje päť fytochrómov (phyA-E) a modré svetlo a UV žiarenie je detekované kryptochrómami (CRY1/CRY2). Dodatočne k tomu existujú ešte špecifické receptory na modré svetlo (NPH1 a NPL1) sprostredkujúce fototropizmus a iné, ešte neidentifikované fotoreceptory, ktoré monitorujú UV-B oblasť (Briggs a Olney 2001).

Medzi množstvom svetla a priebehom senescencie existuje určitá závislosť. Nedostatok svetla alebo skrátenie doby pôsobenia svetla (tzn. napr. skracovanie fotoperiód, resp. skracovanie dňa) sú jednými z enviromentálnych signálov, ktoré môžu indukovať senescenciu rastlín a zmeny s ňou spojené ako zníženie obsahu Chl, pokles hodnoty F_v/F_m alebo q_p a zvýšenie miery lipidovej peroxidácie (Vlčková a kol. 2006, Annanieva a kol. 2008). Svetlo o vysokej intenzite môže u rastlinného organizmu spôsobiť preexcitovanie fotosyntetického aparátu, ktoré môže viesť ku akumulácii ROS a následne k fotooxidatívnomu poškodeniu fotosyntetického aparátu a tým k urýchleniu senescencie (Vlčková a kol. 2006).

Vplyv svetla na priebeh senescencie klíčneho listu tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo* L.) sledovali napr. Annanieva a kol. (2008). Zatemnili sledovaný klíčny list a zrovnávali postup jeho senescencie v prípade, kedy bol druhý klíčny list na svetle alebo tiež zatemnený. Výsledné zistenie je, že vplyv zatemnenia sledovaného listu na urýchlenie resp. spomalenie jeho senescencie závisí od svetelného stavu druhého klíčneho listu z páru. Pri zatemnení oboch klíčnych listov autori pozorovali silné urýchlenie senescencie charakterizované poškodením ultraštruktúry chloroplastov, znížením rýchlosti fotosyntézy a fotochemického kvantového výťažku PSII. Zároveň v tomto stave bola silne znížená endogénna hladina CK. Pri zatemnení iba jedného klíčneho listu, štruktúra a funkcia fotosyntetického aparátu a taktiež obsah endogénnych CK boli oveľa menej ovplyvnené zatemnením. Tieto zistenia dávajú podnet pre myšlienku spomaľovacieho vplyvu osvetleného klíčneho listu na senescenciu zatemneného klíčneho listu.

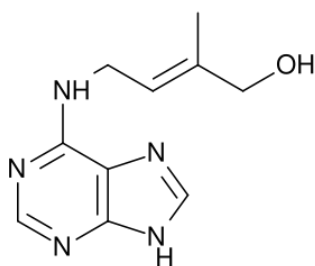
Vlčková a kol. (2006) pozorovali u oddelených listov pšenice (*Triticum aestivum* L.) inkubovaných v tme senescentné zmeny ako zmena tvaru chloroplastov z elipsovitého na viac sférický, značná disorganizácia tylakoidnej membrány a akumulácia plastoglobúl. Na kontinuálnom svetle (o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sa tvar chloroplastov nezmenil tak výrazne ako v tme, akumulácia plastoglobúl bola potlačená a relatívny obsah grán bol vyšší v porovnaní so segmentmi inkubovanými v tme. Počas senescencie na kontinuálnom svetle taktiež dochádzalo ku akumulácii asimilátov v podobe škrobových zŕn v chloroplastoch. Zníženie rýchlosti CO_2 asimilácie bolo pozorované u segmentov v oboch svetelných režimoch.

Z vyššie uvedených príkladov je vidieť, že rôzne svetelné podmienky indukujú rozdielne odpovede rastlinného organizmu alebo pletív súvisiace s ich senescenciou,

ktoré tiež závisia na spôsobe zatemnenia (celá rastlina alebo individuálne časti) (Annanieva a kol. 2008).

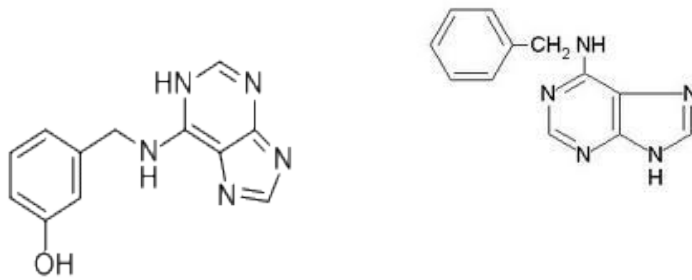
2.2 Cytokiníny

CK sú skupinou rastlinných regulátorov rastu, ktoré sú derivátmi adenínu. Prvým cytokinínom objaveným v rastlinách bol *trans*-zeatin (Obr. 1), avšak prvým izolovaným CK bol kinetin (6-furfurylaminopurín), ktorý bol identifikovaný v roku 1956. Od objavenia CK sa postupne preukázala ich široká pôsobnosť v rôznych procesoch rastlinného života. Dnes sú CK známe ako esenciálne zložky rastlinného rastu a vývoja. Ich biologický efekt na rastlinné bunky a pletivá zahŕňa vplyvy na také procesy, akými sú génová expresia, bunecný cyklus, vývoj chloroplastov, biosyntéza chlorofylu, rast koreňa a rast výhonu, senescencia, transport a mobilizácia živín (Mok a Mok 2001, Werner a kol. 2001, Mik a kol. 2011, Wulfetange a kol. 2011). Na bunecnej úrovni CK podporujú bunecné delenie (sú pozitívnymi regulátormi bunecného delenia) a diferenciáciu buniek a stimulujú biogénu chloroplastov a syntézu chlorofylu (Mok a Mok 2001). CK sú známe schopnosťou spomaliť zmeny spojené so senescenciou, ako sú tvar chloroplastov, degradácia chlorofylu a akumulácia plastoglobúl. Sú schopné ovplyvniť mieru lipidovej peroxidácie a rýchlosť fotosyntézy (Vlčková a kol. 2006). Činnosť CK je však často maskovaná vzájomným pôsobením s inými hormónmi (Mok a Mok 2001) a môže sa líšiť pre rôzne rastlinné druhy (Husičková a kol. 2012).



Obr. 1.: Štruktúrny vzorec zeatinu, prvého objaveného cytokinínu v rastlinách.

Cytokiníny môžu byť klasifikované podľa konfigurácie ich N⁶-postranného reťazca na izoprenoidné (napríklad zeatin (Z) alebo izopentenyladenín (iP)) a aromatické CK, ktoré obsahujú aromatického substituenta v N⁶-polohe (napríklad kinetin (Kin) či 6-benzylaminopurín (BAP) - Obr. 2). *Meta*-topolin (mT) alebo tiež N⁶-(*meta*-hydroxybenzyl)adenín je v súčasnosti dobre identifikovaný, prirodzene sa vyskytujúci, aromatický cytokinín (Obr. 2). Je derivátom benzyladenínu, ktorého aktivita ako cytokinínu je relatívne dobre známa (Vlčková a kol. 2006).



Obr. 2.: Štruktúrne vzorce cytokinínov, vľavo cytokinín meta-topolín (*mT*) a vpravo cytokinín 6-benzylaminopurín (*BAP*).

Obr. 2 ukazuje štruktúrne vzorce prirodzene sa vyskytujúcich CK, ktoré sa často využívajú v experimentoch študujúcich vplyv exogénnej aplikácie CK o rôznych koncentráciách. Myšlienka riadenia senescencie pomocou exogénnej aplikácie cytokinínov dala podnet k štúdiu listovej senescencie pri rôznych exogénnych koncentráciách CK (Gan a Amasino 1996 cit. v Mik a kol. 2011). Veľa z vedomostí o biologickej aktivite cytokinínov je založených práve na experimentoch, ktoré študujú dôsledky exogénnej adície CK alebo endogénneho zvýšenia obsahu CK (Rupp a kol. 1999; Werner a kol. 2003).

2.2.1 Transgénne rastliny so zníženým obsahom endogénnych CK

Transgénne rastliny sú silný nástroj v štúdiu vplyvu CK na procesy v rastlinnom organizme. V súčasnosti existujú a sa využívajú transgénne rastliny ako so zvýšeným, tak i so zníženým obsahom CK.

Transgénne rastliny s vyššou hladinou endogénnych CK môžu mať trvale zvýšenú hladinu CK alebo môžu mať expresiu génu zodpovedného za biosyntézu CK - izopentenyltransferázy (*ipt*) pod kontrolou senescenčne špecifického promotora SAG12. Zvýšený endogénny obsah CK spôsobuje zníženú apikálnu dominanciu a vývoj koreňa a zmenu tvaru listov (Sa 2001 cit. v Ferreira a kol. 2005) a podstatné oneskorenie listovej senescencie (Gan a Amasino 1996, 1997 cit. v Mik a kol. 2011).

Znížená hladina CK v rastline, najčastejšie získaná overexpresiou cytokinín oxidázy/dehydrogenázy (CKX), spôsobuje zvýšený rast koreňa a oneskorenú tvorbu a potlačenie rozvoja listov (Werner a kol. 2003, 2001). CKX je katabolický enzým, ktorého pravdepodobná úloha počas rastlinného rastu a vývoja je práve degradácia CK, pretože je u veľa rastlinných druhov zodpovedný za väčšinu metabolických inaktivácií CK (Mok a Mok 2001, Werner a kol. 2003). Aktivita tohto enzýmu bola preukázaná

u väčšiny vyšších rastlín a v rôznych rastlinných pletivách. CKX je oxidoreduktázou, ktorá obsahuje flavinadenín-dinukleotid (FAD) a nesie izoprenoidný postranný reťazec (Armstrong 1994 cit. vo Werner a kol. 2001). Gény kódujúce tento enzým je možné izolovať napríklad z *Arabidopsis thaliana* (Werner a kol. 2001).

Werner a kol. (2001) získali štyri *AtCKX* gény z *Arabidopsis thaliana*, ktoré použili ako nástroj pre zníženie obsahu endogénnych CK u tabakových rastlín. Pozorovali nárast aktivity CKX u rastlín tabaku, pričom endogénna koncentrácia rôznych foriem CK bola značne znížená oproti WT. Overexpresia *AtCKX* génov spôsobila vývojové zmeny u koreňa a výhonov (rýchlejší rast koreňa, zväčšený koreňový meristém, menej rozsiahlu koreňovú sústavu a znížený rast výhonu), neúplnú apikálnu dominanciu a spomalenú tvorbu buniek v listoch oproti WT. Ukázalo sa tak, že CK sú dôležité pre udržanie bunecného cyklu, delenia a pri tvorbe listov, jednak aby správne fungoval bunecný cyklus a jednak pre udržanie požadovaného počtu delení pre normálnu veľkosť listu. Werner a kol. (2001) tak ukázali, že overexpresia týchto štyroch génov *AtCKX* z *Arabidopsis thaliana* znižuje endogénny obsah CK a hlboko ovplyvňuje vývoj koreňa a výhonu.

Podobne Werner a kol. (2003) sledovali pôsobenie šiestich génov *AtCKX* v *Arabidopsis thaliana*. Overexpresia rôznych *AtCKX* génov spôsobila pokles obsahu CK (30 až 45 % obsahu CK oproti typu WT) a zníženú expresiu CK génu *ARR5:GUS*. Nedostatok CK vyústil do zníženej aktivity apikálneho meristému výhonu (rastliny mali zakrpatené výhony) a do značného zmenšenia listovej plochy, ktoré bolo primárne spôsobené zníženým bunecným delením počas vývoja listu. Tiež bol u transgénnych rastlín pozorovaný počiatok kvitnutia približne tri mesiace neskôr ako u typu WT rastlín. Werner a kol. (2003) tak ukázali, že CK sú pozitívny regulátory rastu výhonu a negatívny regulátory rastu koreňa a že dôležitou funkciou CK je riadenie rastu buniek meristému.

V práci Werner a kol. (2008) boli použité tabakové rastliny so zníženým obsahom CK. Podľa autorov nedostatok CK spôsobil zmeny v ultraštruktúre buniek a nárast hodnoty nefotochemického zhášania fluorescencie chlorofylu u mladých listov transgénnych rastlín, ktoré zároveň obsahovali menej Chl.

Celkovo rastliny so zníženým obsahom CK majú spomalenú tvorbu buniek a znížený počet buniek v listoch, čo indikuje absolútny nárok CK pri tvorbe listov (Werner a kol. 2001, 2003). Nedostatok CK spôsobuje pleiotropické vývojové zmeny ako napríklad znížený rast výhonu a zvýšený rast koreňa, redukuje bunecné delenie

a/alebo spôsobuje skoršie ukončenie diferenciácie buniek v liste (Werner a kol. 2003, 2008). Korene rastlín s nedostatkom CK obsahujú menej sacharidov v porovnaní s typom WT a výhony rastlín vykazujú zmeny v parametroch bunečného cyklu (Werner a kol. 2008).

Od rastlín s nedostatkom cytokinínov sa očakáva poskytnutie informácií o procesoch, v ktorých sú cytokiníny limitujúce a ktoré teda cytokiníny môžu regulovať (Werner a kol. 2003).

2.2.2 Vplyv rôznych koncentrácií CK na senescenciu

Jeden z najznámejších vplyvov cytokinínov je ich schopnosť spomaliť proces senescencie. Je veľmi dobre zdokumentované, že exogénna aplikácia CK bežne spomaľuje zmeny spojené so senescenciou (napr. Vlčková a kol. 2006). Takéto účinky CK na senescenciu sledovali Vlčková a kol. (2006) i pri aplikácii mT na segmenty listov pšenice. mT v koncentrácii 10^{-4} M spomalil degradáciu Chl, udržal tvar chloroplastov elipsovité, potlačil akumuláciu plastoglobúl a udržoval hodnoty maximálneho fotochemického výťažku PSII (F_v/F_m) behom šiestich dní takmer bez zmeny. Avšak Vlčková a kol. (2006) zistili, že vplyv CK na indukovanú senescenciu silne závisel na svetelných podmienkach, v ktorých bola inkubovaná rastlinná vzorka (pozri aj 2.2.2 *Cytokiníny a svetlo*). Napríklad mT významne znížil mieru lipidovej peroxidácie membrán u segmentov inkubovaných v tme, avšak výrazne stimuloval jej nárast u vzoriek inkubovaných na svetle.

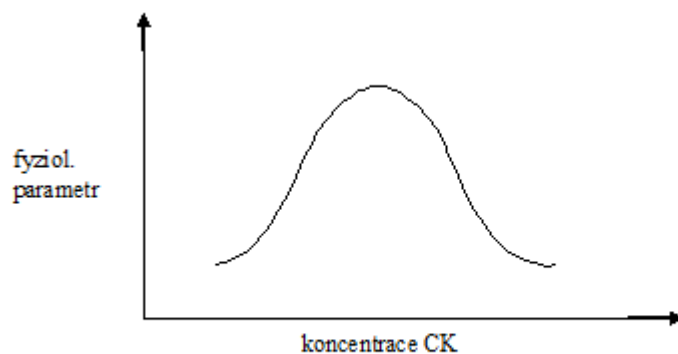
Vplyv rôznych druhov cytokinínov na senescenciu rastliny a lipidovú peroxidáciu membrán sledovali aj Mik a kol. (2011), ktorý na základe výsledkov Vlčkovej a kol. (2006) potvrdili pozitívnu koreláciu medzi vplyvom skúmaných derivátov Kin na zachovanie obsahu Chl a na mieru peroxidácie lipidov. Mik a kol. (2011) pripravili sériu ôsmich derivátov Kin substitúciou N⁹-pozície a sledovali ich účinky v rámci troch biotestov (tabakový kalusový biotest, *Amaranthus* biotest a biotest senescencie). Pozorovali, že deriváty Kin vykazovali silné anti-senescentné účinky na oddelené listy pšenice, umiestnené v tme ako i na svetle a že schopnosť týchto derivátov Kin spomaliť proces senescencie u listov v tme i na svetle bola silne spojená s ich schopnosťou ovplyvniť práve lipidovú peroxidáciu. Tá bola stanovovaná cez obsah malondialdehydu (MDA), produktu lipidovej peroxidácie. Napríklad 6-furfurylamino-9-(2-chloroethyl)purín okrem spôsobenia oneskorenia degradácie Chl v listoch pšenice umiestnených v tme, taktiež chránil membránové lipidy voči negatívnej činnosti ROS,

ktoré sa akumulujú v pletivách počas senescencie. Hoci sa ochranný účinok derivátu Kin voči činnosti ROS stal škodlivým umiestnením na svetle, silné anti-senescentné vlastnosti derivátov Kin predurčujú tieto zložky na zaujímavých kandidátov pre budúce aplikácie v biotechnológiách a poľnohospodárstve.

Obdobne Ogwenová a kol. (2010) pozorovali zníženie obsahu MDA s nárastom koncentrácie cytokinínu N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-fenylurea (CPPU) u oddelených listov rajčiaka (*Lycopersicon esculentum* L.). Tieto výsledky podporujú hypotézu, že CK sú schopné chrániť fotosyntetický aparát pred oxidatívnym poškodením (Ogwenová a kol. 2010).

Napriek tejto všeobecnej vlastnosti cytokinínov spomaliť senescenciu existujú určité prípady, v ktorých ich aplikácia spôsobuje urýchlenie senescencie (Vlčková a kol. 2006, Zacharias a Reid 1990), prípady ako vysoké koncentrácie cytokinínov a vysoké intenzity svetla. Takýto rozdiel v pôsobení CK pozorovali Zacharias a Reid (1990) pri aplikácii 6-benzyladenínu (BA) na listové segmenty *Arabidopsis thaliana*. Zatiaľ, čo u vzoriek inkubovaných v BA o koncentrácii 10^{-6} M bol spomalený pokles obsahu Chl (hlavne sa spomalenie výrazne prejavilo pre vzorky v tme), pri koncentrácii 10^{-5} M a vyššie (tj. 10^{-4} M a 10^{-3} M) bola pozorovaná stimulácia degradácie Chl.

Na základe vlastných výsledkov a informácií o pôsobení rôznych koncentrácií cytokinínov na senescenciu uvedených v literatúre bol Husičkovou a kol. (2012) vytvorený model koncentračnej závislosti CK (Obr. 3). Tento model predpokladá, že zvyšovanie endogénnej hladiny CK vedie síce ku spomaleniu procesu starnutia, avšak pri prekročení určitej „hraničnej“ koncentrácie CK dochádza naopak k urýchleniu (akcelerácii) senescencie (tým i k urýchleniu degradácie chloroplastov a Chl), kde sa vysoká koncentrácia CK stáva pre rastlinný organizmus toxická. Účinok exogénnej aplikácie CK je silne závislý na koncentrácii, ktorá sa aplikuje, i na trvaní daného ošetrenia (Husičková a kol. 2012).



Obr. 3.: Návrh modelu pre závislosť fyziologického parametra na koncentrácii cytokinínov (CK). Za fyziologický parameter pokladáme napr. „leaf longevity“ (nepublikovaný model autorov: Husičková a kol. (2012)).

„Hraničná“ koncentrácia CK sa môže značne líšiť od jedného rastlinného druhu k inému a od druhu CK (Husičková a kol. 2012), čo môže byť dôsledok toho, že rôzne typy CK majú rozdielne úlohy v rozličných vývojových procesoch (Werner a kol. 2001). Rozdielne „hraničné“ koncentrácie pre rôzne CK môžu byť príčinou toho, prečo v práci Mik a kol. (2011) pri skúmaní vplyvu rôznych derivátov Kin na senescenciu zistili, že niektoré deriváty Kin neboli pre rastlinné pletivá toxické ani pri vysokých koncentráciách (na rozdiel od napr. BAP, ktorý má pri koncentrácii $> 10^{-5}$ M negatívny (urýchľujúci) účinok na senescenciu) a preto môžu byť použité v oveľa širšej koncentračnej rade než klasické CK.

Vyššie uvedený model je možné rozšíriť i na vplyv svetla na pôsobenie CK (Husičková a kol. 2012). Tento rozšírený model predpokladá, že podobný efekt ako rast koncentrácie CK má na senescenciu i narastajúca intenzita (dávka) svetla, pričom čím vyššia intenzita (dávka) svetla pri senescencii pôsobí pri súčasnom pôsobení CK, tým nižšia je „hraničná“ koncentrácia CK, pri ktorej dochádza ku zmene „pozitívneho“ účinku CK na „negatívny“.

2.2.3 Svetlo a cytokiníny

Cytokiníny sú dôležitými signálnymi molekulami rastlín. Už od začiatku ich objavenia bolo však zrejmé, že pôsobenie CK v rámci regulácie rastlinného rastu a vývoja je ovplyvnené ďalšími signálmi vrátane svetla (Rashotte a kol. 2005). CK vyvolávajú transkripčné a morfologické zmeny, ktoré sú podobné vplyvom svetla (Cherry a kol. 1994 cit. v Rashotte a kol. 2005). CK a svetlo tak môžu vyvolávať

podobné fotomorfo-genetické a biochemické odpovede v širokom rozsahu rastlinných druhov (Thomas a kol. 1997). Cytokiníny regulujú prostredníctvom signálnych dráh (okrem procesov uvedených v 2.2 Cytokiníny) i procesy, ktoré sú regulované svetlom, ako napríklad deetiolizácia a diferenciácia chloroplastov (Mok 1994 cit. vo Werner a kol. 2003) či dormancia semien a klíčenie, vývoj semien a rast, produkcia pigmentov a fotoperiodická kontrola kvitnutia (Thomas a kol. 1997).

Buschmann a Lichtenthaler (1982) ukázali, že pôsobenie cytokinínov závisí na intenzite svetla, pod ktorým sú rastliny pestované, a že rôzne reakcie ovplyvňované CK sú rôzne závislé na množstve svetla. Príkladom, red'kev siata (*Raphanus sativus* L.) rástla v tme, pod svetlom o nízkej intenzite ($62 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a pod svetlom o vysokej intenzite ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkubovaná v roztoku Kin alebo BA. Niektoré účinky CK, ako napríklad potlačenie predlžovania hypokotylu a koreňa, sa ukázali ako nezávislé na intenzite svetla. Avšak niektoré odpovede boli podporované cytokinínmi v tme a na nízkom svetle, ale potlačené pod svetlom o vysokej intenzite. Niektoré iné odpovede boli indukované cytokinínmi iba v tme a boli potlačené pod oboma svetelnými intenzitami – takéto odpovede boli pozorované pre zväčšovanie listovej plochy a akumuláciu karotenoidov a protochlorofylu. Teda, zatiaľ čo vplyvy cytokinínov môžu byť podobné vplyvom svetla, nie je to univerzálny prípad. Keď kombinované podnety dvoch faktorov presahujú určitú hranicu, ktorá sa môže líšiť pre rôzne odpovede, výsledný efekt môže byť opačný oproti tomu pozorovanému pod hranicou, podobným spôsobom aký je pozorovaný na náraste koncentrácie CK samom (Husičková a kol. 2012).

Taktiež z výsledkov Vlčková a kol. (2006) je vidieť silná závislosť pôsobenia CK na svetelných podmienkach. Vlčková a kol. (2006) sledovali vplyv mT na indukovanú senescenciu oddelených listov pšenice umiestnených na kontinuálnom svetle (o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a v tme. Zatiaľ čo u vzoriek umiestnených v tme aplikácia mT (v koncentrácii 10^{-4} M) efektívne spomalila proces senescencie (nepozmenený elipsovité tvar chloroplastov, potlačená akumulácia plastoglobúl, spomalenie poklesu obsahu Chl, potlačenie nárastu miery lipidovej peroxidácie), tak u segmentov umiestnených na svetle sa vplyv mT zmenil na opačný. Nastalo urýchlenie senescencie, znížili sa hodnoty fotosyntetických parametrov (F_v/F_m , F_m) a narástla miera lipidovej peroxidácie. V tme mT udržoval hodnoty maximálneho kvantového výťažku PS II F_v/F_m takmer nezmenené dokonca i na šiesty deň po oddelení, zatiaľ čo u kontrolných segmentov umiestnených vo vode sa hodnoty F_v/F_m značne znížili. Na

svetle maximálna fotochemická účinnosť PSII bola mierne (ale štatisticky významne) vyššia v segmentoch inkubovaných v mT ako u kontrolných segmentov na druhý deň po oddelení, avšak už na štvrtý deň po oddelení došlo k výraznému poklesu hodnoty F_v/F_m a tým funkcie PSII a na šiesty deň po oddelení u vzoriek v roztoku mT fluorescencia Chl už nebola detekovateľná. Maximálna hodnota fluorescencie F_m sa znížila podobne po oddelení v oboch meraných variantoch vrátane vzoriek umiestnených v tme inkubovaných v mT. Ochranný účinok mT, ktorý bol badateľný v tme sa stal škodlivým pri pôsobení kontinuálneho svetla. Účinok bol škodlivý v dôsledku preexcitovania fotosyntetickej aparatúry, ktoré vyústilo do oxidatívneho poškodenia (Vlčková a kol. 2006).

Ako bolo spomenuté v časti 2.2.2, CK obecné spomaľujú senescenciu, vysoké koncentrácie však spôsobujú jej akceleráciu. Toto urýchlenie je možné pozorovať často u vzoriek umiestnených na svetle (kontinuálnom či periodickom). Boli zaznamenané i vplyvy spôsobené roztokom CK v tme s priamo opačnými účinkami ako tie, ktoré boli spôsobené tou istou koncentráciou roztoku CK pod vplyvom svetla (Zacharias a Reid 1990, Vlčková a kol. 2006). Príkladom Zacharias a Reid (1990) pozorovali spomalenie poklesu obsahu Chl u oddelených listových diskov *Arabidopsis thaliana* inkubovaných v tme na 2. deň po oddelení vďaka aplikácii BA oproti kontrolným diskom umiestnených vo vode. Avšak pre vzorky na svetle s periódou 16 h svetlo a 8 h tma na 3. deň po oddelení sledovali opačný účinok a to stimuláciu rozpadu Chl a tým akceleráciu senescencie.

Tieto výsledky poukazujú na to, že svetlo ovplyvňuje účinok CK a má vplyv na priebeh senescencie a že účinky CK a svetla sú podobné, pričom ich vplyvy sú v mnoho prípadoch aditívne. Avšak keď ich spoločný vplyv prekročí určitú hranicu, ich efekty môžu byť opačné ako tie, ktoré boli pozorovateľné pod touto hranicou. Takéto chovanie je obdobné modelu pre pôsobenie rôznych koncentrácií CK na proces senescencie (Obr. 3), ktorý bol popísaný v časti 2.2.2.

3. CIEĽ PRÁCE

1. Vypracovanie prehľadu problematiky vplyvu CK na (indukovanú) senescenciu zameraného na posúdenie vplyvu koncentrácie CK a svetelných podmienok pri senescencii.
2. Meranie vplyvu rôznej koncentrácie vybraných CK a svetelných podmienok na obsah chlorofylu a parametre veľmi rýchleho indukčného javu pri indukovanej senescencii.
3. Spracovanie výsledkov experimentov a zhodnotenie vplyvu koncentrácie CK a svetelných podmienok na priebeh indukované senescencie.

4. MATERIÁL A METÓDY

4.1 Experiment I

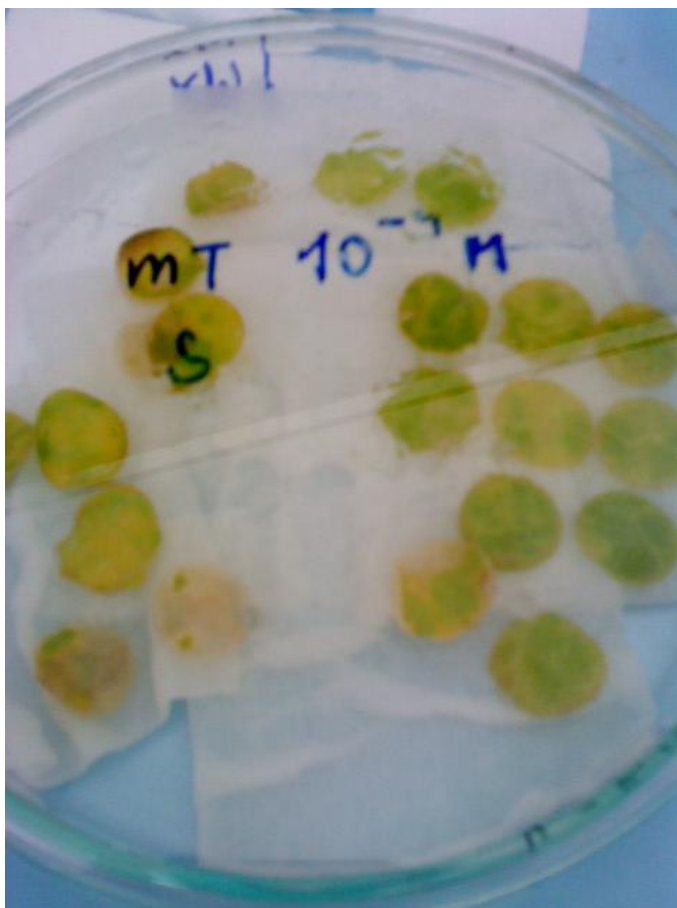
4.1.1 Rastlinný materiál

Pre meranie bol použitý jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.) a tabak virgínsky (*Nicotiana tabacum* L.).

Semená jačmeňa boli zasiate do kvetináčov s perlitom. Kvetináče sa umiestnili do fytkomory s teplotou 20°C, s cyklom 16 hodín svetlo o intenzite $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 8 hodín tma a relatívnej vlhkosti vzduchu 50 %. Po ôsmich dňoch (4.3.2011) od zasiatia boli pomocou nožničiek odstrihávané segmenty (4 cm od špičky) primárneho listu pre navodenie indukovanej senescencie. Listové segmenty boli postavené bazálnym koncom do jednotlivých jamiek titračných doštičiek. Každá titračná doštička obsahovala 12 stĺpcov po ôsmich radách, pričom v každej rade boli umiestnené roztoky, tzn. destilovaná voda, 0,5 % roztok DMSO a roztoky cytokinínov mT a BAP (o koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M, $3\cdot 10^{-4}$ M). Vzorky sa ďalej rozdelili na „svetelnú“ a „tmavú“ variantu. Titračné doštičky so vzorkami označené ako „tmavá varianta“ boli umiestnené do misiek zatemnených alobalom a vzorky v titračných doštičkách ako „svetelná varianta“ boli ponechané vo vyššie uvedenom svetelnom režime fytkomory. Pre meranie bolo použitých 12 segmentov pre každú variantu. Meranie prebiehalo v deň po oddelení („0.“ deň, 4.3.2011), v 7. deň po oddelení (11.3.2011) a 11. deň po oddelení (15.3.2011). Listové segmenty zo „svetelnej“ varianty boli pred meraním zatemnené po dobu 30 min za účelom dosiahnutia rovnomerného rozloženia chloroplastov v bunke a eliminácie vplyvu pohybu chloroplastov na meranie obsahu chlorofylu.

Druhý rastlinný materiál, tabak virgínsky, bol pestovaný v pôde typu Potgrond H (Klasmann-Deilmann GmbH, Nemecko) v skleníku Katedry botaniky v Holicí. Boli použité rastliny „wild-type“ (WT) a rastliny so zníženým obsahom cytokinínov, spôsobeným overexpresiou cytokinín oxidázy/dehydrogenázy (rastliny označené ako „CKX“). Z odobratých listov tabaku (typ WT i typ „CKX“) boli pomocou korkovrtu vyrezané disky o priemere 15 mm pre navodenie indukovanej senescencie. Disky boli umiestnené v počte desať do Petriho misky na filtračný papier (Obr. 4), ktorý bol nasiaknutý príslušným roztokom (destilovanou vodou, 0,5 % roztokom DMSO a roztokom cytokinínov mT a BAP o koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M, $3\cdot 10^{-4}$ M). Jedna Petriho miska obsahovala tabakové disky typu WT i „CKX“. Vzorky sa rozdelili na dve

svetelné varianty. „Tmavá“ varianta bola umiestnená na prepravku, ktorá bola prikrytá alobalom a „svetelná“ varianta bola ponechaná vo svetelnom režime fytokomory (opäť v podmienkach režimu 16 h svetlo a 8 h tma, 50 % relatívna vlhkosť vzduchu a teplota 20°C). Meranie prebiehalo na oddelených rastlinách po 30 min zatemnení v deň oddelenia („0.“ deň, 18.3.2011) a 6. deň po oddelení (24.3.2011)).



Obr. 4.: Spôsob uloženia diskov tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) v Petriho miske, „svetelná“ varianta (označená ako S). Inkubované v cytokiníne metatopolín (mT) pri koncentrácii 10^{-4} M. V ľavej polovici misky umiestnené vzorky typu WT a v pravej polovici umiestnené vzorky typu „CKX“ (7. deň po oddelení).

4.1.2 Použité metódy

V experimente I bol sledovaný relatívny obsah chlorofylu a v prípade tabaku taktiež parameter F_v/F_p . Meranie relatívneho obsahu chlorofylu prebiehalo pomocou prístroja chlorofylmeter SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko). Parameter F_v/F_p , ktorý vyjadruje maximálny kvantový výťažok fotochémiie PSII (Krause a Weis 1991), bol meraný pomocou prístroja Fluorpen (Photon Systems Instruments, Česká republika). Pomer F_v/F_p je počítaný pomocou vzťahu:

$$F_v/F_p = (F_p - F_o) / F_p,$$

kde F_p značí intenzitu fluorescencie vo vlne P krivky veľmi rýchlej fluorescenčnej indukcie (vrFI) a F_o vyjadruje hodnotu minimálnej fluorescencie. Intenzita použitého svetla pri meraní bola $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Meranie F_v/F_p boli prevádzané v strednej časti listového segmentu po 30 minútovej adaptácii na tmu. Aby nedošlo k ovplyvňovaniu senescencie, prebiehali merania pri slabom zelenom svetle. Po premeraní boli vzorky vrátené do titračnej doštičky a vložené späť do príslušného svetelného režimu.

4.2 Experiment II

4.2.1 Rastlinný materiál

Semená jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) boli zasiate do perlitu a umiestnené do fytkomory pri teplote 20°C , relatívnej vlhkosti vzduchu 50 % a pri cykle 16 h svetlo/8 h tma ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Po ôsmich dňoch (12.10.2011) od zasiatia boli pomocou skalpelu odrezané segmenty (4 cm od špičky) primárneho listu pre navodenie indukovanej senescencie. Listové segmenty boli postavené bazálnym koncom do jednotlivých jamiek titračných doštičiek, ktoré boli naplnené po radách destilovanou vodou, 0,5% roztokom DMSO a roztokom cytokinínov mT a BAP (o koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M, $3\cdot 10^{-4}$ M) rozpustených v 0,5% DMSO.

Vzorky sa ďalej rozdelili na „svetelnú“ a „tmavú“ variantu. „Tmavá“ varianta bola umiestnená do čierneho vreca a „svetelná“ do priehľadného igelitu. Pričom „svetelná“ varianta vzoriek bola pre podrobnejšie sledovanie vplyvu svetla na senescenciu rastlín následne rozdelená na 4 varianty označované ako:

- IK varianta – varianta vzoriek na intenzívnom kontinuálnom svetle o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,
- NK varianta – varianta vzoriek na kontinuálnom svetle o intenzite $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,
- IP varianta – varianta vzoriek na intenzívnom periodickom svetle o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (16 h svetlo/8 h tma),
- NP varianta - varianta na periodickom svetle o intenzite $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (16 h svetlo/8 h tma).

Pre meranie bolo použitých 12 segmentov pre každú variantu.

4.2.2 Použité metódy

V experimente boli sledované parameter F_v/F_p a relatívny obsah chlorofylu. Meranie relatívneho obsahu chlorofylu prebiehalo pomocou prístroja chlorofylmeter SPAD-502 a parameter F_v/F_p meraný pomocou fluorimetra PEA (Plant Efficiency Analyser) firmy Hansatech (King's Lynn, Anglicko). Intenzita použitého svetla pri meraní bola $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Všetky merania boli prevádzané v strednej časti listového segmentu po 30 minútovej adaptácii na tmu. Aby nedošlo k ovplyvneniu senescencie prebiehali merania pri slabom zelenom svetle. Po premeraní boli vzorky vrátené do titračnej doštičky a vložené späť do experimentálneho prostredia.

Meranie prebiehalo v piatich termínoch v rámci 12 dní po oddelení (12.10., 15.10., 18.10., 21.10, 24.10.2011).

4.3 Kalibračná krivka pre chlorofylmeter SPAD-502

Chlorofylmeter SPAD-502 slúži pre rýchle a nedeštruktívne stanovenie obsahu chlorofylu meraním priepustnosti (transmisie) žiarenia o vlnovej dĺžke 650 nm cez list. Získaná hodnota obsahu chlorofylu v listoch je však iba relatívna. Pre zistenie skutočne obsahu chlorofylu v listoch je nutné údaje chlorofylmetra okalibrovať. Kalibrácia bola prevedená pomocou súčasného merania relatívneho obsahu chlorofylu chlorofylmetrom a analytického stanovenia obsahu chlorofylu v danej vzorke listu. Zo získaných hodnôt bola zostrojená kalibračná krivka (viď Príloha 1).

Kalibrácia bola prevedená pre listy jačmeňa siateho. Segmenty listov jačmeňa boli adaptované na tmu po dobu približne 30 min a následne bol pri izbovej teplote zmeraný relatívny obsah Chl pomocou chlorofylmetra približne v strede segmentu. Po premeraní sme pomocou skalpela vytvorili 2 cm segmenty (od vrcholu segmentu odrezaný 1 cm a od spodnej časti segmentu 1 cm), pre ktoré sme zistili hmotnosť (m) zvážením a plochu (P). Plocha bola zistená obkresľovaním obrysu segmentu na priesvitnú fóliu, ktorá bola oskenovaná a obrysy plôch boli vyhodnotené pomocou programu Image Analyses. Následne sme jednotlivé vzorky umiestnili do kryoskúmaviek a zamrazili pomocou tekutého dusíka.

Zamrazené vzorky sme vložili do vychladenej trecej misky, v ktorej sme ich rozotrelí s pridaním MgCO_3 a malého množstva 80 % acetónu. Homogenát bol centrifugovaný pri 3600 g po dobu 5 min. Následne boli pomocou spektrofotometra Unicam UV550 (ThermoSpectronic, Veľká Británia) zmerané absorbancie supernatantu

pri vlnových dĺžkach žiarenia 470 nm; 646,8 nm; 663,2 nm a 750 nm s použitím 1 cm kyvety. V prípade potreby bol počas merania extrakt nariadený 80 % acetónom tak, aby absorbanca pri 663,2 nm bola v rozmedzí od 0,4-0,8.

Z takto získaných dát sa previedol výpočet obsahu jednotlivých typov chlorofylu a ich súčtu, tzn. obsah Chl a, Chl b a Chl (a+b) pomocou vzťahov od Lichtenthalera (1987). Jednotlivé hodnoty obsahu Chl (a+b) sme vzťahli na jednotku plochy P a taktiež na jednotku hmotnosti segmentu m. Pre zostrojenie kalibračnej krivky tak bola použitá koncentrácia Chl (a+b) vzťahnutá na jednotku plochy a hodnoty relatívneho obsahu Chl namerané chlorofylmetrom (Príloha 1 – Obr. 14). Ako najvhodnejší fit bola použitá polynomická krivka stupňa 3. Z tejto krivky bola získaná kalibračná rovnica, ktorá bola použitá pre prepočet hodnôt relatívneho obsahu Chl braného ako 100 % u výsledkov prezentovaných v obrázkoch (Obr. 8 – 13). Získaná kalibračná rovnica má tvar:

$$y = (-0,0066) \cdot x^3 + 0,19456 \cdot x^2 - 0,48808 \cdot x + 0,15112$$

kde za „x“ považujeme hodnoty koncentrácie Chl (a+b) a za „y“ hodnoty namerané chlorofylmetrom SPAD-502 v relatívnych jednotkách.

Dodatočne bola zostrojená krivka pre závislosť relatívneho obsahu Chl zisteného chlorofylmetrom na koncentrácii Chl (a+b) vzťahnutého na jednotku hmotnosti (Príloha 1 – Obr. 15).

4.4 Štatistická analýza

Namerané dáta boli spracované pomocou programu Microsoft Excel a Origin (verzia 8.5, OriginLab Corporation, USA). Štatisticky významne rozdiely medzi dátami boli stanovované pomocou testu ANOVA (Analyses of variance). Bol použitý typ jednoduchého triedenia, tzv. jednocestná ANOVA, u ktorej boli vyhodnocované testy Bonferroniho, Tukeyho a Scheffeho.

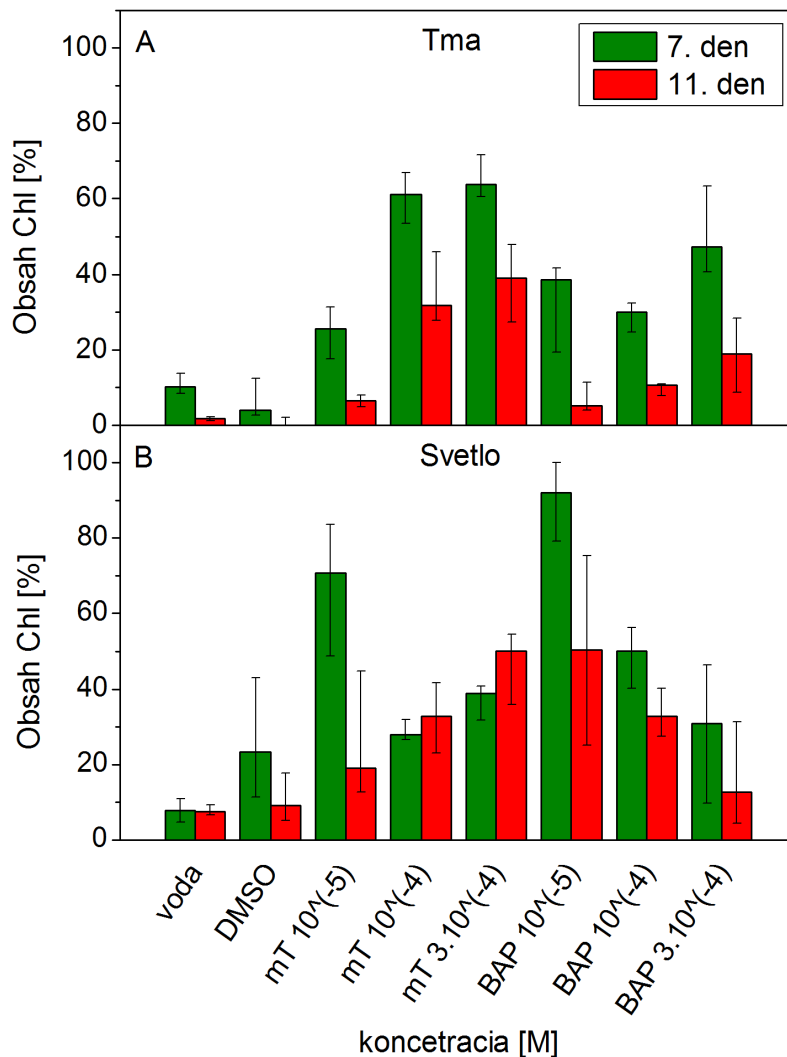
5. VÝSLEDKY

V prevedených experimentoch sa použil rastlinný materiál a metódy opísané v kapitole 4. Materiál a metódy. Indukovaná senescencia oddelených listových vzoriek udržiavaných v rôznych koncentráciách CK a v rôznych svetelných podmienkach bola charakterizovaná poklesom relatívneho obsahu chlorofylu, ktorý sa sledoval pomocou chlorofylmetra SPAD-502. Ako parameter stavu fotosyntetického aparátu, ktorý odráža funkciu PSII, sme použili pomer F_v/F_p , ktorý sa sledoval pomocou prístrojov Fluorpen (v Experimente I) a PEA (v Experimente II).

5.1 Experiment I

Hodnota obsahu Chl nameraná bezprostredne po oddelení listových vzoriek jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) a tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) (v tzv. „nultý“ deň) predstavovala 100 % a podľa kalibračnej rovnice pre jačmeň (Príloha 1) odpovedala $20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $38 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ pre tabak typu WT a $35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ pre tabak typu „CKX“. Kalibračná rovnica pre jačmeň bola určená meraním (Príloha 1), kalibračnú rovnicu pre tabak virgínsky poskytla M. Špundová [$y=(-0.001)\cdot x^3+0,06\cdot x^2+0,55\cdot x+1,67$].

Hordeum vulgare L.



Obr. 5.: Zmeny obsahu chlorofylu počas indukovanej senescencie v tme (A) a na svetle (B) u vzoriek jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: destilovaná voda, 0,5 % roztok DMSO, mT a BAP v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M. Vyjadrené v % obsahu Chl u vzoriek ihneď po oddelení („nulový“ deň; 100 % = $20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, kde $n \in \langle 6, 10 \rangle$.

U vzoriek jačmeňa siateho umiestnených v tme a inkubovaných v destilovanej vode a DMSO dochádzalo s dobou po oddelení k výraznému poklesu obsahu Chl (Obr. 5A). U vzoriek inkubovaných v destilovanej vode došlo k poklesu obsahu Chl na hodnotu približne 10 % v 7. deň po oddelení a na hodnotu približne 2 % v 11. deň po oddelení. U vzoriek inkubovaných v DMSO došlo ešte k výraznejšiemu poklesu než u destilovanej vody, kde 7. deň po oddelení poklesol obsah Chl na 4 % a v 11. deň došlo k zníženiu obsahu Chl až na hodnotu 0 %. Cytokiníny mT i BAP oproti vode a DMSO tento pokles spomalili, ako je zjavné z vyšších hodnôt obsahu Chl 7. i 11. deň po oddelení. Najvýraznejšie spomalenie bolo zaznamenané u roztoku mT o koncentráciách

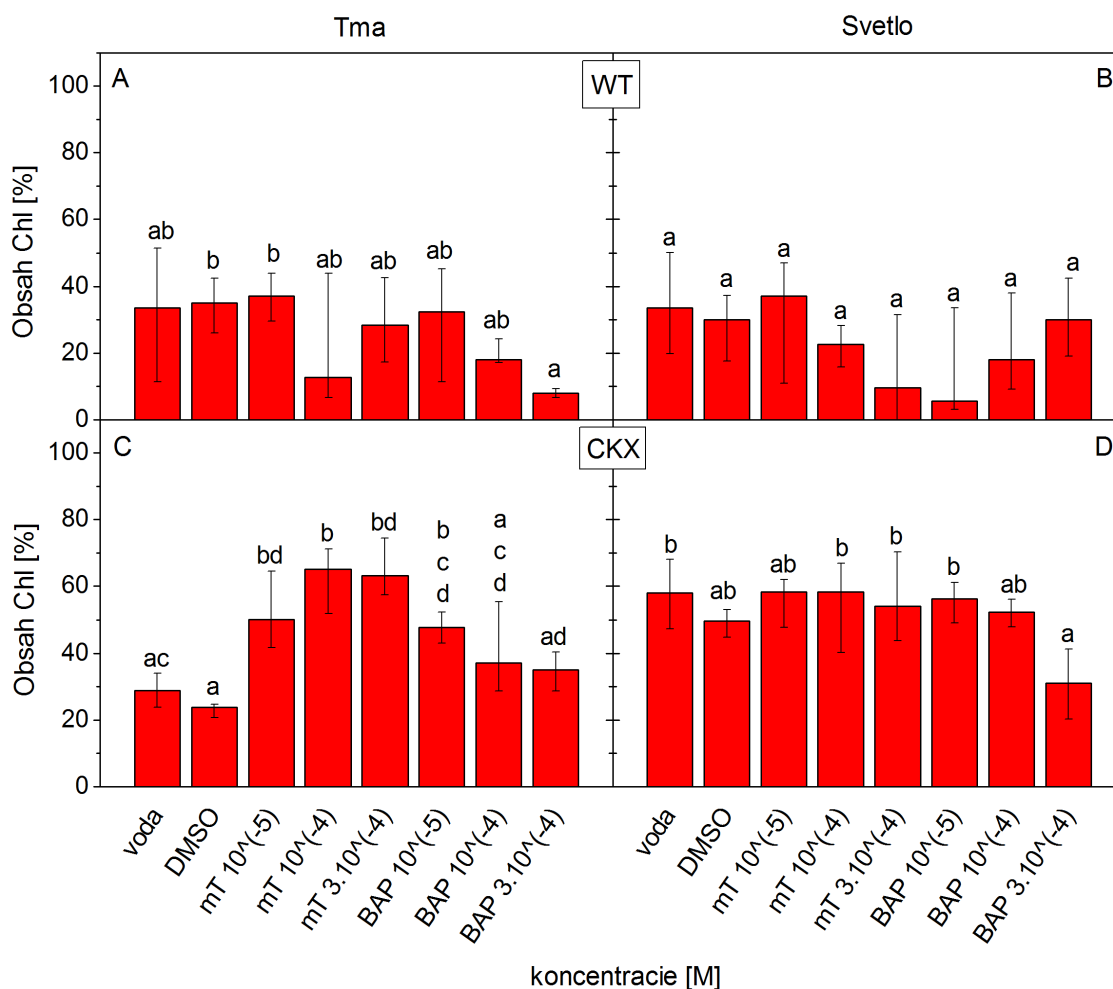
10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M. Hodnota obsahu Chl pre koncentráciu 10^{-4} M klesla v 7. deň po oddelení na 61 % a na 11. deň až na 31 %. U koncentrácie $3 \cdot 10^{-4}$ M roztoku mT poklesol obsah Chl na 7. deň približne na 64 % a na 11. deň na 39 % (Obr. 5A).

Taktiež u vzoriek jačmeňa umiestnených na svetle a inkubovaných vo vode a DMSO dochádzalo po oddelení k výraznému poklesu obsahu Chl (Obr. 5B), avšak tento pokles bol pomalší v porovnaní so vzorkami v tme (Obr. 5A). Tiež v tomto svetelnom režime oba použité CK spomalili pokles obsahu Chl v oddelených listoch oproti vzorkám umiestnených vo vode a DMSO 7. i 11. deň po oddelení. Najväčšie spomalenie bolo zistené u vzoriek inkubovaných v roztoku BAP o koncentrácii 10^{-5} M. Najmenší efekt dosahoval roztok BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M, kde obsah Chl v 11. deň po oddelení klesol až na hodnotu približne 12 %. V tomto svetelnom režime je pre roztok cytokinínu BAP zrejmy pokles jeho účinku s rastúcou koncentráciou.

U diskov tabaku typu WT umiestnených v tme a inkubovaných vo vode a v DMSO bol sledovaný pokles obsahu Chl asi na 33 % po šiestich dňoch po oddelení pre vzorky v destilovanej vode a na 35 % pre vzorky v DMSO (Obr. 6A). Efekt CK na obsah Chl nebol významný s výnimkou roztoku BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M, kde obsah Chl poklesol na hodnotu nižšiu než bola hodnota detekovaná v daný deň u DMSO.

U diskov tabaku typu WT umiestnených na svetle a inkubovaných vo vode a DMSO bol pokles obsahu Chl podobný ako u diskov v tme (Obr. 6B). Efekt CK bol vo všetkých prípadoch nepreukázateľný.

Nicotiana tabacum L.



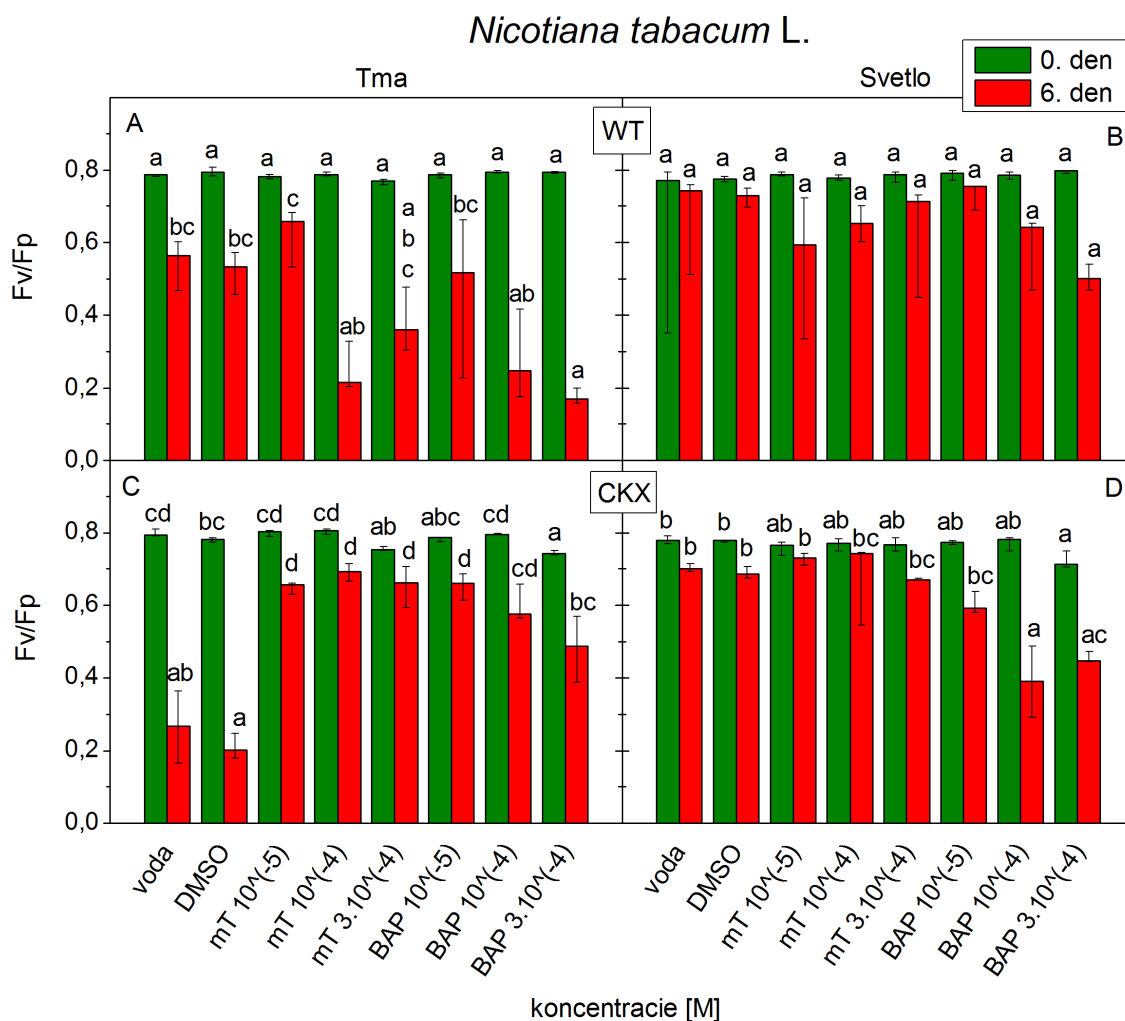
Obr. 6.: Zmeny obsahu chlorofylu po 6 dňoch indukovanej senescencie v tme (A, C) a na svetle (B, D) pre disky tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) typu WT a „CKX“ inkubovaných v jednotlivých roztokoch: destilovaná voda, 0,5 % roztok DMSO, mT a BAP v koncentráciách 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M a 3·10⁻⁴ M. Vyjadrené v % obsahu Chl u vzoriek ihneď po oddelení („nultý“ deň; 100 % = 38 μg·cm⁻² pre tabak typu WT a 35 μg·cm⁻² pre tabak typu „CKX“). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, n=10. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

V listových vzorkách „CKX“ umiestnených v tme (Obr. 6C) bol pokles obsahu Chl zrovnateľný s poklesom u vzoriek typu WT (Obr. 6A), avšak na rozdiel od typu WT tu CK tento pokles signifikantne spomalili vo väčšine prípadov, a to u vzoriek v roztoku mT o koncentracii 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M, 3·10⁻⁴ M a v roztoku BAP o koncentracii 10⁻⁵ M. Vplyv BAP o koncentracii 10⁻⁴ M a 3·10⁻⁴ M bol nesignifikantný. Najvýraznejšie spomalenie poklesu obsahu Chl spôsobil roztok mT o koncentracii 10⁻⁴ M a 3·10⁻⁴ M, kde obsah Chl klesol na približne 65 % šiesty deň po oddelení.

Na svetle došlo u vzoriek „CKX“ inkubovaných vo vode i v DMSO k spomaleniu poklesu obsahu Chl (Obr. 6D) v porovnaní s diskami umiestnenými v tme (Obr. 6C). Pozitívny efekt CK (tzn. spomalenie poklesu obsahu Chl) bol na danom svetelnom režime potlačený, ako vyplýva z podobnosti obsahu Chl u vzoriek inkubovaných v roztokoch CK a vzoriek inkubovaných vo vode a DMSO po 6 dňoch po oddelení (Obr. 6D).

Parameter F_v/F_p bol pred navodením senescencie u diskov tabaku typu WT v tme a inkubovaných vo vode a DMSO približne rovný hodnote 0,78. Šiesty deň po oddelení došlo u vzoriek vo vode a v DMSO k poklesu z hodnoty 0,78 na hodnotu okolo 0,55, čo predstavuje pokles približne o 30 % (Obr. 7A). U vzoriek v roztoku BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M došlo v 6. deň po oddelení ku zvýrazneniu tohto poklesu. Pomer F_v/F_p sa tu znížil približne na hodnotu 0,16 (Obr. 7A). Na svetle došlo k výraznému spomaleniu poklesu hodnoty F_v/F_p u vzoriek WT vo vode a DMSO po šiestich dňoch po oddelení, hodnota F_v/F_p klesla iba o 5 % (Obr. 7B). Taktiež u diskov WT v roztoku CK na svetle došlo k potlačeniu poklesu hodnoty F_v/F_p oproti vzorkám v tme. Najnižšie hodnoty pomeru F_v/F_p boli zaznamenané pre vzorky v roztoku BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M.

U vzoriek „CKX“ umiestnených v tme vo vode a v DMSO došlo v 6. deň po oddelení k výraznejšiemu poklesu hodnoty F_v/F_p než u WT približne o 70 % oproti „0.“ dňu (Obr. 7C). U listových vzoriek inkubovaných v roztokoch CK došlo ku spomaleniu poklesu F_v/F_p : hodnota F_v/F_p pre 10^{-5} M roztok mT klesla o 17 %, pre 10^{-4} M roztok mT o 15 % a pre $3 \cdot 10^{-4}$ M roztok mT približne o 12 %; pre BAP o koncentrácii 10^{-5} M klesla približne o 16 %. Najmenší pozitívny efekt dosahoval roztok BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M. U vzoriek „CKX“ umiestnených na svetle (Obr. 7D) došlo k podobným zmenám F_v/F_p ako u vzoriek WT (Obr. 7B). Najnižšie hodnoty pomeru F_v/F_p boli zaznamenané pre vzorky v roztoku BAP o koncentrácii 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M, pričom hodnoty F_v/F_p boli nižšie než u diskov WT v daných koncentráciách BAP.



Obr. 7.: Zmeny pomeru F_v/F_p počas indukovanej senescencie v tme (A, C) a na svetle (B, D) pre disky tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) typu WT a „CKX“ inkubovaných v jednotlivých roztokoch: destilovaná voda, 0,5 % roztok DMSO, mT a BAP v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M. Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=10$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant (porovnávaný zvlášť 0. a 6. deň).

5.2 Experiment II

V experimente II bolo použitých 5 rôznych svetelných režimov pre podrobnejšie študovanie účinku svetla na vplyv CK na priebeh senescencie u oddelených listov jačmeňa:

- T varianta – varianta v tme
- NP varianta - varianta na periodickom svetle o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (16 h svetlo/8 h tma),
- NK varianta – varianta na kontinuálnom svetle o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,

- IP varianta – varianta na intenzívnom periodickom svetle o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (16 h svetlo/8 h tma),
- IK varianta – varianta na intenzívnom kontinuálnom svetle o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Obdobne ako v experimente I predstavovala hodnota obsahu Chl nameraná v „nultý“ deň 100 % a odpovedala obsahu Chl $21 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Za kontrolné vzorky boli v experimente II na rozdiel od experimentu I považované len listové segmenty umiestnené v 0,5 % roztoku DMSO (v obrázkoch 8-13 označovaný ako roztok s koncentráciou „0“ M). Destilovaná voda bola tiež použitá ako kontrolný roztok, avšak zmeny meraných parametrov vo vode boli podobné ako v roztoku DMSO. Navyše roztok DMSO sa používa ako rozpúšťadlo CK a môže mať vplyv na priebeh senescencie. Z týchto dôvodov je ako kontrolný roztok braný roztok DMSO a nie destilovaná voda.

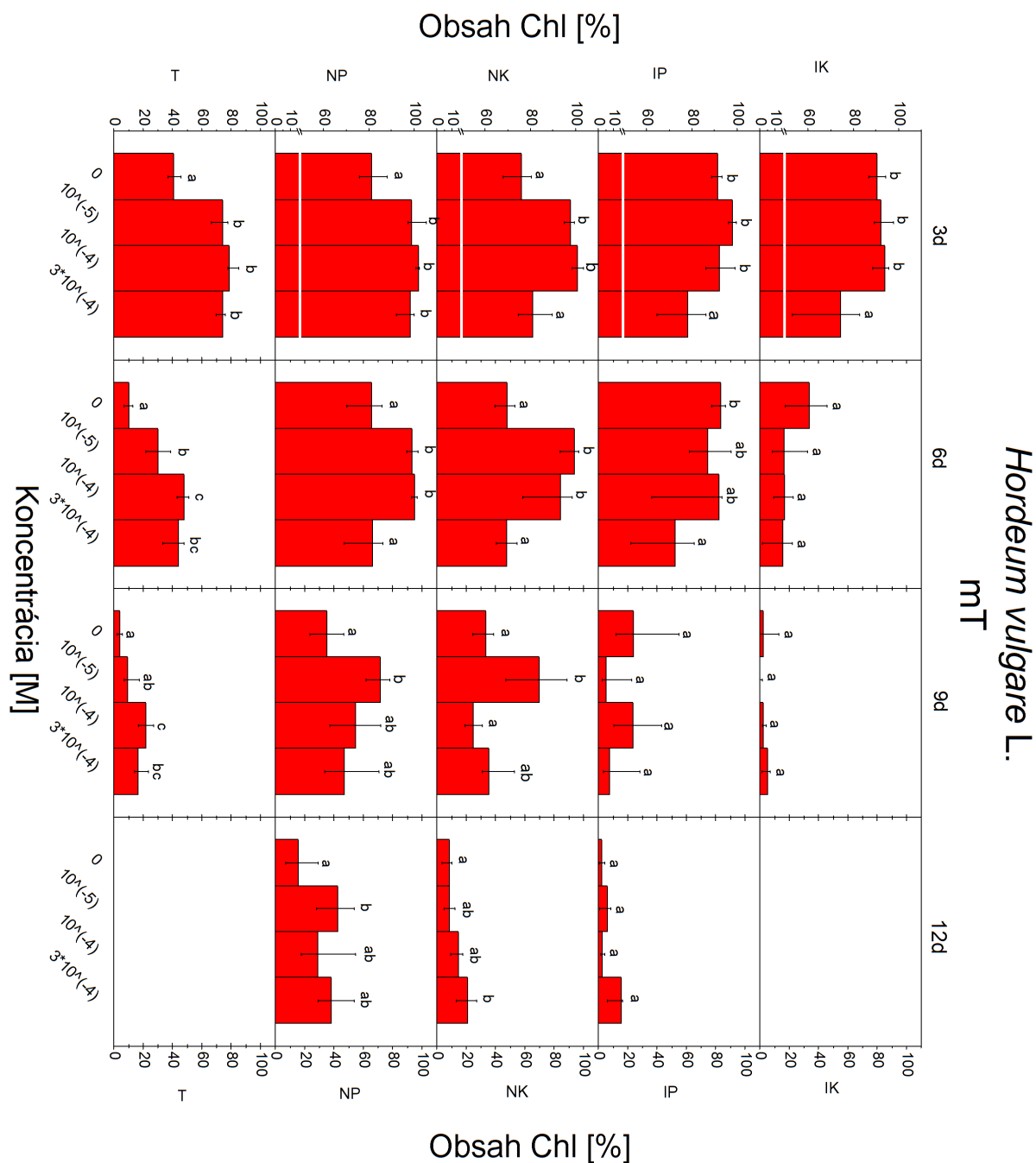
Pre vzorky jačmeňa siateho umiestnených v tme (T) v kontrolnom roztoku došlo v čase (s nárastom počtu dní po oddelení) k veľmi rýchlemu poklesu obsahu Chl (Obr. 8). V tme roztok mT spomalil pokles obsahu Chl vo všetkých použitých koncentráciách oproti kontrolnému roztoku v 3., 6. i 9. deň po oddelení. Najvýraznejšie spomalenie bolo dosiahnuté pre roztok mT o koncentrácii 10^{-4} M, ktoré však nebolo štatisticky významne rozdielne oproti koncentrácii $3\cdot 10^{-4}$ M. V 12. deň po oddelení nebol u vzoriek v tme obsah Chl merateľný.

Vo svetelnom režime NP pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku došlo k pomalšiemu poklesu obsahu Chl oproti vzorkám umiestnených v tme (Obr. 9). Kombinácia svetelného režimu NP a roztokov udržala obsah Chl u vzoriek i na 12. deň po oddelení oproti vzorkám v tme. Roztok mT mal podobný pozitívny účinok na obsah Chl i v režime NP tak ako i v tme. Najvýraznejšie spomalenie poklesu obsahu Chl oproti kontrolným vzorkám bolo zaznamenané pre roztok mT o koncentrácii 10^{-5} M a 10^{-4} M v šiesty deň (6d) po oddelení oproti kontrolnému roztoku (Obr. 8).

U vzoriek umiestnených v režime NK a inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo k pomalšiemu poklesu Chl oproti vzorkám v tme, avšak k mierne rýchlejšiemu oproti variante NP (Obr. 9). Obdobne ako u vzoriek varianty T a NP inkubovaných v roztokoch mT aj u varianty NK dochádzalo k spomaleniu poklesu obsahu Chl (Obr. 8). Najvýraznejšie spomalenie bolo zaznamenané pre roztok mT o koncentrácii 10^{-5} M a 10^{-4} M (v 3. a 6. deň po oddelení), v 9. deň pre roztok mT o koncentrácii 10^{-5} M a v 12. deň pre koncentráciu $3\cdot 10^{-4}$ M oproti kontrolnému roztoku (Obr. 8).

Vo svetelnom režime IP pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku je vidieť v 3. a 6. deň po oddelení výrazné spomalenie poklesu obsahu Chl oproti vzorkám T a NK (Obr. 9). Obsah Chl tu 3. deň po oddelení poklesol približne na 90 %, zatiaľ čo u vzoriek varianty T v tento deň poklesol približne až na 40 %. S nárastom doby po oddelení (tzn. v 9. a 12. deň po oddelení) však obsah Chl poklesol výraznejšie ako u varianty NP (najmä pre koncentráciu 10^{-5} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M roztoku mT). Pozitívny účinok roztoku mT u varianty IP nebol zaznamenaný (Obr. 8). U vzoriek v roztoku mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M poklesol obsah Chl na približne 80 % 3. deň po oddelení a na 50 % 6. deň po oddelení. Táto koncentrácia roztoku mT teda spôsobila zníženie obsahu Chl oproti kontrolnému roztoku, tzn. prejavil sa jej negatívny efekt.

U vzoriek umiestnených vo svetelnom režime IK a inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo k spomaleniu poklesu obsahu Chl oproti vzorkám v tme len na 3. a 6. deň po oddelení (Obr. 9). Pozitívny účinok roztokov mT na pokles obsahu Chl u varianty IK oproti kontrolnému roztoku nebol pozorovaný (Obr. 8). Avšak podobne ako u varianty IP v 3. deň po oddelení aj u IK roztok mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M spôsobil zníženie obsahu Chl, tzn. že daná koncentrácia mala negatívny efekt na obsah Chl. S nárastom doby po oddelení (9. deň po oddelení) došlo k rýchlejšiemu poklesu obsahu Chl oproti vzorkám varianty NP, pričom na 12. deň u varianty IP Chl už nebolo možné detekovať (Obr. 8 a 9).



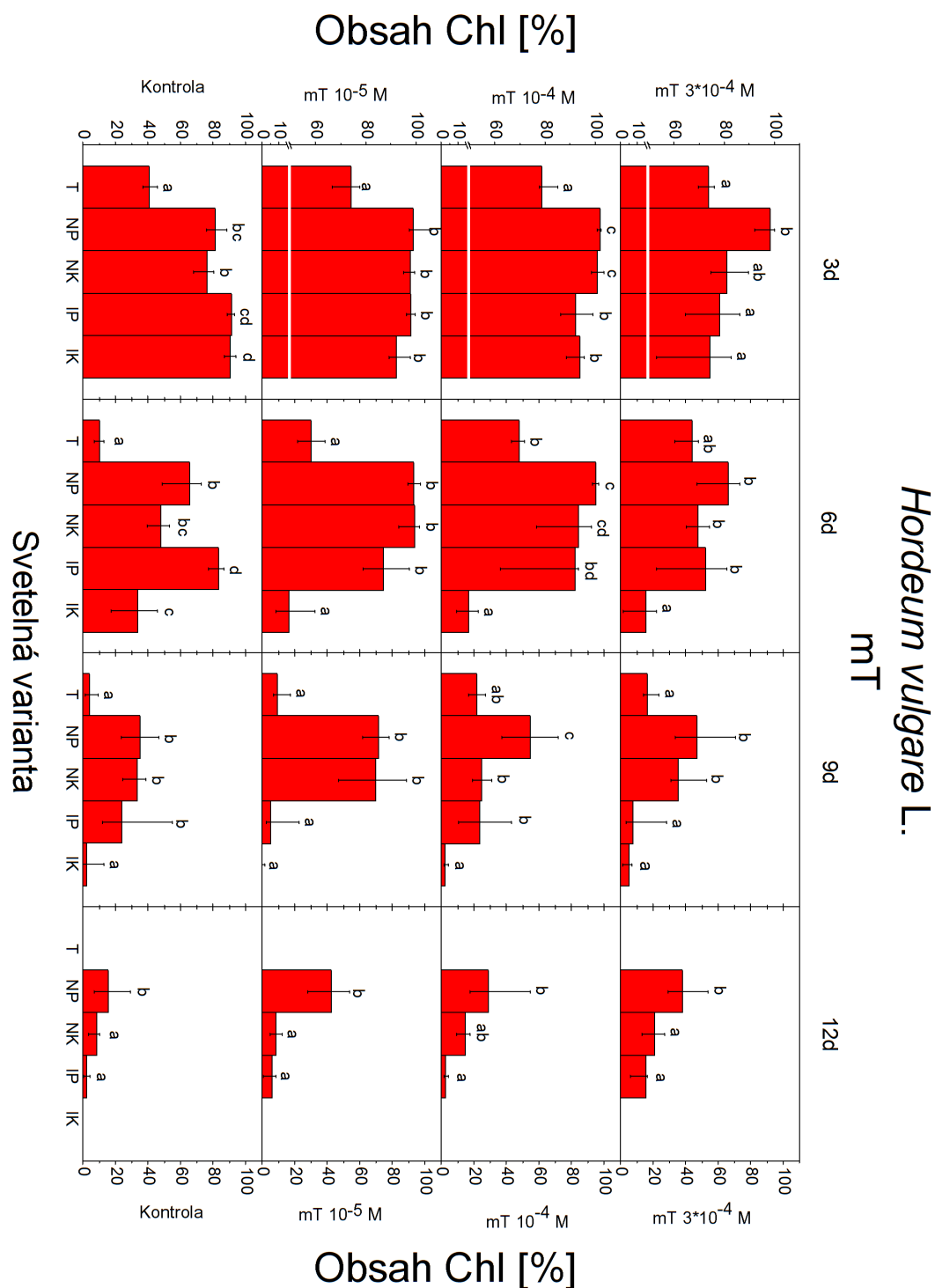
Obr. 8.: Zmeny obsahu Chl behom indukovanej senescencie listových segmentov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare L.*) inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO (koncentrácia „0“) a v roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri piatich svetelných režimoch: T – tma, NP – periodické svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, NK – kontinuálne svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, IP – periodické svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a IK – kontinuálne svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Vyjadrené v % obsahu Chl u vzoriek ihneď po oddelení („nultý“ deň; 100 % = $21 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily ($n = 12$). Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

Na Obr. 9 sú reprezentované rovnaké dáta ako na Obr. 8, avšak je zmenené ich usporiadanie tak, aby bol zreteľný efekt zvyšovania dávky svetla (a jeho štatistická významnosť) na zmeny obsahu Chl u vzoriek v rôznych koncentráciách mT. Z Obr. 9 je zjavné, že u kontrolných vzoriek (na Obr. 8 označované ako koncentrácia „0“) pri náraste svetelnej dávky je pokles obsahu Chl 3. deň po oddelení najprv spomalený (NP, NK, IP), avšak s nárastom počtu dní po oddelení dochádza naopak s nárastom svetelnej dávky k urýchleniu poklesu (IK) oproti tme.

U vzoriek inkubovaných v roztoku mT o koncentrácii 10^{-5} M 3. deň po oddelení dochádzalo u variant NP, NK, IP a IK k približne rovnakému spomaleniu poklesu obsahu Chl oproti vzorkám varianty T (Obr. 9). Pozitívny vplyv na pokles obsahu Chl oproti variante T je vidieť v 3. deň pre variantu NP, NK, IP a IK, v 6. deň po oddelení pre variantu NP, NK a IP, v 9. deň po oddelení pre variantu NP a NK a v 12. deň po oddelení len pre variantu NP. Najvýraznejšie spomalenie poklesu obsahu Chl u danej koncentrácie oproti T bol pozorovaný pre variantu NP i NK v 6. a 9. deň po oddelení. Z Obr. 9 je vidieť, že u varianty s vyššou intenzitou svetla dochádza s nárastom počtu dní k rýchlejšiemu poklesu obsahu Chl oproti variantom o nižšej intenzite svetla pri náraste počtu dní po oddelení.

Pre vzorky inkubované v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M bolo 3. deň po oddelení pozorované spomalenie poklesu obsahu Chl u varianty NP, NK, IP a IK oproti variante T. Pozitívny účinok svetla na pokles obsahu Chl oproti vzorkám varianty T je ďalej vidieť u varianty NP a NK 6. deň po oddelení. S nárastom doby po oddelení, tj. v 9. a 12. deň po oddelení sa výraznejšie spomalenie poklesu obsahu Chl prejavilo len u varianty NP. Naopak negatívny účinok svetla je pozorovateľný u varianty IK v 6. deň po oddelení - obsah Chl bol znížený oproti variante T.

U vzoriek inkubovaných v roztoku mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M došlo v 3. deň po oddelení k spomaleniu poklesu obsahu Chl len u varianty NP oproti vzorkám varianty T. Najvýraznejší spomalenie poklesu obsahu Chl u danej koncentrácie bolo pozorované pre variantu NP v 3., 9. a 12. deň po oddelení a pre variantu NK v 9. deň po oddelení.

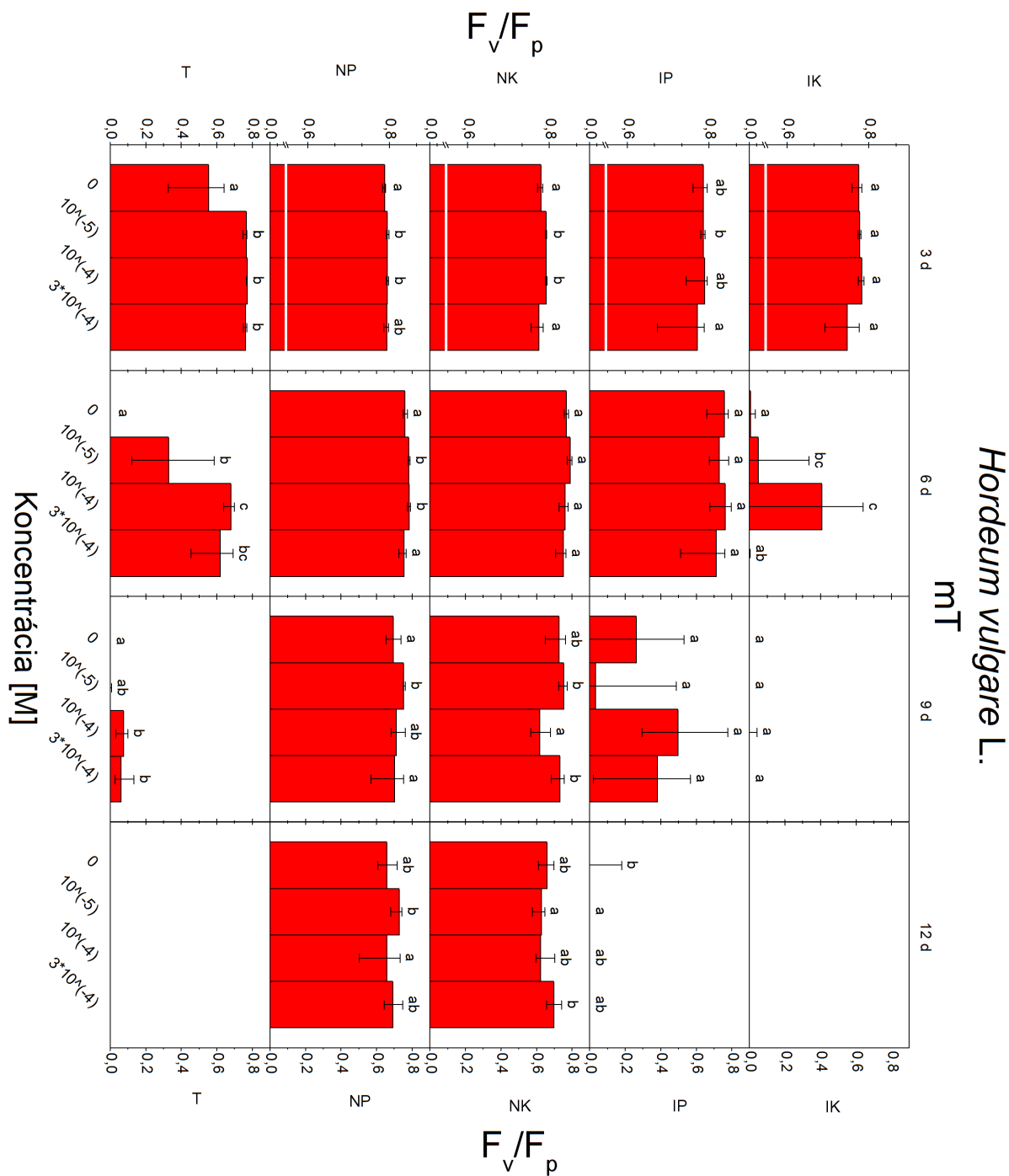


Obr. 9.: Zmeny obsahu Chl behom indukovanej senescencie listových segmentov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare L.*) inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO (koncentrácia „0“ a roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri piatich svetelných režimoch: T – tma, NP – periodické svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, NK – kontinuálne svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, IP – periodické svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a IK – kontinuálne svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Vyjadrené v % obsahu Chl u vzoriek ihneď po oddelení („nultý“ deň; 100 % = $21 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily ($n = 12$). Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

Z Obr. 9 je vidieť, že pri kombinácii určitej svetelnej dávky a roztoku o určitej koncentrácii dochádza buď k spomaleniu alebo k urýchleniu poklesu obsahu Chl. Zmena hranice medzi pozitívnym a negatívnym vplyvom koncentrácií roztoku mT s nárastom svetelnej dávky je zreteľná napríklad v 9. deň po oddelení medzi vzorkami inkubovanými v roztoku mT o koncentrácii 10^{-5} M a vzorkami v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M. U koncentracie 10^{-5} M je vidieť v tento deň výrazné spomalenie poklesu obsahu Chl pre vzorky varianty NP ako i NK. Avšak u vzoriek inkubovaných v koncentrácii 10^{-4} M je spomalenie poklesu obsahu Chl už iba u varianty NP.

Na Obr. 9 je pozorovateľné, že k pozitívnemu vplyvu na pokles obsahu Chl (tj. spomalenie) často dochádza v kombinácii nižších koncentrácií a vyšších svetelných dávok (napr. roztok mT o koncentrácii 10^{-5} M s variantom NK 6. deň po oddelení) alebo pri kombinácii vyšších koncentrácií a nižších svetelných dávok (napr. roztok mT o koncentrácii 10^{-4} M s variantom NP 6. deň po oddelení). K negatívnemu vplyvu na pokles obsahu Chl (tj. k urýchleniu) dochádza pri vysokých koncentráciách a vysokých svetelných dávkach.

U parametra F_v/F_p (maximálny fotochemický kvantový výtťažok PSII – Krause a Weis 1991) pre vzorky jačmeňa umiestnené v tme (T) v kontrolnom roztoku došlo s nárastom doby po oddelení k jeho veľmi rýchlemu poklesu (Obr. 10). V tomto svetelnom režime roztok mT spomalil pokles hodnoty F_v/F_p vo všetkých použitých koncentráciách oproti kontrolnému roztoku v 3., 6. i 9. deň po oddelení. V 12. deň po oddelení parameter F_v/F_p nebol merateľný. Najvýraznejšie spomalenie poklesu spôsobil roztok mT o koncentrácii 10^{-4} M v 6. po oddelení oproti kontrolným vzorkám.



Obr. 10.: Zmeny pomeru F_v/F_p behom indukovanej senescencie listových segmentov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO (koncentrácia „0“ a roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri piatich svetelných režimoch: T – tma, NP – periodické svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, NK – kontinuálne svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, IP – periodické svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a IK – kontinuálne svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily ($n = 12$). Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

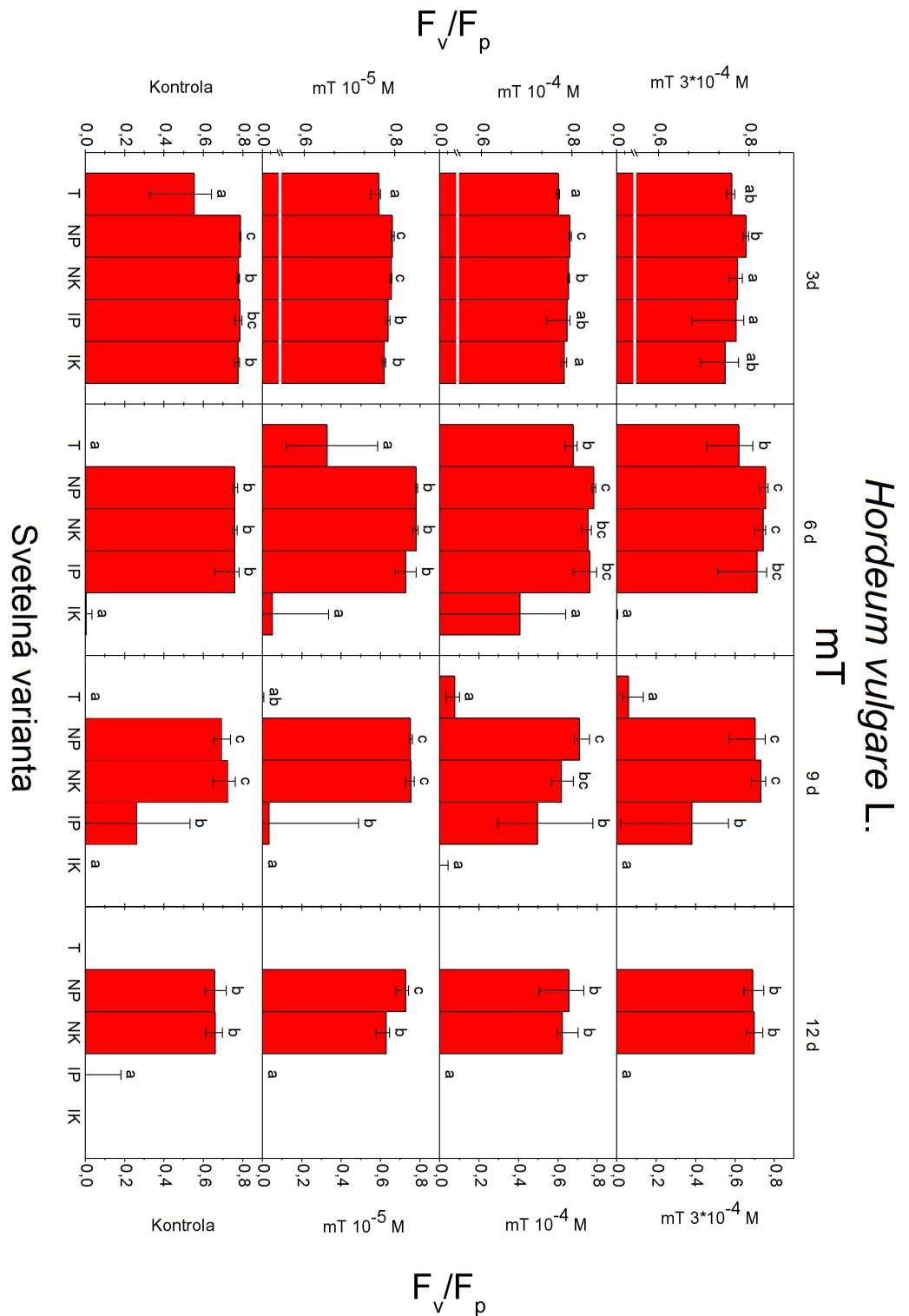
Vo svetelnom režime NP pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku došlo k výraznejšie pomalšiemu poklesu pomeru F_v/F_p oproti vzorkám umiestneným v tme (Obr. 11). V 3. a 6. deň po oddelení došlo k spomaleniu poklesu pomeru F_v/F_p pre roztok mT o koncentrácii 10^{-5} M a 10^{-4} M. V kombinácii svetelného režimu NP a roztokov sa pomer F_v/F_p udržal v rozpätí hodnôt $0,69 \pm 0,03$ i na 12. deň po oddelení (Obr. 10).

U vzoriek umiestnených v režime NK a inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo podobne ako u svetelného režimu NP k spomaleniu poklesu pomeru F_v/F_p oproti vzorkám v tme (Obr. 11). V 3. deň po oddelení došlo pre roztok mT o koncentrácii 10^{-5} M a 10^{-4} M k spomaleniu poklesu hodnoty F_v/F_p oproti kontrolným vzorkám (Obr. 10).

Vo svetelnom režime IP pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku je vidieť spomalenie poklesu F_v/F_p oproti vzorkám varianty T (Obr. 11). Avšak oproti variante NP i NK sa hodnota pomeru F_v/F_p udržala bez výraznej zmeny len do 6. dňa po oddelení, na 9. a 12. deň je už vidieť výrazný pokles hodnoty F_v/F_p .

U vzoriek inkubovaných vo svetelnom režime IK a v kontrolnom roztoku došlo k spomaleniu poklesu hodnoty F_v/F_p oproti vzorkám v tme len na 3. deň po oddelení (Obr. 10). S nárastom doby po oddelení došlo v tomto svetelnom režime k veľmi rýchlemu poklesu hodnoty F_v/F_p . Mierny pozitívny účinok roztoku mT na spomalenie poklesu hodnoty pomeru F_v/F_p oproti kontrolnému roztoku je vidieť pre koncentráciu 10^{-5} M a 10^{-4} M v 6. deň po oddelení (Obr. 10). V ostatných prípadoch efekt mT nebol preukázateľný.

Na Obr. 11 sú reprezentované rovnaké dáta ako na Obr. 10, avšak je zmenené ich usporiadanie tak, aby bol opäť zjavný efekt zvyšovanie dávky svetla (a jeho štatistická významnosť) tentokrát na zmeny parametra F_v/F_p u vzoriek v rôznych koncentráciách mT. Pozitívny účinok svetla na spomalenie poklesu F_v/F_p oproti tme je pozorovateľný v 3. deň po oddelení u varianty NP, NK, IP a IK, v 6. a 9. deň pre variantu NP, NK a IP a v 12. deň len u varianty NP a NK. Od 6. dňa po oddelení bol pokles F_v/F_p naopak urýchlený pre variantu s vyššou intenzitou svetla (IK) oproti variante s nižšou intenzitou svetla (napr. NP) - už v 6. deň po oddelení je vidieť rýchlejší pokles pre variantu IK a v 9. a 12. deň po oddelení pre variantu IP a IK oproti vzorkám varianty NP a NK.



Obr. 11.: Zmeny pomeru F_v/F_p behom indukovanej senescencie listových segmentov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO (koncentrácia „0“ a roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri piatich svetelných režimoch: T – tma, NP – periodické svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, NK – kontinuálne svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, IP – periodické svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a IK – kontinuálne svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily ($n = 12$). Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

U vzoriek inkubovaných v roztoku mT o koncentrácii 10^{-5} M 3. deň po oddelení dochádzalo k spomaleniu poklesu hodnoty F_v/F_p u všetkých svetelných variánt oproti kontrolným vzorkám v daný deň. Pozitívny vplyv svetla oproti T je vidieť podobne ako u kontrolných vzoriek v 3. deň po oddelení pre varianty NP, NK, IP a IK, v 6. deň pre varianty NP, NK a IP a v 9. a 12. deň len pre varianty NP a NK. S nárastom doby po oddelení dochádza tak k výraznejšiemu poklesu hodnoty pomeru F_v/F_p , hlavne pre varianty T a IK, neskôr i IP. Avšak v kombinácii svetelného režimu NP i NK a roztoku mT o tejto koncentrácii je vidieť oproti variante IP spomalenie poklesu F_v/F_p i na 12. deň po oddelení.

Pre vzorky inkubované v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M je pozitívny vplyv na spomalenie poklesu hodnoty F_v/F_p pozorovateľný v 3. a 12. deň po oddelení u varianty NP a NK, v 6. deň u varianty NP a v 9. deň u varianty NP, NK i IP. Najvýraznejšie spomalenie poklesu F_v/F_p bolo pozorované pre variantu NP a NK, ktoré udržali hodnotu pomeru F_v/F_p nad 0,6 i na 12. deň po oddelení. Negatívny efekt svetla je pozorovateľný pre variantu IK v 6. deň po oddelení, kde došlo k poklesu F_v/F_p oproti variante T.

U vzoriek inkubovaných v roztoku mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M bol pozorovaný pomalší pokles F_v/F_p oproti vzorkám inkubovaným v kontrolnom roztoku, hlavne pre variantu T (Obr. 10). Avšak oproti vzorkám inkubovaným v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M bol pokles F_v/F_p výraznejší hlavne pre variantu IK. Negatívny vplyv svetla sa, podobne ako u koncentrácii 10^{-4} M, prejavil pre variantu IK v 6. deň po oddelení, kde došlo k poklesu F_v/F_p oproti variante T.

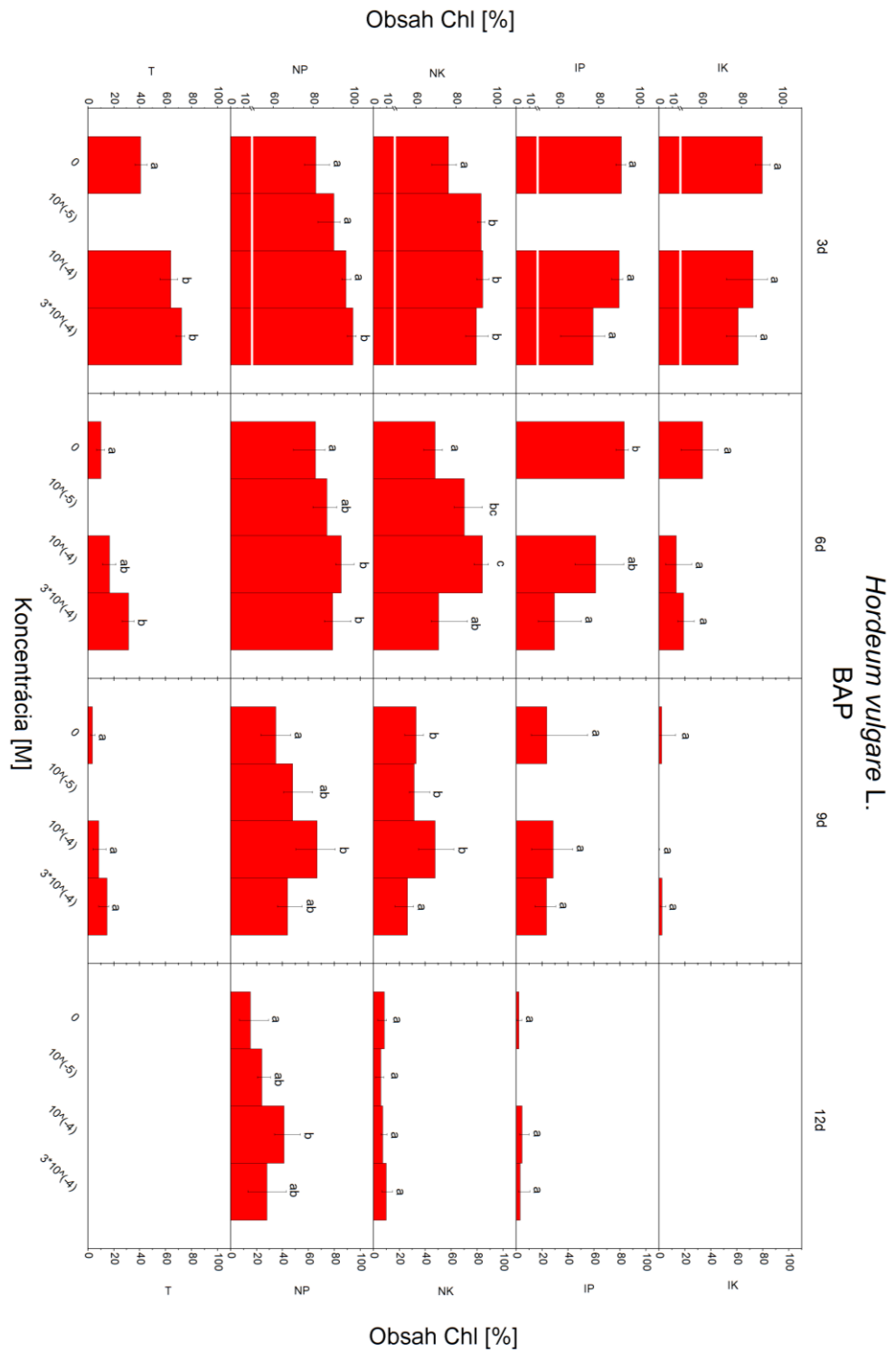
Na Obr. 12 sú zobrazené zmeny obsahu Chl u listových segmentov jačmeňa inkubovaných v roztokoch cytokinínu BAP. Je vidieť, že pre vzorky inkubované v tme v kontrolnom roztoku („0“) dochádzalo s nárastom doby po oddelení k rýchlemu poklesu obsahu Chl a už na 12. deň po oddelení nebol obsah Chl detekovateľný. Roztok BAP spomalil pokles obsahu Chl 3. deň po oddelení v oboch použitých koncentráciách (tzn. 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M) a v 6. deň po oddelení v koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M. Koncentrácia 10^{-5} M v tomto svetelnom režime nebola použitá z dôvodu nedostatku rastlinného materiálu.

Pre vzorky varianty NP inkubované v kontrolnom roztoku bol pozorovaný s nárastom doby po oddelení pomalší pokles obsahu Chl ako pre vzorky varianty T (Obr. 13). Obsah Chl bol touto kombináciou svetelného režimu a použitými koncentraciami BAP udržaný i na 12. deň po oddelení (Obr. 12). Podobne ako vo

variante T, i v režime NP BAP (o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M v 3. a 6. deň po oddelení a o koncentrácii 10^{-4} M na 6., 9. a 12. deň po oddelení) spomalil pokles obsahu Chl. Najvýraznejšie spomalenie bolo dosiahnuté pre roztok BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M 3. deň po oddelení, v 6. deň po oddelení pre koncentracie 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M a v 9. a v 12. deň po oddelení bol pokles obsahu Chl spomalený už len pre roztok BAP o koncentrácii 10^{-4} M.

U vzoriek inkubovaných v svetelnom režime NK v kontrolnom roztoku došlo podobne ako u svetelného režimu NP k pomalšiemu poklesu Chl oproti vzorkám varianty T (Obr. 13). V 3. deň po oddelení je vidieť spomalenie poklesu obsahu Chl u všetkých použitých koncentrácií BAP oproti kontrolnému roztoku (Obr. 12). Aj v tomto svetelnom režime obdobne ako u vzoriek varianty NP teda dochádzalo k pozitívnemu vplyvu BAP na pokles obsahu Chl. Najpozitívnejší efekt bol zaznamenaný pre roztok BAP o koncentrácii 10^{-4} M v 6. po oddelení oproti kontrolnému roztoku. Negatívny vplyv BAP sa prejavil u koncentracie $3 \cdot 10^{-4}$ M v 9. deň po oddelení, kedy došlo k poklesu obsahu Chl oproti kontrolnému roztoku - prejavil sa negatívny účinok tejto koncentracie (Obr. 12).

Vo svetelnom režime IP pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku je vidieť výrazné spomalenie poklesu obsahu Chl oproti vzorkám varianty T, NP i NK hlavne v 3. a 6. deň po oddelení (Obr. 13). Účinok BAP nie je však významný s výnimkou urýchlenia poklesu obsahu Chl u vzoriek v roztoku BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M v 6. deň po oddelení oproti kontrolnému roztoku, kedy sa prejavil (podobne ako v 9. deň po oddelení pre variantu NK) negatívny účinok BAP na obsah Chl (Obr. 12). Koncentrácia 10^{-5} M v tomto svetelnom režime nebola použitá z dôvodu nedostatku rastlinného materiálu.



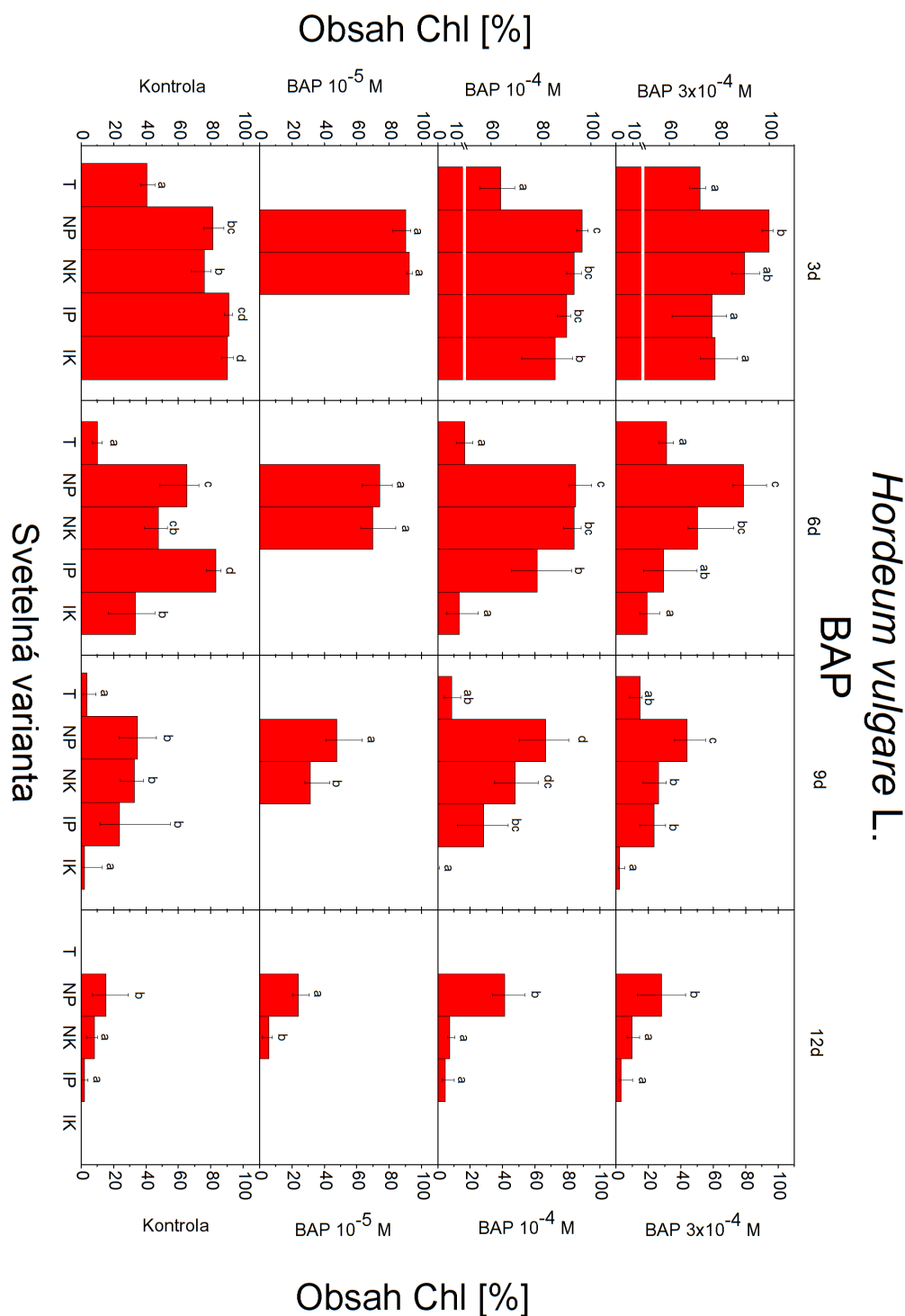
Obr. 12.: Zmeny obsahu Chl behom indukovanej senescencie listových segmentov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare L.*) inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO (koncentrácia „0“ a roztokoch BAP (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri piatich svetelných režimoch: T – tma, NP – periodické svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, NK – kontinuálne svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, IP – periodické svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a IK – kontinuálne svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Vyjadrené v % obsahu Chl u vzoriek ihneď po oddelení („nultý“ deň; 100 % = $21 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily ($n = 12$). Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

U vzoriek varianty IK inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo k pomalšiemu poklesu obsahu Chl oproti vzorkám v tme na 3. a 6. deň po oddelení (Obr. 13). S nárastom doby po oddelení došlo k rýchlemu poklesu obsahu Chl. Vplyv BAP na pokles obsahu Chl bol však vo všetkých prípadoch nepreukázateľný (Obr. 12). Koncentrácia 10^{-5} M v tomto svetelnom režime nebola použitá z dôvodu nedostatku rastlinného materiálu.

Na Obr. 13 sú prezentované rovnaké dáta ako na Obr. 12, ale je zmenené ich poradie tak, aby bol badateľný vplyv zvyšovania svetelnej dávky (a jeho štatistická významnosť) na zmeny obsahu Chl u vzoriek jačmeňa v rôznych koncentráciách BAP. Ako už bolo uvedené, u kontrolných vzoriek inkubovaných v tme dochádzalo s nárastom doby po oddelení k výraznému poklesu obsahu Chl. U varianty NP, NK a IP bol pokles obsahu Chl spomalený oproti T u kontrolného roztoku počas celého experimentu, varianta IK len do 6. dňa po oddelení, potom bol pokles tejto varianty výraznejší než u T.

Pre vzorky inkubované v roztoku BAP o koncentrácii 10^{-5} M bol sledovaný pokles obsahu Chl len pre varianty NP a NK z dôvodu nedostatku rastlinného materiálu. S nárastom doby po oddelení bol pokles obsahu Chl výraznejší pre vzorky varianty NK (Obr. 13), tj. pri pôsobení vyššej svetelnej dávky.

V rámci vzoriek inkubovaných v roztoku BAP o koncentrácii 10^{-4} M je pozorovateľný pomalší pokles obsahu Chl oproti kontrolným vzorkám (Obr. 12). Pozitívny vplyv svetla na pokles obsahu Chl je vidieť v 3. deň po oddelení pre varianty NP, NK, IP i IK, v 6. deň po oddelení pre varianty NP, NK a IP, v 9. deň po oddelení pre varianty NP a NK oproti variante T a v 12. deň po oddelení už len pre variantu NP. K najvýraznejšiemu spomaleniu poklesu obsahu Chl v tejto koncentrácii BAP tak dochádzalo pre variantu NP. V tejto koncentrácii je teda badateľné, že s nárastom svetelnej dávky dochádza k rýchlejšiemu poklesu obsahu Chl.



Obr. 13.: Zmeny obsahu Chl behom indukovanej senescencie listových segmentov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO (koncentrácia „0“ a roztokoch BAP (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri piatich svetelných režimoch: T – tma, NP – periodické svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, NK – kontinuálne svetlo o intenzite $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, IP – periodické svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a IK – kontinuálne svetlo o intenzite $(370 \pm 40) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Vyjadrené v % obsahu Chl u vzoriek ihneď po oddelení („nultý“ deň; 100 % = $21 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily ($n = 12$). Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

U vzoriek inkubovaných v roztoku BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M v 3. deň po oddelení došlo k spomaleniu poklesu obsahu Chl pre variantu NP oproti variante T (Obr. 12). Pozitívny vplyv svetla v kombinácii s koncentráciou $3 \cdot 10^{-4}$ M je pozorovateľný na 6 deň po oddelení u varianty NP a NK, ktoré spomalili pokles obsahu Chl oproti variante T (Obr. 13). V 9. a 12. deň po oddelení bol pokles obsahu Chl spomalený len vo variante NP.

Zmeny parametra F_v/F_p u vzoriek inkubovaných v roztokoch BAP boli kvalitatívne podobné zmenám detekovaným u vzoriek inkubovaných v roztokoch mT (Obr. 10, 11). Z tohto dôvodu nie sú výsledky merania F_v/F_p u vzoriek inkubovaných v roztokoch BAP v práci prezentované.

6. DISKUSIA

Je dobre zdokumentované, že so starnutím sa znižuje obsah Chl (napr. Zacharias a Reid 1990, Noodén a kol. 1997, Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006) a menia sa aj parametre fotosyntézy, akým je napr. maximálny fotochemický výťažok PSII, ktorý sa najčastejšie vyjadruje ako pomer F_v/F_m resp. F_v/F_p , pričom s nárastom doby senescencie dochádza k poklesu hodnoty tohto pomeru (napr. Vlčková a kol. 2006). Je tiež dobre známe, že exogénna aplikácia CK bežne spomaľuje procesy spojené so senescenciou, v niektorých prípadoch však môže byť pozorovaný opačný efekt. Zjednodušene je možné povedať, že pri aplikácii CK o nízkej koncentrácii je ich pôsobenie pozitívne - tzn. dochádza k spomaleniu zmien spojených so senescenciou a pri vysokých koncentráciách dochádza k stimulácii týchto zmien. Príkladom Zacharias a Reid (1990) pri pôsobení BAP o koncentrácii 10^{-6} M sledovali spomalenie poklesu obsahu Chl a u vyšších koncentrácií (10^{-4} M, 10^{-3} M) stimuláciu degradácie Chl.

Stanoviť presnú hodnotu hranice medzi „nízkou“ a „vysokou“ koncentráciou CK a povedať, ktorá je optimálna, je všeobecne zložitou úlohou. Pre rôzny druh CK je hodnota „hraničnej“ koncentrácie rôzna. Príkladom, Zacharias a Reid (1990) pri aplikácii BAP o koncentrácii 10^{-4} M na segmenty *Arabidopsis thaliana* sledovali stimuláciu senescentných zmien (pokles obsahu Chl) - vybraná koncentrácia BAP mala negatívny účinok. Na rozdiel od toho Vlčková a kol. (2006) sledovali pri aplikácii mT v tejto koncentrácii na segmenty spomalenie týchto zmien. Taktiež pre rôzny rastlinný druh sa pôsobenie jednej koncentrácie CK prejaví rôzne - pre jeden druh je vybraná koncentrácia vhodná pre inhibovanie senescentných zmien, pre iný druh je už táto koncentrácia toxická a senescenciu naopak urýchľuje (Husičková a kol. 2012).

Na základe informácií z literatúry o pôsobení rôznych koncentrácií CK na senescenciu a taktiež na základe vlastných výsledkov vytvorili Husičková a kol. (2012) model koncentračnej závislosti vplyvu CK na senescenciu (Obr. 3), ktorý predpokladá, že zvyšovanie koncentrácie CK do určitej „hraničnej“ koncentrácie má inhibujúce účinky na proces starnutia, avšak po prekročení tejto „hraničnej“ hodnoty sa účinky na senescenciu stanú stimulujúce.

Do pôsobenia CK zasahuje ešte veľa iných vonkajších faktorov, medzi ktoré patrí aj svetlo. Efekt rôznych koncentrácií CK na postup senescencie závisí práve na intenzite pôsobiaceho svetla (Buschmann a Lichtenthaler 1982). Účinky CK a svetla sú

si podobné, no keď ich spoločný vplyv prekročí určitú hranicu, ich efekty môžu byť opačné tým, ktoré boli pozorovateľné pod touto hranicou. Na svetle o nízkej intenzite sú účinky CK často podporované a na svetle o vysokej intenzite môžu byť účinky potlačené. Na vplyv svetla na účinok CK sa dá aplikovať spomenutý model koncentračnej závislosti.

V práci bol sledovaný účinok exogénnej aplikácie rôzne koncentrovaných CK (mT a BAP) a rôznych svetelných podmienok na priebeh indukovanej senescencie. Priebeh senescencie bol hodnotený cez obsah Chl a parametra F_v/F_p . Meranie prebiehalo za použitia rastlinného materiálu jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) a tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) typu WT a typu „CKX“ (s overexpresiou CKX).

V prvom experimente sme porovnávali účinok rôznej koncentrácie (10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M) mT a BAP v tme a na periodickom svetle (16 h svetlo, $90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ /8 h tma) na priebeh senescencie oddelených segmentov jačmeňa siateho. Za parameter odrážajúci mieru senescencie bol použitý obsah Chl, meranie prebiehalo v 7. a 11. deň po oddelení.

U kontrolných vzoriek (vo vode a v 0,5 % DMSO) bol zaznamenaný veľmi rýchly pokles obsahu Chl, pričom tento pokles bol rýchlejší v tme v porovnaní s kontrolnými vzorkami, ktoré boli inkubované na svetle (Obr. 5). To znamená, že priebeh senescencie bol rýchlejší v tme v porovnaní so svetlom, čo je v súlade s literatúrou. Podobný výsledok zistili napr. aj Vlčková a kol. (2006) u oddelených listov pšenice hlavne v 6. deň po oddelení alebo Zacharias a Reid (1990), ktorí detekovali rýchlejší postup senescencie pre kontrolné vzorky *Arabidopsis thaliana* v tme už v 2. deň po oddelení.

Pokiaľ sa na vzorky inkubované v tme aplikoval CK (mT alebo BAP), pokles obsahu Chl bol spomalený. Najvýraznejšie spomalenie bolo pozorované u roztoku mT v koncentrácii 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M a u roztoku BAP v koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M. Taktiež tento výsledok je v plnom súlade s literatúrou. Podobne Zacharias a Reid (1990) pozorovali pri aplikácii BAP o koncentrácii 10^{-4} M na listové disky *Arabidopsis thaliana* inkubované v tme spomalenie poklesu obsahu Chl oproti kontrolným vzorkám. Taktiež Vlčková a kol. (2006) zistili spomalenie poklesu obsahu Chl pri exogénnej aplikácii mT o koncentrácii 10^{-4} M na segmenty listov pšenice inkubované v tme.

U vzoriek inkubovaných na periodickom svetle bolo taktiež zaznamenané spomalenie priebehu senescencie pod vplyvom CK, pričom u BAP bolo zistené

posunutie hodnoty „optimálnej“ koncentrácie (tzn. koncentrácie s najviac pozitívnym vplyvom, u ktorej bolo zistené najvýraznejšie spomalenie senescencie) z $3 \cdot 10^{-4}$ M (v tme) na 10^{-5} M (Obr. 5). Podobné bolo zistenie Zachariasa a Reida (1990) po aplikácii BAP na listové disky *Arabidopsis thaliana*. V tme bola „optimálnou“ koncentráciou hodnota 10^{-3} M a na svetle došlo k posunu tejto koncentrácie až na hodnotu 10^{-6} M, resp. 10^{-5} M.

Už z tohto testovacieho experimentu teda vyplynulo, že rôzne koncentrácie mT a BAP spomaľujú senescenciu oddelených listov jačmeňa rôznou mierou a že miera ich účinku závisí na svetelných podmienkach pri senescencii. V ďalšom experimente s oddelenými listami jačmeňa bol preto detailnejšie sledovaný priebeh senescencie počas 12 dní po oddelení a bolo použitých 5 rôznych svetelných režimov.

I v tomto experimente sa potvrdil vplyv svetla na rýchlosť senescencie oddelených listov jačmeňa. U kontrolných vzoriek (inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO označovanom ako koncentrácia „0“ M) v tme (varianta T) bol väčšinou zaznamenaný veľmi rýchly pokles obsahu Chl a hodnoty parametra F_v/F_p . U kontrolných vzoriek inkubovaných na svetle (tzn. varianty NP, NK, IP, IK) väčšinou dochádzalo ku spomaleniu priebehu senescencie oproti tme (Obr. 9, 13). U varianty NP dochádzalo k najvýraznejšiemu spomaleniu poklesu obsahu Chl a parametra F_v/F_p . K podobnému, aj keď nie tak výraznému spomaleniu senescencie dochádzalo u varianty NK: u vzoriek varianty NP a NK sa často obsah Chl udržal spolu s F_v/F_p i na 12. deň po oddelení (Obr. 11). Menej výrazné spomalenie bolo pozorované pre variantu IP. U varianty IK už dochádzalo k spomaleniu poklesu parametrov oproti tme väčšinou len do 6. dňa po oddelení a následne s nárastom doby po oddelení už bol pokles obsahu Chl i F_v/F_p približne rovnaký ako pre variantu T (Obr. 9, 11). Z týchto výsledkov je vidieť, že vplyv svetla na senescenciu závisí na jeho intenzite, resp. dávke. Ak je intenzita, resp. dávka svetla nižšia, tak priebeh senescencie je spomalený. No v momente, keď sa intenzita alebo dávka svetla zvýši nad „hraničnú“ hodnotu, dochádza k rýchlemu postupu senescencie. Takéto zrýchlenie senescencie môže nastať v dôsledku preexcitovania fotosyntetického aparátu a akumulácie ROS a následného fotooxidatívneho poškodenia (Vlčková a kol. 2006). „Hraničná“ hodnota intenzity, resp. dávky svetla bude zrejme do značnej miery určená tým, na akú intenzitu (dávku) svetla je rastlina aklimovaná.

Po aplikácii mT a BAP na listové segmenty jačmeňa starnúceho v tme dochádzalo k spomaleniu senescencie u všetkých použitých koncentrácií, pričom

účinnejšie sa javili väčšinou vyššie koncentrácie tj. 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M (Obr. 8, 10, 12). U variant NP a NK bolo najvýraznejšie spomalenie pozorované väčšinou u koncentrácií 10^{-5} M a 10^{-4} M pre roztok mT a u koncentrácie 10^{-4} M pre roztok BAP. So zvýšením intenzity svetla (varianta IP a IK) sa už v niektorých prípadoch začal prejavovať negatívny účinok BAP i mT v koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M, tzn. dochádzalo k urýchleniu poklesu obsahu Chl oproti kontrole (Obr. 8, 12).

Z uvedených výsledkov je možné vypozerovať trend, že s rastúcou intenzitou/dávkou svetla dochádza k posunu „optimálnej“ koncentrácie CK. U listov starnúcich v tme sa pre mT ako „optimálna“ javila koncentrácia 10^{-4} M (Obr. 8, 10), no u varianty NK to bola skôr koncentrácia 10^{-5} M (Obr. 8, 10). U BAP bol zaznamenaný posun hodnoty „optimálnej“ koncentrácie z hodnoty $3 \cdot 10^{-4}$ M v tme na hodnotu 10^{-4} M u varianty NP a NK (Obr. 12). Výsledky teda indikujú, že BAP má hodnotu „optimálnej“ koncentrácie na svetle nižšiu v porovnaní s mT.

Z priebehu senescencie pri pôsobení rôznych koncentrácií roztokov mT a BAP môžeme zhrnúť, že pri zvyšovaní koncentrácie dochádza síce k spomaleniu senescencie, avšak toto spomalenie je pozorovateľné len do určitej „hraničnej“ hodnoty. Po prekročení tejto hodnoty dochádza k urýchleniu senescencie a teda k prejavu sa negatívneho účinku CK (Obr. 5 – roztok BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M). Podobne sa mení priebeh senescencie aj pri pôsobení svetla. V kombinácií nižších koncentrácií CK a nízkej intenzity svetla je priebeh senescencie často spomalený, avšak opäť len do určitej hraničnej hodnoty. Po jej prekročení dochádza k akcelerácii senescencie, čo odpovedá modelu pre koncentračnú závislosť účinkov CK. Získané výsledky tak podporujú navrhovaný model Husičkovej a kol. (2012).

V rámci bakalárskej práce bol v testovacom experimente taktiež zrovnávaný vplyv CK a svetla na priebeh senescencie listových diskov WT rastlín tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) a rastlín so zvýšenou aktivitou CKX. U diskov z WT rastlín starnúcich na svetle a v tme nebol v použítom usporiadaní experimentu väčšinou zaznamenaný významný vplyv mT a BAP na pokles obsahu Chl (Obr. 6) a F_v/F_p (Obr. 7) okrem negatívneho vplyvu BAP o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M. Oproti tomu u vzoriek rastlín „CKX“ v tme bolo vo väčšine prípadov zaznamenané spomalenie poklesu obsahu Chl (Obr. 6) i F_v/F_p (Obr. 7) vplyvom CK. Predpokladáme, že tento výsledok by mohol súvisieť so zníženým obsahom endogénnych CK u rastlín „CKX“, ktorý sa mohol prejaviť zvýšeným účinkom exogénne aplikovaných CK v zrovnaní s WT: zatiaľ čo po aplikácii exogénnych CK na listové disky WT rastlín už mohlo dôjsť

k prekročeniu „hraničnej“ koncentrácie CK a nebol teda zaznamenaný pozitívny vplyv CK na senescenciu, u diskov z „CKX“ rastlín nemuselo vďaka zníženému obsahu endogénnych CK k prekročeniu „hraničnej“ koncentrácie ešte dôjsť a aplikované CK mali teda pozitívny vplyv. Tieto výsledky naznačujú, že model Husičkovej a kol. (2012) by sa mohol dať aplikovať i v prípadoch transgénnych či mutantných rastlín so zmeneným obsahom endogénnych CK. Overovanie platnosti modelu pre tieto prípady plánujeme v najbližšej budúcnosti previesť s rastlinami *Arabidopsis*, ktoré majú znížený alebo zvýšený obsah endogénnych CK.

7. ZÁVER

Všeobecne je známe, že cytokiníny dokážu spomaliť proces senescencie a tým i zmeny so senescenciou spojené, akými sú napr. pokles obsahu Chl či pokles aktivity fotosyntetického aparátu. S nárastom koncentrácie cytokinínov (CK) väčšinou dochádza k spomaleniu senescencie (tzn. spomalenie poklesu Chl i pomeru F_v/F_p), avšak toto spomalenie je len do určitej „hraničnej“ hodnoty koncentrácie. CK, ktorý mal do tejto hodnoty pozitívny vplyv na rastlinný organizmus, tzn. inhiboval senescentné zmeny, po prekročení hodnoty „hraničnej“ koncentrácie začína prejavovať svoj negatívny vplyv, tzn. stimuluje zmeny spojené so senescenciou. S ďalším zvýšením koncentrácie dochádza k akcelerácii senescencie a vybraná koncentrácia sa stáva pre rastlinný organizmus toxická. Účinok CK na priebeh senescencie sa tak líši v závislosti na použitej koncentrácii. Pri exogénnej aplikácii CK okrem iného treba brať do úvahy aj pôsobenie vonkajšieho faktoru, akým je svetlo. Svetlo dokáže výrazne ovplyvniť priebeh senescencie, pričom jeho pôsobenie je podobné pôsobeniu CK. Svetlo a CK dokážu mať do určitej miery pozitívny vplyv na senescenciu, avšak keď ich spoločný vplyv prekročí určitú „hranicu“ pôsobenia, môže nastať opačný efekt, tzn. urýchlenie senescencie.

Na základe obdobných informácií a vlastných výsledkov bol Husičkovou a kol. (2012) vypracovaný model koncentračnej závislosti účinkov CK na senescenciu. Tento model sa dá rozšíriť aj na pôsobenie svetla na účinok CK. V takomto prípade potom platí, že čím vyššia intenzita (dávka) svetla pôsobí pri senescencii, tým nižšia je hodnota „hraničnej“ koncentrácie, pri ktorej sa mení pozitívny vplyv CK na senescenciu na negatívny.

Ako je vidieť z vyššie uvedených informácií, účinok CK na senescenciu sa dá ovplyvniť práve použitou koncentráciou pri exogénnej aplikácii CK na rastlinný materiál, ako aj intenzitou použitého svetla. Takýmto spôsobom sme sa v experimentoch predkladanej práce zamerali na štúdium vplyvu rôznych koncentrácií CK *meta*-topolínu a benzylaminopurínu a rôznych svetelných podmienok na priebeh senescencie u rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) a tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) a teda na overovanie modelu Husičkovej a kol. (2012). Priebeh senescencie sme hodnotili cez pokles obsahu Chl a pokles parametra F_v/F_p vyjadrujúceho funkciu PSII.

Exogénna aplikácia cytokinínov mT a BAP spomalila pokles obsahu Chl i pomeru F_v/F_p počas indukovanej senescencie vyvolanej oddelením primárnych listov jačmeňa siateho. Z priebehu senescencie pri pôsobení rôznych koncentrácií roztokov CK bolo vidieť, že pri zvyšovaní koncentrácie dochádzalo síce k spomaleniu senescencie, avšak toto spomalenie bolo pozorovateľné len do určitej koncentrácie (väčšinou 10^{-4} M). Po jej prekročení dochádzalo k urýchleniu senescencie a tak k prejavu negatívneho vplyvu cytokinínov. No miera účinku rôznych koncentrácií BAP a mT závisela na svetelných podmienkach, pri ktorých prebiehala senescencia.

Podobne ako pri pôsobení rôznych koncentrácií cytokinínov sa menil priebeh senescencie i pri pôsobení rôznych intenzít (dávok) svetla. Ak bola intenzita svetla nižšia ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) priebeh senescencie bol spomalený oproti tme. So zvyšovaním dávky svetla bol efekt spomalenia senescencie postupne menej badateľnejší a postupne dochádzalo k posunu „optimálnej“ koncentrácie CK smerom k nižším hodnotám. Za touto hodnotou už dochádzalo k rýchlemu postupu senescencie, v podobe rýchleho poklesu obsahu Chl a pomeru F_v/F_p , čo mohlo byť v dôsledku fotooxidatívneho poškodenia spôsobeného vysokou intenzitou svetla ($370 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Ako je vidieť z vyššie uvedených informácií, tak predpokladaný model Husičkovej a kol. (2012) môžeme podľa získaných výsledkov považovať za správny. Pri sledovaní účinku svetla na vplyv rôznych koncentrácií roztokov CK na priebeh senescencie môžeme ďalej predpokladať, že model koncentračnej závislosti CK vytvorený Husičkovou a kol. (2012) sa dá aplikovať aj na účinky svetla.

Pri sledovaní vplyvu CK na priebeh senescencie listových diskov tabakových rastlín WT nebol väčšinou zaznamenaný pozitívny vplyv CK, zatiaľ čo u typu so zvýšenou aktivitou CKX došlo k spomaleniu senescencie v dôsledku aplikácie CK. Predpokladáme, že vyšší účinok exogénnych CK u „CKX“ rastlín môže byť v dôsledku zníženého obsahu endogénnych CK v porovnaní s WT. Zatiaľ čo u aplikácie CK na WT mohlo dôjsť k prekročeniu „hraničnej“ koncentrácie a nebol teda pozorovaný pozitívny vplyv CK na senescenciu, u „CKX“ nemuselo k prekročeniu „hraničnej“ hodnoty ešte dôjsť a v dôsledku toho sa prejavil pozitívny vplyv CK. Ďalej tak predpokladáme, že vyššie spomenutý model by bolo možné rozšíriť i na podobné prípady rastlín, ktoré majú pozmenený obsah endogénnych CK. V budúcnosti preto plánujeme s pokračovaním overovania vyššie spomenutého modelu pre prípady transgénnych alebo mutantných rastlín.

8. ZOZNAM LITERATÚRY

- Ananieva K, Ananiev E, Doncheva S, Georgieva K, Tzvetkova N, Kamínek M, Motyka V, Dobrev P, Gajdošová S, Malbeck J, (2008) Senescence progression in a single darkened cotyledon depends on the light status of the other cotyledon in *Cucurbit pepo* (zucchini) seedlings: potential involvement of cytokinins and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity. *Plant Physiol* 134: 609-623
- Briggs WR, Olney MA (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin and one superchrome. *Plant Physiol* 125: 85-88
- Buschmann C, Lichtenthaler HK (1982) The effect of cytokinins on growth and pigment accumulation of radish seedlings (*Raphanus-sativus* L.) grown in the dark and at different light quanta fluence rates. *Photochem Photobiol* 35: 217-221
- Ferreira FJ, Kieber JJ (2005) Cytokinin signaling. *Plant Biology* 8: 518-525
- Husičková A, Doležal K, Špundová M (2012) The light and concentration-dependence of cytokinin responses. Manuskript v príprave.
- Choi J, Hwang I (2007) Cytokinin: perception, signal transduction and role in plant growth and development. *Journal of Plant Biol* 502: 98-108
- Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 313-349
- Kreslavski VD, Carpentier R., Klimov VV, Allakhverdiev SI (2009) Transduction mechanisms of photoreceptors signals in plant cells. *Photochem Photobiol C; Photochemistry reviews* 10 63-80
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 350-382
- Lawlor DW (2001) Photosynthesis. BIOS Scientific Publishers, Oxford
- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad M, Spíchal L (2011) N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* 72: 821-831
- Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118

- Noodén DL, Guiamét JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Plant Physiol.* 101: 746-753
- Ogweno JO, Hu WH, Song XS, Shi K, Mao WH, Zhou YH, Yu JQ (2010) Photoinhibition-induced reduction in photosynthesis is alleviated by abscisic acid, cytokinin and brassinosteroid in detached tomato leaves. *Plant Growth Regul* 60:175-182
- Rashotte AM, Chae HS, Maxwell BB, Kieber JJ (2005) The interaction of cytokinin with other signals. *Plant Physiol* 123: 184-194
- Rupp H, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmülling T (1999) Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* 18: 357-363
- Špundová M, Popelková H, Ilík P, Skotnica J, Novotný R, Nauš J (2003) Ultrastructural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *J Plant Physiol* 160: 1051-1058
- Thomas TH, Hare PD, van Staden J (1997) Phytochrome and cytokinin responses. *Plant Growth Regul* 23:105-122
- Vlčková A (2003) Vliv vybraných růstových látek na změny fotosyntetického aparátu při umělé senescenci. Diplomová práce, UP Olomouc.
- Vlčková A, Špundová M, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nauš J (2006) Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiol Plant* 126: 257-267
- Werner T, Holst K, Pörs Y, Guivarc'h A, Mustroph A, Chriqui D, Grimm B, Schmülling T (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *J Exp Bot* 59: 2659-2672
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling 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: 2532-2550
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS* 98: 10487-10492
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmülling T (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* 18: 1808-1818

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

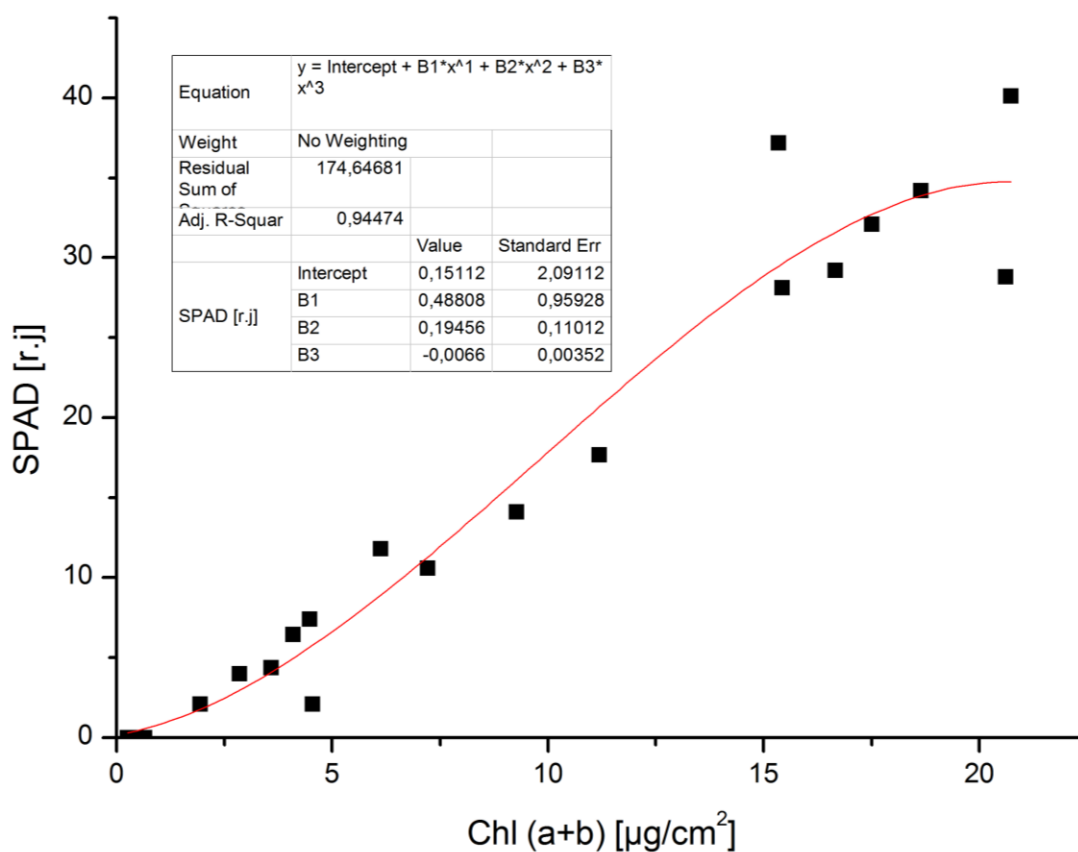
PRÍLOHY

PRÍLOHA 1: Kalibračné krivky pre Chlorofylmeter SPAD-502

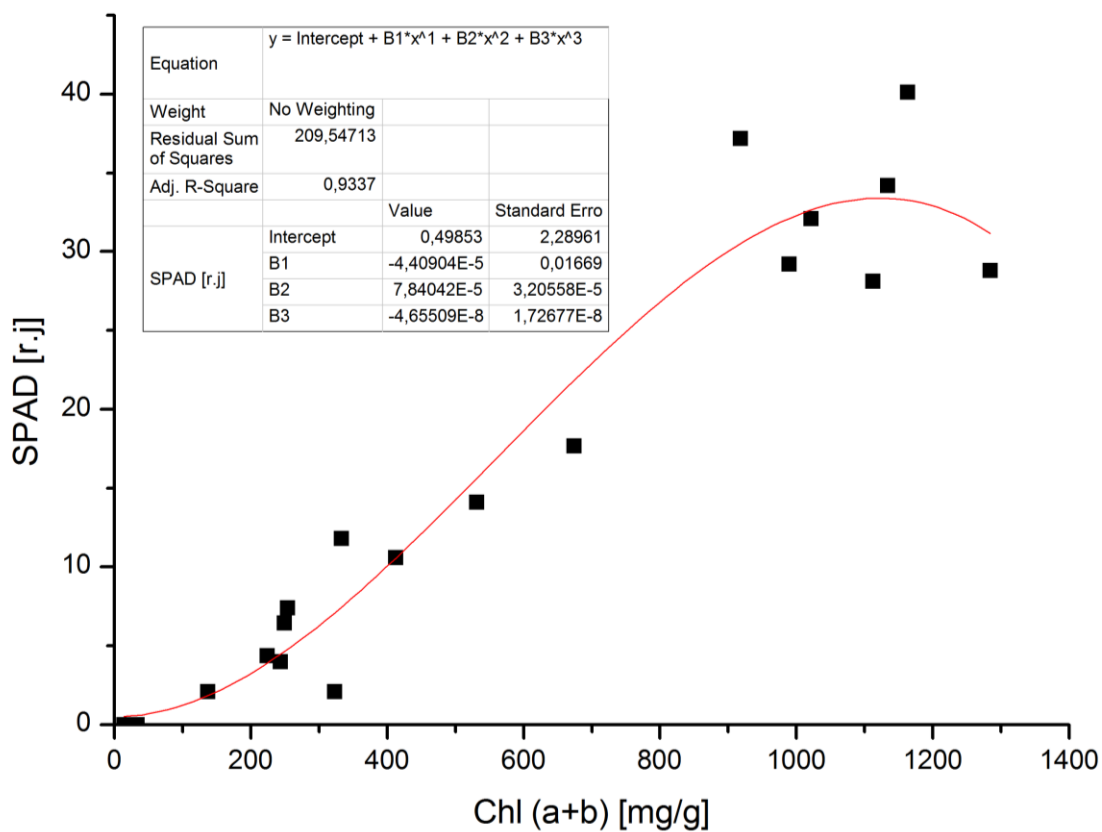
PRÍLOHA 2: Poster prezentovaný na konferencii Plant Biology Congress, Freiburg (29.7. - 3.8. 2012)

PRÍLOHA 1

Kalibračné krivky pre Chlorofylmeter SPAD-502



Obr. 14.: Kalibračná krivka pre Chlorofylmeter SPAD-502 vyjadruje závislosť medzi hodnotami Chl v relatívnych jednotkách zistenými pomocou chlorofylmetra SPAD-502 a hodnotami koncentrácie Chl (a+b) vztiahnutých na jednotku plochy P listov.



Obr. 15.: Kalibračná krivka pre Chlorofylmeter SPAD-502 vyjadruje závislosť medzi hodnotami Chl v relatívnych jednotkách zistenými pomocou chlorofylmetra SPAD-502 a hodnotami koncentrácie Chl (a+b) vztiahnutých na čerstvú hmotnosť listov.

PRÍLOHA 2



CONCENTRATION- AND LIGHT-DEPENDENCE OF CYTOKININ ACTION DURING SENESCENCE OF DETACHED BARLEY LEAVES



Alexandra Husičková*, Helena Melkovičová**, Jozefína Provalilová**, Martina Špundová*

*Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic
 **Department of Biophysics, Palacký University, Tr. Svobody 26, 771 46 Olomouc, Czech Republic
 email: martina.spundova@upol.cz

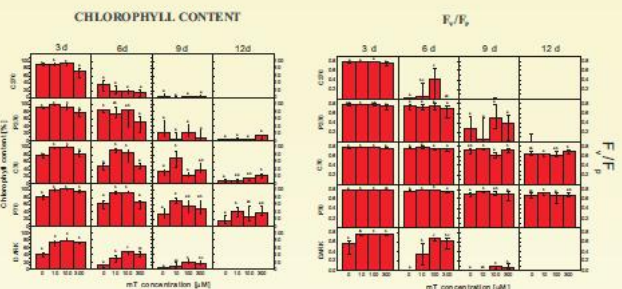
SUMMARY

Cytokinins are well known for their ability to retard or slow down senescence but there is also some evidence that cytokinins can, under certain circumstances, accelerate it (e.g. Vlčková et al. 2006). This reversal of cytokinin action has been linked to high cytokinin concentration and/or the extensive exposure of leaves to light.

In our work, the concentration- and light-dependence of effect of cytokinin meta-topolin was studied in barley leaves during 12 d after their detachment. Three concentration (10 μM , 100 μM , 300 μM) and five "light" regimes (dark, D; periodic light 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, P70; continual light 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, C70; periodic light 370 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, P370; continual light 370 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, C370) were used. The chlorophyll content and maximal efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_p) were used to evaluate an extent of senescence.

In control leaves (without mT) the rate of decrease in both chlorophyll content and F_v/F_p fell in order: D, C370, P370, C70, and P70. In dark senescing leaves, mT had the expected positive effect (i.e. slowed down a decrease in chlorophyll content and F_v/F_p) in all concentrations used. However, the positive effect of mT decreased with increasing light dose, and at C370 leaves even changed to negative ones (i.e. mT accelerated the decreases in both parameters). This trend was more pronounced in case of higher mT concentrations.

RESULTS



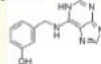
MATERIALS AND METHODS

Plant material

- detached primary leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.)
- measurement: 0, 3, 6, 9, 12 d after detachment
- medians and quartiles are presented (n = 12)

Cytokinin solutions

- meta-topolin (mT; N6-(meta-hydroxybenzyl)adenine)
- "0 M" (0,5% DMSO), 10 μM , 100 μM , 300 μM



Light conditions during senescence

- dark (D)
- periodic light 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 h/8 h dark) (P70)
- continual light 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C70)
- periodic light 370 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 h/8 h dark) (P370)
- continual light 370 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C370)

Chlorophyll content

- chlorophyllmeter SPAD-502 (Konica Minolta, Japan) calibrated by an analytical measurement of real chlorophyll content

F_v/F_p (maximal efficiency of photosystem II photochemistry)

- fluorometer PEA (Hansatech, King's Lynn, UK)

DARK

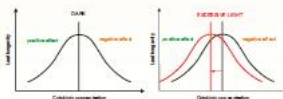
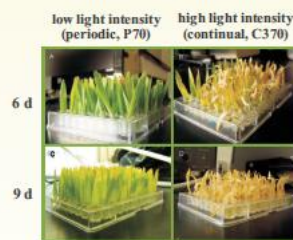
- mT had positive effect (slowed down decrease in Chl content and F_v/F_p) in all concentration used

LOW LIGHT INTENSITY (P70 - periodic, C70 - continual)

- slowed down decrease in Chl content and F_v/F_p compared with dark
- mT had positive effect only in lower concentrations

HIGH LIGHT INTENSITY (especially C370 - continual)

- accelerated decrease in Chl content and F_v/F_p compared with dark
- mT had rather negative effect
- (higher concentrations = more negative effect)



Hypothetical dependence of leaf longevity on cytokinin concentration in the dark and under excessive light (adapted from a model of Ferreira and Kieber (2005) for root growth response). With increasing concentration, positive effect increases until a threshold and then switches to negative one. Under excessive light, the threshold shifts to a lower concentration.

References

- Ferreira FJ, Kieber JJ (2005) Cytokinin signaling. *Plant Biology* 8, 518-525
 Vlčková A et al. (2006) Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126, 257-267

Acknowledgement

This work was supported by the project Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research (ED0007/0 I/01), by the ESF project CZ.1.07/2.2.00/20.0165, and by Technological Agency of the Czech Republic (Grant No. Ta01010254).

