

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

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



**Koncentračná závislosť účinkov cytokinínov na
senescenciu rastlín a vplyv svetelných podmienok**

Vypracovala: Bc. Helena Melkovičová

Obor: Biofyzika

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Martina Špundová, Ph.D.

Ďakujem svojej vedúcej diplomovej práce RNDr. Martine Špundovej, Ph.D., za všetok jej čas strávený pri tejto práci, za skvelú korektúru textu a výsledkov a za cenné rady. Ďalej ďakujem Mgr. Alexandre Husičkovej, Ph.D., za pomoc a psychickú podporu. V neposlednom rade ďakujem za podporu práce projektom č. LO10204 Udržiteľný rozvoj výzkumu Centrum regionu Haná z Národného programu udržiteľnosti I, MŠMT

Prehlasujem, že som diplomovú 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: _____

ABSTRAKT

Priebeh senescencie rastlín je ovplyvňovaný mnohými faktormi vrátane cytokinínov (CK) a fotosynteticky aktívneho žiarenia (PAR). V prvej časti predkladanej práce bol študovaný účinok cytokinínu *meta*-topolinu (mT) na priebeh senescencie u oddelených listových segmentov mutantov *Arabidopsis thaliana* s pozmenenou percepciou CK. Boli použité 4 genotypy - WT, *ahk2ahk4*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk3*, pričom WT predstavoval kontrolnú variantu. Senescencia bola vyvolaná oddelením listových segmentov a jej miera bola posudzovaná podľa obsahu Chl a hodnoty parametra F_V/F_P , odrážajúceho účinnosť fotochémiu fotosystému II a tým stav fotosyntetického aparátu. Segmenty boli po oddelení ponorené do jednotlivých roztokov - 0, 5 % roztok dimethylsulfoxidu (DMSO) a do rôzne koncentrovaných roztokov mT (10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M).

U oddelených listových segmentov mutantov *ahk3ahk4* a *ahk2ahk3* uložených v tme došlo v dôsledku nefunkčnosti receptora AHK3 k miernemu urýchleniu senescencie oproti genotypu WT a *ahk2ahk4*. Zatiaľ čo u genotypov WT a *ahk2ahk4* nebol pozorovaný výraznejší spomaľujúci účinok PAR na priebeh senescencie (na pokles obsahu Chl a parametra F_V/F_P), u *ahk2ahk3* a *ahk3ahk4* bol tento účinok zreteľný. Cytokinín mT nespôsobil spomalenie senescencie ani v jednej použitej koncentrácii a bol naopak zaznamenaný vo väčšine prípadov jeho negatívny účinok na pokles obsahu chlorofylu a pokles parametrov F_V/F_P .

V ďalšej časti práce bol študovaný vplyv mT a rôznych svetelných podmienok na pohyb chloroplastov (CP) vyvolaný modrým svetlom u oddelených listových segmentov *Arabidopsis thaliana* a jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) a v listoch tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.). V prvom prípade boli použité dva svetelné režimy - tma a svetlo periodické o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a roztoky DMSO a 10^{-4} M mT. Obecne došlo u použitých rastlinných vzoriek k inhibícii pohybu CP s nárastom doby po oddelení, pričom inhibícia bola výraznejšia v tme ako na PAR. Najmenší rozsah pohybu CP bol zaznamenaný pre rastlinný druh jačmeň siaty. U exogénnej aplikácie mT sme vo väčšine prípadov nezaznamenali výraznejší účinok mT na tento proces. U tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) došlo k inhibícii oboch typov pohybu CP po aplikácii roztoku DEX indukujúceho výrazné zvýšenie endogénnych CK.

ABSTRACT

Plant senescence is influenced by many factors including cytokinins (CK) and photosynthetically active radiation (PAR). In the first part of the study the effect of cytokinin *meta*-topolin (mT) on senescence of detached leaves of *Arabidopsis thaliana* receptor mutants was examined. Four *Arabidopsis* genotypes were used - wild-type (WT), *ahk2ahk4*, *ahk3ahk4* and *ahk2ahk3*. WT plants were used as a control variant. Senescence was induced by detachment of leaf segments and its rate was judged by the chlorophyll (Chl) content and F_v/F_p parameter reflecting the efficiency of photosystem II photochemistry. After detachment the segments were inserted to 0,5% solution of dimethyl sulfoxide (DMSO) and to different solutions of mT (10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M).

In leaf segments of mutants *ahk3ahk4* and *ahk2ahk3* incubated in the dark senescence was slightly accelerated compared to WT and *ahk2ahk4* due to a malfunctioning receptor AHK3. While in genotypes WT and *ahk2ahk4* was not observed significant retarding effect of PAR on senescence (on the decrease of Chl and parameter F_v/F_p), this effect was clear in *ahk2ahk3* and *ahk3ahk4*. *Meta*-topolin did not cause retardation of senescence in either concentration which was used and in most cases a negative effect on the decrease in chlorophyll content and F_v/F_p was observed.

In the next part of the work the impact of mT and different light conditions on chloroplast movement induced by blue light was studied in detached leaf segments of *Arabidopsis thaliana* and barley (*Hordeum vulgare* L.) and in leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). In the first case we used two light modes - dark and periodic light of intensity of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and two solutions – 0,5% DMSO and 10^{-4} M mT. In general, inhibition of chloroplast movement occurred with time after detachment. The inhibition was more pronounced in the dark compared to PAR. The smallest extent of chloroplast movement was observed in barley. The exogenous application mT did not mostly have a marked effect on this process. In the leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) there was inhibition of chloroplast movement after the application of DEX solution causing very pronounced increase in level of endogenous CK.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

- 35S - promotor z vírusu mozaiky karfiolu
- 4-PU-30 - N-fenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl)močovina; fenylmočovínový derivát
- ADP - 5'-adenosindifosfát
- AHK - histidínkinázový receptor z *Arabidopsis*
- AHPs - histidín-fosfotransférové proteíny z *Arabidopsis*
- AMK - 5'-adenosinmonofosfát
- AtCKX - cytokinín oxidáza/dehydrogenáza z *Arabidopsis*
- AtENT - nukleosidový transportér z *Arabidopsis*
- AtIPT - izopentenyltrasferáza/y z *Arabidopsis*
- ATP - 5'-adenosintrifosfát
- ARRs - regulátory odpovede u *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis response regulator*)
- BAP - N⁶-benzylaminopurín
- CK - cytokinín/y
- CKI1 - histidínkinázový receptor 1 cytokinínov
- CKX - cytokinín oxidáza/dehydrogenáza resp. cytokinín oxidáza/reduktáza
- CP - chloroplast/y
- CPPU - N-fenyl-N'-[2chloro-4-pyridyl]močovina
- CRE - receptory cytokinínovej odpovede (*cytokinin response*)
- CRY - krytochróm (CRY1/CRY2)
- Cyt b₆/f - cytochróm b₆/f komplex
- cZ - *cis*-zeatín
- DEX - dexametazón (*dexametason*)
- de novo* - (lat.) znovu, od začiatku
- DMSO - dimetylsulfoxid
- ENTs - špecifické transportéry CK nukleosidového typu (*equilibrative nucleoside transporters*)
- F_M (F_M') - maximálna intenzita fluorescencie chlorofylu vzorky adaptovanej na tmu (na svetlo)
- F₀ - minimálna intenzita fluorescencie chlorofylu vzorky adaptovanej na tmu
- F_P - maximálna intenzita fluorescencie chlorofylu vzorky adaptovanej na tmu merená systémom FluorCam

- F_V - variabilná fluorescencia
- $F_V/F_{M(P)}$ - maximálny kvantový výťažok fotochémie fotosystému II; $F_V/F_{M(P)} = (F_{M(P)} - F_0)/F_{M(P)}$
- $\Delta F/F_{M'}$ - aktuálny kvantový výťažok fotochémie fotosystému II; $\Delta F/F_{M'} = (F_{M'} - F_t)/F_{M'}$
- FS - fotosyntéza; fotosyntetický
- G1 fáza - postmitotická/presyntetická fáza bunkového cyklu
- G2 fáza - postsyntetická fáza bunkového cyklu
- HK - histidínkináza (*histidine kinase*)
- HPt - histidín-fosfotransférové proteíny (*histidine-phosphotransfer protein*)
- CHASE - extracelulárna proteínová doména obsiahnutá v niektorých transmembránových receptoroch rastlín (*cyclase/histidine-kinase associated sensory extracellular*)
- Chl - chlorofyl; chlorofylový
- in planta* - (lat.) v rastlinnom organizme
- iP - N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adenín
- iPR - N^6 -(Δ^2 -izopentenyl)adenín ribozid
- IPT - isopentenyltransferáza
- in vitro* - (lat.) mimo živé telo, v skúmavke
- in vivo* - (lat.) v živom
- LHC - svetlozberné komplexy (*light-harvesting complexes*)
- LHCP - proteín svetlozberných komplexov, ktorý viaže chlorofyl (*light-harvesting chlorophyll a/b binding protein*)
- M fáza - mitotická fáza bunkového cyklu
- mRNA - mediátorová RNA
- mT - *meta*-topolín
- PAR - fotosynteticky aktívne žiarenie (*photosynthetically active radiation*)
- PCD - programovaná bunčná smrť (*programmed cell death*)
- per se* - (lat.) sám sebou, prostredníctvom seba samého
- PHY - fytochrom (PHYA - PHYE)
- PSI - fotosystém I
- PSII - fotosystém II
- Pssu* - promotor, malá podjednotka Rubisco z hrachu siateho
- Pssu-ipt* - gén kódujúci IPT pod kontrolou promotora *Pssu*
- q_p - fotochemické zhášanie fluorescencie chlorofylu

RD	- prijímačová doména (<i>receiver domain</i>)
ROS	- reaktívne formy kyslíka (<i>reactive oxygen species</i>)
RRs	- regulátory odpovede (<i>response regulators</i>); napr. RRs typu A alebo typu B
Rubisco	- ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza
S fáza	- syntetická fáza bunkového cyklu
SAGs	- gény spojené so senescenciou (<i>senescence-associated genes</i>)
SAM	- apikálny meristém výhonu (<i>shoot apical meristem</i>)
TCS	- dvojjložkový systém (<i>two-component system</i>)
TDZ	- thidiazuron
TM	- transmembránová/é doména/y
tRNA	- transferázová RNA
tZ	- <i>trans</i> -zeatín
tZR	- <i>trans</i> -zeatín ribozid
UV-B	- ultrafialové žiarenie v oblasti 280 až 315 nm
WT	- wild-type
Z	- zeatín

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. PREHĽAD PROBLEMATIKY.....	2
2.1 Cytokiníny.....	2
2.1.1 Metabolizmus cytokinínov.....	3
2.1.2 Prenos signálu cytokinínov.....	5
2.1.2.1 Komponenty TCS dráhy cytokinínov.....	6
2.1.3 Účinkok cytokinínov.....	11
2.2 Senescencia.....	14
2.3 Pohyb chloroplastov.....	17
2.4 Koncentračná a svetelná závislosť účinkov cytokinínov.....	19
2.4.1 Exogénne aplikácie cytokinínov.....	19
2.4.2 Endogénne hladiny.....	24
3. CIEĽ PRÁCE.....	31
4. MATERIÁL A METÓDY.....	32
4.1 Rastlinný materiál.....	32
4.1.1 Arabidopsis thaliana.....	32
4.1.2 Jačmeň siaty.....	33
4.1.3 Tabak virgínsky.....	34
4.2 Použité metódy.....	35
4.2.1 Meranie obsahu chlorofylu.....	35
4.2.2 Meranie parametra F_v/F_p	36
4.2.3 Pohyb chloroplastov.....	36
4.2.4 Kalibračná krivka pre chlorofylmeter SPAD-502 pre rastlinný druh Arabidopsis thaliana.....	38
4.3 Štatistická analýza dát.....	39
5. VÝSLEDKY.....	40
5.1 Experiment I.....	40
5.1.1 Genotyp WT.....	40
5.1.2 Genotyp <i>ahk2,4</i>	50
5.1.3 Genotyp <i>ahk 3,4</i>	60
5.1.4 Genotyp <i>ahk2,3</i>	70
5.2 Experiment II.....	81

5.2.1 Jačmeň siaty.....	81
5.2.2 Tabak virgínsky	82
6. DISKUSIA.....	86
7. ZÁVER	93
8. ZOZNAM LITERATÚRY	95
PRÍLOHY	108

1. ÚVOD

Rastliny sú počas životného cyklu vystavované nespočetnému množstvu rôznych signálov, ktoré prichádzajú buď z ich okolitého alebo z vnútorného prostredia. Počas evolúcie v rastlinách vznikol sofistikovaný systém receptorov a signálnych dráh, ktorý umožňuje primerané reakcie a odozvy na tieto signály. Jedným z takýchto signálov sú i rastlinné hormóny (fytohormóny). Tie môžu pôsobiť ako z vonkajšieho prostredia pri exogénnych aplikáciách (napr. v podobe postrekov alebo roztokov), tak môžu pôsobiť prirodzene vo vnútornom prostredí (endogénne hladiny hormónov).

Senescencia (starnutie) je jeden z nemála procesov, ktorý je ovplyvnený fytohormónami. Obecne je známe, že jej priebeh ovplyvňujú hormóny cytokiníny (CK), ktoré sú schopné do určitej miery spomaliť jej priebeh, ale i urýchliť. CK sú dôležité regulátory rôznych vývojových a rastových procesov u rastlín. Sú štruktúrne rôznorodé a biologicky všestranné. Charakter ich účinku je však podmienený použitou koncentráciou a aplikovanými svetelnými podmienkami.

V roku 2012 bol Husičkovou a kol. vytvorený model popisujúci koncentračnú i svetelnú závislosť účinku CK. Tento model popisuje, že do určitej „hraničnej“ koncentrácie sa CK chovajú ako pozitívne regulátory senescencie v zmysle spomalenia priebehu zmien spojených so senescenciou. No za prekročením tejto koncentrácie je účinok CK opačný, CK urýchľujú priebeh senescencie a pôsobia tak ako negatívne regulátory senescencie. Pri aplikácii vyšších intenzít fotosynteticky aktívneho žiarenia (PAR) potom dochádza často k posunu tejto hraničnej hodnoty smerom k nižším koncentráciám v dôsledku sčítania sa účinkov príslušnej koncentrácie fytohormónu a PAR. Platnosť tohto modelu bola potvrdená v bakalárskej práci Melkovičovej (2012) na oddelených listoch jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) pre cytokiníny *meta*-topolín (mT) a benzylaminopurín (BAP).

Cieľom diplomovej práce bolo zistiť, či navrhnutý model bude fungovať tiež v prípade pôsobenia mT na umelo navodenú senescenciu listov *Arabidopsis thaliana* v štyroch rôznych genotypoch - WT a troch receptorových mutantoch (*ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4*).

Okrem zisťovania vplyvu mT na zmeny obsahu Chl a funkcie fotosystému II vyvolané indukovanou senescenciou bol sledovaný jeho vplyv na pohyb chloroplastov, ktorý je pri senescencii inhibovaný.

2. PREHĽAD PROBLEMATIKY

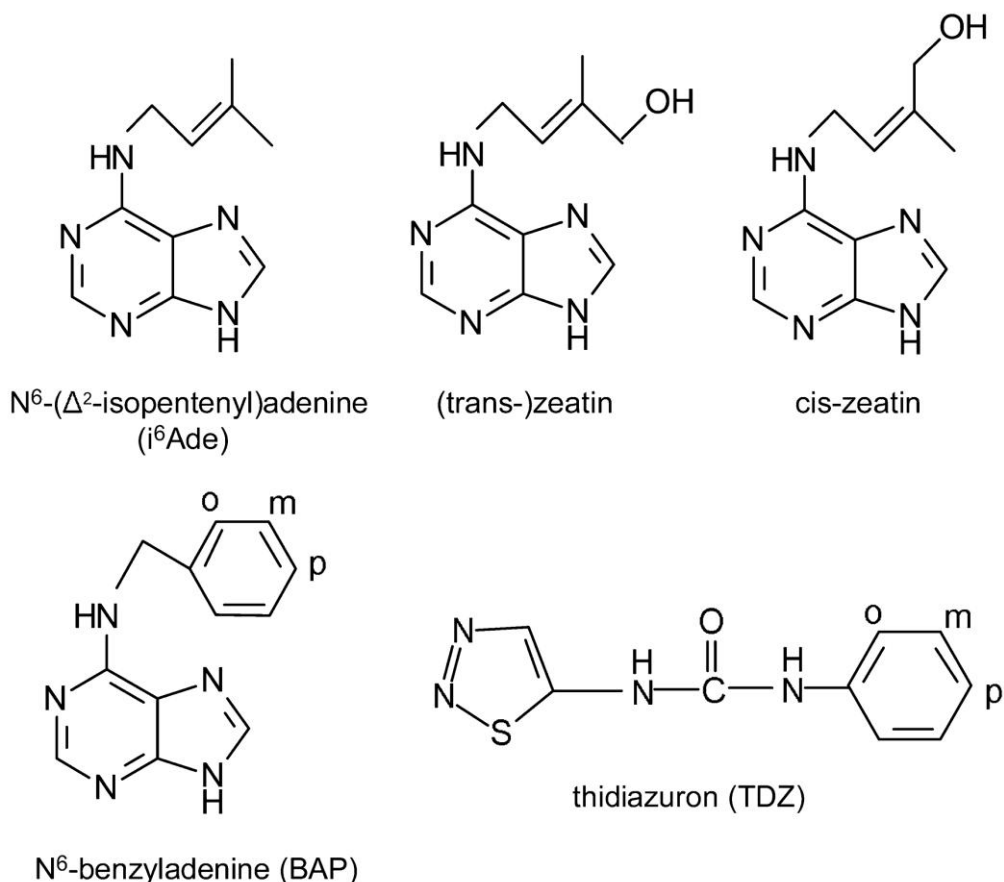
2. 1 Cytokiníny

Cytokiníny (CK) predstavujú rastlinné hormóny, ktoré boli identifikované v 50. rokoch 20. storočia ako faktory, ktoré podporujú bunkové delenie a trvalý rast rastlinných buniek (Miller a kol., 1955). Prvým CK objaveným v rastlinách bol *trans*-zeatín, no prvým izolovaným CK bol kinetín (6-furfurylaminopurín) získaný z autoklávovaných vzoriek spermií sled'a v roku 1955 skupinou prof. Skooga (Mik a kol., 2011). Odvtedy boli CK postupne objavované v čoraz väčšom počte rastlinných druhov a postupne sa ukázalo, že CK zohrávajú úlohu v rôznych procesoch rastlinného rastu a vývoja.

Dnes je známa široká škála prirodzených i syntetických CK. Prirodzene sa vyskytujúce CK (endogénne CK) predstavujú adenínové deriváty a môžu byť klasifikované na základe konfigurácie ich postranného reťazca v polohe N⁶ adenínu na izoprenoidné a aromatické CK (Kakimoto, 2003a; Frébort a kol., 2011). U izoprenoidných CK je substituentom izoprenoidný reťazec. Ten môže alebo nemusí obsahovať dvojnú väzbu a často môže byť hydroxylovaný. Podľa toho môžeme potom rozlišovať CK s izoprenoidným reťazcom s dvojnou väzbou, kam patrí: N⁶-(Δ^2 -izopentenyl)adenín (iP), *trans*-zeatín (tZ), zeatín (Z) alebo *cis*-zeatín (cZ) a CK s izoprenoidným reťazcom bez dvojnej väzby (dihydrozeatín; Obr. 1). Zďaleka najviac prevažujú CK s nenasýteným izoprenoidným postranným reťazcom, predovšetkým tie s hydroxylovaným postranným reťazcom ako je tZ a jeho deriváty (Letham, 1963). Niektorými autormi býva skupina izoprenoidných CK delená na dve podskupiny: CK izopentenyladenínového typu, ktoré nesú izopentenylový postranný reťazec v pozícii N⁶, a zeatínového typu, ktoré nesú hydroxylovaný izopentenylový postranný reťazec v konfigurácii *trans* alebo *cis* (Kakimoto, 2003a). Druhú veľkú skupinu prirodzene sa vyskytujúcich CK tvoria aromatické CK, kde je substituentom aromatický kruh. Medzi tieto CK patria napríklad: 6-benzylaminopurín (BAP, resp. N⁶-benzyladenin - BA; Obr. 1), kinetín, alebo *meta*-topolin (mT). U prirodzene sa vyskytujúcich CK, keďže sa jedná o adenínové deriváty, je často potrebné rozlišovať medzi zmenami, ktoré sú vyvolané práve CK a zmenami, ktoré sú spojené s biochémiou purínov (Mok a Mok, 2001).

Medzi syntetické CK radíme fenylmočovínové deriváty, ktoré sa prirodzene v rastlinných pletivách nevyskytujú (Mok a Mok, 2001). Niektoré sú vysoko aktívne a

často i vysoko stabilné, napr. N-fenyl-N'-[2chloro-4-pyridyl]močovina (CPPU) alebo thidiazuron (TDZ) (Obr. 1; Mok a Mok, 2001; Frébort a kol., 2011).



Obr. 1: Chemická štruktúra vybraných CK. U BAP a TDZ sú vyobrazené pozície (o, m, p), na ktorých môžu byť tieto CK hydroxylované. Obrázok prevzatý z článku Mok a kol. (2005).

2.1.1 Metabolizmus cytokinínov

De novo syntéza cytokinínov prebieha u rastlín v rôznych orgánoch, no najviac v intenzívne sa deliacich pletivách. Najvyšší podiel tvorby sa uskutočňuje v apikálnom meristém koreňa. Odtiaľto sú CK transportované xylémom v podobe ribotidov alebo ribozidov do ostatných častí. Syntéza sa prevažne odohráva pridaním izopentenylového reťazca na ATP alebo ADP (Mok a Mok, 2001; Kakimoto, 2001; Kakimoto, 2003a; Nordstörn a kol., 2004; Sakakibara, 2006). Túto reakciu katalyzujú izopentenylyltransferázy (IPT). *Arabidopsis thaliana* obsahuje deväť génov pre IPT (AtIPT1 až AtIPT9), z ktorých sedem predstavuje adenylát IPT, ktoré pripájajú izoprenoidný reťazec na ADP alebo ATP, a dve sú tRNA IPT, ktoré pripájajú izoprenoidný reťazec na adenín v tRNA (Åstot a kol., 2000; Kakimoto, 2001; Kakimoto, 2003a). Alternatívnym zdrojom CK tak môže byť i tRNA (Akiyoshi a kol., 1984; Åstot a kol., 2000; Kakimoto, 2003a).

CK sa môžu v rastlinnom organizme vyskytovať v rade metabolických foriem: vo forme voľných báz alebo vo forme už vyššie spomenutých ribozidov, ktoré obsahujú ribózu, či ribotidov, čo sú ribozidy s naviazanou fosfátovou skupinou (Mok a Mok, 2001; Kakimoto, 2003a). Za biologicky aktívnu formu sú považované voľné báze, ktoré sa prednostne viažu na receptory. Hlavnou transportnou formou sú ribozidy a ribotidy, ktoré sú roznášané prostredníctvom xylému a i floému (Mok a Mok, 2001; Kakimoto, 2003a; Sun a kol., 2005). Nedávno boli pre CK objavené i špecifické transportéry, tzv. ENTs (equilibrative nucleoside transporters; Sun a kol., 2005). Tieto transportéry predstavujú integrálne membránové proteíny, ktoré sprostredkovávajú transport naprieč bunecnou membránou pre CK nukleosidového typu - hlavne pre izopentenyladenínové ribozidy (iPR) a *trans*-zeatinové ribozidy (tZR) a ich analógy. Napríklad u *Arabidopsis thaliana* je možné nájsť nukleosidové transportéry AtENT8 (SOI33) a AtENT3 (Sun a kol., 2005). CK sa ďalej môžu vyskytovať i v zásobnej forme v podobe nukleotidov, nukleosidov alebo O-glukosidov (Frébort a kol., 2011). Medzi jednotlivými formami CK môže dochádzať k vzájomným premenám a modifikáciám (Sakakibara, 2006). Modifikácie sa môžu týkať ako adenínového kruhu tak izoprenoidného postranného reťazca alebo aromatického kruhu pripojených v pozícii N⁶ (Mok a Mok, 2001). Tieto modifikácie často vyúsťujú do zmien v aktivite a funkcii CK (Sakakibara, 2006). Jednou z modifikácií môže byť i konjugácia CK s glukózou (glukozylácia), ktorý vplýva na rovnovážnu hladinu CK a často môže viesť i k ich inaktivácii. Tento proces môže byť vratný, kedy dochádza ku glukozylácii adenínu v polohe N³ (O-glukozylácia), a nevratný, kedy glukozylácia adenínu prebieha v polohe N⁷ alebo N⁹ (N-glukozylácia) a vedie k úplne biologickej inaktivácii CK (Sakakibara, 2006; Kurakawa a kol., 2007).

Degradácia CK je sprostredkovaná malou skupinou cytokinín oxidáz/dehydrogenáz (CKX) (Sun a kol., 2005). Tieto enzýmy katalyzujú oxidatívny rozklad Δ^2 -izoprenoidných CK, čím sa utvorí adenín/adenozín a odpovedajúci nenasýtený aldehyd (Brownlee a kol., 1975). CKX tak nevratne inaktivuje CK v jedinom kroku enzymatického štiepenia postranného reťazca, čo vedie k úplnej strate biologickej aktivity (Armstrong, 1994; Mok a Mok, 2001). Enzým CKX predstavuje flavín adenín dinukleotid obsahujúci oxidoreduktázu (Armstrong, 1994; Schmülling a kol., 2003) a je schopný pôsobiť ako oxidáza i ako dehydrogenáza. Pri jeho zvýšenej aktivite dochádza k poklesu obsahu endogénnych CK (Kamínek a kol., 1997) a jeho nadprodukcia môže vyústiť až do tzv. syndrómu z nedostatku CK (Werner a kol., 2003; *vid' 2.4.2.1 Transgénne rastliny*). Gény kódujúce tento enzým boli identifikované už v

niekoľkých rastlinných druhoch: v kukurici (Morris a kol., 1999), v *Arabidopsis thaliana* (Werner a kol., 2001) a v orchideách (Yang a kol., 2003). U *Arabidopsis* má génová rodina CKX sedem členov - AtCKX1 až AtCKX7 (Schmülling a kol., 2003), pričom jednotliví členovia sa líšia svojimi biochemickými charakteristikami, subcelulárnou kompartmentizáciou a reguláciou expície (Werner a kol., 2003).

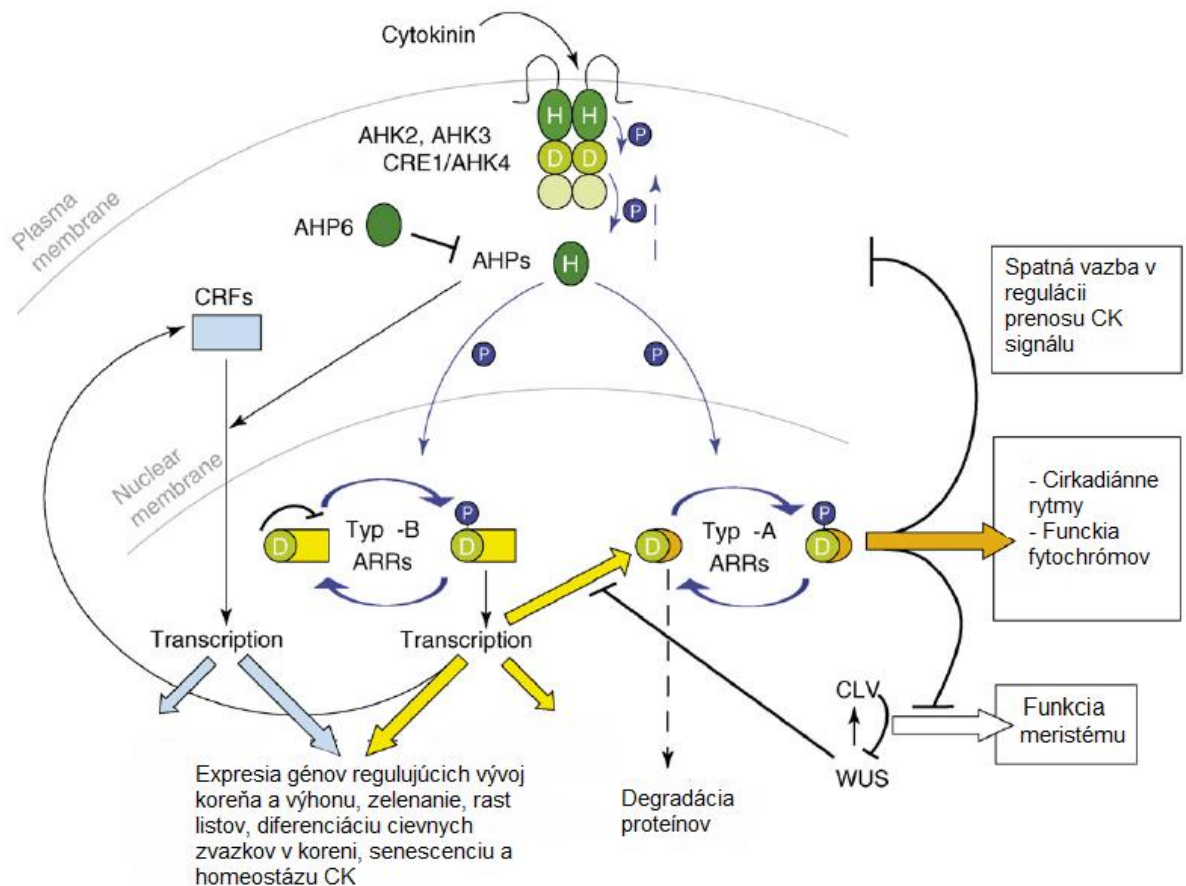
Ako je vidieť, rovnovážna hladina CK v rastlinnom organizme je udržiavaná prostredníctvom biosyntézy, vzájomnej premeny, krátkodobých a/alebo nevratných konjugácií alebo nevratnou degradáciou (Mok a Mok, 2001). Koncentrácia CK v jednotlivých pletivách, bunkách a organelách je udržiavaná rôznymi enzýmami biosyntézy a metabolizmu (Frébort a kol., 2011).

2.1.2 Prenos signálu cytokinínov

Proces prenosu CK signálu sa deje prostredníctvom tzv. dvojzložkového systému (Two Component System - TCS). Tento systém je podobný prokaryotickému prenosu signálov baktérií a kvasiniek (Hwang a Sheen, 2001; Kakimoto, 2003b; Sun a kol., 2005). Signál je prenášaný prostredníctvom fosforylácie jednotlivých zložiek dráhy (Obr. 2) a celý proces je riadený pomocou histidínkináz (Heyl a Schmülling, 2003; Ferreira a Kieber, 2005).

TCS predstavuje komplexný signálny systém, na ktorého začiatku je receptor v podobe kinázy s extracelulárnou doménou umiestnený v membráne. Táto doména obsahuje väzbové miesto pre ligand (CK). Po naviazaní CK sa formuje na dimér a dochádza k zmene konformácie cytoplazmatickej domény receptora s histidínkinázovou aktivitou a následne k autofosforylácii histidínového zvyšku. Táto zmena uvedie do pohybu kaskádu signálneho prenosu. Fosfát je následne prenesený na zvyšok kyseliny asparágovej, ktorá je súčasťou prijímačovej domény na C-konci receptora, a potom na histidín-fosfotransférové proteíny (HPt), ktoré sa nachádzajú v cytoplazme. HPt sú translokované do jadra a prepravujú tak ďalej fosfát na posledné zložky dráhy - na zvyšok aspartátu obsiahnutý v regulátoroch odpovede (RRs) typu B, resp. typu A. RRs typu B pracujú ako regulátory transkripcie a expície génov. Vplývajú i na expíciu génov RRs typu A, ktoré inhibujú prenos fosfátu z HPt na typ B RRs a pracujú tak ako sprostredkovatelia negatívnej spätnej väzby (Hwang a Sheen, 2001; Mok a Mok, 2001; Mougél a Zhulin, 2001; Hwang a kol., 2002; Heyl a Schmülling, 2003; Kakimoto, 2003b; Rashotte a kol., 2003; Higuchi a kol., 2004; Ferreira a Kieber, 2005; Choi a Hwang, 2007; To a kol., 2007).

V TCS cytokinínov tak obecné nájdeme tri základné proteínové rodiny: histidínkinázy, histidín-fosfotransférové proteíny a regulátory odpovedí. Samozrejme sa v systéme môžu vyskytovať i iní nepreskúmaní účastníci. U *Arabidopsis thaliana* je TCS tvorený tromi základnými histidínkinázami z CRE rodiny receptorov (AHK), piatimi histidín-fosfotrasférovými proteínmi (AHPs) a dvadsiatimi dvoma regulátormi odpovede (ARRs) (Heyl a Schmölling., 2003; Obr. 2).



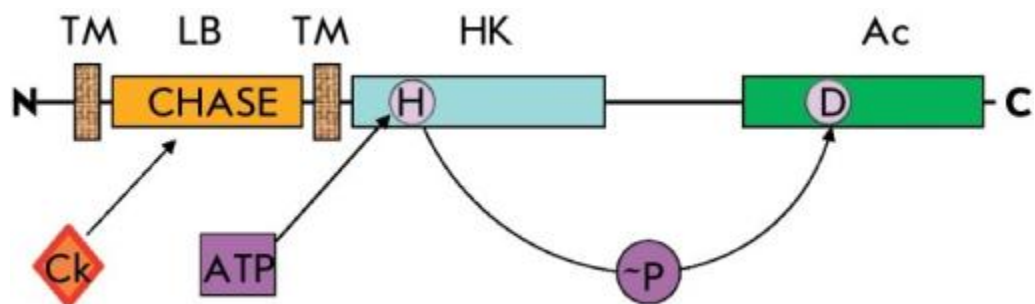
Obr. 2: Model prenosu CK signálu v *Arabidopsis thaliana*. CK sa naviažu na receptor AHK2, AHK3 alebo AHK4 v membráne. Vazba aktivuje postupnú fosforyláciu zložiek dráhy - vyjadrené tmavo modrými šipkami. Fosfát je prenesený na proteíny AHPs, ktoré sa translokujú do jadra a prenášajú fosfát na prijímačové domény ARRs typu A a typu B. Prenos fosfátu môže byť z AHPs na ARRs inhibovaný proteínom AHP6. ARRs následne riadia transkripciu génov príslušiacich danému účinku CK. Prevzaté z článku To a Kieber (2008) a upravené.

2.1.2.1 Komponenty TCS dráhy cytokinínov

Receptory CK predstavujú hybridné histidínkinázy, ktoré sú umiestnené prevažne v plazmatickej membráne. Inou možnou lokalizáciou týchto receptorov je endoplazmatické retikulum (Wulfetange a kol., 2011; Caesar a kol., 2011) a nie je vylúčená ani ich prítomnosť na iných endomembránach (Romanov a kol., 2006). Ako

bolo spomenuté vyššie, v *Arabidopsis thaliana* existujú tri základne CK receptory, a to: AHK2, AHK3 a AHK4/CRE1/WOL1 (Inoue a kol., 2001; Suzuki a kol., 2001; Ueguchi a kol., 2001; Yamada a kol., 2001; Heyl a Schmölling, 2003; Stolz a kol., 2011), ktoré sa líšia svojimi biologickými a biochemickými vlastnosťami a funkciami (Riefler a kol., 2006). Špecifickosť receptorových funkcií je daná rozdielmi v ich expresii (Ueguchi a kol., 2001; Heyl a Schmölling, 2003; Higuchi a kol., 2004, Stolz a kol., 2011), rozdielmi v schopnosti rozpoznať a viazať rôzne formy a druhy CK (Yamada a kol., 2001; Romanov a kol., 2006; Stolz a kol., 2011) a ďalej je určená schopnosťou receptoru špecificky interagovať s inými proteínmi (Dortay a kol., 2008) a/alebo je daná rozdielmi v ich subcelulárnej lokalizácii. Avšak i napriek týmto rozdielom vykazujú tieto tri receptory vysoký stupeň štruktúrnej podobnosti (Stolz a kol., 2011). Expresia génov pre tieto receptory prebieha pravdepodobne vo všetkých orgánoch, i keď množstvo receptorov v jednotlivých orgánoch rastliny je odlišné (Riefler a kol., 2006).

Primárna štruktúra receptorov sa vyznačuje prítomnosťou extracelulárnej CHASE domény (Cyclase/Histidine-kinase Associated Sensory Extracellular) na N-konci receptoru, ktorá viaže CK a je obklopená dvoma až tromi transmembránovými doménami (TM) a obsahuje približne 270 aminokyselín (Mähönen a kol., 2000). Za CHASE doménou sa nachádza histidínkinázová doména (HK) a doména regulátoru odpovede obsahujúca prijímačovú doménu (RD) na C-konci receptoru v cytoplazmatickej časti, ktorá obsahuje aspartátový zvyšok (Obr. 3). Cytoplazmatická časť všetkých troch receptorov potom interaguje s AHPs (Mougel a Zhulin, 2001; Riefler a kol., 2006).



Obr. 3: Doménová štruktúra CK receptoru (demonštrované na AHK4 z *Arabidopsis thaliana*). Receptor obsahuje nasledovné proteínové domény: TM - transmembránová; LB - doména viažuca ligand (CHASE); HK- histidínkináza; Ac - akceptorová. CK-cytokiníny; H - histidín; D - aspartát; ATP - adenozíntrifosfát; N a C - znamenajú N a C konce proteínu a ~P predstavuje prenášanú fosfátovú skupinu. Obrázok prevzatý z článku Lomin a kol. (2012).

Sekundárna štruktúra receptorov CK je vysoko homológna s charakteristickými znakmi α -helixu a β -skladaného listu (Mougel a kol., 2001). Pre správnu funkčnosť receptoru je nutná prítomnosť histidínového zvyšku v cytoplazmatickej doméne (Mähönen a kol., 2000).

Histidínkináza AHK4 bola objavená v roku 2001 ako prvý CK receptor (Inoue a kol., 2001; Suzuki a kol., 2001). Gény pre AHK4 sú výrazne exprimované v proliferujúcich pletivách - v apikálnom meristéme výhonu (SAM - shoot apical meristem), počas formovania nodúl v lucerne (*Medicago trunculata*) a hlavne v koreňovej čiapočke (Mähönen a kol., 2000; Inoue a kol., 2001; Ueguchi a kol., 2001; Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004), pričom príslušná mRNA bola prevažne lokalizovaná v strednom válci koreňa a v pericykly (Mähönen a kol., 2000). S AHK4 je spojená existencia pozitívnej spätnej väzby v signálnej dráhe CK ako dôsledok zvýšenia expresie génov pre tento receptor v prítomnosti CK. Naopak k poklesu úrovne expresie génov pre AHK4 dochádza napr. pri nedostatku fosfátu (Franco-Zorilla a kol., 2002). AHK4 slúži na prenos CK signálu pre procesy ako sú: bunečná proliferácia embrya, regenerácia výhonu *in vitro*, predlžovanie koreňa (Obr. 4) a regulácia reakcií spôsobených nedostatkom fosfátu (Mähönen a kol., 2000; Inoue a kol., 2001; Franco-Zorilla a kol., 2002), iniciácia rastu listov či načasovanie indukcie kvitnutia a reakcie súvisiace so zmenami vo výžive (Werner a Schmölling, 2009). AHK4 tiež pôsobí pri stimulácii klíčenia v tme (Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004; Riefler a kol., 2006) a môže funkčne nahradiť receptor AHK2 (Stolz a kol., 2011). AHK4 je prioritne aktivovaný voľnými bázami CK (Kopečný a kol., 2008) iP- a Z-typu (Yamada a kol., 2001). U mutácie v génoch tohto receptoru (*ahk4*) neboli pozorované výrazné zmeny v morfológii alebo fenotype rastliny (Inoue a kol., 2001; Franco-Zorilla a kol., 2002), no môže dochádzať k tvorbe vážnych defektov vo vývoji vodivých pletív (Mähönen a kol., 2000).

Ďalšou histidínkinázou z CRE rodiny receptorov je AHK3. Expresia génov pre AHK3 bola prevažne nájdená v nadzemných častiach *Arabidopsis* (Ueguchi a kol., 2001; Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004) a spolu s génmi pre AHK2 sú výrazne exprimované v ďalej sa nedeliacich listových bunkách (Nishimura a kol., 2004; Stolz a kol., 2011). AHK3 sprostredkúva signály CK pri riadení správneho vývoja listov a podieľa sa na prenose signálu CK pri riadení rastu orgánov a pri spomalení priebehu senescencie (Riefler a kol., 2006). Pri senescencii v listoch vystavených tme hrá AHK3 dôležitú úlohu pri sprostredkovaní signálov na zachovanie obsahu Chl (Obr. 4). Túto

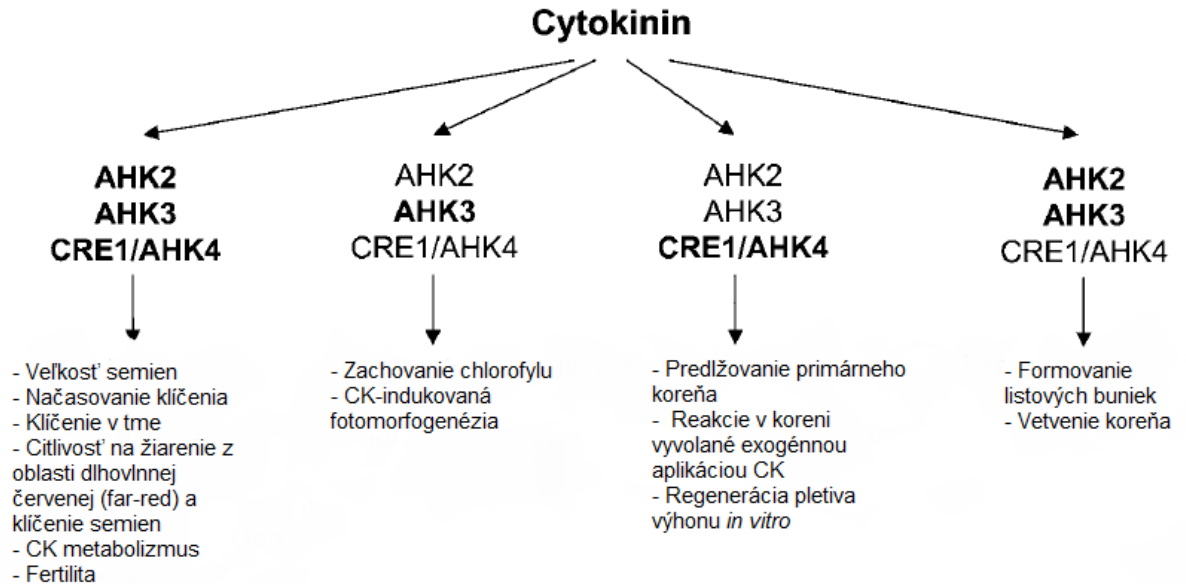
informáciu dokáže AHK3 sprostredkovať sám bez interakcie s receptormi AHK2 či AHK4. V prípade nefunkčnosti AHK3 nie sú AHK2 a ani AHK4 sami o sebe schopné sprostredkovať tento signál (resp. iba slabo), avšak bolo zistené, že sú toho schopné pri aplikácii vyšších koncentrácií CK (Riefler a kol., 2006). Ďalej AHK3 spolu s AHK2 významne funguje v sprostredkovaní CK signálov v regulácii koreňového rastu (Riefler a kol., 2006). Vescovi a kol. (2012) ukázali, že biosyntéza CK cZ typu je riadená receptormi AHK2 a AHK3. AHK3 podobne ako AHK4 uprednostňuje voľné báze iP a Z ako ligandy, napriek tomu AHK3 môže byť aktivovaný širšou škálou ligandov (Yamada a kol., 2001; Spíchal a kol., 2004). Mutácie v génoch receptoru AHK3 (*ahk3*) spôsobujú miernu redukciu veľkosti ružice *Arabidopsis* a obsahu Chl. U senescencii oddelených listov mutantov s nefunkčným receptorom AHK3 dochádza potom často k rýchlejšiemu poklesu obsahu Chl oproti WT (Riefler a kol., 2006).

Posledným receptorom z CRE rodiny je histidínkináza AHK2. Expresia AHK2 je podobne ako u AHK3 lokalizovaná prevažne v nadzemných častiach rastlín *Arabidopsis* (Ueguchi a kol., 2001; Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004). AHK2 má spolu s AHK3 významnú úlohu v riadení rastu orgánov (Obr. 4) a pri spomalení priebehu senescencie. No predpokladá sa, že primárne funguje v kombinácii s AHK3 a AHK4 (Riefler a kol., 2006). Mutácia génu pre tento receptor (*ahk2*) nespôsobuje významné zmeny v citlivosti voči CK (Riefler a kol., 2006).

Okrem vyššie spomenutých receptorov CK existujú samozrejme i ďalšie. Tie však často postrádajú prítomnosť domény typickej pre CRE rodinu receptorov (napr. CHASE alebo RD) a pravdepodobne neslúžia ani ako receptory pre CK. Takýmto receptorom je napríklad histidínkinázový receptor *Arabidopsis* AHK1, ktorý slúži v procese osmoregulácie a je nezávislý na prítomnosti CK. Ďalším príkladom je histidínkináza CKI1, ktorá neobsahuje RD doménu (Kakimoto, 2003b) a nie je úplne objasnené, či CKI1 dokáže fungovať ako receptor CK *in planta* (Heyl a Schmölling, 2003). U rastlín je však CKI1 nutný pre megagametogenéziu a pre tvorbu cievnych zväzkov (Pischke a kol., 2002).

Ako je vidieť z vyššie uvedených informácií, jednotlivé typy receptorov sprostredkujú signály pre rôzne CK účinky. U niektorých účinkov sa môžu receptory spoločne dopĺňať alebo pre daný účinok stačí aktivita len jedného receptoru (Obr. 4). Obecne je prenos signálu CK prostredníctvom všetkých troch hlavných receptorov aktivovaný už nízkou (nanomolárnou) koncentráciou CK (Stolz a kol., 2011) a je závislý od pH prostredia. Biochemické štúdie odhalili, že maximálna väzbová aktivita

medzi CK a receptorom je blízka neutrálnemu až slabo alkalickému pH (Romanov a kol., 2006).



Obr. 4: Účinok CK receptorov a ich kombinácií na procesy regulované týmito hormónmi. Receptory s najväčším príspevkom do daného procesu sú vyznačené hrubým písmom. Obrázok je založený na dátach z článku Riefler a kol. (2006). Účinok receptorov v mutantoch s „vypnutou“ funkciou receptorov (tzv. loss of function mutants) na fertilitu, formovanie listových buniek, primárne predĺžovanie koreňa, účinok exogénnych CK v koreni a regenerácia výhonu *in vitro* boli tiež popísané inými autormi (Inoue a kol., 2001; Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004). Obrázok prevzatý z článku Riefler a kol. (2006).

Ďalšou zložkou signálnej dráhy CK sú HPt proteíny, ktoré sa dokážu dočasne traslokovať do jadra. HPt proteíny tak fungujú ako článok medzi receptormi a príslušnými RRs typu B a prenášajú signál z cytoplazmy do jadra. U *Arabidopsis thaliana* nájdeme päť takýchto proteínov, označovaných ako AHP1 až AHP5 (Hwang a Sheen, 2001; Heyl a Schmülling, 2003; Kakimoto, 2003b; Rashotte a kol., 2003; Choi a Hwang, 2007).

Poslednú základnú zložku signálnej dráhy CK predstavujú RRs. Ich základnou funkciou je sprostredkovanie transkripcie génov (Rashotte a kol., 2003). U *Arabidopsis thaliana* bolo zistených 22 RRs označovaných ako ARR (Heyl a Schmülling, 2003). Aktivita týchto regulátorov sa mení s ich stavom fosforylácie (Schaller a kol., 2002 cit. v Heyl a Schmülling, 2003). ARR sú rozdelené na základe ich štruktúry do dvoch hlavných skupín: typ A a typ B. Gény kódujúce tieto dva typy ARR reagujú rozdielne

na prítomnosť CK. Gény pre ARRy typu A sú v prítomnosti CK indukované okamžite a spĺňajú kritérium génov primárnej odpovede (D'Agostino a kol., 2000). Naproti tomu úroveň expície génov pre ARRy typu B nie je CK ovplyvnená (Kiba a kol., 1999; Lohrmann a kol., 1999). Bolo zistené, že expresia niektorých génov pre ARRy typu A a B môže byť spustená pri pôsobení abiotických stresových faktorov ako je vysoká koncentrácia solí, nedostatok vody alebo nízka teplota. Tento jav môže indikovať prelínanie sa medzi signálnymi dráhami CK a signálnymi dráhami spustenými abiotickými stresmi (Urao a kol., 1998). Ďalším rozdielom medzi týmito dvoma skupinami je spôsob, akým regulujú signálnu dráhu CK: ARRy typu A fungujú ako negatívne regulátory signálnej dráhy CK - potláčajú prenos fosfátu z AHPs na ARRy (To a Kieber, 2008; Obr. 4). ARRy typu B tvoria naopak pozitívne regulátory dráhy a vplývajú na expresiu a transkripciu génov v reakcii na prítomnosť CK a ovplyvňujú tiež transkripciu génov pre ARRy typu A (Hwang a Sheen, 2001; Obr. 4).

2.1.3 Účinok cytokinínov

CK účinkujú, podobne ako iné signálne molekuly pri už veľmi malých množstvách (1-50 pmol na gram čerstvej váhy; Galuzska a kol., 2008). Dokážu pôsobiť ako miestny signál v meristemických pletivách tak i ako signál na dlhšie vzdialenosti (Frébort a kol., 2005).

CK majú u rastlín širokú škálu pôsobnosti. Sú začlenené do regulácie dejov ako sú: vývoj a klíčenie semien, apikálna dominancia, vetvenie, fotomorfogenézia, nástup doby kvitnutia, fertilita, senescencia, rezistencia voči patogénu či odpoveď na stres (Mok, 1994; Mok a Mok, 2001; Rashotte a kol., 2003; Werner a Schmölling, 2009). napr. na osmotický a chladový stres (Tran a kol., 2007). CK sú tiež spojené s noduláciou v strukovinách (Murray a kol., 2007) a s cirkadiálnymi rytmami (Hanano a kol., 2006). Ovplyvňujú tiež mobilizáciu živín a distribúciu biomasy (Takei a kol., 2001; Mik a kol., 2011). Na bunecnej úrovni regulujú bunecné delenie, proliferáciu a diferenciáciu buniek (Mok a Mok, 2001; Fernando a Kieber, 2005; Sun a kol., 2005; Riefler a kol., 2006) a vplývajú na expresiu rôznych génov, napr. na expresiu génov pri nedostatku fosfátu (Martin a kol., 2000; Mik a kol., 2011). CK môžu v rastlinných bunkách vyvolať programovanú bunecnú smrť (PCD) (Vescovi a kol., 2012) a indukovať aktivitu antioxidantných enzýmov počas ontogenézy (Synková a kol., 2006).

CK sú schopné regulovať biosyntézu Chl (Mok, 1994; Werner a kol., 2008, Cortleven a kol., 2011; Mik a kol., 2011) a vplývať na akumuláciu rastlinných

pigmentov (Chory a kol., 1994). Buschmann a Lichtenthaler (1982) zistili zvýšenú akumuláciu Chl po exogénnej aplikácii CK na semenáče reďkovky (*Raphanus sativus* L.), ktorá vyústila do zvýšenej koncentrácie Chl po 6 h osvetľovania. Navyše účinkom CK došlo i k akumulácii antokyanov a karotenoidov. Avšak primárne je tvorba Chl nezávislá na CK, čo naznačuje, že CK nie sú potrebné *per se* pre tvorbu Chl, ale skôr fungujú v modulácii jeho obsahu (Riefler a kol., 2006).

CK ďalej ovplyvňujú ultraštruktúru, funkciu a vývoj chloroplastov (CP) a dokážu zvyšovať rýchlosť ich delenia (Mok, 1994; Mok a Mok, 2001; Rashotte a kol., 2003; Werner a Schmölling, 2009; Mik a kol., 2011) a stimulovať transkripciu CP génov (Zubo a kol., 2008). Prostredníctvom regulácie biosyntézy Chl cytokiníny predlžujú životnosť chloroplastov (Mok, 1994; Synková a kol., 2006).

CK vplývajú tiež na rýchlosť fotosyntézy (FS) (Chory a kol., 1994; Mok a Mok, 2001) a to prostredníctvom vplyvu na rôzne transkripty a proteíny zahrnuté v tomto procese (Flores a Tobin, 1988 cit. v Werner a kol., 2008) akými sú napr.: proteín svetlozberných komplexov viažuci Chl (LHCP), Rubisco (Lerbs a kol., 1984) alebo fosfoenolpyruvát karboxyláza a uhlíkaté anhydráty v kukurici (Sugiharto a kol., 1992 cit. v Werner a kol., 2008). CK dokážu zvyšovať aktivitu FS (Wareing a kol., 1968), pričom vplývajú ako na jej „svetelnú“ tak i „temnostnú“ fázu (Cortleven a kol., 2012).

CK zohrávajú dôležitú úlohu i v embryonálnom vývoji a v morfogénzii cievnych zväzkov (Mähönen a kol., 2000; Schmölling, 2002). Sú dôležitými regulačnými faktormi morfogénzie a aktivity meristému prostredníctvom riadenia jeho bunecnej proliferácie, pričom v meristémoch koreňa a výhonu plnia protikladné úlohy (Mok, 1994; Werner a kol., 2001, 2003; Kurakawa a kol., 2007). Vo výhone sú CK pozitívnymi regulátormi rastu (tzn. pri ich nedostatku sa spomalí jeho rast) a v koreni predstavujú negatívne regulátory (tzn. pri ich absencii je rast koreňa stimulovaný) (Werner a kol., 2008). Koordinácia vývoja týchto dvoch orgánov prostredníctvom CK je umožnená tým, že CK dokážu sprostredkovať informácie o stave živín v koreni a vo výhone. Bolo preukázané, že dodaním dusíku rastlinám, ktoré trpeli jeho nedostatkom, dochádza k zvýšenému exportu CK z koreňa. CK sú potom transportované cez xylém do listov, kde vyvolávajú zvýšenú expresiu génov pre regulátory odpovede typu A (Sakakibara a kol., 1998; Martin a kol., 2000). Tak CK môžu sprostredkovať signál na dlhé vzdialenosti a vypomáhať tak napríklad v čase nedostatku dusíka a následne spúšťať sled rôznych procesov v pletivách. Tak CK samotné aj ako ich signálna dráha

môžu byť zahrnuté v sprostredkovaní rôznych vývojových procesov v koreni, ktoré závisia na dusíku (Schmülling, 2002).

CK tiež vplývajú na fixáciu uhlíka v orgánoch, asimiláciu a rozklad primárnych metabolitov (Werner a kol., 2008).

CK a ich štruktúrne deriváty samozrejme fungujú i ako regulátory rôznych fáz bunkového cyklu, akými sú: prechod G1/S, S fáza a prechod G2/M (Mok a Mok, 2001; Werner a kol., 2008), pričom sú schopné inhibovať aktivitu kináz regulujúcich cyklus (Binarová a kol., 1998 cit. v Riefler a kol., 2006). Funkcia CK v bunkovom cykle je však nezávislá na prítomnosti receptorov lokalizovaných v membráne (Riefler a kol., 2006).

V neposlednom rade CK vplývajú na senescenciu (starnutie) rastlín (*vid'* 2.2 *Senescencia*). Obecné je známe, že CK dokážu spomaliť jej priebeh a to prostredníctvom brzdenia zmien spojených so senescenciou (*vid'* 2.4.1 *Exogénne aplikácie cytokinínov*). Medzi tieto zmeny patrí žltnutie listov odrážajúce pokles obsahu Chl (Cortleven a kol., 2011), tvorba plastoglobúl (Hudák a kol., 1996), zvýšená priepustnosť membrán (Kraus a kol., 1993) a pokles hodnôt FS parametrov ako je rýchlosť fotosyntézy (P_N) (Gan a Amasino, 1995), koeficient fotochemického zhášania fluorescencie Chl (q_p) a maximálny kvantový výťažok fotochemických procesov vo fotosystéme II (F_v/F_m) (Vlčková a kol., 2006). Prostredníctvom signálnych dráh dokážu CK buď priamo alebo nepriamo inhibovať transkripciu génov spojených so senescenciou (SAGs) (Gan a Amasino, 1997).

Výsledný účinok CK na rôzne fyziologické procesy je podmienený radou faktorov. Pôsobenie týchto fytohormónov závisí od ich koncentrácie, od ich štruktúrnej formy (vzťah medzi štruktúrou a aktivitou CK bol diskutovaný vo veľa prácach súčasne s ich biosyntézou alebo metabolizmom - *vid'* napr. Sakakibara, 2006), od použitej intenzity svetla, od rastlinného druhu alebo môže byť ich účinok modulovaný pôsobením iných hormónov (Buschmann a Lichtenthaler, 1982; Pospíšilová a kol., 1993; Chory a kol., 1994; Vlčková a kol., 2006; Ananieva a kol., 2008; Melkovičová, 2012).

2.2 Senescencia

Senescencia (starnutie) je vysoko regulovaný vývojový proces, ktorý predstavuje finálne štádium vývoja rastliny a vedie k smrti (Noodén 1988). Nástup senescencie reprezentuje vekovo závislý prechod z funkčne aktívneho stavu do fáze degradácie (Smart 1994; Noodén a kol., 1997).

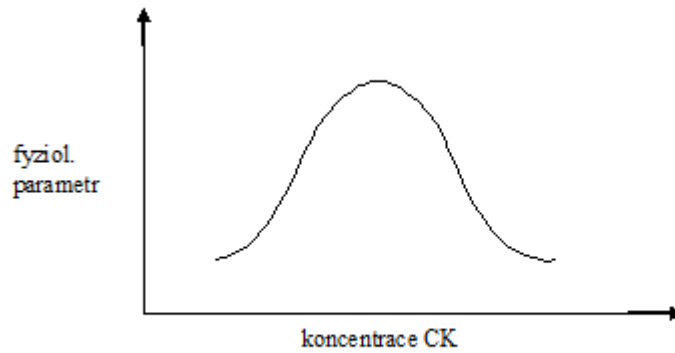
Priebeh senescencie sa dá obecné rozdeliť do troch hlavných fáz (Noodén a kol., 1997). Prvou fázou je fáza iniciácie. Obecné je hlavným regulátorom senescencie jadro a nástup celého procesu je riadený geneticky. Avšak priebeh senescencie môže byť ovplyvnený i radou rôznych vonkajších i vnútorných faktorov. Medzi vonkajšie faktory môžeme radiť svetelné podmienky - úplný alebo čiastočný nedostatok svetla alebo naopak výrazný nadbytok svetla, alebo rôzne environmentálne stresy ako sú extrémne teploty, nedostatok vody či živín (Smart, 1994). Medzi vnútorné faktory môžeme radiť rôzne vývojové zmeny alebo účinok fytohormónov (Noodén, 1988; Gan a Amasino, 1997).

Druhou fázou je fáza degradácie. V bunke dochádza k postupnému systematickému rozkladu rôznych organel a k syntéze rôznych hydrolytických enzýmov, akými sú proteázy, lipázy, nukleázy a enzýmy degradujúce Chl. Zvyšuje sa tak odbúravanie mastných kyselín, proteínov i nukleových kyselín (Noodén a kol., 1997). Dochádza k premiestňovaniu živín (Zavaleta-Mancera a kol., 2007 cit. v Mik a kol., 2011). Ďalej sa v bunke zvyšuje hladina cukrov (Noodén a Leopold, 1978; Gan a Amasino, 1997) a reaktívnych foriem kyslíku (ROS) (Mik a kol., 2011). V dôsledku akumulácie ROS dochádza k oxidatívne poškodeniu DNA, proteínov a nenasýteným mastných kyselín a k nárastu peroxidácie membránových lipidov (Špundová a kol., 2003; Vlčková a kol., 2006; Mik a kol., 2011). Tieto poškodenia vedú postupne k poškodeniu bunky a môžu vyústiť až do buncnej smrti. I keď k tvorbe ROS dochádza počas celého života rastliny, ich koncentrácia sa výrazne zvyšuje práve počas senescencie. Ich primárnym zdrojom sú miesta s prenosom elektrónov, akými sú mitochondrie a CP. Toto fotooxidačné poškodenie je možné znížiť absorpciou prebytočného žiarenia napr. pomocou pigmentov xantofylového cyklu a tým zamedziť preredukovaniu FS elektrotransportného reťazca - tým sa zamedzí tvorbe ROS (Logan a kol., 1999). Iným mechanizmom ochrany proti fotooxidačnému poškodeniu môže byť i únikový pohyb CP. Tento pohyb býva však počas senescencie inhibovaný (*vid' 2.3 Pohyb chloroplastov*). So senescenciou dochádza i k poklesu obsahu Chl (Zacharias a Reid, 1990; Noodén a kol., 1997; Špundová a kol., 2003; Vlčková a kol., 2006). V

dôsledku rozpadu Chl predstavujú CP organely s prvými známkami senescencie. CP podstupujú počas senescencie množstvo ultraštruktúrnych zmien (Noodén, 1988). Dochádza k zmenám vo veľkosti a tvare, k redukcii a disorganizácii tylakoidného systému, zvyšuje sa množstvo plastoglobúl. Rozpad tylakoidov začína s úbytkom komplexov Cyt b_6/f , ktoré slúžia na prenos elektrónov medzi fotosystémom II (PSII) a fotosystémom I (PSI), nasleduje rozpad PSI a PSII, i svetlozberných komplexov LHC a neskôr i ATP syntázy. V strome dochádza k degradácii enzýmu Rubisco a iných enzýmov. Toto poškodenie CP postupne samozrejme vyúsťuje do deštrukcie FS aparátu a teda i do poklesu kapacity elektrónového transportu a celkovej FS aktivity (Noodén a kol., 1997; Lawlor, 2001). Ďalej sa v bunke zvyšuje expresia génov spojených so senescenciou (SAGs) (Gan a Amasino, 1997). V relatívne neskoršom štádiu dochádza k senescentným zmenám v mitochondriách a v jadre.

Poslednou fázou senescencie je fáza terminačná. Tvoria sa ďalšie špeciálne proteázy. Radia sa sem reakcie, ktoré usmrcujú bunku a môžu zahŕňať procesy podobné apoptóze. Dochádza k celkovej strate homeostázy a integrity bunecnej membrány. Rastlinné bunky tak počas senescencie podstupujú vysoko koordinované zmeny v ich štruktúre, v metabolizme a v génovej expresii.

Ako už bolo spomenuté už vyššie, senescenciu je možné ovplyvniť radou faktorov. Dnes je už obecné známe, že tento proces sa dá ovplyvniť účinkom CK. CK dokážu do určitej miery spomaliť jej priebeh, no na druhej strane i urýchliť. V roku 2012 bol Husičkovou a kol. vytvorený model pre koncentračnú a svetelnú závislosť účinkov CK (Obr. 5). Tento model popisuje, že CK sú schopné do určitej „hraničnej“ hodnoty koncentrácie spomaliť priebeh senescencie, avšak nad touto „hranicou“ dochádza k akcelerácii celého procesu, k urýchleniu poklesu obsahu Chl, degradácie CP i k poklesu fotosyntetickej aktivity. Tento model sa dá rozšíriť i o účinok PAR. Pri aplikácii vyššej intenzity PAR dochádza k posunu hraničnej hodnoty smerom k nižším koncentráciám v dôsledku sčítania sa účinkov príslušnej koncentrácie a aplikovanej dávky PAR.

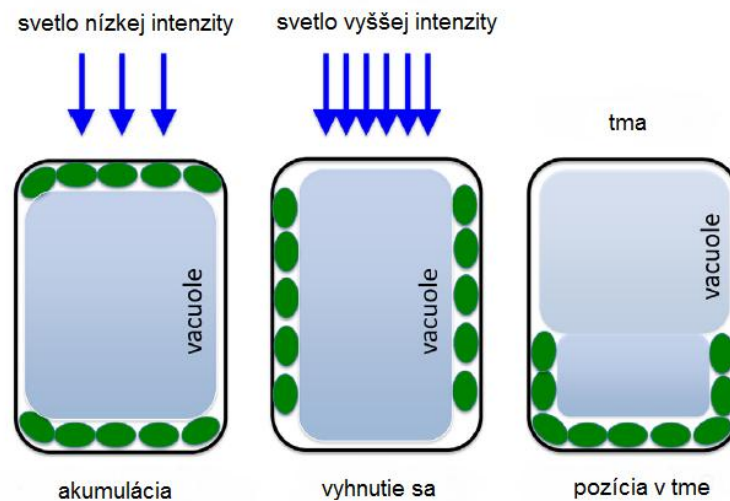


Obr. 5: Návrh modelu koncentračnej závislosti pre účinok CK. Za fyziologický parameter môžeme považovať napríklad dĺžku života listu. Pri zvyšovaní koncentrácie CK dochádza postupne k predlžovaniu jeho života, no len do určitej „hraničnej“ hodnoty. Za týmto „zlomovým“ bodom už ďalšie zvýšenie koncentrácie nevedie k predlžovaniu života, ale naopak k jeho skráteniu. Obdobne sa dá týmto spôsobom aplikovať model i pre závislosť medzi senescenciou a koncentráciou CK (nepublikovaný model autorov Husičková a kol., 2012).

2.3 Pohyb chloroplastov

Pohyb chloroplastov je dôležitý pre prežitie rastlín pod vyššími intenzitami PAR a pre efektívnu funkčnosť a maximálnu rýchlosť FS pod nižšími intenzitami PAR. Distribúcia CP je závislá na svetelných podmienkach, ktorým je daný list resp. rastlina vystavená (Nauš a kol., 2010; Davis a Hanganter, 2012; Wada, 2013).

U pohybu CP môžeme rozlíšiť dve základné reakcie v závislosti od svetelnej intenzity. Prvou je reakcia na PAR o nízkej intenzite (tzv. LFR - low fluence rate), kedy sa chloroplasty usporadúvajú pozdĺž bunečnej steny kolmo k dopadajúcemu žiareniu (face position; poloha diastrofe). Dochádza k pohybu CP akoby smerom ku PAR (accumulation response - akumulácia) a absorpcia PAR je v tomto prípade najvyššia (Obr. 6). Druhou je reakcia na PAR o vysokej intenzite (tzv. HFR - high fluence rate). V tomto prípade sa CP zoraďujú pozdĺž bunečnej steny paralelne s dopadajúcim žiarením (side position; parastrofe). CP sa akoby snažia vyhnúť svetelnému žiareniu a pohybujú sa smerom od PAR (avoidance response - „vyhnutie sa“) (Wada a kol., 2003; Gabryš, 2004; Banaš a kol., 2011). V tme chloroplasty zaujímajú nemennú pozíciu (apostrofe; Obr. 6) a ich distribúcia závisí od svetelnej intenzity, ktorej boli vystavené počas rastu (Trojan a Gabryš, 1996).



Obr. 6: Schematické rozloženie chloroplastov v mezofylných bunkách *Arabidopsis thaliana*. Chloroplasty sú uložené v tenkej vrstve cytoplazmy medzi plazmatickou membránou a tonoplastom veľkej vakuoly. Vľavo - reakcia akumulácie. Chloroplasty sa v dôsledku pôsobenia svetla o nízkej intenzite ukladajú do vrchnej a spodnej strany buniek palisádového mezofylu tak, aby bolo dosiahnuté maximálnej absorpcie. V strede - reakcia "vyhnutie sa". Chloroplasty sa ukladajú po stranách palisádových buniek, aby sa minimalizovala absorpcia svetla o vysokej intenzite. Vpravo - pozícia v tme. Chloroplasty sa ukladajú na spodnej strane buniek, avšak fyziologická funkcia tohto rozloženia nie je úplne známa. Obrázok a opis prevzaté z článku Wada (2013) a upravené.

Pohyb CP môže prebiehať v akomkoľvek smere a líši sa v závislosti od rastlinného druhu (Königer a Bollinger, 2012). Je riadený prevažne žiarením z modrej a z blízkej UV oblasti. U *Arabidopsis thaliana* boli identifikované dva fotoreceptory na modré svetlo vplývajúce na pohyb CP - fototropín 1 (phot1) a fototropín 2 (phot2). Oba riadia akumuláciu CP, ale len phot2 riadi u chloroplastov reakciu „vyhnutie sa“ pod PAR o vysokej intenzite (Briggs a Olney, 2001; Sakai a kol., 2001; Wada 2013). Phot2 je tiež zodpovedný za pozíciu CP v tme v palisádových bunkách mezofylu (Suesugu a kol., 2005). Oba fototropíny vplývajú i na ďalšie procesy ako je: fototropizmus, otváranie prieduchov alebo pozícia listov (Sakai a kol., 2001).

CP sa pohybujú vďaka chloroplastovým aktínovým filamentám (cp-aktín), ktoré musia byť polymerizované proteínom CHUP1 (chloroplast unusual positioning1) na prednej strane pohybujúceho sa CP (Wada, 2013).

2.4 Koncentračná a svetelná závislosť účinkov cytokinínov

Účinok CK býva často určovaný prostredníctvom sledovania vplyvu po aplikovaní určitej koncentrácie CK (exogénnej) a tým ovplyvnením endogénnej hladiny. Ďalším veľkým pomocníkom v štúdiu sú dnes i rôzne geneticky modifikované rastliny.

2.4.1 Exogénne aplikácie cytokinínov

Dnes je už obecné známe, že exogénna aplikácia CK spomaľuje zmeny spojené so senescenciou (Noodén a Leopold, 1978). Medzi takéto zmeny patrí napr. žltnutie listov (napr. Cortleven a kol., 2011) a s tým spojený pokles obsahu Chl (napr. Buschmann a Lichtenthaler, 1982), tvorba plastoglobúl (Hudák a kol., 1996), zvýšená priepustnosť membrán (Kraus a kol., 1993) alebo pokles hodnôt fotosyntetických parametrov ako je rýchlosť fotosyntézy (P_N), koeficient fotochemického zhášania fluorescencie Chl (q_p) a maximálny kvantový výťažok fotochemických procesov vo fotosystéme II (F_v/F_M) (Gan a Amasino, 1995; Vlčková a kol., 2006). Navyše CK dokážu prostredníctvom signálnych dráh buď priamo alebo nepriamo inhibovať transkripciu génov spojených so senescenciou (SAGs) (Gan a Amasino, 1995; 1997). Bolo tiež dokázané, že CK dokážu regulovať i expresiu génov kódujúcich invertázu bunečnej steny, ktorej aktivita je esenciálna pre mobilizáciu živín indukovanú CK a pre spomalenie senescencie (Balibrea Lara a kol., 2004 cit. v Werner a kol., 2008). Avšak pri určitých podmienkach sú CK schopné priebeh senescencie naopak urýchliť (Zacharias a Reid, 1990; Carimi a kol., 2004). Takéto účinky CK boli pozorované pri použití vyšších koncentrácií (napr. Pospíšilová a kol., 1993, 2001; Rulcová a Pospíšilová, 2001). Hoci akcelerácia senescencie exogénnym aplikovaním vyššej koncentrácie CK bola popísaná mnohými publikáciami, presný mechanizmus, ktorý vedie k týmto opačným účinkom nebol zatiaľ úplne identifikovaný. Možnou príčinou sa javí spojenie s indukciou oxidatívneho stresu pozorovanou napr. od Mlejnek a kol. (2003) v tabakových bunečných suspenziách.

V roku 1993 Pospíšilová a kol. sledovali u klíčiach rastlín tabaku a zemiaku účinok cytokinínu BAP, ktorý pridali do rastového média. Nízka koncentrácia BAP (0,004 μM) spôsobila stimuláciu rastu a veľmi mierny nárast obsahu Chl a+b, pomerov Chl a/b a Chl/karotenoidy a nárast rýchlosti fotosyntézy v oboch druhoch rastlín. S vyššou koncentráciou BAP (4,4 μM) bola naopak pozorovaná inhibícia rastu klíčiach

rastlín a ich výhony mali pozmenenú morfológiu. Došlo k poklesu rýchlosti FS, rýchlosti transpirácie, k poklesu obsahu Chl a parametrov *in vivo* fluorescencie (F_v/F_M , q_p). Tento negatívny účinok BAP bol výraznejší u tabakových rastlín.

Rozdiely v účinku rôznych koncentrácií CK zaznamenali i Genkov a kol. (1997), ktorí aplikovali fenylnmočovínové deriváty 4-PU-30 a TDZ na kultúry klinčeka záhradného (*Dianthus caryophyllus* L.). Zistili, že pri nízkych koncentráciách (0,004 μ M) dochádzalo k zvýšeniu obsahu fotosyntetických pigmentov a k zníženiu aktivity chlorofylázy, ktorá predstavuje kľúčový enzým metabolizmu Chl. Pri vyšších koncentráciách (0,4 a 4 μ M) dochádzalo k opačným účinkom.

V roku 2004 Carimi a kol. publikovali výsledky, ktoré ukázali urýchlenie priebehu senescencie po aplikovaní vyššej koncentrácie BAP. BAP bol aplikovaný v koncentracii 13 a 27 μ M na bunečné kultúry *Arabidopsis thaliana* a mrkvy obecné (*Daucus carota* L.). Ošetrovanie kultúr spôsobilo zvýšenú expresiu génov spojených so senescenciou (SAG12) a cysteínových proteáz. Došlo k zvýšenému rozpadu jadrovej DNA a k zvýšeniu počtu mŕtvych buniek. Pri aplikovaní rovnakej koncentrácie BAP na rastliny *Arabidopsis* boli pozorované morfologické zmeny ako pokles v koreňovej hmote a tvorba početných vrúbkov v listových okrajoch a dochádzalo k rýchlejšiemu žltnutiu listov.

Účinkom vysokých koncentrácií CK dochádza i k indukcii PCD. Vescovi a kol. (2012) sledovali účinok BAP na *Arabidopsis thaliana*. Zistili, že prítomnosť vysokej koncentrácie BAP (44 μ M) vyvolala PCD. Došlo k výraznému poklesu bunečnej hmoty (bunečná sušinná hmotnosť) a percentuálny podiel mŕtvych buniek sa zdvojnásobil po 4 dňoch od aplikácie BAP.

Okrem CK majú na priebeh senescencie vplyv i svetelné podmienky (Ananieva a kol., 2008). Svetlo je elektromagnetické žiarenie, ktoré predstavuje pre rastlinu popredný zdroj energie a hlavný signálny faktor pôsobiaci vo vývoji (Briggs a Olney, 2001). Schopnosť rastlín efektívne zvyšovať fotosyntetickú produktivitu závisí na schopnosti rastliny vnímať, zhodnotiť a reagovať na kvalitu a kvantitu žiarenia a na jeho smer. Svetlo ako signálny faktor je u rastlín absorbované prostredníctvom súboru fotoreceptorov a svetelná energia je prevedená na vnútorný signál (Lawlor, 2001). Receptory na červenú oblasť spektra svetelného žiarenia sú fytochromy. Tie podstupujú po absorpcii konformačnú zmenu z formy absorbujúcej v červenej oblasti na formu absorbujúcu v ďalekej červenej oblasti, čo jednoznačne vedie k zmenám v regulácii génov zahrnutých vo vývoji a raste (Schäfer a Bowle, 2002). Obecne červená oblasť

žiarenia (660 nm) indukuje odpovede riadené fytochrómami, zatiaľ čo oblasť ďalej červenej (730 nm) inhibuje tieto odpovede. U *Arabidopsis thaliana* nájdeme 5 fytochrómov (PHYA-E), ktoré reagujú na červenú a ďalekú červenú oblasť a ktoré sprostredkovávajú procesy ako: aktivácia klíčenia, inhibícia predlžovania stonky u rastlín rastúcich v tme, indukcia rozširovania listov a regulácia kvitnutia. Modré a UV žiarenie je detekované kryptochromami (CRY1/CRY2), ktoré dokážu regulovať predlžovanie hypokotylu a načasovanie kvitnutia. Navyše existujú ešte dva špecifické receptory pre fototropizmus citlivé na modrú oblasť spektra (NPH1 a NPL1) a iné fotoreceptory pre UV-B oblasť (Briggs a Olney, 2001). Tento súbor fotoreceptorov dovoľuje rastlinám monitorovať a odpovedať na okolité svetelné podmienky, ktorým sú vystavené. Napríklad tma, resp. nedostatok svetelnej energie môže u rastlín vyvolať rôzne zmeny spojené so senescenciou ako sú pokles obsahu Chl, poškodenie tylakoidov, zvýšenie tvorby ROS alebo pokles FS aktivity a tým parametrov FS ako napr. maximálneho výťažku fotochémiie PSII F_v/F_m i aktuálneho výťažku fotochémiie PSII $\Delta F/F_m$ (Špundová a kol., 2003; Vlčková a kol., 2006; Ananieva a kol., 2008). Tieto zmeny však závisia na stupni zatemnenia - či je zatemnená celá rastlina alebo len individuálne orgány na rastline, pretože v prípade zatemnenia napr. dvoch listov na rastline je postup senescencie týchto orgánov riadený svetelným stavom zvyšku rastliny. Tento poznatok súhlasí i so zistením skupiny Ananieva a kol. (2008), ktorý sledovali účinok zatemnenia na postup senescencie v jednom alebo oboch jednotlivito zatemnených kotyledonov mladých rastlín tekvice obyčajnej (*Cucurbita pepo*). Zistili, že priebeh senescencie u jedného zatemneného kotyledonu závisí na svetelných podmienkach druhého kotyledonu. Tmou indukovaná senescencia môže tak byť orgánovo špecifická.

Naopak aplikáciou svetla (strednej intenzity; približne až do $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dochádza často k spomaleniu poklesu obsahu Chl v oddelených listoch (Chang a Kao, 1998 cit. v Špundová a kol., 2003). Podobný vplyv svetelných podmienok bol pozorovaný i v práci Melkovičová (2012), kde bol u listových segmentov jačmeňa inkubovaných v tme zaznamenaný výrazný pokles obsahu Chl i hodnoty maximálneho kvantového výťažku PSII vyjadreného v pomere F_v/F_p a u segmentov inkubovaných na svetle bolo vo väčšine prípadov pozorované spomalenie poklesu týchto dvoch parametrov. Vyššie intenzity alebo dávky svetla môžu vyvolávať u rastlín fotooxidatívne poškodenie zahrňujúce deštrukciu pigmentových molekúl svetlom a mať

negatívny (urýchľujúci) účinok na senescenciu (Špundová a kol., 2003; Vlčková a kol., 2006).

Mnohé procesy, ktoré sú indukované pôsobením rôznych svetelných podmienok, sú podobné procesom, ktoré sú vyvolané pôsobením CK. Ide o procesy ako: inhibícia rastu hypokotylu, aktivácia funkcie meristému výhonu, klíčenie semien, diferenciácia CP (Thomas a kol., 1997; Werner a Schmölling, 2009), zelenanie (Mok 1994), fotomorfogeneza a kvitnutie (Chory a kol., 1994; Thomas a kol., 1997) alebo nástup senescencie (Gan a Amasino, 1996).

Súčasný modely predpokladajú, že CK a svetlo môžu pôsobiť prostredníctvom spoločných signálnych dráh (Chory a kol., 1994). Možná konvergencia medzi signálnymi dráhami CK a svetla bola preukázaná skupinou Sweere a kol. (2001) alebo tiež Frankhauserom (2002). Obe skupiny predpokladajú priamu interakciu medzi fytochromom B (PHY B) a regulátorom odpovede 4 u *Arabidopsis* (ARR4), ktorý patrí medzi prvky signálnych dráh CK. Ich výsledky ukázali, že ARR4 je schopný regulácie signálnej dráhy svetla červenej spektrálnej oblasti na úrovni fotoreceptorov triedy PHY B.

Jedna z prvých štúdií, ktorá sa zaoberala závislosťami medzi účinkami svetla a CK, bola prevedená Buschmannom a Lichtenthalerom v roku 1982: bol sledovaný vplyv BAP (8,9 μM) a kinetinu (9,3 μM) na akumuláciu pigmentov (antokyany, karotenoidy, fototransformovateľný protochlorofyl, chlorofyl) a na niekoľko rastových parametrov (veľkosť listovej plochy, predĺženie hypokotylu a koreňa) u reďkovky siatej (*Raphanus sativus* L.). Účinky CK sledovali jednak pri pôsobení tmy a jednak pri svetle o vyššej (90 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, tj. približne 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a nižšej intenzite (10 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, tj. približne 62 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Zistili, že u vzoriek v tme oba CK potlačili rast koreňa a hypokotylu oproti kontrolným vzorkám (bez CK). Došlo k nepatrnému zvýšeniu listovej plochy a k zvýšeniu akumulácie pigmentov. Predovšetkým bol zvýšený obsah antokyanov v hypokotyle. U semenáčov na svetle o nižšej intenzite CK opäť potlačili rast koreňa a hypokotylu oproti kontrolným vzorkám. Listová plocha bola oproti semenáčom v tme zmenšená. Podobne ako v tme bola zvýšená akumulácia antokyanov no akumulácia ostatných pigmentov bola cytokinínmi málo ovplyvnená. Na svetle o vyššej intenzite bola oproti tme a svetle o nižšej intenzite zaznamenaná menšia účinnosť CK. Došlo tu k poklesu akumulácie antokyanov. Buschmann a Lichtenthaler (1982) teda ukázali, že účinok exogénne aplikovaných CK u rastliny závisí na použitej svetelnej intenzite.

Vplyv BAP pri pôsobení dvoch rôznych svetelných podmienok sledovali Zacharias a Reid (1990). V experimente použili oddelené listové disky *Arabidopsis thaliana*. V tme pri aplikovaní koncentrácie 10^{-6} M došlo k spomaleniu poklesu obsahu Chl, no pri koncentrácii nad 10^{-5} M nebol pozorovaný výrazný vplyv na obsah Chl. Naproti tomu u diskov inkubovaných na svetle pri koncentrácii BAP nad 10^{-5} M bol pozorovaný opačný účinok, došlo k stimulácii Chl degradácie.

V roku 2006 Vlčková a kol. sledovali vplyv rôznych svetelných podmienok na priebeh senescencie oddelených listov pšenice (*Triticum aestivum* L.), na ktoré bol exogénne aplikovaný mT (10^{-4} M). Senescencia bola charakterizovaná zmenami v štruktúre CP, poklesom obsahu Chl, poklesom maximálneho kvantového výťažku PSII a rýchlosti asimilácie CO_2 a zvýšením hladiny lipidovej peroxidácie. Zatiaľ čo u listových segmentov inkubovaných v tme mT účinne spomalil zmeny spojené so senescenciou vo všetkých parametroch, na kontinuálnom svetle ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sa účinok mT zmenil na opačný.

Koncentračná a svetelná závislosť účinkov CK bola tiež sledovaná v bakalárskej práci Melkovičovej (2012). Boli použité BAP a mT, ktoré boli aplikované v koncentrácii 10^{-5} M, 10^{-4} M, $3\cdot 10^{-4}$ M na oddelené listové segmenty jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Oba CK v tme spomalili pokles obsahu Chl i hodnoty F_V/F_P v jednotlivých použitých koncentráciách. No tento účinok CK sa postupne znižoval s nárastom svetelnej dávky a pri aplikovaní kontinuálneho PAR ($370 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) CK urýchlili pokles oboch spomenutých parametrov. Z výsledkov je možné vidieť, 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. Podobný charakter účinku na priebeh senescencie bol sledovaný i pri pôsobení svetla. V spojení nízkej intenzity svetla a nižších koncentrácií CK dochádzalo k spomaleniu priebehu senescencie, avšak opäť len do určitej „hraničnej“ hodnoty. Po jej prekročení dochádzalo k urýchleniu senescencie. Tieto výsledky odpovedajú modelu pre koncentračnú závislosť účinkov CK, vytvoreného Husičkovou a kol. z roku 2012 (Obr. 5).

Negatívny účinok vysokej koncentrácie CK bol zistený i v práci Prokopová a kol. (2010), v ktorej bol aplikovaný BAP o koncentrácii 200 μM na listové disky šalátu siateho (*Lactuca sativa* L.). Došlo k poklesu obsahu FS pigmentov v spojení s inhibíciou fotochémií PSII a elektrónového transportu. Tieto zmeny boli oveľa

výraznejšie pri aplikovaní PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ než na PAR o intenzite $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Ako je vidieť z vyššie uvedených informácií, účinok CK na priebeh senescencie sa líši v závislosti na použitej koncentrácii a od príslušných svetelných podmienok. Svetlo aj CK dokážu do určitej miery spomaľovať zmeny spojené so senescenciou a môžu tak predstavovať pozitívne regulátory tohto procesu. No keď ich samostatný alebo spoločný vplyv prekročí určitú „hranicu“ pôsobenia, môže dochádzať k opačným účinkom a priebeh senescencie a zmien s ňou spojených sa môže urýchliť. Účinok svetla a CK sa tiež môže líšiť i v závislosti od rastlinného druhu, pretože pre každý rastlinný druh existuje iná optimálna („hraničná“) koncentrácia fytohormónu. A navyše môže byť účinok CK ovplyvnený i pôsobením iných hormónov, napr. auxinov, ktoré dokážu regulovať veľkosť poolu CK (Nordstöm a kol., 2004).

2.4.2 Endogénne hladiny

Hladina endogénnych CK je obecné priestorovo a časovo regulovaná. CK sa hojne vyskytujú v koreňovej špičke, v apikálnom meristéme koreňa a nezrelých semenách (Letham, 1994), pričom hladina endogénnych CK sa mení počas rastlinného vývoja a rastu (Benková a kol., 1999) a môže byť ovplyvnená environmentálnymi faktormi ako napríklad množstvom dostupných minerálov (Sakakibara a Takei, 2002) či dostatkom vody (hladina sa znižuje pri strese z nedostatku vody) (Yang a kol., 2001). K zmenám v hladine endogénnych CK môže tiež dochádzať v súvislosti s bunkovým cyklom, kedy bolo pozorované, že najvyššia hladina CK sa vyskytuje v neskoršej S fáze a počas M fázy (Redig a kol., 1996). Obecné je endogénna hladina aktívnych CK u rastlín regulovaná rýchlosťou biosyntézy, ich vzájomnej premeny, transportu a degradácie (Kakimoto, 2003a).

Ovplyvnenie endogénnych hladín CK predstavuje alternatívny prístup štúdia účinkov CK. Ovplyvnenie hladiny môže byť prevedené napr. zvýšením expresie génov kódujúcich enzýmy biosyntézy CK (IPT) alebo tvorbou rastlinných mutantov, ktoré môžu mať napr. „vypnuté“ receptory pre CK (tzv. loss of function mutants).

2.4.2.1 Transgénne rastliny so zmeneným obsahom CK

Jedným z efektívnych nástrojov štúdia mechanizmu pôsobenia CK je použitie transgénnych rastlín. Využívajú sa transgénne rastliny ako so zvýšením tak i so zníženým obsahom CK.

Transgénné rastliny so zvýšeným obsahom CK môžu byť vytvorené prostredníctvom génu *ipt*, získaného napr. z Ti plazmidu *Agrobacterium tumefaciens*. Tento gén kóduje enzým izopentenyltransferázu (IPT) a jeho expresiou dochádza k zvýšeniu obsahu CK. Väčšina z týchto rastlín vykazuje spomalenie procesu senescencie ako i zmeny v morfológii a vo vývoji. CK okrem senescencie samozrejme ovplyvňujú taktiež iné procesy a môže sa stať, že nadprodukcia CK pred nástupom senescencie bude zasahovať do normálneho vývoja rastliny. Aby sa vyhlo tomuto problému, je používaný ako promotor *ipt* génu SAG12 (Gan a Amasino 1995). Tento promotor aktivuje expresiu génu *ipt* na počiatku senescencie, čo vedie k zvýšeniu hladiny CK a to zabraňuje nástupu listovej senescencie. Napr. u tabakových rastlín, ktoré obsahujú tento transgen, dochádza k spomaleniu priebehu senescencie bez akýchkoľvek vývojových abnormalít (Gan a Amasino, 1997). Vyššia endogénna hladina CK spôsobovaná expresiou génu IPT často redukuje apikálnu dominanciu a vývoj koreňa a mení listový tvar (Sa a kol., 2001 cit. v Ferreira a Kieber, 2005).

Jednými z rastlín obsahujúcimi gén *ipt* sú tabakové rastliny typu *Pssu-ipt*. Jedná sa o transgénné tabakové rastliny, v ktorých je gén *ipt* pod kontrolou protomotoru *Pssu* (malá podjednotka Rubisco z hrachu siateho) indukovaného svetlom (Cortleven a kol., 2011). Tento gén je lokalizovaný na prenášanej DNA oblasti Ti-plazmidu v *Agrobacterium tumefaciens*.

Rastliny tohto genotypu obsahujú CP s špecifickou ultraštruktúrou: obsahujú viac grán a majú zvýšený obsah škrobových zrn (Synková a kol., 2006). Majú vyšší obsah chloroplastovej superoxid dizmutázy (SOD) a ferredoxin-NADP⁺ reduktázy (FNR) oproti WT, čo môže súvisieť s ochranou proti fotooxidatívne mu poškodeniu (Cortleven a kol., 2011). Superoxid je formovaný v akomkoľvek mieste, v ktorom je prítomný elektrónový transportný reťazec alebo kyslík. Predpokladá sa, že chloroplastová SOD v rastlinách slúži na superoxidu vznikajúceho na redukujúcej strane PSII. FeSOD je lokalizovaná v CP a zahrnutá v ochrane ako plazmatickej membrány, tak PSII proti oxidatívne mu poškodeniu (Van Camp a kol., 1997 cit. v Cortleven a kol., 2011). Toto pozorovanie odpovedá tvrdeniu, že CK stimulujú aktivitu antioxidantných enzýmov počas ontogenézy (Synková a kol., 2006). Zvýšené množstvo FNR, ktorý katalyzuje prenos elektrónu z ferredoxínu na NADP⁺, môže byť tiež spojené s ochranou proti fotooxidatívne mu poškodeniu (Cortleven a kol., 2011). Nedávna štúdia ukázala, že tabakové rastliny s nadprodukciou FNR vykazujú zvýšenú toleranciu voči fotooxidatívne mu poškodeniu (Rodriguez a kol., 2007 cit. v Cortleven a

kol., 2011). Černý a kol. (2011) taktiež našli zvýšený obsah FNR v semenáčoch *Arabidopsis thaliana* po aplikácii CK.

Tieto rastliny majú i zvýšený obsah fruktóza-bisfosfát aldolázy, ktorá katalyzuje premenu glycerinaldehyd-3-fosfátu s dihydroxyacetónom na fruktóza-1,6-bisfosfát (Cortleven a kol., 2011). Zvýšený obsah aldolázy v *Pssu-ipt* tabakových rastlinách je v súlade s výsledkami autorov Černý a kol. (2011), ktorý našli podobné zvýšenie v semenáčoch *Arabidopsis thaliana* po aplikácii CK.

Ďalším typom rastlín s obsahom génu *ipt* sú tabakové rastliny CaMV35S > GR > *ipt* (lína 303 a 307). Jedná sa o transgénne tabakové rastliny obsahujúce systém pOp-*ipt*/LhGR pre expresiu *ipt* génu indukovateľnú dexametazónom (DEX). Po indukcii pomocou DEX dochádza k vysokému nárastu obsahu endogénnych CK, ktorý je až o štyri rády vyšší než obsah CK u neaktivovaných vzoriek. Táto vysoká koncentrácia CK má následne inhibičný účinok na FS. Dochádza tiež k nárastu v obsahu stresových hormónov (kyseliny salicylovej, jasmonovej a abscisovej) a k akumulácii ROS. Nie sú však pozorované známky chlorózy ani štatisticky významný pokles v obsahu Chl. Dochádza k tvorbe masívnych lézií, ktoré sú spojené s vädnutím a oba tieto procesy vyúsťujú do kompletného kolapsu listov u rastlín línie 303, ktoré do nasledujúcich 3 týždňov uschnú. Rozširovanie lézií a vädnutie býva menšieho rozsahu u rastlín líniu 307, pričom rastliny tejto línie dokážu prežiť po jednej dávke DEX, následne sa vyvíjať a dokonca produkovať životaschopné semená. Vyššie spomenuté formovanie lézií je závislé na použitej dávke DEX a na prítomnosti svetla (Novák a kol., 2013).

Transgénne rastliny so zníženým endogénnym obsahom CK môžu byť získané nadprodukciou (overexpresiou) génov kódujúcich cytokinín oxidázové/dehydrogenázové (CKX) enzýmy, ktoré pôsobia v degradácii CK (Werner a kol., 2001, 2003; Yang a kol., 2003). Takéto rastliny potom vykazujú fenotyp nazývajúci sa tzv. syndróm z nedostatku CK (*cytokinin-deficiency syndrome*). Typickými znakmi týchto rastlín sú menšie listy a celková zakrpatenosť, ďalej oneskorený nástup kvitnutia, nárast sterility a hlavne tvorba pomaly rastúceho výhonu s malými listami (produkcia buniek listu je iba 3-4 % WT) a zvýšený rast koreňa. U pletiva výhonu dochádza k zvýšenej vakuolizácii a skoršej diferenciacii plastidov, ktoré majú v neskoršom vývoji čiastočne poškodené tylakoidné štruktúry. Výraznejší pokles v obsahu CK vedie ku kompletnému zastaveniu rastu apikálneho výhonkového meristému. Dochádza k poklesu buncného delenia a v buncnom cykle sa objavuje inhibícia prechodu z G2 fáze do mitózy. Korene rastlín s nedostatkom CK sú širšie a

viac rozvetvené a obsahujú menej cukrov v porovnaní s WT. Avšak tento jav nevyplýva negatívne na glykolýzu, obsah ATP či vývoj koreňa. Listy týchto rastlín majú menší počet buniek a oneskorenú iniciáciu, obsahujú menej Chl a nefotochemické zhášanie u mladých listov býva zvýšené (Werner a kol., 2001, 2003, 2008).

U tabakových rastlín typu CKX poklesáva hladina CK na 30 % až 60 % oproti typu WT. V tejto línii býva rast nadzemných častí spomalený: dĺžka internódia, veľkosť listov a veľkosť apikálneho meristému výhonu bývajú zmenšené, zatiaľ čo samotný interval zakladania listov býva zvýšený. Tieto fenotypové prejavy sú spôsobené zníženou rýchlosťou bunecného delenia. Na bunecnej úrovni je veľkosť buniek zväčšená, zatiaľ čo ich počet zmenšený. Oproti tomu celková koreňová hmota narastá v dôsledku nárastu veľkosti meristematickej zóny koreňa. Z tohto dôvodu sa predpokladá, že CK sú pozitívnymi regulátormi bunecného delenia i v koreňovom apikálnom meristeme (Werner a kol., 2001; 2008).

Zaujímavé je, že transgénne tabaky s mnohonásobne zvýšenou aktivitou CKX a teda výrazne zníženým obsahom CK prekvapivo neprejavovali znaky urýchlenej senescencie, ale práve naopak (Mýtinová a kol., 2006).

Arabidopsis thaliana obsahuje sedem členov génovej rodiny pre CKX - AtCKX1 až AtCKX7 (Schmülling a kol., 2003). Jednotliví členovia sa líšia svojimi biochemickými vlastnosťami, svojou subcelulárnou kompartmentizáciou a reguláciou expresie (Werner a kol., 2003). Werner a kol. (2003) skonštruovali transgénne rastliny *Arabidopsis*, u ktorých dochádza k individuálnej overexpresii 6 AtCKX a previedli detailnú analýzu fenotypu. Transgénne rastliny mali menší obsah CK (30 až 40 % oproti WT). Nedostatok CK vyústil do zníženej aktivity apikálneho meristému vegetatívnych a listových výhonov a listových základov, čo nám naznačuje absolútnu potrebu tohto hormónu v rastlinnom organizme.

Ďalším typom rastlín so zníženým obsahom endogénnych CK predstavujú tabakové rastliny 35S:CKX1. Jedná sa o transgénne rastliny tabaku obsahujúce gén (CKX1) kódujúci CK oxidázu/dehydrogenázu, z *Arabidopsis thaliana* pod kontrolou 35S promotora z vírusu mozaiky karfiolu (Cortleven a kol., 2011).

Elektrónovou mikroskopiou bola odhalená pozmenená ultraštruktúra buniek stonkového meristému. Bol evidovaný znížený počet buniek v apikálnom meristeme výhonu a zreteľné cytologické zmeny oproti WT. V porovnaní s WT bol zvýšený počet vakuol v bunkách SAM a heterochromatická sieť jadra bola oslabená. Mitochondrie

tohto genotypu sa javili zväčšené a viac pretiahnuté a vykazovali dilatované vnútorné tubuli. Plastidy javili znaky nezrelosti.

Listové základy tohto genotypu obsahujú väčšie bunky oproti WT s väčším počtom vakuol a zníženým relatívnym obsahom cytoplazmy. Bunky palisádového parenchýmu sú kruhovo tvarované a často oddelené veľkými medzibunečnými priestormi. CP sú dlhšie a väčšie než u WT a obsahujú menšie grana. Ďalej bolo v bunkách tohto genotypu pozorované často nepravidelné zosilnenie bunečnej steny. Listy tohto genotypu obsahujú bunky s diorganizovanou cytoplazmou a jadrom, vykazujú znaky autofágie, formovanie vezikúl a zdurenie ER (Werner a kol., 2008). Prekvapivé je, že rastliny 35S:CKX1 majú zvýšenú úroveň fruktóza-bisfosfát aldolázy podobne ako rastliny *Pssu:ipt* (Cortleven a kol., 2011). Werner a kol. (2008) dávajú túto zvýšenú aktivitu aldolázy do súvislosti s kompenzáciou nižšieho obsahu sacharidov.

Tieto rastliny vykazujú výraznejšie zmeny vo fenotype (majú napr. výrazne menší koreňový systém) oproti transgénemu tabakovému typu 35S:CKX2 (Werner a kol., 2001, 2008).

4.4.2.2 *ahk* mutanty

U *Arabidopsis thaliana* nájdeme tri základné histidínkinázové receptory pre CK - AHK2, AHK3 a AHK4 (Inoue a kol., 2001; Suzuki a kol., 2001; Ueguchi a kol., 2001; Yamada a kol., 2001). Tieto receptory môžu byť vyradené zo svojej funkcie (tzv. loss of function mutants) a to prostredníctvom umlčania génov pre tieto receptory. Podľa počtu vyradených receptorov môžeme mať: „single“ mutanty s vyradeným jedným receptorom (napr. *ahk4*), „double“ mutanty s vyradenými dvoma receptormi (napr. *ahk2ahk3*) alebo „triple“ mutanty, ktoré majú nefunkčné všetky tri receptory (*ahk2ahk3ahk4*).

Tieto mutanty bývajú využívané pre bližšie objasnenie fungovania signálnych dráh alebo na odhalenie funkcie receptora, ktorý sa účastní v prenose signálu CK a v sprostredkovaní účinku pre príslušný CK.

Tieto rastliny majú často zmenšený priemer ružice, menší vzrast, oneskorený nástup kvitnutia a tiež znížený počet listových buniek (Riefler a kol., 2006).

Pre jednoduché „single“ mutanty (*ahk2*; *ahk3* a *ahk4*) vid' kapitolu 2.1.2.1 *Komponenty TCS dráhy cytokinínov*.

U mutanta *ahk2ahk3ahk4* („triple“ mutant) je pozorovaný syndróm z nedostatku CK (Werner a kol., 2003). Rastliny tohto mutanta majú malý vzrast a menší počet listov, s menším počtom buniek na list ako WT. Zaujímavé je, že nefunkčnosť týchto troch receptorov CK síce vedie ku kompletnému pozastaveniu rastu meristému apikálneho výhonu (Werner a kol., 2003), no i tak sú schopné tieto mutanty založiť a udržať si funkčný meristém výhonu (Higuchi a kol., 2004; Nishimura a kol., 2004; Riefler a kol., 2006). Semienka tohto mutanta sú dvakrát väčšie ako semienka WT (Riefler a kol., 2006). Tento nárast vo veľkosti semien je priamym dôsledkom straty funkcie receptorov a ich úlohy v kontrole správneho rastu (Riefler a kol., 2006).

ahk2ahk3 mutant vykazuje značné vývojové zhoršenia naznačujúce, že príslušné dva receptory fungujú cez spoločné signálne dráhy. V dôsledku toho, že receptory AHK2 a AHK3 sprostredkujú účinok CK na priebeh senescencie, sú v priebehu listovej senescencie vyvolanej tmou bunky tohto mutanta necitlivé na CK (Stolz a kol., 2011) a nemajú na CK závislú inhibíciu straty Chl, ktorá je indukovaná tmou. Má zníženú veľkosť listovej ružice a redukovaný rast stonky. Listy tohto mutanta formujú menej buniek, sú menšie a majú znížený obsah Chl. No na druhej strane je rýchlosť listovej iniciácie a načasovanie kvitnutia rovnaká ako u WT. U tohto typu mutanta sa ďalej vyvíja výrazne rozšírený koreňový systém, ktorý je dosiahnutý dvojím spôsobom. Jednak prostredníctvom rýchlejšieho rastu primárneho koreňa než u WT a jednak zvýšeným vetvením, kedy dochádza k zvýšenej tvorbe laterálnych koreňov (Werner a kol., 2003; Nishimura a kol., 2004; Riefler a kol., 2006). V roku 2014 sledovali Cortleven a kol. u listových segmentov mutanta *ahk2ahk3* účinok PAR o vysokej intenzite ($1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) na zmenu hodnoty maximálneho kvantového výťažku fotochémie PSII (F_V/F_M). Zistili, že u tohto mutanta dochádza oproti typu WT k výraznejšiemu poklesu hodnoty F_V/F_M a k poklesu antioxidačnej kapacity.

ahk2ahk4 mutant obsahuje funkčný receptor AHK3, ktorý je dôležitý pre správny rast orgánov a je považovaný za hlavný receptor spojený s reguláciou senescencie (Riefler a kol., 2006). Vďaka prítomnosti tohto receptoru sa tak dá očakávať spomalenie priebehu senescencie. Pri inkubácii listov tohto mutanta na PAR o vyššej intenzite dochádza v porovnaní napr. s mutantom *ahk2ahk3* alebo *ahk3ahk4* k najmenšiemu poklesu hodnoty F_V/F_M (Cortleven a kol., 2014).

ahk3ahk4 mutant má funkčný receptor AHK2. Tento je sám postačujúci pre udržanie normálneho rastu pri štandardných rastových podmienkach (Higuchi a kol.,

2004; Riefler a kol., 2006) a predpokladá sa, že AHK2 hrá v procese senescencie skôr vedľajšiu úlohu (Kim a kol., 2006).

...

Ako je vidieť z vyššie uvedených poznatkov, veľa vedomostí o biologickej aktivite a účinku cytokinínov je založených práve na experimentoch využívajúcich exogénne aplikácie týchto fytohormónov alebo zmeny v ich endogénnom obsahu. Hoci tieto experimenty priniesli významné informácie o procesoch, ktoré sú ovplyvnené CK, nie vždy musia odrážať skutočné funkcie a procesy *in vivo*. Celkový účinok cytokinínov závisí od množstva faktorov. Ich pôsobenie závisí napr. od použitej koncentrácie, od svetelných podmienok a tiež od rastlinného druhu. Týmito faktormi je tak podmienený i priebeh rastlinnej senescencie.

Táto práca nadväzuje a rozširuje bakalársku prácu Melkovičovej (2012), ktorá bola venovaná sledovaniu koncentračnej a svetelnej závislosti účinku cytokinínov BAP a mT u rastlinného druhu jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Pre tento rastlinný druh získané výsledky potvrdili platnosť vyššie spomenutého modelu Husičkovej a kol. (2012) (*vid' 2.2 Senescencia*). Koncentračnú a svetelnú závislosť účinku CK sme chceli preskúmať hlbšie a z tohto dôvodu sme sledovali účinky cytokinínu mT na umelo navodenú senescenciu listov *Arabidopsis thaliana*, pričom pre podrobnejšie skúmanie sme použili štyri rôzne genotypy - WT a tri receptorové mutanty *ahk2ahk3*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk4*.

Druhým dôležitým cieľom bolo posúdeniu vplyvu cytokinínu mT a svetelných podmienok na pohyb chloroplastov. Tento cieľ vyplynul z poznatkov, že CK sú jednoducho schopné vplývať na priebeh senescencie a že počas senescencie dochádza k inhibícii pohybu chloroplastov (nepublikované výsledky). Je už obecné známe, že CK sú schopné ovplyvňovať chloroplasty - vplývajú na ich vývoj, diferenciáciu, ultraštruktúru, funkciu a tým celkovo na ich životaschopnosť (Mok, 1994; Mok a Mok, 2001; Rashotte a kol., 2003; Werner a Schmölling, 2009; Mik a kol., 2011). Otázkou ostáva či sú schopné vplývať i na pohyb chloroplastov.

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo:

1. spracovanie prehľadu problematiky vplyvu cytokinínov na zmeny štruktúry a funkcie fotosyntetického aparátu pri senescencii zameraný na porovnanie vplyvu rôznych koncentrácií cytokinínov a svetelných podmienok pri senescencii rastlín.
2. zistenie zmien obsahu chlorofylu (použitím chlorofylmetra SPAD-502) a parametra F_v/F_p (použitím prístroja FluorCam) u oddelených listových segmentov rastlín *Arabidopsis thaliana* inkubovaných v rôznych koncentráciách cytokinínu *meta*-topolínu a za rôznych svetelných podmienok.
3. zistenie zmien v pohybe chloroplastov vyvolanom modrým svetlom pri senescencii indukovanej oddelením listov rôznych rastlinných druhov (tabak virgínsky, jačmeň siaty, *Arabidopsis thaliana*) a otestovanie vplyvu cytokinínu mT na tieto zmeny.
4. na základe získaných výsledkov posúdiť vplyv použitých koncentrácií mT a svetelných podmienok na priebeh senescencie a zhodnotiť vplyv mT na pohyb chloroplastov.

4. MATERIÁL A METÓDY

4.1 Rastlinný materiál

V diplomovej práci boli pre realizáciu experimentov využité tri rôzne rastlinné druhy: *Arabidopsis thaliana* (Arábovka Thalova), jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.) a tabak virgínsky (*Nicotiana tabacum* L.).

4.1.1 *Arabidopsis thaliana*

V experimente boli použité rastliny *Arabidopsis thaliana* rôznych genotypov. Typ WT predstavoval kontrolu. Ďalšie typy boli tri mutanty s receptorovými „knockout-ami“, ktoré mali vyradené dva receptory z funkcie (tzv. „double“ mutanty) *ahk2ahk4*, *ahk3ahk4* a *ahk2ahk3*, ktoré sú v práci označované skráteno ako: *ahk2,4*; *ahk3,4* a *ahk2,3*. Pred výsadbou boli semená (láskavo poskytnuté dr. L. Spíchalom z PŘF UP v Olomouci) namočené v deionizovanej vode po dobu približne 24 hodín a inkubované v ľadničke. Semená boli následne zasiate do pôdy typu Potgrond H (Klasmann-Deilmann, Nemecko) a zaliate deionizovanou vodou. Kvetináče sa umiestnili do fytokomory s nastaveným cyklom 8 hodín svetlo o intenzite $170 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 16 hodín tma, s teplotou $22^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ a relatívnou vlhkosťou vzduchu 60 %. Rastliny boli zalievané približne jedenkrát do týždňa deionizovanou vodou. Po desiatich dňoch od výsadby bol prevedený rozsev rastlín po dve do jedného kvetináča.

Približne po piatich týždňoch od výsadby boli z listov *Arabidopsis* oddeľované kruhové disky o priemere 1,5 cm pomocou dierkovača. Po oddelení boli segmenty adaptované na tmu po dobu 30 min a následne premerané pomocou chlorofylmetra SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan) a FluorCamu (PSI, Drásov, ČR) (tieto hodnoty predstavovali hodnoty pre 0. deň). Disky boli umiestňované do makrotitračných doštičiek so 6 kruhovými jamkami naplnenými postupne 0,5 % roztokom dimetylsulfoxidu (DMSO) a cytokinínu *meta*-topolínu (mT) o koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M rozpustených v 0,5 % DMSO. Vzorky boli rozdelené na jednotlivé varianty nasledovne:

1. varianta TMA (T) - varianta vzoriek umiestnená počas celého experimentu v tme. Prieniku svetla bolo zabránené tak, že doštičky so vzorkami sa umiestnili do nepriehľadnej vaničky, vrch vaničky bol prikrytý alobalom a vanička bola vložená do čierneho hrubého igelitového vreca.

2. varianta NÍZKE SVETLO (NS) - varianta vzoriek umiestnená pod fotosynteticky aktívne žiarenie (PAR) o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.
3. varianta VYSOKÉ SVETLO (VS) - varianta vzoriek pod PAR o intenzite $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

Takto rozdelené vzorky boli umiestnené v rôznych poschodiach (s požadovanou hodnotou PAR) fytokomory Algaetron (PSI, Drásov, ČR) s definovaným cyklom 8 hodín svetlo a 16 hodín tma, s teplotou $22^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ a relatívnou vlhkosťou vzduchu 60 %.

Jednotlivé parametre (obsah Chl a fluorescenčný parameter F_V/F_P) boli nasledovne premeriavané druhý, štvrtý a šiesty deň po oddelení v približne rovnaký čas. Pred každým meraním boli vzorky z režimov NS a VS umiestnené po dobu 30 minút v tme pre dosiahnutie na tmú adaptovaného stavu vzoriek, pri ktorom sú chloroplasty (CP) rovnomerne rozložené v bunkách a kedy na tylakoidnej membráne chloroplastov neprebiehajú fotochemické a biochemické reakcie fotosyntézy.

Pre pohyb chloroplastov boli pre *Arabidopsis thaliana* použité dve varianty (viď 4.2.3 *Pohyb chloroplastov*), pričom v každej boli použité dva roztoky: 0,5 % roztok DMSO ako kontrola a roztok mT o koncentrácii 10^{-4} M. Vzorky boli po oddelení rozdelené ako:

1. varianta T - varianta vzoriek umiestnená počas celého experimentu v tme. Prieniku svetla bolo zabránené tak, že doštičky so vzorkami sa umiestnili do nepriehľadnej vaničky, vrch vaničky bol prikrytý alobalom a vanička bola vložená do čierneho hrubého igelitového vreca.
2. varianta S - varianta vzoriek umiestnená pod PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$

Vzorky boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň (6. d) po oddelení v približne rovnaký čas. Pred každým meraním boli vzorky varianty S umiestnené po dobu 30 minút v tme pre dosiahnutie na tmú adaptovaného stavu vzoriek.

4.1.2 Jačmeň siaty

Semená jačmeňa siateho boli vysiate do perlitu a zaliate Knopovým roztokom. Kvetináče boli následne umiestnené do fytokomory s podmienkami: 16 hodín svetlo o intenzite $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a 8 hodín tma, s teplotou 20°C a relatívnou vlhkosťou vzduchu 50 %. Rastliny boli ďalej zalievané deionizovanou vodou. Po ôsmich dňoch od výsadby

boli pomocou nožničiek odstrihované primárne listy, z ktorých boli následne pomocou skalpela približne 4 cm od listovej špičky odrezávané segmenty. Segmenty boli vložené do mikrotitračných doštičiek bazálnym koncom. Každá doštička obsahovala osem rád s 12 jamkami, pričom v jednotlivých radoch boli umiestnené 0,5 % roztok DMSO a roztok cytokinínu mT (o koncentrácii 10^{-4} M) rozpustený v 0,5 % DMSO. Segmenty boli ďalej rozdelené na varianty:

1. varianta TMA - doštičky so vzorkami boli umiestnené do misky zabalenej alobalom a následne čiernym hrubým vrecom.
2. varianta SVETLO (SV) - vzorky umiestnené pod PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (pestovné PAR).

Takto rozdelené vzorky boli umiestnené vo fytokomore Algaetron (PSI, Brno, ČR) s požadovanou hodnotou PAR a s definovaným cyklom 16 hodín svetlo a 8 hodín tma, teplotou $22^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ a relatívnou vlhkosťou vzduchu 60 %. K experimentu bolo použitých 6 segmentov pre každú variantu. Meranie prebiehalo v 0. deň po oddelení, 3. a 6. deň po oddelení. Pred každým meraním boli vzorky varianty SV umiestnené po dobu 30 minút v tme pre dosiahnutie na tmú adaptovaného stavu vzoriek podobne ako u *Arabidopsis thaliana* (vid' 4.1.1 *Arabidopsis thaliana*).

4.1.3 Tabak virgínsky

U tabaku virgínskeho boli použité dva typy rastlín - wild-type (WT) a transgénná línia 303 (láskavo poskytnutá prof. Brzobohatým z Katedry molekulárnej biológie a rádiobiológie Mendelovy univerzity v Brne; vid' 2.4.2.1 *Transgénne rastliny*). Semená tabaku boli vysiate do pôdy typu Potgrond H a zaliate destilovanou vodou. Rastliny boli pestované vo fytokomore s cyklom 12 hodín svetlo o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a 12 hodín tma, s teplotou 20°C a relatívnou vlhkosťou vzduchu 50 %. Po piatich týždňoch od zasiatia bol premeraný počiatočný stav pohybu CP (0. deň). Po premeraní boli na rastliny línie 303 aplikované roztoky dexamethasonu (DEX) a moku v objeme 50 ml. Mok bol pripravený zmiešaním 0,05 ml 96 % etanolu s 49,95 ml vody z kohútiku a roztok DEX bol pripravený zmiešaním DEX o koncentrácii $20 \mu\text{M}$ s 0,096 % etanolom. Pre ďalšie dni experimentu boli merané miesta vyznačené pomocou špendlíka pripuchnutého do hlíny v blízkosti sledovanej oblasti. Po premeraní boli rastliny utriedené podľa svetelnej varianty nasledovne:

1. varianta TMA (T) - rastliny v kvetináčoch boli umiestnené do väčšej misky a prikryté hrubým čiernym igelitovým vrecom.

- a) WT
 - b) DEX - táto varianta predstavuje rastlinu tabaku línie 303, ktorá bola zaliata roztokom DEX o objeme 50 ml.
2. varianta SVETLO (SV) - rastliny boli počas experimentu umiestnené na rovnakom svetelnom režime ako pri pestovaní.
- a) WT
 - b) 303 - varianta rastliny tabaku línie 303, na ktorú nebol aplikovaný žiadny roztok,
 - c) Mok - varianta rastliny tabaku línie 303 zaliata mokom v objeme 50 ml,
 - d) DEX - varianta rastliny tabaku línie 303 zaliata roztokom DEX o objeme 50 ml.

Meranie prebiehalo v deň pred aplikáciou roztokov (0. deň; 1.10.2013) a v 1., 2. a 3. deň po aplikácii roztokov. Pred každým meraním boli rastliny umiestnené na dobu 30 min v tme podobne ako u *Arabidopsis thaliana* (vid' 4.1.1 *Arabidopsis thaliana*).

4.2 Použité metódy

Experimentálna časť práce zahrňuje dve základné merania - sledovanie koncentračnej a svetelnej závislosti pôsobením mT u oddelených listov *Arabidopsis thaliana* a sledovanie vplyvu CK na zmeny v pohybe chloroplastov u rastlín jačmeňa siateho, *Arabidopsis* a tabaku virgínskeho. V prípade rastlinných druhov *Arabidopsis* a jačmeňa bola navodená senescencia oddelením jednotlivých listových segmentov. U tabaku virgínskeho bolo meranie prevádzané na neoddelených listoch. Stanovovanými parametrami u experimentu sledovania koncentračnej a svetelnej závislosti boli relatívny obsah Chl a parameter F_v/F_p , pohyb chloroplastov bol sledovaný pomocou zmien transmitancie meraných chlorofylmetrom SPAD-502.

4.2.1 Meranie obsahu chlorofylu

Jeden z parametrov charakterizujúcich mieru senescencie bol relatívny obsah Chl. Meranie relatívneho obsahu Chl sa prevádzalo pomocou chlorofylmetra SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan), ktorý nedeštruktívnym spôsobom sníma transmitanciu pri vlnových dĺžkach 650 nm a 940 nm.

Pred každým meraním boli vzorky zo svetelných režimov (u *Arabidopsis* varianta NS, VS; u jačmeňa SV a u tabaku všetky varianty SV) umiestnené po dobu 30 minút v tme pre elimináciu vplyvu pohybu CP na hodnoty transmitancie (vid' 2.3 *Pohyb*

chloroplastov). Meranie bolo prevádzané vždy z adaxiálnej strany listu. U jačmeňa siateho boli snímané hodnoty približne zo stredu 4 cm segmentu. U tabaku virgínskeho boli hodnoty merané vždy na rovnakom liste v približne rovnakom mieste.

Hodnoty obdržané chlorofylmetrom boli prevedené pomocou kalibračnej rovnice na hodnoty obsahu Chl v $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (vid' 4.2.4 Kalibračná krivka pre chlorofylmeter SPAD-502 pre rastlinný druh *Arabidopsis thaliana*).

4.2.2 Meranie parametra F_V/F_P

Parameter F_V/F_P bol sledovaný pomocou prístroja FluorCam 700 MF (PSI, Drásov, ČR). Tento fluorescenčný zobrazovací systém (poskytuje 2D zobrazovanie) umožňuje sledovanie fluorescencie z celej plochy listu. Priebeh meranie bol definovaný nahraním požadovaného meracieho protokolu s nasledovnými parametrami: senzitivita 50 %; relatívna intenzita saturačného pulzu (*superirradiance*) 100 % (čo odpovedalo ožiarenosti $2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v mieste vzorku).

Vyhodnocovaný bol parameter F_V/F_P , ktorý vyjadruje maximálny kvantový výťažok fotochémie PSII (Krause a Weis, 1991) a poskytuje informácie o funkčnom stave PSII. Pomer F_V/F_P je definovaný vzťahom:

$$F_V/F_P = (F_P - F_0)/F_P,$$

kde F_0 predstavuje hodnotu minimálnej fluorescencie, F_V hodnotu variabilnej fluorescencie a F_P predstavuje maximálnu intenzitu fluorescencie Chl meranú použitým prístrojom.

Pred meraním boli vzorky vyfotografované a zo svetelných režimov NS a VS umiestnené po dobu 30 minút v tme. Vzorky *Arabidopsis* boli poskladané na doštičku s navlhčenou buničinou a boli zoradené po šesticich do štyroch riadkov podľa použitých koncentrácií mT (prvý riadok DMSO, druhý mT o koncentrácii 10^{-5} M, tretí mT o koncentrácii 10^{-4} M a štvrtý mT o koncentrácii $3\cdot 10^{-4}$ M). Meranie prebiehalo v tme pri slabom zelenom svetle a pri pokojovej teplote a po jeho prebehnutí boli vzorky vrátené späť do makrotitračných doštičiek a do určeného svetelného režimu.

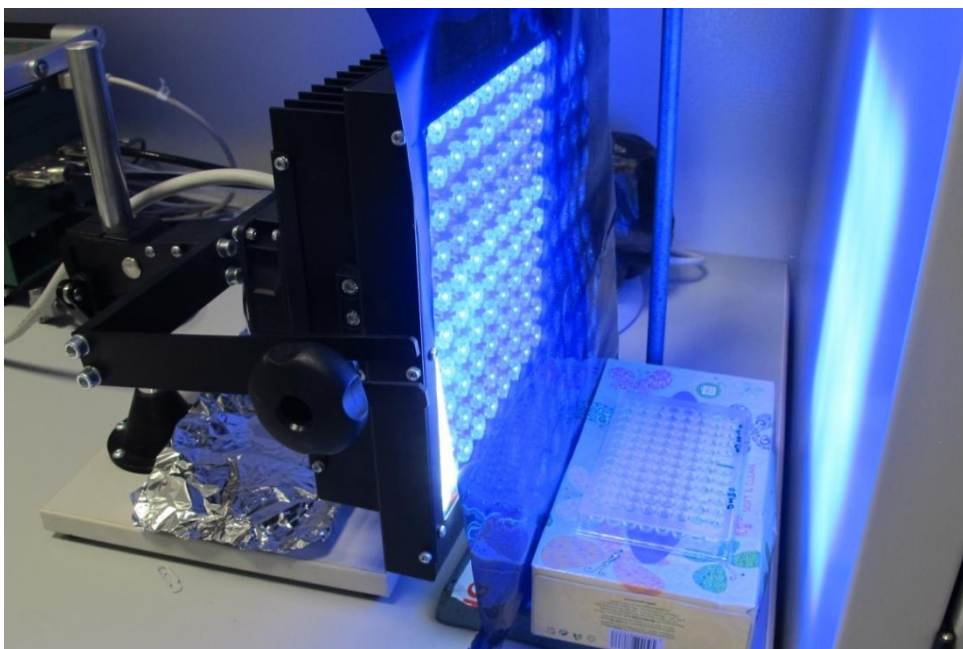
4.2.3 Pohyb chloroplastov

Pre experiment zameraný na sledovanie pohybu chloroplastov bola využitá aparátúra (Obr. 7), ktorá pozostávala z LED panelu, zdroja pre LED panel, modrej fólie pripevnenej na paneli, ktorá tak poskytovala modré svetelné žiarenie o vlnovej dĺžke približne 450 - 480 nm. LED panel bol umiestňovaný tak, aby žiarenie dopadalo kolmo

na segmenty, resp. listy. Svetlom indukovaný pohyb CP bol meraný pomocou zmien transmitancie, ktoré sa sledovali pomocou chlorofylmetra SPAD-502.

V experimente boli využité 3 typy rastlín: *Arabidopsis thaliana*, jačmeň siaty a tabak virgínsky. U jačmeňa siateho a *Arabidopsis* boli premeriavané oddelené listové segmenty, ktoré boli usporiadané v (mikro)titračných doštičkách s príslušnými roztokmi. U tabaku boli premeriavané vybrané miesta na neoddelených listoch.

Pred meraním boli vzorky *Arabidopsis* varianty NS a VS a jačmeňa varianty SV adaptované na tmu po dobu 30 min. Pre meranie boli vzorky *Arabidopsis* preložené na doštičku s navlhčenou buničinou a vzorky jačmeňa boli ukladané do mikrotitračných doštičiek, ktorých jamky obsahovali deionizovanú vodu. U tabaku virgínskeho bola na tmu adaptovaná (po dobu 30 min; varianta SV) celá rastlina.



Obr. 7: Spôsob usporiadania aparatury pre sledovanie indukovaného pohybu CP pre rastlinný druh jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.).

Po 30 min adaptácii na tmu boli segmenty/listy premerané pomocou chlorofylmetra SPAD-502 (tieto hodnoty predstavovali počiatočnú hodnotu v čase 0 min). Následne boli segmenty v mikrotitračných doštičkách, resp. kvetináče s rastlinami vložené pod LED panel. Meranie bolo prevádzané po dobu 80 minút pri pokojovej teplote. Tento časový interval bol rozdelený na dva 40 minútové intervaly. V prvom časovom úseku boli listové segmenty vystavené svetelnému žiareniu o intenzite približne $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a po dobu ďalších 40 minút žiareniu o intenzite približne $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Odpočítavanie hodnôt SPAD pomocou chlorofylmetra

bolo prevádzané u *Arabidopsis thaliana* každých 20 minút, u jačmeňa a tabaku každých 5 minút.

Vzorky *Arabidopsis* a jačmeňa boli na konci merania vrátené do pôvodných doštičiek a všetky vyššie spomenuté rastlinné druhy boli po meraní vložené do určených svetelných režimov.

4.2.4 Kalibračná krivka pre chlorofylmeter SPAD-502 pre rastlinný druh *Arabidopsis thaliana*

V diplomovej práci sa obsah Chl stanovoval prostredníctvom chlorofylmetra SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan). Meranie týmto prístrojom je založené na snímaní transmitancie pri vlnových dĺžkach 650 nm a 940 nm. Displej však ukazuje hodnoty M v relatívnych SPAD jednotkách. Keďže hodnoty obsahu Chl zistené prístrojom sú iba relatívne bolo potrebné zistiť skutočné obsahy. Reálne hodnoty boli získané prevedením kalibrácie chlorofylmetra, ktorá bola uskutočnená na *Arabidopsis thaliana* genotypu WT. Výsledkom je kalibračná krivka uvedená na Obr. 35 a získaná kalibračná rovnica má tvar:

$$y = (-0,001) \cdot x^3 + 0,056 \cdot x^2 - 0,068 \cdot x + 2,704$$

kde premenná „x” predstavuje hodnoty namerané pomocou chlorofylmetra a premenná „y” predstavuje hodnoty koncentrácie Chl (a+b) v jednotkách $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$. Postup kalibrácie bol nasledovný:

Vybrané listové segmenty boli (po 30 min adaptácii na tmu) premerané pomocou chlorofylmetra. Meranie bolo pre vybranú oblasť listu prevedené 5 krát a pre hodnoty bol vypočítaný medián. Následne boli z vybraných listových segmentov vyrezané kruhové disky pomocou dierkovača o priemere 1,2 cm. Ďalej bola prevedená extrakcia pigmentov v 80 % acetóne. Vzorky boli vložené do vychladenej trecej misky s prídavkom malého množstva MgCO_3 a 80 % acetónu. Homogenát bol následne odstredený pomocou centrifúgy Sigma 3-30KS (SIGMA Laborzentrifugen, Nemecko) pri 4000 g po dobu 5 min a teplote 10°C. Po odstredení boli zmerané absorbancie supernatantu pomocou spektrofotometra Unicam UV550 (ThermoSpectronic, Veľká Británia) pre vlnové dĺžky 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm. Ak bol supernatant veľmi koncentrovaný, bol nariedený 80 % acetónom tak, aby absorbancia pre vlnovú dĺžku 663,2 nm dosahovala hodnoty v intervale 0,4 - 0,8. Po získaní hodnôt absorbancie bol vypočítaný celkový obsah Chl *a* a *b* v extrakte pomocou vzťahu Lichtenthalera (1987):

$$\text{Chl (a+b)} = 7,15 \cdot [A(663,2) - A(750)] + 18,71 \cdot [A(646,8) - A(750)],$$

kde $A(663,2)$, $A(750)$, $A(646,8)$ predstavujú hodnoty absorbcie pre jednotlivé vlnové dĺžky 663,2 nm, 750 nm a 646,8 nm. Hodnoty celkového obsahu Chl boli vzťahované na plochu segmentov a vyjadrené v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

4.3 Štatistická analýza dát

Vyhodnotenie dát bolo prevádzané pomocou programu Microsoft Excel a Origin (verzia 8.5, OriginLab Corporation, USA). Štatistická analýza bola spracovaná pomocou metódy analýzy rozptylu ANOVA, ktorá umožňovala overiť štatisticky významné rozdiely dát. Bola použitá jednofaktorová ANOVA, v ktorej boli vyhodnotené testy Tukeyho, Scheffeho a Bonferroniho.

5. VÝSLEDKY

V prevedených experimentoch boli použité rastlinné materiály a metódy opísané v kapitole 4. Materiál a metódy.

5.1 Experiment I

V prvom experimente sme použili ako rastlinný materiál *Arabidopsis thaliana* v štyroch rôznych genotypoch (WT, *ahk2,4*; *ahk3,4*; *ahk2,3*). Senescencia bola u *Arabidopsis* vyvolaná oddelením listových segmentov a jej priebeh sa určoval prostredníctvom merania obsahu Chl a parametra F_V/F_P , ktorý odráža funkciu fotosystému II a tým stav FS aparátu. Relatívny obsah Chl bol meraný pomocou chlorofylmetra SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko). Tento obsah bol následne prevedený pomocou kalibračnej rovnice na skutočný obsah Chl vyjadrený v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Parameter F_V/F_P bol meraný pomocou systému FluorCam 700 MF (PSI, Drásov, ČR). Parametre boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v druhý deň (2. d), v štvrtý deň (4. d) a v šiesty deň po oddelení (6. d).

Pre štúdium kombinovaného účinku PAR a CK na hodnoty sledovaných parametrov boli vzorky inkubované v troch svetelných režimoch a v troch rôznych koncentráciách roztoku mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3\cdot 10^{-4}$ M). Kontrolným roztokom bol vo všetkých prípadoch 0,5 % roztok DMSO.

Boli použité nasledujúce svetelné režimy: T - vzorky v tme, NS - vzorky na svetle o nižšej intenzite ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a VS - vzorky na svetle o vyššej intenzite ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Pre štúdium účinku CK na pohyb chloroplastov boli u každého genotypu zmerané zmeny hodnoty SPAD odrážajúce zmeny transmitancie vyvolané pôsobením modrého svetla o vysokej a nízkej intenzite. V prípade sledovania zmien v pohybu chloroplastov boli použité listové segmenty inkubované v tme (T) a na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v 0,5 % DMSO a 10^{-4} M.

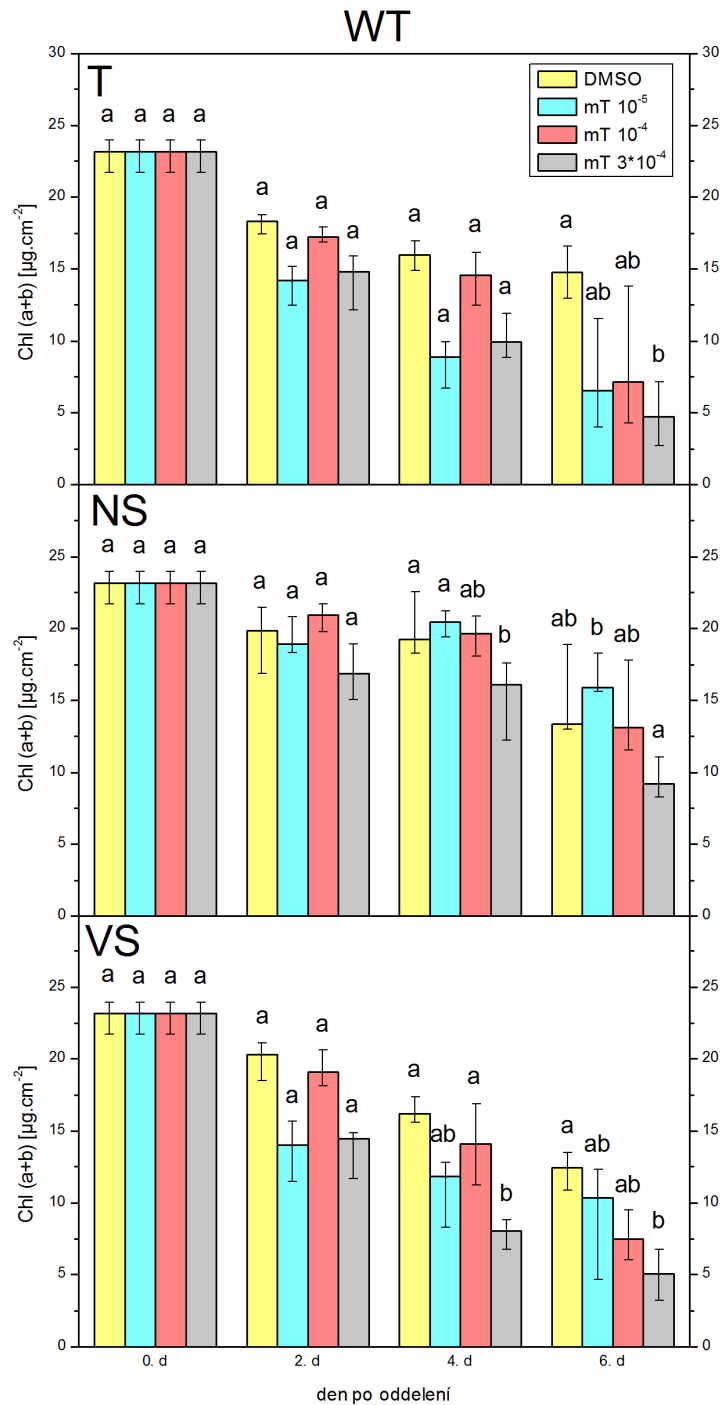
5.1.1 Genotyp WT

Pre vzorky *Arabidopsis thaliana* varianty WT, ktoré boli umiestnené v tme (T) v kontrolnom roztoku (DMSO) došlo k poklesu obsahu Chl (Obr. 8) v čase (s nárastom počtu dní po oddelení). Hodnoty obsahu Chl poklesli z pôvodnej hodnoty $23,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ na hodnotu $14,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, čo predstavuje pokles o približne 37 %. V tme roztok mT nespomalil pokles obsahu Chl ani v jednom termíne ani v jednej z použitých koncentrácií oproti kontrolnému roztoku, naopak bola pozorovaná tendencia urýchlenia

poklesu tohto parametra. Najvýraznejšie poklesnutie bolo dosiahnuté pre roztok mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M, ktorého pokles bol štatisticky významný oproti kontrolnému roztoku v 6. d po oddelení, kedy došlo k poklesu obsahu Chl z hodnoty $23,1 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 0. d na hodnotu $4,7 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, čo predstavuje pokles o približne 80 %.

Na svetelnom režime NS pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku došlo tiež k poklesu obsahu Chl (Obr. 8) v čase. Hodnoty obsahu Chl poklesli z pôvodnej hodnoty $23,1 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ na hodnotu $13,3 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení, čo predstavuje pokles o približne 43 %. V kombinácii svetelného režimu NS a roztoku mT došlo k miernejšiemu poklesu obsahu Chl oproti T a u nižších koncentrácií bola zaznamenaná tendencia spomalenia poklesu obsahu Chl oproti kontrolným vzorkám (pre 10^{-4} M v 2. d, pre 10^{-5} M a 10^{-4} M v 4. d po oddelení a pre 10^{-4} M v 6. d).

Hodnota obsahu Chl u vzoriek umiestnených v režime VS a inkubovaných v kontrolnom roztoku poklesla z hodnoty $23,1 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 0. d na hodnotu $12,5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení (Obr. 8), čo predstavuje pokles asi o 47 %. Obdobne ako u vzoriek varianty T roztok mT nespomalil pokles obsahu Chl ani v jednom termíne ani v jednej z použitých koncentrácií oproti kontrolnému roztoku. Naopak, pre roztok mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M bola nameraná štatisticky významne nižšia hodnota obsahu Chl oproti kontrolnému roztoku v 4. d po oddelení (pokles z pôvodnej hodnoty približne o 80 %) a v 6. d po oddelení (pokles o 71 %) (Obr. 8).

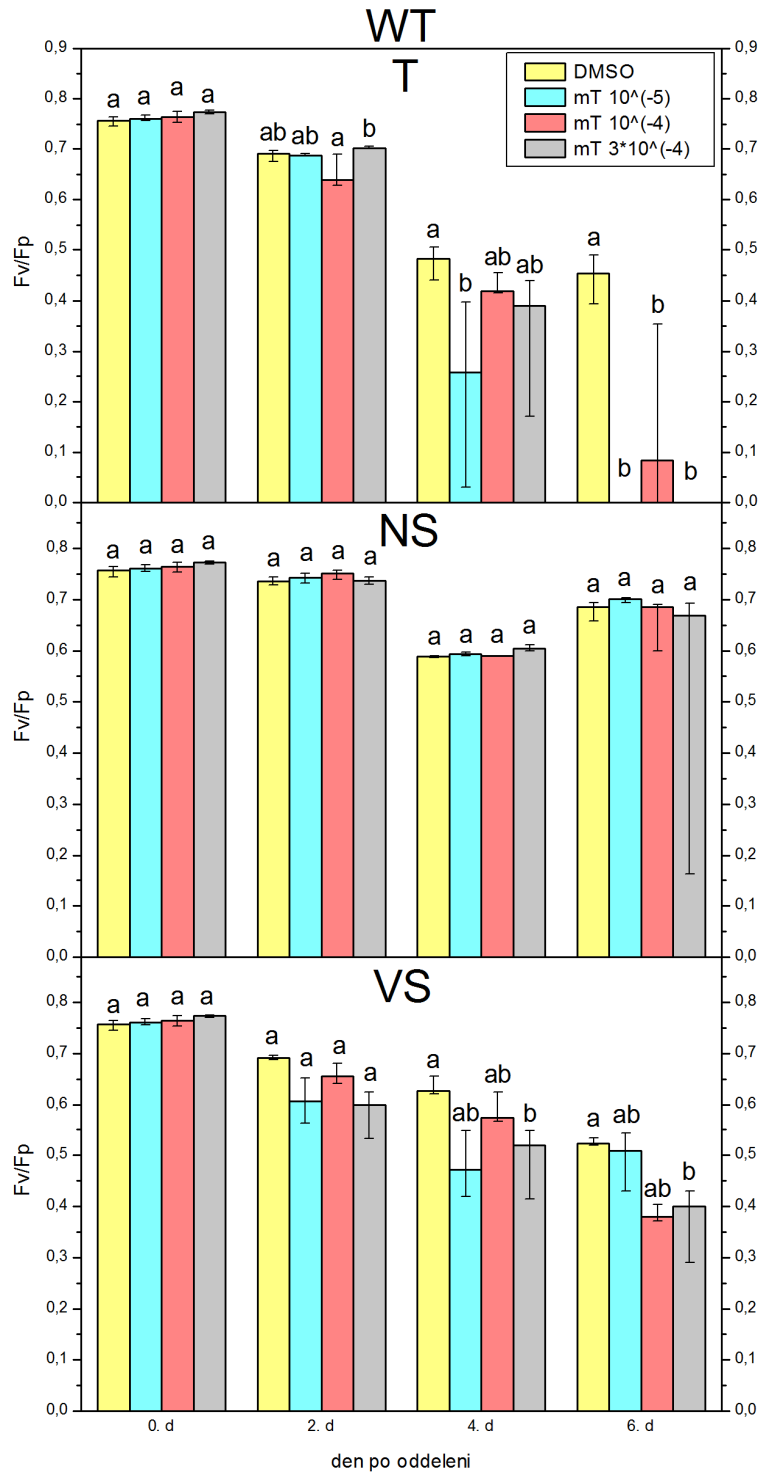


Obr. 8: Zmeny obsahu Chl počas indukovanej senescencie v tme (T), na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NS) a na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (VS) u diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu WT. Disky boli inkubované v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3\cdot 10^{-4}$ M. Na ose y sú vyjadrené koncentrácie Chl (a+b) vztiahnuté na plochu segmentu a vyjadrené v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Disky boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v druhý deň (2. d), štvrtý (4. d) a v šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=6$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť v danom termíne.

U parametra F_V/F_P (maximálny fotochemický kvantový výťažok PSII - Krause a Weis, 1991) pre vzorky *Arabidopsis* typu WT umiestnené v tme (T) v roztoku DMSO došlo k jeho poklesu (Obr. 9) s nárastom doby po oddelení. Hodnota F_V/F_P poklesla z 0,756 v 0. d na hodnotu 0,454 v 6. d po oddelení, teda o približne 40 %. V tomto svetelnom režime roztok mT nespomalil pokles hodnoty F_V/F_P oproti kontrolnému roztoku, naopak pre roztok mT v koncentrácii 10^{-5} M v 4. a v 6. d po oddelení a v koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M v 6. d po oddelení bola hodnota F_V/F_P preukazne nižšia oproti vzorkám v DMSO.

Vo svetelnom režime NS pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku došlo k výraznému spomaleniu poklesu parametra F_V/F_P oproti vzorkám umiestneným v tme (T) (Obr. 9), čo je hlavne vidieť v 6. d po oddelení, kedy bola hodnota F_V/F_P 0,686, čo oproti hodnote v 0. d predstavuje pokles približne o 10 %. U všetkých roztokov sa pomer F_V/F_P udržal v rozpätí hodnôt 0,668 - 0,701 i na 6. d po oddelení (Obr. 9). Preukazný účinok mT na hodnoty parametra F_V/F_P nebol zaznamenaný.

U vzoriek umiestnených na svetelnom režime VS v kontrolnom roztoku došlo k podobnému poklesu hodnoty F_V/F_P ako u vzoriek inkubovaných v tme (Obr. 9) z hodnoty 0,756 v 0. d po oddelení na hodnotu 0,524 v 6. d po oddelení, čo percentuálne predstavuje 31 % pokles. V kombinácii tohto svetelného režimu a roztokov mT je vidieť prejav negatívneho účinku mT, a to pre koncentráciu $3 \cdot 10^{-4}$ M, kde došlo k urýchleniu poklesu F_V/F_P oproti kontrolnému roztoku v 4. a 6. d po oddelení (celkovo tento pokles predstavoval do 6. d po oddelení úbytok približne o 47 %). V ostatných prípadoch nebol efekt mT štatisticky významný.

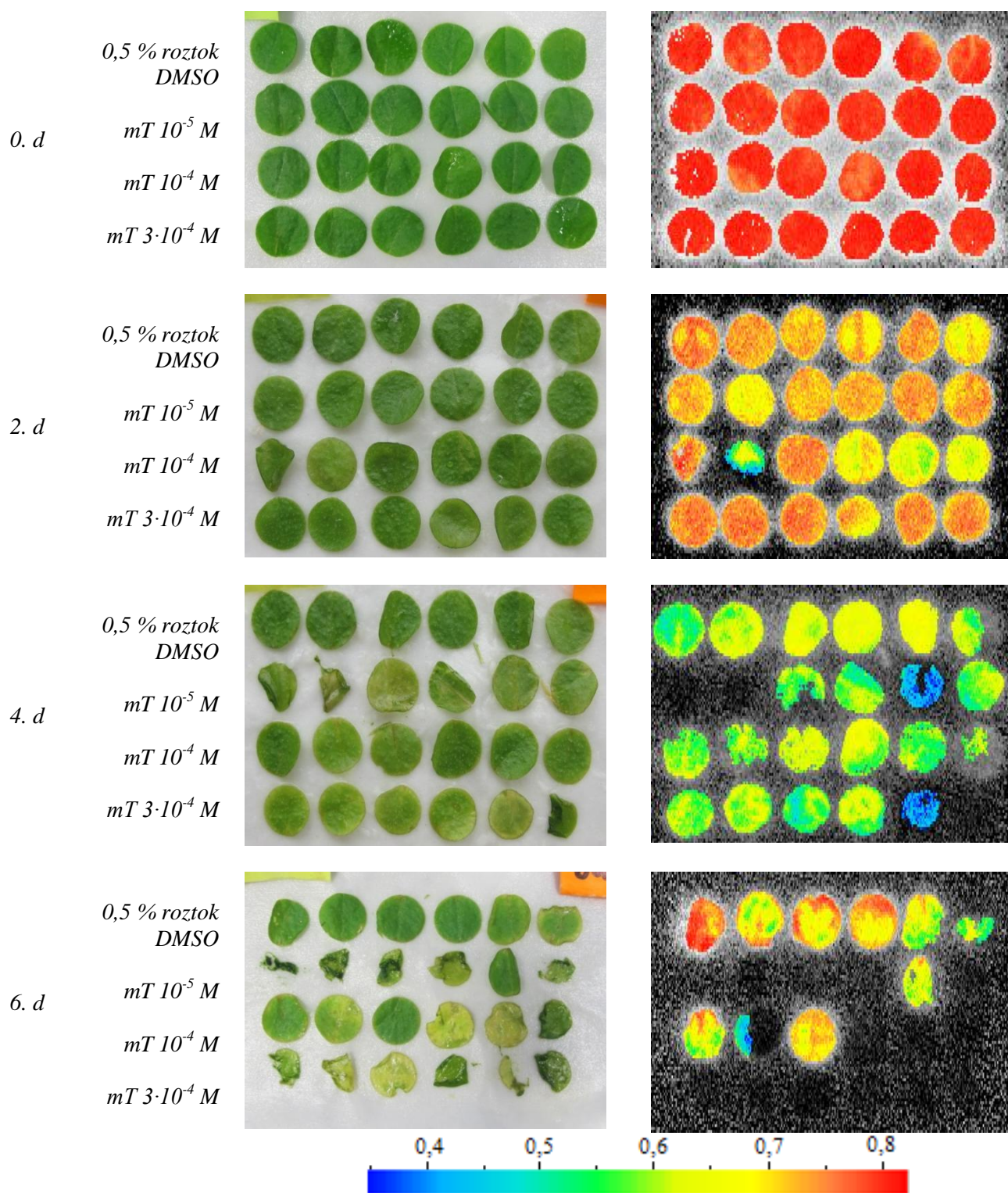


Obr. 9: Zmeny parametra F_v/F_p počas indukovanej senescencie listových diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu WT inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO a roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri troch svetelných režimoch: T – tma, NS – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, VS – PAR o intenzite $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedené sú mediány a kvartily, $n = 12$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant v danom termíne.

Zmeny parametra F_V/F_P v ploche oddelených listov v čase (s nárastom doby po oddelení) sú vyobrazené pre jednotlivé svetelné varianty na Obr. 10 - 12.

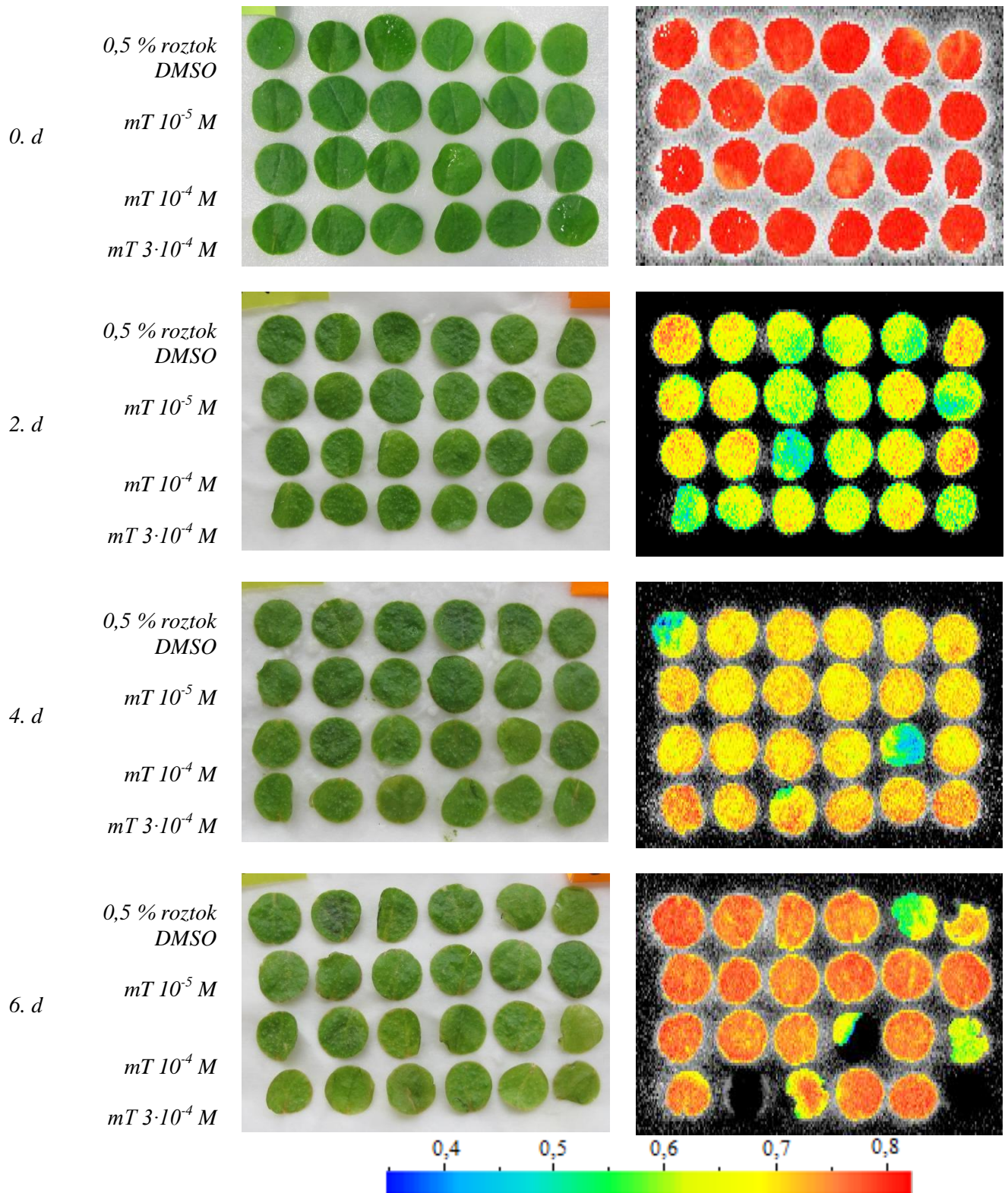
Napr. z Obr. 10 je vidieť postupný pokles parametra F_V/F_P v čase, a to najmä u segmentov inkubovaných v tme v roztoku mT v koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M, čo je i v súlade s Obr. 9. Kombinácia tohto svetelného režimu a vyššej koncentrácie mT mala teda negatívny účinok na pokles parametra F_V/F_P - to je najviac viditeľné v 6. d po oddelení. U vzoriek režime NS je zaznamenaný mierny nárast hodnôt z 4. na 6. d po oddelení. Vzorky bol pravdepodobne z nám neznámeho dôvodu stresované, čo sa prejavilo nižšími hodnotami F_V/F_P v 4. d. Na Obr. 10 je ďalej viditeľný nárast obsahu antokyanov u segmentov inkubovaných v DMSO v 6. d po oddelení. Nárast obsahu antokyanov je zrejмый zo zvýšenej pigmentácie listov, ktoré ofialovali.

Arabidopsis thaliana WT - TMA



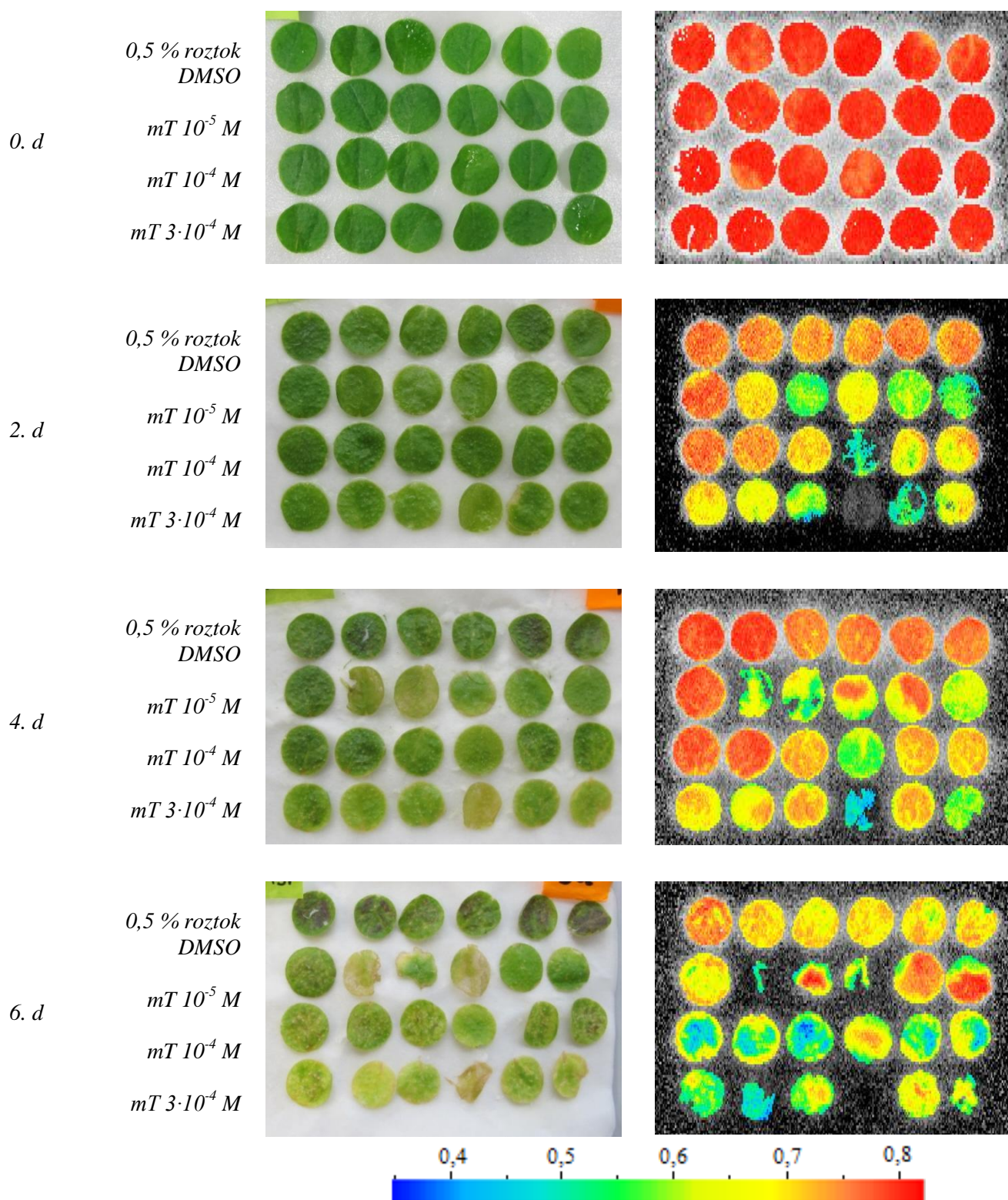
Obr. 10: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu WT varianty T (umiestnené v tme počas celého experimentu) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana WT - NS



Obr. 11: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu WT varianty NS (umiestnené na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana WT - VS

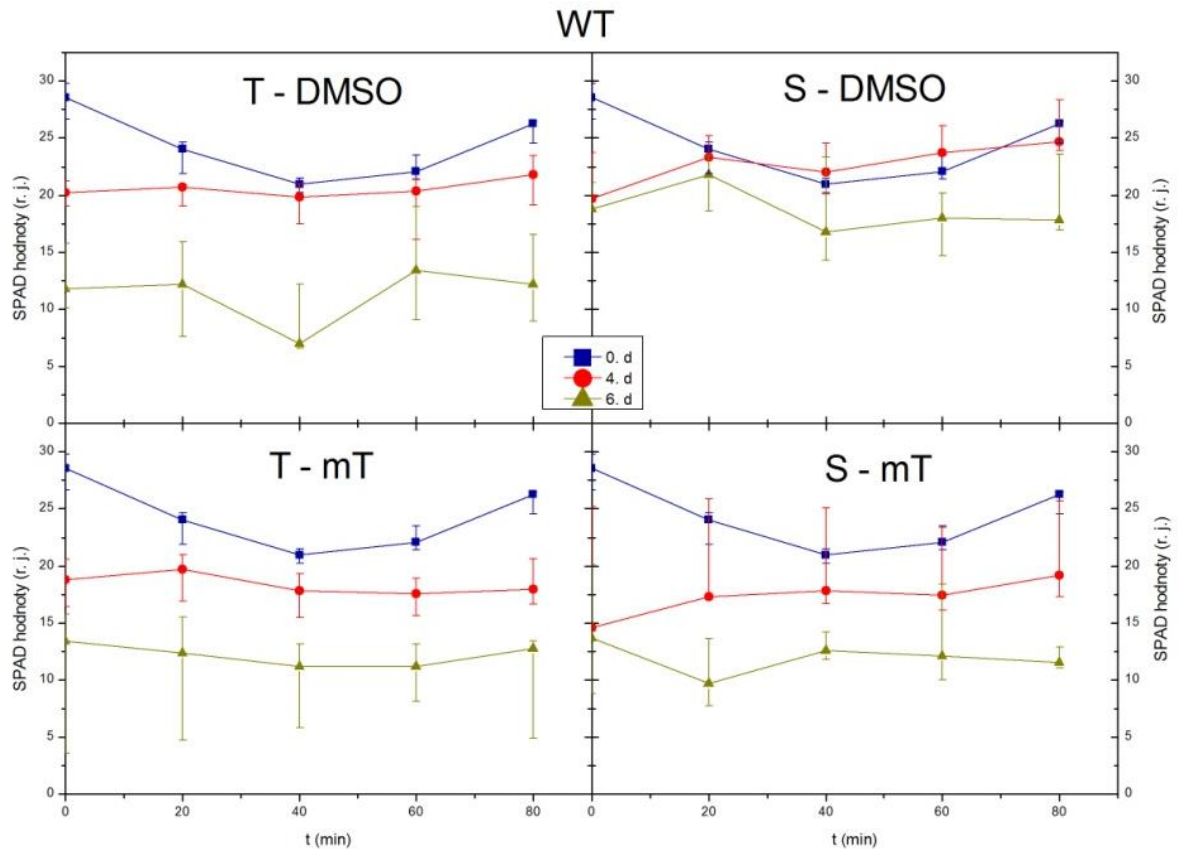


Obr. 12: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu WT varianty VS (umiestnené na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M). Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Na Obr. 13 sú vyobrazené zmeny hodnôt SPAD počas pôsobenia modrého svetla. Tieto zmeny sú spôsobené zmenami transmitancie vyvolanými pohybom chloroplastov. Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla boli v 0. d po oddelení podobné u všetkých variant. U vzoriek *Arabidopsis* typu WT mali tieto zmeny „klasický“ priebeh, tzn., že v priebehu prvých 40 min, kedy boli vzorky vystavené modrému svetlu o vyššej intenzite ($190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) došlo k poklesu hodnôt SPAD v dôsledku reakcie CP „vyhnutie sa“ a nárastu transmitancie, a v priebehu ďalších 40 min, kedy sa aplikuje modré svetlo nižšej intenzity ($8-12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) došlo k nárastu hodnoty SPAD v čase v dôsledku „akumulácie“ CP a poklesu transmitancie.

U vzoriek *Arabidopsis* typu WT umiestnených v tme a inkubovaných v DMSO (T - DMSO) boli inhibované oba typy pohybu CP. Na 6. deň po oddelení sa spomalil pohyb „vyhnutie sa“, následne po aplikácii svetla o nižšej intenzite došlo k akumuláčnemu pohybu CP. U vzoriek inkubovaných v tme v roztoku mT (T- mT; Obr. 13) bol 4. d pohyb CP inhibovaný podobne ako u vzoriek T-DMSO, minimálny pohyb CP bol zaznamenaný i 6. d po oddelení.

U vzoriek inkubovaných na svetle v roztoku DMSO (S - DMSO; Obr. 13) došlo v 4. d po oddelení po zapnutí silného modrého svetla k miernemu nárastu hodnoty SPAD, čo odráža skôr akumuláčny typ pohybu CP. Podobný nárast po prvých 20 min pôsobenia silného modrého svetla nastal i 6. d po oddelení, pričom nasledoval mierny pokles hodnôt SPAD.



Obr. 13: Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla u listových *Arabidopsis thaliana* genotypu WT. Segmenty boli prvých 40 min osvetľované modrým svetlom o intenzite $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následne po dobu ďalších 40 min modrým svetlom o intenzite $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli po oddelení inkubované v 0,5 % roztoku DMSO a v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M a ponechané na dvoch svetelných režimoch: T – tma, S – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=5 - 6$.

U vzoriek varianty S v mT bol inhibovaný pohyb CP „vyhnutie sa“, dochádzalo k veľmi miernemu nárastu hodnôt SPAD počas pôsobenia silného i slabého modrého svetla, avšak meranie bolo zaťažené veľkou chybou. V 6. d po oddelení došlo po prvých 20 min svetla o vyššej intenzite k poklesu hodnoty SPAD a následne k spätnému nárastu (Obr. 13).

5.1.2 Genotyp *ahk2,4*

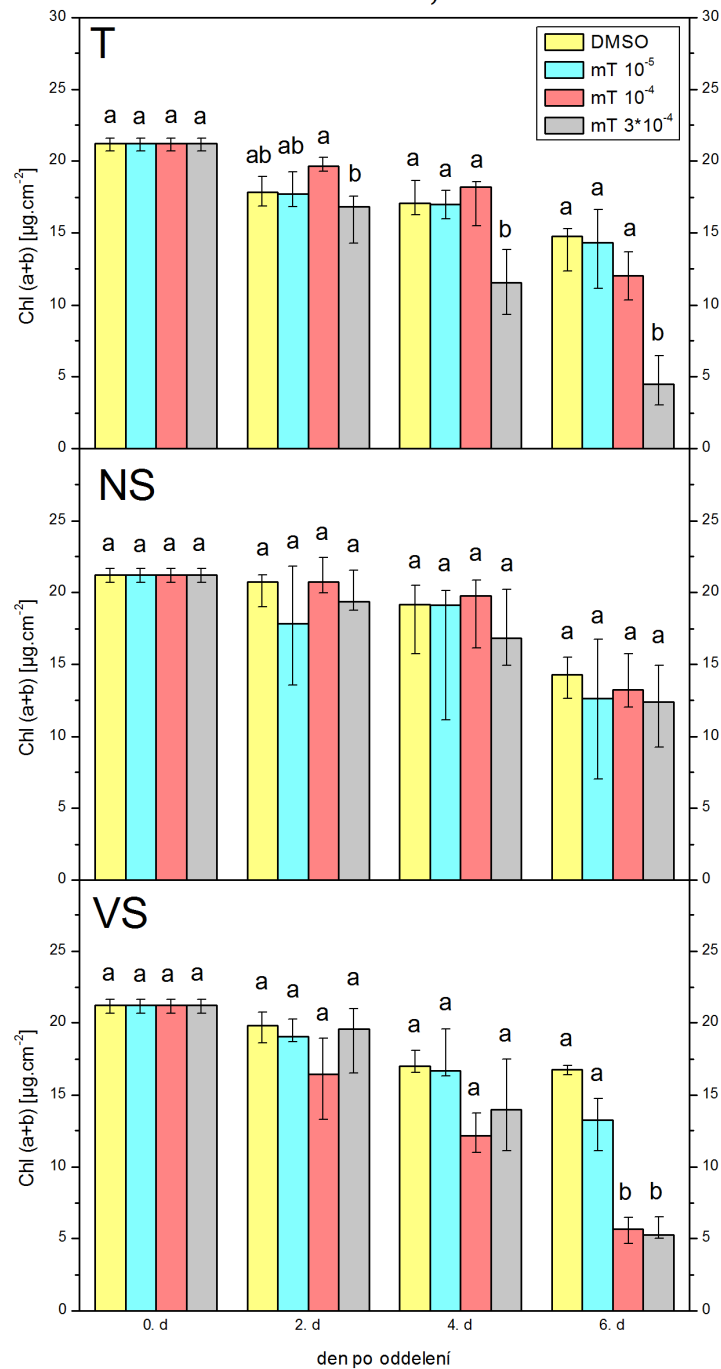
Na Obr. 14 sú vyobrazené zmeny obsahu Chl u listových segmentov *Arabidopsis thaliana* typu *ahk2,4*. Pre vzorky umiestnené v tme (T) v kontrolnom roztoku dochádzalo s nárastom doby po oddelení k miernemu poklesu hodnoty obsahu Chl. Táto hodnota poklesla z $21,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 0. d na $14,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení, čo

predstavuje pokles o približne 31 %. Mierne pozitívny účinok roztoku mT bol zaznamenaný pre koncentráciu 10^{-4} M v 2. a 4. d po oddelení, kedy došlo k miernemu spomaleniu poklesu obsahu Chl oproti kontrolnému roztoku, avšak tento účinok nie je štatisticky preukázateľný. Naopak negatívny účinok roztoku mT bol zaznamenaný pre koncentráciu $3 \cdot 10^{-4}$ M, u ktorej boli hodnoty obsahu Chl oproti kontrolnému roztoku preukazne nižšie v 4. a 6. d po oddelení. U tejto koncentrácie došlo k poklesu obsahu Chl na hodnotu $11,6 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 4. d po oddelení a na hodnotu $4,5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 6. d. Celkovo tento pokles percentuálne tvoril približne 79 % do 6. d po oddelení.

Pre vzorky varianty NS inkubované v kontrolnom roztoku dochádzalo k približne podobnému poklesu hodnoty obsahu Chl ako u varianty T, približne o 33 % počas 6 dní po oddelení. Výraznejší účinok (negatívny/pozitívny) na pokles obsahu Chl u roztoku mT oproti kontrolnému roztoku nebol zaznamenaný ani pre jednu použitú koncentráciu a nevyskytujú sa tu ani štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými roztokmi (Obr. 14).

U vzoriek varianty VS inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo k mierne pomalšiemu poklesu hodnoty obsahu Chl oproti variante T i NS. Hodnota obsahu Chl tu počas 6 dní po oddelení poklesla o približne 21 %. Pre vzorky inkubované v roztoku mT o koncentracii 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M bol zaznamenaný preukazný negatívny účinok na obsah Chl v 6. d po oddelení, hodnoty oproti východzej hodnote (0. d) poklesli o 73 % resp. 75 %.

ahk 2,4

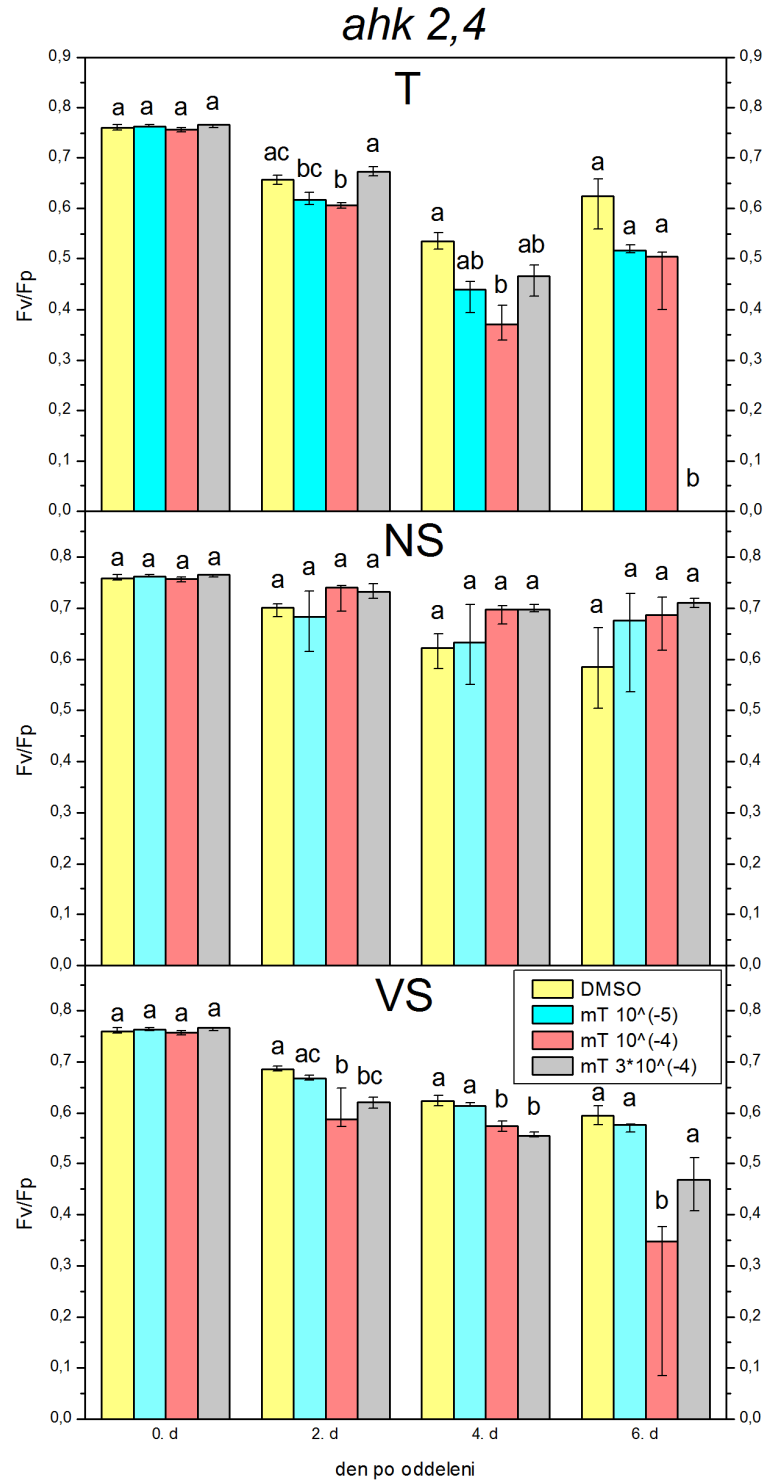


Obr.14: Zmeny obsahu Chl počas indukovanej senescencie v tme (T), na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NS) a na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (VS) u diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,4*. Disky boli inkubované v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3\cdot 10^{-4}$ M. Na ose y sú vyjadrené koncentrácie Chl (a+b) vziahanuté na plochu segmentu a vyjadrené v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Disky boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v druhý deň (2. d), štvrtý (4. d) a v šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=6$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant v danom termíne.

Zmeny parametra F_V/F_P u vzoriek *Arabidopsis* typu *ahk2,4* sú vyobrazené na Obr.15. Pre vzorky umiestnené v tme (T) v kontrolnom roztoku došlo k poklesu hodnoty parametra do 4. d po oddelení. Zo 4. d na 6. d je však zaznamenané zlepšenie, v podobe nárastu hodnoty F_V/F_P z hodnoty 0,535 v 4. d na hodnotu 0,625 v 6.d po oddelení. Celkovo došlo v tomto roztoku k poklesu hodnoty parametra z hodnoty 0,759 v 0. d na hodnotu 0,625 v 6. d po oddelení, čo predstavuje pokles o 18 %. V tomto svetelnom režime roztok mT spomalil pokles hodnoty F_V/F_P oproti kontrolnému roztoku len v 2. d po oddelení v koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M, toto spomalenie však nebolo preukazné. V 6. d po oddelení sa účinok tejto koncentrácie dokonca zmenil na opačný a došlo k výraznému poklesu hodnoty F_V/F_P oproti kontrolného roztoku. Negatívny účinok roztoku mT na pokles hodnoty parametra F_V/F_P bol pozorovaný i pre koncentráciu 10^{-4} M a to v 2. a v 4. d po oddelení (Obr. 15).

Vo svetelnom režime NS pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku došlo po oddelení k mierne rýchlejšiemu poklesu parametra F_V/F_P oproti vzorkám umiestneným v tme (T) (Obr. 15). Hodnota parametra F_V/F_P tu poklesla z pôvodnej hodnoty 0,759 v 0. d na hodnotu 0,586 v 6. d po oddelení, teda približne o 23 %. U vzoriek inkubovaných v roztoku mT bola zaznamenaná tendencia spomalenia poklesu hodnoty parametra F_V/F_P oproti kontrolnému roztoku. Pozitívny účinok je vidieť hlavne pre koncentrácie 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M v 2. a 4. d po oddelení a pre všetky tri použité koncentrácie v 6. d po oddelení. Avšak tento účinok mT nebol štatisticky významný.

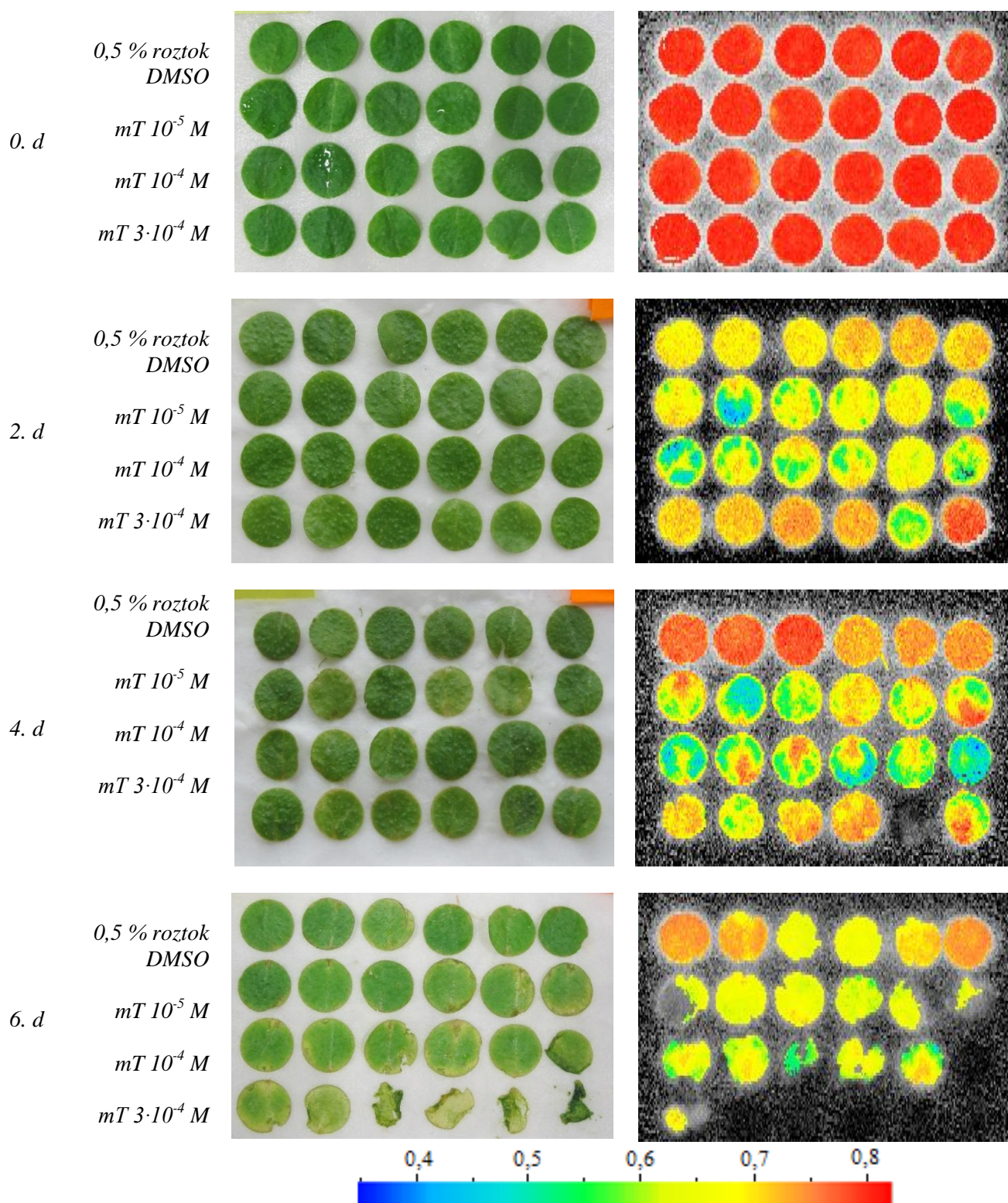
U vzoriek inkubovaných na svetelnom režime VS v kontrolnom roztoku (Obr. 15) došlo tiež k poklesu F_V/F_P . Hodnota poklesla z pôvodnej hodnoty 0,759 v 0. d na hodnotu 0,595 v 6. d po oddelení, čo percentuálne predstavuje pokles približne o 21 %. Tento pokles sa javí mierne rýchlejší než pre vzorky inkubované v T, ale pomalší než pre vzorky inkubované na režime NS. V kombinácii VS a roztoku mT došlo k prejavu negatívneho účinku na urýchlenie poklesu F_V/F_P oproti kontrolnému roztoku u koncentrácii 10^{-4} M v 2., 4. i 6. d po oddelení. Hodnota F_V/F_P tu poklesla z počiatočnej hodnoty 0,758 v 0. d na hodnotu 0,345 v 6. d po oddelení, čo percentuálne predstavuje pokles o 54 %. Preukazný negatívny účinok bol zaznamenaný i pre koncentráciu $3 \cdot 10^{-4}$ M v 2. a 4. d.



Obr. 15: Zmeny parametra F_v/F_p počas indukovanej senescencie listových diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,4* inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO a roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri troch svetelných režimoch: T – tma, NS – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, VS – PAR o intenzite $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedené sú mediány a kvartily, $n = 12$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant v danom termíne.

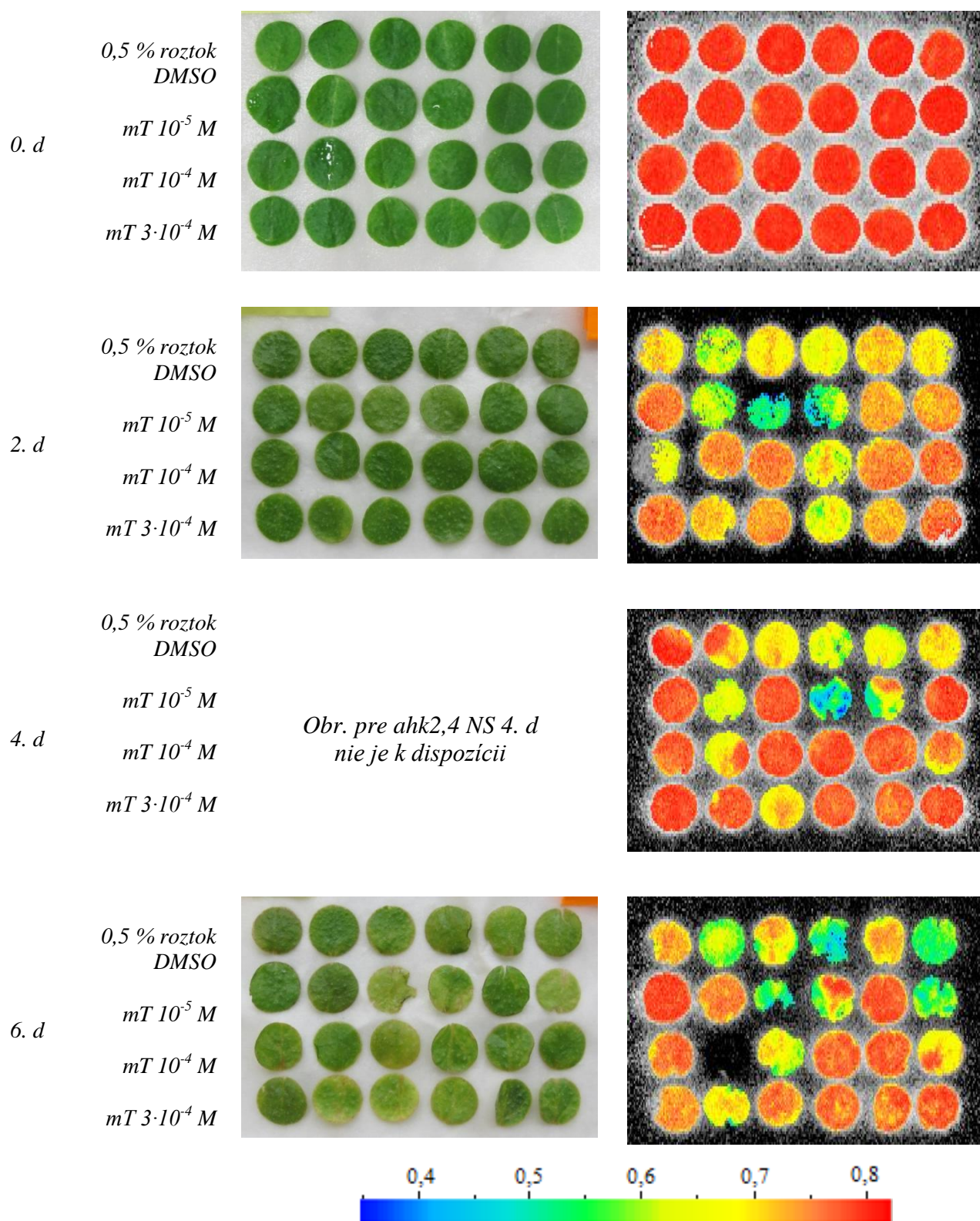
Zmeny parametra F_V/F_P v ploche oddelených listov v čase (s nárastom doby po oddelení) sú vyobrazené pre jednotlivé svetelné varianty na Obr. 16 - 18, z ktorých je viditeľný postupný pokles tohto parametra počas jednotlivých dní. Najvýraznejší pokles oproti kontrolnému roztoku zaznamenaný pre vzorky inkubované v roztoku mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M varianty T v 6. d po oddelení a pre vzorky inkubované v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M varianty VS v 6. d po oddelení (Obr. 15), bol v súlade s plošnými zmenami parametra F_V/F_P zistenými pomocou FluorCamu (Obr. 16 a Obr. 18). Z Obr. 18 (VS) je tiež vidieť zvýšený obsah antokyanov v 4. a 6. d po oddelení, 6. d najviac u vzoriek inkubovaných v DMSO.

Arabidopsis thaliana ahk2,4 - T



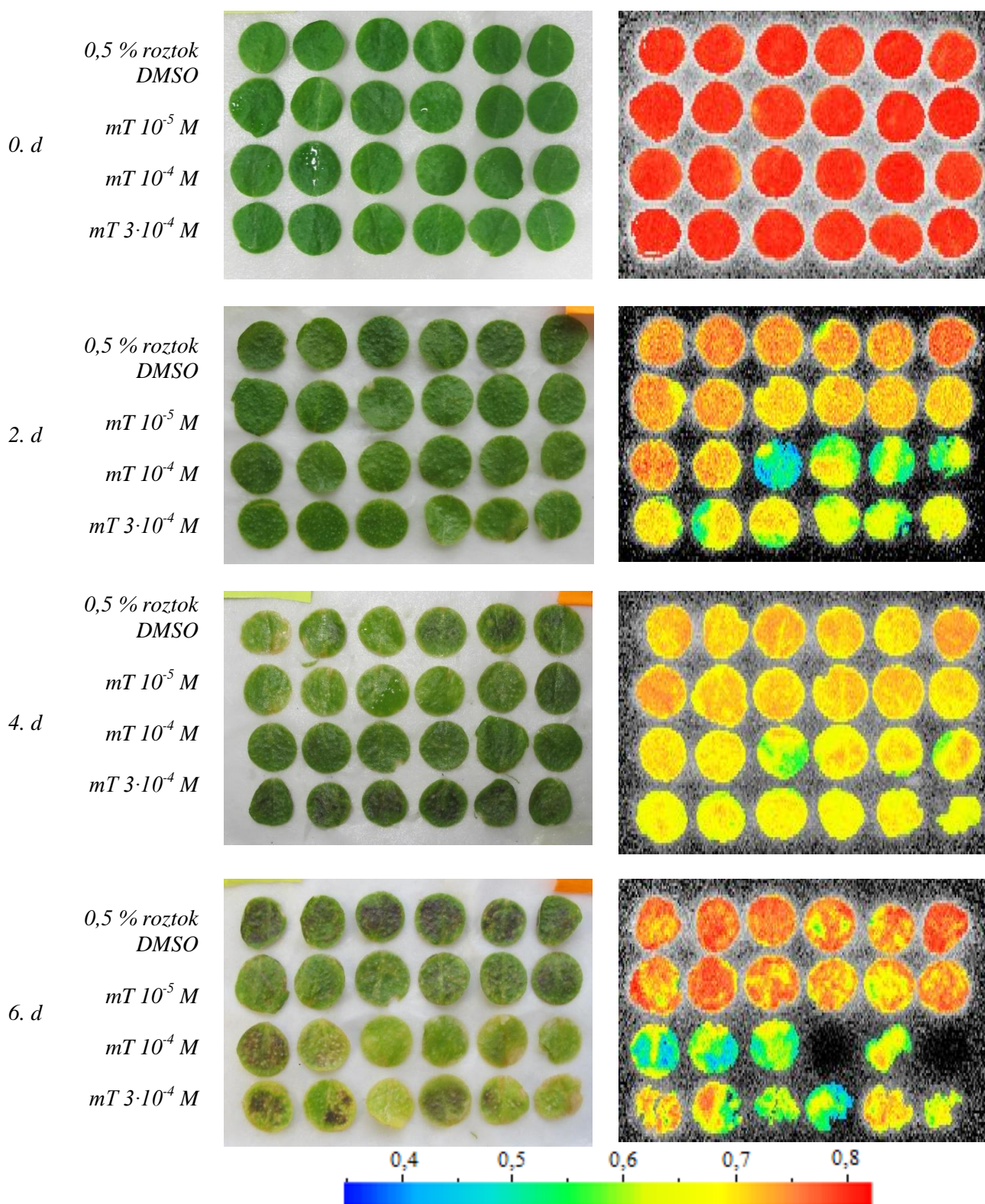
Obr. 16: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,4* varianty *T* (umiestnené v tme počas celého experimentu) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok *mT* v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana ahk2,4 - NS



Obr. 17: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,4* varianty NS (umiestnené na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok *mT* v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana ahk2,4 - VS



Obr. 18: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu ahk2,4 varianty VS (umiestnené na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

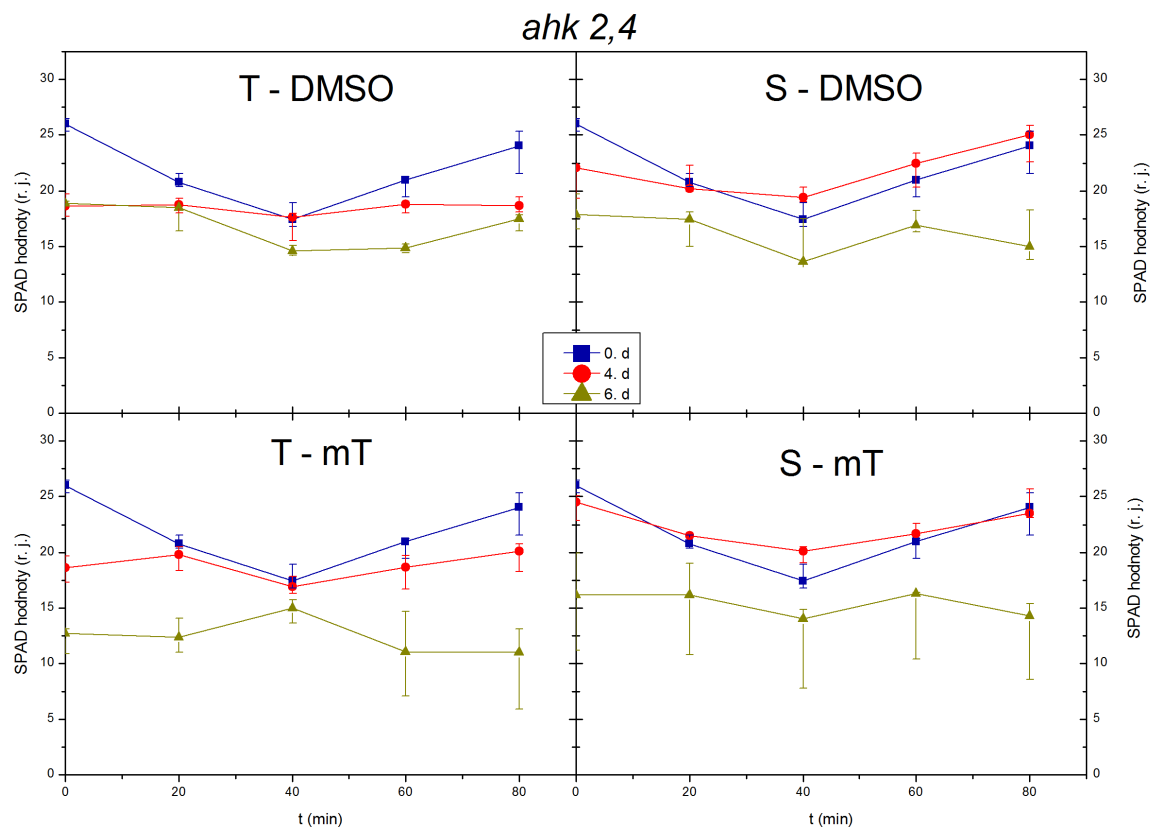
Zmeny hodnôt SPAD počas pôsobenia modrého svetla pre genotyp *ahk2,4* sú vyobrazené na Obr. 19. Tieto zmeny sú spôsobené zmenami transmitancie vyvolanými pohybom chloroplastov. Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla boli v 0. d po oddelení podobné u všetkých variant.

Podobne ako u vzoriek *Arabidopsis* typu WT (Obr. 13) mali tieto zmeny „klasický“ priebeh (vid' 5.1.1 Genotyp WT). U vzoriek inkubovaných v DMSO a umiestnených v tme (T - DMSO) boli inhibované oba typy pohybu CP. V 6. d po oddelení sa spomalil pohyb „vyhnutie sa“. Následne po aplikácii svetla o nižšej intenzite bol pozorovaný akumulčný pohyb CP.

U vzoriek inkubovaných v tme v roztoku mT (T - mT; Obr. 19) bol zaznamenaný „klasický“ priebeh krivky i v 4. d po oddelení oproti vzorkám v kontrolnom roztoku (T -DMSO). V 6. deň po oddelení dochádzalo po zapnutí svetla o vyššej intenzite k miernemu nárastu hodnoty SPAD, čo skôr odráža akumulčný typ pohybu CP. Následne po zapnutí svetla o nižšej intenzite dochádzalo naopak k miernemu poklesu hodnoty SPAD, čo naopak odráža typ pohybu „vyhnutie sa“.

U vzoriek *ahk2,4* umiestnených na svetle a inkubovaných v roztoku DMSO (S - DMSO; Obr. 19) boli v 4. d zaznamenané stále výrazné zmeny v hodnotách SPAD oproti vzorkám v T. Na 6. d po oddelení sa spomalil pohyb „vyhnutie sa“. Po zapnutí svetla o nižšej intenzite následne došlo k akumulčnému pohybu CP.

U vzoriek inkubovaných na svetle v roztoku mT (S - mT) došlo k veľmi podobným zmenám v hodnotách SPAD v jednotlivých dňoch po oddelení ako u vzoriek inkubovaných v DMSO.



Obr. 19: Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla u listových segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,4*. Segmenty boli prvých 40 min osvetľované modrým svetlom o intenzite $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následne po dobu ďalších 40 min modrým svetlom o intenzite $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli po oddelení inkubované v 0,5 % roztoku DMSO a v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M a ponechané na dvoch svetelných režimoch: T – tma, S – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=5 - 6$.

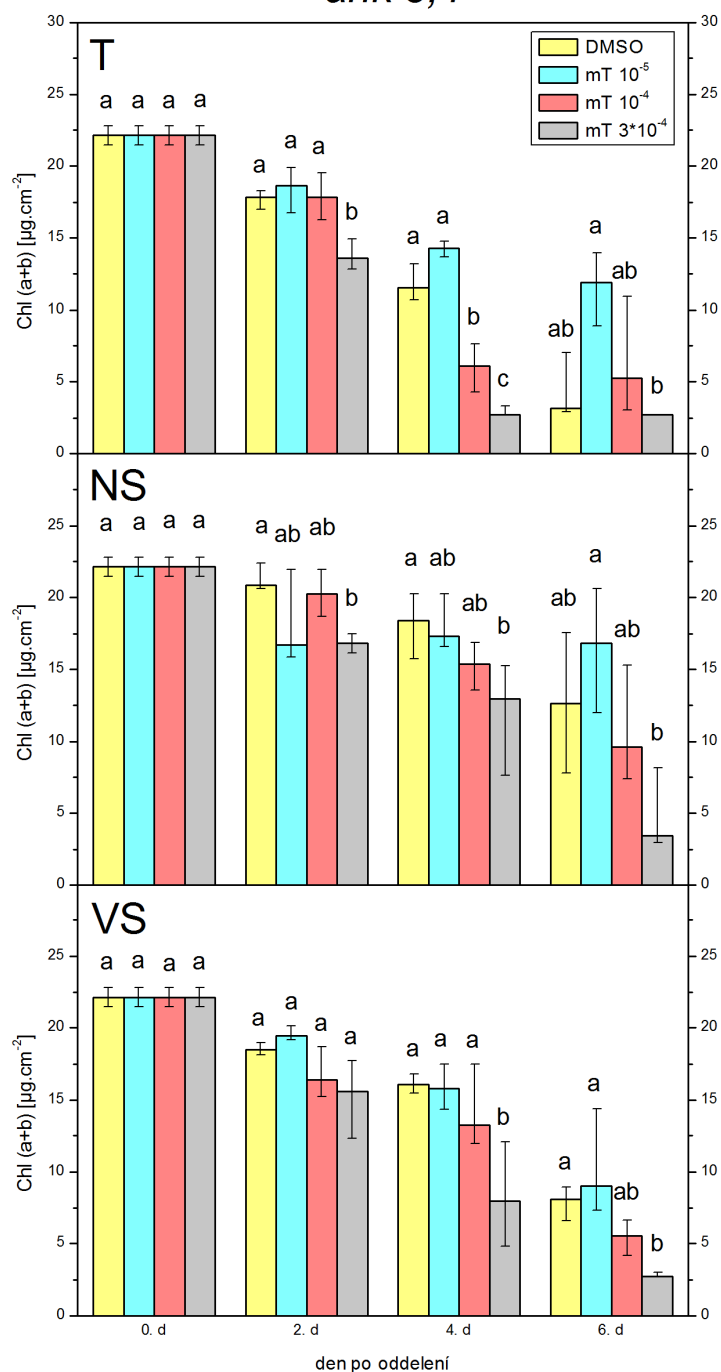
5.1.3 Genotyp *ahk 3,4*

Zmeny obsahu Chl pre vzorky *Arabidopsis thaliana* varianty *ahk3,4* sú vyobrazené na Obr. 20. U vzoriek inkubovaných v tme (T) v kontrolnom roztoku dochádzalo k rýchlemu poklesu hodnoty obsahu Chl, ktorá poklesla z počiatočnej hodnoty $22,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 0. d na hodnotu $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení. Percentuálne tento pokles predstavuje úbytok o takmer 86 %. U mT sa prejavil pozitívny účinok na spomalení poklesu obsahu Chl oproti kontrolnému roztoku u koncentrácii 10^{-5} M, tento účinok však nie je štatisticky významný. Naopak preukazný negatívny účinok mT je viditeľný u koncentrácii 10^{-4} M v 4. d po oddelení a u koncentrácii $3\cdot 10^{-4}$ M v 2. a v 4. d po oddelení, kedy došlo k urýchleniu poklesu obsahu Chl oproti kontrolnému roztoku.

Na svetelnom režime NS u vzoriek inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo po oddelení k výrazne pomalšiemu poklesu obsahu Chl oproti vzorkám v T. Hodnota obsahu Chl tu poklesla z pôvodnej hodnoty $22,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 0. d na hodnotu $12,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení, tento pokles predstavoval percentuálne približne 43 %. Pre vzorky inkubované v roztoku mT bol zaznamenaný opäť nepreukazný pozitívny účinok pre koncentráciu 10^{-5} M, tentoraz v 6. d po oddelení. Negatívny účinok roztoku mT sa prejavil u koncentrácie $3\cdot 10^{-4}$ M, kedy bol obsah Chl preukazne nižší ako u DMSO 2., 4. a 6. d po oddelení.

U vzoriek varianty VS inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo k rýchlejšiemu poklesu obsahu Chl oproti variante NS, avšak k mierne pomalšiemu oproti variante T (Obr. 20). Hodnota obsahu Chl poklesla počas 6. dní po oddelení približne o 63 %. U vzoriek inkubovaných v mT došlo k najvýraznejšiemu poklesu obsahu Chl pre koncentráciu $3\cdot 10^{-4}$ M, kedy došlo k poklesu o približne 88 %.

ahk 3,4

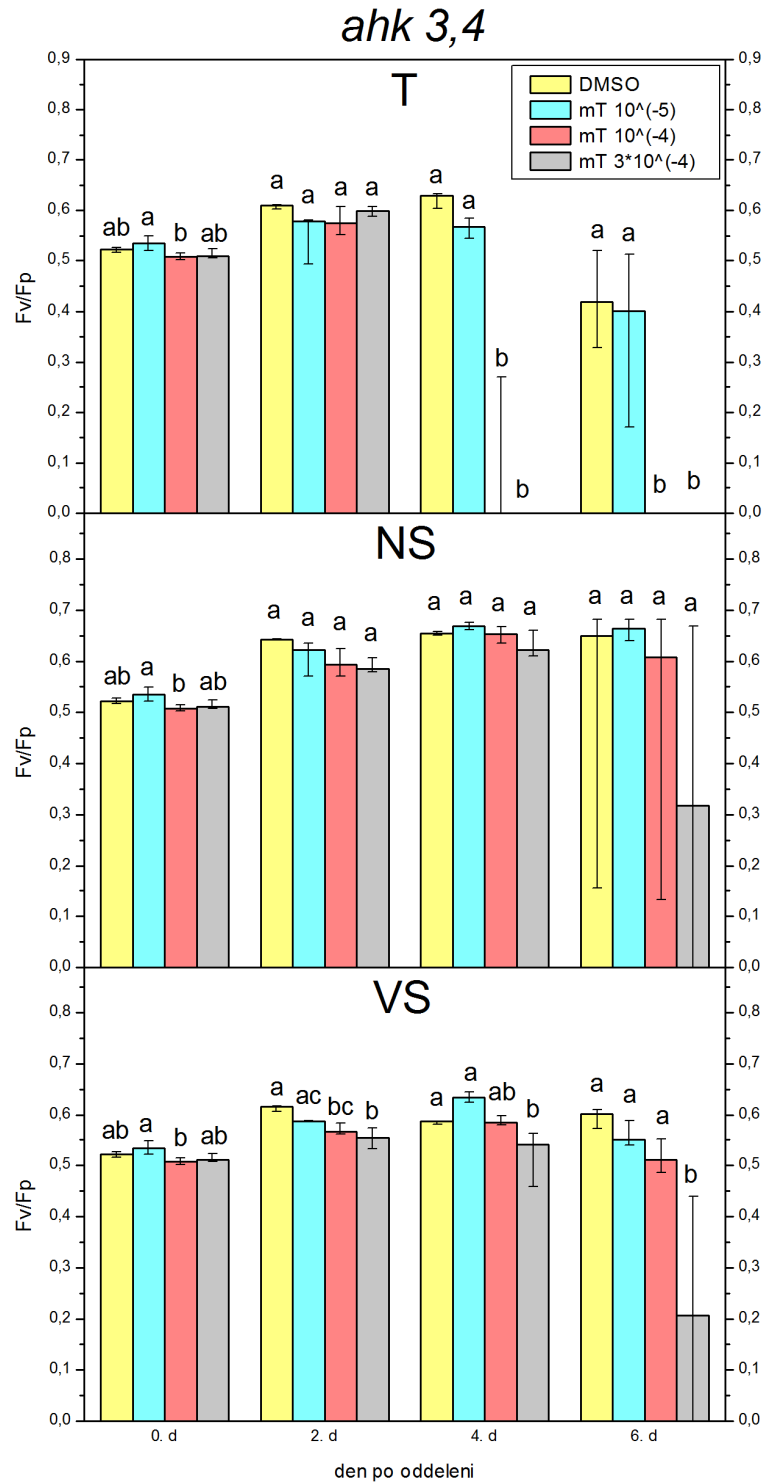


Obr. 20: Zmeny obsahu Chl počas indukovanej senescencie v tme (T), na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NS) a na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (VS) u diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk3,4*. Disky boli inkubované v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3\cdot 10^{-4}$ M. Na ose y sú vyjadrené koncentrácie Chl (a+b) vztiahnuté na plochu segmentu a vyjadrené v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Disky boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v druhý deň (2. d), štvrtý (4. d) a v šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=6$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant v danom termíne.

Zmeny F_V/F_P pre vzorky *Arabidopsis* typu *ahk3,4* sú vyobrazené na Obr. 21. U vzoriek umiestnených v tme (T) v kontrolnom roztoku došlo k nárastu hodnoty parametra F_V/F_P do 4. d po oddelení a následne zo 4. na 6. d k jej poklesu. Celkovo medzi 0. d a 6. d po oddelení došlo k poklesu hodnoty parametra z pôvodnej hodnoty 0,522 v 0. d na hodnotu 0,419 v 6. d, čo percentuálne predstavuje pokles o približne 20 %. V 4. a 6. po oddelení došlo u vzoriek v mT o koncentracii 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M k výraznému zhoršeniu štruktúry a väčšina z nich nebola merateľná - hodnoty sa pre tieto vzorky brali ako nulové. Z toho dôvodu je u vzoriek zaznamenaný výrazný pokles F_V/F_P pre tieto koncentrácie oproti kontrolnému roztoku.

U vzoriek varianty NS inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo podobne ako u vzoriek v tme k nárastu hodnôt F_V/F_P v čase, avšak tento nárast pokračoval až do 6. d po oddelení. Do 6. dňa tento nárast predstavoval približne 25 %. U vzoriek mT boli zmeny v hodnotách F_V/F_P veľmi podobné ako u DMSO. Nižšia hodnota bola pozorovaná len v 6. d po oddelení pre koncentráciu $3 \cdot 10^{-4}$ M, avšak rozdiel vzhľadom k vzorkám v DMSO nebol štatisticky významný, zrejme kvôli veľkému rozptylu hodnôt (Obr. 21).

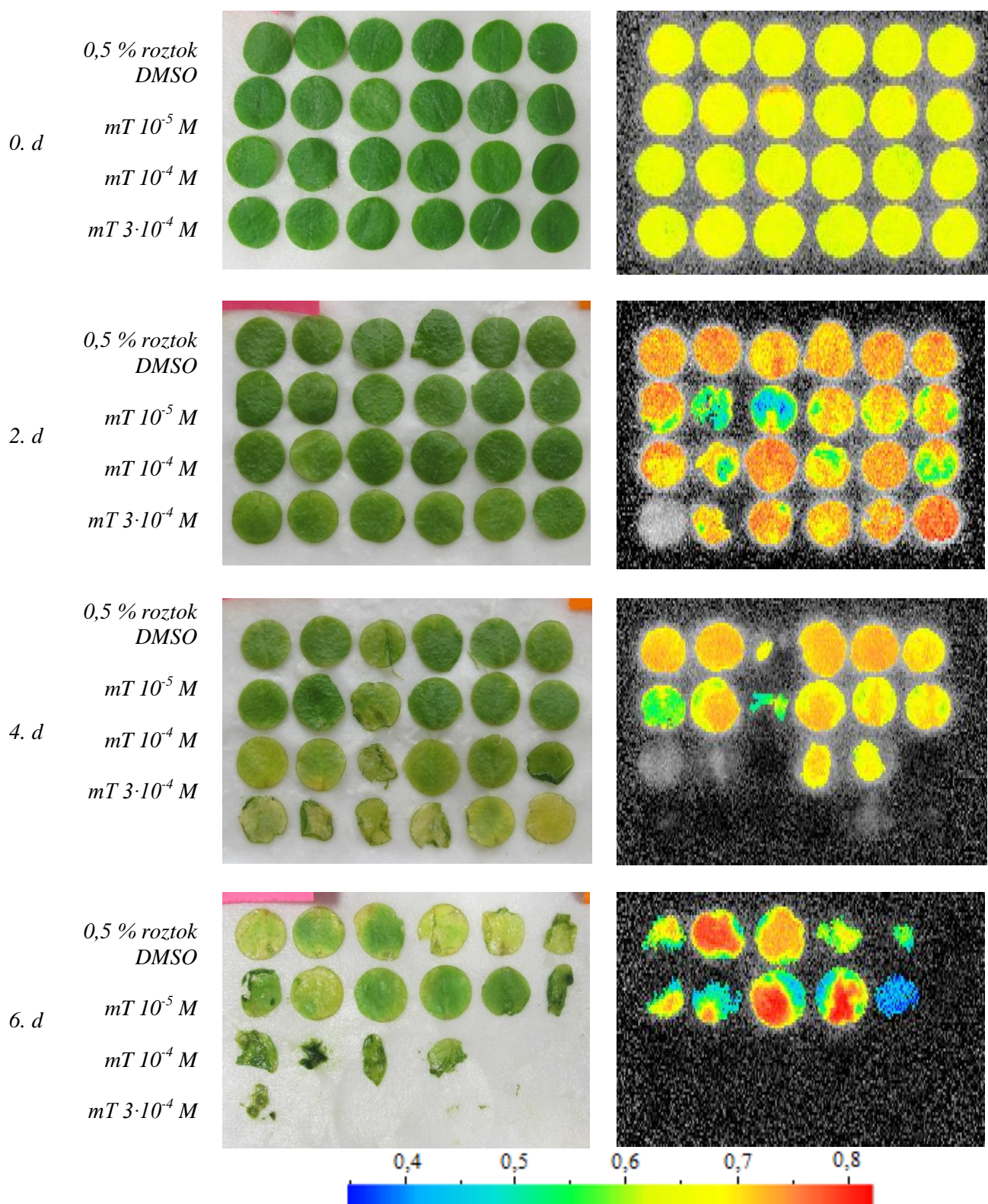
Pre vzorky varianty VS umiestnené v kontrolnom roztoku došlo do 6. po oddelení tiež k miernemu nárastu hodnoty parametra F_V/F_P . Celkovo nárast predstavoval 16 %. U vzoriek v mT došlo k nepreukaznému pozitívnemu účinku u koncentracie 10^{-5} M v 4. d po oddelení. Ďalej u koncentracie 10^{-4} M došlo k negatívneho účinku na F_V/F_P v 2. a 4. d a u koncentracie $3 \cdot 10^{-4}$ M v 2., 4. i v 6. d po oddelení. Celkovo F_V/F_P pokleslo u vzoriek v $3 \cdot 10^{-4}$ M mT o približne 61 %.



Obr. 21: Zmeny parametra F_v/F_p počas indukovanej senescencie listových diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk3,4* inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO a roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri troch svetelných režimoch: T – tma, NS – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, VS – PAR o intenzite $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedené sú mediány a kvartily, $n = 12$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant v danom termíne.

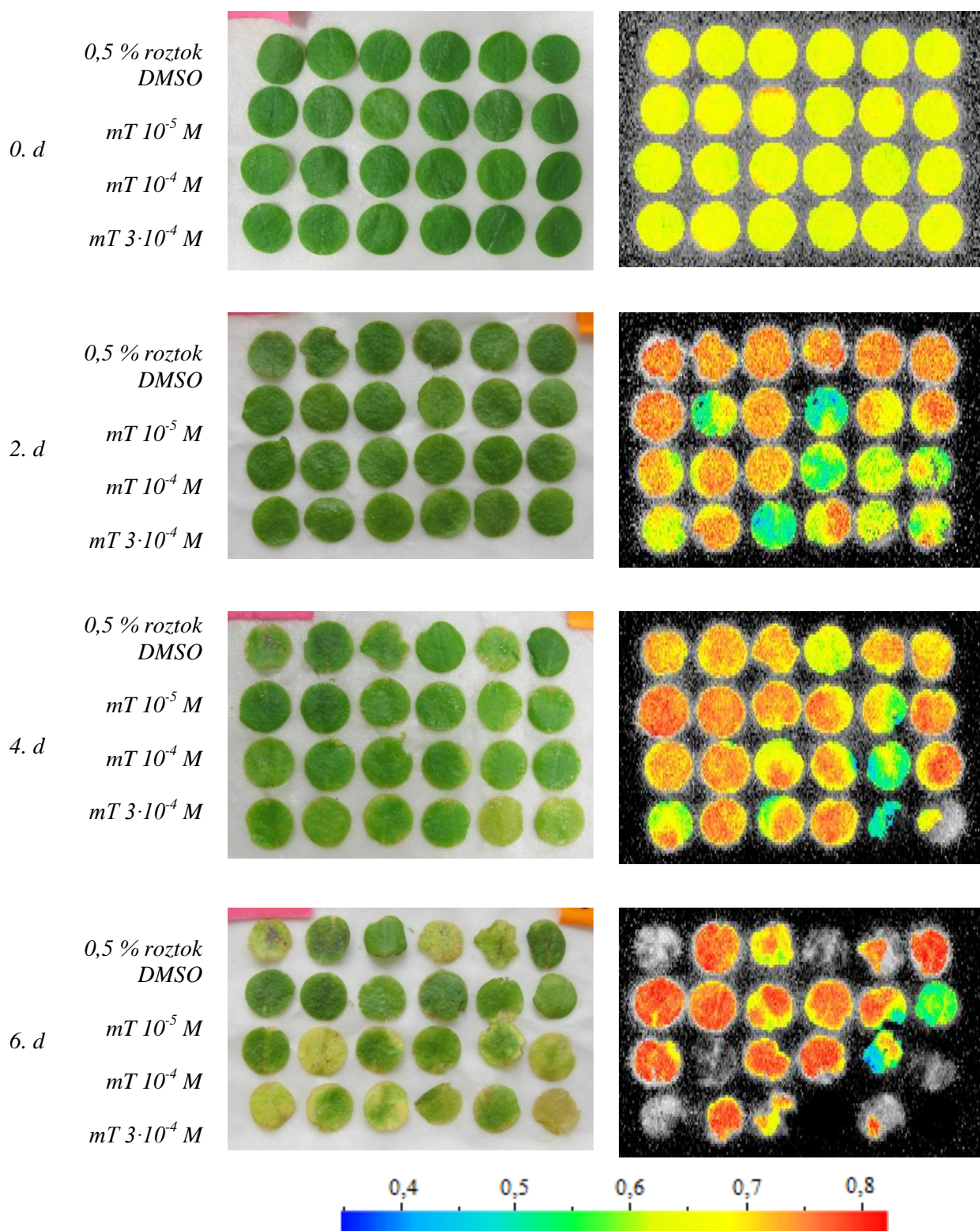
Zmeny parametra F_V/F_P v ploche oddelených listov s nárastom doby po oddelení sú vyobrazené pre jednotlivé svetelné varianty na Obr. 22 - 24. V rámci všetkých variant dochádzalo k postupnému nárastu hodnoty parametra F_V/F_P v čase - z 0. d na 2. d, resp. na 4. d po oddelení. To je v súlade s výsledkami uvedenými na Obr. 21. V 6. d po oddelení došlo k výraznému zhoršeniu štruktúry niektorých vzoriek inkubovaných v mT o koncentrácii 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M a meranie na nich nemohlo prebehnúť. Pre tieto vzorky bola hodnota F_V/F_P braná ako nulová a z tohto dôvodu bol zaznamenaný výrazný pokles F_V/F_P u týchto variant oproti kontrolnému roztoku (Obr. 21 a 22). Pokles F_V/F_P bol zaznamenaný i pre vzorky varianty VS inkubované v roztoku mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M v 6. d po oddelení (Obr. 21 a 24). Z Obr. 24 je tiež zrejmý nárast v obsahu antokyanov u vzoriek inkubovaných v DMSO, hlavne v 6. d po oddelení.

Arabidopsis thaliana ahk3,4 - T



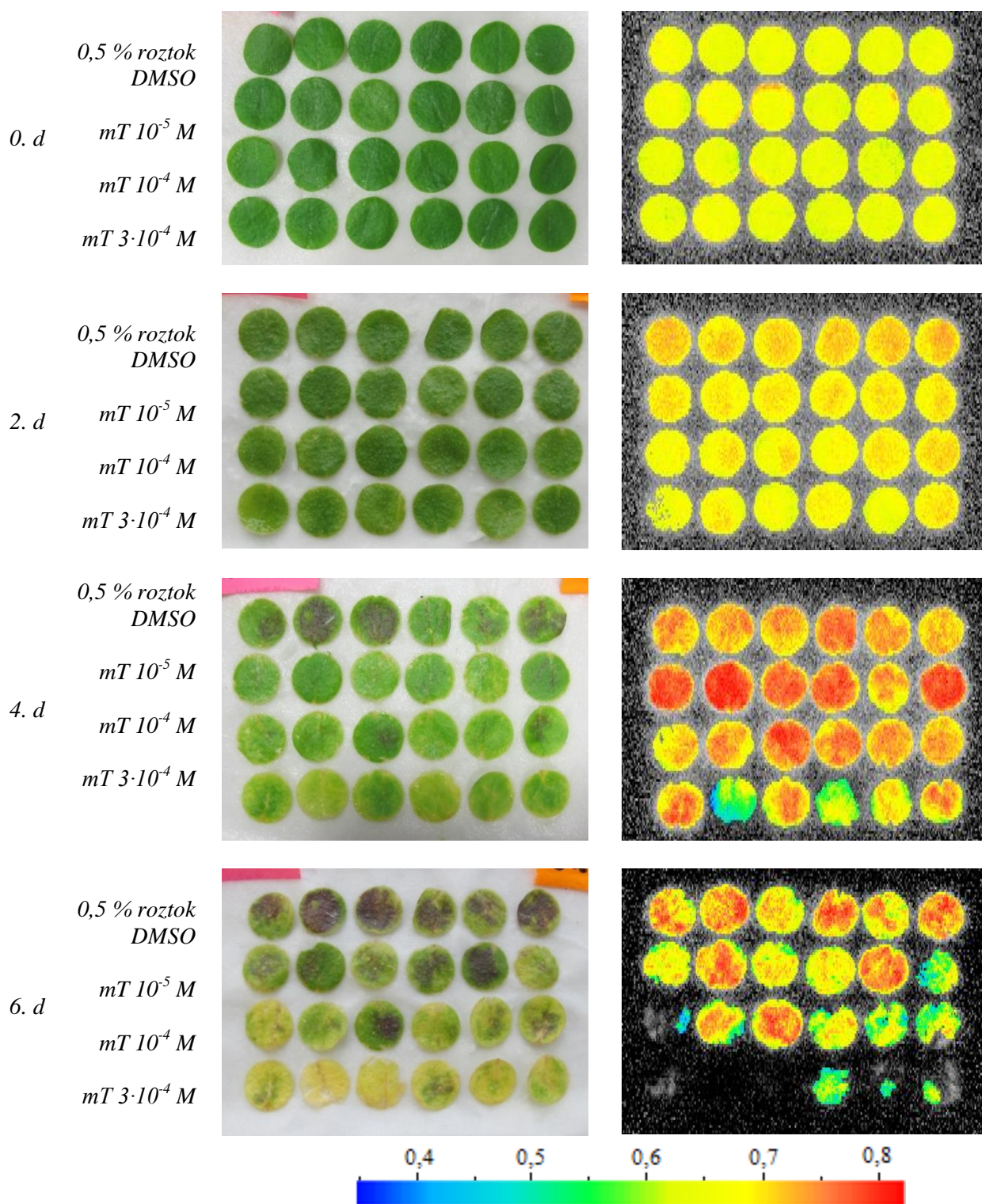
Obr. 22: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk3,4* varianty *T* (umiestnené v tme počas celého experimentu) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok *mT* v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana ahk3,4 - NS



Obr. 23: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk3,4* varianty NS (umiestnené na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana ahk3,4 - VS



Obr. 24: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk3,4* varianty VS (umiestnené na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M). Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

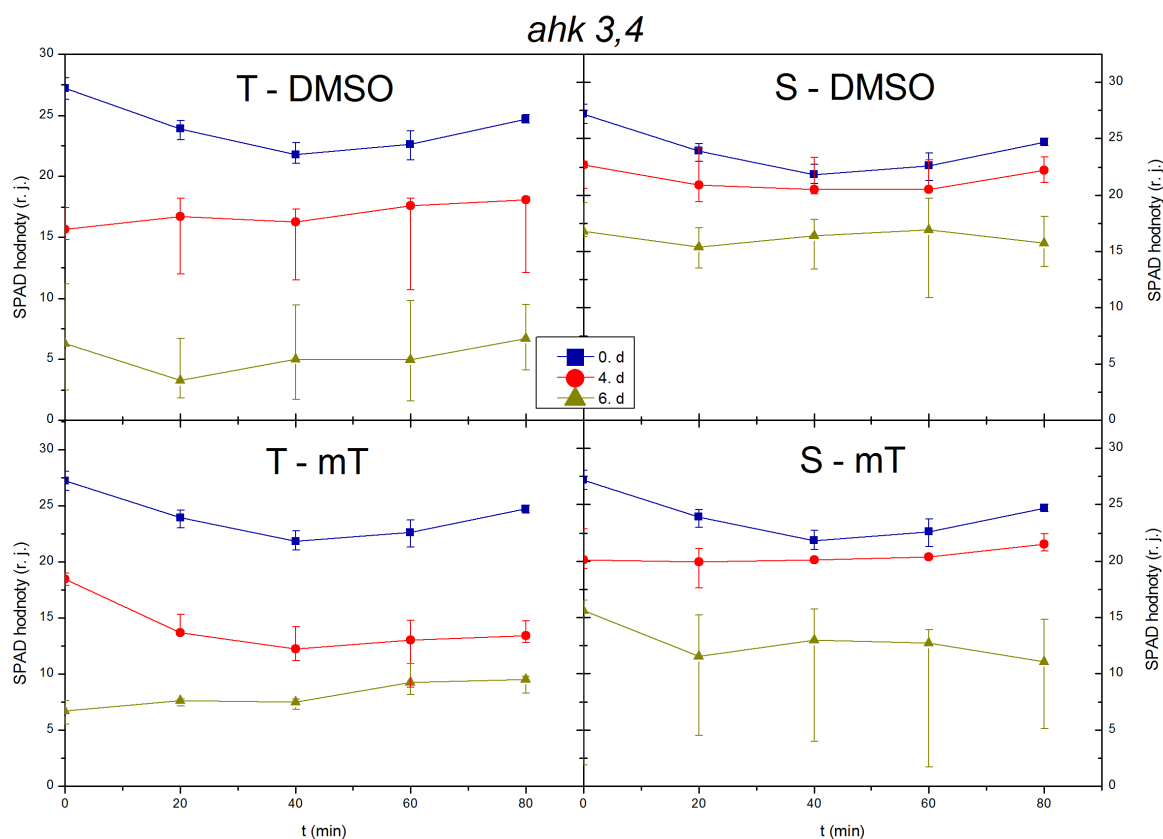
Na Obr. 25 sú zobrazené zmeny hodnôt SPAD počas pôsobenia modrého svetla. Tieto zmeny sú spôsobené zmenami transmitancie vyvolanými pohybom chloroplastov. Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla boli v 0. d po oddelení podobné u všetkých variant. Podobne ako u vzoriek *Arabidopsis* typu WT (Obr. 13) mali tieto zmeny „klasický“ priebeh (vid' 5.1.1 Genotyp WT).

U vzoriek v tme inkubovaných v roztoku DMSO (T - DMSO) bol v 4. d po oddelení inhibované oba typy pohybu. V 6. d po oddelení došlo v priebehu 20 min aplikácie svetla vyššej intenzity k reakcii „vyhnutie sa“, no následne došlo k akumuláčnemu pohybu CP.

Pre vzorky umiestnené v tme a inkubované v mT (T - mT) mali zmeny hodnôt SPAD „klasický“ priebeh. Štvrtý deň bol na rozdiel od vzoriek T - DMSO zachovaný pohyb „vyhnutie sa“. No v 6. d bol inhibovaný typ pohybu „vyhnutie sa“ a došlo len k akumuláčnemu pohybu CP, bez ohľadu na aplikáciu svetla o danej intenzite.

Pre vzorky inkubované na svetle v DMSO (S - DMSO) mali zmeny hodnôt SPAD „klasický“ priebeh podobne ako u varianty T - mT. V 6. d po oddelení došlo však k inhibícii oboch typov pohybu.

Pre vzorky inkubované na svetle v roztoku mT (S - mT) boli inhibované oba typy pohybu podobne ako u vzoriek T - DMSO. V 6. d boli však zaznamenané zmeny, pričom sa inhiboval pohyb typu „vyhnutie sa“.



Obr. 25: Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla u listových segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk3,4*. Segmenty boli prvých 40 min osvetľované modrým svetlom o intenzite $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následne po dobu ďalších 40 min modrým svetlom o intenzite $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli po oddelení inkubované v 0,5 % roztoku DMSO a v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M a ponechané na dvoch svetelných režimoch: T – tma, S – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=5 - 6$.

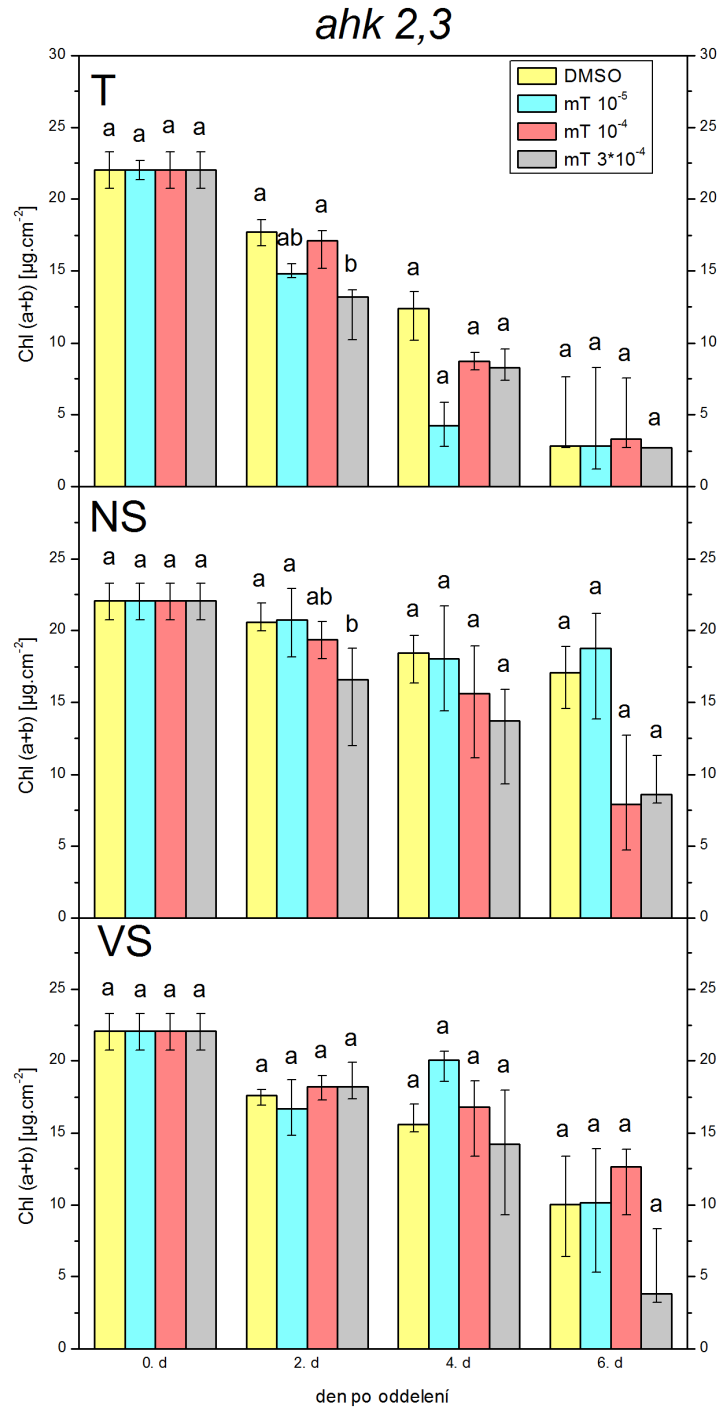
5.1.4 Genotyp *ahk2,3*

Zmeny obsahu Chl pre vzorky *Arabidopsis* typu *ahk2,3* sú vyobrazené na Obr. 26. U vzoriek *ahk2,3* varianty T inkubovaných v kontrolnom roztoku dochádzalo s nárastom počtu dní k rýchlemu poklesu hodnoty obsahu Chl. Táto hodnota poklesla z $22 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 0. d na $2,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení, čo percentuálne predstavuje pokles o približne 87 %. Jediným štatisticky významným efektom mT vzhľadom k DMSO bolo zníženie obsahu Chl 2. d po oddelení u koncentrácii $3\cdot 10^{-4}$ M.

Na svetelnom režime NS pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku došlo k výrazne menšiemu poklesu obsahu Chl oproti vzorkám v T (Obr. 26). Hodnota obsahu Chl tu poklesla z $22 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 0. d na $17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení, teda približne o 23

%. Vzorok v 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M mT mali obsah Chl oproti DMSO nižší od 2. d, ale iba v prípade $3 \cdot 10^{-4}$ M koncentrácie a 2. d po oddelení bol tento rozdiel štatisticky významný.

Pre vzorky varianty *ahk2,3* umiestnené v svetelnom režime VS a v kontrolnom roztoku došlo k rýchlejšiemu poklesu hodnoty obsahu Chl oproti vzorkám v režime NS, ale k pomalšiemu poklesu ako v T. Hodnota obsahu Chl tu poklesla z $22 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 0. d na $10 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ v 6. d po oddelení, čo predstavuje pokles o približne 55 %. V tomto svetelnom režime nebol zaznamenaný žiadny preukazný efekt mT na pokles obsahu Chl. Vyšší obsah Chl u koncentrácie 10^{-5} M v 4. d po oddelení a u koncentrácie 10^{-4} M v 6. d po oddelení a nižší obsah Chl u koncentrácie $3 \cdot 10^{-4}$ M v 6. d po oddelení oproti DMSO neboli preukazné (Obr. 26).

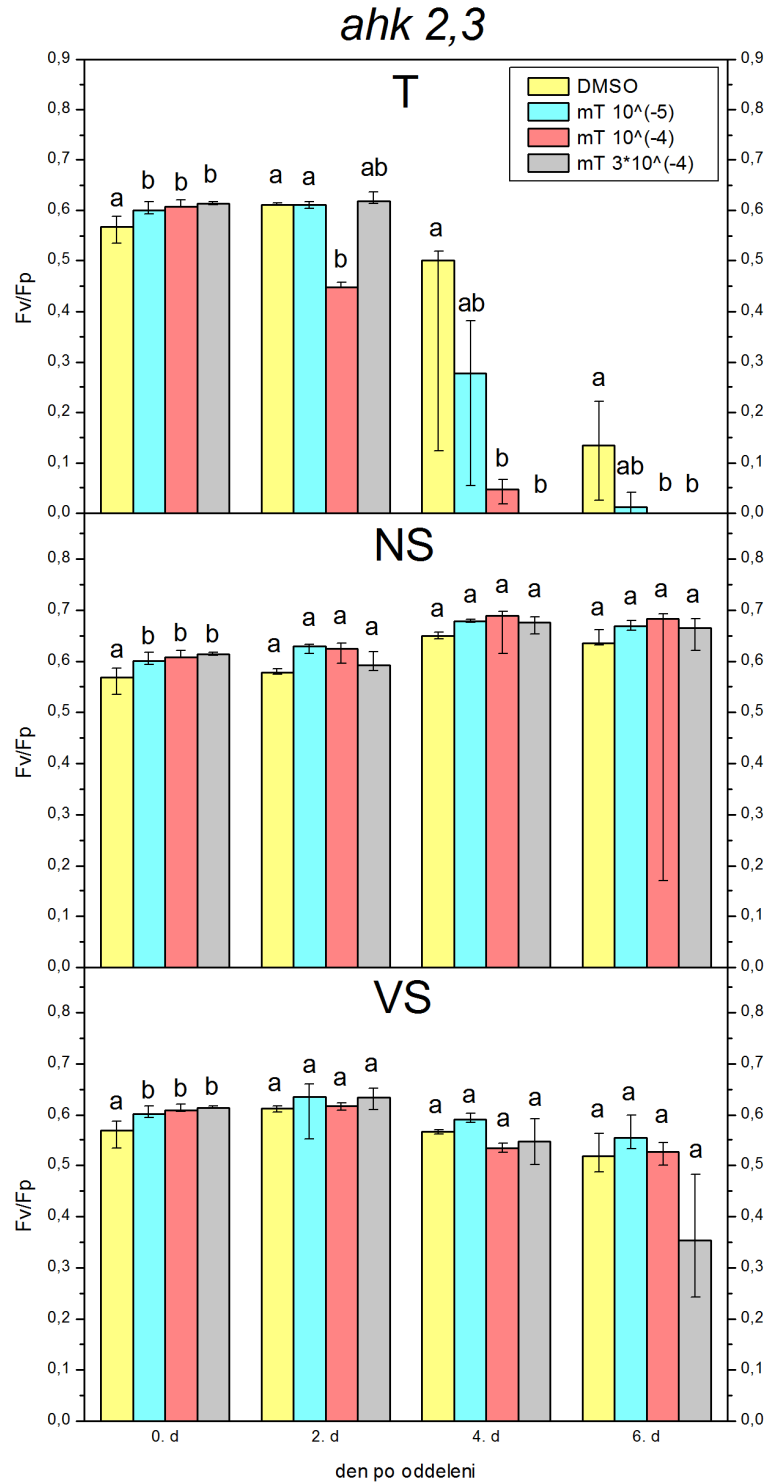


Obr. 26: Zmeny obsahu Chl počas indukovanej senescencie v tme (T), na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NS) a na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (VS) u diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,3*. Disky boli inkubované v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3\cdot 10^{-4}$ M. Na ose y sú vyjadrené koncentrácie Chl (a+b) vziahanuté na plochu segmentu a vyjadrené v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Disky boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v druhý deň (2. d), štvrtý (4. d) a v šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=6$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant.

Zmeny parametra F_V/F_P u typu *ahk2,3* sú vyobrazené na Obr. 27. Na režime T pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku bol z 0. d na 2. d zaznamenaný nárast parametra F_V/F_P . Avšak v 4. a 6. d došlo k výraznému poklesu F_V/F_P . Jeho hodnota poklesla z hodnoty 0,569 v 0. d na hodnotu 0,134 v 6. d po oddelení. Tento pokles predstavuje 76 %. V tme u vzoriek inkubovaných v mT boli v 0. d zaznamenané preukazne vyššie hodnoty oproti DMSO. V ďalších termínoch roztok mT nespomalil pokles obsahu Chl ani v jednej z použitých koncentrácií. V 4. a v 6. d po oddelení došlo k výraznému zhoršeniu štruktúry niektorých vzoriek inkubovaných mT o koncentrácií 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M a z tohto dôvodu neboli vzorky merateľné - hodnota F_V/F_P bola pre ne braná ako nulová. A preto je v tieto dni zaznamenaný u týchto vzoriek výrazný pokles F_V/F_P .

U vzoriek inkubovaných na svetelnom režime NS v kontrolnom roztoku bol zaznamenaný nárast parametra F_V/F_P takmer podobne ako u vzoriek varianty T. Tento nárast F_V/F_P pretrval až do 6. d po oddelení, zatiaľ čo u varianty T došlo zo 4. na 6. d k jeho poklesu. Celkovo jeho hodnota stúpila z 0,569 v 0. d na hodnotu 0,635 v 6. d po oddelení, čo predstavuje nárast o približne 12 %. Podobné zmeny boli zaznamenané vo vzorkách inkubovaných v mT, kde bol zmienený nárast ešte mierne výraznejší oproti kontrolnému roztoku. Napr. u koncentrácie 10^{-4} M došlo k nárastu z 0,601 v 0. d na 0,684 v 6. d po oddelení, teda o približne 14 %. Obecne v 0. d boli zaznamenané preukazne vyššie hodnoty u vzoriek inkubovaných v mT oproti DMSO podobne ako u vzoriek v T.

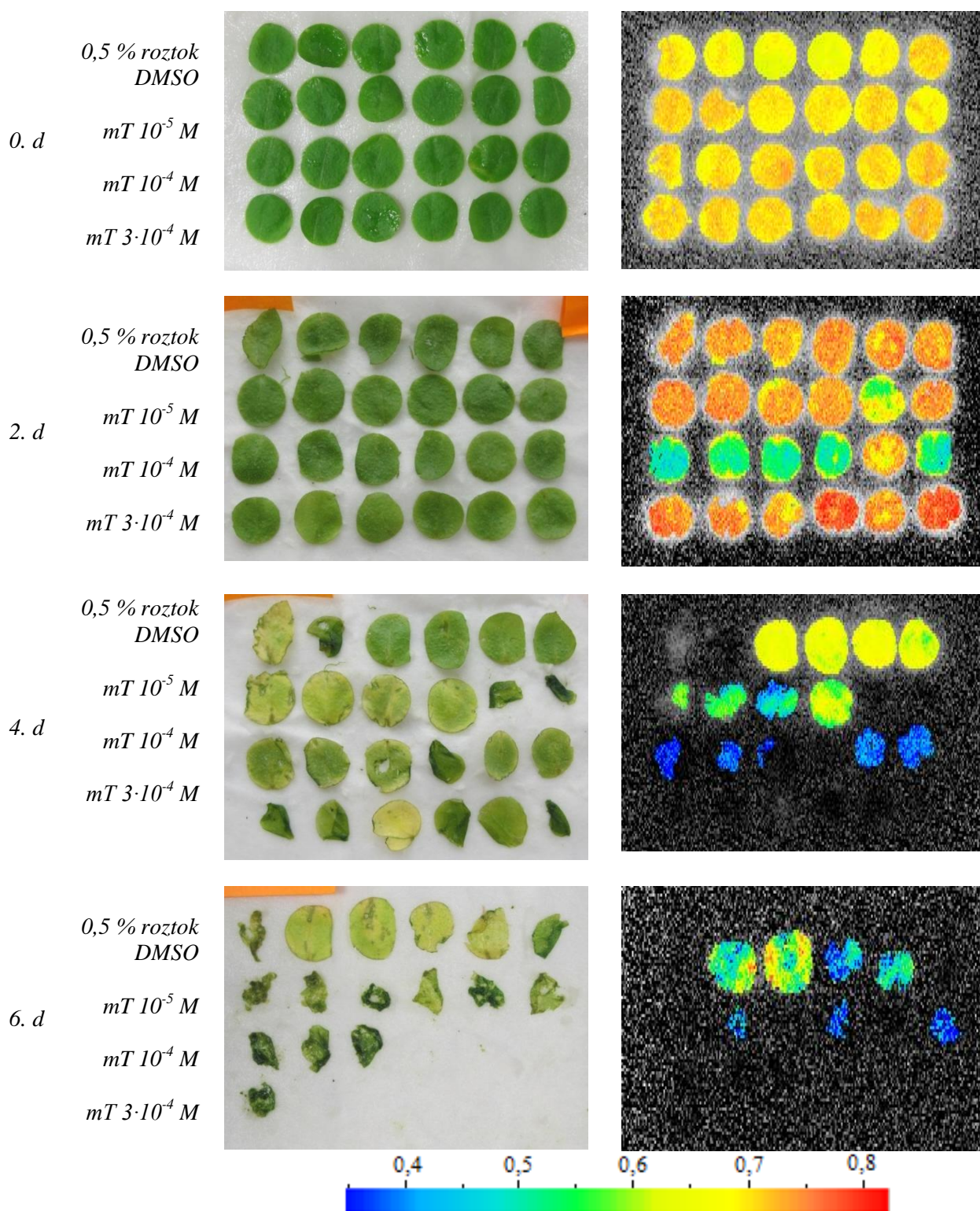
Na svetelnom režime VS u vzoriek inkubovaných v kontrolnom roztoku došlo k miernemu poklesu hodnoty parametra F_V/F_P . Tento pokles bol oveľa pomalší ako v T. Hodnota parametra tu poklesla z 0,569 v 0. d na 0,518, teda približne o 9 %. V 0. d boli u vzoriek inkubovaných v mT, podobne ako u vzoriek zo svetelného režimu T alebo NS, zaznamenané preukazne vyššie hodnoty F_V/F_P oproti DMSO. Avšak pozitívny resp. negatívny účinok roztoku mT nebol v ďalších dňoch preukázateľný ani v jednej z použitých koncentrácií.



Obr. 27: Zmeny pomeru F_v/F_p počas indukovanej senescencie listových diskov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,3* inkubovaných v 0,5 % roztoku DMSO a roztokoch mT (10^{-5} M, 10^{-4} M, $3 \cdot 10^{-4}$ M) pri troch svetelných režimoch: T – tma, NS – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, VS – PAR o intenzite $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedené sú mediány a kvartily, $n = 12$. Rozdielne písmená v rámci jednotlivých grafov označujú štatisticky významnú rozdielnosť variant v danom termíne.

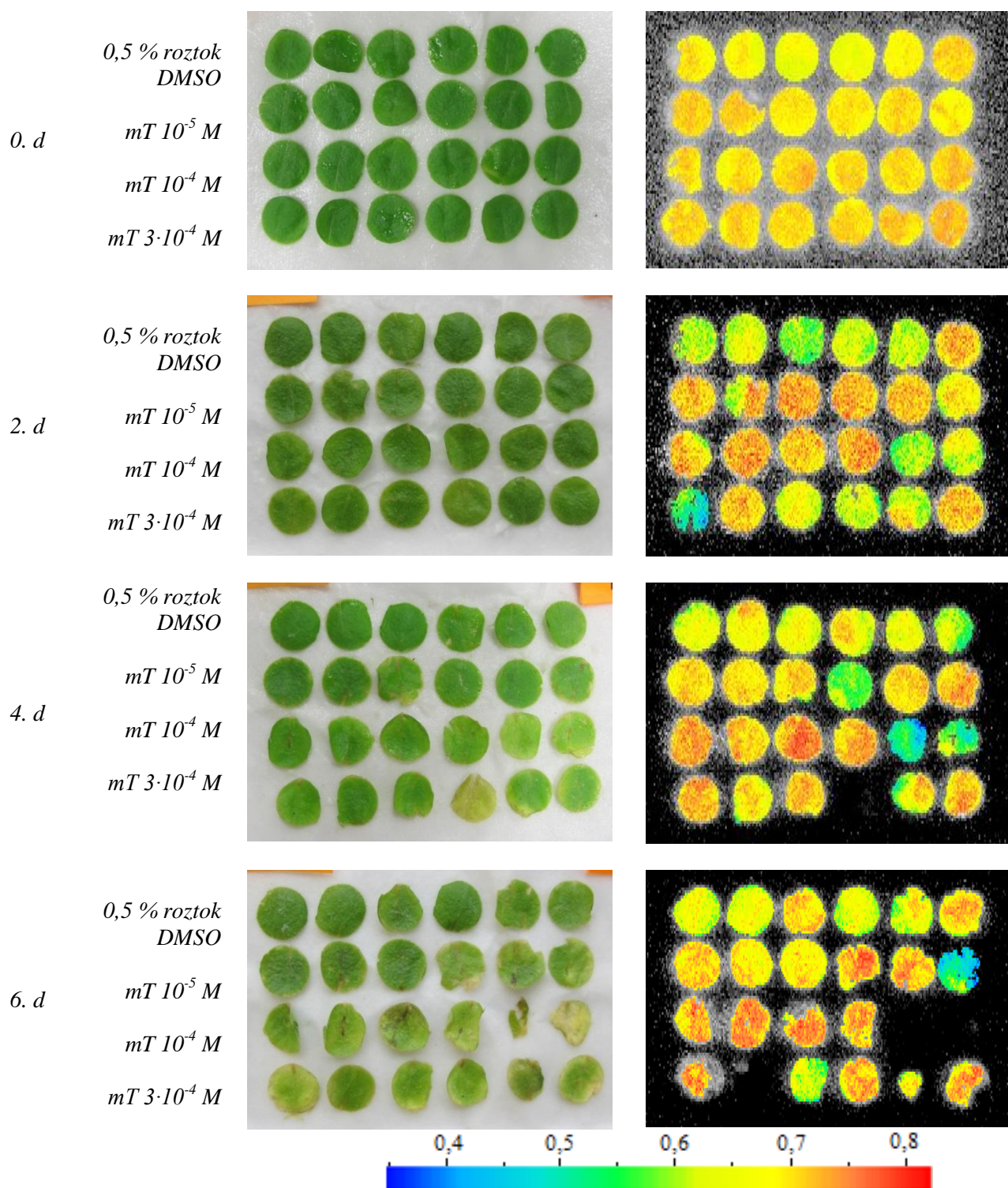
Zmeny parametra F_V/F_P v ploche oddelených listov počas doby po oddelení sú vyobrazené pre jednotlivé svetelné varianty na Obr. 28 - 30. U vzoriek inkubovaných v tme (T) dochádzalo k postupnému relatívne výraznému poklesu tohto parametra s viditeľným negatívnym vplyvom mT všetkých koncentrácií od 4. d po oddelení (Obr. 28). U varianty NS bol naopak sledovaný nárast F_V/F_P u väčšiny vzoriek (Obr. 29). U varianty VS je zrejmé udržanie F_V/F_P i na 6. d po oddelení v rozmedzí 0,518 až 0,555 pre roztoky DMSO a mT o koncentracii 10^{-5} M a 10^{-4} M a 0,354 pre roztok mT o koncentracii $3 \cdot 10^{-4}$ M (Obr. 30).

Arabidopsis thaliana ahk2,3 - T



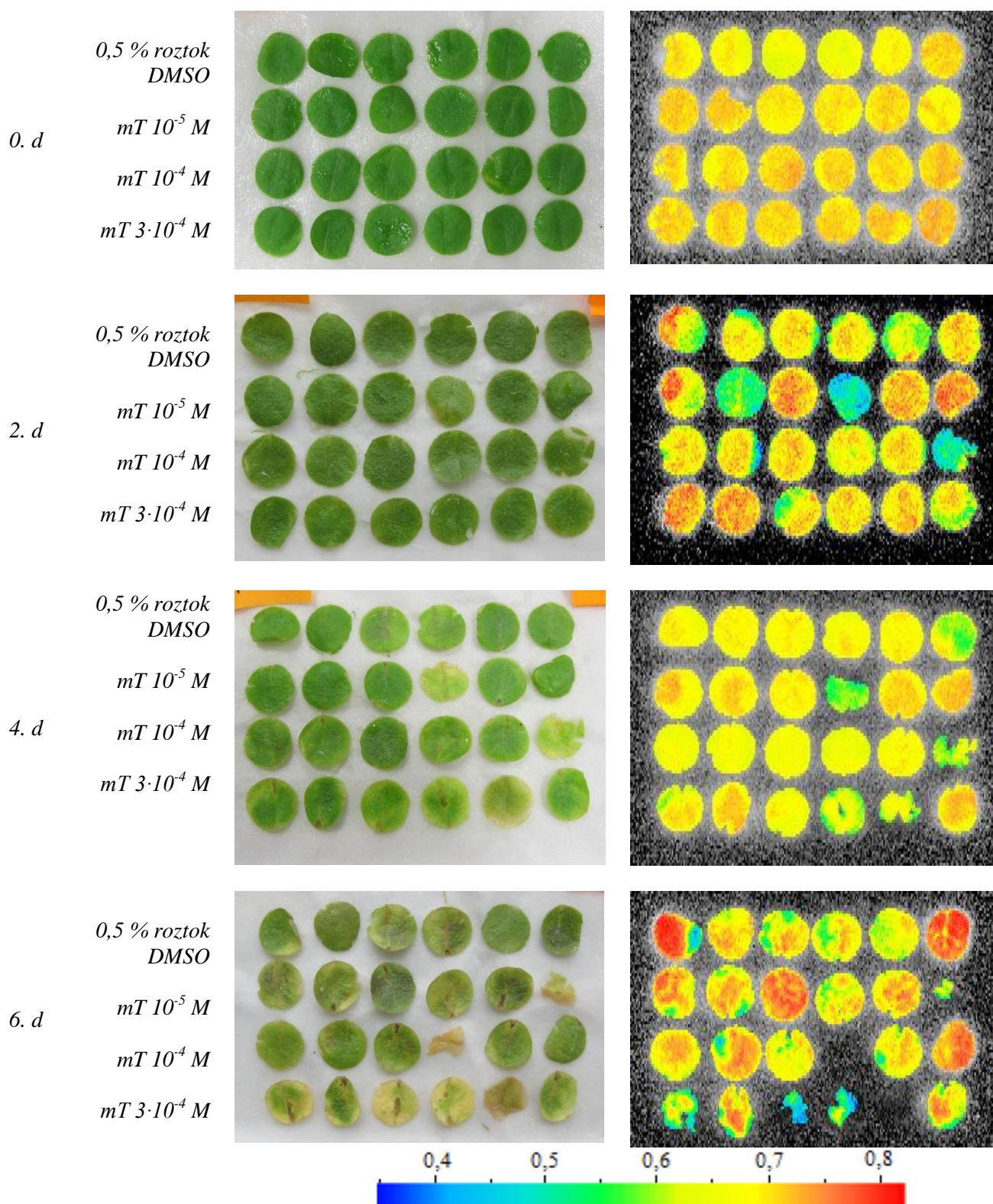
Obr. 28: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,3* varianty *T* (umiestnené v tme počas celého experimentu) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok *mT* v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana ahk2,3 - NS



Obr. 29: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,3* varianty *NS* (umiestnené na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok *mT* v koncentráciách $10^{-5} M$, $10^{-4} M$ a $3 \cdot 10^{-4} M$. Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

Arabidopsis thaliana ahk2,3 - VS



Obr. 30: Vľavo uvedené fotografické snímky segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu ahk2,3 varianty VS (umiestnené na PAR o intenzite $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubovaných v jednotlivých roztokoch: 0,5 % roztok DMSO, roztok mT v koncentráciách 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M). Obrázky sú zoradené podľa jednotlivých dní po oddelení - nultý (0. d), druhý (2. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6.d). Vpravo vyobrazené plošné zmeny parametra F_v/F_p .

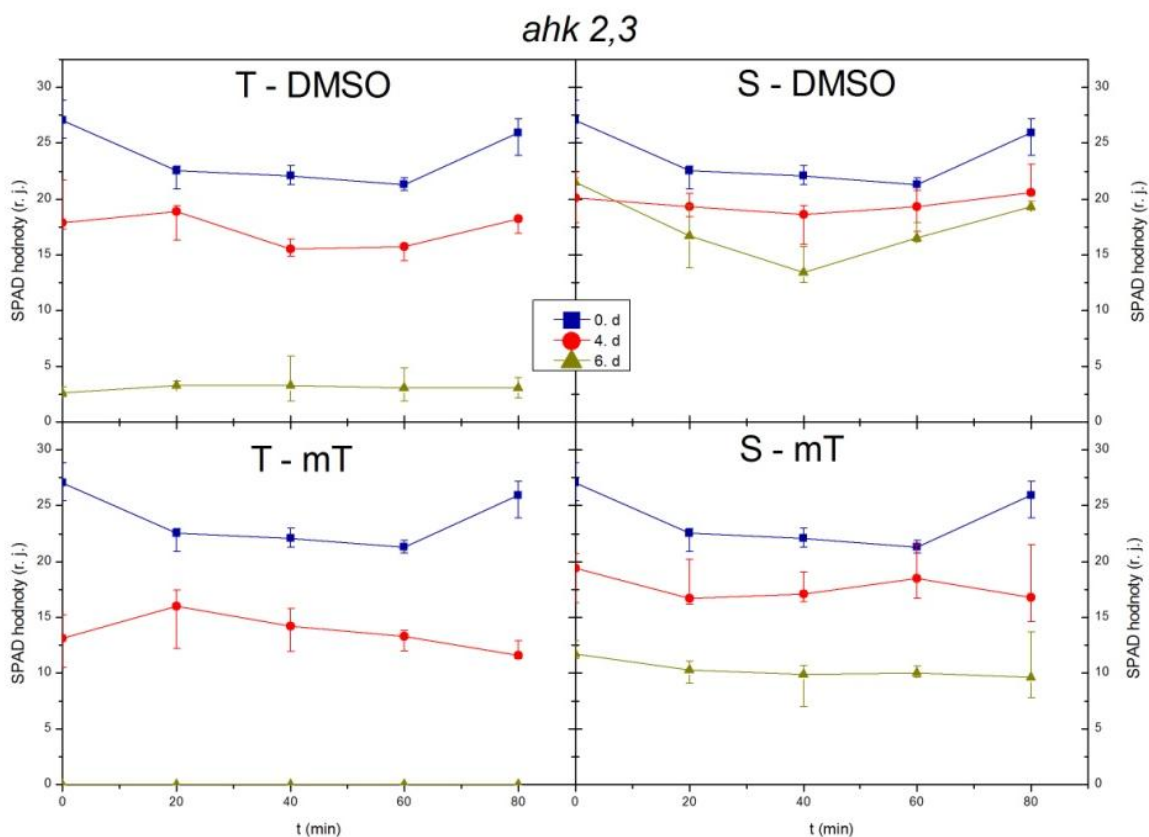
Na Obr. 31 sú vyobrazené zmeny hodnôt SPAD pre genotyp *ahk2,3* počas pôsobenia modrého svetla. Tieto zmeny sú spôsobené zmenami transmitancie vyvolanými pohybom chloroplastov. Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla boli v 0. d po oddelení podobné u všetkých variant. Podobne ako u vzoriek *Arabidopsis* ostatných použitých genotypov mali tieto zmeny „klasický“ priebeh (vid' 5.1.1 Genotyp WT).

U vzoriek umiestnených v tme a inkubovaných v DMSO (T - DMSO) došlo v 4. d po oddelení k spomaleniu pohybu „vyhnutie sa“. Následne po aplikácii svetla o nižšej intenzite došlo k akumuláčnemu pohybu CP. V 6. d po oddelení boli inhibované oba typy pohybu.

U vzoriek umiestnených v tme a inkubovaných v roztoku mT (T - mT; Obr. 31) boli inhibované oba typy pohybu v 4. i v 6. d po oddelení.

Na svetelnom režime u vzoriek inkubovaných v kontrolnom roztoku (S - DMSO) boli v 4. d po oddelení inhibované oba typy pohybu, ale v 6. d je zaznamenané ich obnovenie.

U vzoriek inkubovaných v mT (S - mT) boli, podobne ako u vzoriek varianty T - mT v 4. d a v 6. d po oddelení inhibované oba typy pohybu.



Obr. 31: Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla u listových segmentov *Arabidopsis thaliana* genotypu *ahk2,3*. Segmenty boli prvých 40 min osvetľované modrým svetlom o intenzite $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následne po dobu ďalších 40 min modrým svetlom o intenzite $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli po oddelení inkubované v 0,5 % roztoku DMSO a v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M a ponechané na dvoch svetelných režimoch: T – tma, S – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), štvrtý (4. d) a šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=5 - 6$.

5.2 Experiment II

V druhom experimente boli sledované účinky mT na pohyb CP u dvoch rastlinných druhov - jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) a tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) línie 303, prostredníctvom sledovania zmien hodnôt SPAD.

Pre štúdium účinkov mT boli u jačmeňa použité dva svetelné režimy (TMA a SV - periodické PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 16h svetlo/8 h tma) a dva roztoky (DMSO a roztok mT v koncentrácii 10^{-4} M). Segmenty boli premeriavané v deň oddelenia (0. d) a v 3. (3. d) a v 6. deň (6. d) po oddelení. U tabaku boli použité dva rovnaké svetelné režimy ako u jačmeňa, ale s inou fotoperiódou (12 h PAR/12 h tma). Listy boli premeriavané deň pred aplikáciou roztokov (0. d), v 1. deň (1. d), v 2. deň (2. d) a v 3. deň (3. d) po aplikácii.

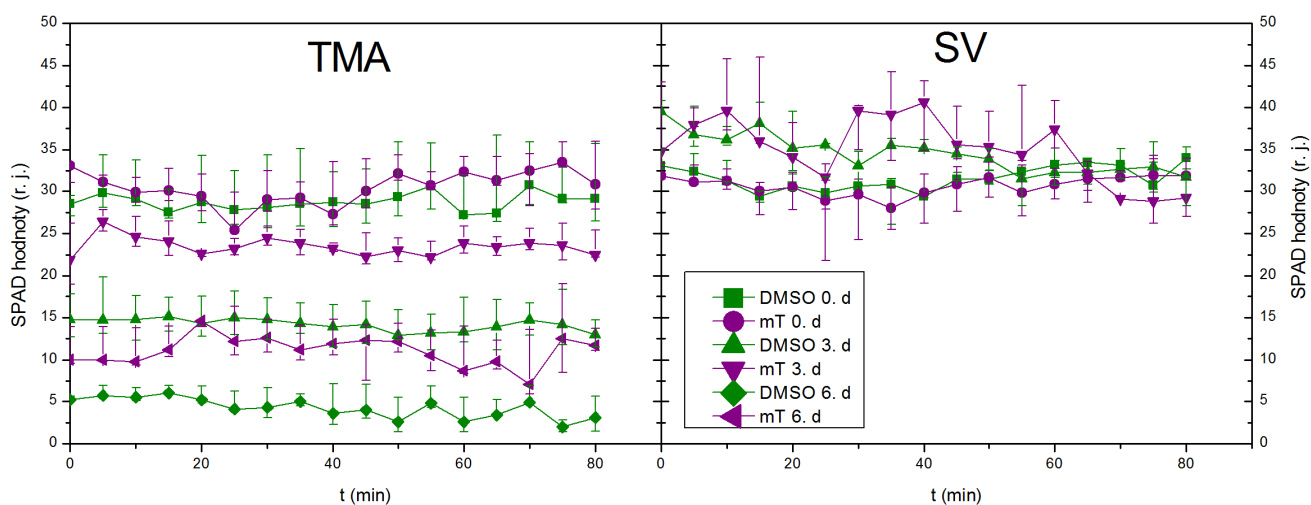
5.2.1 Jačmeň siaty

Pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku (DMSO) v svetelnom režime TMA neboli v žiadnom termíne merania evidované výraznejšie zmeny hodnôt SPAD v priebehu 40 min aplikácie svetla o vyššej a nižšej intenzite (Obr. 32). Bolo viditeľné iba znižovanie východzej hodnoty SPAD s dobou po oddelení spôsobené poklesom obsahu Chl v dôsledku senescencie.

U vzoriek inkubovaných v mT na svetelnom režime TMA v 0. d po aplikácii svetla o vyššej intenzite dochádzalo k postupnému miernemu poklesu hodnoty SPAD (z 33 v čase 0 min na hodnotu 27 v čase 40 min). Následne po aplikácii svetla o nižšej intenzite dochádzalo k postupnému nárastu až na hodnotu 31 v 80 min. V 3. d po oddelení neboli zaznamenané pre túto variantu žiadne výrazné zmeny v hodnotách SPAD vyvolané aplikáciou modrého svetla okrem mierneho nárastu v 5 min aplikácie svetla o vyššej intenzite. V 6. d po oddelení bol počas aplikácie svetla o vyššej intenzite evidovaný mierny nárast hodnoty SPAD z 10 na 15 v čase 20 min.

U varianty SV pre vzorky inkubované v kontrolnom roztoku DMSO v 0. d dochádzalo po aplikácii svetla o vyššej intenzity k veľmi miernemu poklesu hodnoty SPAD z hodnoty 33 v čase 0 min na hodnotu 30 v čase 40 min. Po aplikácii svetla o nižšej intenzite dochádzalo k postupnému nárastu až na hodnotu 34 v čase 80 min. V 3. d po oddelení bol zaznamenaný len mierny pokles z hodnoty 39,5 v čase 0. min na hodnotu 32 v čase 80 min. U varianty SV pre vzorky inkubované v roztoku mT boli v 0. d zaznamenané len mierne zmeny v hodnotách SPAD. V 3. d po oddelení dochádzalo

len k oscilácii hodnôt. V 6. d po oddelení neboli hodnoty SPAD pre variantu SV merateľné.



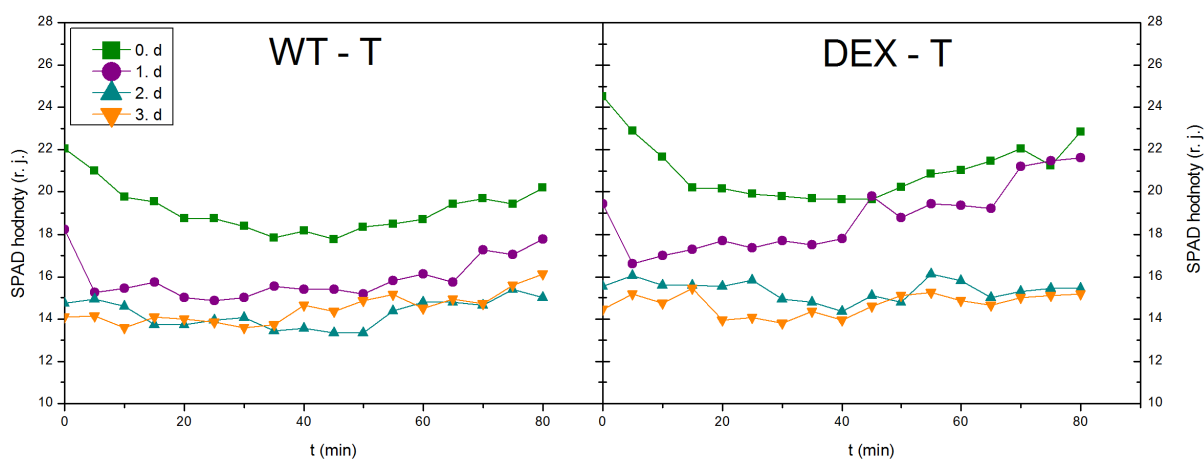
Obr. 32: Zmeny hodnôt SPAD vyvolané pôsobením modrého svetla u listových segmentov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Segmenty boli prvých 40 min osvetľované modrým svetlom o intenzite $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následne po dobu ďalších 40 min modrým svetlom o intenzite $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli po oddelení inkubované v 0,5 % roztoku DMSO a v roztoku mT o koncentrácii 10^{-4} M a ponechané na dvoch svetelných režimoch: T – tma, SV – PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), tretí (3. d) a v šiesty deň po oddelení (6. d). Uvedené sú mediány a horné a dolné kvartily, $n=6$.

5.2.2 Tabak virgínsky

Hodnota SPAD v 0. deň u listov variety WT inkubovaných v tme (WT - T) počas aplikácie modrého svetla o vyššej intenzite postupne mierne klesala z počiatočnej hodnoty 22 až na hodnotu 18 v čase 40 min (Obr. 33). Následne pri aplikácii svetla o nižšej intenzite dochádzalo k postupnému nárastu tejto hodnoty až na hodnotu 20 v čase 80 min. Podobný priebeh bol evidovaný i v 1. d, kde došlo k poklesu z počiatočnej hodnoty 18 na hodnotu 15 v čase 40 min a následne k nárastu až na konečnú hodnotu 17 v čase 80 min. V 2. d bol zaznamenaný podobný priebeh zmien ako v 0. d a v 1. d, i keď tieto zmeny boli veľmi malé: došlo k poklesu počiatočnej hodnoty 15 na hodnotu 14 v čase 40 min a následne k nárastu na hodnotu 15 v čase 80 min.. V 3. d bol evidovaný len postupný nárast hodnoty SPAD bez ohľadu na aplikácie svetla príslušnej intenzity. Hodnota stúpala z 14 v čase 0 min na hodnotu 16 v čase 80 min.

U listov variety DEX (rastlina tabaku línie 303 zaliata roztokom DEX o objeme 50 ml) inkubovaných v tme (DEX - T) došlo v 0. d k postupnému poklesu hodnoty

SPAD z počiatočnej hodnoty 24 na hodnotu 20 v čase 40 min. Po aplikácii svetla o nižšej intenzite došlo k postupnému nárastu až na hodnotu 23 v čase 80 min. V 1. d došlo k vymiznutiu poklesu hodnoty SPAD na intenzívnom modrom svetle, došlo iba k postupnému veľmi miernemu nárastu z počiatočnej hodnoty 19,5 na hodnotu 22 v čase 80 min. V 2. a v 3. d neboli zaznamenané výrazné zmeny hodnôt SPAD.



Obr. 33: Zmeny hodnôt SPAD u listov tabaku virgínskeho varianty T (počas celého experimentu v tme) typu WT a DEX - varianta rastliny tabaku línie 303 zaliata roztokom DEX v objeme 50 ml. Listy boli prvých 40 min osvetľované modrým svetlom o intenzite $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následne po dobu ďalších 40 min modrým svetlom o intenzite $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Segmenty boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v prvý (1. d), v druhý (2. d) a v tretí deň po oddelení (3. d). Uvedené sú priemery, $n=2..$

Na svetelnom režime SV u varianty WT (WT - SV) bol evidovaný „klasický“ priebeh hodnôt SPAD odrážajúci v prvej fáze reakciu „vyhnutie sa“ a v druhej fáze akumuláciu CP v dôsledku pôsobenia modrého svetla vysokej a nízkej intenzity (Obr. 34). Hodnota SPAD najprv poklesla z počiatočnej hodnoty 23 až na hodnotu 19 v čase 40 min a následne (pri aplikácii svetla o nižšej intenzite) došlo k postupnému nárastu až na hodnotu 20 v čase 80 min. Priebeh podobného charakteru i rozsahu bol zaznamenaný pre všetky dni, na rozdiel od listov varianty WT inkubované v tme, kde v 2. d dochádzalo len k miernym zmenám a v 3. d bol evidovaný len postupný nárast hodnôt (Obr. 33).

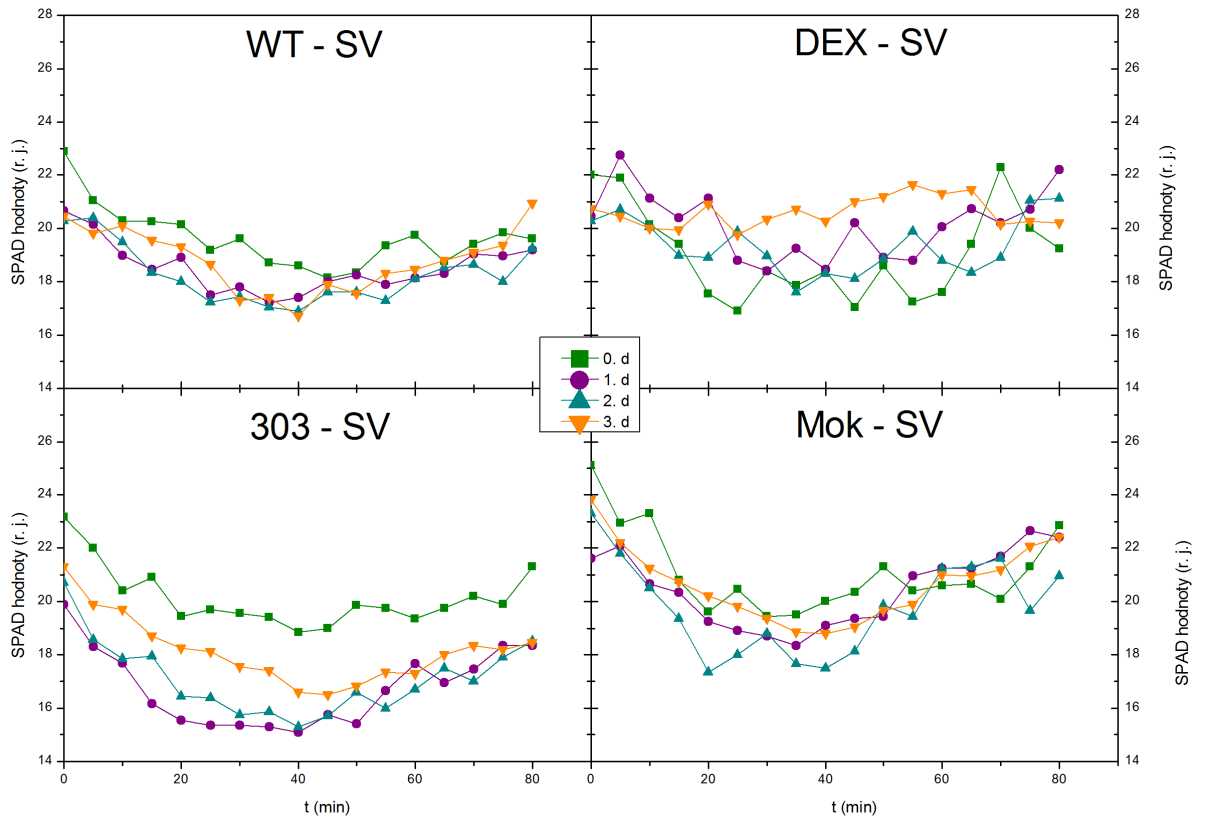
U varianty DEX (varianta rastliny tabaku línie 303 zaliata roztokom DEX o objeme 50 ml.) inkubovanej na svetle (DEX - SV) došlo v 0. d v priebehu prvých 40 min ku poklesu hodnoty SPAD (z počiatočnej hodnoty 22 na hodnotu 18). Následne pri aplikácii svetla o nižšej intenzite došlo k nárastu na hodnotu 22 v čase 70 min, táto

hodnota v priebehu desiatich minút mierne poklesla až na hodnotu 19 v čase 80 min. V 1. d bol tento priebeh podobný - došlo k poklesu z počiatočnej hodnoty 20 na hodnotu 18,5 v 40 min a následne k nárastu až na hodnotu 22. Podobne v 2. d došlo k podobným zmenám, v podobnom rozsahu hodnôt - hodnota SPAD tu poklesla z 20 na hodnotu 18 v čase 40 min a následne stúpila až na hodnotu 21. V 3. d neboli zaznamenané výrazne zmeny v hodnotách SPAD počas pôsobenia modrého svetla, čo značí inhibíciu oboch typov pohybu CP.

Pre listy varianty 303 (varianta rastliny tabaku línie 303, na ktorú nebol aplikovaný žiadny roztok) na svetle (303 - SV) bol v 0. d zaznamenaný pokles hodnôt SPAD (z 23 na 19 v čase 40 min) a následne po aplikácii svetla o nižšej intenzite došlo k nárastu až na 21 v čase 80 min. Podobné zmeny v hodnotách SPAD boli zaznamenané i pre ostatné dni (1. d, 2. d i 3. d).

U varianty Mok (varianta rastliny tabaku línie 303 zaliata mokom v objeme 50 ml) inkubované na svetle (Mok - SV) došlo v 0. d po aplikácii modrého svetla o vyššej intenzite k poklesu hodnoty SPAD z 25 na 20 v čase 40 min. Následne pri aplikácii svetla nižšej intenzity došlo k nárastu na hodnotu 23 v čase 80 min. K veľmi podobným zmenám došlo i v 1. d, 2. d a 3. d.

Z uvedených výsledkov je zrejme, že aplikácia DEX na rastliny tabaku línie 303 spôsobujúca výrazný nárast obsahu CK a oxidatívne poškodenie (Novák a kol., 2013) spôsobila inhibíciu oboch typov pohybu chloroplastov.



Obr. 34: Zmeny hodnôt SPAD u listov tabaku virgínskeho varianty SV (umiestnené na PAR o intenzite $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) typu WT, DEX - varianta rastliny tabaku línie 303 zaliata roztokom DEX v objeme 50 ml; 303 - varianta rastliny tabaku línie 303, na ktorú nebol aplikovaný žiadny roztok a Mok - varianta tabaku línie 303 zaliata mokom (0,05 ml 96 % etanolu s 49,95 ml vody z kohútiku) o objeme 50 ml. Listy boli prvých 40 min osvetľované modrým svetlom o intenzite $190 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následne po dobu ďalších 40 min modrým svetlom o intenzite $8 - 12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Listy boli premeriavané v deň oddelenia (0. d), v prvý (1. d), v druhý (2. d) a v tretí deň po oddelení (3. d). Uvedené sú priemery, $n=2$.

6. DISKUSIA

Priebeh senescencie je spojený s určitými charakteristickými zmenami, akými sú: pokles obsahu Chl, akumulácia ROS a tým zvýšené oxidatívne poškodenie (Vlčková a kol., 2006) alebo pokles určitých fotosyntetických parametrov, napr. maximálneho kvantového výťažku fotochémiie PSII vyjadreného pomerom F_V/F_P , resp. F_V/F_M alebo koeficientu fotochemického zhášania fluorescence Chl (q_p). Celkovo pri senescencii dochádza k zhoršeniu funkcie FS aparátu a poklesu FS aktivity (napr. Zacharias a Reid, 1990; Gan a Amasino, 1995; Vlčková a kol., 2006; Špundová a kol., 2003). Senescenciu je však možné ovplyvniť radov faktorov. Jedným z takýchto faktorov sú i cytokiníny (CK). Tie dokážu na jednej strane spomaliť jej priebeh, no na druhej i urýchliť. Výsledný charakter účinku CK na priebeh senescencie závisí od rôznych faktorov - od použitej koncentrácie, svetelných podmienok, od formy použitého CK, od rastlinného druhu atď.

V roku 2012 bol Husičkovou a kol. vytvorený model popisujúci koncentračnú a svetelnú závislosť účinku CK (Obr. 5). Autori predpokladajú, že CK dokážu spomaliť priebeh senescencie do určitej „hraničnej“ hodnoty koncentrácie, pričom po prekročení tejto koncentrácie je priebeh senescencie naopak urýchlený. Dochádza k urýchleniu zmien spojených so senescenciou (urýchľuje sa pokles obsahu Chl i vyššie uvedené parametry FS) a tým dochádza k akcelerácii celého procesu. Tento model je možné ešte rozšíriť o účinky PAR. Pri aplikácii vyššej intenzity alebo obecné dávky PAR dochádza k posunu „hraničnej“ hodnoty smerom k nižším koncentráciám CK v dôsledku sčítania sa účinkov príslušnej koncentrácie a aplikovanej dávky svetla.

Diplomová práca nadväzuje a rozširuje bakalársku prácu Melkovičovej (2012), kde bola sledovaná koncentračná a svetelná závislosť účinkov CK na priebeh senescencie u rastlinného druhu jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Boli použité BAP a mT, ktoré boli aplikované v koncentracii 10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M na oddelené listové segmenty jačmeňa. Oba CK v tme spomalili pokles obsahu Chl i hodnoty F_V/F_P v jednotlivých použitých koncentráciách. No tento efekt spomalenia senescencie cytokinínami bol postupne menej badateľnejší s nárastom svetelnej dávky a pri aplikovaní kontinuálneho svetla ($370 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) CK urýchlili pokles oboch spomenutých parametrov, pravdepodobne v dôsledku fotooxidatívneho poškodenia. V súlade s navrhnutým modelom (Husičková a kol., 2012) exogénna aplikácia CK teda spomalila pokles obsahu Chl a F_V/F_P , avšak len do určitej koncentrácie (väčšinou 10^{-4}

M), po ktorej prekročení naopak dochádzalo k urýchleniu poklesu týchto parametrov. Pri zvyšovaní dávky svetla postupne dochádzalo k posunu „optimálnej“ koncentrácie CK smerom k nižším hodnotám.

Pre potvrdenie obcejnejšej platnosti navrhnutého modelu je nutné overiť, či funguje i v prípade iných druhov rastlín, prípadne u rastlín s pozmeneným obsahom endogénnych CK alebo percepciou CK. Pre ďalšie meranie bol vybraný druh *Arabidopsis thaliana*, ktorý sa v súčasnej dobe používa najčastejšie ako modelová rastlina.

V diplomovej práci bolo teda sledované pôsobenie exogénnej aplikácie rôzne koncentrovaného cytokinínu mT (10^{-5} M, 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M) a rôznych svetelných podmienok (tma T; PAR o intenzite $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, NS; PAR o intenzite $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, VS) na priebeh senescencie u oddelených listových segmentov *Arabidopsis thaliana*. Pre podrobnejšie sledovanie závislostí boli použité 4 rastlinné genotypy - WT a tri rastlinné mutanty s „knock-outovanými“ receptormi CK (*ahk2,4*; *ahk3,4*; *ahk2,3*). Miera senescencie bola stanovovaná prostredníctvom obsahu Chl a parametra F_V/F_P . Navyiac oproti bakalárskej práci sme rozšírili experimenty o sledovanie vplyvu mT na pohyb chloroplastov, ako ďalšieho procesu, u ktorého sa očakáva inhibícia počas senescencie. Tieto účinky sme sledovali nielen u rastlinného druhu *Arabidopsis thaliana*, ale i u jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) a tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.)

Prvý genotyp, u ktorého sme porovnávali účinok použitej koncentrácie mT a svetelných podmienok, bol genotyp WT (Obr. 8, 9). U kontrolných segmentov (v 0,5 % roztoku DMSO) tento genotypu bol zaznamenaný postupný pokles obsahu Chl i parametra F_V/F_P s nárastom počtu dní vo všetkých svetelných režimoch. V prípade PAR o nižšej intenzite (NS) bol uvedený pokles mierne spomalený oproti vzorkám v tme alebo oproti vzorkám na PAR o vyššej intenzite (VS). Pri aplikácii mT na segmenty starnúce v tme nebol pokles obsahu Chl ani parametra F_V/F_P spomalený ani v jednej z použitých koncentrácií. Bol pozorovaný naopak pokles parametrov oproti kontrolnému roztoku. To je v rozpore s výsledkami zistenými v práci Melkovičovej (2012), kde bol pokles týchto parametrov spomalený pri aplikácii mT na listové segmenty jačmeňa siateho, pričom najvýraznejšie spomalenie poklesu bolo pozorované pre koncentráciu 10^{-4} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M. U vzoriek na PAR varianty NS bolo zaznamenané mierne spomalenie priebehu senescencie pod vplyvom mT, v prípade koncentrácie 10^{-5} M a 10^{-4} M (Obr. 8, 9). Avšak tento pozitívny tento účinok nebol štatisticky významný. Toto

zistenie je v súlade s výsledkami zistenými v práci Melkovičovej (2012), kde bol obsah Chl i hodnota parametra F_V/F_P najviac spomalená koncentráciou 10^{-5} M a 10^{-4} M. Podobné výsledky zistili i Vlčková a kol. (2006) u oddelených listov pšenice, kde roztok mT spomalil pokles obsahu Chl i parametra F_V/F_P na svetle i v 6. deň po oddelení. U segmentov inkubovaných na PAR o vysokej intenzite (VS) došlo k výraznejšiemu poklesu obsahu Chl i F_V/F_P než u varianty NS, pričom najvýraznejší pokles bol pozorovaný pre koncentrácie $3 \cdot 10^{-4}$ M. Celkovo u genotypu WT bol najrýchlejší pokles parametrov zaznamenaný pre svetelný režim T a VS a pri inkubácii v roztoku mT o koncentrácii $3 \cdot 10^{-4}$ M. V kombinácii tejto koncentrácie a svetelného režimu VS potom došlo k prejavu negatívneho účinku na priebeh senescencie, tzn., že dochádzalo k urýchleniu poklesu oboch parametrov a teda i priebehu senescencie.

U kontrolných segmentov genotypu *ahk2,4* inkubovaných v tme (Obr. 14, 15) došlo k miernejšiemu poklesu obsahu Chl i parametra F_V/F_P oproti vzorkám WT (Obr. 8, 9). U vzoriek inkubovaných na NS resp. VS nebol zaznamenaný výraznejší účinok PAR na spomalenie parametrov oproti vzorkám v tme. Tento mutant má „vypnuté“ receptory AHK2 a AHK4 a funkčný je len receptor AHK3. Tento receptor je dôležitý pre sprostredkovanie účinkov CK spojených so senescenciou (Kim a kol., 2006; Riefler a kol., 2006). Predpokladá sa, že AHK2 a AHK4 hrajú pri sprostredkovaní tohto účinku minoritnú úlohu (Kim a kol., 2006). U vzoriek inkubovaných v tme (T), na ktoré bol aplikovaný roztok mT, bolo zaznamenané mierne spomalenie poklesu Chl v 2. a v 4. deň po oddelení pre koncentráciu 10^{-4} M a mierne spomalenie poklesu F_V/F_P v 2. d po oddelení pre koncentráciu $3 \cdot 10^{-4}$ M. Toto pozorovanie koreluje s poznatkom, že vďaka prítomnosti funkčného receptora AHK3 sa dá u listových segmentov inkubovaných v tme očakávať spomalenie priebehu senescencie. Avšak toto pozorovanie nebolo štatisticky preukazné a navyše v neskorších dňoch po oddelení (4. a 6.) sa účinok koncentrácie $3 \cdot 10^{-4}$ M zmenil na negatívny a došlo tu k rýchlejšiemu poklesu obsahu Chl i pomeru F_V/F_P oproti kontrole. Najvýraznejší pokles parametrov bol zaznamenaný na svetelnom režime T a VS v porovnaní s kontrolnými vzorkami inkubovanými v NS a v kombinácii týchto svetelných režimov a najvyššej koncentrácie $3 \cdot 10^{-4}$ M podobne ako u varianty WT.

U genotypu *ahk3,4* pre kontrolné vzorky (Obr. 20, 21) dochádzalo k najväčšiemu poklesu obsahu Chl v tme i na PAR o vyššej intenzite (VS) v porovnaní s ostatnými genotypmi. Hodnota obsahu Chl u vzoriek v tme poklesla do 6. dňa o 86 % a u vzoriek na VS o 63 %. Avšak oproti tomu hodnota parametra F_V/F_P u vzoriek v tme

neklesla výrazne (len o 20 %) a dokonca u vzoriek na VS táto hodnota do 6. dňa po oddelení stúpla o 16 %. Celkovo sú hodnoty F_V/F_P v 4. a v 6. deň pre vzorky mutanta *ahk3,4* inkubované na režime VS vyššie ako hodnoty u vzoriek typu *ahk2,3* (Obr. 9) alebo mutanta *ahk2,4* (Obr. 15). Toto pozorovanie je v súlade s tvrdením, že pri inkubácii listov tohto mutanta na PAR o vyššej intenzite dochádza v porovnaní napr. s mutantom *ahk2,3* alebo *ahk2,4* k najmenšiemu poklesu hodnoty F_V/F_M (Cortleven a kol., 2014). Tento genotyp nemá funkčné receptory AHK3 a AHK4 a funkčným receptorom ostáva AHK2. Ako bolo spomenuté vyššie, AHK3 je hlavný receptor sprostredkujúci účinky CK spojené so senescenciou. U tohto mutanta sa tak predpokladá, že bude dochádzať k urýchleniu senescencie u segmentov inkubovaných v tme. Toto tvrdenie je v súlade s pozorovaním, že u vzoriek inkubovaných v tme (T) v DMSO dochádzalo k oveľa výraznejšiemu poklesu obsahu Chl i pomeru F_V/F_P oproti segmentom varianty WT.

U genotypu *ahk3,4* podobne ako u WT (Obr. 8, 9) a *ahk2,4* (Obr. 14, 15) bol celkovo zaznamenaný negatívny účinok vyššej koncentrácie mT, tj. urýchlenie poklesu oboch parametrov.

U kontrolných segmentov genotypu *ahk2,3* podobne ako u *ahk3,4* došlo v tme k rýchlejšiemu poklesu hodnôt obsahu Chl i parametra F_V/F_P v dôsledku nefunkčnosti receptoru AHK3 (Obr. 26, 27). U vzoriek na PAR však došlo k výraznému spomaleniu tohto poklesu. Podľa Cortleven a kol. (2014) dochádza u tohto mutanta k výraznému poklesu parametra F_V/F_M pri pôsobení PAR o vysokej intenzite. V našom prípade je teda vidieť, že nami použitá intenzita $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nemala ešte škodlivý účinok na fotosystém II. V prípade segmentov *ahk2,3* inkubovaných v mT bol štatisticky preukazný opäť len negatívny účinok tohto CK.

Celkovo bol u vzoriek *Arabidopsis thaliana* pozorovaný v jednotlivých výsledkoch skôr negatívny účinok ako pozitívny na pokles obsahu Chl i pomeru F_V/F_P , tzn., že dochádzalo vo väčšine prípadov k urýchleniu poklesu týchto parametrov a tým k urýchleniu senescencie. Tento účinok je hlavne výrazný a najviac preukazný pre koncentráciu $3\cdot 10^{-4}$ M. Toto nepodchytenie pozitívneho účinku CK sa dá odôvodniť tým, že účinok CK závisí nielen od použitej koncentrácie a od použitých svetelných podmienok, ale i od použitého rastlinného druhu. Tento fakt sa mohol prejaviť i v našom experimente a z tohto dôvodu sme nemuseli podchytiť pozitívny účinok CK tak ako tomu bolo napr. v práci Melkovičová (2012). V našom prípade sa mohlo stať, že

sme sa pohybovali v oblasti koncentrácií, ktoré sú pre daný rastlinný druh vysoké a vo väčšine prípadov spôsobujú nie spomalenie senescencie, ale naopak jej urýchlenie.

Pohyb CP sme pozorovali prostredníctvom zmien hodnôt SPAD počas pôsobenia modrého svetla. Vďaka zmenám v hodnotách sa dajú odhadnúť typy pohybu CP. Pri aplikovaní vyšších svetelných intenzít dochádza u CP k reakcii „vyhnutie sa“, chloroplasty sa ukladajú po stranách palisádových buniek, aby sa minimalizovala absorpcia svetla o vyššej intenzite. Vďaka tomu dochádza k zvýšeniu hodnôt transmitancie cez list a na prístroji tak nameriame nižšie hodnoty SPAD. Naopak u vzoriek vystavených svetlu nižšej intenzity dochádza k reakcii „akumulácia“, chloroplasty sa ukladajú do vrchnej a spodnej strany buniek tak, aby bolo dosiahnuté maximálnej absorpcie. Dochádza tak k zníženiu hodnôt transmitancie a na prístroji nameriame vyššie hodnoty SPAD.

Pre preštudovanie vplyvu mT na zmeny pohybu CP súvisiace so senescenciou boli použité tri rastlinné druhy - *Arabidopsis thaliana* (v 4 rôznych genotypoch), jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.) a tabak virgínsky (*Nicotiana tabacum* L.).

V deň oddelenia pohyb CP obecné fungoval dobre u všetkých použitých genotypov *Arabidopsis thaliana*. V priebehu počiatočných 40 min aplikácie svetla o vyššej intenzite dochádzalo k poklesu hodnôt SPAD odrážajúc reakciu „vyhnutie sa“. Tento pokles sa pohyboval približne okolo 20 až 30 %. Pri aplikácii svetla o nižšej intenzite následne dochádzalo k nárastu SPAD (odrážajúceho akumuláciu pohybu CP) až na hodnotu spravidla o 5 až 9 % nižšiu akou bola hodnota počiatočná (v čase 0 min).

U genotypu WT vzoriek inkubovaných v tme (T) dochádzalo k inhibícii pohybu s nárastom počtu dní po oddelení (Obr. 13). U vzoriek inkubovaných v DMSO sa však na 6. deň obnovili zmeny v hodnotách SPAD na rozdiel od vzoriek v mT. U vzoriek na svetle (S) došlo k vymiznutiu „klasického“ priebehu v štvrtý deň podobne ako u vzoriek v T, ale zmeny hodnôt SPAD tu boli ešte výrazné. Dochádzalo k ich postupnému zvyšovaniu bez ohľadu na žiarenie, ktorému boli vzorky vystavené.

U genotypu *ahk2,4* bol u vzoriek inkubovaných v tme v DMSO (Obr. 19) podobne ako u typu WT (Obr. 13) inhibovaný pohyb CP na štvrtý deň po oddelení. Naproti tomu u vzoriek inkubovaných na PAR bol u oboch variant zaznamenaný „klasický“ priebeh krivky i v 4. deň po oddelení. Výraznejšie rozdiely v pôsobení mT na zmeny hodnôt SPAD však neboli pozorované.

U genotypu *ahk3,4* bol pohyb inhibovaný už na štvrtý deň po oddelení vo všetkých použitých variantách (Obr. 25), okrem varianty vzoriek inkubovaných v mT v tme (T - mT), kde ešte výrazne dochádzalo k pohybu „vyhnutie sa“ po aplikácii PAR o nižšej intenzite a následne k akumuláčnemu pohybu po aplikácii PAR o vyššej intenzite.

U genotypu *ahk2,3* došlo k vymiznutiu „klasického“ priebehu už v 4. deň po oddelení pre takmer všetky varianty (Obr. 31), okrem varianty kontrolných vzoriek inkubovaných na svetle (S - DMSO). Tu bol v 6. deň po oddelení evidovaný „klasický“ priebeh hodnôt SPAD a fungovali oba typy pohybu v závislosti na aplikácii príslušného PAR.

Ako je vidieť, v niektorých prípadoch dochádzalo ku inhibícii pohybu CP v 4. deň po oddelení, no na 6. deň k jeho obnoveniu. Tento jav by mohol byť spôsobený opakovanou manipuláciou so vzorkami, na ktoré je pohyb CP pravdepodobne citlivý. Celkovo je u *Arabidopsis* vidieť, že s dobou po oddelení dochádza k postupnej inhibícii pohybu chloroplastov. Inhibícia je vo väčšine prípadov výraznejšia u vzoriek inkubovaných v tme oproti vzorkám inkubovaných na PAR (viď napr. Obr. 19). Pre exogénnu aplikáciu mT nebol však zaznamenaný výraznejší účinok na zmeny resp. inhibíciu pohybu.

U jačmeňa siateho boli celkovo zmeny hodnôt SPAD vyvolané pohybom CP veľmi malé, čo by mohlo súvisieť so spôsobom postavenia listov voči dopadajúcemu PAR - u jačmeňa (obilnín, tráv) je postavenie listov viac rovnobežné so smerom dopadajúceho svetla v porovnaní napr. s tabakom. Takže by sa dalo predpokladať, že rozsah pohybu CP vyvolaného modrým PAR bude u jačmeňa menší. V tomto prípade však môže nastať problém s meraním pohybu CP chlorofylmetrom, ktorý je necitlivý na relatívne malé zmeny transmitancie spôsobené pohybom CP. S nárastom počtu dní po oddelení došlo v tme k inhibícii pohybu CP - najviac u varianty vzoriek inkubovaných v DMSO (Obr. 32). Oproti tomu u vzoriek inkubovaných na PAR dochádzalo k obom typom pohybu i na 3. deň, i keď vo veľmi malom rozsahu hodnôt SPAD. Pre exogénnu aplikáciu mT nebol, podobne ako u *Arabidopsis*, zaznamenaný výraznejší účinok mT na zmeny resp. inhibíciu pohybu.

U tabaku virgínskeho bol pozorovaný výraznejší účinok CK, presnejšie ich výrazne zvýšenej endogénnej koncentrácie, na pohyb CP, ako vyplynulo zo zrovnania medzi variantou DEX a ostatnými variantami. U tabaku varianty WT, Mok a 303 dochádzalo k približne rovnakým zmenám hodnôt SPAD takmer po všetky dni experimentu (Obr. 33, 34). Na druhej strane u vzoriek varianty DEX došlo k inhibícii

pohybu a tým k vymiznutiu „klasického“ priebehu už v prvý deň po aplikácii roztoku dexametazónu, ktorá indukovala zvýšenie endogénnej koncentrácie CK, a dochádzalo tu len k postupnému nárastu hodnoty SPAD. Táto rýchla inhibícia oboch typov pohybu v dôsledku nadmerne zvýšenej endogénnej koncentrácie CK zrejme súvisí s oxidatívnym poškodením (Novák a kol., 2013).

Ako je vidieť z vyššie uvedených pozorovaní, pohyb chloroplastov je pravdepodobne inhibovaný s procesom senescencie - u segmentov *Arabidopsis* a jačmeňa to bola senescencia vyvolaná oddelením listových segmentov a u tabaku nadmernou koncentráciou endogénnych CK. U vzoriek inkubovaných v tme nastupovala inhibícia pohybu CP pravdepodobne skôr ako u vzoriek na svetle (viď napr. jačmeň siaty Obr. 32). Avšak tieto závery by bolo potrebné overiť ďalším štúdiom.

7. ZÁVER

Je známe, že cytokiníny (CK) vplývajú na priebeh senescencie. Pri nižších koncentráciách hormónu obvykle dochádza k spomaleniu senescencie a procesov s ňou spojených, pri vyšších koncentráciách naopak k urýchleniu senescencie (napr. Zacharias a Reid, 1990; Vlčková a kol., 2006). Vplyv CK na priebeh senescencie sa tak líši v závislosti od použitej koncentrácie. Účinok CK na priebeh senescencie však môže byť ovplyvnený i svetlom. Obvykle, majú CK a svetlo do určitej miery pozitívny vplyv na senescenciu, avšak, ak dôjde ku aplikácii zvýšenej dávky svetla resp. intenzity v prítomnosti CK a/alebo ku zvýšeniu koncentrácie CK, dôjde k urýchleniu senescencie v dôsledku sčítania účinkov týchto dvoch činiteľov. V roku 2012 bol Husičkovou a kol. (2012) vytvorený model popisujúci túto koncentračnú a svetelnú závislosť účinku CK (Obr. 5), ktorého platnosť bola overená pre oddelené listy jačmeňa a cytokiníny mT a BAP v práci Melkovičovej (2012).

V predkladanej práci sme sa zamerali na štúdium týchto závislostí u rastlinného druhu *Arabidopsis thaliana* za použitia štyroch rôznych genotypov - wild-type (WT) a troch mutantov s ovplyvnenou percepciou CK receptorov (*ahk2,4*; *ahk3,4*; *ahk2,3*) a tým i na overovanie obecnnejšej platnosti vyššie spomenutého modelu. Oddelené listové segmenty jednotlivých genotypov boli inkubované v rôzne koncentrovanom roztoku *meta*-topolínu (mT) a v rôznych svetelných podmienkach. Miera senescencie bola hodnotená podľa poklesu obsahu chlorofylu (Chl) a parametra F_v/F_p vyjadrujúceho funkciu PSII.

V experimente sme zaznamenali u oddelených listových segmentov receptorových mutantov *ahk2,3* a *ahk3,4*, v dôsledku neprítomnosti receptoru AHK3, očakávaný výraznejší pokles obsahu Chl v tme v porovnaní s WT. Zatiaľ čo u genotypov WT a *ahk2,4* nebol pozorovaný výraznejší spomaľujúci účinok PAR na priebeh senescencie (na pokles obsahu Chl a parametra F_v/F_p), u *ahk2,3* a *ahk3,4* bol tento účinok zreteľný (hlavne v 4. a v 6. deň po oddelení), zrejme z dôvodu výraznejšieho urýchlenia senescencie v tme.

Exogénnou aplikáciou fytohormónu mT na oddelené listové segmenty *Arabidopsis thaliana* nedošlo k spomaleniu senescencie ani v jednej z použitých koncentrácií. Vo väčšine prípadov bol pozorovaný len negatívny účinok tj. urýchlenie poklesu meraných parametrov a tým i priebehu senescencie. Tento účinok bol výraznejší u svetelného režimu T a VS a pri použití najvyššej koncentrácie mT ($3 \cdot 10^{-4}$

M). Toto pozorovanie je možným dôsledkom faktu, že celkový charakter účinku CK nezávisí len od použitej koncentrácie a svetelných podmienok, ale i od použitého rastlinného druhu. Je možné, že nami zvolené koncentrácie mT neboli „optimálne“ pre spomalenie senescencie u tohto rastlinného druhu.

U experimentov testujúcich zmeny pohybu CP sme vo väčšine prípadov nezaznamenali výraznejší účinok mT na tento proces. Obecne došlo u použitých rastlinných vzoriek k inhibícii pohybu CP s nárastom doby po oddelení, pričom inhibícia bola výraznejšia v tme ako na PAR. U tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) sme zistili, že k inhibícii oboch typov pohybu CP dochádza po aplikácii roztoku DEX na rastliny, ktorý spôsobuje výrazný nárast v koncentrácii endogénnych CK a následne oxidatívne poškodenie (Novák a kol., 2013). Najmenší rozsah pohybu CP vyvolaného modrým svetlom bol zaznamenaný pre rastlinný druh jačmeň siaty. Toto pozorovanie môže byť spojené so spôsobom postavenia listov tohto rastlinného druhu (takmer paralelne s dopadajúcim svetlom oproti napr. tabaku), ktorého dôsledkom chloroplasty jačmeňa pravdepodobne nepotrebujú väčšiu reguláciu tohto pohybu.

Na základe získaných výsledkov a pozorovaní plánujeme v budúcnosti znovooverenie koncentračnej a svetelnej závislosti pre rastlinný druh *Arabidopsis thaliana* v účinku iných cytokinínových derivátov a iných koncentrácií fytohormónov.

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. *Physiol Plant*. 134:609-623
- Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *PNAS* 81: 5994-5998
- Armstrong DJ (1994) Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In *Cytokinins: Chemistry, activity and function* Mok DWS, Mok MC, eds. (Boca raton, FL: CRC press), pp. 1399-154
- Åstot C, Doležal K, Nordström A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua NH (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *PNAS* 97: 14778-14783
- Banaś AK, Aggarwal CH, Labuz J, Sztatelman O, Gabryś H (2012) Blue light signalling in chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany* 63: 1559-1574
- Barry GR, Rogers SG, Fraley RT, Brand L (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *PNAS* 81: 4776-4780
- Benková E, Witters E, Van Dongen W, Kolář J, Motyka V, Brzbohatý B, Van Onckelen HA, Macháčková I (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts, occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiol* 121: 245-251
- 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
- Brownlee BG, Hall RH, Whitty CD (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N⁶- Δ^2 -isopentenyladenine. *Canadian Journal of Biochemistry* 53: 37-41
- 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 the different light quanta fluence rates. *Photochemistry and Photobiology* 35: 217-221

- Carimi F, Terzi M, De Michele R, Zottini M, Lo Schiavo F (2004) High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Sci* 166: 963-969
- Caesar K, Thamm MK, Witthöft J, Elgass K, Huppenberger P, Grefen Ch, Horák J, Harter K (2011) Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* 62: 5571–5580
- Cortleven A, Noben JP, Valcke R (2011) Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study. *Proteome Science* 9: 33
- Cortleven A, Valcke R (2012) Evaluation of the photosynthetic activity in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: lessons from cytokinins. *Plant Physiol* 144: 394-408
- Cortleven A, Nitschke S, Klaumünzer M, AbdElgawad H, Asard H, Grimm B, Riefler M, Schmölling T (2014) A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the Arabidopsis histidin kinase2 and Arabidopsis histidin kinase3 receptors. *Plant Physiol* 164: 1470–1483
- Černý M, Dyčka F, Bobáľová J, Brzbohatý B (2011) Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling. *J Exp Bot* 62: 921-937
- Davis PA, Hanganter RP (2012) Chloroplast movement provides photoprotection to plants by redistributing PSII damage within leaves. *Photosynth Res.* 112: 153-161
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* 124: 1706-1717
- Dortay H, Gruhn N, Pfeifer A, Schwerdtner M, Schmölling T, Heyl A (2008) Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *J. Proteome Res.* 7: 3649-3660
- Ferreira FJ, Kieber JJ (2005) Cytokinin signaling. *Plant Biology* 8: 518-525
- Franco-Zorilla JM, Martin AC, Solano R, Rubio V, Leyva A, Paz-Ares J (2002) Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: 353-360

- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* 62: 2431-2452
- Frébortová J, Novák O, Frébort I, Jorda R (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *The Plant Journal* 61: 467–481.
- Gabrys H (2004) Blue light-induced orientation movements of chloroplasts in higher plants: Recent progress in the study of their mechanisms. *Acta physiologiae plantarum* 26: 476 - 478
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, Sauer P, Jacobsen S, Peč P (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur. J. Biochem.* 268: 450-461
- Galuszka P, Spíchal L, Kopečný D, Tarkowski P, Frébortová J, Šebela M, Frébort I (2008) Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in natural products chemistry* Atta-ur-Rahman, eds. (Elsevier, Amsterdam), 34: 203–264
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986–1988
- Gan S, Amasino RM (1996) Cytokinins in plant senescence: From spray to pray to clone and play. *Bioessays* 18: 557-565
- Gan S, Amasino RM (1997) Making sense of senescence - Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol* 113: 313-319
- Genkov T, Tsoneva P, Ivanova I (1997) Effects of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in vitro cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. *J Plant Growth Regul* 16: 169-172
- Hanano S, Domagalska MA, Nagy F, Davis SJ (2006) Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to Cells* 11: 1381-1392
- Heyl A, Schmölling T (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Current opinion in plant biology* 6: 480-488
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T (2004) In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8821-8826

- Hudák J, Vizárová G, Šikulová J, Ovečková O (1996) Effect of cytokinins produced by strains of *Agrobacterium tumefaciens* with binary vectors on plastids in senescent barley leaves. *Acta Physiol Plant* 18: 205-210
- Husičková A, Doležal K, Špundová M (2012) The light and concentration-dependence of cytokinin responses. Manuscript v přípravě.
- Hwang D, Chen HC, Sheen J (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 500-515
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389
- Choi, J, Hwang I (2007) Cytokinin: Perception, Signal Transduction and Role in Plant Growth and Development. *Journal of Plant Biol.* 50(2): 98-108
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* - *det* mutants have altered response to cytokinins. *Plant Physiol* 104: 339-347
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063
- Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42: 677-685
- Kakimoto T (2003a) Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.* 116: 233-239
- Kakimoto T (2003b) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 605-27
- Kamínek M, Motyka V, Vaňková R (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101: 689-700
- Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T (1999) Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 40: 767-71
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG, Hwang I (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA* 103: 814–819
- Kopečný D, Šebela M, Briozzo P, Spíchal L, Houba-Hérin N, Mašek V, Joly N, Madzak C, Anzenbacher P, Laloue M (2008) Mechanism-based inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase attack FAD cofactor. *J Mol Biol* 380: 886-99

- Königer M, Bollinger N (2012) Chloroplast movement behavior varies widely among species and does not correlate with high light stress tolerance. *Planta* 236: 411-426
- Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349
- Kraus TH, Hofstra G, Fletcher RA (1993) Regulation of senescence by benzylaminopurine and uniconazole in intact and excised soybean cotyledons. *Plant Physiol Bioch* 31: 827-834
- Kreslavski VD, Carpentier R., Klimov VV, Allakhverdiev SI (2009) Transduction mechanisms of photoreceptors signals in plant cells. *Journal of photochemistry and photobiology C; Photochemistry reviews* 10: 63-80
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445: 652–655
- Lawlor DW (2001) *Photosynthesis*. BIOS Scientific Publishers, Oxford
- Lerbs S, Lerbs W, Klyachko NL, Romanko EG, Kulaeva ON, Wollgiehn SR, Parthier B (1984) Gene expression in cytokinin and light-mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 162: 289–298
- Letham DS (1963) Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Sci* 8: 569–573
- Letham DS (1994) Cytokinins as phytohormones – sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In *Cytokinins: Chemistry, activity and function*. Mok DWS, Mok MC, eds. (Boca raton, FL: CRC press), pp. 57-80
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Döll M, Fietz HJ, Bach T, Kozel U, Meier D and Rahmsdorf U (1981) Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves *Photosynthesis Res.* 2: 115–141
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-382
- Logan BA, Demmig-Adams B, Adams WWIII (1999) Acclimation of photosynthesis to the environment. In: *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis* Singhal GS, Renger G, Sopory, SK, Irrgang KD, Govindjee, eds. (Narosa Publishing House, New Delhi), pp. 477-512

- Lohrmann J, Buchholz G, Keitel C, Sweere U, Kircher S (1999) Differential expression and nuclear localization of response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 1:495-505
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MYu, Osolodkin DI, Romanov GA (2012) Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae* 4(3): 31–45
- Martin AC, del Pozo JC, Iglesias J, Rubio V, Solano R, de la Peña A, Leyva A, Paz-Ares J (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 24(5): 559-567
- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfrey PN, Helauritta Y (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 14: 2938-2943
- Melkovičová H (2012) Koncentračná závislosť účinkov cytokinínov na indukovanú senescenciu rastlín. Bakalárska práca, UP Olomouc
- Miller CO, Skoog F, von Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1392-1392
- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad M a Spíchal L (2011) N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* 72: 821-831
- Mlejnek P, Doležal P, Procházka S (2003) Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Environ* 26: 1723-1735
- Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89-118
- Mok MC (1994) Cytokinins and plant development: an overview. In: *Cytokinins: chemistry, activity and function* Mok DWS, Mok MC, eds. (Boca Raton, FL: CRC), pp. 167-178
- Mok MC, Martin RC, Dobrev PI, Vankova R, Ho PS, et al. (2005) Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin *O*-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiol.* 137:1057–66
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh NN (1999) Isolation of gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 328-33

- Mougel, C., Cournoyer B, Nesme X (2001) Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti-plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Applied Environmental Microbiology*. 67(1): 65-74.
- Mougel C, Zhulin IB (2001) CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem. Sci.* 26: 582-84
- Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczyglowski K (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315: 101–104
- Mýtinová Z, Motyka V, Haisel D, Lubovská Z, Trávníčková A, Dobrev P, Holík J, Wilhelmová N (2011) Antioxidant enzymatic protection during tobacco leaf ageing is affected by cytokinin depletion. *Plant Growth Regul* 65: 23-34
- Mýtinová Z, Haisel D, Wilhelmová N (2006) Photosynthesis and protective mechanisms in transgenic tobacco leaves with overexpressed cytokinin oxidase/dehydrogenase and thus lowered cytokinin content during ageing. *Photosynthetica* 44: 599-605
- Nauš J, Prokopová J, Řebíček J, Špundová M (2010) SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynthesis research* 105: 265-271
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1365-1377
- Noodén D. L, Guamét J. J, John I (1997) Senescence mechanisms. *Physiol Plant* 101: 746-753
- Noodén LD (1988) The phenomenon of senescence and aging. In: *Senescence and Aging in Plants* Nooden LD, Leopold AC (Academic Press, San Diego), pp. 1–50
- Nooden LD, Leopold AC (1978) Fytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission. In *Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise*, Letham DS, Goodwin PB, Higgins TJV, eds. (Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press), pp. 329-369

- Novák J, Pavlů J, Novák O, Nožková-Hlaváčková V, Špundová M, Hlavinka J, Koukalová Š, Skalák J, Černý M, Brzobohatý B (2013) High cytokinin levels induce a hypersensitive-like response in tobacco. *Annals of botany* 112: 41-55
- Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Åstot C, Doležal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8039-8044
- Ogwenó 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
- Pischke MS, Jones LG, Otsuga D, Fernandez DE, Drews GN, Sussman MR (2002) An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15800-15805
- Pospišilová J, Čatský J, Synkova H, Macháčková I, Solárová J, (1993) Gas exchange and *in vivo* chlorophyll fluorescence in potato and tobacco plantlets *in vitro* as affected by various concentrations of 6-benzylaminopurine. *Photosynthetica* 29: 1-12
- Pospišilová J, Rulcová J, Vomáčková L (2001) Effect of benzyladenine and hydroxybenzyladenosine on gas exchange of bean and sugar beet leaves. *Biol Plantarum* 44:523-528
- Prokopová J, Špundová M, Sedlářová M, Husičková A, Novotný R, Doležal K, Nauš J, Lebeda A (2010) Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiol Bioch* 48: 716-723
- Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* *Physiol Plant* 132: 1998-2011
- Rashotte AM, Chae HS, Maxwell BB, Kieber JJ (2005) The interaction of cytokinin with other signals. *Physiol Plant* 123:184-194
- Redig P, Shaul O, Inze D, Van Montagu M, Van Onckelen H (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle synchronized tobacco BY-2 cells. *FEBS Lett.* 391: 175-80
- Riefler M, Novák O, Strnad M, Schmölling T (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism: *Plant Cell* 18: 40–54

- Romanov GA, Lomin SN, Schmulling T (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* 57: 4051-4058
- Rulcová J, Pospíšilová J (2001) Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biol Plantarum* 44: 75–81
- Rupp H, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmulling 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(5): 357-363
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie J, Briggs WR, Wada M, Okada K (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6969-74
- Sakakibara H, Suzuki M, Takei K, Deji A, Taniguchi M, Sugiyama T (1998) A response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant J.* 14: 337-44
- Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 431-449
- Sakakibara H, Takei K, Hirose N (2006) Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science* 11: 440-448
- Sakakibara H, Takei K (2002) Identification of cytokinin biosynthesis genes in *Arabidopsis*: a breakthrough for understanding the metabolic pathway and the regulation in higher plants. *J. Plant Growth Regul.* 21: 17-23
- Schäfer E, Bowle CH (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO reports* 3: 1042–1048
- Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/ dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* 116: 241–252
- Schmülling T (2002) New insights into the functions of cytokinins in plant development. *J Plant Growth Regul* 21: 40-49
- Smart CM (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol* 126: 419-448
- Sun J, Niu Q, Tarkowski P, Zheng B, Tarkowska D, Sandberg G, Chua N, Zuo J (2003) The *Arabidopsis AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol* 131: 167–176

- Sun J, Hirose N, Wang X, Wen P, Xue L, Sakakibara H, Zuo J (2005) *Arabidopsis* SOI33/AtENT8 gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport *in planta*. *Journal of Integrative Plant Biol.* 47: 588-603
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H, Mizuno T (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* 42: 107-113
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmülling T (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* 45: 1299–1305
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, Achazi K, Romanov GA, Schmulling T (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant Journal* 67: 157-168
- Suetsugu N, Kagawa T, Wada M (2005) An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 151–162.
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Bäurle I, Kudla J, Nagy F, Schäfer E and Harter K (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 294: 1108-1111
- Fankhauser C (2002) Light perception in plants: cytokinins and red light join forces to keep phytochrome B active. *Trends in Plant Science* 7: 143-145
- Synková H, Schnablová R, Polanská L, Hušák M, Šiffel P, Vácha F, Malbeck J, Macháčková I, Nebesářová J (2006) Three-dimensional reconstruction of anomalous chloroplasts in transgenic *ipt* tobacco. *Planta* 223: 659-671
- 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
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 26405-26410

- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004a) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin *thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 41866-41872
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H (2004b) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1053-1062
- Thomas TH, Hare PD, van Staden J (1997) Phytochrome and cytokinin responses. *Plant Growth Regulation* 23: 105-122
- To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE and Kieber JJ (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* 19: 3901-3914
- To JPC and Kieber JJ (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci* 13: 85-92
- Tran LS, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamauchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20623-20628
- Trojan A, Gabryś H (1996) Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L.) depends on light conditions during growth. *Plant Physiol* 111: 419-425
- Ueguchi C, Sato S, Kato T and Tabata S (2001) The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42: 751-755
- Urao T, Yakubov B, Yamaguchi-Schinozaki K, Shinozaki K (1998) Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 427: 175-78
- Vescovi M, Riefler M, Gessuti M, Novák O, Schmülling T, Lo Schiavo F (2012) Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in *Arabidopsis* cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CRE1/AHK4. *Journal of Experimental Botany* 63: 2825-2832
- 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
- Wada M (2013) Chloroplast movement. *Plant Science* 210: 177–182
- Wada M, Kagawa T, Sato Y (2003) Chloroplast movement. *Annu Rev Plant Biol* 54: 455–468
- Walczak T, Gabryś H (1980) New type of photometer for measurements of transmission changes corresponding to chloroplast movements in leaves. *Photosynthetica* 14: 65–72
- Wareing PF, Khalifa MM, Treharne KJ (1968) Rate-limiting processes in photosynthesis at saturating light intensities: *Nature* 220: 453–457
- Werner T, Holst K, Pörs Y, Guivarc'h A, Mustroph A, Chriqui D, Grimm B, Schmölling 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, Schmölling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* 15: 2532–2550
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmölling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS* 98: 10487–10492
- Werner T., Schmölling T (2009). Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 527–538
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmölling T, (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Physiol Plant* 156: 1808–1818
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* 42: 1017–1028
- Yang S, Yu H, Yu Y, Goh CJ (2003) Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid DSCKX1. *FEBS Letters* 555: 291–296
- Yang HQ, Tang RH and Cashmore AR (2001) The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* 13: 2573–2587

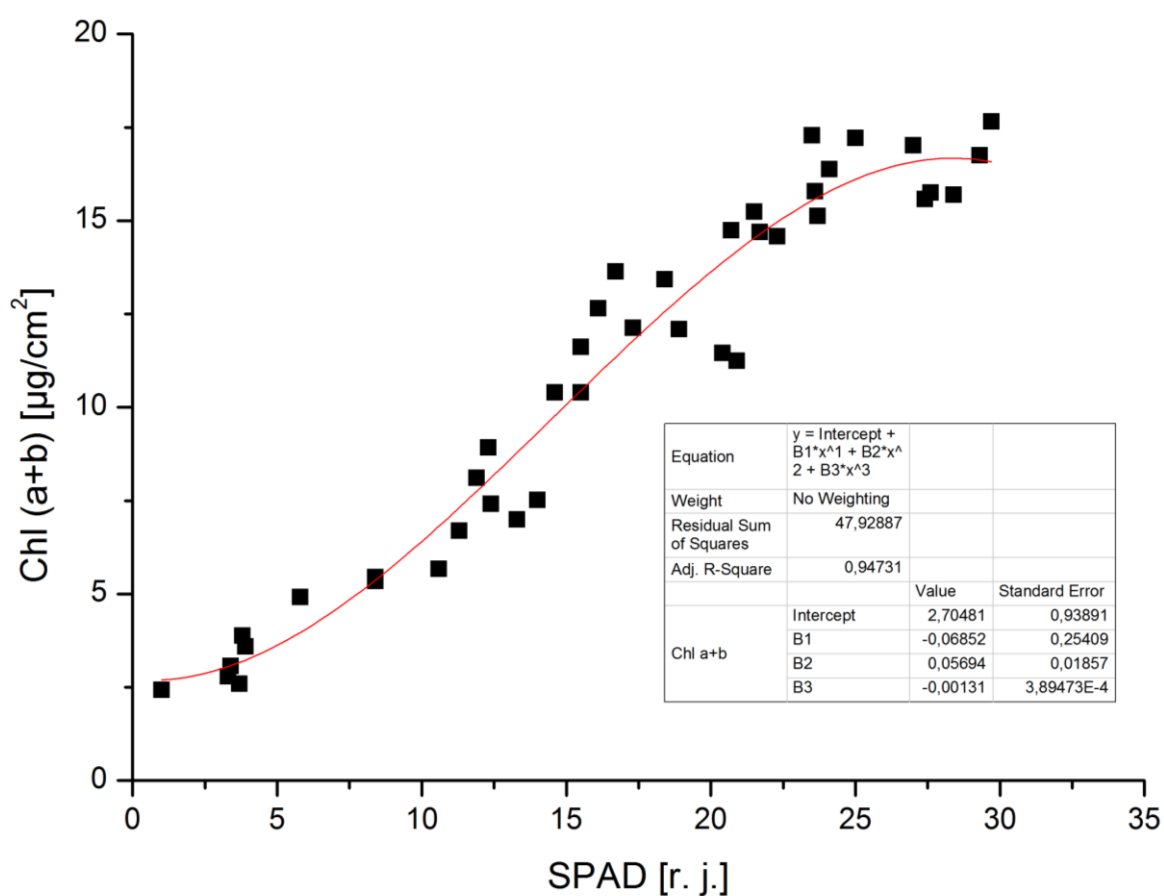
- Zacharias L, Reid SM (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol* 80: 549–554
- Zubo YO, Yamburenko Mv, Selivanka SY, Shakirova FM, Avalbaev AM, Kudryakova NV, Zubkova NK, Leire K, Kulaeva ON, Kusnetsov V, Börner T (2008) Cytokinin stimulates chloroplast transcription in detached barley leaves. *Plan Physiol*. 148: 1082-1093

PRÍLOHY

PRÍLOHA 1: Kalibračná krivka pre Chlorofylmeter SPAD-502 pre rastlinný druh *Arabidopsis thaliana*

PRÍLOHA 1

Kalibračná krivka pre Chlorofylmeter SPAD-502 pre rastlinný druh *Arabidopsis thaliana*



Obr. 35: Kalibračná krivka pre Chlorofylmeter SPAD-502 vyjadrujúca závislosť medzi hodnotami Chl v relatívnych jednotkách zmeranými pomocou chlorofylmetra SPAD-502 a hodnotami koncentrácie Chl (a+b) vzťahnutých na jednotku plochy P listov *Arabidopsis thaliana*.