

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv světla na změny obsahu chlorofylu a funkce
fotosystému II během indukované senescence rostlin
se změněnou endogenní koncentrací nebo percepcí cytokininů**

Vypracovala:

Eva Pilařová

Obor:

Experimentální biologie

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Martina Špundová, Ph.D.

Děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Martině Špundové, Ph.D., za pedagogickou a odbornou pomoc, a také za věnované úsilí a čas. Dále děkuji Bc. Heleně Melkovičové za cenné rady a pomoc při měření.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Martiny Špundové, Ph.D., a za použití odborné literatury a dalších informačních zdrojů uvedených v seznamu literatury na konci práce. Kalibrace chlorofylmetru SPAD-502 na skutečný obsah chlorofylu pomocí analytického měření byla provedena ve spolupráci s Bc. Helenou Melkovičovou.

V Olomouci dne: _____

Souhrn

Senescence rostlin je ovlivňována mnoha faktory včetně fotosynteticky aktivního záření (FAR) a cytokininů (CK). Vliv FAR na účinek CK při senescenci nebyl prozatím zcela prostudován. U rostlin s ovlivněným (zvýšeným nebo sníženým) obsahem endogenních cytokininů nebo s ovlivněnou percepcí CK byl v souvislosti s indukovanou senescencí oddělených listů většinou posuzován pouze průběh senescence ve tmě.

V práci byl studován vliv FAR o nízké ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ozářenosti na rychlost senescence oddělených listů různých variant rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) s pozměněnou percepcí nebo koncentrací CK. Jednalo se o receptorové „knock-outy“ *ahk2 ahk3*, *ahk2 ahk4* a *ahk3 ahk4* a o mutanty *pga22*, u kterých byl pomocí aplikace 17- β -estradiolu (*pga22(I)*) navýšen obsah CK. Jako kontrolní varianta byly použity rostliny „wild-type“ (wt). Míra senescence oddělených listů byla posuzována podle obsahu chlorofylu a hodnoty parametru F_v/F_p , který odráží účinnost fotochemie fotosystému II.

U oddělených listů receptorových mutantů *ahk2 ahk3* a *ahk3 ahk4* inkubovaných ve tmě způsobila ztráta receptoru AHK3 mírné urychlení senescence oproti wt a mutantu *ahk2 ahk4*. Zatímco u variant wt a *ahk2 ahk4* nebyl pozorován zpomalující účinek FAR na pokles obsahu Chl, u *ahk2 ahk3* a *ahk3 ahk4* byl tento efekt průkazný. Nepřítomnost receptoru AHK3 při indukované senescenci by tedy mohla být do jisté míry kompenzována přítomností FAR.

Předpokládaná zvýšená koncentrace CK v listech *pga22(I)* zpomalila snížení funkce PSII u listů inkubovaných ve tmě. V přítomnosti FAR se pozitivní vliv zvýšené koncentrace CK s dobou po oddělení změnil v negativní, což by mohlo souviset s nárůstem oxidativního poškození v důsledku přexcitování fotosyntetického aparátu.

Summary

Plant senescence is influenced by many factors including photosynthetically active radiation (PAR) and cytokinins (CK). The influence of PAR on the CK effect on senescence has not yet been fully elucidated. In plants with altered levels (increased or decreased) of endogenous CK or plants with affected perception of CK only dark-senescence of detached leaves is usually studied.

In this study the influence of low PAR ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and high PAR ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) on the senescence was examined in detached leaves of different variants of *Arabidopsis* plants (*Arabidopsis thaliana* L.) with altered perception or concentration of CK: double receptor knock - outs *ahk2 ahk3*, *ahk2 ahk4* and *ahk3 ahk4*, and *pga22* mutant with increased CK content induced by 17- β -estradiol (*pga22(I)*). Wild-type (wt) plants were used as a control variant. Chlorophyll content and F_v/F_p parameter reflecting the efficiency of photosystem II photochemistry were used for the evaluation of senescence rate.

In detached leaves of the receptor mutants *ahk2 ahk3* and *ahk3 ahk4* incubated in the dark a loss of the receptor AHK3 caused a slight acceleration of senescence compared to the wt and the *ahk2 ahk4* mutant. A slowing effect of PAR on the decrease in chlorophyll content was observed in *ahk2 ahk3* and *ahk3 ahk4* leaves but not in wt and *ahk2 ahk4* ones. The absence of the receptor AHK3 could be therefore compensated to some extent by the PAR.

The expected higher CK concentration in *pga22(I)* leaves slowed down the inhibition of function PSII in the leaves incubated in the dark. In the presence of PAR the positive effect of increased CK concentration changed during the time after detachment to negative, which could be related to the increased oxidative damage due to the overexcitation of photosynthetic apparatus.

Seznam zkratek

AHK2	- cytokininový receptor (<i>Arabidopsis</i> histidine kinase)
<i>ahk2,3</i>	- dvojitý mutant <i>ahk2 ahk3</i> (bez receptorů AHK2 a AHK3)
<i>ahk2,4</i>	- dvojitý mutant <i>ahk2 ahk4</i> (bez receptorů AHK2 a AHK4)
AHK3	- cytokininový receptor (<i>Arabidopsis</i> histidine kinase)
<i>ahk3,4</i>	- dvojitý mutant <i>ahk3 ahk4</i> (bez receptorů AHK3 a AHK4)
AHK4	- cytokininový receptor (<i>Arabidopsis</i> histidine kinase)
BAP	- 6-benzylaminopurin
CK	- cytokinin(y)
CKX	- cytokininoxidasa/dehydrogenasa
CO ₂	- oxid uhličitý
dpo	- den (dny) po oddělení
F ₀	- minimální intenzita fluorescence
FAD	- flavinadenindinukleotid
FAR	- fotosynteticky aktivní záření
F _m	- maximální intenzita fluorescence
F _p	- maximální naměřená intenzita fluorescence
F _v	- variabilní fluorescence
F _v /F _{m(p)}	- maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
Chl	- chlorofyl
IK	- kontinuální FAR o intenzitě $370 \pm 40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
IP	- periodické FAR o intenzitě $370 \pm 40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
IPT	- isopentenyltransferasa
mT	- <i>meta</i> -topolin
NK	- kontinuální FAR o intenzitě $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
NP	- periodické FAR o intenzitě $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
q _p	- fotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
ROS	- reaktivní formy kyslíku
Rubisco	- ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa
T	- tma
wt	- wild-type

Obsah

1. ÚVOD	1
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY	2
2.1 Senescence	2
2.1.1 Vliv světelných podmínek na senescenci	3
2.2 Cytokininy	6
2.2.1 Vliv cytokininů na senescenci	6
2.3 Rostliny se změněnou endogenní hladinou nebo percepcí cytokininů	8
2.3.1 Receptorové „knock-outy“ (<i>ahk2</i> , <i>ahk3</i> , <i>ahk4</i>)	8
2.3.2 Mutant <i>pga22</i>	10
2.4 Vliv světelných podmínek na účinek cytokininů na senescenci	10
3. CÍLE PRÁCE	12
4. MATERIÁL A METODY	13
4.1 Rostlinný materiál	13
4.2 Použité metody	15
4.2.1 Stanovení obsahu chlorofylu	15
4.2.2 Kalibrační křivka pro chlorofylmetr SPAD-502	15
4.2.3 Stanovení parametru F_v/F_p	16
4.3 Statistické zpracování výsledků	17
5. VÝSLEDKY	18
5.1 Varianta <i>wt</i>	18
5.1.1 Obsah chlorofylu	18
5.1.2 Parametr F_v/F_p	18
5.2 Varianta <i>ahk2,3</i>	21
5.2.1 Obsah chlorofylu	21
5.2.2 Parametr F_v/F_p	23
5.3 Varianta <i>ahk3,4</i>	25
5.3.1 Obsah chlorofylu	25
5.3.2 Parametr F_v/F_p	25
5.4 Varianta <i>ahk2,4</i>	28
5.4.1 Obsah chlorofylu	28
5.4.2 Parametr F_v/F_p	28

5.5	Varianta <i>pga22</i>	31
5.5.1	Obsah chlorofylu.....	31
5.5.2	Parametr F_v/F_p	31
5.6	Varianta <i>pga22(I)</i>	34
5.6.1	Obsah chlorofylu.....	34
5.6.2	Parametr F_v/F_p	34
6.	DISKUSE.....	37
7.	ZÁVĚR.....	41
8.	SEZNAM LITERATURY.....	42
	PŘÍLOHY.....	46

1. ÚVOD

Senescence je přirozený, geneticky řízený proces, který je ovlivňován mnoha faktory. Mezi ně patří světelné podmínky a cytokininy. Vliv fotosynteticky aktivního záření (FAR) ve spojení s působením cytokininů (CK) nebyl prozatím zcela prozkoumán. Senescence je ovlivněna intenzitou FAR i dobou jeho působení, přičemž v případě oddělených listů (při tzv. indukované senescenci) probíhá nejrychleji zpravidla ve tmě, poté na FAR o vysoké ozáření a nejpomaleji u listů na FAR o nízké ozáření. Se senescencí dochází k poklesu obsahu chlorofylu a parametru F_v/F_m odrážejícího fungování fotosystému II.

Cytokininy zpravidla zpomalují senescenci, ale za určitých okolností ji mohou i urychlit (např. Vlčková a kol. 2006, Melkovičová 2012). Urychlení senescence nastává při vysokých koncentracích CK a/nebo při současném působení vyšší intenzity nebo dávky FAR. U rostlin se změnou endogenní koncentrací cytokininů zpravidla dochází se zvýšením koncentrace CK ke zpomalení senescence (např. Petit-Paly a kol. 1999) a se snížením koncentrace CK k jejímu urychlení (např. Werner a kol. 2008). V souvislosti s působením CK může být rychlost senescence ovlivněna také prostřednictvím receptorů CK. V rámci receptorů AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4 je za hlavní receptor ovlivňující rychlost senescence považován AHK3, zatímco vliv receptorů AHK2 a CRE1/AHK4 se považuje spíše za vedlejší (Kim a kol. 2006).

Cílem bakalářské práce bylo posoudit vliv FAR o nízké ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ozáření na rychlost senescence oddělených listů různých variant rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) s pozměněnou percepcí nebo koncentrací CK. Jednalo se o receptorové „knock-outy“ *ahk2 ahk3*, *ahk2 ahk4* a *ahk3 ahk4* a o mutanty *pga22*, u kterých byl pomocí aplikace 17- β -estradiolu navýšen obsah CK. Jako kontrolní varianta byly použity rostliny „wild-type“ (wt). Míra senescence oddělených listů byla posuzována podle obsahu chlorofylu a hodnoty parametru F_v/F_p , který odráží účinnost fotochemie fotosystému II.

2. PŘEHLED PROBLEMATIKY

2.1 Senescence

Senescence, biologické stárnutí, patří mezi přirozené procesy probíhající v rostlině a je poslední a zároveň velmi důležitou fází životního cyklu rostlin (Gan a Amasino 1997, Lim a kol. 2007). Je to geneticky naprogramovaný proces zahrnující změny ve struktuře a funkci buněk vedoucí až k jejich smrti. Tento složitý proces je spojen s postupnými změnami v buněčné fyziologii, genové expresi a biochemii (Breeze a kol. 2011). Senescenci lze rozdělit na přirozenou a indukovanou. Přirozená senescence probíhá koordinovaně od špičky a okrajů listů až po samotnou bázi listů. Je řízena především geneticky, ovšem ovlivňují ji i jiné faktory. Indukovaná senescence může být navozena např. oddělením listu, působením patogenů nebo změnou faktorů prostředí.

Hlavním viditelným příznakem senescence je žloutnutí listů, které je způsobeno rozpadem chlorofylu (Chl) (Zacharias a Reid 1990, Noodén a kol. 1997, Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006). Důležitým ukazatelem senescence je tedy úbytek množství chlorofylu, proto je podle tohoto parametru obecně posuzována míra senescence. Během senescence se mění tvar chloroplastů z elipsovitého na sférický, dochází k neuspořádanosti tylakoidních membrán a nahromadění plastoglobulí (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006). Strukturální změny fotosyntetického aparátu během senescence jsou doprovázeny zhoršením jeho funkce. Dochází ke snížení maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (PSII), který je vyjadřován jako poměr F_v/F_m (resp. F_v/F_p) a ke snížení fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (Vlčková a kol. 2006). Rychlost asimilace oxidu uhličitého (CO_2) je také snížena (Gan a Amasino 1995, Rulcová a Pospíšilová 2001, Vlčková a kol. 2006). Při senescenci zpravidla dochází k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) a k nárůstu oxidativního poškození včetně peroxidace lipidů (Vlčková a kol. 2006).

Senescence je ovlivněna řadou různých faktorů. Mezi vnější faktory ovlivňující senescenci se řadí zejména FAR, délka dne, teplota, dostupnost vody a živin a patogenní infekce. Mezi vnitřní faktory ovlivňující senescenci patří např. obsah a vzájemné poměry obsahu rostlinných hormonů a stupeň ontogeneze (Guo a Gan 2005, Lim a kol. 2007).

2.1.1 Vliv světelných podmínek na senescenci

Úloha světelných podmínek při senescenci zatím nebyla zcela prostudována. Z obecného hlediska lze říci, že senescence probíhá pomaleji na světle než ve tmě. Bylo zjištěno, že FAR na jedné straně podporuje senescenci tím, že zvyšuje aktivitu cytokininoxidasy/dehydrogenasy (CKX), což je enzym katalyzující degradaci rostlinných hormonů cytokininů a dochází tak k rychlejšímu odbourání cytokininů, na druhou stranu dokáže mírně potlačit senescenci tím, že zpomaluje degradaci Chl a úbytek fotosyntetických proteinů (Werner a kol. 2006, Schlüter a kol. 2011).

Senescence je ovlivňována intenzitou a dobou působení FAR. Zkrácením doby působení FAR a/nebo snížením jeho intenzity mohou být navozeny změny spojené se senescencí, jako je snížení obsahu Chl, pokles hodnoty F_v/F_m nebo fotochemického zhášení (q_p) a zvýšení míry lipidové peroxidace (Vlčková a kol. 2006, Annanieva a kol. 2008). Při působení FAR o vysoké intenzitě může dojít k urychlení senescence vlivem fotooxidativního poškození fotosyntetického aparátu, které je způsobeno přexcitováním fotosyntetického aparátu vedoucím k akumulaci ROS (Vlčková a kol. 2006).

Vlčková a kol. (2006) zjistili, že u oddělených listů pšenice inkubovaných ve tmě došlo ke změnám v chloroplastech jak ve tvaru, tak v jejich uspořádání a ultrastruktuře. Tvar chloroplastů byl změněn z elipsovitého na sférický a došlo k akumulaci plastoglobulí. Na rozdíl od oddělených listů inkubovaných ve tmě nedošlo u oddělených listů inkubovaných na kontinuálním FAR (o intenzitě $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) k tak výrazné změně chloroplastů: akumulace plastoglobulí byla potlačena a byla lépe zachována struktura gran. Během senescence na kontinuálním FAR došlo v chloroplastech k nahromadění asimilátů v podobě škrobových zrn. Ve tmě i na kontinuálním FAR byla v oddělených listech pozorována snížená rychlost asimilace CO_2 (Vlčková a kol. 2006).

Senescence je tedy výrazně ovlivněna světelnými podmínkami, a to jak intenzitou PAR, tak dobou jeho působení. V případě oddělených listů senescence zpravidla probíhá nejrychleji ve tmě, poté na FAR o vysoké ozáření a nejpomaleji na FAR o nízké ozáření (např. Špundová a kol. 2003). Typickým znakem chloroplastů během indukované senescence oddělených listů na FAR je výskyt škrobových zrn, který je způsoben přetrvávající funkcí fotosyntetického aparátu, zabráněním transportu asimilátů do jiné části rostliny a případně také vystavením kontinuálnímu světlu bez temnotní fáze (Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006).

2.1.1.1 Vliv světelných podmínek na změny obsahu chlorofylu

Schlüter a kol. (2011) pozorovali vliv světla na změny obsahu Chl u ječmene (*Hordeum vulgare* L.): po 5-ti denní inkubaci oddělených listů ve tmě a na periodickém FAR o nízké ozáření (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) byl obsah Chl u listů ve tmě menší.

V bakalářské práci Melkovičové (2012) byly pozorovány změny obsahu Chl v oddělených listech ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) inkubovaných při různých světelných podmínkách: tma (T), periodické FAR o intenzitě 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NP), kontinuální FAR o intenzitě 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (NK), periodické FAR o intenzitě 370 \pm 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (IP) a kontinuální FAR o intenzitě 370 \pm 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (IK). U oddělených listů ječmene inkubovaných jak na FAR, tak ve tmě, došlo k postupnému snížení obsahu Chl s dobou po oddělení, nicméně výraznější pokles obsahu Chl byl pozorován ve tmě. Třetí den po oddělení byl nejnižší obsah Chl zaznamenán u oddělených listů inkubovaných ve tmě a nejvyšší obsah Chl byl u listů variant IP a IK. U oddělených listů inkubovaných na FAR o nižší intenzitě (NP a NK) došlo k rychlejšímu poklesu obsahu Chl než u oddělených listů inkubovaných na vysokých světelných intenzitách (IP a IK), a zároveň k pomalejšímu poklesu obsahu Chl oproti tmě (T). Ovšem 12. dpo již nebyly vzorky inkubované ve tmě a na IK měřitelné a nejvyšší obsah Chl byl zaznamenán u listů na NP a NK.

FAR tedy výrazně ovlivňuje rychlost poklesu obsahu Chl v oddělených listech: u listů inkubovaných ve tmě dochází zpravidla k rychlejšímu poklesu obsahu Chl než na FAR (např. Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006, Schlüter a kol. 2011, Melkovičová 2012), nicméně pokud je intenzita nebo dávka FAR vysoká, pokles obsahu chlorofylu může být oproti tmě naopak urychlen (Vlčková a kol. 2006, Melkovičová 2012).

2.1.1.2 Vliv světelných podmínek na změny parametru F_v/F_m

Kromě rychlosti poklesu obsahu Chl ovlivňuje FAR také rychlost poklesu F_v/F_m vyvolaného senescencí (např. Špundová a kol. 2003, Kim a kol. 2006, Vlčková a kol. 2006). Obecně lze říci, že parametr F_v/F_m klesá nejrychleji u rostlin inkubovaných ve tmě. Největší zpomalení poklesu parametru F_v/F_m způsobuje FAR o nízké ozáření. FAR o vysoké ozáření způsobuje zpomalení poklesu parametru F_v/F_p oproti tmě a urychlení poklesu F_v/F_p oproti FAR o nízké ozáření (Thimann a kol. 1977, Kar a kol. 1993, Chang a Kao 1998 – cit. v Špundová a kol. 2003).

Například Špundová a kol. (2003) pozorovali po 5-ti denní inkubaci oddělených listů ječmene (*Hordeum vulgare* L.) ve tmě snížení parametru F_v/F_m z hodnoty 0,8 na 0,55. U oddělených listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření (90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) došlo k menšímu snížení parametru F_v/F_m (z 0,8 na 0,75), což indikovalo lepší udržení funkce PSII ve srovnání s listy ve tmě.

V práci Melkovičové (2012) byly pozorovány změny poměru F_v/F_p u oddělených listů ječmene inkubovaných při různých světelných podmínkách (T, NP, NK, IP a IK). K nejrychlejšímu poklesu parametru F_v/F_p došlo u oddělených listů inkubovaných ve tmě a na světelném režimu IK. U oddělených listů ječmene inkubovaných na světelných variantách NP, NK a IP došlo ke zpomalení poklesu F_v/F_p . K nejvýraznějšímu zpomalení poklesu F_v/F_p došlo u světelných režimů NP a NK.

Ze srovnání doby působení FAR (periodické a kontinuální) lze říci, že periodické FAR pokles F_v/F_p zpomalilo více než FAR kontinuální, přičemž výraznější zpomalení způsobilo periodické FAR o nižší intenzitě (NP) ve srovnání s intenzitou vyšší (IP) (Melkovičová 2012). Z toho lze usoudit, že z hlediska zpomalení senescence je pro rostlinu výhodnější periodický světelný režim než kontinuální.

Z výše uvedeného vyplývá, že vliv FAR na senescenci je určován jeho intenzitou a dávkou. Podle Melkovičové (2012) je při nižší intenzitě FAR senescence zpomalena, ovšem zvýší-li se intenzita nad určitou („hraniční“) hodnotu, dojde k urychlení senescence, které zřejmě souvisí s přeexcitováním fotosyntetického aparátu, akumulací ROS a následným fotooxidativním poškozením (Vlčková a kol. 2006). Podle Melkovičové (2012) bude zřejmě „hraniční“ hodnota intenzity FAR záviset na intenzitě FAR, při které rostlina rostla, resp. na kterou byla aklimatizována.

2.2 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony patřící mezi regulátory růstu rostlin. Cytokininy jsou produkovány jak podzemní částí rostliny, tedy kořeny, tak nadzemními částmi rostliny jako jsou stonky, listy, šišule nebo květy (Miyawaki a kol. 2004). Prvním objeveným CK byl trans-zeatin (Letham 1963).

Cytokininy lze rozdělit na přirozené a umělé. Přirozené CK jsou N^6 - substituované deriváty adeninu s aromatickým nebo isoprenoidním postranním řetězcem (Mok a Mok 2001). V současnosti je známo přes 40 přirozených cytokininů (Zažimalová a kol. 1999), mezi které je řazen např. i 6-benzylaminopurin (BAP), který byl původně považován za syntetickou látku, avšak nedávno bylo zjištěno, že jeho deriváty se vyskytují i v rostlinách (Strnad a kol. 1993 cit. z Luštinec a Žárský 2005). V praxi jsou nejvíce používány CK připravené uměle. Podmínkou jejich biologické aktivity je to, že jsou odvozeny od adeninu, který má nahrazenou aminoskupinu v poloze 6 (Procházka a kol. 1998).

Tyto rostlinné hormony účinkují s jinými rostlinnými hormony synergicky i antagonisticky a ovlivňují celou řadu vývojových procesů v rostlinách, jako je buněčné dělení a diferenciace, vývoj chloroplastů, biosyntéza chlorofylu a stárnutí buněk (Mok a Mok 2001, Mík a kol. 2001). Například ve spolupráci s auxiny regulují organogenezi a podporují tvorbu výhonů. Opačný (antagonistický) účinek lze najít u regulace apikální dominance, kde mají CK nezastupitelnou roli. Cytokininy potlačují apikální dominanci, na rozdíl od auxinů, které ji posilují. Další z mnoha procesů ovlivněných CK je transport a mobilizace živin. Cytokininy také stimulují syntézu karotenoidů, které chrání rostliny před škodlivým vlivem FAR a ROS (Chernyad'ev 2000).

Bylo zjištěno, že v závislosti na své koncentraci CK zpomalují nebo urychlují pokles obsahu Chl, pokles rychlosti fotosyntézy a nárůst míry lipidové peroxidace během indukované senescence (Vlčková a kol. 2006).

2.2.1 Vliv cytokininů na senescenci

Mezi hlavní a nejnápadnější účinky CK patří zpomalení senescence včetně zpomalení poklesu obsahu Chl (např. Selivankina a kol. 2001), potlačení strukturních změn chloroplastů a zpomalení nárůstu lipidové peroxidace (např. Vlčková a kol. 2006). Tyto změny způsobuje jak exogenní aplikace cytokininů, tak zvýšená koncentrace endogenních CK u transgenních rostlin *A. thaliana* (Sun kol. 2003). Potlačení lipidové

peroxidace je pravděpodobně způsobeno stimulací, příp. zachováním aktivity antioxidantních enzymů (např. Liu a Huang 2002 – cit. ve Vlčková a kol. 2006).

Exogenní aplikace cytokininů obvykle vede ke zpomalení snížení obsahu chlorofylu (např. Selivankina a kol. 2001) a zpomalení poklesu rychlosti asimilace CO₂ způsobeného zhoršením funkce fotosyntetického aparátu ve stárnoucích listech (Gan a Amasino 1995, Rulcová a Pospíšilová 2001).

Exogenní aplikace CK má velký vliv na klíčový enzym fotosyntézy - ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasu/oxygenasu (Rubisco). Během senescence dochází k postupné degradaci Rubisco, přičemž se snižuje jeho aktivita i obsah (např. Chernyad'ev a Monakhova 2003). Při exogenní aplikaci CK nedochází k jeho úbytku a enzym Rubisco je v rostlině stále produkován (Lerbs a kol. 1984).

Ovlivnění senescence cytokininy závisí na jejich koncentraci. Nízká koncentrace CK zpomaluje senescenci, na rozdíl od vysoké koncentrace cytokininů, která ji urychluje (Vlčková a kol. 2006). Podle Melkovičové (2012) je pro různý druh rostlin a CK různá „hraniční“ hodnota koncentrace. Melkovičová (2012) pozorovala vliv cytokininů *meta*-topolinu (mT) a BAP na stárnoucí oddělené listy ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a zjistila, že ve zpomalení poklesu obsahu Chl byla v případě mT nejúčinnější koncentrace 10⁻⁴ M a v případě BAP koncentrace 3·10⁻⁴ M. Podobně Vlčková a kol. (2006) při pozorování vlivu mT na indukovanou senescenci pšenice (*Triticum aestivum* L.) zjistili, že 10⁻⁴ M mT zpomalil pokles obsahu Chl. Zacharias a Reid (1990) při sledování vlivu BAP na indukovanou senescenci *A. thaliana* zjistili, že 10⁻⁶ M BAP způsobil zpomalení poklesu obsahu Chl, zatímco koncentrace 10⁻³ M a 10⁻⁴ M způsobiley stimulaci degradace chloroplastů.

Z výše uvedeného vyplývá, že CK ovlivňují senescenci na několika úrovních – na úrovni obsahu Chl, struktury chloroplastů, aktivity a obsahu Rubisco i na úrovni aktivity antioxidantních enzymů, akumulace ROS a peroxidace lipidů. Jejich vliv mimo jiné závisí na jejich koncentraci.

2.3 Rostliny se změněnou endogenní hladinou nebo percepcí cytokininů

Existují způsoby, jak ovlivňovat endogenní obsah CK nebo jejich signální dráhu v rostlinách. Endogenní hladinu CK lze v rostlině snížit nebo zvýšit a lze ovlivnit také percepci CK. Například Gan a Amasino (1995) izolovali z *A. thaliana* gen exprimovaný pouze při senescenci, naklonovali jeho promotor ke strukturnímu genu IPT a vnesli tento chimerický gen do rostliny tabáku. Spolu se zahájením senescence nastalo i navození syntézy CK v *PSAG12-IPT* v rostlinách, což způsobilo zpomalení senescence. Petit-Paly a kol. (1999) při svém experimentu *in vitro* na tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) zjistili, že zvýšením hladiny CK zavedením genu IPT došlo ke zpomalení senescence. Belintani a kol. (2012) u transgenních rostlin cukrové třtiny (*Saccharum spp.*) využili ke zpomalení senescence chlad, díky kterému došlo k aktivaci promotoru IPT genu, a tím zvýšili odolnost rostlin vůči chladu. Werner a kol. (2008) studovali rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) se sníženou endogenní koncentrací CK díky zvýšenému obsahu CKX. Nedostatek CK způsobil snížení obsahu Chl a změny v ultrastruktuře buněk typické pro senescenci.

Obecně lze říci, že u rostlin se zvýšenou endogenní koncentrací cytokininů zpravidla dochází ke zpomalení senescence (např. Petit-Paly a kol. 1999), zatímco u rostlin se sníženou koncentrací CK dochází k jejímu urychlení (např. Werner a kol. 2008).

2.3.1 Receptorové „knock-outy“ (*ahk2, ahk3, ahk4*)

V souvislosti s působením CK může být rychlost senescence ovlivněna prostřednictvím jejich receptorů. U *A. thaliana* jsou známy tři cytokininové receptory AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4 (Inoue a kol. 2001, Yamada a kol. 2001). Tyto 3 cytokininové receptory *A. thaliana* mají velmi podobnou strukturu. Jde o histidinové proteinkinasy, které spouštějí signální dráhu cytokininů. Předpokládá se, že cytokininové receptory jsou u *A. thaliana* lokalizovány převážně v plazmatické membráně a endoplasmatickém retikulu (Caesar a kol. 2011).

Receptory AHK2, AHK3, CRE1/AHK4 mají pravděpodobně částečně redundantní funkci, přičemž se předpokládá, že jednotlivé typy se na regulaci různých procesů podílejí různou měrou (Riefler a kol. 2006). V souvislosti se senescencí

je za hlavní receptor považován AHK3, zatímco vliv receptorů AHK2 a CRE1/AHK4 se považuje spíše za vedlejší (Kim a kol. 2006, Riefler a kol. 2006). V případě senescence indukované oddělením listů a jejich inkubací ve tmě měl mutant *ahk3* (bez receptoru AHK3) senescenci urychlenou, i když přirozenou senescenci výrazněji ovlivněnou neměl (Kim a kol. 2006).

Kombinace mutací *ahk2 ahk3* je z hlediska senescence považována za nejvýznamnější a prodlužuje délku života rostliny (Riefler a kol. 2006). U dvojitého mutantu *ahk2 ahk3* byly pozorovány nejvýznamnější změny ve vývoji rostlin a listů oproti wt a ostatním dvojitým mutantům (*ahk2 ahk4*, *ahk3 ahk4*): došlo k redukci velikosti listů, listy obsahovaly méně chlorofylu a díky rychlému vývoji primárního kořene a zvýšenému větvení kořenů došlo u tohoto dvojitého mutantu k silnému vývoji kořenového systému (Riefler a kol. 2006). Při aplikaci CK na oddělené listy inkubované po dobu 10 dní ve tmě bylo u tohoto mutantu oproti wt výrazně potlačeno zpomalení degradace Chl. Z toho autoři usuzují, že receptor AHK3 bude hrát hlavní roli při udržení obsahu Chl prostřednictvím CK (Riefler a kol. 2006).

Cortleven a kol. (2014) sledovali u oddělených listů dvojitého mutantu *ahk2 ahk3* odezvu na FAR o vysoké ozáření. Po 24 h inkubace oddělených listů na FAR o ozáření $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bylo u dvojitého mutantu *ahk2 ahk3* pozorováno oproti wt výraznější snížení parametru F_v/F_m z hodnoty 0,8 na 0,4 (u wt klesla hodnota na 0,6), snížení antioxidační kapacity o 20 % a snížení obsahu karotenoidů. Výraznější poškození listů *ahk2 ahk3* působením FAR o vysoké ozáření bylo podle autorů zřejmě způsobeno zvýšenou citlivostí D1 proteinu v PSII vůči fotoinhibici.

Kim a kol. (2006) uvádějí, že receptory AHK2 a CRE1/AHK4 hrají spíše vedlejší roli při zpomalení senescence, jelikož v jejich přítomnosti není senescence zpomalena takovou měrou jako v přítomnosti receptoru AHK3. Po 6-ti denní inkubaci oddělených listů *A. thaliana* ve tmě byl totiž obsah Chl u jednoduchých mutantů *ahk2* a *ahk4* větší oproti mutantu *ahk3* a zároveň nižší ve srovnání s wt.

Po 24 hodinovém vystavení oddělených listů FAR o vysoké ozáření došlo u dvojitého mutantu *ahk2 CRE1/ahk4* k nejmenšímu snížení maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_m) ve srovnání s *ahk2 ahk3* a *ahk3 ahk4* (Cortleven a kol. 2014), což znamená, že nepřítomnost receptoru AHK2 nezpůsobuje zvýšení citlivosti vůči FAR o vysoké ozáření tak, jako nepřítomnost receptoru AHK3 a fungují u něho relativně dobře opravy D1 proteinu v PSII.

2.3.2 Mutant *pga22*

Podle Sun a kol. (2003) je mutant *pga22* pravděpodobně ovlivněn v klíčových složkách biosyntézy a signalizace CK. Získaná funkční mutace v lokusu *PGA22* pravděpodobně ovlivňuje biosyntézu CK v rostlinách přes isopentenyladenosin-5-monofosfát. Mutant *pga22* obsahuje vyšší množství isopentenyltransferázy (IPT, dříve *AtIPT8*) a je citlivý na 17- β -estradiol: aplikace 17- β -estradiolu způsobuje navození exprese genu pro IPT a výrazný nárůst obsahu CK (Spíchal 2013 – ústní sdělení).

V experimentu Sun a kol. (2003) klíčila semena mutantu *pga22* 6 dní na médiu „Murashige a Skoog“ s i bez 17- β -estradiolu ve tmě a na FAR o nízké ozáření. Semena klíčící na médiu bez 17- β -estradiolu nebyla schopna vytvořit zelený kalus, oproti tomu v přítomnosti 17- β -estradiolu došlo k rychlému dělení buněk, a tím k vytvoření kalusu. Po odstranění induktoru se mutant *pga22* dále vyvinul do rostliny. Vytvoření kalusu u mutantu *pga22* bylo pravděpodobně způsobeno nárůstem obsahu *ipt*.

Předpokládané zvýšení obsahu CK v rostlinách *pga22* po aplikaci 17- β -estradiolu by mělo ovlivnit rychlost indukované senescence oddělených listů, přičemž se dá očekávat různá míra ovlivnění u listů inkubovaných ve tmě a na FAR (viz následující kapitola).

2.4 Vliv světelných podmínek na účinek cytokininů na senescenci

Vliv CK na senescenci je výrazně ovlivněn světelnými podmínkami (Vlčková a kol. 2006). Mechanismy rozdílného působení CK při různých světelných podmínkách v souvislosti s fotosyntetickým aparátem a fotosyntetickými procesy nejsou příliš prostudovány (Vlčková a kol. 2006). Autoři Zacharias a Reid (1990) pozorovali vliv exogenní aplikace CK na změny obsahu Chl v discích listů *A. thaliana* umístěných na různých světelných podmínkách. Cytokinin BAP o koncentraci 10^{-5} M a vyšší způsobil u disků inkubovaných na FAR ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16 h světlo/8 h tma) zrychlení úbytku Chl oproti diskům inkubovaným ve tmě, zatímco ve tmě BAP úbytek Chl zpomalil oproti diskům inkubovaným bez CK.

Vlčková a kol. (2006) zjistili, že mT má opačný efekt na indukovanou senescenci oddělených listů inkubovaných ve tmě a na FAR o nízké ozáření. V experimentu byl sledován vliv 10^{-4} M mT na fotosyntetický aparát oddělených listů pšenice (*Triticum aestivum* L.) umístěných na kontinuálním FAR ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) nebo ve tmě. V listech bez vlivu mT došlo v obou režimech k rychlému úbytku Chl. *Meta*-topolin v obou

režimech zpomalil úbytek Chl, přičemž k výraznějšímu zpomalení došlo u listů inkubovaných ve tmě. *Meta-topolin* ovlivnil také změny ve tvaru a ultrastruktuře chloroplastů: ve tmě nebyl u listů pod vlivem mT změněn tvar ani umístění chloroplastů, bylo potlačeno hromadění plastoglobulí a chloroplasty obsahovaly větší počet gran. Vlivem mT také došlo k výraznému zpomalení poklesu parametru F_v/F_p . U oddělených listů inkubovaných na kontinuálním FAR byl účinek mT opačný: byl pozorován výraznější úbytek gran a výraznější pokles F_v/F_p oproti listům inkubovaným bez mT (Vlčková a kol. 2006).

Melkovičová (2012) sledovala vliv exogenní aplikace mT a BAP o různé koncentraci a za různých světelných podmínek na průběh indukované senescence listů ječmene. Zjistila, že pokud byl na listy inkubované ve tmě aplikován mT nebo BAP, došlo ke zpomalení poklesu obsahu Chl a parametru F_v/F_p . Avšak tento pozitivní účinek se snižoval s rostoucí světelnou dávkou a při kontinuálním FAR vysoké intenzity ($370 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, varianta IK) se dokonce změnila na negativní (tj. došlo k urychlení poklesu obsahu Chl a F_v/F_p).

Z výše uvedeného je zřejmé, že vliv CK na senescenci závisí na přítomnosti a intenzitě FAR. Zatímco ve tmě CK zpravidla (v nepřilíš vysokých koncentracích) zpomalují senescenci, při současném působení FAR může být jejich vliv na senescenci zpomalující i urychlující, přičemž rozhodovat zřejmě bude míra využití excitací ve fotosyntetickém aparátu (Vlčková a kol. 2006). Dosavadní poznatky o změně účinku CK na senescenci vlivem FAR jsou omezeny na exogenní aplikaci CK. Účinek FAR na senescenci oddělených listů rostlin se změněnou endogenní koncentrací nebo percepcí CK není zatím dostatečně prostudován.

3. CÍLE PRÁCE

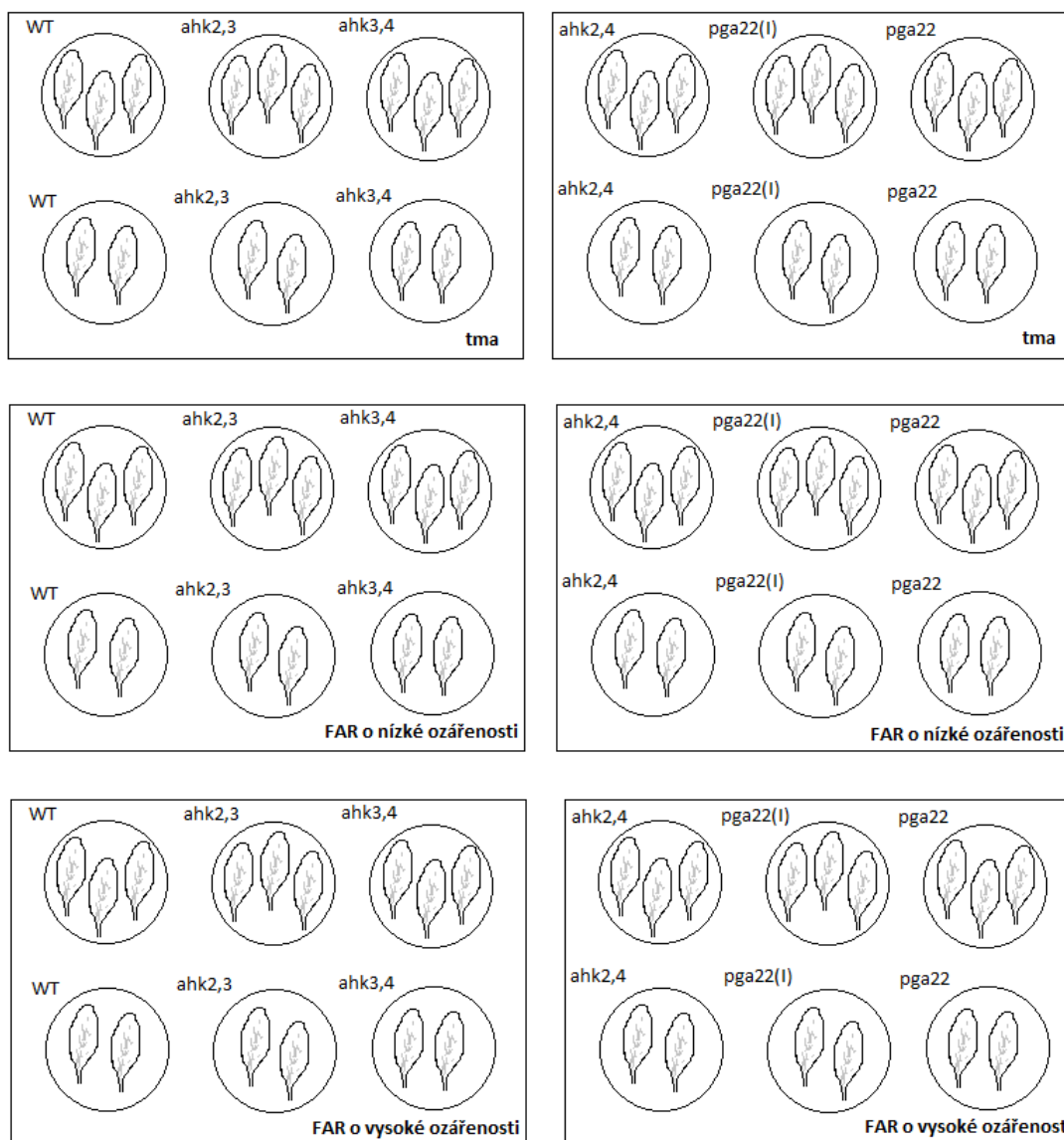
1. Vypracovat přehled problematiky vlivu světelných podmínek na senescenci oddělených listů rostlin v souvislosti s působením cytokininů.
2. Srovnat časový průběh změn obsahu chlorofylu a parametru F_v/F_p během indukované senescence oddělených listů inkubovaných za různých světelných podmínek (tma, FAR o nízké ozářenosti, FAR o vysoké ozářenosti) následujících typů rostlin *Arabidopsis*: „wild type“, „double“ mutanty *ahk2 ahk3*, *ahk2 ahk4* a *ahk3 ahk4* a mutanty *pga22*.
3. Na základě získaných výsledků srovnat vliv světelných podmínek na průběh indukované senescence u použitých typů rostlin a zhodnotit ho v souvislosti se změněnou percepcí nebo endogenní koncentrací cytokininů.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

Pro experiment byly použity různé typy huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.). Prvním typem byl wild-type (wt), tedy normální rostlina, která měla zároveň funkci kontrolní rostliny, se kterou byly srovnávány ostatní typy *A. thaliana*. Dalším typem byly rostliny *A. thaliana* s různým receptorovým „knock-outem“, přičemž měření bylo provedeno s dvojitými mutanty varianty *ahk2 ahk3* (v textu označováno jako *ahk2,3*), *ahk3 ahk4* (v textu označováno jako *ahk3,4*) a *ahk2 ahk4* (v textu označováno jako *ahk2,4*). Posledním měřeným typem byl mutant *pga22* (v textu označován jako *pga22*), který obsahuje vyšší množství isopentenyltransferázy (IPT). Mutant *pga22* byl měřen bez aplikace 17- β -estradiolu (označení *pga22*) a po aplikaci 17- β -estradiolu (*pga22(I)*) za účelem indukce exprese genu pro IPT (AtIPT8) (Sun a kol. 2003).

Semínka výše uvedených typů *A. thaliana* (laskavě poskytnutá dr. Spíchalem, PřF UP v Olomouci) byla namočena do deionizované vody (3. 10. 2013) a inkubována v ledničce. Po 24 hodinách byla semínka vyseta do květináčů obsahujících substrát Potgrond H (Klasmann-Deilmann, Německo) a zalita deionizovanou vodou. Květináče byly následně umístěny do fytokomory. Fytokomora byla nastavena na cyklus 8 hodin světlo ($170 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a 16 hodin tma, teplotu 22 °C/20 °C a relativní vlhkost vzduchu 60 %. Po 10 dnech (14. 10. 2013) byly rostliny rozesazeny tak, aby se v každém květináči nacházely dvě rostliny. Dva dny před oddělením listů byla část rostlin typu *pga22* postříkána 17- β -estradiolem o koncentraci 10^{-5} M (varianta *pga22(I)*). Po 5-ti týdnech od zasetí (15. 11. 2013) byly pomocí nůžek odděleny listy, které byly okamžitě vloženy adaxiální stranou listu nahoru do jamek makrotitračních destiček s 10 ml deionizované vody. Z každého typu rostlin (WT; *ahk2,3*; *ahk3,4*; *ahk2,4*; *pga22* a *pga22(I)*) bylo odděleno celkem 15 listů. Ty byly rozděleny na 3 skupiny po pěti listech a každá pětice byla rozdělena mezi dvě jamky jedné makrotitrační destičky (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma rozložení oddělených listů *A. thaliana* podle světelných režimů a typu rostliny.

Dvojice destiček s oddělenými listy byly umístěny do fytokomory Algaetron (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika) na 3 světelné režimy: tma, FAR o nízké ozáření ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a FAR o vysoké ozáření ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Ve fytokomoře byl nastaven stejný cyklus jako při pěstování rostlin: 8 hodin světlo a 16 hodin tma, teplota $22\text{ }^{\circ}\text{C}/20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V režimu „tma“ byly 2 destičky umístěny do plastového boxu a následně do krabice, která byla zatemněna černým igelitovým pytlím tak, aby nedošlo k žádnému průniku FAR. Druhé dvě makrotrrační destičky byly vloženy do

fytokomory do patra s FAR o nízké ozáření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Třetí varianta byla umístěna na FAR o vysoké ozáření 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Měření na oddělených listech probíhalo celkem čtyřikrát, přičemž první měření bylo provedeno v den oddělení (15. 11. 2013) a další 2., 4. a 6. den po oddělení (dpo) přibližně ve stejnou dobu.

Měření proběhlo ve 4 nezávislých experimentech, přičemž v této práci jsou prezentovány výsledky ze 4. experimentu. Výsledky z ostatních experimentů byly obdobné.

4.2 Použité metody

4.2.1 Stanovení obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu byl měřen nedestruktivně chlorofylmetrem SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko). Vzorky, které byly umístěny na FAR o vysoké a nízké ozáření, byly před měřením umístěny na 25 minut do tmy, aby byl eliminován vliv pohybu chloroplastů na měření. Každý list byl proměřen po celé ploše 5krát, použita byla průměrná hodnota. Po změření relativního obsahu chlorofylu následovalo měření fluorimetrem.

Hodnoty získané chlorofylmetrem byly následně pomocí rovnice kalibrační křivky (viz kapitola 4.2.2) převedeny na hodnoty obsahu chlorofylu v $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Měření probíhalo při slabém zeleném světle.

4.2.2 Kalibrační křivka pro chlorofylmetr SPAD-502

Kalibrace chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko) byla provedena samostatným měřením obsahu chlorofylu chlorofylmetrem v různě zelených listech *A. thaliana* a současným analytickým stanovením obsahu chlorofylu v těchto listech. Získaná kalibrační křivka je uvedena v Příloze jako Obr. P1. Hodnoty získané pomocí chlorofylmetru byly převedeny na skutečný obsah chlorofylu podle rovnice:

$$y = -0,0013x^3 + 0,0569x^2 - 0,0685x + 2,7048,$$

kde „x“ udává hodnoty naměřené chlorofylmetrem SPAD-502 v relativních jednotkách a „y“ hodnoty koncentrace Chl (a+b) v $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Z oddělených listů *A. thaliana* byly vyříznuty kruhové segmenty o průměru 12 mm. Po 30-ti minutové adaptaci na tmu při pokojové teplotě byl v segmentech změřen relativní obsah chlorofylu chlorofylmetrem SPAD-502. Každý segment byl proměřen 5x

a jako výsledná hodnota pro daný segment byla vzata hodnota průměrná. Segmenty byly umístěny na vlhké buničině, aby nedošlo k jejich vysychání. Následně byl každý segment zvlášť vložen do vychlazené třecí misky a s přidavkem $MgCO_3$ a malého množství 80% acetonu zhomogenizován. Výsledný homogenát byl přelit do zkumavky a uchováván na ledu. Poté byl homogenát zcentrifugován při 4000 g po dobu 5 min a při teplotě 10 °C. Pomocí spektrofotometru Unicam UV550 (Thermospectronic, Velká Británie) a 1 cm kyvety byla změřena absorbance supernatantu při vlnových délkách 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm a 750 nm. Měřený supernatant byl v případě potřeby ředěný 80% acetonem tak, aby absorbance při 663,2 byla v rozmezí 0,4 - 0,8.

Pomocí vztahů Lichtenthalera (1987) byly naměřené hodnoty absorbancí převedeny na obsah Chl (a+b) v $\mu g.cm^{-2}$. Pro sestavení kalibrační křivky byly použity koncentrace Chl (a+b) v $\mu g.cm^{-2}$ a hodnoty relativního obsahu Chl naměřené chlorofylmetrem.

4.2.3 Stanovení parametru F_v/F_p

K měření parametru F_v/F_p v ploše listů byl použit fluorescenční zobrazovací systém Fluorcam 700MF (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika) umožňující měření fluorescence chlorofylu z celé plochy vzorku. Parametr F_v/F_p odrážející maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (Kitajima a Butler, 1975), je stanoven podle vztahu:

$$F_v/F_p = (F_p - F_0) / F_p,$$

kde F_p je maximální měřená intenzita fluorescence a F_0 minimální intenzita fluorescence vzorku adaptovaného na tmu. Parametr F_v/F_p podává informaci o funkčním stavu fotosystému II (PSII), přičemž hodnoty parametru F_v/F_p kolem 0,8 charakterizují dobře fungující PSII. Nižší hodnoty F_v/F_p signalizují zhoršení funkce PSII. Při měření je fluorescence chlorofylu snímána CCD kamerou, což umožňuje měření fluorescenčních parametrů ve větší ploše.

Měření probíhalo za pokojové teploty. Oddělené listy umístěné na FAR byly před měřením F_v/F_p adaptovány po dobu 25 minut na tmu v rámci měření obsahu Chl chlorofylmetrem (viz 4.2.1). Oddělené listy jedné rostlinné varianty z různých světelných režimů byly poskládány na destičku s navlhčenou buničinou a seřazeny po pěticih podle světelných režimů v pořadí tma, FAR o nízké ozáření a FAR o vysoké ozáření.

Navlhčená buničina byla použita z důvodu zamezení vysychání listů během měření. Měření probíhalo vždy ve tmě za slabého zeleného světla.

V programu Fluorcam 700MF byly nastaveny parametry: Sensitivita: 50 %, relativní intenzita aktinického FAR (Irradiance): 50 % (odpovídalo ozáření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v místě vzorků ($\pm 10\%$)), relativní intenzita saturačního pulsu (Superirradiance): 100 % (odpovídalo ozáření 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v místě vzorků) a následně bylo spuštěno měření. Princip měření spočíval nejprve ve změření F_0 , kdy byla reakční centra PSII otevřená (v oxidovaném stavu). Následovalo změření F_p (pomocí saturačního pulsu), kdy došlo k uzavření reakčních center PSII (redukci elektronových akceptorů). Po změření byly listy fotograficky zdokumentovány a vráceny zpět do makrotitrační destičky a příslušného světelného režimu.

4.3 Statistické zpracování výsledků

Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Office Excel a Origin (verze 8.5, OriginLab Corporation, USA). Statistická významnost rozdílů mezi hodnotami parametrů listů inkubovaných při různých světelných podmínkách byla vyhodnocena pomocí One way ANOVA a Tukeyho testu. Statistická významnost rozdílů vzhledem k počáteční hodnotě (0. dpo) byla vyhodnocena pomocí párového t-testu.

5. VÝSLEDKY

V experimentech byly použity různé varianty rostlin *A. thaliana* (viz kapitola 4. Materiál a metody). U oddělených listů inkubovaných ve tmě, na FAR o nízké ozáření a FAR o vysoké ozáření byl pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko) měřen relativní obsah Chl, který byl pomocí kalibrační rovnice převeden na skutečný obsah Chl. Jako parametr, který určuje stav fotosyntetického aparátu (odrážející funkci fotosystému II) jsme použili parametr F_v/F_p změřený pomocí fluorescenčního zobrazovacího systému Fluorcam 700MF (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika).

5.1 Varianta wt

5.1.1 Obsah chlorofylu

U oddělených listů varianty wt inkubovaných ve tmě došlo během šesti dnů po oddělení k mírnému poklesu obsahu Chl z $16,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0. dpo) na $14,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6. dpo), což představuje pokles o 10 % (Obr. 2A). Pokles obsahu Chl oproti výchozí hodnotě byl statisticky významný 4. a 6. dpo.

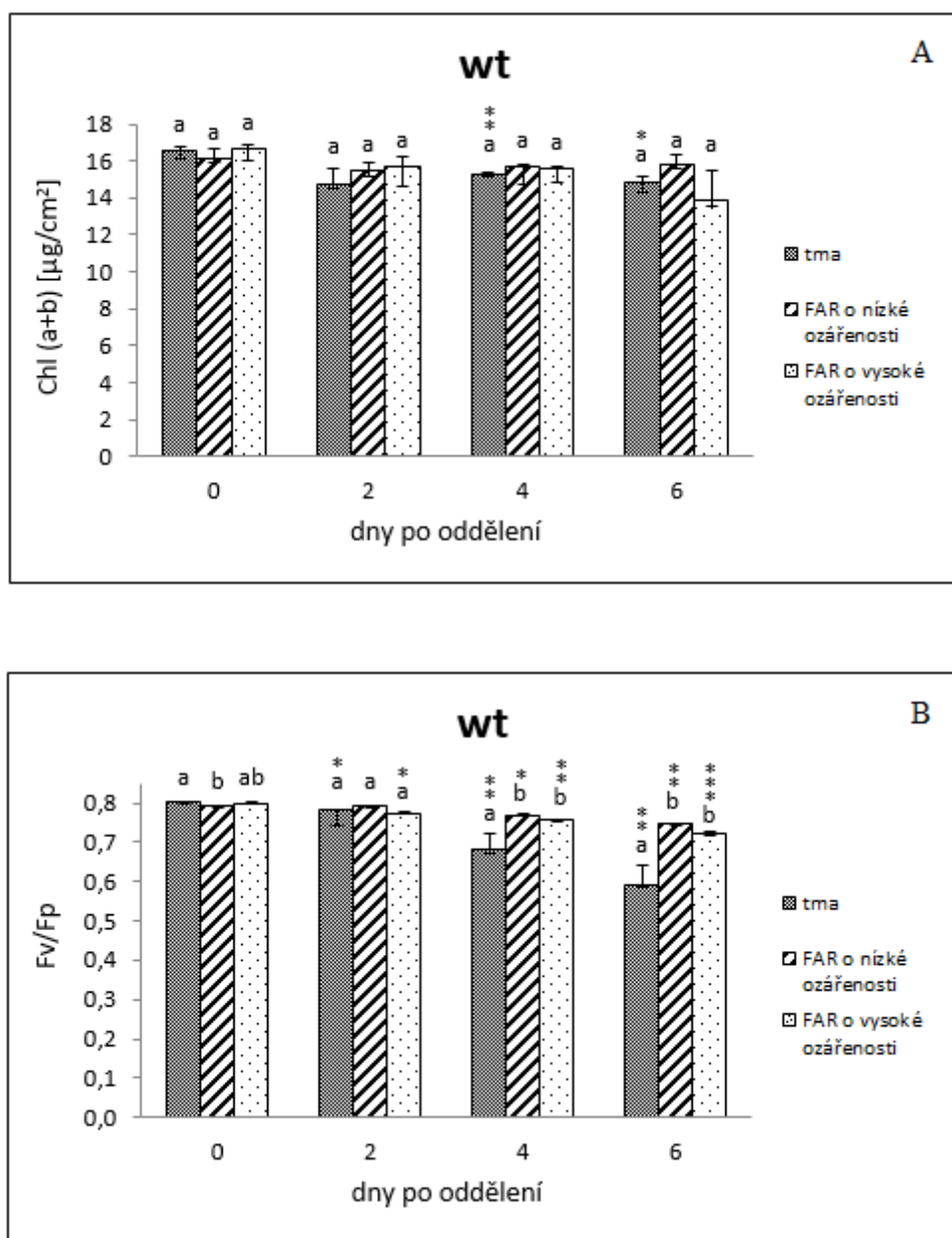
Obsah Chl u oddělených listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření byl 6. dpo téměř stejný jako výchozí hodnota; obsah Chl klesl z hodnoty $16,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0.dpo) na $15,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, tj. asi jen o 3 %.

Hodnota obsahu Chl u oddělených listů inkubovaných na FAR o vysoké ozáření klesla z hodnoty $16,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0. dpo) na $13,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6. dpo), což je pokles o 20 %. I když tento pokles obsahu Chl se jeví jako nejvýraznější, statisticky významný oproti výchozí hodnotě nebyl.

5.1.2 Parametr F_v/F_p

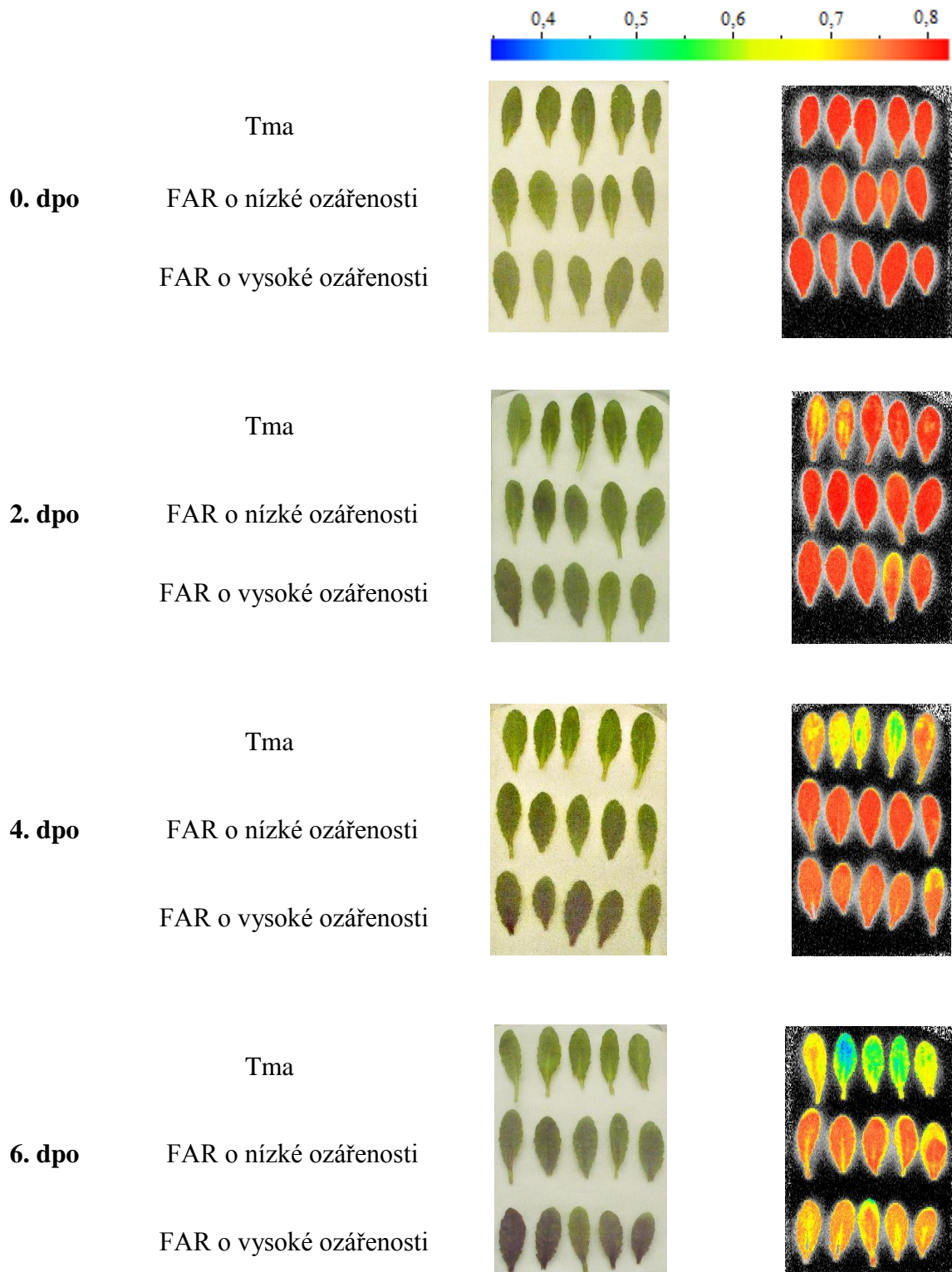
U listů varianty wt inkubovaných ve tmě došlo k postupnému poklesu F_v/F_p , přičemž tento pokles byl statisticky významný již od 2. dpo (Obr. 2B). Během 6 dní po oddělení klesla hodnota F_v/F_p z 0,801 (0. dpo) na 0,593 (6. dpo), což znamená pokles o 25 %. Pokles F_v/F_p byl u listů inkubovaných na FAR zpomalen oproti tmě: u oddělených listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření se hodnota F_v/F_p snížila jen o 6 %, na FAR o vysoké ozáření o 10 %. Pokles F_v/F_p odrážející snížení funkce (fotochemie)

fotosystému II byl tedy relativně malý, což značilo, že při zvolených podmínkách a době po oddělení fungoval PSII ještě relativně dobře.



Obr. 2: Obsah Chl (A) a poměr F_v/F_p (B) v oddělených listech varianty wt měřené 0., 2., 4. a 6. den po oddělení ve tmě a na FAR o nízké ozáření ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ozáření ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Uvedeny mediány a kvartily ($n = 5$). Různá písmena označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými v daném termínu v listech na různých světelných režimech ($P \leq 0,05$), hvězdičky označují statisticky významně odlišnou hodnotu od hodnoty naměřené 0. den po oddělení (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$).

Varianta *wt*



Obr. 3: Fotografie (vlevo) a parametr F_v/F_p (vpravo) oddělených listů *A. thaliana* varianty *wt* - 0., 2., 4. a 6. den po oddělení (dpo).

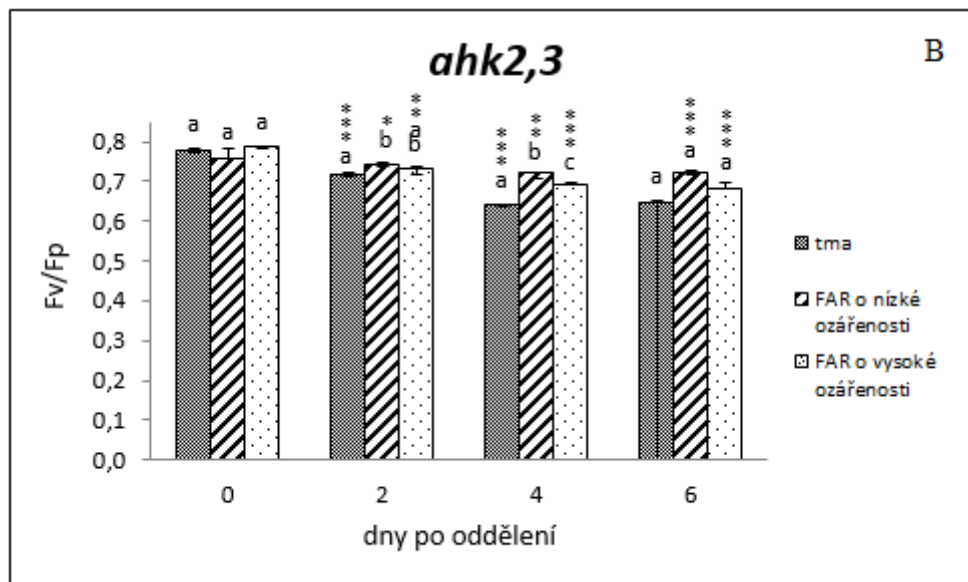
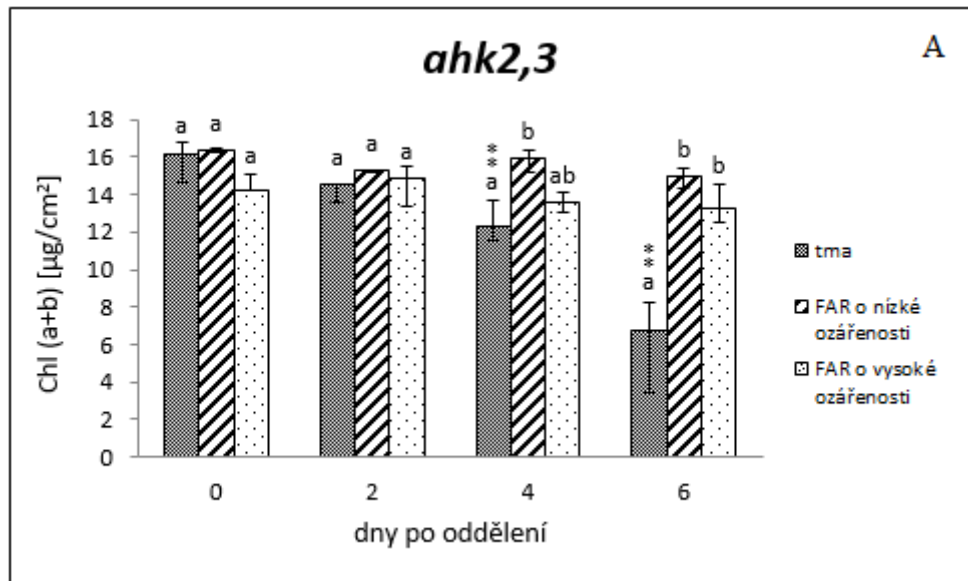
Změny parametru F_v/F_p v ploše oddělených listů s dobou po oddělení jsou uvedeny na Obr. 3. Z Obrázku 3 je patrný postupný pokles F_v/F_p s dobou po oddělení, a to zejména u listů inkubovaných ve tmě (4. a 6. dpo). V souladu s Obr. 2B jsou šestý den po oddělení patrné vyšší hodnoty F_v/F_p u listů inkubovaných na FAR v porovnání s tmou. FAR tedy mělo pozitivní efekt na zachování funkce PSII. Čtvrtý a 6. dpo došlo u oddělených listů wt inkubovaných na FAR o nízké a vysoké ozáření ke změně pigmentace listů, které postupně zřívověly, zřejmě díky nárůstu obsahu anthokyanů v listech (Obr. 3). Viditelně výraznější nárůst obsahu anthokyanů byl pozorován u vzorků inkubovaných na FAR o vysoké ozáření.

5.2 Varianta *ahk2,3*

5.2.1 Obsah chlorofylu

U oddělených listů varianty *ahk2,3* inkubovaných ve tmě došlo během šesti dnů po oddělení k nejvýraznějšímu poklesu obsahu Chl ve srovnání s listy inkubovanými při FAR o nízké a vysoké ozáření (Obr 4A). Šestý den po oddělení obsah Chl klesl na 40 % původní hodnoty. Tento pokles byl tedy mnohem výraznější ve srovnání s oddělenými listy varianty wt inkubovanými ve tmě, kde byl pokles pouze 10 % (Obr. 3A).

Obsah Chl u oddělených listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření klesl z hodnoty $16,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0. dpo) na $15,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6. dpo), což představuje pokles o 10 %. Hodnota obsahu Chl u oddělených listů inkubovaných na FAR o vysoké ozáření klesla během šesti dnů po oddělení pouze o 5 %. Přítomnost FAR o nízké i vysoké ozáření tedy měla pozitivní vliv na udržení obsahu Chl.



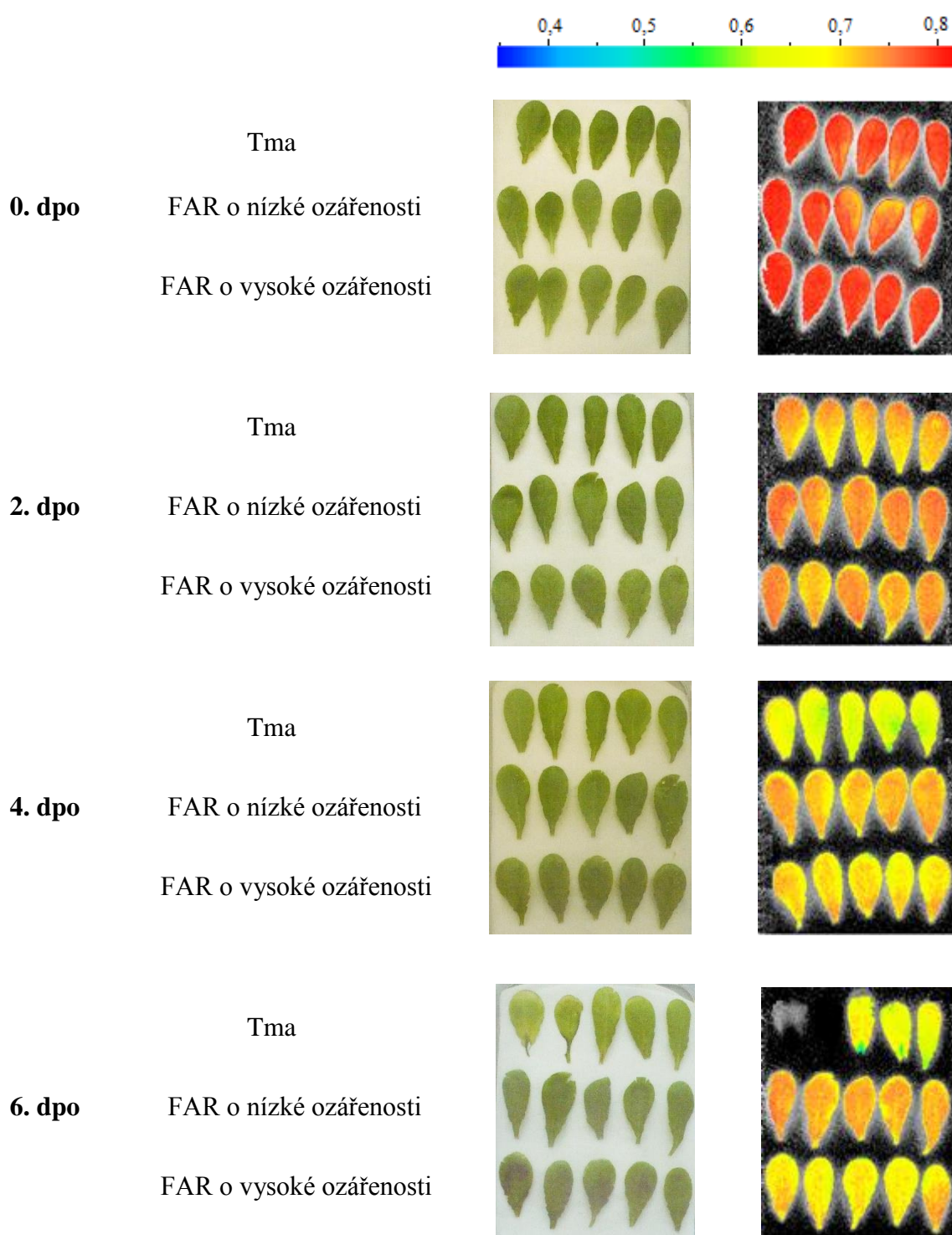
Obr. 4: Obsah Chl (A) a poměr F_v/F_p (B) v oddělených listech varianty *ahk2,3* měřené 0., 2., 4. a 6. den po oddělení ve tmě a na FAR o nízké ozáření ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ozáření ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Uvedeny mediány a kvartily ($n = 5$). Různá písmena označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými v daném termínu v listech na různých světelných režimech ($P \leq 0,05$), hvězdičky označují statisticky významně odlišnou hodnotu od hodnoty naměřené 0. den po oddělení (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$).

5.2.2 Parametr F_v/F_p

U oddělených listů varianty *ahk2,3* inkubovaných ve tmě došlo k postupnému poklesu F_v/F_p , a to z 0,778 (0. dpo) na 0,646 (6. dpo), což představuje pokles o 20 % (Obr. 4B.) Tento pokles nebyl statisticky významný. Pokles F_v/F_p u oddělených listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření byl pouze 5% (z 0,758 na 0,721) a na FAR o vysoké ozáření 15% (z 0,785 na 0,683). Rozdíly mezi hodnotami F_v/F_p u jednotlivých světelných variant nebyly 6. dpo statisticky významné, ale 4. dpo ano: nejnižší hodnotu F_v/F_p měly listy inkubované ve tmě, následovaly listy na FAR o vysoké ozáření a nejvyšší F_v/F_p měly listy inkubované na FAR o nízké ozáření. V tomto případě mělo tedy FAR o nižší ozáření průkazně pozitivnější efekt na udržení F_v/F_p v porovnání s FAR o vysoké ozáření.

Na Obr. 5 můžeme vidět postupný pokles parametru F_v/F_p v ploše oddělených listů s dobou po oddělení u listů všech světelných variant. U varianty *ahk2,3* nedošlo během šesti dnů po oddělení k výraznější změně pigmentace listů do fialova, zřejmě tedy nedošlo k nárůstu obsahu anthokyanů v oddělených listech.

Varianta *ahk2,3*



Obr. 5: Fotografie (vlevo) a parametr F_v/F_p (vpravo) oddělených listů *A. thaliana* varianty *ahk2,3* - 0., 2., 4. a 6. den po oddělení (dpo).

5.3 Varianta *ahk3,4*

5.3.1 Obsah chlorofylu

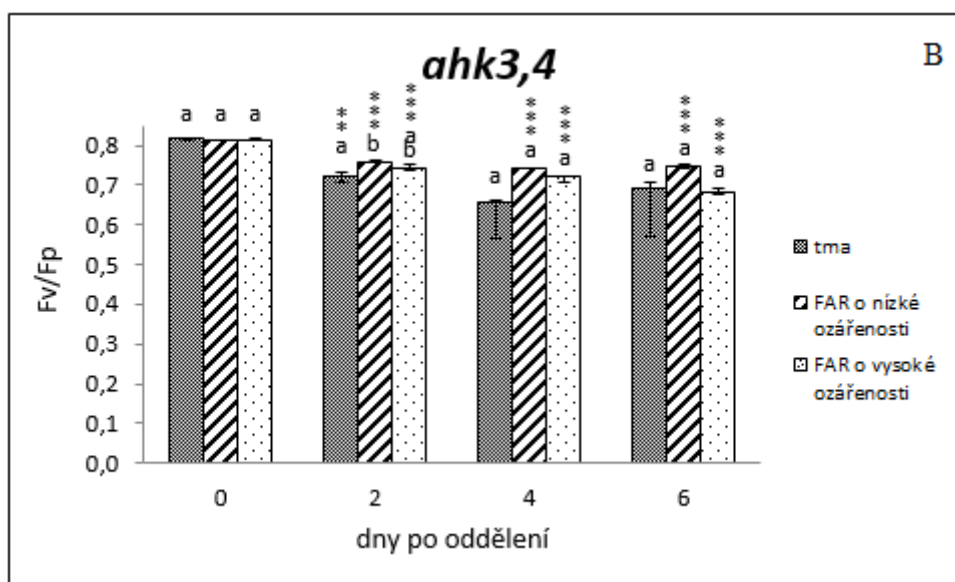
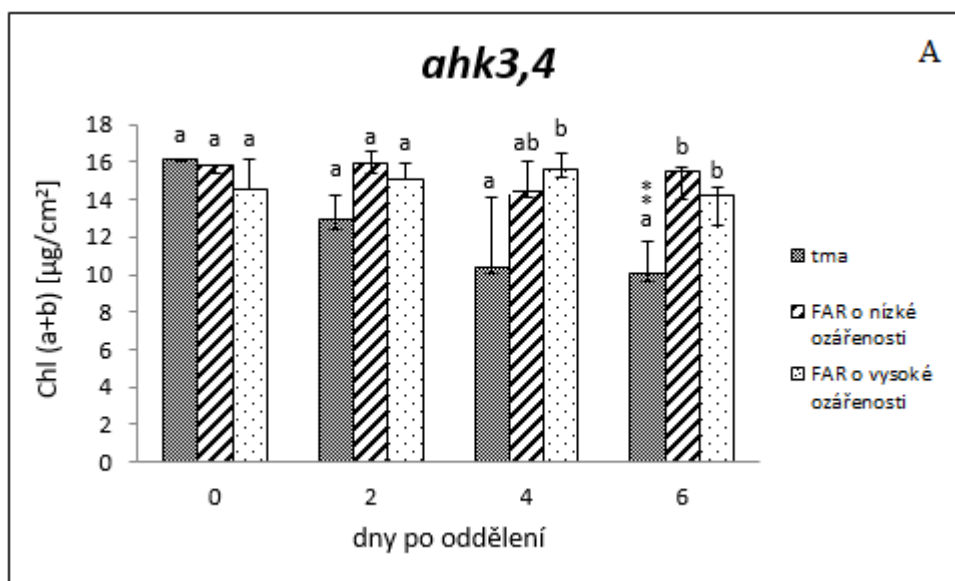
U oddělených listů varianty *ahk3,4* došlo během šesti dnů po oddělení k výraznému poklesu obsahu Chl, a to o 40 % (Obr. 6A). Hodnota obsahu Chl klesla z 16,1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0. dpo) na 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6. dpo). Tento pokles byl tedy mnohem výraznější než u varianty wt.

Pokles obsahu Chl byl u listů inkubovaných na FAR oproti tmě zpomalen: u listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření se téměř nezměnil (klesl jen o 2 %). U listů inkubovaných na FAR o vysoké ozáření nedošlo během šesti dnů po oddělení téměř k žádnému poklesu obsahu Chl: obsah Chl klesl z hodnoty 14,6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0. dpo) na 14,2 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6. dpo).

5.3.2 Parametr F_v/F_p

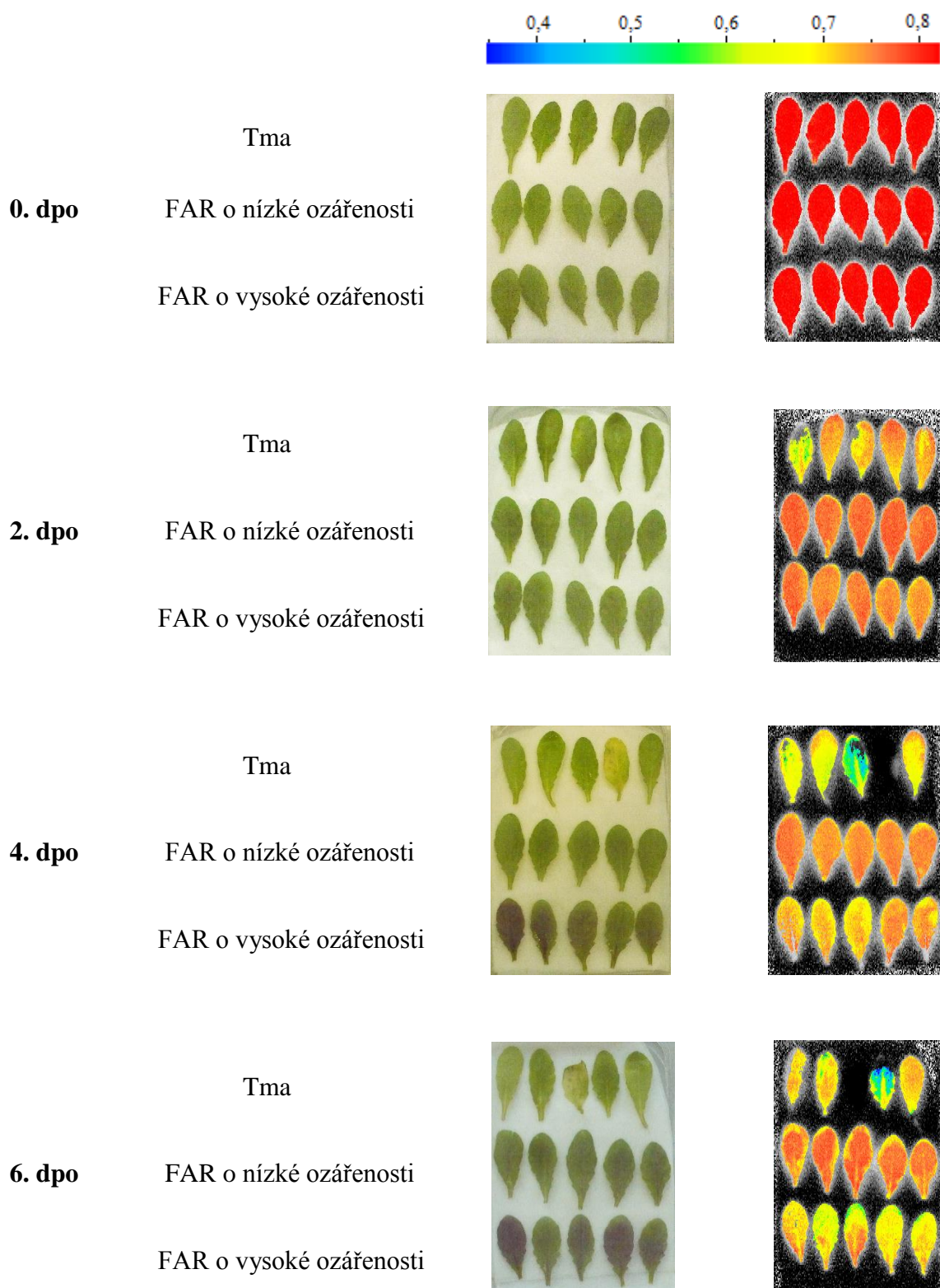
U oddělených listů varianty *ahk3,4* inkubovaných ve tmě došlo během šesti dnů po oddělení k 15% poklesu F_v/F_p (z hodnoty 0,816 na 0,690), přičemž rozdíl těchto hodnot nebyl statisticky významný (Obr. 6B). Ve srovnání s variantou wt byl pokles menší. U listů inkubovaných na FAR došlo během šesti dnů po oddělení také k postupnému poklesu F_v/F_p oproti výchozí hodnotě: poměr F_v/F_p u listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření klesl o 10 %, na FAR o vysoké ozáření o 20 %. U oddělených listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření došlo k poklesu F_v/F_p z hodnoty 0,813 (0. dpo) na 0,745 (6. dpo), na FAR o vysoké ozáření z hodnoty 0,815 (0. dpo) na 0,681 (6. dpo).

Na Obr. 7 můžeme vidět změny parametru F_v/F_p v ploše oddělených listů *ahk3,4*. S dobou po oddělení a v rámci všech světelných variant docházelo k postupnému poklesu F_v/F_p , a to především u listů inkubovaných ve tmě. Čtvrtý a šestý den po oddělení došlo u listů *ahk3,4* inkubovaných na FAR o vysoké ozáření k výrazné změně pigmentace listů do fialova, zřejmě tedy k nárůstu obsahu anthokyanů v listech (Obr. 7).



Obr. 6: Obsah Chl (A) a poměr F_v/F_p (B) v oddělených listech varianty *ahk3,4* měřené 0., 2., 4. a 6. den po oddělení ve tmě a na FAR o nízké ozáření ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ozáření ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Uvedeny mediány a kvartily ($n = 5$). Různá písmena označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými v daném termínu v listech na různých světelných režimech ($P \leq 0,05$), hvězdičky označují statisticky významně odlišnou hodnotu od hodnoty naměřené 0. den po oddělení (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$).

Varianta *ahk3,4*



Obr. 7: Fotografie (vlevo) a parametr F_v/F_p (vpravo) oddělených listů *A. thaliana* varianty *ahk3,4* - 0., 2., 4. a 6. den po oddělení (dpo).

5.4 Varianta *ahk2,4*

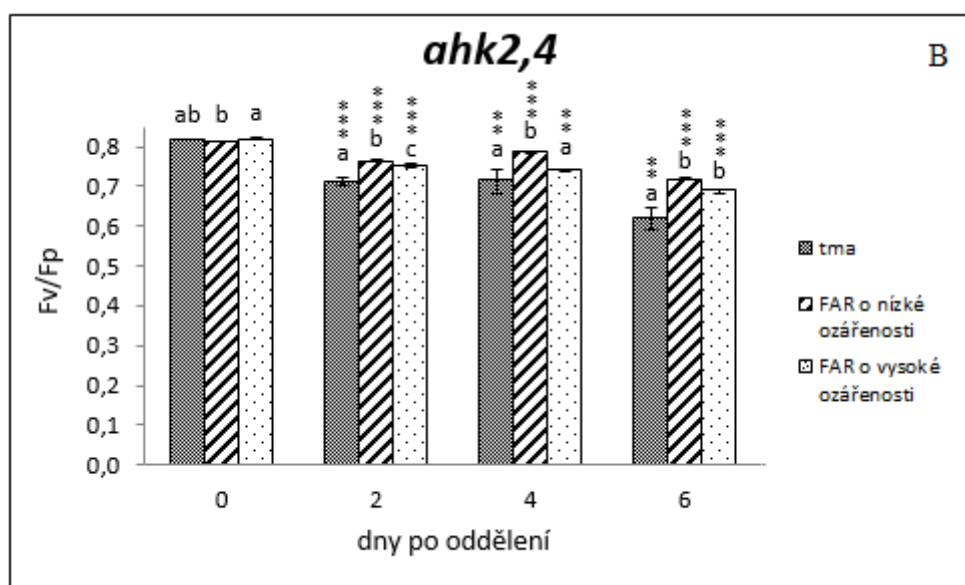
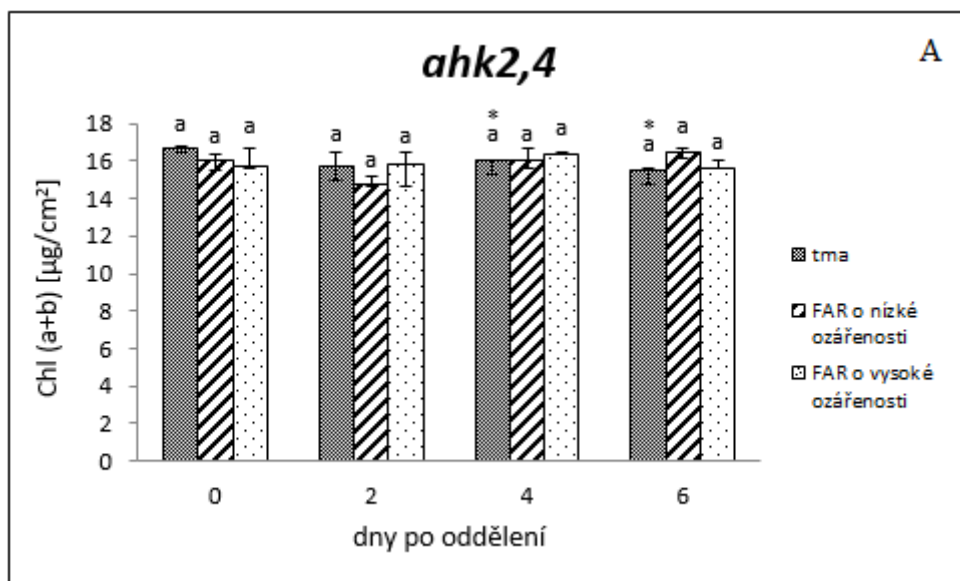
5.4.1 Obsah chlorofylu

Obsah Chl u listů varianty *ahk2,4* inkubovaných ve tmě klesl během šesti dnů po oddělení z 16,6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ na 15,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Obr. 8A). Tento 10% pokles byl přibližně stejný jako u listů wt inkubovaných ve tmě. U listů inkubovaných na FAR došlo ke zpomalení poklesu obsahu Chl: obsah Chl u listů na FAR o nízké i vysoké ozáření se během šesti dnů po oddělení téměř nezměnil. U listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření došlo dokonce k mírnému nárůstu obsahu Chl oproti původní hodnotě. Ovšem tato změna nebyla oproti počáteční hodnotě obsahu Chl statisticky průkazná.

5.4.2 Parametr F_v/F_p

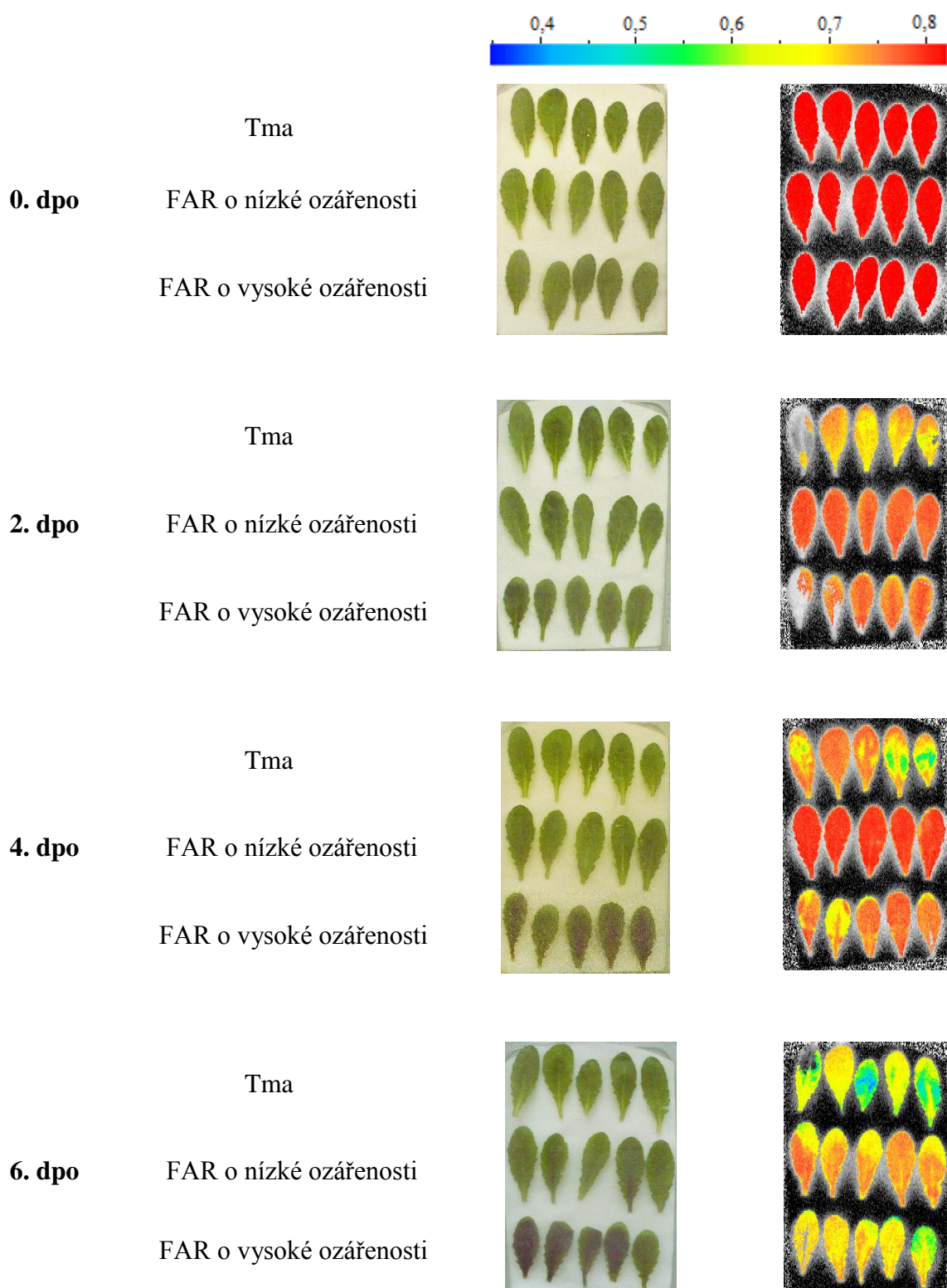
U oddělených listů *ahk2,4* inkubovaných ve tmě došlo během šesti dnů po oddělení k 25% poklesu F_v/F_p : hodnota F_v/F_p klesla z 0,816 (0. dpo) na 0,623 (6. dpo) (Obr. 8B). Pokles F_v/F_p byl tedy podobný jako u listů varianty wt. U listů inkubovaných na FAR došlo ke zpomalení poklesu F_v/F_p oproti tmě: u listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření došlo k poklesu F_v/F_p o 10 % (z 0,812 na 0,719), na FAR o vysoké ozáření o 15 % (z 0,819 na 0,690). Efekt FAR byl statisticky průkazný pro obě ozáření.

Postupný pokles F_v/F_p v ploše listů jednotlivých světelných variant je zřejmý i z Obr. 9. Nejvýraznější pokles F_v/F_p byl zaznamenán u listů inkubovaných ve tmě. U varianty *ahk2,4* došlo 6. dpo u listů inkubovaných na FAR o vysoké ozáření k výrazné pigmentaci listů do fialova, a tedy zřejmě k nárůstu obsahu anthokyanů v listech.



Obr. 8: Obsah Chl (A) a poměr F_v/F_p (B) v oddělených listech varianty *ahk2,4* měřené 0., 2., 4. a 6. den po oddělení ve tmě a na FAR o nízké ozáření ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ozáření ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Uvedeny mediány a kvartily ($n = 5$). Různá písmena označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými v daném termínu v listech na různých světelných režimech ($P \leq 0,05$), hvězdičky označují statisticky významně odlišnou hodnotu od hodnoty naměřené 0. den po oddělení (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$).

Varianta *ahk2,4*



Obr. 9: Fotografie (vlevo) a parametr F_v/F_p (vpravo) oddělených listů *A. thaliana* varianty *ahk2,4* - 0., 2., 4. a 6. den po oddělení (dpo).

5.5 Varianta *pga22*

5.5.1 Obsah chlorofylu

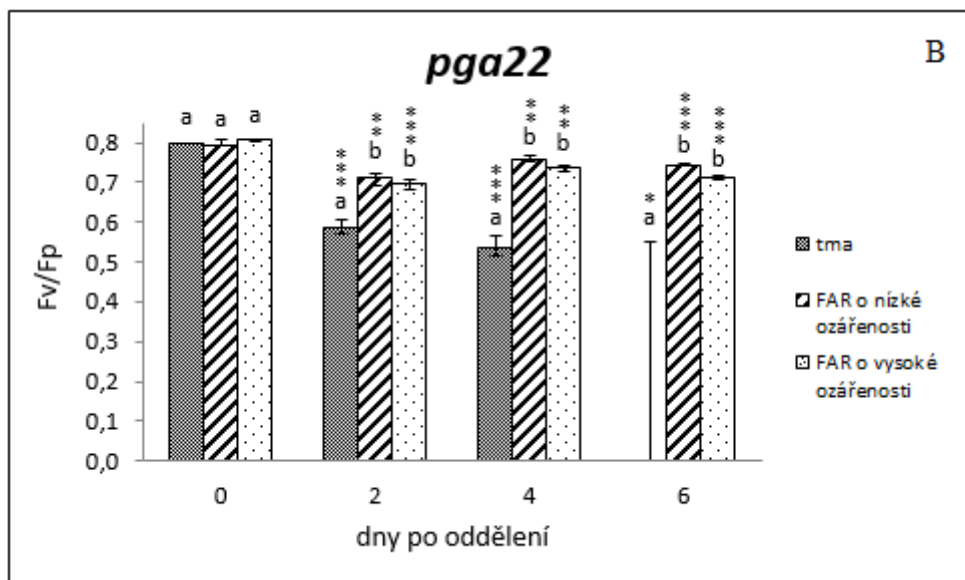
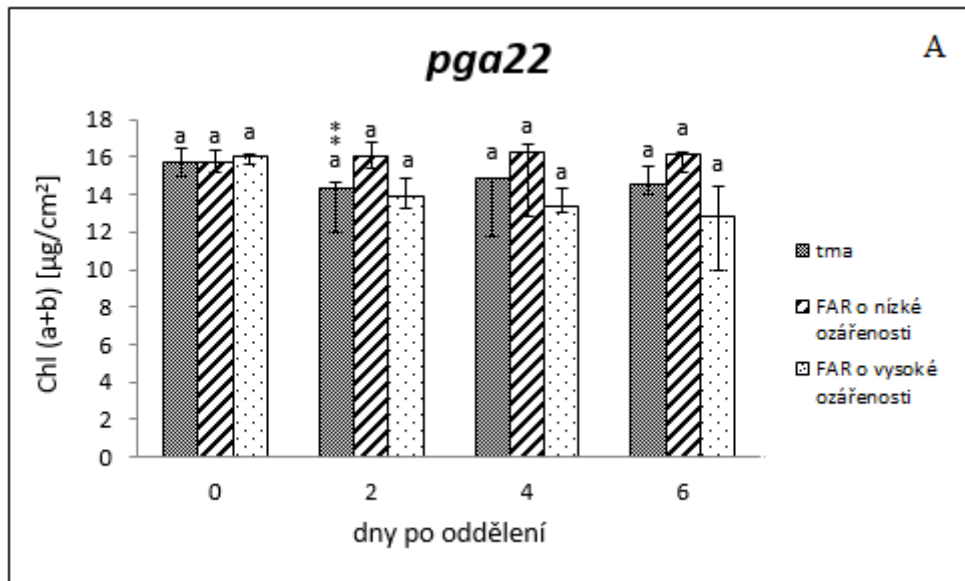
Pokles obsahu Chl v listech varianty *pga22* inkubovaných ve všech světelných režimech nebyl během šesti dnů po oddělení statisticky významný (Obr. 10A). Statisticky významný pokles byl zaznamenán pouze 2. dpo u listů *pga22* inkubovaných ve tmě, kde již došlo k poklesu o 10 % oproti výchozí hodnotě. Celkově došlo u oddělených listů *pga22* inkubovaných ve tmě k poklesu obsahu Chl o 10 %: hodnota klesla z $15,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ na $14,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

U oddělených listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření nedošlo během šesti dnů po oddělení k poklesu obsahu Chl, ale došlo k jeho mírnému navýšení (o 3%) oproti výchozí hodnotě. Obsah Chl u listů inkubovaných na FAR o vysoké ozáření klesl během šesti dnů po oddělení o 20 % oproti výchozí hodnotě, a to z $16,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0. dpo) na $12,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6. dpo).

5.5.2 Parametr F_v/F_p

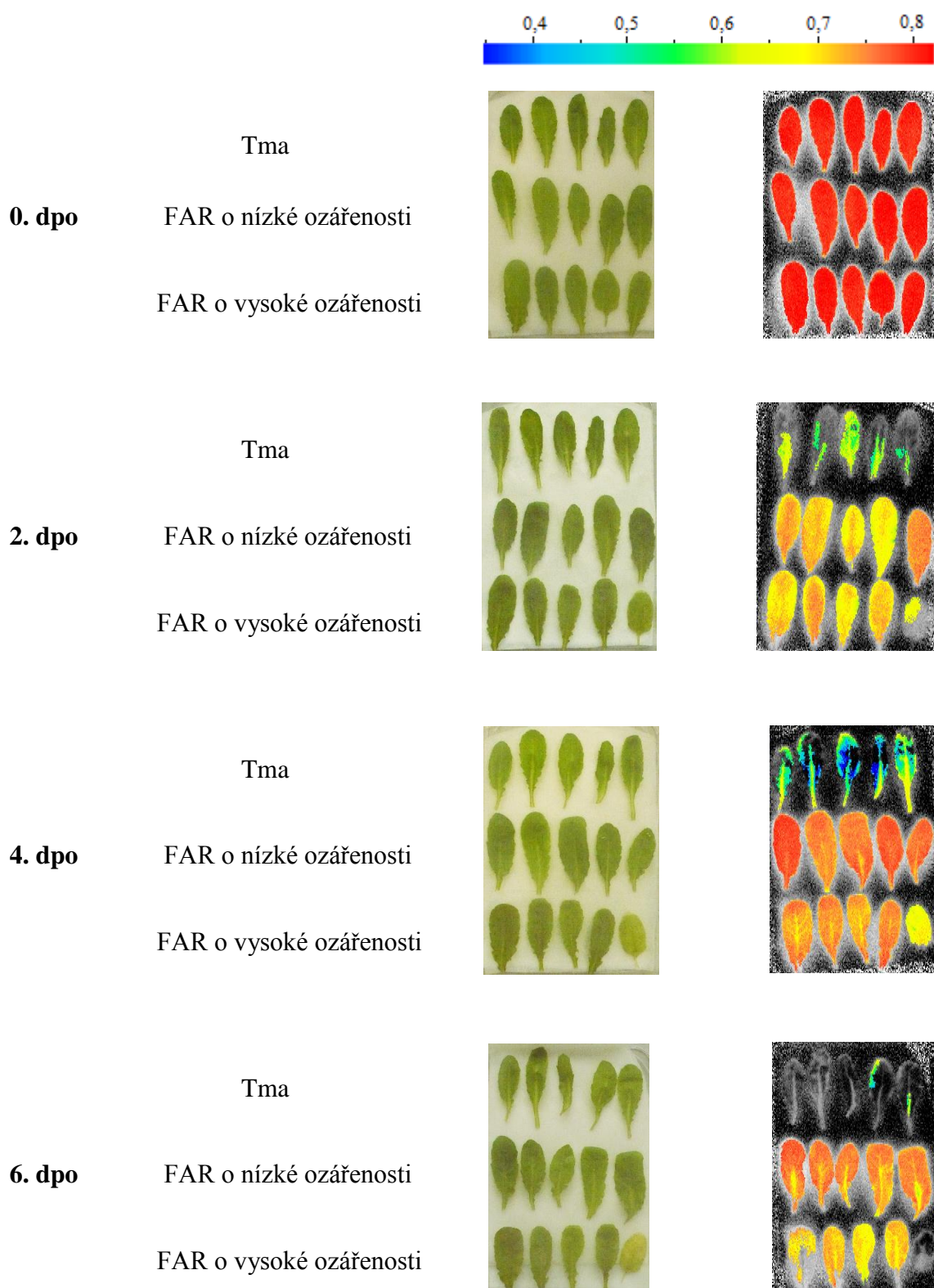
Hodnota F_v/F_p u oddělených listů varianty *pga22* inkubovaných ve tmě klesla během šesti dnů po oddělení o 100% oproti výchozí hodnotě (0,799, 0. dpo) – (Obr. 10B). Toto radikální snížení F_v/F_p bylo mnohem výraznější než u varianty wt, kde hodnota klesla během šesti dnů po oddělení o 25 %. Přítomnost FAR velmi výrazně zpomalila pokles F_v/F_p : u listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření došlo pouze k 5% poklesu (z 0,794 na 0,742), na FAR o vysoké ozáření k 10 % poklesu (z 0,806 na 0,710).

Změny parametru F_v/F_p v ploše oddělených listů s dobou po oddělení jsou uvedeny na Obr. 11: je patrný postupný pokles F_v/F_p s dobou po oddělení, a to zejména u listů inkubovaných ve tmě, kde jsou patrně nižší hodnoty F_v/F_p již 2. dpo. U oddělených listů *pga22* nedošlo ke změně pigmentace listů do fialova.



Obr. 10: Obsah Chl (A) a poměr F_v/F_p (B) v oddělených listech varianty pga22 měřené 0., 2., 4. a 6. den po oddělení ve tmě a na FAR o nízké ozářenosti ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ozářenosti ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Uvedeny mediány a kvartily ($n = 5$). Různá písmena označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými v daném termínu v listech na různých světelných režimech ($P \leq 0,05$), hvězdičky označují statisticky významně odlišnou hodnotu od hodnoty naměřené 0. den po oddělení (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$).

Varianta *pga22*



Obr. 11: Fotografie (vlevo) a parametr F_v/F_p (vpravo) oddělených listů *A. thaliana* varianty *pga22* - 0., 2., 4. a 6. den po oddělení (dpo).

5.6 Varianta *pga22(I)*

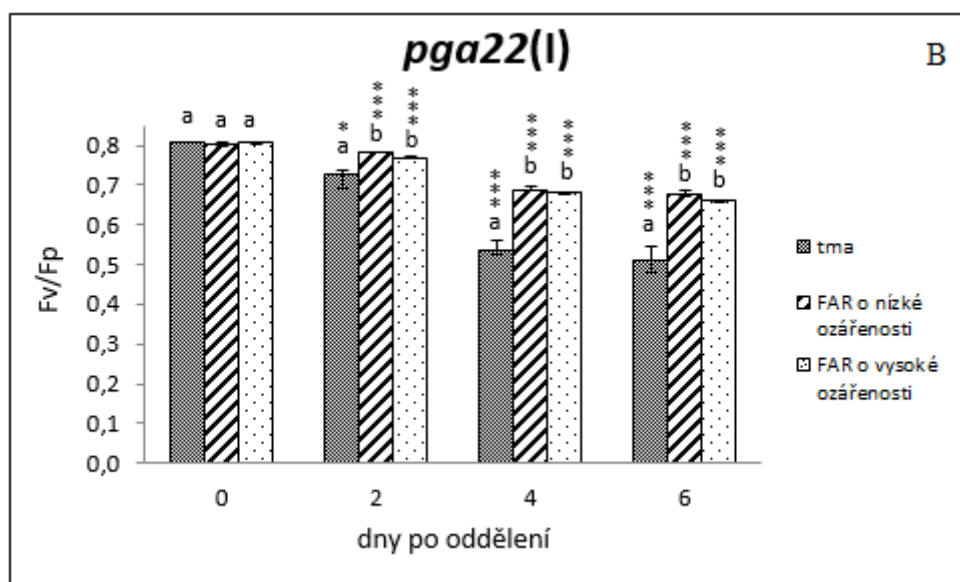
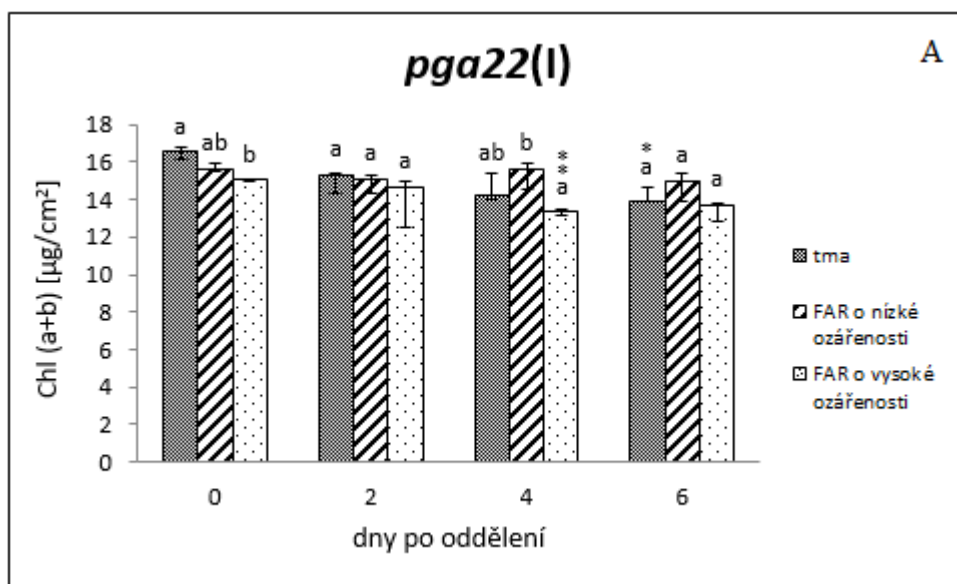
5.6.1 Obsah chlorofylu

Obsah Chl u oddělených listů varianty *pga22(I)* inkubovaných ve tmě klesl během šesti dnů po oddělení z hodnoty $16,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0. dpo) na $13,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6. dpo) (Obr. 12A). Tento 15% pokles obsahu Chl byl v porovnání s *wt* a *pga22* rychlejší. Pokles obsahu Chl u listů inkubovaných na FAR během šesti dnů po oddělení nebyl oproti výchozí hodnotě statisticky významný: u listů na FAR o nízké ozáření došlo k poklesu hodnot o 5 % (z $15,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ na $15,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), u listů na FAR o vysoké ozáření byl pokles 9% (z $15,0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ na $13,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$).

5.6.2 Parametr F_v/F_p

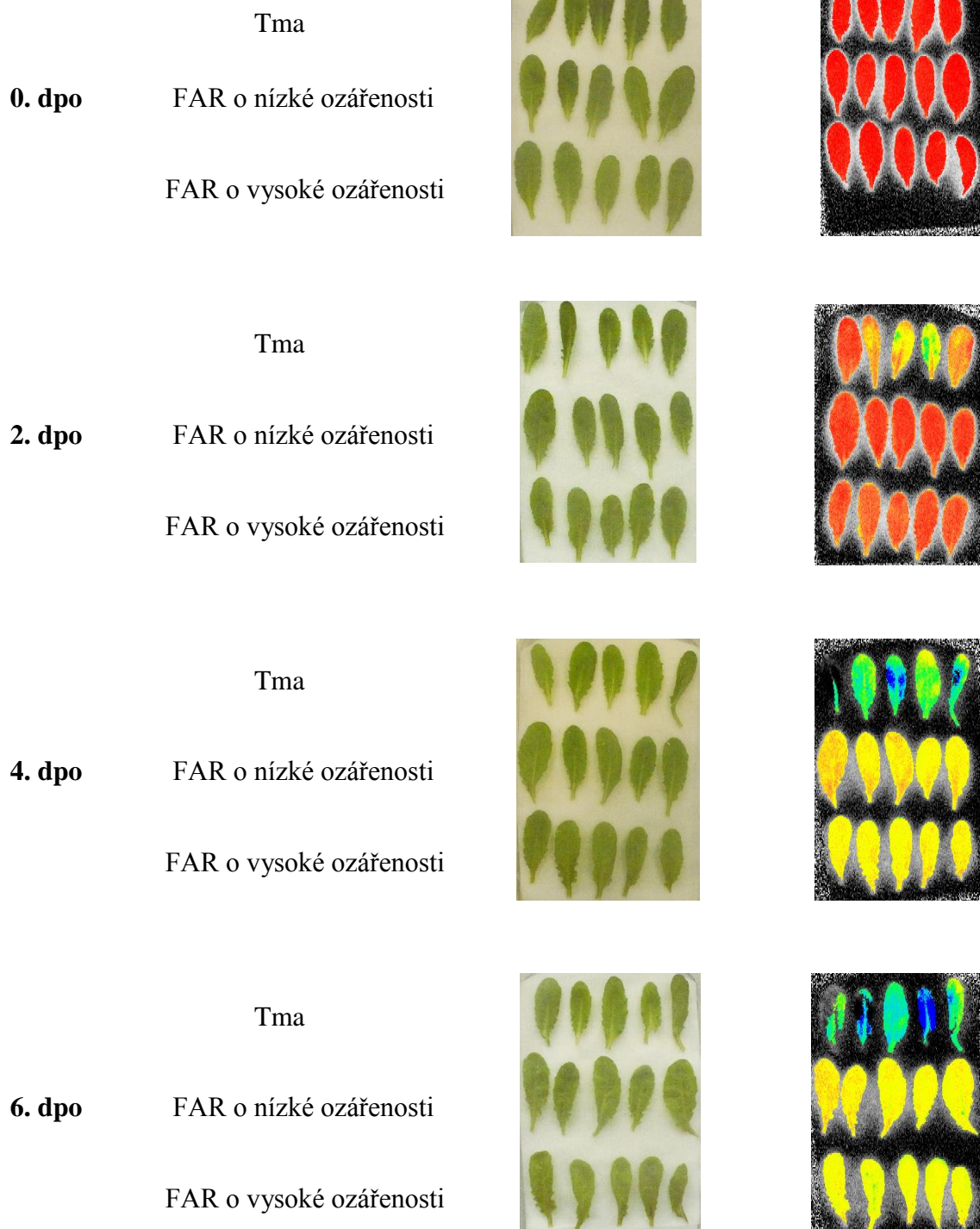
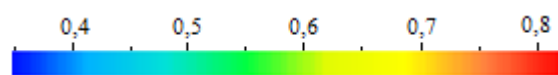
Hodnota F_v/F_p u oddělených listů varianty *pga22(I)* inkubovaných ve tmě klesla během šesti dnů po oddělení o 40 %, a to z 0,808 (0. dpo) na 0,509 (6. dpo) (Obr. 12B). U oddělených listů inkubovaných na FAR došlo ke zpomalení poklesu F_v/F_p oproti tmě. U listů inkubovaných na FAR o nízké ozáření klesl F_v/F_p během šesti dnů po oddělení o 15 % (z 0,805 na 0,676). Hodnota F_v/F_p listů inkubovaných na FAR o vysoké ozáření klesla během šesti dnů po oddělení o 20 %, a to z 0,806 (0. dpo) na 0,659 (6. dpo).

Na Obr. 13 jsou prezentovány změny parametru F_v/F_p varianty *pga22(I)* v ploše oddělených listů s dobou po oddělení. Nejvýraznější pokles F_v/F_p byl zaznamenán u listů inkubovaných ve tmě (4. a 6. dpo). U varianty *pga22(I)* nedošlo ke změně pigmentace listů do fialova (Obr. 13).



Obr. 12: Obsah Chl (A) a poměr F_v/F_p (B) v oddělených listech varianty *pga22(I)* měřené 0., 2., 4. a 6. den po oddělení ve tmě a na FAR o nízké ozáření ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ozáření ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Uvedeny mediány a kvartily ($n = 5$). Různá písmena označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami naměřenými v daném termínu v listech na různých světelných režimech ($P \leq 0,05$), hvězdičky označují statisticky významně odlišnou hodnotu od hodnoty naměřené 0. den po oddělení (* - $P \leq 0,05$, ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$).

Varianta *pga22(I)*



Obr. 13: Fotografie (vlevo) a parametr F_v/F_p (vpravo) oddělených listů *A. thaliana* varianty *pga22(I)* - 0., 2., 4. a 6. den po oddělení (dpo).

6. DISKUSE

Míra senescence je obvykle stanovována podle obsahu Chl, protože je dobře známo, že při senescenci (přirozené i indukované) dochází k postupnému úbytku Chl (např. Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006). Při senescenci dochází ke zhoršení funkce fotosyntetického aparátu včetně snížení maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII vyjadřovaného poměrem F_v/F_m (resp. F_v/F_p). Zpravidla také dochází k akumulaci ROS a k nárůstu oxidativního poškození (Vlčková a kol. 2006). Senescence je ovlivňována řadou faktorů, mezi které patří FAR a CK. Vliv světelných podmínek na účinek CK a na senescenci nebyl prozatím zcela prostudován.

Je známo, že průběh senescence je ovlivňován FAR, přičemž oproti tmě může mít FAR jak pozitivní – zpomalující (zpravidla v případě nižších intenzit), tak negativní – urychlující účinek (zpravidla v případě vyšší intenzity nebo dávky) (např. Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006). U listů inkubovaných ve tmě s exogenní aplikací CK dochází obvykle ke zpomalení senescence, pokud ale naroste dávka (např. při použití kontinuálního FAR místo periodického) nebo se zvýší intenzita FAR, exogenní aplikace CK může senescenci urychlit. U rostlin s ovlivněným (zvýšeným nebo sníženým) obsahem endogenních cytokininů nebo s ovlivněnou percepcí CK byl v souvislosti s indukovanou senescencí oddělených listů většinou posuzován pouze průběh senescence ve tmě (např. Kim et al. 2006, Riefler a kol. 2006) a není tudíž známo, jestli a jak přítomnost FAR tento průběh ovlivňuje.

V bakalářské práci byl proto studován průběh indukované senescence oddělených listů *Arabidopsis thaliana* se změněnou endogenní hladinou CK a jejich percepcí při různých světelných podmínkách: ve tmě, na FAR o nízké ozáření (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a na FAR o vysoké ozáření (300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Míra senescence byla určována pomocí obsahu Chl a parametru F_v/F_p . Jako rostlinný materiál byly použity různé varianty huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.): wt, *ahk2,3*, *ahk3,4*, *ahk2,4*, *pga22* a *pga22(I)*. Měření probíhalo 0., 2., 4. a 6. dpo.

V případě listů varianty wt inkubovaných ve tmě došlo během 6 dní po oddělení k poklesu obsahu Chl asi o 11 % (Obr. 2A), úbytek Chl byl tedy velmi mírný. V případě FAR o nízké ozáření byl uvedený pokles mírně zpomalen, avšak tento efekt nebyl statisticky významný. FAR o vysoké ozáření naopak mírně zesílilo pokles obsahu Chl

oproti tmě, avšak ani tento efekt nebyl statisticky průkazný. V případě změn obsahu Chl tedy nemělo FAR prokazatelný účinek. Avšak je nutné poznamenat, že měření obsahu Chl v případě listů inkubovaných na FAR bylo zřejmě zkresleno předpokládanou akumulací antokyanů (Obr. 3). Přítomnost antokyanů může totiž zvyšovat hodnotu měřenou chlorofylmetrem SPAD (Hlavinka a kol. 2013) a naměřená hodnota tedy mohla být u nafialovělých listů vyšší, než odpovídalo skutečnému obsahu Chl.

Na rozdíl od obsahu Chl FAR u listů wt průkazně zpomalilo pokles F_v/F_p oproti tmě (Obr. 2B, Obr. 3), a to jak FAR o nízké, tak FAR o vysoké ozářenosti. Zpomalení senescence oddělených listů na FAR o nízké ozářenosti oproti tmě zjistili také např. Špundová a kol. (2003) nebo Schlüter a kol. (2011). Pokles F_v/F_p byl oproti tmě výrazně zpomalen také u oddělených listů ječmene inkubovaných při NP, NK a IP režimu (Melkovičová 2012). Rozdíl mezi hodnotou F_v/F_p u listů na FAR o nízké a vysoké ozářenosti nebyl v našem případě statisticky průkazný (Obr. 2B), což znamená, že v případě vysokého FAR zřejmě nebyla překročena „hraniční“ intenzita, při které už by docházelo k urychlení poklesu F_v/F_p (Melkovičová 2012).

U oddělených listů receptorového mutantu *ahk2,3* došlo v porovnání s wt k výraznějšímu poklesu obsahu Chl (Obr. 4A). Při oddělení byl obsah Chl v listech tohoto mutantu a wt přibližně stejný. Tyto výsledky neodpovídají výsledkům práce Riefler a kol. (2006), ve které měl mutant počáteční obsah Chl nižší a po 10 dnech indukované senescence ve tmě přibližně stejný jako wt. Předpokládáme, že rozdílný výsledek v případě počátečního obsahu Chl by mohl souviset s jinými světelnými podmínkami při pěstování rostlin: v našem případě byl použit režim 8 h světlo (LED)/16 h tma, v práci Rieflera a kol. (2006) režim 16 h světlo (skleník)/8 h tma. Podle autorů nejsou CK k syntéze Chl přímo potřebné, spíše se podílejí na modulaci obsahu Chl při daných podmínkách.

Oproti tmě došlo u listů *ahk2,3* inkubovaných na FAR ke zpomalení poklesu obsahu Chl. Na rozdíl od wt byl tento efekt statisticky průkazný, a to pro FAR obou ozářeností (Obr. 4A). Přítomnost FAR se však neprojevila v případě F_v/F_p – rozdíly hodnot naměřených 6. dpo v listech inkubovaných ve tmě a na FAR byly statisticky neprůkazné. Jedním z důvodů mohl být velký rozptyl hodnot z důvodu slabého fluorescenčního signálu dvou listů ze tmy (Obr. 5). Listy *ahk2,3* by měly být podle Cortleven a kol. (2014) citlivější k působení FAR o vysoké ozářenosti – po 24 h působení

FAR o ozáření 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byl zaznamenán výraznější pokles F_v/F_m v porovnání s wt. V našem případě tedy použitá ozáření 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ještě neměla poškozující vliv na fotosystém II.

V případě listů varianty *ahk3,4* byly získány velmi podobné výsledky jako v případě mutantu *ahk2,3*. Obsah Chl klesal po oddělení rychleji než u wt, přičemž FAR tento pokles průkazně potlačilo (Obr. 6A). Podobně jako u wt, také u tohoto mutantu bylo zaznamenáno fialovění listů inkubovaných na FAR (Obr. 7), což mohlo zkreslit výsledky měření chlorofylmetrem. Pozitivní efekt FAR v případě F_v/F_p nebyl statisticky průkazný (Obr. 6B), nicméně na Obr. 7 jsou patrné vyšší hodnoty F_v/F_p u listů na FAR o nízké ozáření.

Mírné urychlení senescence oddělených listů mutantů bez receptoru AHK3 ve tmě odpovídá výsledkům práce Kim a kol. (2006), ve které byla zjištěna rychlejší senescence u „single“ mutantu *ahk3*, což autoři vysvětlují klíčovou rolí AHK3 při regulaci délky života listů. Významnost role AHK3 se ještě více projevuje v případě aplikace exogenních CK zpomalující senescenci oddělených listů ve tmě (Kim a kol. 2006, Riefler a kol. 2006).

Díky přítomnosti receptoru AHK3 se tedy dalo očekávat zpomalení průběhu senescence u listů mutantu *ahk2,4* inkubovaných ve tmě. Ke zpomalení poklesu obsahu Chl v porovnání s *ahk2,3*, *ahk3* a wt skutečně došlo (Obr. 8A), podobně jako v práci Kim a kol. (2006), kde byl pokles obsahu Chl pomalejší u „single“ mutantu *ahk2* v porovnání s wt a *ahk3*. U listů na FAR nedošlo ke statisticky průkaznému zpomalení poklesu obsahu Chl oproti tmě, nicméně zpomalující efekt FAR byl průkazný v případě F_v/F_p , tak jako u wt.

Mutanty *pga22* jsou pravděpodobně ovlivněny v klíčových složkách biosyntézy a signalizaci CK (Sun a kol. 2003). Obsahují vyšší množství IPT než wt a jsou citlivé na přítomnost 17- β -estradiolu. Aplikace 17- β -estradiolu způsobuje navození exprese genu pro IPT a výrazně zvyšuje obsah CK (Spíchal 2013 – nepublikované výsledky). V našem experimentu byl sledován průběh senescence u rostlin *pga22* bez a po aplikaci 17- β -estradiolu (varianta označená jako *pga(I)*).

Pokles obsah Chl u listů *pga22* inkubovaných ve tmě nebyl ani po 6 dnech po oddělení statisticky významný (Obr. 10A). U listů *pga22(I)* došlo k mírnému urychlení poklesu obsahu Chl oproti wt a *pga22*, přičemž tento 16% pokles oproti počáteční hodnotě byl statisticky průkazný (Obr. 12A). FAR nemělo na pokles obsahu Chl statisticky průkazný efekt ani u listů *pga22*, ani u *pga(I)* (Obr. 10A, 12A).

Zajímavější výsledky byly zjištěny u parametru F_v/F_p . U listů *pga22* inkubovaných ve tmě došlo během šesti dní po oddělení k nejvýraznějšímu poklesu F_v/F_p v rámci všech měřených variant (6. dpo nebyly listy už téměř měřitelné, fluorescenční signál byl velmi slabý (Obr. 10B, Obr. 11). U listů *pga22(I)* inkubovaných ve tmě ale došlo k výraznému zpomalení tohoto poklesu (Obr. 12B). Výrazné udržení funkce PSII v listech *pga22(I)* bylo zřejmě způsobeno předpokládanou zvýšenou koncentrací CK. Tento výsledek je v souladu s literaturou, protože např. Vlčková a kol. (2006) při pozorování vlivu exogenní aplikace cytokininu mT (10^{-4} M) na listy pšenice inkubované ve tmě zjistili zpomalení poklesu F_v/F_p u listů s exogenní aplikací mT oproti listům bez mT. Melkovičová (2012) také pozorovala u listů ječmene inkubovaných ve tmě zpomalení poklesu F_v/F_p po aplikaci CK mT a BAP.

FAR průkazně zpomalilo pokles F_v/F_p u listů *pga22* i *pga22(I)* oproti tmě (Obr. 10B, Obr. 11, Obr. 12B, Obr. 13). V případě *pga22* byly 6. dpo u listů na FAR o nízké ozáření patrné vyšší hodnoty F_v/F_p než u listů na FAR o vysoké ozáření (Obr. 11), i když tento rozdíl nebyl statisticky významný (Obr. 10B). Ze srovnání variant *pga22* a *pga22(I)* je zřejmé, že 2. dpo byly u *pga22(I)* hodnoty F_v/F_p vyšší, zatímco 4. a 6. dpo nižší než u *pga22*. Tento výsledek odpovídá předpokládanému vlivu zvýšené koncentrace CK působící současně s FAR: počáteční pozitivní vliv vyšší koncentrace CK (tj. udržení funkce PSII) se s dobou po oddělení mění v negativní (tj. zhoršuje funkci PSII oproti listům bez vlivu CK nebo oproti listům pod vlivem CK, ale ve tmě) (Vlčková a kol. 2006, Melkovičová 2012). Podle Vlčkové a kol. (2006) tento efekt souvisí s nárůstem oxidativního poškození v důsledku přeexcitování fotosyntetického aparátu.

7. ZÁVĚR

Je známo, že FAR ovlivňuje průběh senescence oproti tmě. Při nižších intenzitách FAR obvykle dochází ke zpomalení senescence, při vyšších intenzitách FAR k urychlení senescence (např. Špundová a kol. 2003, Vlčková a kol. 2006), ovšem vliv FAR na účinek CK při senescenci nebyl prozatím zcela prostudován. Exogenní aplikace CK obvykle zpomalí senescenci u listů inkubovaných ve tmě, ovšem dojde-li ke zvýšení dávky světla nebo jeho intenzity, může dojít vlivem exogenní aplikace CK k urychlení senescence. U rostlin s ovlivněným (zvýšeným nebo sníženým) obsahem endogenních cytokininů nebo s ovlivněnou percepcí CK byl v souvislosti s indukovanou senescencí oddělených listů většinou posuzován pouze průběh senescence ve tmě a není tudíž známo, jestli a jak přítomnost FAR tento průběh ovlivňuje.

V naší práci došlo u oddělených listů receptorových mutantů *ahk2,3* a *ahk3,4* ve tmě v porovnání s wt k očekávanému výraznějšímu poklesu obsahu Chl. Mírné urychlení senescence oddělených listů mutantů bez receptoru AHK3 ve tmě je v souladu s prací Kim a kol. (2006), ve které bylo zjištěno, že rychlejší senescence probíhá u „single“ mutantu *ahk3*. Autoři tento efekt vysvětlují klíčovou rolí AHK3 při regulaci délky života listů. Zatímco u variant wt a *ahk2,4* nebyl pozorován zpomalující účinek FAR na pokles obsahu Chl, u *ahk2,3* a *ahk3,4* byl tento účinek průkazný, zřejmě z důvodu výraznějšího poklesu obsahu Chl ve tmě. To znamená, že nepřítomnost receptoru AHK3 při indukované senescenci by mohla být do jisté míry kompenzována přítomností FAR. Tuto hypotézu ale bude potřeba ověřit.

Předpokládaná zvýšená koncentrace CK v listech *pga22(I)* zpomalila snížení funkce PSII u listů inkubovaných ve tmě. V přítomnosti FAR se pozitivní vliv zvýšené koncentrace CK s dobou po oddělení změnil v negativní, což by podle literatury mohlo souviset s nárůstem oxidativního poškození v důsledku přeexcitování fotosyntetického aparátu. Pro hledání mechanismů společného působení CK a FAR při indukované senescenci bude potřeba ověřit, jak se mění obsah CK v těchto mutantech během indukované senescence při různých světelných režimech.

8. SEZNAM LITERATURY

- Ananieva K, Ananiev E, Doncheva S, Georgieva K, Tzvetkova N, Kamínek M, Motyka V, Dobrev P, Gajdošová S, Malbeck J (2008) Senescence progression in a single darkened cotyledon depends on the light status of the other cotyledon in *Cucurbit pepo* (zucchini) seedlings: potential involvement of cytokinins and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity. *Plant Physiol* 134: 609–623
- Belintani NG, Guerzoni JTS, Moreira RMP, Vieira LGE (2012) Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the *ipt* gene under a cold inducible promoter. *Biol Plantarum* 56: 71–77
- Breeze E, Harrison E, McHattie S, Hughes L, Hickman R, Hill C, Kiddle S, Kim YS, Penfold CA, Jenkins D, Zhang C, Morris K, Jenner C, Jackson S, Thomas B, Tabrett A, Legaie R, Moore JD, Wild DL, Ott S, Rand D, Beynon J, Denby K, Mead A, Buchanan-Wollaston V (2011) High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell* 23: 873–894
- 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, 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
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986–1988
- Guo Y, Gan S (2005) Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Curr Top Dev Biol* 71: 83–112
- Hlavinka J, Nauš J, Špundová M (2013) Anthocyanin contribution to chlorophyll meter readings and its correction. *Photosynth Res* 118: 277–295
- Chernyad'ev II (2000) Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins. *Appl Environ Microbiol* 36: 527–539

- 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
- 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*. *PNAS* 103: 814–819
- Kitajima M, Butler WL (1975) Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts. *Biochem Biophys Acta* 396: 72–85
- 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
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 350–382
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* 58: 115–136
- Luštinec J, Žárský V (2005) Úvod do fyziologie vyšších rostlin, Karolinum, Praha
- Melkovičová H (2012) Koncentračná závislosť účinkov cytokinínov na indukovanú senescenciu rastlín. Bakalárska práca, UP Olomouc
- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad M, Spíchal L (2011) N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* 72: 821–831
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* 37: 128–138
- Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 89–118
- Noodén LD, Guiamét JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Physiol Plant* 101: 746–753
- Petit-Paly G, Franck T, Brisson L, Revers C, Chénieux J C, Rideau M (1999) Cytokinin modulates katalase activity and coumarin accumulation in *in vitro* cultures of tobacco. *J Plant Physiol* 155: 9–15

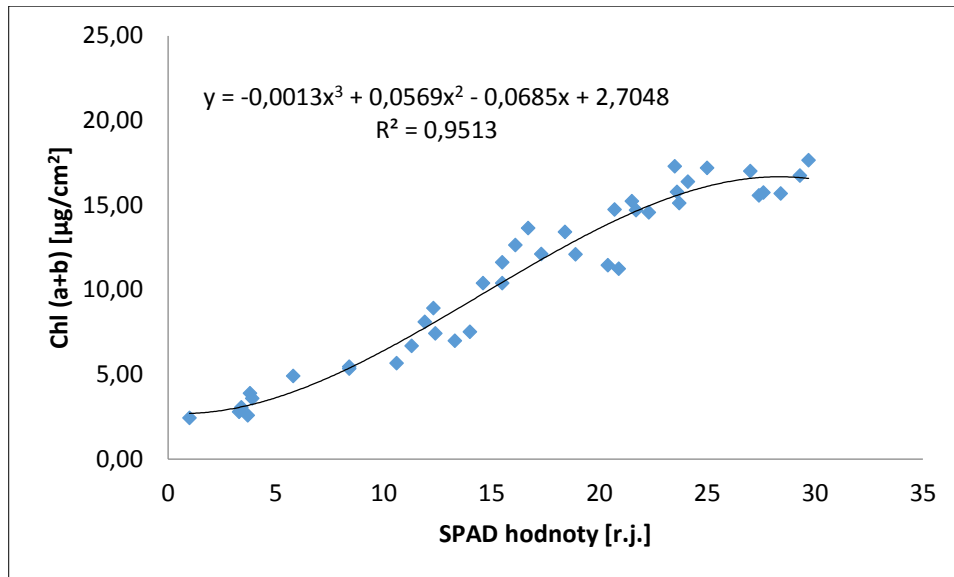
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J a kol. (1998) Fyziologie rostlin, Academia, Praha
- Riefler M, Novák O, Strnad M, Schmölling T (2006) Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism: *Plant Cell* 18, 40–54
- Rulcová J, Pospíšilová J (2001) Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biol Plantarum* 44: 75–81
- Selivankina SY, Karavaiko NN, Kuiper D, Novikova GV, Kulaeva ON (2001) Cytokinin activity of zeatin allylic phosphate, a natural compound. *Plant Growth Regul* 33: 157–164
- Schlüter T, Leide J, Conrad K (2011) Light promotes an increase of cytokinin oxidase/dehydrogenase activity during senescence of barley leaf segments. *J Plant Physiol* 168: 694–698
- 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
- Špundová M, Popelková H, Ilík P, Skotnica J, Novotný R, Nauš J (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *J Plant Physiol* 160: 1051–1058
- Vlčková A, Špundová M, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nauš J (2006) Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiol Plant* 126: 257–267
- Werner T, Holst K, Pörs Y, Guivarc'h A, Mustroph A, Chriqui D, Grimm B, 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, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmölling T (2006) New insight into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol* 8: 371–381
- 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
- Zacharias L, Reid SM (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol* 80: 549–554

Zažímalová E, Kamínek M, Březinová A, Motyka V (1999) Control of cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Hooykaas PJJ, Hall MA, Libbenga KR (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Pp. 142-150. Elsevier Science B.V., Amsterdam

PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1

Kalibrační křivka pro chlorofylmetr SPAD-502



Obr. P1: Kalibrační křivka chlorofylmetru SPAD-502 získaná pomocí analytického stanovení obsahu chlorofylu v listech Arabidopsis.