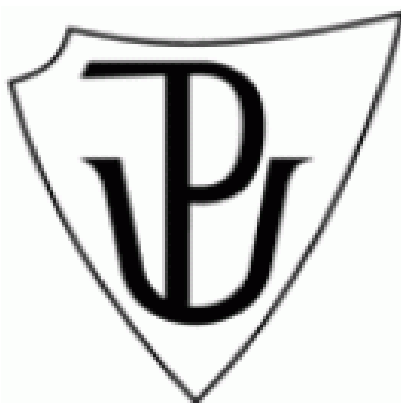


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

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



**Srovnání působení nových N9-substituovaných derivátů
cytokininů v průběhu indukované senescence**

Vypracoval: Petr Běčák

Obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Alexandra Husičková, Ph. D.

Děkuji vedoucí bakalářské práce Mgr. Alexandře Husičkové, Ph.D., za trpělivost při konzultacích a odbornou pomoc a čas. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Karlu Doležalovi, Dr., za odbornou pomoc při konzultování výsledků a za syntézu potřebných cytokininů, Ivetě Koblíkové a Renči Štáffové za pomoc při přípravě vzorků pro měření a při měření.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením Mgr. Alexandry Husičkové, Ph. D., za použití odborných článků uvedených v seznamu literatury na konci bakalářské práce.

V Olomouci dne: _____

Souhrn

Cytokininy (CK) jsou známy pro svoji schopnost zpomalit senescenci rostlin, ale z mnohých experimentů vyplynulo, že za jistých podmínek CK způsobují urychlení senescenčních procesů v rostlinách. Tento zvrát v účincích cytokininů byl pozorován u vysokých koncentrací a při vysoké ozáření listů. Od nového derivátu CK MeOBAPR 6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-ribofuranosylpurin, který byl syntetizován v Laboratoři růstových regulátorů PřF UP, se očekávalo, že nebude urychlovat senescenční procesy ani při koncentracích při kterých má CK BA toxické účinky na listy.

V naší práci byl studován vliv cytokininu MeOBAPR na oddělené listy ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.), přičemž jako pozitivní kontrola byl použit CK 6-benzyladenin (BA). Byla sledována závislost účinků těchto CK na jejich koncentraci a na světelných podmínkách. Pro stanovení míry indukované senescence byl měřen obsah chlorofylu a hodnota maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (F_v/F_p). Pro stanovení koncentrační závislosti byly v případě BA použity koncentrace (10, 100, 300 μM), v případě MeOBAPR koncentrace (10, 100, 300, 600 μM). Pro stanovení světelné závislosti jsme použili tři světelné režimy. „Tma“ a periodický režim 8 hodin tma/16 hodin světlo o nízké ($90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a vysoké ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ozáření. Jako kontrolní roztok byl použit 0,5% roztok DMSO (dimethylsulfoxid). DMSO bylo použito k přípravě roztoků CK všech koncentrací, tak aby v každé koncentraci byl 0,5 % roztok DMSO.

U listů inkubovaných v DMSO bez CK ve tmě byl po oddělení naměřen značný pokles obsahu chlorofylu i F_v/F_p . U listů inkubovaných na světle v DMSO nebyl pokles těchto parametrů tak výrazný jako ve tmě. Světlo tedy zpomalilo senescenční procesy. U listů uchovávaných ve tmě s CK bylo pozorováno zpomalení poklesu obsahu chlorofylu a F_v/F_p pro všechny koncentrace oproti kontrolním vzorkům v DMSO. BA signifikantně zpomalil senescenci, u listů inkubovaných ve tmě byla nejúčinnější nejvyšší použitá koncentrace (300 μM). Tato koncentrace měla u listů inkubovaných na intenzivním světle mírně poškozující účinek. Na intenzivním světle senescenci nejvíce zpomalil BA o koncentraci 10 μM . MeOBAPR měl ve srovnatelných koncentracích podobné účinky jako BA. Ve tmě dokázala koncentrace 600 μM MeOBAPR nejúčinněji oddálit senescenci. Avšak při inkubaci listů na světle byl v případě 600 μM MeOBAPR pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_p výrazně urychlen. U listů inkubovaných při vysoké ozáření

senescenci urychlil i 300 μ M MeOBAPR. Tudiž se podařilo prokázat, že MeOBAPR při vysokých koncentracích urychluje senescenci oddělených listů ječmene setého a že tento vliv silně závisí na světelných podmínkách.

Summary

Cytokinins (CKs) are known for their ability to retard or slow down plant senescence, but many experiments show that under certain conditions CK can accelerate the course senescence. This reverse of CKs effect was observed at application of high concentration and/or at high irradiance of leaves. From new CK derivative 6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-ribofuranosylpurin (MeOBAPR), that has been synthesized in the Laboratory of Plant Growth Regulator at the Faculty of Science PU, was expected, that this derivative would not accelerate the senescence processes. In our work was studied the influence of CK MEOBAPR on detached leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). CK 6-benzyladenin (BA) was used as a positive control. The dependence of effects of these CK on their concentration and on light conditions was estimated. For estimation of the extent of induced senescence were used measurements of chlorophyll content and of the maximal efficiency of photosystem II photochemistry (F_v/F_p). The detached leaves were kept in 0,5% solution of DMSO (dimethylsulfoxid) containing either BA (10, 100, 300 μ M) or MeOBAPR (10, 100, 300, 600 μ M). As a control solution was used pure 0,5% DMSO. The leaf segments were kept under three light regimes: darkness and periodic regimes of 8 hour dark/ 16 hour light of low ($90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and high ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) irradiance.

Considerable decrease in chlorophyll content and F_v/F_p was observed in the leaves incubated in DMSO without CKs kept in darkness. These decreases were markedly slowed down when the leaves were kept under light conditions. In the leaves incubated in dark with CKs was observed retardation of the declines of chlorophyll content and F_v/F_p for all concentrations in comparison to the control leaves in DMSO. Application of BA significantly slowed down the senescence induced changes; while applied in the darkness the highest concentration (300 μ M) being the most effective, when applied under the high light the same concentration had moderate detrimental effect and most effective was the concentration of 10 μ M BA. Similar results were measured in comparable concentrations of MeOBAPR. Application of the highest (600 μ M) concentration of MeOBAPR significantly slowed down senescence induced changes in the dark. However in leaves incubated under the low light conditions was observed markedly accelerated decline of chlorophyll content and F_v/F_p in the case of 600 μ M MeOBAPR. In the leaves incubated under the high light intensity was observed accelerated senescence already at the 300 μ M

MeOBAPR. It has been shown that MeOBAPR at high concentrations accelerates senescence and that these influence depends on light conditions.

Seznam zkratk

ATP	- adenzin-3-fosfát
BA	- 6-benzyladenin
CAT	- kataláza
CK	- cytokinin(y)
CKX	- cytokinin oxido/reduktáza
Cyt b ₆ /f	- cytochrom b ₆ /f komplex
DMSO	- dimethylsulfoxid
F _m	- maximální intenzita fluorescence chlorofylu
F _o	- minimální intenzita fluorescence chlorofylu
F _p	- intenzita fluorescence ve vlně P křivky velmi rychlé fluorescenční indukce
F _v	- variabilní fluorescence
F _v /F _p	- maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
Chl	- chlorofyl
CWI	- cell wall invertáza, invertáza v buněčné stěně
GR	- glutathion reduktáza
LHC	- light harvesting komplex, světlo-sběrný komplex
MDA	- malondialdehyd
NADP ⁺	- nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
NPQ	- non-photochemical quenching, nefotochemické zhášení
PAR	- photosynthetically active radiation, fotosynteticky aktivní záření
PCD	- programmed cell death, programovaná buněčná smrt
PEA	- Plant Efficiency Analyser, přístroj k měření křivek velmi rychlé fluorescence
PQ	- plastochinon
PSI	- fotosystém I
PSII	- fotosystém II
Q _A	- menanchinon
q _p	- photochemical quenching, fotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
ROS	- reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SAG 12	- senescence associated gene-,
SOD	- superoxid dismutáza

SPAD-502	- přístroj na měření obsahu chlorofylu
tZ	- <i>trans</i> -zeatin
UV-B	- ultra violet, ultra fialové záření
3MeOBAP	- 3-methoxy(-6-benzylamino)purin
3OHBAP	- 3-hydroxy(-6-benzylamino)purin
MeOBAPR	- 6-(3-methoxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin

Obsah

Souhrn	iii
Summary	v
Seznam zkratk	vii
1. Úvod.....	1
2. Přehled problematiky	2
2.1 Stárnutí rostlin	2
2.2 Cytokininy(CK).....	3
2.3 Vliv světla na stárnutí rostlin.....	6
2.4 Vliv světla na působení cytokininů	7
2.5 Vliv různých koncentrací cytokininů na senescenci	7
2.6 Fluorescence chlorofylu	10
3. Cíl práce:.....	11
4. Materiál a metody	12
4.1 Experiment I.....	12
4.1.1 Rostlinný materiál	12
4.1.2 Použité metody.....	13
4.2 Experiment II.....	14
4.3 Statistická analýza	17
5. Výsledky měření	18
5.1 Experiment I.....	19
5.2 Experiment II.....	25
5.3 Souhrn	30
6. Diskuze.....	31
7. Závěr	36
8. Seznam literatury	37

1. Úvod

CK jsou látky nacházející se v rostlinách, kde plní funkci rostlinných hormonů. Tyto hormony dokáží např. ovlivnit vývoj a dělení buněk, oddálit stárnutí buněk a stimulovat fotosyntézu. Prvním popsaným cytokininem byl kinetin (6-furfurylaaminopurin) v 50. letech 20. století objevený Skoogem a kol. (1956). Od té doby se vědcům podařilo objevit a syntetizovat velké množství cytokininů, avšak jejich způsob ovlivňující různé rostliny je ve fázi zkoumání.

Objasnění vlivu rostlinných hormonů na rostlinné mechanismy bychom mohli využít například v zemědělství pro zvýšení výnosu rostlin.

V naší bakalářské práci jsme se zabývali způsobem působení cytokininů na stárnutí (senescenci) rostlin.

Senescence rostlin je přirozený nebo uměle vyvolaný proces, odehrávající se v buňkách rostlin a vedoucí k buněčné smrti. Senescence je ovlivněna, jak vnějšími faktory, například intenzitou světelného záření, množstvím vody, patogeny, toxiny, ozonem, zasolením, teplotou, ale i vnitřními faktory, mezi něž patří hormony.

Všeobecně přijímaným názorem je, že CK dokáží zpomalit senescenci rostlinných buněk. Důležité pro náš experiment bylo, při jakých podmínkách, například intenzitě osvětlení nebo koncentraci cytokininů, má daný cytokinin pozitivní efekt na oddálení stárnutí rostlin. Bylo zjištěno, že vyšší koncentrace cytokininu při vyšší intenzitě světla způsobuje urychlení stárnutí rostlin. Dalším důležitým faktorem je druh cytokininu, tedy jeho chemické složení, způsob jakým ho rostlina dokáže metabolizovat a jeho schopnost navázat se na cytokininové receptory a ovlivnit odpovědnostní regulátory.

V dřívější bakalářské práci Melkovičové (2012) byl popsán teoretický model popisující vliv cytokininů na stárnutí rostlin v závislosti na intenzitě ozáření rostlin. Tento model předpokládal, že při určité koncentraci cytokininů a určité intenzitě světla dojde v rostlině ke zlomu, kdy CK přestanou zpomalovat stárnutí, ale naopak začnou proces stárnutí v listu urychlovat. Cílem naší bakalářské práce bylo prozkoumat vliv nového cytokininu MeOBAPR, který byl nasyntetizován v laboratoři růstových regulátorů UP v Olomouci. Porovnat vliv MeOBAPR s cytokininem BA, jehož účinky jsou dobře popsány např. i v práci Melkovičová (2012) a ověřit model popisující vliv cytokininů na stárnutí rostlin při uměle vyvolaném senescenci rostlin v závislosti na koncentraci cytokininů a světelných podmínkách.

2. Přehled problematiky

2.1 Stárnutí rostlin

Stárnutí rostlin (senescence) je proces vedoucí k programované buněčné smrti (programmed cell death, PCD). Při senescenci dochází k syntéze hydrolytických enzymů například proteáz, lipáz, nukleáz. Dochází k degeneraci buněčných organel, jako jsou chloroplasty, endoplazmatické retikulum, mitochondrie a jádro buňky. Senescence má vliv na koncentraci a tvar chloroplastů, stabilitu a vlastnosti thylakoidních membrán v chloroplastech, dochází k peroxidaci thylakoidní membrány, k destrukci jejich proteinů, větší propustnosti iontů přes thylakoidní membránu a k poškození enzymů a proteinů ve stromatu u chloroplastů (Vlčková a kol. 2006).

Při degeneraci chloroplastů dochází k rozkládání chlorofylu (Chl), měření obsahu chlorofylu se často používá k částečnému určení průběhu senescence (Vlčková a kol. 2006), v průběhu senescence se mění ultrastruktura chloroplastů tvar z elipsovitého na více kulový a začínají se shlukovat a také dochází k akumulaci plastoglobulí (Vlčková a kol. 2006). Enzymy degradující chlorofyl se mohou nacházet v membráně samotných chloroplastů.

Rozpad thylakoidní membrány začíná degradací komplexu Cyt b_6/f , tím se inhibuje transport elektronů mezi fotosystémem II (PSII) a fotosystémem I (PSI), rozpadají se PSI, PSII i ATP syntéza (Lawlor 2001) cit. v Melkovičová 2012, Valcke a kol. 2012).

Senescence rostlin se projeví na fotochemickém zhášení fluorescence chlorofylu (q_p), maximálním kvantovém výtěžku fotochemie fotosystému PSII (F_v/F_p). V důsledku senescence dochází k poklesu q_p i F_v/F_p . (Vlčková a kol. 2006). F_v/F_p se vypočítá pomocí poměrů fluorescencí, ty vznikají ve PSII nejčastěji v proteinu CP43 a jsou důsledkem redukováného stavu plastochinonu (PQ) (Srivastava a kol. 1995, Valcke a kol. 2012). Fotosyntetická aktivita je závislá na proteinech, které se účastní fotosyntézy a nacházejí se jak v chloroplastu, tak v jádře. Dále závisí na mnoha vnějších přírodních faktorech, jako jsou intenzita fotosynteticky aktivního záření (photosynthetically active radiation, PAR) záření, ultrafialové záření (ultra violet, UV-B), teplota, sucho, toxické látky ve vzduchu a další (Srivastava a kol. 1995, Valcke a kol. 2012). Tyto vnější přírodní faktory mohou negativně ovlivnit fotosyntetické procesy v rostlině, mohou poškodit elektronový

transport přes thylakoidní membrány, Calvinův cyklus, vyvolat peroxidaci lipidů. Senescence je řízena expresí genů, a její průběh je značně ovlivněn vnějšími přírodními vlivy. V naší práci jsme se hlavně zabývali zkoumáním vlivu intenzity ozáření a dvěma druhy cytokininů BA (6-benzyladenin) a MeOBAPR (6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-ribofuranosylpurin) na senescenci ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.).

2.2 Cytokininy (CK)

Cytokininy (CK) jsou rostlinné hormony, které ovlivňují růst rostlin, patří tedy do skupiny růstových regulátorů. První známý cytokinin by *trans*-zeatin, ale prvním extrahovaným cytokininem byl kinetin (6-furfurylaminopurin) objevený Skoogem a kol. (1956). V průběhu času, byla zjišťovaná jejich důležitost pro různé procesy rostlinného života. V dnešní době jsou chápány jako základní složka pro vývoj a růst rostlin.

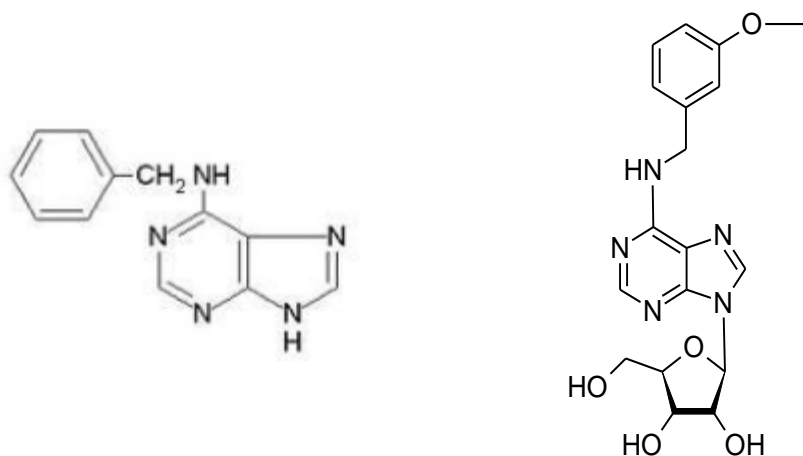
CK ovlivňují genovou expresi, buněčný cyklus, vývoj chloroplastů, růst kořenů, transport a metabolismus živin, stárnutí a růst nadzemních částí rostliny (Mok 2001, Werner a kol. 2001 Wulfetange a kol. 2011 cit. v Melkovičová 2012, Mik a kol. 2011).

Podporují dělení a diferenciaci buněk přispívají k syntéze chloroplastů a chlorofylů (Mok 2001 v Melkovičová 2012, Zacarias a kol. 1990). Zpomalují příznaky senescence, jako jsou změna tvaru chloroplastu degradace chlorofylů a akumulaci plastoglobulí, zvyšují syntézu antioxidantních enzymů a zvyšují množství invertázy v buněčné stěně (cell wall invertázy, CWI) (Vlčková a kol. 2006, Zwak a kol. 2013). Tím negativně ovlivňují tvorbu ROS a peroxidaci lipidů a také rychlost fotosyntézy (Mýtinová a kol. 2011, Zwak a kol. 2013).

Rozlišujeme CK podle konfigurace na izoprenoidní např. zeatin a aromatické CK, které obsahují aromatickou substituci v N6-poloze např. kinetin nebo BA (6-benzyladenin) obr. č. 1. Dále je můžeme rozlišit podle toho, zda se jednotlivé CK vyskytují přirozeně například kinetin nebo jsou uměle vytvořeny MeOBAPR 6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-ribofuranosylpurin obr. č. 1.

Molecular Formula = C₁₈H₂₁N₅O₅

Formula Weight = 387.38984



Obr. 1: Vlevo strukturní vzorec BA, vpravo strukturní vzorec MeOBAPR.

Obrázek 1 ukazuje strukturní vzorce cytokininů, se kterými jsme pracovali během našich experimentů. Důležitou součástí těchto experimentů bylo měření listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) ponechaných v různých koncentracích cytokininů a při různém osvětlení. Ze strukturních vzorců je pravděpodobné, že na oba CK bude ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) reagovat trochu odlišně, pravděpodobně kvůli odlišné vaznosti CKX na oba druhy CK a různé vaznosti na těchto CK na regulátory CK odpovědi (response regulator, RR) (Mik a kol. 2011a, 2011 b, Podlešáková a kol. 2012).

Účinky exogenně přidaných cytokininů v rostlině jsou ovlivněny nejenom světlem a jejich koncentrací, ale také tím, jestli podporují nebo inhibují syntézu cytokininů vyskytujících se přirozeně v rostlině. Dále záleží na způsobu, jakým se v rostlině aktivují jednotlivé typy cytokininů. Podle výsledků z Podlešákové a kol. (2012) jsou některé typy cytokininů např. 3MeOBAP9G ((3-hydroxy(-6-benzylamino-9-glucosyl)purine) ve stavu neaktivním, protože nedokázaly aktivovat cytokininové akceptory např. AHK3. Rostlina ho musí nejprve aktivovat, aby měl daný cytokinin vliv na mechanismy spouštějící se tímto cytokininovým receptorem. Jedním ze způsobů, jakým může rostlina deaktivovat CK je pomocí dehydrogenáz cytokininů (CKXs) při nadměrné koncentraci cytokininů (Podlešáková a kol. 2012). Důležitým faktorem je, jakým způsobem CK ovlivňují transkripci RR a aktivitu cytokininových receptorů AHK3 a dalších (Podlešáková a kol. 2012). Některé deriváty cytokininů např. BAP-ribosidy mají lepší vlastnosti na uchování obsahu chlorofylů než jejich volné báze, některé naopak horší např. BAP-glukosidy

(Holub a kol. 1998). Může to být způsobeno tím, že BAP-glukosidy jsou zásobní forma BA a v listech se běžně nevyskytují (Werbrouck a kol. 1995)

Peroxidace membránových lipidů je dalším ze znaků senescence (Vlčková a kol. 2006, Mik a kol. 2011), dochází k ní v důsledku působení reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a jejich zvýšené tvorby (Mik a kol. 2011). Tyto reaktivní formy kyslíku vznikají v rostlině po celou dobu jejího života, ale při senescenci, která je pozdní fází životního cyklu, dochází k jejich hromadění v důsledku poklesu aktivity a koncentrace antioxidantních enzymů a nefotochemického zhášení (non photochemical quenching, NPQ). Rostlinné hormony CK dokáží zpomalit tvorbu ROS. Z práce Mytinové a kol. (2011) vyplývá, že při aplikaci cytokininů na list dochází k zvýšení hladiny některých antioxidantních enzymů jako kataláza (CAT) a superoxid dismutázy (SOD) a tím se zamezí tvorbě ROS. Bylo dokázáno, že pokud se spustí exprese genů pro tvorbu cytokininů pomocí promotoru SAG 12 (senescence associated gene) u geneticky pozměněných rostlin na začátku senescence, dojde k oddálení senescence. Ke zvýšení koncentrace některých antioxidantních enzymů SOD a glutathion reduktázy (GR) došlo i v případě geneticky upravených rostlin, které produkovaly velké množství CKX (cytokinin oxido/reduktázy), a tím měly uměle sníženou hladinu cytokininů. Je to vysvětleno zvýšeným oxidativním stresem v raném stadiu vývoje, což rostlina vykompenzovala zvýšenou syntézou antioxidantních enzymů (Mýtinová a kol. 2011). Různé CK podporují rozličně aktivitu a tvorbu odlišných enzymů, odpovědných regulátorů, chlorofylu, jiných hormonů nebo tvorbu kalusu, (Carimi a kol 2003, 2004, Podlešáková a kol. 2006, Mik a kol. 2011a , 2011b). Jak ukázal Carimi a kol. (2003 a 2004) ve svých experimentech na rostlinách mrkve (*Daucus carota* L.) a husejníčku rolním *Arabidopsis thaliana* (L.) mají při různých koncentracích BA různě nastartované senescenční procesy, tedy že v těchto rostlinách dochází k iniciaci buněčné smrti (programmed cell death, PCD) při různých koncentracích BA. Dále se zabýval různými druhy cytokininů (CK) a jejich vlivem na růst a vývoj mrkve. Z výsledků zjistili, že CK kinetin (6-furfurylaminopurín) a zeatin (9-aminocarboxyethyltransferase) nemají negativní vliv na růst a vývoj mrkve ani při 27 μ M koncentraci, při které BA (6-benzyladenin) urychlil PCD. Pravděpodobně proto, že cytokinin oxido/reduktázy (CKX) mají větší vaznost na zeatin než na BA.

2.3 Vliv světla na stárnutí rostlin

Světlo je elektromagnetické záření, které dodává energii pro fotochemické procesy dějící se na Zemi. Rostliny světlo „chytají“ pomocí světlo-sběrných komplexů (light harvesting complex, LHC) a tuto energii předávají do reakčního centra (RC). LHC jsou složeny z chlorofylu a, b, karotenoidů a proteinů. V PSII dochází k excitaci pigmentu P680, který uvolní e^- . Tento elektron je poté dále přenášen po spádnicí redoxního potenciálu. Přes lineární elektronový přenos je elektron využit na syntézu energeticky bohatých molekul (Srivastava a kol. 1994, Valcke 2012).

Rostlina je tedy závislá na intenzitě dopadajícího světla. Při malé intenzitě světla nebo za tmy rostlina nedokáže uspokojit své metabolické potřeby, což vede k nastartování senescence (Zwak a kol. 2013, Liu a kol. 2006). Na vysoké intenzitě světla dochází v rostlině k přeexcitaci PSII, k poškození fotosyntetického aparátu rostliny a peroxidaci lipidů (Špundová a kol. 2006). Energie z LHC a PSII není využita a dochází k akumulaci plastochinonu (PQ) elektronového přenašeče v redukovaném stavu, což způsobí zvýšení fluorescence PSII a poškození PSII. V redukovaném stavu je také ferredoxin (Fd). Z ferredoxinu za normálních podmínek putuje elektron na kationt nikotinamidadeninukleotidfosfátu ($NADP^+$). Při nadměrné ozáření je $NADP^+$ ve stromatu nedostatek a elektron může přeskočit na molekulu vody rozštěpit ji za vzniku ROS (Vlčková a kol. 2006). Dále dochází k akumulaci hexóz a škrobových zrn (Vlčková a kol. 2006). Akumulace hexóz a zvýšená množství ROS vedou k začátku senescence (Vlčková a kol. 2006, Zwak a kol. 2013).

V práci Vlčkové a kol. (2006) se zabývali oddělenými listy pšenice (*Triticum aestivum* L.) inkubovaných ve tmě a na kontinuálním světle o intenzitě $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ve tmě pozorovali senescenční změny například hromadění plastoglobulí, neorganizovanost thylakoidní membrány a změnu tvaru chloroplastů z eliptického na kulový. Na kontinuálním světle nedošlo ke změně tvaru chloroplastů a hromadění plastoglobulí, počet gran byl vyšší než ve tmě. Na kontinuálním světle došlo k akumulaci škrobových zrn v chloroplastech. U obou světelných režimů byla pozorována snížená schopnost asimilace oxidu uhličitého.

Je tedy patrné, že světlo a jeho intenzita bude mít zásadní vliv na senescenci rostlinných listů.

2.4 Vliv světla na působení cytokininů

CK jsou důležitými rostlinnými hormony, které ovlivňují funkci nebo koncentraci některých proteinů nebo enzymů. CK dokáží ovlivnit koncentraci antioxidantních enzymů i xantofylový cyklus, dokáží zvýšit hladinu zeaxantinu (Vlčková a kol. 2006 Mýtinová a kol. 2011, Wu a kol. 2012). Dále také podporují funkci karboxylového calvinova cyklu a tvorbu ribulose -1,5-bifosfátu karboxylázy/oxygenázy (Rubisco), dokáží odvrátit degeneraci chloroplastů jejich změnu tvaru a hromadění plastoglobulí. Podporují syntézu invertázy v buněčné stěně CWI, která rozkládá složitější cukry na hexózy (Vlčková a kol. 2006, Zwack a kol. 2013).

Tyto vlastnosti cytokininů mají ale různý vliv na senescenci rostlinných buněk při různé ozáření a světelných podmínkách. Toto tvrzení vyplývá z práce Vlčkové a kol. (2006), kde se zabývali oddělenými pšeničnými listy (*Triticum aestivum* L. cv. Hereward) s exogenně přidaným cytokininem *meta*-topolinem (N^6 -(*meta*-hydroxybenzyl)adenin). Pozorování probíhalo na dvou režimech se srovnávacími vzorky bez přidaného *meta*-topolinu. První světelný režim byl pod kontinuálním ozářením $100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Druhý režim byl uchováván ve tmě. Ve tmě se došlo díky CK ke zpomalení poklesu kvantového výtěžku, menšímu poškození chloroplastů, menší degradaci chlorofylu a menšímu excitačnímu „tlaku“ v PSII oproti kontrole. V případě kontinuálního osvětlení byly tyto efekty způsobené *meta*-topolinem pozorovány pouze do druhého dne od oddělení lístků. Po druhém dni došlo k nárůstu excitačního „tlaku“ ve PSII a v dalších dnech došlo k poklesu F_v/F_p v PSII oproti kontrole, dále došlo k degradaci chloroplastů a chlorofylů, peroxidaci lipidů a akumulaci škrobových zrn. Přes zvýšenou hladinu *zeaxantinu* oproti kontrole došlo k poškození PSII přeexcitováním. Také došlo k inhibici zabudovávání karboxylového cyklu v důsledku nashromáždění škrobových zrn a hexós a to díky nadměrné koncentraci CWI a nedostatku spotřebních (sink) míst pro metabolity, což bylo vytvořeno i oddělením listu od zbytku rostliny (Vlčková a kol. 2006, Zwack a kol. 2013).

2.5 Vliv různých koncentrací cytokininů na senescenci

CK jsou známé pro svou vlastnost oddalovat senescenci u rostlin. Je známo, že exogenně přidané CK mají ochranné vlastnosti, tedy působí pozitivně na enzymy a

proteiny, které dokáží potlačit nepříznivé působení stresorů a tím zamezit nebo potlačit vznik stresu v rostlině (Vlčková a kol. 2006, Mýtinová a kol. 2011). Jak už bylo řečeno v sekci 2.4, ne vždy působí CK v rostlině pozitivně proti senescenci. Záleží na vnějších přírodních podmínkách nebo uměle vytvořených, v kterých se rostlina nachází. Ze sekce 2.4 vyplývá, že po dvou dnech po oddělení lístků na kontinuálním osvětlení, se začaly ochranné účinky cytokininů vytrácet a CK začaly nepřímo podporovat senescenci hromaděním asimilantů. Dalším faktorem, který může ovlivnit senescenci u rostlin, kromě výše zmíněných, je koncentrace cytokininů.

Jak ukázala práce Mik a kol. (2011a), v které se zabývali deriváty cytokininu kinetinu (6-fufrylaminopurine) v N9 pozici a jejich anti-senescenčními vlastnostmi (na tabákový kalus a biologické aktivity na amaranthu). Jejich prvním cílem bylo zjistit optimální koncentraci derivátů kinetinu v tabákovém kalusu a pro biologickou aktivitu amarathu. Zjistili, že některé deriváty kinetinu mají vyšší optimální koncentraci 100 μM i vyšší relativní aktivitu při této koncentraci než kinetin o koncentraci 1 μM v tabákovém kalusu. Pro biologickou aktivitu amaranthu byla optimální koncentrace u všech derivátů i kinetinu stejná a nejlepší relativní aktivitu měl kinetin o koncentraci 100 μM . Dále zkoumali optimální koncentraci derivátů kinetinu na dvou režimech, při kontinuální tmě a na kontinuálním světle. Ve tmě byla optimální koncentrace derivátů stanovena stejně jako kinetinu (100 μM) a pouze jeden derivát 1-bromo-2-chloroethan kinetinu měl lepší relativní aktivitu než kinetin. Na kontinuálním světle byla stanovena u většiny derivátů o jeden řád vyšší koncentrace (100 μM) než u kinetinu (10 μM). Měřili také schopnost udržení obsahu chlorofylu na odtržených pšeničných (*Triticum aestivum* L. cv. Hereward) listech na světle. Nejlépe dokázal zpomalit pokles obsahu chlorofylu derivát 1-bromo-2-chloroethan kinetinu a to i při vysoké koncentraci (100 μM). Také se zabývali peroxidací lipidové dvojvrstvy na světle a za tmy pomocí proměření obsahu malondialdehydu (MDA), který je produktem lipidové peroxidace. Z výsledků vyplynulo, že nejmenší koncentraci MDA za tmy měly listy v derivátu 1-bromo-2-chloroethan kinetinu, ale na světle byla u tohoto derivátu naměřena největší koncentrace MDA.

Další práce, která popisuje závislost koncentrace cytokininů a jejich vliv na tabákový kalus a obsah chlorofylu v oddělených listech ječmene je od Holuba a kol. (1998). V jejich práci se zabývali deriváty ribosidů a glukosidů u BA i *meta*-topolinu jejich různými koncentracemi v rozmezí (10 nM až 100 μM). Z jejich výsledků vyplývá, že ribosidované CK zmírnily pokles obsahu chlorofylu lépe než jejich báze a také to, že při vzrůstající koncentraci cytokininů byly lépe schopny zpomalit pokles obsahu

chlorofylu ribosidované CK než jejich volné báze. Naopak glukosidované CK zvýraznily pokles obsahu chlorofylu než jejich báze, ale při vyšších koncentracích dokázaly lépe zpomalit pokles obsahu chlorofylu než při nižších koncentracích. Vliv ribosidovaných nebo glukosidovaných cytokininů na tabákový kalus byl horší v porovnání s jejich bázemi. Také se zde ukázalo, že nejvhodnější koncentrace pro vývoj tabákového kalusu je kolem 50 μM tedy alespoň pro ribosidované nebo bázové CK. U glukosidovaných cytokininů nedošlo k poklesu váhy tabákového kalusu ani při největší koncentraci 100 μM .

Také práce od Podlešákové a kol. (2012), ve které se zabývali porovnáním vlivu různých koncentrací cytokininů na cytokininové receptory. V jejich práci se zabývali vlivem cytokininů tZ (*trans*-zeatin) BA (6-benzyladenin), 3OHBAP (3-hydroxy(-6-benzylamino)purin) a 3MeOBAP (3-methoxy(-6-benzylamino)purin) na cytokininové receptory u *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) AHK3, AHK4 a u kukuřice (*Zea mays* L. cv. CELLUX) ZmHK1 a ZmHK3a. Dále se v jejich práci zabývali dalšími deriváty BA, ale ty nevyvolaly odpověď u receptorů ani při největší koncentraci těchto derivátů. Z výsledků vyplynulo, že nejnižší spouštěcí koncentraci, na kterou začaly receptory reagovat, měl skoro ve všech případech tZ pouze u ZmHK1 měl podobnou startovní koncentraci s BA (6-benzyladenin). Druhou nejnižší spouštěcí koncentraci měl většinou BA poté 3OHBAP a 3MeOBAP. V některých případech se spouštěcí koncentrace moc nelišily, např. pro AHK3 byly spouštěcí koncentrace BA, 3OHBAP a 3MeOBAP přibližně stejné. Z grafu také vyplývá, že po dosažení určité koncentrace tZ nedochází u receptorů ke zvýšení odezvy a aktivita receptorů i přes zvyšující koncentraci tZ, zůstává podobná. Ve dvou případech u AHK3 a ZmHK3a byla naměřena mírně zvýšená aktivita receptorů při nejvyšší koncentraci BA oproti tZ. V případě AHK3 dosáhly i ostatní deriváty 3OHBAP a 3MeOBAP při nejvyšší koncentraci stejné aktivity receptoru jako tZ.

Z těchto materiálů je patrné, že na koncentraci cytokininů záleží, neboť při malé nebo nadměrné koncentraci cytokininů může docházet k zhoršení vlivu cytokininů na kalus, peroxidaci lipidů, obsah chlorofylu nebo na PSII, popřípadě na cytokininové receptory oproti optimální koncentraci. Z jejich výsledků vyplývá, že CK s s různým prostorovým uspořádáním, mají odlišný vliv na rostliny při různých koncentracích (Podlešáková a kol. 2012).

Dalším faktorem, který ovlivňuje optimální koncentraci cytokininů je světlo. Jak ukázal experiment Mik a kol. (2011), optimální koncentrace kinetinu na světle je nižší

oproti tmě. Je pravděpodobné, že se zvyšující se intenzitou světla bude optimální koncentrace cytokininů klesat.

2.6 Fluorescence chlorofylu

Fluorescence chlorofylu je spojena s fotochemickou aktivitou PSII. Fluorescence je vyvolaná redukovaným stavem menanchinonu (Q_A) tedy Q_A^- , fluorescence je závislá na době po kterou je Q_A redukováno. Doba kdy je Q_A redukováno nám určuje, jak dobře fotochemie v RC probíhá. Čím déle Q_A redukováno tím méně probíhá fotochemie. Když je Q_A redukována nastává zavřený stav RC ve PSII. Pouze, když je Q_A v nereduovaném stavu tzn., když je otevřený stav RC ve PSII může probíhat fotochemie. Při našem experimentu jsme měřili velmi rychlou fluorescenční indukci, která je charakterizována O-J-I-P křivkou. O-J charakterizuje přechod Q_A do redukovaného stavu Q_A^- . I-P přechod charakterizuje heterogenitu mezi rychlostmi redukce plastochinonu (PQ). Při měření fluorescence se setkáme s pojmy F_0 , což je minimální fluorescence na začátku měření. Při ozařování listů stále intenzivnějším PAR fluorescence listu roste, až intenzita fluorescence dojde do bodu při určité intenzitě ozáření, kdy má list maximální hodnotu fluorescence F_m . Při dalším zvýšení intenzity záření už nedochází k zvýšení fluorescence. Hodnoty fluorescence se značí F_p , pokud je intenzita PAR menší nebo rovna hodnotě fluorescence F_m .

3. Cíl práce:

- a) Vypracovat přehled problematiky vlivu cytokininů a různých světelných podmínek na senescenci zaměřený na srovnání vlivu různých koncentrací cytokininů.
- b) Změřit vliv různých koncentrací cytokininů a světelných podmínek na obsah chlorofylu a stanovit fotochemický kvantový výtěžek PSII.
- c) Zpracovat výsledky a vyhodnotit vliv koncentrací cytokininů a světelných podmínek na senescenci rostlin.

4. Materiál a metody

4.1 Experiment I

4.1.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální účely byl použit ječmen setý (*Hordeum vulgare L.*).

Semínka ječmene byla zasetá do květináčů s perlitovým substrátem a zalita Knopovým roztokem. Květináče jsme umístili do fotokomory s teplotou 20°C, se světelným cyklem 16 hodin světlo 8 hodin tma. Intenzitu světla jsme nastavili na 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Relativní vlhkost vzduchu jsme nastavili na 50%. Po osmi dnech od zasetí, které proběhlo 29. 7. 2013, byly pomocí měřítka a skalpelu odděleny segmenty o délce 4 cm od špičky primárního listu. Oddělené listové segmenty byly bazálním koncem zasunuty do jamek v titračních destičkách. Titrační destička obsahovala 96 jamek. V řadách byly umístěny roztoky: 0,5% roztok DMSO, roztoky BA o koncentracích (10 μM , 100 μM , 300 μM) a MeOBAPR o koncentracích (10 μM , 100 μM , 300 μM , 600 μM). Vzorky jsme dále rozdělili podle intenzity světelného záření, při kterých budou nadále uchovány ve fotokomoře, na „intenzivní“ světlo ($(330 \pm 40) \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), „nízkou“ světlo ($(90 \pm 10) \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a na „tmu“. Vzorky ve tmě byly zabaleny za použití speciálního obalu tvořeného ze dvou černých plastových pytlů. Titrační destičky byly označeny (podle varianty osvětlení) a umístěny do plastových nádob, ve kterých byla navlhčená buničina, aby udržovala vlhkost. Tyto nádoby byly překryty fólií a zalepeny. Poté už byly nádoby s titračními destičkami umístěny pod různé druhy osvětlení do fotokomory v případě „tmy“. V titračních destičkách jsme tedy vytvořili 8 variant vzorků každý po dvanácti segmentech. Měření probíhalo osm dní od zasetí v „0.“ dni a poté každý třetí den až do devátého dne. Vzorky pěstované pod světelným cyklem byly před měřením umístěny na dobu 30 minut do tmy, aby byla otevřená všechna reakční centra (RC, reaction center) a kvůli chloroplastům, aby se mohly rovnoměrně rozprostřít v buňce a nedošlo k pohybu chloroplastů, které by mělo vliv na měření obsahu chlorofylu.



Obr. 3: Listy ječmene pěstované na intenzivním světle, vyfocené šestý den od oddělení.

4.1.2 Použité metody

V prvním experimentu byl sledován relativní obsah chlorofylu a maximální fotochemický kvantový výtěžek fotochemie PSII F_v/F_p . Relativní obsah chlorofylu jsme měřili pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko). Hodnoty chlorofyl metru SPAD- 502 jsou počítány z propustnosti listu pro dvě různé vlnové délky 650 nm (velká absorpce chlorofylů) a 940 nm (minimální absorpce chlorofylu. Osvětlování tvoří červená a infračervená LED (luminiscenční diody). Záření prochází listem a dopadá na detekční okénko s křemíkovou fotodiodou. Hodnota L odráží obsah chlorofylů v listech je vypočítána srovnáním poměrů intenzit detekovaného záření o vlnových délkách 650 nm a 940 nm při měření bez vzorku a se vzorkem (listem).

$$L = \log[(I'_{940}/I_{940})/(I'_{650}/I_{650})] = \log[(I'_{940} \cdot I_{650})/(I'_{650} \cdot I_{940})] \quad (1)$$

kde I_{650} , I_{940} ... je el. proud na fotodiodě vyvolaný dopadem záření o vlnové délce 650 nm a 940 nm (bez vzorku).

I'_{650} , I'_{940} ... je el. proud na fotodiodě vyvolaný dopadem záření o vlnové délce 650 nm a 940 nm po průchodu vzorkem (listem).

Z proměřených kontrolních vzorků před oddělením jsme stanovili kontrolní obsah chlorofylu v listech, který jsme porovnávali s dalšími naměřenými hodnotami obsahu chlorofylu v průběhu měření. Měření maximálního fotochemického kvantového výtěžku PSII bylo prováděné na přístroji fluorimetru PEA (Plant Efficiency Analyser) firmy

Hansatech (King's Lynn, Anglie). Intenzita použitého světla při měření byla $1800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. F_v/F_p je počítáný pomocí vztahu

$$\frac{F_v}{F_p} = \frac{(F_p - F_0)}{F_p}, \quad (2)$$

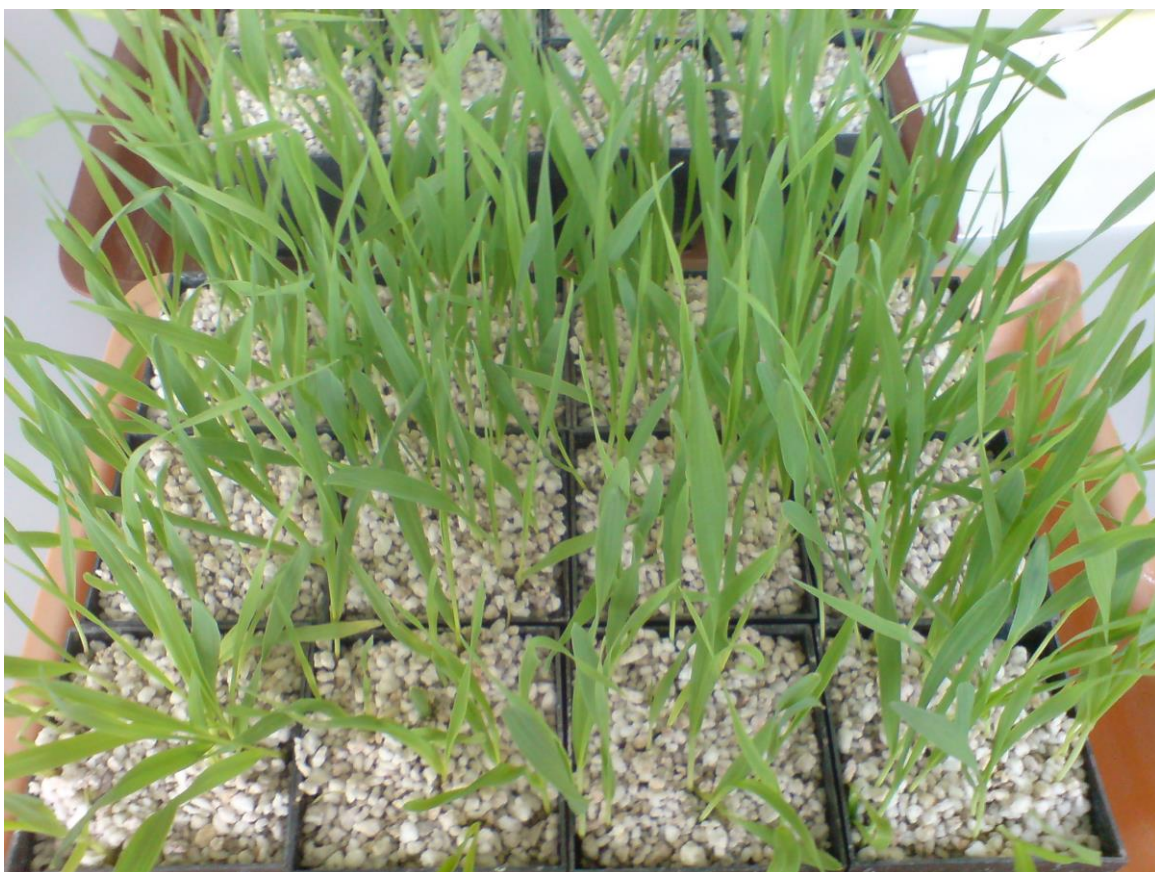
kde hodnota F_p je maximální hodnota fluorescence, F_0 je minimální intenzita fluorescence a F_v je variabilní intenzita ve velmi rychlé fluorescenční indukci. Fluorescence chlorofylu je spojena s fotochemickou aktivitou PSII. Fluorescence je vyvolaná redukováným stavem menanchinonu (Q_A) tedy Q_A^- , fluorescence je závislá na době, kdy je Q_A redukováno. Doba kdy je Q_A redukováno nám určuje, jak dobře fotochemie v RC probíhá. Čím déle Q_A redukováno tím méně fotochemie pracuje. Při našem experimentu jsme měřili velmi rychlou fluorescenci, která je charakterizována O-J-I-P křivkou. O-J charakterizuje přechod Q_A do redukováného stavu Q_A^- . I-P stav charakterizuje heterogenicidu mezi rychlostmi redukce plastochinonu (PQ)

Měření relativního obsahu chlorofylu i maximálního fotochemického kvantového výtěžku PSII byla prováděna ve střední části listu po 30 minutové adaptaci rostlin na tmou. Měření probíhalo za mírného zeleného světla, které by nemělo uzavírat RC v PSII a ovlivnit rozmístění chlorofylu. Po měření byly vzorky vráceny zpátky do titračních destiček a vloženy zpět do fotokomory, pro měření v dalších termínech.

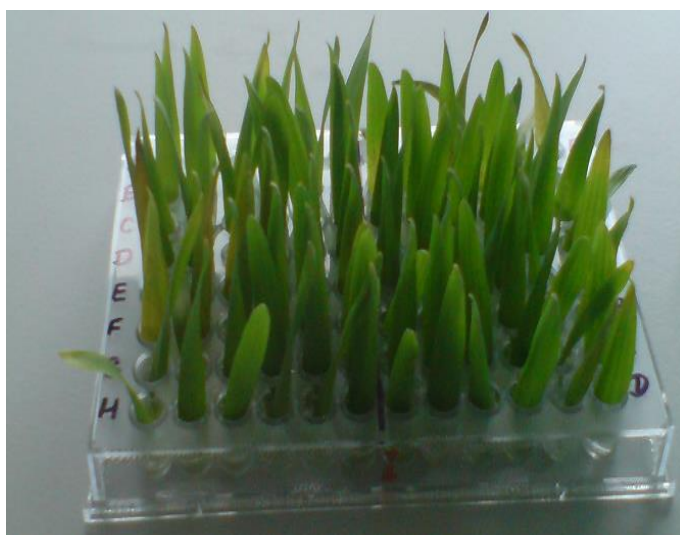
Faktorem, který mohl ovlivnit měření, byla rozpustnost BA a MeOBAPR. MeOBAPR se dobře rozpouští i ve vysokých koncentracích v DMSO, ale BA je ve vodě nerozpustný a v DMSO se může při vyšších koncentracích vysrážet.

4.2 Experiment II

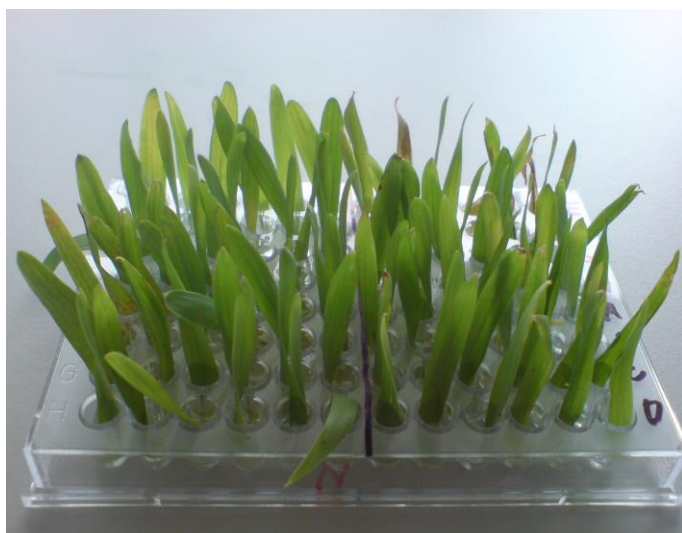
Druhý experiment probíhal podobně jako první experiment, byl použit stejný rostlinný materiál a stejné metody, odlišná byla intenzita použitého světla v přístroji PEA pro měření F_v/F_m , kde jsme intenzitu museli snížit na $1440 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ kvůli hraniční detekci detektoru „overscale“. Dále se experiment II konal v jiných datech. Zasetí proběhlo 2. 9. 2013. První kontrolní měření „0.“ den byl 10. 9. 2013 a dále se pokračovalo v měřeních po třech dnech 3., 6. a 9. den po oddělení.



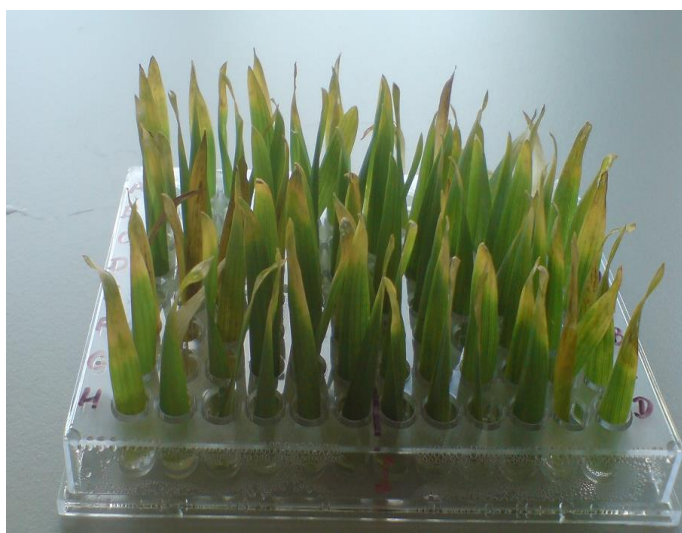
Obr. 4: Vzrostlý ječmen 8 dní od zasetí



Obr. 5: Ječmen v titrační destičce uchováván na intenzivním světle, vyfoceno 3. den od oddělení.



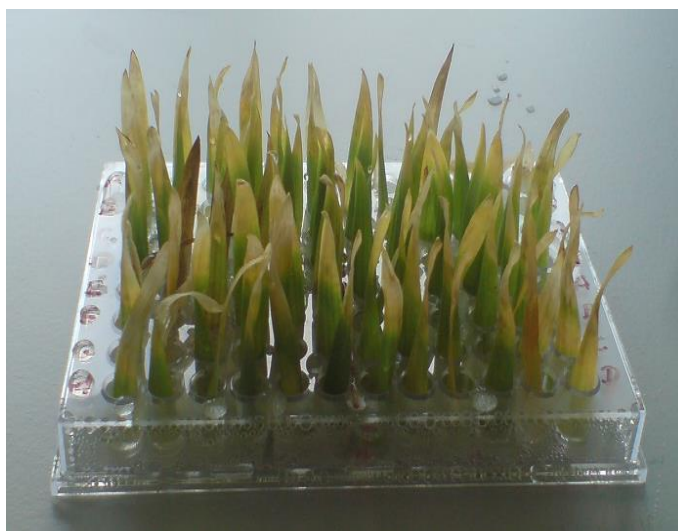
Obr. 6: Ječmen v titrační destičce uchováván na normálním světle, vyfoceno 6. den od oddělení.



Obr. 7: Ječmen v titrační destičce pěstován na intenzivním světle, vyfoceno 6. den od oddělení.



Obr. 8: Ječmen v titrační destičce pěstován na normálním světle, vyfoceno 9. den od oddělení.



Obr. 9: Ječmen v titrační destičce pěstován na intenzivním světle, vyfoceno 9. den od oddělení.

4.3 Statistická analýza

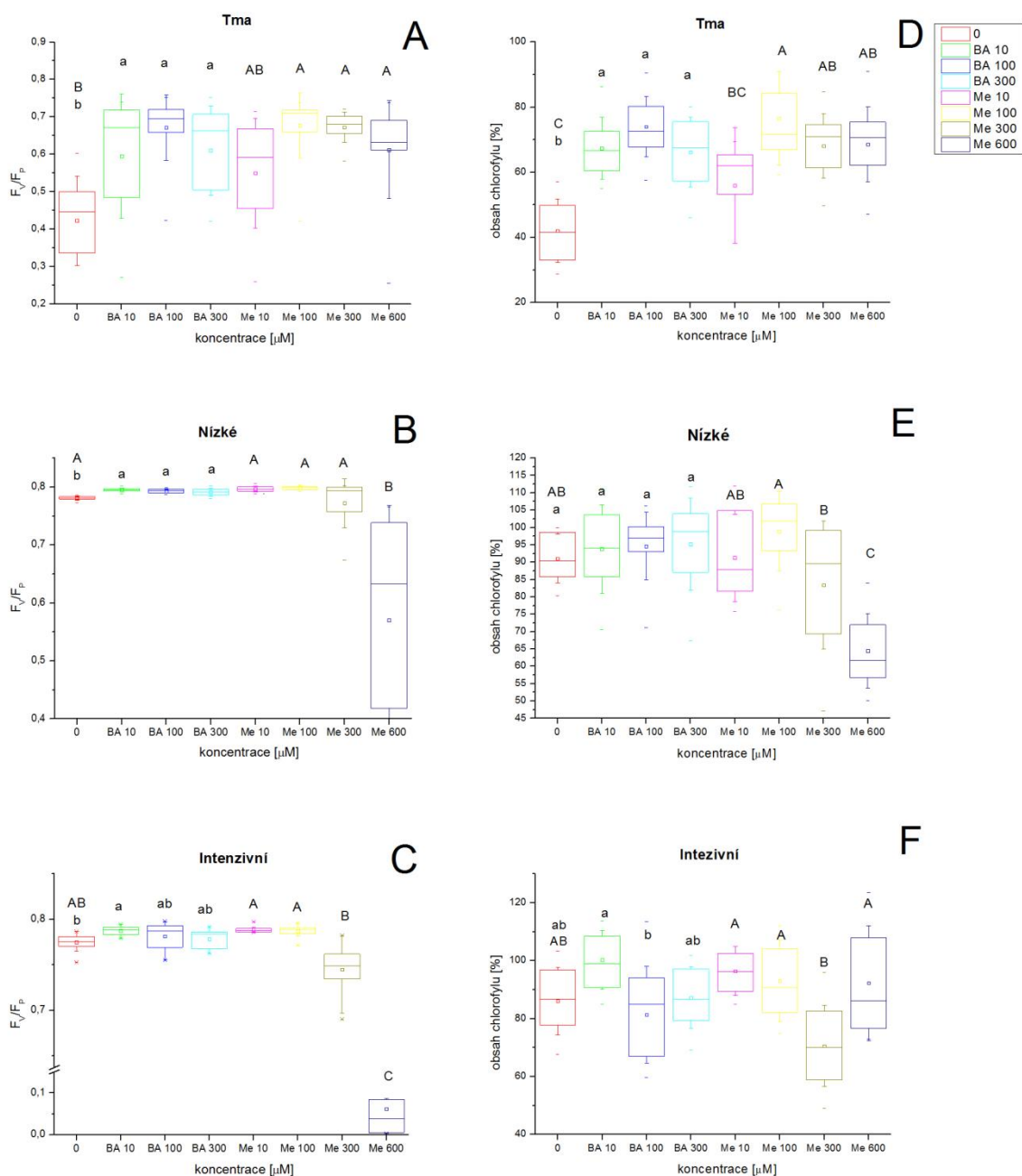
Naměřená data byla zpracována v programu Microsoft Excel a Origin (verze 8.5, OriginLab Corporation, USA). Statisticky významné odchylky mezi daty byly stanoveny pomocí ANOVA (Analyse of variance) testu. Použit typ testu jednoduchého třídění, tak zvaná jednocestná ANOVA, u které jsme vyhodnotili testy Bonferroniho a Tukeyho. Takto jsme vytvořili dva jednocestné ANOVA Bonferroniho a Tukeyho testy. Pro každé měření jsme použili tyto dva testy. První Bonferroniho a Tukeyho test srovnával 0,5% roztok DMSO a koncentrace BA a druhý Bonferroniho a Tukeyho test srovnával 0,5% roztok DMSO a koncentrace MeOBAPR. Oba druhy cytokininů se daly porovnat přes 0,5% roztok DMSO.

5. Výsledky měření

V našich experimentech jsme použili rostlinný materiál a metody popsané v sekci „4. Materiál a metody“. U primárních listů ječmene byla oddělením indukována umělá senescence. Senescence byla charakterizována relativním poklesem obsahu chlorofylu, který jsme sledovali pomocí přístroje SPAD-502. Před oddělením listů v „0.“ dni byly naměřeny kontrolní hodnoty obsahu chlorofylu a F_v/F_p na celých rostlinách ječmene. Hodnota kontrolního obsahu chlorofylu byla pro další měření listů stanovena jako 100 % a dále byla porovnáována s dalšími naměřenými hodnotami obsahu chlorofylu v průběhu měření. K zjištění stavu fotosyntetického aparátu PSII, jsme použili F_v/F_p , který jsme sledovali pomocí přístroje PEA. Střední hodnota F_v/F_p byla naměřena ($0,800 \pm 0,01$). Jako kontrola ke koncentracím cytokininů v průběhu měření byly požity vzorky uchovávané v 0,5 % roztoku DMSO. DMSO v této koncentraci neovlivňuje průběh senescence ve srovnání s listy inkubovanými ve vodě (Vlčková a kol. 2003).

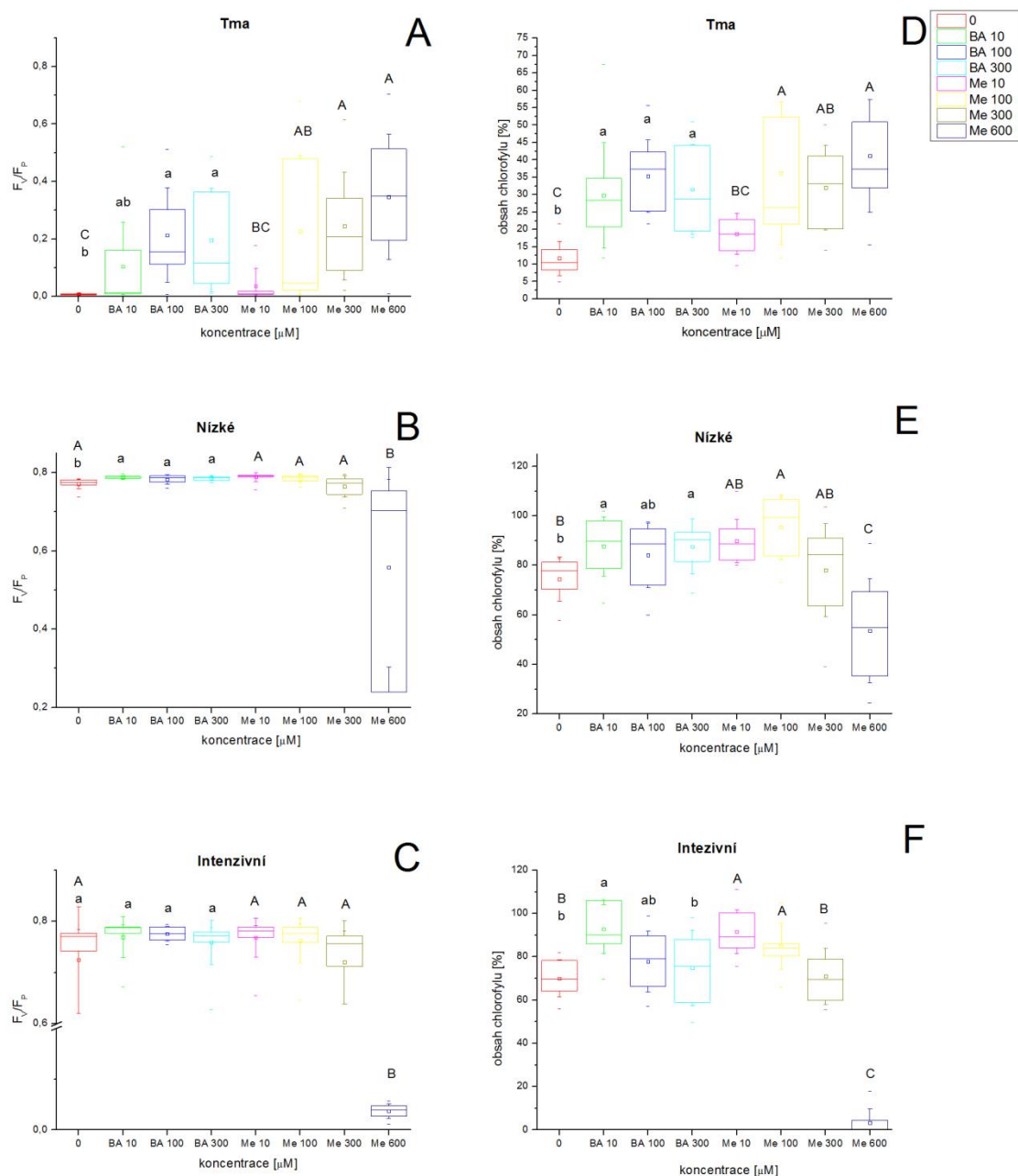
5.1 Experiment I

3 DPO, Exp I.



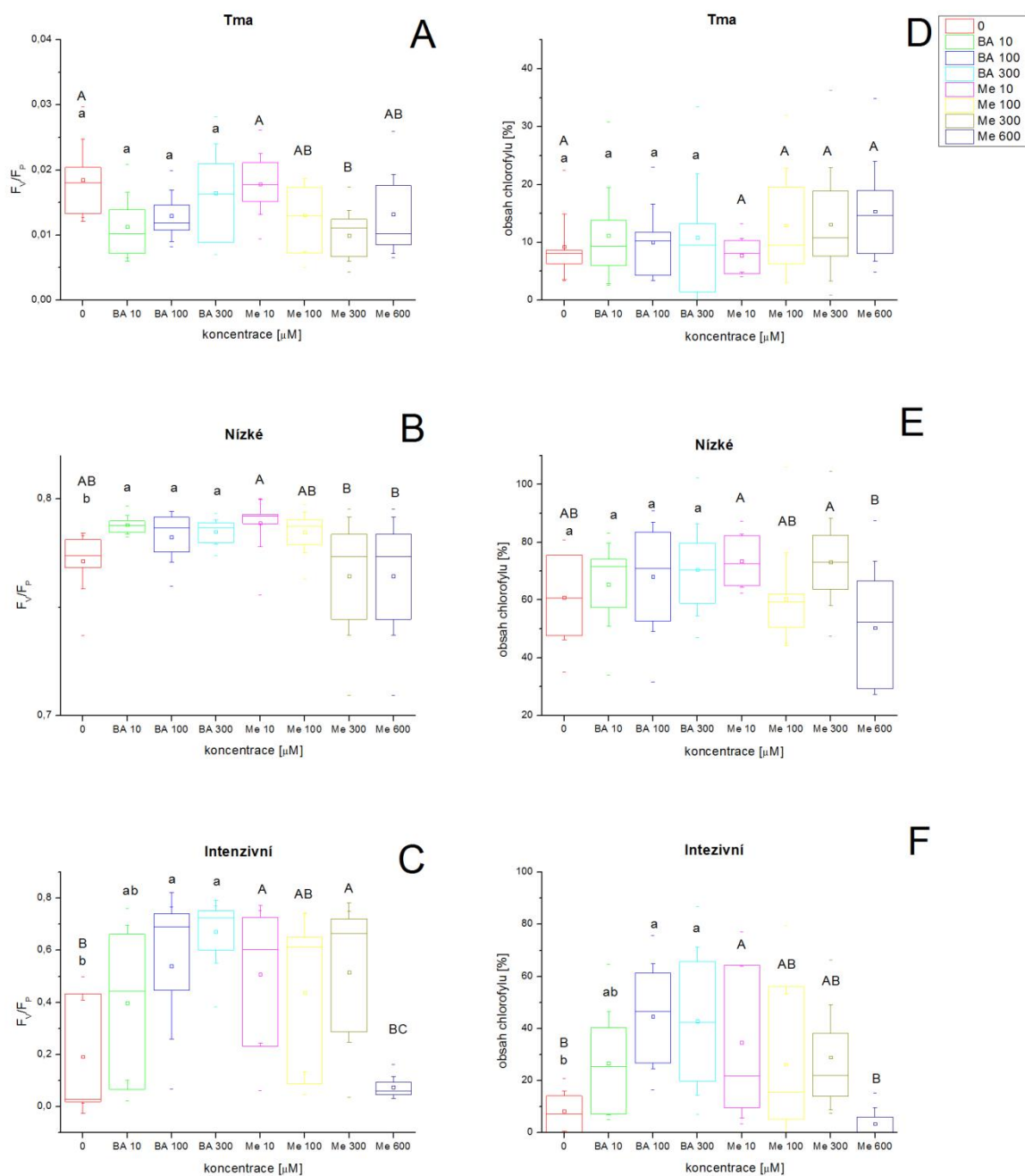
Obr. 10: Maximální kvantový výtěžek fotochemie ve fotosystému II (F_v/F_p) a obsah chlorofylu měřené na listech ječmene setého třetí den po oddělení inkubovaných ve tmě (A, D), na nízkém světle (B, E) nebo na intenzivním světle (C, F) v 0,5% roztoku DMSO (O), nebo v 10, 100 a 300 μM roztoku BA, nebo v 10, 100, 300 a 600 μM roztoku MeOBAPR. Obsah chlorofylu je vyjádřen v % obsahu chlorofylu v listech před oddělením. Zobrazené jsou průměry (\square), SD (\perp), mediány (—), horní a dolní kvartily (hranice obdélníků). Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl mezi variantami BA a DMSO (a,b); MeOBAPR a DMSO (A, B, C).

6 DPO, Exp I.



Obr. 11: Maximální kvantový výtěžek fotochemie ve fotosystému II (F_v/F_p) a obsah chlorofylu měřené na listech ječmene setého třetí den po oddělení inkubovaných ve tmě (A, D), na nízkém světle (B, E) nebo na intenzivním světle (C, F) v 0,5% roztoku DMSO (O), nebo v 10, 100 a 300 μ M roztoku BA, nebo v 10, 100, 300 a 600 μ M roztoku MeOBAPR. Obsah chlorofylu je vyjádřen v % obsahu chlorofylu v listech před oddělením. Zobrazené jsou průměry (\square), SD (\perp), mediány ($—$), horní a dolní kvartily (hranice obdélníků). Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl mezi variantami BA a DMSO (a,b); MeOBAPR a DMSO (A, B, C).

9 DPO, Exp I.



Obr. 12: Maximální kvantový výtěžek fotochemie ve fotosystému II (F_v/F_p) a obsah chlorofylu měřené na listech ječmene setého třetí den po oddělení inkubovaných ve tmě (A, D), na nízkém světle (B, E) nebo na intenzivním světle (C, F) v 0,5% roztoku DMSO (0), nebo v 10, 100 a 300 μ M roztoku BA, nebo v 10, 100, 300 a 600 μ M roztoku MeOBAPR. Obsah chlorofylu je vyjádřen v % obsahu chlorofylu v listech před oddělením. Zobrazené jsou průměry (\square), SD (\perp \top), mediány (—), horní a dolní kvartily (hranice obdélníků). Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl mezi variantami BA a DMSO (a,b); MeOBAPR a DMSO (A, B, C).

Tma

V Experimentu I u vzorků uchovávaných ve tmě (Obr. 10, 11, 12 A,D) v DMSO byl už 3. den naměřen velký pokles hodnot F_v/F_p na $(0,5 \pm 0,1)$ a obsahu chlorofylu na (42 %) oproti kontrolním hodnotám v „0.“ dni. V dalších dnech tyto hodnoty dále klesaly až do 9. dne kdy byl naměřen F_v/F_p na $(0,018 \pm 0,006)$ a obsah chlorofylu pod 10 %. U vzorků pěstovaných ve tmě v BA 3. den po oddělení a v 6. den po oddělení měly koncentrace 100 μM a 300 μM BA signifikantně menší pokles F_v/F_p než u vzorků v DMSO. V 9. dni po oddělení jsme naměřili nesignifikantně nejvyšší hodnotu F_v/F_p u vzorků v DMSO oproti vzorkům pěstovaným v cytokininech, kromě vzorků v MeOBAPR o koncentraci 300 μM , které měly signifikantně nižší F_v/F_p oproti listům v DMSO. U vzorků v MeOBAPR byl naměřen signifikantně menší pokles F_v/F_p pro koncentrace 100 μM , 300 μM a 600 μM oproti listům v DMSO, tento trend byl pozorován do 6. dne po oddělení. U všech koncentrací BA byl naměřen signifikantně menší pokles obsahu chlorofylu oproti DMSO do 6. dne po oddělení. Při měření obsahu chlorofylu byl u vzorků s vyššími koncentracemi MeOBAPR 100 μM , 300 μM a 600 μM naměřen signifikantně menší pokles obsah chlorofylu oproti DMSO do 6. dne po oddělení. Tedy jsme pozorovali podobný trend jako u F_v/F_p . Nejmenší pokles parametrů byl z BA naměřen pro koncentraci 100 μM , ale pouze nesignifikantně oproti ostatním koncentracím. V 9. dni po oddělení nebyly signifikantní rozdíly v obsahu chlorofylu, mírně vyšší obsah chlorofylu měly vzorky pěstované v MeOBAPR o nejvyšších koncentracích (300 μM a 600 μM).

Pěstební intenzita světla

U vzorků pěstovaných při nízké (pěstební) intenzitě světla (Obr. 10, 11, 12 B,E) v DMSO byl ve 3. dni pozorován mírný pokles v hodnotách F_v/F_p na $(0,78 \pm 0,01)$ oproti „0.“ dni. V 9. dni po oddělení se hodnota F_v/F_p na $(0,77 \pm 0,02)$ téměř nezměnila. Větší pokles byl zaznamenán pro obsah chlorofylu u vzorků v DMSO, kdy ve 3. dni byl naměřen obsah chlorofylu na 90 % a 9. den už jen na 80 % oproti „0.“ dnu. Ukázalo se, že nízké světlo dokáže zpomalit senescenci oproti kontrolním vzorkům uchovávaným ve tmě. U všech koncentrací BA byl naměřen signifikantně menší pokles F_v/F_p než u listů v DMSO po celou dobu měření. Nejvýraznější zpomalení poklesů parametrů bylo pozorováno pro BA u 10 μM koncentrace. U vzorků pěstovaných při nízké intenzitě byl pozorován rychlejší pokles F_v/F_p u listů v MeOBAPR o nejvyšší koncentraci 600 μM na

oproti nižším koncentracím (10, 100, 300 μM) MeOBAPR i oproti DMSO už od 3. dne po oddělení. V 9. dni po oddělení bylo toto urychlení poklesu F_v/F_p pozorováno i u koncentrace 300 μM oproti nejnižší koncentraci 10 μM MeOBAPR. Koncentrace MeOBAPR 10 μM a 100 μM měly menší pokles F_v/F_p než listy v DMSO po celou dobu měření, tyto koncentrace MeOBAPR měly nejvýraznější účinek na zpomalení senescence. Při měření obsahu chlorofylu byla naměřena podobná závislost koncentrace u MeOBAPR v obsahu chlorofylu jako u F_v/F_p . Tedy nejvyšší použitá koncentrace (600 μM) MeOBAPR urychlila pokles obsahu chlorofylu oproti nižším koncentracím (10, 100, 300 μM). V 6. dni po oddělení měly koncentrace 10 μM a 300 μM BA signifikantně vyšší obsah chlorofylu než listy v DMSO. Nejmenší pokles byl naměřen pro vzorky v MeOBAPR o koncentraci 100 μM do 6. dne po oddělení. V 6. dni měla tato koncentrace signifikantně vyšší obsah chlorofylu než DMSO. Nejvýraznější zpomalení poklesu obsahu chlorofylu pro BA bylo naměřeno pro koncentraci 300 μM . U vzorků pěstovaných na nízkém světle měly lepší vlastnosti CK s nižšími koncentracemi (10,100 μM) než s vyššími koncentracemi (300 μM , 600 μM) MeOBAPR, oproti vzorkům pěstovaných ve tmě, kde byl naopak menší pokles parametrů zaznamenán u vzorků ve vyšších koncentracích cytokininů než u vzorků v nižších koncentracích cytokininů.

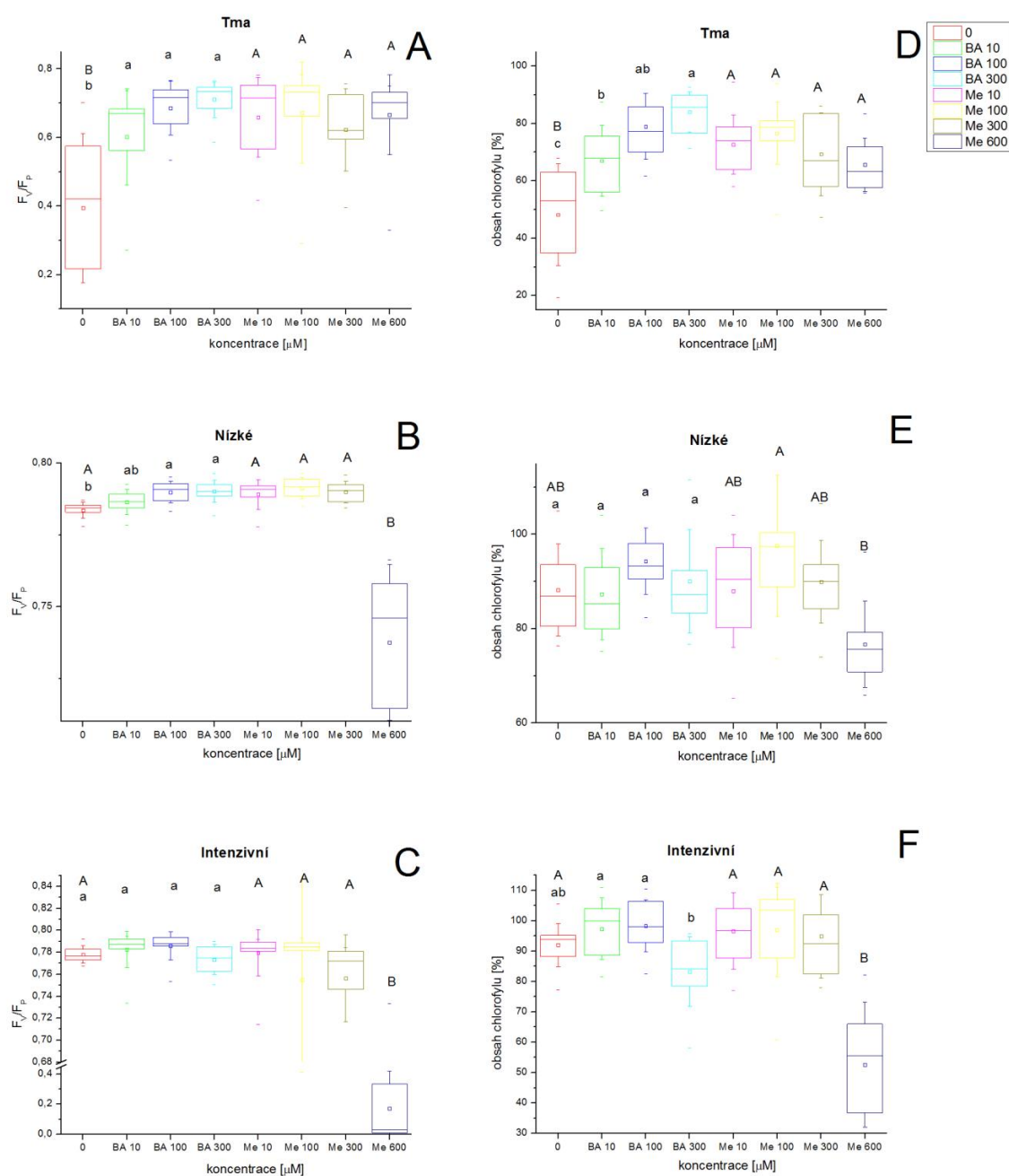
Zvýšená intenzita světla

U vzorků pěstovaných na intenzivním světle (Obr. 10, 11, 12 C,F) v DMSO byl ve 3. dni pozorován mírný pokles v hodnotách F_v/F_p ($0,77 \pm 0,01$) oproti „0.“ dni. V 9. dni po oddělení se hodnota F_v/F_p snížila až na ($0,2 \pm 0,3$). Podobný pokles v průběhu měření byl zaznamenán pro obsah chlorofylu u vzorků v DMSO, kdy ve 3. dni byl naměřen obsah chlorofylu 84 % a 9. den už jen 8 % oproti „0.“ dnu. Z tohoto měření vyplývá, že u kontrolních vzorků v DMSO uchovávaných na intenzivním světle proběhly senescenční procesy rychleji než u vzorků v DMSO na nízké světle. Mezi koncentracemi BA nebyly v průběhu měření pozorovány signifikantní rozdíly v F_v/F_p . Signifikantně menší pokles F_v/F_p u listů v BA oproti listům v DMSO byl naměřen 3. den po oddělení pro koncentraci 10 μM . V 9. dni po oddělení byl signifikantně menší pokles F_v/F_p naměřen u koncentrací 100 μM a 300 μM BA. Tyto výsledky poukazují na časový vývoj koncentrace cytokininů, tedy že v průběhu měření se optimální koncentrace, která nejvíce zpomalila pokles F_v/F_p , změnila z 10 μM na koncentrace 100 μM a 300 μM BA. U vzorků pěstovaných na intenzivním světle byl pozorován signifikantně negativní vliv MeOBAPR o koncentraci 300 μM na F_v/F_p oproti nižším koncentracím (10,100 μM) MeOBAPR 3. dne po oddělení

v dalších dnech už ne. Listy v koncentraci 600 μM MeOBAPR měly signifikantně nižší F_v/F_p než koncentrace (10, 100, 300 μM) MeOBAPR i než listy v DMSO do 6. dne. V 6. dni po oddělení byl signifikantně nižší F_v/F_p naměřen u nejvyšší koncentrace MeOBAPR 600 μM a tento stav byl naměřen i 9. den po oddělení. Mírně vyšší F_v/F_p byl zaznamenán nejčastěji u koncentrací 10 μM a 100 μM MeOBAPR oproti vzorkům v DMSO, tyto koncentrace můžeme považovat za nejvhodnější z použitých pro MeOBAPR při daných podmínkách. Při měření obsahu chlorofylu byl pozorován také negativní vliv vysokých koncentrací MeOBAPR oproti nižším i oproti DMSO, ale byly naměřeny trochu jiné výsledky než v případě F_v/F_p . Hlavní rozdíl byl naměřen 3. den po oddělení, kdy u BA i MeOBAPR byl v koncentracích 100 μM a 300 μM naměřen signifikantně nižší pokles obsahu chlorofylu než u nižších koncentrací 10 μM a 100 μM . U vyšších koncentrací 300 μM BA a 600 μM MeOBAPR byl u zaznamenán vyšší obsah chlorofylu oproti koncentracím 100 μM BA a 300 μM MeOBAPR. V dalších dnech se tento jev u MeOBAPR neprojevil, ale u BA v 9. dni po oddělení byl naměřen mírně vyšší obsah chlorofylu u koncentrací 100 μM a 300 μM než u koncentrace 10 μM . Nejmenší pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_p pro BA byl naměřen pro koncentraci 10 μM , tedy alespoň po dobu prvních šesti dní měření. Pro MeOBAPR měla koncentrace 10 μM nejmenší pokles chlorofylu a 6. a 9. den po oddělení měla signifikantně vyšší obsah chlorofylu než DMSO. U vzorků pěstovaných na intenzivním světle ve vyšších koncentracích cytokininů jsme pozorovali větší pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_p než u vzorků pěstovaných na nízkém světle.

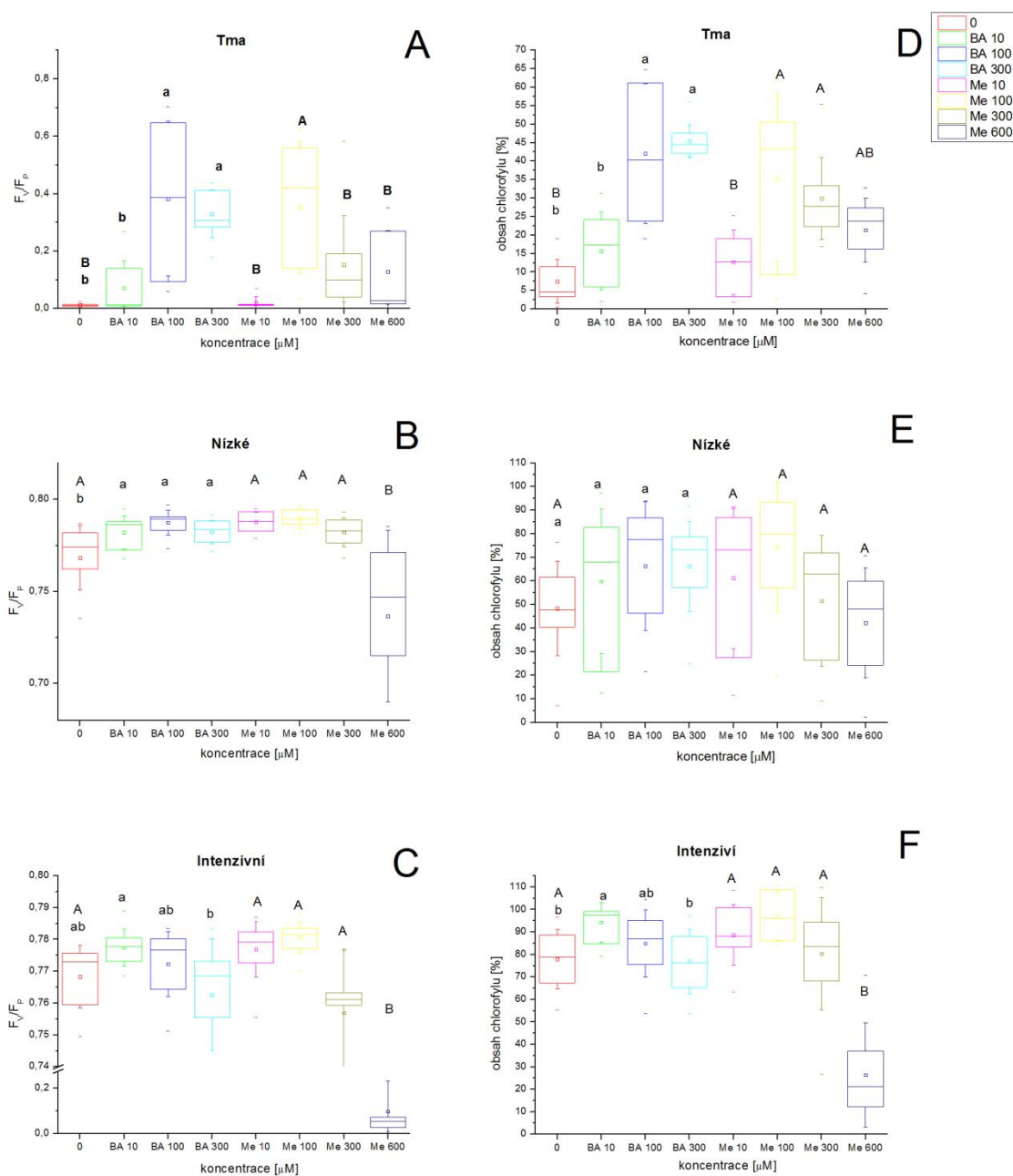
5.2 Experiment II

3 DPO, Exp II.



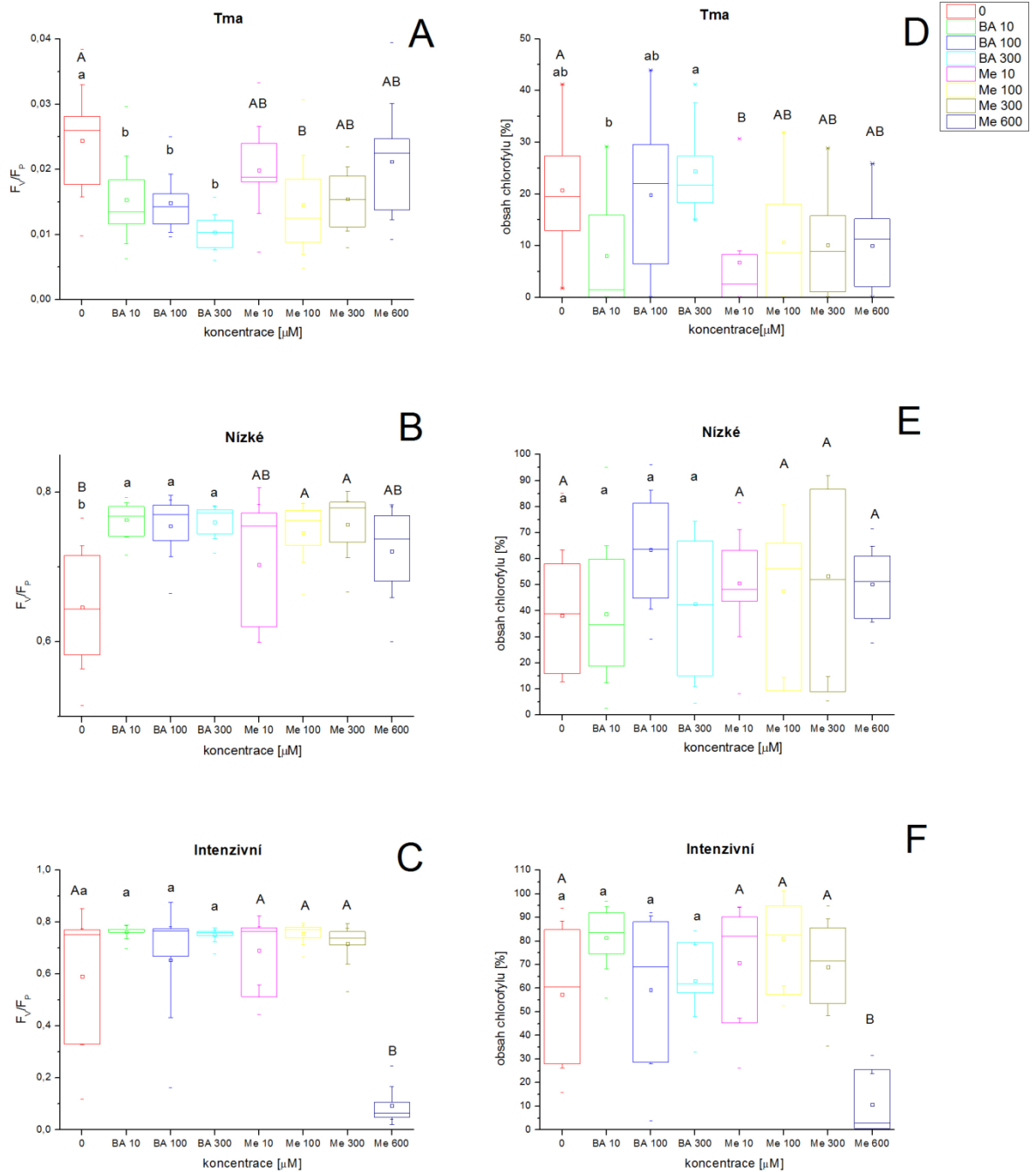
Obr. 13: Maximální kvantový výtěžek fotochemie ve fotosystému II (F_v/F_p) a obsah chlorofylu měřené na listech ječmene setého třetí den po oddělení inkubovaných ve tmě (A, D), na nízkém světle (B, E) nebo na intenzivním světle (C, F) v 0,5% roztoku DMSO (O), nebo v 10, 100 a 300 μM roztoku BA, nebo v 10, 100, 300 a 600 μM roztoku MeOBAPR. Obsah chlorofylu je vyjádřen v % obsahu chlorofylu v listech před oddělením. Zobrazené jsou průměry (\square), SD (\perp \top), mediány ($—$), horní a dolní kvartily (hranice obdélníků). Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl mezi variantami BA a DMSO (a,b); MeOBAPR a DMSO (A, B, C).

6 DPO, Exp II.



Obr. 14: Maximální kvantový výtěžek fotochemie ve fotosystému II (F_v/F_p) a obsah chlorofylu měřené na listech ječmene setého třetí den po oddělení inkubovaných ve tmě (A, D), na nízkém světle (B, E) nebo na intenzivním světle (C, F) v 0,5% roztoku DMSO (0), nebo v 10, 100 a 300 μ M roztoku BA, nebo v 10, 100, 300 a 600 μ M roztoku MeOBAPR. Obsah chlorofylu je vyjádřen v % obsahu chlorofylu v listech před oddělením. Zobrazené jsou průměry (\square), SD (\perp), mediány ($—$), horní a dolní kvartily (hranice obdélníků). Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl mezi variantami BA a DMSO (a,b); MeOBAPR a DMSO (A, B, C).

9 DPO, Exp II.



Obr. 15: Maximální kvantový výtěžek fotochemie ve fotosystému II (F_v/F_p) a obsah chlorofylu měřené na listech ječmene setého třetí den po oddělení inkubovaných ve tmě (A, D), na nízkém světle (B, E) nebo na intenzivním světle (C, F) v 0,5% roztoku DMSO (O), nebo v 10, 100 a 300 μM roztoku BA, nebo v 10, 100, 300 a 600 μM roztoku MeOBAPR. Obsah chlorofylu je vyjádřen v % obsahu chlorofylu v listech před oddělením. Různá písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl mezi variantami BA a DMSO (a,b); MeOBAPR a DMSO (A, B, C).

Tma

V Experimentu II u vzorků uchovávaných ve tmě (Obr. 13, 14, 15 A, D) v DMSO byl už 3. den naměřen pokles hodnot F_v/F_p na $(0,4 \pm 0,2)$ a obsahu chlorofylu na (54 %) oproti kontrolním hodnotám v „0.“ dni. Zaznamenali jsme rychlejší pokles parametrů než v Experimentu I. V dalších dnech tyto hodnoty dále klesaly až do 9. dne, kdy byl naměřen F_v/F_p $(0,026 \pm 0,008)$ a obsah chlorofylu 20 %. U vzorků uchovávaných ve tmě 3. den po oddělení, byl naměřen signifikantně menší pokles F_v/F_p u vzorků s CK oproti DMSO. V 6. dni po oddělení byl signifikantně menší pokles F_v/F_p naměřen u BA o koncentracích 100 μM a 300 μM , u MeOBAPR pro koncentraci 100 μM ve srovnání s listy v DMSO. V 9. dni po oddělení byl naměřen nejvyšší F_v/F_p u listů DMSO oproti ostatním cytokininům, koncentrace 300 μM BA a 100 μM MeOBAPR měly nejnižší F_v/F_p oproti ostatním koncentracím cytokininů BA a MeOBAPR. Při měření obsahu chlorofylu byl u vzorků s koncentracemi 100 μM a 300 μM MeOBAPR naměřen menší pokles obsahu chlorofylu oproti listům v DMSO do 6. dne po oddělení. U BA měla koncentrace 300 μM signifikantně menší pokles obsahu chlorofylu oproti DMSO do 6. dne po oddělení a v 9. dni nesignifikantně vyšší obsah chlorofylu než listy v DMSO. Nejmenší pokles parametrů byl naměřen pro BA u koncentrace 300 μM , pro MeOBAPR koncentrace 100 μM . V 9. dni po oddělení měly nejnižší obsah chlorofylu CK o nejnižší koncentraci 10 μM pro BA i MeOBAPR oproti ostatním vzorkům.

Pěstební intenzita světla

U vzorků pěstovaných při nízké (pěstební) intenzitě světla (Obr. 13, 14, 15 B, E) v DMSO byl 3. den pozorován mírný pokles v hodnotách F_v/F_p na $(0,78 \pm 0,01)$ oproti „0.“ dni. 9. den po oddělení se hodnota F_v/F_p $(0,65 \pm 0,1)$ mírně poklesla. Větší pokles byl zaznamenán pro obsah chlorofylu u vzorků v DMSO, kdy 3. den byl naměřen obsah chlorofylu 83 % a 9. den už jen 39 % oproti „0.“ dnu. Ukázalo se, že nízké světlo dokáže zpomalit senescenci oproti kontrolním vzorkům uchovávaným ve tmě, ale účinek světla nebyl tak velký jako v Experimentu I. U všech koncentrací BA, s výjimkou koncentrace 10 μM ve 3. dni po oddělení, byl naměřen signifikantně menší pokles F_v/F_p než u listů v DMSO po celou dobu měření. Nejmenší pokles pro vzorky v BA byl zaznamenán pro 100 μM koncentraci. U vzorků pěstovaných při nízké intenzitě světla byl pozorován signifikantně rychlejší pokles F_v/F_p u vzorků v MeOBAPR o nejvyšší koncentraci 600 μM oproti vzorkům v DMSO i v nižších koncentracích (10 μM , 100 μM a 300 μM) MeOBAPR už od 3. dne po oddělení. V 9. dni po oddělení přešel tento signifikantně

negativní vliv na nesignifikantní oproti ostatním koncentracím MeOBAPR. Koncentrace MeOBAPR 10 μ M, 100 μ M a 300 μ M měly nesignifikantně nejmenší pokles F_v/F_p než listy v DMSO po celou dobu měření, tyto koncentrace MeOBAPR měly nejvýraznější účinek na zpomalení senescence na nízkém světle. Při měření obsahu chlorofylu byla naměřena podobná závislost u koncentrace MeOBAPR v obsahu chlorofylu jako u F_v/F_p . Tedy vyšší koncentrace 600 μ M MeOBAPR měla signifikantně negativní vliv na obsah chlorofylu ve 3. dni po oddělení oproti koncentracím 10 μ M, 100 μ M a 300 μ M, které měly vyšší obsah chlorofylu než listy v DMSO (0 μ M koncentraci). V 6. dni byl naměřen nesignifikantně vyšší obsah chlorofylu v koncentracích 10 μ M, 100 μ M a 300 μ M MeOBAPR oproti 600 μ M koncentraci MeOBAPR i oproti listům v DMSO. V 9. dni byl nesignifikantně největší pokles obsahu chlorofylu naměřen pro koncentraci 10 μ M oproti ostatním koncentracím MeOBAPR (100, 300, 600 μ M). Nejmenší pokles parametrů u vzorků v MeOBAPR byl naměřen pro koncentraci 100 μ M oproti vzorkům v DMSO. U všech koncentrací BA nebyly po celou dobu měření zaznamenány signifikantní rozdíly v obsahu chlorofylu. Nejmenší pokles parametrů pro BA byl naměřen pro koncentraci 100 μ M oproti listům v DMSO. U vzorků pěstovaných na nízkém světle více zpomalily pokles parametrů CK s nižšími koncentracemi než s nejvyšší koncentrací 600 μ M MeOBAPR, která vyvolala signifikantně rychlejší nástup senescence 3. den po oddělení a v dalších dnech se stal tento jev nesignifikantním. U vzorků pěstovaných ve tmě byl naopak menší pokles parametrů zaznamenán u vzorků ve vyšších koncentracích cytokininů než u vzorků v nižších koncentracích cytokininů, tak jak tomu bylo v Experimentu I.

Zvýšená intenzita světla

U vzorků pěstovaných na intenzivním světle (Obr. 13, 14, 15 C, F) v DMSO byl ve 3. dni pozorován mírný pokles hodnot F_v/F_p na $(0,78 \pm 0,01)$ oproti „0.“ dni. V 9. dni po oddělení klesla střední hodnota F_v/F_p na $(0,5 \pm 0,3)$. Větší pokles v průběhu měření byl zaznamenán pro obsah chlorofylu u vzorků v DMSO, kdy ve 3. dni byl naměřen obsah chlorofylu 94% a 9. den už jen 60% oproti „0.“ dnu. Z tohoto měření vyplývá, že u kontrolních vzorků v DMSO uchovávaných na intenzivním světle tentokrát neproběhly senescenční procesy rychleji než u vzorků v DMSO na nízké světle. Dokonce u vzorků na intenzivním světle v DMSO byly naměřeny vyšší parametry než u vzorků na nízkém světle v DMSO. Mezi koncentracemi BA nebyly v průběhu měření pozorovány signifikantní rozdíly v rychlosti poklesu F_v/F_p , kromě 6. dne, kdy byl naměřen nižší F_v/F_p

u vzorků v BA s koncentrací 300 μM oproti vzorkům v koncentracích 10 μM a 100 μM BA i oproti listům v DMSO. Nejmenší pokles F_v/F_p pro listy v BA byl naměřen pro 10 μM koncentraci po celou dobu měření. Bohužel nezaznamenali jsme časový vývoj koncentrace cytokininů jako v Experimentu I. U vzorků pěstovaných na intenzivním světle byl pozorován signifikantně rychlejší pokles F_v/F_p u vzorků v MeOBAPR o koncentraci 600 μM na oproti vzorkům v koncentracích 10 μM , 100 μM a 300 μM MeOBAPR už od 3. dne po oddělení po celou dobu měření. Žádná z koncentrací MeOBAPR neměla signifikantně menší pokles F_v/F_p oproti DMSO v průběhu měření. Menší pokles F_v/F_p byl zaznamenán nejčastěji u koncentrací 10 μM a 100 μM MeOBAPR, tyto koncentrace můžeme považovat za nejvhodnější pro MeOBAPR při daných podmínkách. Při měření obsahu chlorofylu ve vzorcích byl pozorován podobný negativní vliv vysokých koncentrací MeOBAPR i BA oproti nižším, ale byly naměřeny trochu jiné výsledky než v případě F_v/F_p . Signifikantně nejrychlejší pokles obsahu chlorofylu byl naměřen u MeOBAPR s nejvyšší koncentrací 600 μM oproti nižším koncentracím 10 μM , 100 μM a 300 μM MeOBAPR i oproti listům v DMSO po celou dobu měření. U BA byl signifikantně nižší obsah chlorofylu naměřen při koncentraci 300 μM , ale jen do 6. dne od oddělení, poté přešel signifikantní rozdíl v obsahu chlorofylu na nesignifikantní oproti koncentracím 10 μM a 100 μM BA. Nejvýraznější účinek na zpomalení senescence pro vzorky v BA měla koncentrace 10 μM , která měla 6. po oddělení signifikantně vyšší obsah chlorofylu než DMSO. Pro vzorky v MeOBAPR byla nejvhodnější koncentrace 10 μM . U vzorků pěstovaných na intenzivním světle ve vyšších koncentracích cytokininů jsme pozorovali větší pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_p než u vzorků pěstovaných na nízkém světle.

5.3 Souhrn

V Experimentu I i Experimentu II výsledky měření ukázaly, že u vzorků uchovávaných ve tmě jsou senescenční procesy urychleny nejvíce a také že nejnižší koncentrace (10 μM) nemají tak silný protektivní účinek jako vyšší koncentrace cytokininů. Na světelných režimech byla senescence listů v kontrolách (DMSO) zpomalena oproti vzorkům v DMSO uchovávaných ve tmě. Bohužel výsledky Experimentu I a Experimentu II se rozcházejí v tom, jaká intenzita světla pro kontrolní vzorky zpomaluje více senescenční procesy. V Experimentu I výsledky ukázaly, že lépe

dokáže senescenci oddálit světlo o nízké intenzitě, ale v Experimentu II se tento trend nepotvrdil u obsahu chlorofylu. Nicméně u obou experimentů jsme na vzorcích ve světelných variantách naměřili podobnou koncentrační závislost, která ukazuje, že vyšší koncentrace cytokininů na světle urychlují senescenční procesy oproti nižším koncentracím cytokininů, které senescenci zpomalují. Tato závislost byla lépe pozorovatelná u vzorků uchovávaných na intenzivním světle než u vzorků pěstovaných na světle o nízké intenzitě. Některé koncentrace (10 μ M BA a 100 μ M MeOBAPR) dokonce dokázaly u některých listů zvýšit jejich obsah chlorofylu 3. den po oddělení oproti kontrole v „0.“ dnu a dále potlačit senescenční procesy v rostlině po celou dobu měření pokud byly vzorky uchovávané na nízkém světle.

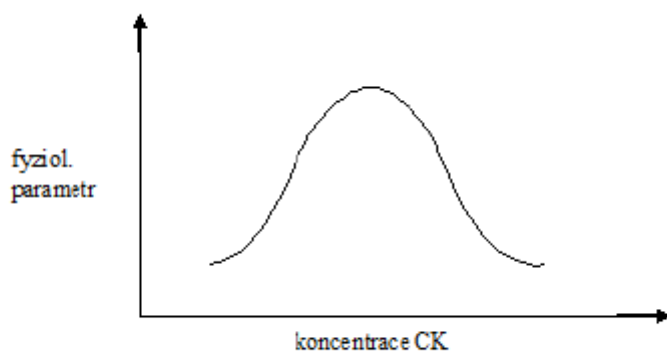
6. Diskuze

Je známo, že při stárnutí se v rostlinných částech snižuje obsah chlorofylu (Zacharias a Reid 1990, Vlčková a kol. 2006, Qingdai Liu a kol. 2006, Mýtinová a kol. 2011, Melkovičová 2012). Se stárnutím je také spojena změna fotosyntetických parametrů, jakými jsou například maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII, který se označuje jako F_v/F_m (resp. F_v/F_p). Během stárnutí dochází k poklesu F_v/F_p např. (Vlčková a kol. 2006, Qingdai Liu a kol. 2006, Ogweno a kol. 2010, Melkovičová 2012). Z experimentálních měření vyplývá, že exogenní aplikace cytokininů zpomaluje procesy spojené s PCD, existují ale případy, kdy může být efekt cytokininů opačný (Carimi a kol. 2002, 2003). Lze říci, že při použití nízké koncentrace CK na světle dochází k oddálení senescence, ale pokud aplikujeme vyšší koncentrace CK obzvlášť na intenzivním světle dochází naopak k zrychlení senescenčních procesů (Zacharias a Reid 1990, Carimi a kol. 2002, Carimi a kol. 2003, Melkovičová 2012, Xuexia Wu a kol. 2012). Dále také záleží na typu cytokininu a rostlině, na níž je exogenně aplikován, protože některé druhy cytokininů nemusí mít negativní vliv na obsah chlorofylu ani při vyšší koncentraci např. (Holub a kol. 1998, Mik a kol. 2011a, 2011b).

Stanovit co možná neoptimálnější koncentraci CK pro rostlinu je dost těžké, protože různé, ale i stejné druhy cytokininů mohou mít při stejných koncentracích odlišné účinky na různé rostliny. Příkladem může být Zacharias a Reid (1990), kde při aplikaci BA o koncentraci 100 μ M na segmenty listů husejníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) pozorovali začátek senescenčních změn, tedy urychlený pokles obsahu chlorofylu. Tudíž

vybraná koncentrace BA urychlovala senescenci. Zato v práci Holuba a kol. (1998), kde sledovali účinek BA, zeaxantinu a meta-topolinu na pšeničných listech (*Triticum aestivum* cv. Hereward), nebyl naměřen při koncentraci 100 μM žádný pokles v obsahu chlorofylu u žádného z CK oproti kontrolním vzorkům v DMSO. Dalším příkladem může být práce Carimi a kol. (2002), kde zkoumali vliv koncentrací BA na mrkev (*Daucus carota* L.) a *Arabidopsis thaliana* (L.). Zjistili že, mrkev je citlivější k vyšším koncentracím BA než *Arabidopsis thaliana*. Senescence u mrkve byla vyvolána už při koncentraci 13 μM BA, ale u *Arabidopsis thaliana* až při koncentraci 27 μM BA.

V práci Melkovičové (2012), která se zabývala působením různých koncentrací CK na senescenci rostlin byl využit graf koncentrační závislosti cytokininů na senescenci (Obr. 16), který předpokládá, že zvyšující se koncentrace cytokininů má inhibující účinky na senescenci do jisté koncentrace a po překročení této koncentrace dochází naopak k stimulaci stárnutí rostlin.



Obr. 16: Model závislosti fyziologického parametru na koncentraci cytokininů (CK). Za fyziologický parametr považujeme například délku života listu. (nepublikovaný model autorů: Husičková a kol. (2012) převzat z práce Melkovičové (2012))

Na působení CK má vliv i mnoho vnějších faktorů, jako je intenzita světelného záření. Jak ukázala práce Melkovičové (2012) a jak vyplývá i z našich výsledků závisí optimální koncentrace cytokininů na intenzitě světelného záření. Světlo i CK dokáží oddálit senescenci, pokud ale jejich společný vliv překročí určitou hranici, pak jejich společný vliv indukuje senescenci. Na společný vliv koncentrace cytokininu a intenzitu světla se dá použít podobný model jako na koncentrační závislost CK.

V naší práci jsme sledovali účinek exogenně aplikovaných různých koncentrací cytokininů BA a MeOBAPR. Cytokinin BA, jehož účinky jsou dobře známy už

z dřívějších prací Melkovičové (2012) a jiných, jsme použili jako pozitivní kontrolu pro srovnání míry účinnosti nového CK MeOBAPR, jenž byl nasyntetizován v laboratoři růstových regulátorů v Olomouci a jehož účinky na fotosyntetický aparát dosud nejsou podrobně zdokumentovány. Oba CK jsme sledovali při různých světelných podmínkách, které měly vliv na průběh senescence. U MeOBAPR jsme předpokládali, že nebude urychlovat senescenci listů uchovávaných na světle při vyšších koncentracích 300 a 600 μM . Míra senescence listů ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) byla stanovována pomocí měření obsahu chlorofylu a parametru F_v/F_p . V prvním i druhém experimentu jsme porovnávali účinky koncentrací (10 μM , 100 μM a 300 μM) BA a (10 μM , 100 μM , 300 μM , 600 μM) MeOBAPR ve tmě a na periodickém světle o nízké(pěstební) intenzitě (16 h světlo 90 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 8 h tma) a na intenzivním světle (16 h světlo 330 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 8 h tma) na průběh senescence oddělených segmentů ječmene setého.

U kontrolních vzorků uchovávaných ve vodě s DMSO byl, zaznamenám v obou experimentech ve tmě pokles obsahu chlorofylu i F_v/F_p , tento pokles byl zaznamenán i u světelných variant, avšak nebyl tak výrazný (Obr. 10 a 13). Světlo tedy průběh senescence zpomalilo. Podobné výsledky naměřili Vlčková a kol. (2006) na oddělených pšeničných listech od čtvrtého dne po oddělení nebo Zacharias a Reid (1990), kteří naměřili rychlejší průběh senescence u vzorků *Arabidopsis thaliana* uchovávaných ve tmě už od druhého dne po oddělení listů oproti listům na světle. 0,5 % roztok DMSO byl použit k rozpuštění CK. Tento roztok nemá na změny obsahu chlorofylu a F_v/F_p v listech významný vliv (Vlčková 2003)

Při aplikaci cytokininů BA a MeOBAPR na vzorky inkubované ve tmě, došlo k menšímu úbytku obsahu chlorofylu i F_v/F_p než u listů v DMSO. Tudíž došlo k zpomalení průběhu senescence. Vyšší koncentrace (100, 300 μM) BA i (100, 300, 600 μM) MeOBAPR byly ve tmě účinnější než 10 μM koncentrace (Obr. 10, 11, 12, 13, 14, 15). Tyto výsledky jsou podobné s výsledky BA v práci Melkovičové (2012).

Po aplikaci cytokininu BA na vzorky uchovávané na světle o nízké intenzitě měly všechny koncentrace naměřené parametry v rámci chyby a nedošlo k signifikantním odchylkám po celou dobu měření. U vzorků uchovávaných v MeOBAPR byl naměřen signifikantně nižší obsah chlorofylu a F_v/F_p u vzorků v MeOBAPR s nejvyšší koncentrací 600 μM oproti nižším koncentracím (10, 100, 300 μM). Tyto koncentrace MeOBAPR (10, 100, 300 μM) zpomalovaly průběh senescence podobně jako stejné koncentrace BA

(Obr. 10, 11, 12, 13, 14, 15). Tedy jsme u CK MeOBAPR pozorovali koncentrační závislost CK na fyziologických parametrech rostliny např. obsahu chlorofylu nebo F_v/F_p .

Po aplikaci cytokininu BA na vzorky uchovávané na intenzivním světle měly koncentrace 100 μM a 300 μM BA ve třetím a šestém dni po oddělení rychlejší pokles obsahu chlorofylu než listy v koncentraci 10 μM BA. Listy v této koncentraci měly nejmenší pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_p do 6. dne měření oproti listům v DMSO (0 μM koncentraci). Koncentrace 600 μM MeOBAPR měla nižší obsah chlorofylu a F_v/F_p v obou experimentech ve světelných variantách po celou dobu měření, až na jednu výjimku. U vzorků v MeOBAPR byl naměřen nižší obsah chlorofylu a F_v/F_p při aplikaci nejvyšších koncentrací 600 μM a 300 μM oproti nižším koncentracím (10 a 100 μM), tento pokles byl viditelnější než u vzorků inkubovaných na světle o nízké intenzitě. Pravděpodobně proto, že u vzorků inkubovaných na intenzivním světle se sčítá vliv intenzivního světla a účinek CK a tím může docházet k projevům urychlení senescence u vzorků pěstovaných už při 300 μM koncentraci, oproti vzorkům pěstovaným na světle o nízké intenzitě, kde vliv světla není tak vysoký. Byla zde také naměřena jedna výjimka na Obr. 10C,F, kdy nejvyšší koncentrace 600 μM MeOBAPR měla signifikantně vyšší obsah chlorofylu než koncentrace 300 μM , což mohlo být způsobeno zpětnovazebnou inhibicí, která byla zapříčiněna nahromaděním asimilantů, které vedly ke zhoršení funkce PSII, pravděpodobně díky malé dostupnosti NADP^+ , jako konečného elektronového akceptoru. Tato zpětnovazebná inhibice ale přímo neovlivňuje obsah chlorofylu, který byl na Obr. 10F srovnatelný s obsahem chlorofylu u listů v DMSO. (Vlčková a kol. 2006).

V Experimentu II (Obr. 13, 14, 15) byly pozorované podobné výsledky jako u Experimentu I (Obr. 10, 11, 12). Ale řada změn, které byly v Experimentu I signifikantní byly v Experimentu II sice patrné, ale ne signifikantně významné. Například u vzorků pěstovaných na světle o nízké intenzitě se koncentrace 600 μM MeOBAPR, která měla v Experimentu I signifikantně nižší parametry po celou dobu měření, se v průběhu měření Experimentu II její signifikantně nižší parametry změnila na nesignifikantní. Podobné výsledky byly naměřeny také pro BA o koncentraci 300 μM na intenzivním světle, kde také v průběhu měření došlo k změně ze signifikantně nižších parametrů na nesignifikantní. Dále na intenzivním světle v Experimentu II nebyla vyhodnocena koncentrace 300 μM MeOBAPR jako signifikantně urychlující senescenci oproti nižším koncentracím 10 a 100 μM jako tomu bylo u Experimentu I. Některé z těchto výsledků mohly být způsobeny vysrážením se BA o koncentraci 300 μM v průběhu měření,

popřípadě odlišným termínem pěstování nebo nějakým stresovým faktorem možná nedostatečnou zálivkou.

Výsledky, které zjistil Mik a kol. (2011a), kdy derivát kinetinu na kontinuálním světle na oddělených pšeničných listech dokázal udržet vysoký obsah chlorofylu, ale také pro tento derivát byl naměřen vysoký obsah malondialdehydu (MDA), což poukazuje na začínající senescenční procesy, zatím bez vlivu na obsah chlorofylu. Toto zjištění je důležité i pro naše výsledky, protože z nich můžeme říci, že obsah chlorofylu pravděpodobně nepatří mezi první parametry, které by byly ovlivněny v průběhu senescence.

Naše měření bylo ovlivněno tím, že jsme jej prováděli na oddělených listech, ve kterých se akumulují jednoduché cukry daleko rychleji než v celé rostlině, protože zde neexistují přirozené „sink“ místa spotřeby cukrů, jako jsou mladé listy nebo kořeny, což mělo za následek rychlejší průběh senescenčních procesů (Zwak a kol. 2012). Různé exogenně přidané CK i jejich koncentrací působí v rostlině odlišnou expresí genů pro tvorbu mnoha druhů CKX (Podlešáková a kol. 2012). Z práce Carimiho kol. (2003), ve které se zabývali CK BA, kinetinem, zeatinem, kde BA měl jiné výsledky na průběh PCD v mrkvi než kinetin a zeatin, což si teoreticky vysvětlovali rozličnou vazností cytokininů na CKX. Teoreticky by mohl mít BA a MeOBAPR jinou vaznost na CKX, což mohlo ovlivnit naše výsledky.

Naše výsledky odpovídají měřením uskutečněná Melkovičovou (2012), Vlčkovou a kol. (2006) a Zachariásem a Reidem (1990). Bohužel se nám nepovedlo prokázat, že by MeOBAPR při vyšší koncentraci 600 μM na světle byl pro rostlinu netoxický oproti koncentracím (10 a 100 μM) MeOBAPR. Ale koncentrace MeOBAPR (10, 100 a 300 μM) mají podobné účinky na oddálení senescence v listech ječmene jako porovnatelné koncentrace BA. Proto bych doporučil proměření vlastností cytokininu MeOBAPR na celých rostlinách, protože na celé rostlině nebude docházet k zpětnovazebné inhibici kvůli hromadění asimilantů (Vlčková a kol. 2006). Dále podle výsledků Podlešákové a kol. (2012) na cytokininech 3MeOBAP9G (3-hydroxy(-6-benzylamino-9-glukosyl)purine), 3MeOBA9THPP (3-methoxy(6-benzylamino-9-tetrahydropyran-2-yl)purine), které neměly inhibující vliv na růst kořenového systému a jejichž struktura je podobná MeOBAPR, který by také nemusel mít inhibující efekt na růst kořenového systému.

7. Závěr

Je známo, že CK dokáží zpomalit proces senescence a tím potlačit i změny, které se senescencí přicházejí, jako jsou pokles obsahu chlorofylu a pokles výkonu fotosyntetického aparátu. Jak ukázala Melkovičová (2012) se zvyšující se koncentrací CK se snižuje pokles obsahu chlorofylu a F_v/F_p během senescence, do určité „hraniční“ koncentrace, za níž už dochází k zvýraznění poklesu těchto parametrů a dochází k indukci senescenčních procesů. Je ale důležité vědět, jaká koncentrace cytokininů je pro danou rostlinu v daných podmínkách optimální, tedy dokáže nejlépe oddálit senescenční procesy.

Protože vysoké koncentrace cytokininů na intenzivním světle akcelerují senescenční procesy a naopak nízké koncentrace cytokininů ve tmě nemají dostatečný ochranný efekt. Účinek cytokininů se tedy liší podle použité koncentrace, ale závisí i na vnějších vlivech, například na intenzitě světelného záření. Světlo i CK mají schopnost oddálit senescenci, ale vzájemné působení při vysoké ozáření a vysoké koncentraci cytokininů může být pro rostlinu toxické.

Z našich měření vyplývá, že model, který popsala ve své práci Melkovičová (2012), lze aplikovat i při našich měřeních. Dále se tento model rozšířil na působení světla na účinek cytokininů. Bohužel jsme v naší práci nezjistili, že by CK MeOBAPR o koncentraci 600 μM zpomaloval senescenční změny v oddělených listech ječmene setého uchovávaných na světelných režimech tak dobře, jako u listů inkubovaných v koncentracích 10 μM a 100 μM MeOBAPR. Tedy, že by MeOBAPR neurychloval senescenční procesy v těchto listech při své nejvyšší koncentraci 600 μM . Tato koncentrace vedla pravděpodobně díky hromadění asimilantů ke zpětnovazebné inhibici fotosyntézy a k oxidativnímu poškození. Pro lepší zmapování účinků tohoto cytokininu by pravděpodobně vhodná jeho aplikace na celé rostliny.

8. Seznam literatury

- Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Schiavo F L (2002) Cytokinins: new apoptic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421
- Carimi F, Terzi M, Michele R D, Zottini M, Schiavo F L (2003) High levels of cytokinin induce PCD by accelerarating senescence. *Plant Science* 166: 963-969
- Holub J, Hanuš J, Hanke D E, Strnad M (1998) Biological aktivty of cytokinins derived from *ortho*-and *meta*-hydroxybenzyladenie. *Plant Growth Regulation* 26: 109-115
- Liu Q, Zhu Y, Tao H, Wang N, Wang Y (2006) Damage of PS II duribg senescence of *Spirodela polyrrhiza* explant under log-day conditions and its provention by 6-benzyladenine. *Journal of Plant Research* 119: 145-152
- Melkovičová H (2012) Koncentračná závislosť účinkov cytokininov na indukovanú senescenciú rastlín. Bakalárská práce, UP Olomouc.
- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad M, Spíchal L (2011a) N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* 72: 821-831
- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Spíchal L, Plíhal O, Nisler J, Zahajská L, Doležal K, Strnad M (2011b) N9-substituted N⁶-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]purine derivatives and their biological activity in selected cytokinin bioassays. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 7244-7251
- Mytinová Z, Motyka V, Haisel D, Luboská Z, Trávníčková A, Dobrev P, Holík J, Wilhelmová N (2011) Antioxidant enzymatic protection during tobacco leaf ageing is affected by cytokinin depletion. *Plant Growth Regulation* 65: 23-34
- Ogweno J O, Hu W H, Song X S, Shi K, Mao W H, Zhou Y H, Yu J Q (2010) Photoinhibition-induced reduction in photosynthesis is alleviated by absicsic acid, cytokinin and brassinosteroid in detached tomato leaves. *Plant Growth Regulation* 60: 175-182
- Podlešáková K, Zalabák D, Čudejková M, Plíhal O, Szüčová L, Doležal K, Spíchal L, Strnad M, Galuszka P (2012) Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicormolar range. *Plos One* 7(6): e39293
- Srivastava A, Strasser R T, Govindjee (1995) Pholyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanoobatcterial. *Photochemistry and Photobiology*. 61: 32-42

- Špundová M, Popelková H, Ilík P, Novotný R, Nauš J (2003) Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barely leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* 160: 1051-1058
- Valcke R, Cortleven A (2012) Evaluation of the photosynthetic activity in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: lesson from cytokinin. *Physiologia Plantarum* 144: 394-408
- 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. *Physiologia Plantarum* 126: 257-267
- Werbrouck S P O, van der Jeught B, Dewitte W, Prinsen E, Van Onckelen H A, Debergh P C (1995) The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* „Shott Petite“ in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Reports* 14: 662-665
- Wu X, Zhu Z, Li X, Zha D (2012) Effects of cytokinin on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters and antioxidative in seedlings of eggplant (*Solanum melongena* L.) under salinity stress. *Acta Physiologia Plantarum* 34: 2105-2114
- Zacharias L, Reid M S, (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum* 80: 549-554
- Zwack P J, Rashotte A M, (2013) Cytokinin inhibition of leaf senescence. *Plant Signaling & Behavior* 8(7): e24737