

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Lenka Juřicová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



**Stimulace biosyntézy cytokininů aplikací
 β -estradiolu na oddělené listy mutantů
pga22 rostlin *Arabidopsis***

Bakalářská práce

Lenka Juřicová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Lenka Juřicová

Název práce: Stimulace biosyntézy cytokininů aplikací β -estradiolu na oddělené listy mutantů *pga22* rostlin *Arabidopsis*

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra biofyziky, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Alexandra Husičková, Ph.D

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt: Senescence je přirozený proces stárnutí probíhající v rámci jednotlivých rostlinných orgánů nebo celého organismu. Projevuje se postupným snižováním fungování rostlinných orgánů a úbytkem schopností nahrazovat poškozené či odumřelé buňky novými. Tento proces je ovlivněn vnějšími podmínkami prostředí i řadou důležitých rostlinných hormonů. K nejznámějším patří cytokinininy, které senescenci rostlin zpravidla zpomalují.

Pro studium senescence se využívá řady rostlinných mutantů. My jsme pracovali s *pga22*, což je mutant rostlin huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Při aplikaci 17- β -estradiolu na tyto rostliny dochází k indukci exprese genu pro isopentenyltransferázu (*AtIPT8*), která je jedním z hlavních enzymů syntézy cytokininů. Cílem práce bylo najít vhodný způsob aplikace 17- β -estradiolu na oddělené listy, tak aby na nich mohl být sledován vliv indukované syntézy cytokininů na průběh umělé senescence. Senescence se zpravidla projevuje poklesem obsahu chlorofylu a funkčnosti fotosyntetického aparátu. Pro vyhodnocení účinku různých aplikací 17- β -estradiolu jsme proto použili měření obsahu chlorofylu a maximálního kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II (Fv/Fp). Oproti očekávání bylo u oddělených listů po aplikaci 17- β -estradiolu pozorováno spíše urychlení senescence. Stejně jako Sun a kol. (2003) jsme k aplikaci 17- β -estradiolu přidali Tween 20, pro lepší proniknutí 17- β -estradiolu do listů a zjistili jsme jeho negativní účinek na oddělené listy kontrolních rostlin. Použité způsoby aplikace pravděpodobně nevyvolaly indukci syntézy cytokininů v takovém množství, aby došlo k zpomalení senescence.

Klíčová slova: Senescence, cytokinininy, obsah chlorofylu, *pga22*

Počet stran: 40

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Lenka Juřicová

Title: Stimulation of cytokinin biosynthesis β -estradiol applications on separate sheets of *Arabidopsis* mutants *pga22*

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Biophysics, Palacky University in Olomouc

Supervisor: Mgr. Alexandra Husiřková, Ph.D

The year of presentation: 2013

Abstract: Senescence is a natural process of aging leading to a general deterioration of plant organ functioning, gradually reducing its ability to replace defective or dead cells with new ones. This process is influenced by external environmental conditions, as well as a number of important plant hormone. One of the best known groups of plant hormones that are known to influence the course of senescence comprise cytokinins. These plant hormones are known for their ability to retard senescence.

For studies of senescence can be used a number of plant mutants. We worked with *pga22*, a plant mutant of *Arabidopsis thaliana* that is known to strongly increase expression of an isopentenyl transferase (*AtIPT8*) after exogenous application of 17- β -estradiol. The *AtIPT8* is an enzyme of cytokinin biosynthesis. The aim of this work was to find the 17- β -estradiol treatment applicable for our future studies of artificial senescence after induced cytokinin synthesis. For evaluation of the course of senescence we used measurements of chlorophyll content and of maximum quantum yield of photosystem II photochemistry (*Fv/Fp*) that are well documented to decrease during senescence. Surprisingly we found rather accelerated senescence after the 17- β -estradiol treatment. From our results we conclude that used treatments did not induce synthesis of cytokinins strong enough to overcome the negative effect Tween 20, which was used to increase the availability of 17- β -estradiol for leaves.

Keywords: Senescence, cytokinins, chlorophyll content, *pga22*

Number of pages: 40

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Lenka Juřicová

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Mgr. Alexandře Husičkové,
Ph.D. za ochotu, cenné rady a věnovaný čas v průběhu vypracování bakalářské práce.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1. Senescence	10
2.2. Cytokininy	10
2.3. Transgenní rostliny.....	12
2.4. Vliv cytokininů na obsah chlorofylu během senescence.....	12
2.5. Fotosyntéza.....	14
2.5.1. Velmi rychlá fluorescenční indukce	14
2.5.2. Změna fotosyntetických parametrů se senescencí	15
2.6. Vliv cytokininů na oxidativní poškození	17
2.7. Cytokininová indukce programované buněčné smrti.....	18
2.8. Rostlinný mutant pga22	19
3. CÍLE PRÁCE	21
4. MATERIÁL A METODY	22
4.1. Rostlinný materiál	22
4.1.1. Příprava Knoppova roztoku	22
4.1.2. Příprava 1. výsevu.....	22
4.1.3. Příprava 2. výsevu.....	23
4.1.4. Podmínky pěstování.....	23
4.2. Indukce syntézy růstových látek	24
4.2.1. Oddělení listů.....	24
4.3. Použité metody	26
5. VÝSLEDKY	28
5.1. Vliv aplikace 17- β -estradiolu na Fv/Fp v listech huseníčku rolního	28
5.2. Vliv aplikace 17- β -estradiolu na obsah chlorofylu v listech huseníčku rolního.....	31
6. DISKUSE.....	35
7. ZÁVĚR.....	37
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	38

SEZNAM ZKRATEK

BAP - benzylaminopurin

DPO - dny po oddělení listů

Fv/Fp - maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II

HBA - N⁶-(m-hydroxybenzyl)adenosin

IPT - isopenthenyltransferáza

ipt - gen kódující isopenthenyltransferázu

MDA - malondialdehyd

1. ÚVOD

Zájem vědců je již dlouhou dobu soustředěn na rostlinné hormony cytokininy. Tyto regulátory rostlinného růstu jsou v rostlinách běžně syntetizovány a ovlivňují mnoho vývojových procesů. Stimulují dělení buněk, zakládání a vývoj pupenů a zpomalují stárnutí rostlinných pletiv a ovlivňují tak senescenci.

Proces stárnutí rostlin a jejich orgánů, označovaný také jako senescence, je přirozenou adaptací rostlin např. na sezónní klima, ale může být také ovlivněn nepříznivými podmínkami prostředí. Cytokininy zpravidla zpomalují rostlinnou senescenci, avšak jejich účinek závisí na mnoha parametrech, jako je např. druh rostliny (Pospíšilová a kol. 2001), druh a koncentrace cytokininů (Carimi a kol. 2003) a doba jejich působení (Pospíšilová a kol. 2001).

Pro studium účinků cytokininů na senescenci rostlinných listů se s oblibou využívá rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L.) včetně jejich mutantů. Tyto rostliny mají plně sekvencovaný genom a jsou tedy významným modelovým systémem v biologii. Velkým přínosem pro studium vlivu cytokininů na vývoj rostlin jsou např. mutanti *pga22*, u nichž dochází k výrazné indukci syntézy cytokininů po exogenní aplikaci 17- β -estradiolu (Sun a kol. 2003). Na oddělení biofyziky se zabýváme vlivem cytokininů na průběh senescence indukované oddělením listů. Stimulace syntézy cytokininů v oddělených listech mutantů *pga22* doposud nebyla popsána. Cílem mé bakalářské práce bylo určit nejvhodnější způsob aplikace 17- β -estradiolu na oddělené listy mutantu *pga22*.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Senescence

Jako vše živé i rostliny procházejí přirozeným procesem stárnutí (senescence), který nakonec vede k odumření buněk, pletiv, orgánů nebo i celých rostlin. Senescenční proces je charakterizován převahou dějů katabolických nad anabolickými a o délce života rostlin, začátku jejich stárnutí a smrti rozhodují faktory genetické, fyziologické i ekologické (Luštinec a Žárský 2005). Během přirozené senescence dochází v rostlinných buňkách ke geneticky naprogramovaným změnám, které vedou k jejich odumření, avšak k zahájení těchto změn je zapotřebí impulsu, který může pocházet z vnitřních fyziologických vztahů nebo z vnějšího prostředí (Luštinec a Žárský 2005). Viditelným příznakem stárnutí je snížení obsahu chlorofylu, které je v listech provázeno i degradací proteinů. Proces senescence je ovlivněn rostlinnými hormony cytokininy, které vykonávají řadu důležitých fyziologických funkcí. Tyto rostlinné hormony ovlivňují senescenci, avšak zcela ji neodvrátí, mohou jen ovlivnit její průběh.

2.2. Cytokininy

Cytokininy jsou významnou skupinou rostlinných hormonů, které se tvoří převážně v meristému kořenů a odtud jsou následně transportovány xylémem do ostatních částí rostlinného těla, kde spolu s místně syntetizovanými cytokininy rozvíjí řízení a stárnutí celé rostliny. Společně s auxiny jsou označovány za hlavní regulátory rostlinného růstu. V současné době je známo více než 30 přirozených cytokininů, které jsou po chemické stránce odvozeny z adeninu substituovaném na aminoskupině v poloze 6 (Procházka a kol. 1998). Právě tato konfigurace je podmínkou jejich biologické aktivity (Procházka a kol. 1998). Cytokininy můžeme dělit na základě substituentů, kterým může být isopentenyl či hydroxyisopentenyl jako je tomu např. u zeatinu anebo benzyl nesoucí v poloze 2 nebo 3 hydroxylovou skupinu. Tyto aromatické cytokininy bývají označovány také jako topoliny, podle výskytu v topolu (Luštinec a Žárský 2005). Cytokininy můžeme rozdělit také na přirozené (endogenní) a uměle připravované (syntetické). Jako první přirozený cytokinin byl z nezralého

endospermu kukuřice izolován zeatin, avšak dříve byl v laboratoři F.Skooga v USA izolován cytokinin nazvaný kinetin z DNA sledího spermatu (Luštinec a Žárský 2005). V praxi se často používá syntetických cytokininů. Hojně používaný 6-benzylaminopurin (BAP) byl dlouhou dobu považován za látku syntetickou, avšak dnes je již známo, že BAP a jeho deriváty se vyskytují v rostlinách (Strnad a kol. 1993 cit. z Luštinec a Žárský 2005).

Ať už se jedná o cytokininy přirozené či syntetické, jde bezpochyby o skupinu látek vykonávající řadu důležitých fyziologických funkcí, mezi něž patří stimulace buněčného dělení a prodlužování, syntéza bílkovin, chlorofylu a škrobu, stimulace tvorby pupenů, dormance semen, podpora růstu listů, a zpoždění stárnutí listů (Hess 1983, Luštinec a Žárský 2005). Tyto rostlinné hormony také v nízkých dávkách stimulují zakládání a růst kořenů, naproti tomu vysoké dávky mají účinek právě opačný (Pastýrik 1979). Rostlinné cytokininy působí synergicky i antagonisticky s řadou dalších rostlinných hormonů a společně ovlivňují řadu funkcí během růstu rostliny. Jak syntetické, tak přirozeně se vyskytující cytokininy zvyšují rychlost transpirace a ovlivňují otevírání průduchů (Pospíšilová a kol. 2001). Pospíšilová a kol. (2001) ve své studii zjistili, že je možné stimulovat výměnu plynů, rychlost transpirace a rychlost fotosyntézy exogenní aplikací cytokininů. Účinky závisely na druhu rostliny a koncentraci cytokininů. Méně pak na způsobu aplikace a rostlinném věku (Pospíšilová a kol. 2001). U fazolových sazenic měl BAP pozitivní efekt na rychlost fotosyntézy a rychlost transpirace. V bavlně, lnu, kukuřici a cukrové řepě aplikace cytokininů významně neovlivnila rychlost transpirace, rychlost fotosyntézy ani otevírání průduchů. Účinky cytokininů jsou také odlišné v závislosti na typu použitého cytokininu. Vlivem různých typů a koncentrací cytokininů na buněčné kultury mrkve obecné (*Daucus carota* L.) se zabýval Carimi a kol. (2003). Buněčné kultury staré 5 dnů inkuboval s BAP, difenylmočovinou, kinetinem nebo zeatinem. Buňky o 7 dní později upravil pro analýzu DNA a kultury inkubované bez cytokininů použil jako kontrolu. Z výsledků zjistil, že přidání zeatinu a kinetinu do kultivačního média významně nemění růst mrkvových buněk ve srovnání s kontrolními podmínkami a nepozoroval ani fragmentaci DNA. Také difenylmočovina neměla žádný vliv na růst buněk. Ve svých experimentech zjistil, že BAP ($1,3 \cdot 10^{-5}$ a $2,7 \cdot 10^{-5}$ M) výrazně snižuje růst mrkvových buněk a pozoroval také fragmentaci jaderné DNA (Carimi a kol. 2003).

2.3. Transgenní rostliny

V současné době se v řadě oborů ke studiu morfologických a fyziologických procesů rostlin a také k modifikaci obsahu rostlinných hormonů využívá rostlin transgenních (Procházka a kol. 1998). Jelikož některé druhy mikroorganismů jako např. *Agrobacterium tumefaciens* dokáží vytvářet rostlinné hormony, lze s výhodou pro studium vlivu těchto hormonů využít transgenních rostlin s vnesenými geny pro syntézu těchto rostlinných hormonů. V biosyntéze cytokininů je důležitým enzymem isopentenyltransferáza (IPT), která je m.j. produktem jednoho z agrobakteriálních onkogenů. Gan a Amasino ovlivnili proces sránutí transgenních tabákových rostlin tím, že z rostlin huseníčku rolního izolovali gen, který se exprimuje pouze při procesu stárnutí listů a promotor tohoto genu naklonovali ke strukturnímu genu *ipt*. Takto vytvořený chimerický gen vnesli do rostlin tabáku. Indukce syntézy cytokininů v P_{SAG12}-IPT transgenních rostlinách nastala se zahájením procesu stárnutí, čímž bylo stárnutí potlačeno. Na transgenních rostlinách lze tedy studovat biologické funkce jednotlivých rostlinných hormonů (Procházka a kol. 1998). Transgenních rostlin využili ve své práci i Belintani a kol. (2012), kteří chladem indukovali promotor *ipt* genu, aby tak oddálili senescenci v rostlinách cukrové třtiny (*Saccharum* spp.). Jejich výsledky ukázaly, že indukovaná exprese *ipt* genu zvýšila odolnost rostlin vůči chladu (Belintani a kol. 2012). Petit-Paly a kol. (1999), kteří se ve své práci zabývali zjišťováním vlivu cytokininů na činnost katalázy, rovněž zvýšili endogenní hladiny cytokininů zavedením *ipt* genu a zjistili, že cytokininy opravdu ovlivnily aktivitu katalázy (Petit-Paly a kol. 1999).

2.4. Vliv cytokininů na obsah chlorofylu během senescence

Rostlinné buňky obsahují zelené listové barvivo chlorofyl, které jim umožňuje vykonávat proces fotosyntézy. U stárnoucích buněk se zvyšuje syntéza enzymů odbourávajících chlorofyl a dochází k degeneraci chloroplastů (Procházka a kol. 1998). Snížením obsahu chlorofylu dochází k poklesu rychlosti fotosyntézy a viditelnému žloutnutí rostlinných orgánů (Procházka a kol. 1998). Ve stárnoucích listech postupně klesá obsah cytokininů, které inhibují odbourávání chlorofylu. Aplikace cytokininů pak zpomaluje stárnutí listů. Již v roce 1957 Richmond a Lang upozorovali, že stárnutí listů může být zpomaleno o několik dní po aplikaci kinetinu

(Hess 1983). Později byl tento jev podrobněji studován Osbornem a Mothesem a jeho skupinou, kteří aplikovali kinetin na jednu polovinu listové čepele izolovaného listu tabáku a zjistili, že takto ošetřená polovina listové čepele zežloutne pomaleji ve srovnání s polovinou neošetřenou. Do míst, kde byl aplikován kinetin, proudí aminokyseliny a jiné látky ze stárnoucích oblastí listu, které jsou zde zadržovány a zabudovávány do bílkovin. Vliv kinetinu stimuloval syntézu RNA a bílkovin což jsou pravděpodobně základní příčiny zpomaleného stárnutí (Hess 1983).

Zacarias a Reid (1990), kteří se zabývali touto problematikou, použili pro studium vlivu cytokininů na obsah chlorofylu BAP. Ve své práci použili linie rostlin huseníčku rolního a zjistili, že aplikace BAP (10^{-6} M) vyvolala zvýšení obsahu chlorofylu v listových discích držných ve tmě. Z jejich výsledků vyplývá, že obsah chlorofylu je tedy možno ovlivnit aplikací BAP (Zacarias a Reid 1990). Vlivem BAP na obsah chlorofylu se zabýval také Wu a kol. (2012). K tomuto studiu použili sazenice lilku (*Solanum melongena* L.) v nichž vyvolali stres aplikací chloridu sodného se čtyřmi koncentracemi BAP ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ M). Chlorid sodný snížil obsah chlorofylu ve srovnání s kontrolními rostlinami o 22 %. Aplikace BAP v nižších koncentracích ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} M) vyvolala zvýšení obsahu chlorofylu o 10 a 11 % ve srovnání s rostlinami se samotným chloridem sodným. Vyšší koncentrace BAP ($2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ M) neměly v tomto ohledu žádný účinek (Wu a kol. 2012). Rulcová a Pospíšilová (2001) zkoumaly vliv BAP na rehydrataci fazolových rostlin po vodním stresu a po aplikaci 10^{-6} M BAP zjistily mírné zpoždění stárnutí listů 17 dnů starých fazolových rostlin (*Phaseolus vulgaris* L.). U těchto rostlin byl obsah chlorofylu po nástřiku listů BAP mírně vyšší než u kontrolních listů (Rulcová a Pospíšilová 2001). Aplikace cytokininů tedy vede ke zpomalení poklesu obsahu chlorofylu se senescencí, ale příliš vysoké koncentrace mohou vyvolat naopak žloutnutí. Carimi a kol. (2003) studovali účinek BAP procentuelním počítáním žlutých listů u rostlin huseníčku rolního a mrkve obecné. Pro kultivaci použili média obsahující $4 \cdot 10^{-6}$, $1,3 \cdot 10^{-5}$ a $2,7 \cdot 10^{-5}$ M BAP. U rostlin huseníčku inkubovaných na médiu s BAP bylo zaznamenáno předčasné žloutnutí listů, snížení kořenové hmoty, několik vrubů na okraji listů, zbarvení hlavních žil do fialova a předčasná fragmentace DNA. Po 110 dnech bylo u kontrolních rostlin a rostlin s BAP stanoveno procento zežloutnutých listů. Čím vyšší byla koncentrace BAP, tím vyšší bylo také procento předčasně zežloutnutých listů a to u rostlin huseníčku i mrkve

(Carimi a kol. 2003). Zacarias a Reid (1990) rovněž zjistili, že BAP v koncentraci 10^{-5} M stimuloval snížení obsahu chlorofylu u rostlin huseníčku držných na světle.

Poněkud odlišný způsob vlivu cytokininů na obsah chlorofylu studovali Belintani a kol. (2012). Ve své práci se zabývali oddálením senescence v rostlinách cukrové třtiny se zavedeným *ipt* genem, jehož promotor AtCOR15a je aktivovaný chladem. Už před vystavením rostlin chladným teplotám zjistili vyšší obsah chlorofylu u transgenních rostlin ve srovnání s rostlinami kontrolními. V listech transgenních rostlin bylo zjištěno výrazné zvýšení obsahu chlorofylu po vystavení teplotě 0 °C oproti kontrolním rostlinám, kde obsah chlorofylu po stresu klesal. Po skončení experimentu byly rostliny umístěny do skleníku při teplotě 28 °C a i za 24 hodin bylo zjištěno zachování výrazných rozdílů v obsahu chlorofylu mezi transgenními a kontrolními rostlinami, přestože obsah chlorofylu klesl. Z výsledků vyplynulo, že exprese *ipt* genu a následná syntéza cytokininů ovlivňuje obsah chlorofylu a způsobuje větší odolnost rostlin vůči chladu (Belintani a kol. 2012).

2.5. Fotosyntéza

Fotosyntézu lze jednoduše definovat jako základní biochemický proces tvorby organických látek z látek anorganických, která je jedinečnou vlastností zelených rostlin. Podstatou je zachycení světelné energie ve formě fotonů v živých chloroplastech a s využitím této energie dochází k přeměně oxidu uhličitého a vody na energii chemickou, vázanou v organických látkách (Pastýrik 1979). Tento proces má zásadní význam pro život na Zemi a úzce souvisí s činností rostlinných hormonů cytokininů. Cytokinininy senescenci zpomalují, zejména prodlužováním fotosyntetické aktivity chloroplastů (Zacarias a Reid 1990).

2.5.1. Velmi rychlá fluorescenční indukce

Jako ukazatel fotosyntézy je ve velké míře používána fluorescenční indukce chlorofylu (Stirbet a kol. 1998). Tato přechodná fluorescencce neboli Kautský efekt byla již pozorována u rostlin, řas a sinic (Stirbet a kol. 1998). Rychlou fluorescenční indukci rozumíme nárůst fluorescence do maxima působením nízkých intenzit excitačního světla. Křivka takovéto fluorescence má charakteristický tvar O-I-P.

Použitím vysokých intenzit excitačního světla dojde k velmi rychlé fluorescenční indukci a v nárůstu fluorescence se objeví dvě vlny. Křivka takovéto fluorescence má charakteristický tvar O-J-I-P. Proměnná fluorescence chlorofylu souvisí s fotochemickou aktivitou fotosystému II (Strasser a kol. 1995). Strasser a kol. (1995) pozorovali zvýšení fluorescence rýže z minimální meze F_0 na maximální mez F_m . Nárůst fluorescence během indukce byl důsledkem poklesu kvantového výtěžku fotochemie v důsledku rostoucí koncentrace primárního chininového akceptoru Q_A v redukovaném stavu (Strasser a kol. 1995). Se zvyšující se intenzitou světla fluorescence stoupla a změnila se z typické OIP křivky na křivku se dvěma mezi úrovněmi J a I (Strasser a kol. 1995) Relativní výšky jednotlivých vln rostou s rostoucí intenzitou excitace a po dosažení určité intenzity se růst jednotlivých vln zastaví (Strasser a kol. 1995). Intenzita fluorescence rychle stoupá z počáteční nízké hodnoty F_0 na nevyšší hodnotu F_p . Při zvyšování intenzity excitace F_p roste až dosáhne své maximální hodnoty F_m , kdy jsou v redukovaném stavu všechna Q_A (Stirbet a kol. 1998). Z parametrů velmi rychlé fluorescenční indukce můžeme vypočítat maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_p), protože hodnota veličiny F_v/F_p je přibližně rovna F_v/F_m . Působí-li na list stresující podmínky, dohází k charakteristickému snížení F_v/F_m .

2.5.2. Změna fotosyntetických parametrů se senescencí

Wu a kol. (2012) se zabývali vlivem BAP na F_v/F_p v lilkových sazenicích stresovaných chloridem sodným. Chlorid sodný zrychlil pokles F_v/F_p ve srovnání s kontrolními rostlinami. Aplikován byl BAP ve čtyřech koncentracích, přičemž nižší koncentrace ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} M) výrazně zlepšily F_v/F_p a vyšší koncentrace ($2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ M) neměly na tento parametr výraznější vliv (Wu a kol. 2012). Rulcová a Pospíšilová (2001) sledovaly rovněž účinky BAP (10^{-6} a 10^{-5} M), který aplikovaly na substrát nebo nastříkaly na primární listy 14 dnů starých rostlin fazole obecné. Fazolové rostliny dostatečně zásobovaly vodou anebo vystavily vodnímu stresu po dobu 4 dnů a následně měřily vodivost průduchů, asimilaci oxidu uhličitého a F_v/F_m na primárních listech rostlin. Jejich výsledky prokázaly pouze mírně pozitivní účinek aplikace 10^{-6} M BAP na parametry související s fotosyntézou primárních fazolových listů. Koncentrace 10^{-5} M BAP měla většinou negativní dopad na měřené parametry. Lze tedy říct, že nižší koncentrace BAP měly mírně pozitivní účinek, zatímco vysoké

koncentrace měly účinek negativní. Způsob aplikace v tomto experimentu nebyl rozhodující (Rulcová a Pospíšilová 2001). Pospíšilová a kol. (2001) ve své studii pracovali s fazolovými sazenicemi a zjišťovali vliv BAP na vodivost průduchů, rychlost transpirace a asimilaci oxidu uhličitého. Ke kořenům aplikovali BAP (10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} a $2 \cdot 10^{-5}$ M). Zjištěno bylo zvýšení vodivosti průduchů a rychlosti fotosyntézy již 1 hodinu po aplikaci všech koncentrací. Na sazenicích cukrové řepy vyzkoušeli účinky hydroxybenzyladenosinu (HBA) na tytéž parametry. Nicméně pozitivní efekt byl pozorován až po 24 hodinách na rychlost fotosyntézy v rostlinách s kořeny ponořenými do 10^{-5} M HBA (Pospíšilová a kol. 2001). Ogweno a kol. (2010) studovali proces fotoinhibice na základě významného snížení rychlosti fotosyntézy, kvantového výtěžku fotochemie fotosystému PSII v ustáleném stavu a fotochemického zhášení na oddělených listech rajčat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Jejich cílem bylo zjistit, zda cytokininy hrají roli v regulaci fotosyntézy. Z výsledků vyplynulo, že cytokinin N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea v koncentraci $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ výrazně zmírňuje proces fotoinhibice a zpomaluje pokles rychlosti fotosyntézy, kvantového výtěžku fotochemie fotosystému PSII v ustáleném stavu a fotochemické zhášení. Cytokinin N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea v této koncentraci zvýšil asimilaci oxidu uhličitého, přičemž vyšší koncentrace měly malý vliv nebo dokonce asimilaci oxidu uhličitého snížily (Ogweno a kol. 2010). Fotosyntetickými parametry souvisejícími se senescencí se zabývali Wu a kol. (2012), kteří studovali vliv BAP na intracelulární koncentraci oxidu uhličitého, vodivost průduchů, rychlost transpirace a asimilaci oxidu uhličitého v lílkových sazenicích stresovaných chloridem sodným. Aplikován byl BAP ve čtyřech koncentracích ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ M). Všechny čtyři koncentrace BAP zpomalily pokles intracelulární koncentrace oxidu uhličitého a rychlost transpirace, přičemž jako nejúčinnější se prokázala koncentrace 10^{-5} M. Tři nejnižší použité koncentrace BAP rovněž významně zpomalily pokles asimilace oxidu uhličitého a vodivosti průduchů, přičemž jako nejúčinnější se opět prokázala koncentrace 10^{-5} M (Wu a kol. 2012). Nízké koncentrace cytokininu tedy vyvolaly zpomalení změn funkce fotosyntetického aparátu vyvolaných senescencí a vysoké koncentrace neměly žádný nebo opačný účinek.

2.6. Vliv cytokininů na oxidativní poškození

Všechny rostliny čelí během svého života nejrůznějším vlivům okolního prostředí na něž musí být schopny aktivně reagovat a přizpůsobit se jim. Jestliže nejsou schopny se těmito podmínkám přizpůsobit, dochází u nich k fyziologickému stresu a oxidativnímu poškození membrán. Produktem oxidativního poškození membrán je malondialdehyd (MDA), jehož množství lze ovlivnit pomocí cytokininů a to exogenní aplikací i zavedením *ipt* genu. Exogenní aplikaci BAP na listy lilkových sazenic, v nichž byl vyvolán solný stres (chloridem sodným), studovali Wu a kol. (2012), kteří tímto způsobem sledovali vliv cytokininů na obsah MDA a produkci superoxidového aniontového radikálu. Solný stres vyvolal senescenci a zvýšil obsah MDA a produkci superoxidového aniontového radikálu v listech lilkových sazenic, avšak všechny použité koncentrace BAP ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , $2 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ M) vyvolaly snížení obsahu MDA a sníženou produkci superoxidového aniontového radikálu. Jako nejúčinnější se prokázal BAP v koncentraci 10^{-5} M (Wu a kol. 2012). Snížený obsah MDA byl pravděpodobně způsoben pozitivním účinkem BAP na aktivitu antioxidantních enzymů jako jsou superoxiddismutáza, kataláza, peroxidáza a askorbát peroxidáza. Aplikace BAP ve všech zmíněných koncentracích zvýšila aktivitu superoxiddismutázy, katalázy a askorbát peroxidázy, přičemž největší účinek měla koncentrace 10^{-5} M BAP. Aktivita peroxidázy byla zvýšena pouze nižšími koncentracemi BAP, přičemž největší účinek měl BAP rovněž v koncentraci 10^{-5} M. Z výsledků vyplynulo, že BAP zmírňuje senescenci indukovanou solným stresem posílením aktivity antioxidantních enzymů (Wu a kol. 2012). Snížení obsahu MDA pozorovali také Belintani a kol. (2012) v listech rostlin cukrové třtiny. V transgenních rostlinách s genem pro isopentenyltransferázu (*ipt*) aktivovaným chladem, nebylo před působením chladu zjištěno významných rozdílů v obsahu MDA ve srovnání s kontrolními rostlinami. Avšak při 0 °C bylo pozorováno významné zvýšení MDA u kontrolních rostlin oproti rostlinám transgenním. Po skončení experimentu bylo za 24 hodin pozorováno snížení obsahu MDA v transgenních rostlinách, zatímco v kontrolních rostlin zůstal obsah MDA vyšší (Belintani a kol. 2012).

Předpokládá se, že cytokininy jakožto významná třída fytohormonů se schopností zpomalit rostlinné stárnutí, by mohly být regulátory v činnosti katalázy a hromadění kumarinů. Tento vliv cytokininů na činnost katalázy studoval Petit-Paly a

kol. (1999) na *in vitro* kulturách tabáku. U suspenze tabákových buněk zjistil mírný pokles aktivity katalázy během první hodiny po aplikaci $1 \cdot 10^{-6}$ M BAP. Později se aktivita opět zvýšila, ale nebyla vyšší než u kontrolních buněk. U buněk bez cytokininů pozoroval zvýšení aktivity na dvojnásobnou hodnotu. Odlišné výsledky zaznamenal u kultur prýtových buněk. Zde endogenní hladiny cytokininů zvýšil zavedením *ipt* genu anebo exogenní aplikací cytokininů. Tato inhibice katalázy souvisela s hromaděním scopolinu a indukci kumarinů, a tedy výsledky ukázaly, že cytokininy ovlivňují aktivitu katalázy (Petit-Paly a kol. 1999). Inhibiční efekt cytokininů na činnost katalázy v *in vitro* kulturách tabáku byl velmi rychlý, v experimentu k němu došlo během prvních 30 minut po aplikaci (Petit-Paly a kol. 1999). Cytokininy tedy snižují aktivitu katalázy, ale v závislosti na použité dávce, koncentraci, fyziologických podmínkách a hlavně době působení (Petit-Paly a kol. 1999).

2.7. Cytokininová indukce programované buněčné smrti

Jak bylo uvedeno v kapitolách 2.4 a 2.5.2 cytokininy jsou považovány za látky s anti-senescenčními účinky, ale při vysokých hladinách mohou tyto hormony proces stárnutí urychlit. Werner a kol. (2003 cit. z Carimi a kol. 2004) ve svých studiích zaznamenali zpožděnou senescenci při aplikaci cytokininů a tedy očekávali, že dojde k nástupu senescence při snížení jejich hladiny, místo toho listy huseníčku s deficitem cytokininů ukázaly známky spíše zpoždění než zrychlení senescence, což vyhodnotili z měření obsahu chlorofylu. Prezentované výsledky Wenera a kol. (2003 cit. z Carimi a kol. 2004) ukázaly, že roli cytokininů na senescenci nelze kompletně vysvětlit na základě současných znalostí o činnosti těchto hormonů. Tyto hormony jsou ovlivněny také CKX geny, což jsou geny pro cytokinin dehydrogenázu, která cytokininy rozkládá (Werner a kol. 2003 cit. z Carimi a kol. 2004). Současné výsledky ukazují, že vysoké hladiny cytokininů spouštějí programovanou buněčnou smrt v proliferujících buněčných kulturách mrkve obecné a huseníčku rolního (Carimi a kol. 2004). U celých rostlin bylo pozorováno žloutnutí listů a masové snižování kořenové hmoty doprovázené fragmentací DNA. Zdá se tedy, že působení vysokých hladin cytokininů může být interpretováno jako zrychlené stárnutí, a to jak v buněčné suspenzi, tak celých rostlinách (Carimi a kol. 2004).

Jak bylo zjištěno, cytokinin BAP ve vysokých dávkách aplikovaný rostlinám a kultivovaným buněčným suspenzím z huseníčku rolního a mrkve obecné vyvolává programovanou buněčnou smrt prostřednictvím zrychleného stárnutí (Carimi a kol. 2004). Tento jev byl pozorován na ošetřených buněčných kulturách i na listech ošetřených rostlin. Účinek BAP se měnil s fyziologickým stavem buněk. Účinný byl BAP u neorganizovaně rostoucí mrkvové buněčné kultury, avšak u buněk v embryonálních podmínkách se ukázal jako neefektivní. Carimi a kol. (2004) ve své studii cytokininové indukce programované buněčné smrti v buněčných kulturách huseníčku a mrkve použili koncentrace $4 \cdot 10^{-6}$, $1,3 \cdot 10^{-5}$ a $2,7 \cdot 10^{-5}$ M BAP, které přidali do 5 dnů starých buněčných suspenzí. V médiu mrkvových buněk zjistili, že přítomnost $4 \cdot 10^{-6}$ BAP neměla žádný vliv na růst buněk nebo na DNA fragmentaci, ale další dvě koncentrace ($1,3 \cdot 10^{-5}$ a $2,7 \cdot 10^{-5}$ M BAP) snížily růst buněk na 30 % a 18 % oproti kontrole a indukovaly jadernou DNA fragmentaci, a to do 7 a 4 dnů po aplikaci BAP, což je znakem programované buněčné smrti. Přídavek $4 \cdot 10^{-6}$ a $1,3 \cdot 10^{-5}$ M BAP do kultivačního média buněk huseníčku neměl žádný vliv, ale koncentrace $2,7 \cdot 10^{-5}$ M BAP buněčný růst snížila na 39 % oproti kontrole. Účinek BAP závisel také na době působení tohoto hormonu.

BAP však není jediným cytokininem vyvolávajícím programovanou buněčnou smrt, stejný účinek byl také pozorován při použití 6-(γ,γ -dimethylallylamino)purinu pro indukci programované buněčné smrti v buněčných kulturách tabáku (Mlejnek a kol. 2002 cit. z Carimi a kol. 2004) a byl účinný rovněž v buněčných kulturách huseníčku rolního. Zeatin se neprokázal jako účinný.

2.8. Rostlinný mutant *pga22*

Rostliny huseníčku rolního jsou dobrým modelovým systémem při studiu cytokininů. Navzdory mnohaletému výzkumu je naše současné chápání těchto hormonů stále neúplné. Sun a kol. (2003) s využitím funkčního screeningu identifikovali více než 40 údajných mutací u huseníčku, které označili jako aktivátory růstu rostlin (plant growth activators, *pga*).

Jako reprezentativního rostlinného mutantu z tohoto souboru Sun a kol. (2003) vybrali *pga22*. Získaná funkční mutace v lokusu *PGA22* vyústila v typické reakce cytokininů. Molekulární a genetické analýzy ukázaly, že *PGA22* kóduje IPT dříve

identifikovanou jako AtIPT8, která je významná při syntéze cytokininů. Rostlinní *pga22* mutanti nahromadili pozoruhodně vysoké úrovně isopentenyladenosin 5-monofosfátu a isopentenyladenosinu, jak bylo zjištěno při analýze hmotnostní spektrometrií. Tento výsledek naznačuje, že AtIPT8/PGA22 je funkční IPT, která může řídit biosyntézu cytokininů v rostlinách přes isopentenyladenosine-5-monofosfát závislé dráhy. Pomocí funkčního screeningu, který byl zaměřen na disekci cytokininových a auxinových signálních drah, byly identifikovány dvě třídy nových mutantů. Druhá třída mutantů naznačuje ovlivnění klíčových komponent v cytokininové signalizaci (Sun a kol. 2003).

U rostlinného mutantu *pga22* aplikací 17- β -estradiolu dojde k aktivaci genu *AtIPT8* a syntéze cytokininů, které ovlivní růst huseníčku. Sun a kol. (2003) aplikoval 17- β -estradiol na 6 dní staré rostliny *pga22*. Tyto rostliny rostly na agaru s 17- β -estradiolem. Jako optimální se zdál být 17- β -estradiol o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M (Sun a kol. 2003).

3. CÍLE PRÁCE

1. Posouzení vlivu různých koncentrací β -estradiolu na oddělené listy mutantů *pga22* a kontrolních rostlin huseníčku plovoucích na jeho roztoku.
2. Aplikace β -estradiolu sprejem na oddělené listy mutantů *pga22* a kontrolních rostlin huseníčku plovoucích na vodě.
3. Zhodnotit vliv použitých koncentrací β -estradiolu, způsobu aplikace a doby jeho působení na průběh indukované senescence.
4. Z výsledků vybrat nejvhodnější způsob aplikace β -estradiolu pro plánované studium vlivu indukované syntézy cytokininů na umělou senescenci.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Rostlinný materiál

4.1.1. Příprava Knoppova roztoku

Knoppův roztok používaný pro zalévání rostlin byl připraven následujícím způsobem. Nejprve byl desetilitrový kanystr naplněn přibližně do $\frac{3}{4}$ deionizovanou vodou. Potom bylo do kanystru postupně přidáno po 100 ml od každého z pěti zásobních roztoků. Následně bylo přidáno 10 kapek 50% chloridu železitého (FeCl_3) a na závěr byl kanystr doplněn do 10 l a protřepán.

Zásobní roztoky použité pro přípravu Knoppova roztoku:

tetrahydrát dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).....	57,2 g/l vody
síran hořečnatý (MgSO_4).....	14,3 g/l vody
dusičnan draselný (KNO_3).....	14,3 g/l vody
dihydrogen fosforečnan draselný (KH_2PO_4).....	14,3 g/l vody
chlorid draselný (KCl).....	7,1 g/l vody

4.1.2. Příprava 1. výsevu

Před samotným výsevem bylo dne 11. 10. 2012 namočeno do 1 ml destilované vody 30 semen mutanta rostliny huseníčku rolního *pga22* a 35 semen kontrolních rostlin. Takto připravená semena byla po čtyři dny ponechána v ledničce při 4 °C.

Po 4 dnech byla do 36 květináčů napěchována hlína Seedlingsubstrát, ta byla postříkána vodou a do podložního tácu byl nalit Knoppův roztok. Následně byla pomocí pipety vysázena semena vždy po dvou do jednoho květináče. Takto vysázená semena byla na první týden růstu přikryta víkem, poté bylo víko sundáno a rostliny byly zalévány Knoppovým roztokem. Ve fytokomoře byly rostliny ponechány 5 týdnů (obr. 1).

4.1.3. Příprava 2. výsevu

Celý experiment byl opakován pro získání většího počtu vzorků a pro vyzkoušení dalšího způsobu aplikace. Dne 25. 10. 2012 bylo před výsevem namočeno do 1 ml destilované vody 36 semen mutanta *pga22* a 50 semen kontrolních rostlin. Takto připravená semena byla po čtyři dny ponechána v ledničce při 4 °C. Poté byl proveden výsev těchto semen, který proběhl stejným způsobem jako při prvním výsevu.

4.1.4. Podmínky pěstování

Fytotron: FytoScope FS 360, firma PSI, Brno

Režim: krátký den (8h světlo, 16h tma)

Teplota: (21°C den, 19 °C noc)

Zdroj světla: bílé LED, infračervené LED

Intenzita světla: 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



*Obr. 1: Výsadba rostlin huseníčku rolního. Vlevo je zachycena fotografie kontrolních rostlin, vpravo jsou pak vidět rostlinní mutanti *pga22*.*

Tab. 1: Roztoky použité v prvním experimentu.

<i>Označení</i>	<i>Roztok</i>
<i>pga22</i>	
voda	deionizovaná voda
$5 \cdot 10^{-9}$ M	5 nM β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
$5 \cdot 10^{-8}$ M	50 nM β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
$5 \cdot 10^{-7}$ M	500 nM β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
$5 \cdot 10^{-6}$ M	5 μ M β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
kontrolní rostliny	
voda	deionizovaná voda
$5 \cdot 10^{-6}$ M	5 μ M β -estradiol v 0,1% Tweenu 20

Tab. 2: Roztoky a jejich aplikace použité v druhém experimentu.

<i>Označení</i>	<i>Roztok</i>
<i>pga22</i>	
voda	deionizovaná voda
0 M	0,1% Tween 20
$5 \cdot 10^{-9}$ M	5 nM β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
$2 \cdot 10^{-7}$ M	200 nM β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
$5 \cdot 10^{-6}$ M	5 μ M β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
spr. 0 M	sprej roztokem 0,1% Tweenu 20
spr. $5 \cdot 10^{-6}$ M	sprej 5 μ M β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20
kontrolní rostliny	
voda	deionizovaná voda
0 M	0,1% Tween 20
$5 \cdot 10^{-6}$ M	5 μ M β -estradiol v 0,1% Tweenu 20
spr. 0 M	sprej roztokem 0,1% Tweenu 20
spr. $5 \cdot 10^{-6}$ M	sprej 5 μ M β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20

Makrotitrační destičky byly uloženy do misky a do igelitového sáčku a následně dány do fytokomory, kde byly ponechány stejné podmínky jako při růstu rostlin. Měření takto oddělených listů bylo provedeno po 3, 6, 8 a 10 dnech po

oddělení listů (DPO). Měření druhého experimentu bylo provedeno po 2, 4, 6 a 8 DPO.

4.3. Použité metody

Kontrolní rostliny i rostliny mutantů *pga22* byly na 30 minut zatemněny a poté byl změřen velmi rychlý fluorescenční indukční jev pomocí fluorimetru PEA (Plant Efficiency Analyser) firmy Hansatech (King's Lynn, Anglie) (obr. 3). Světlo bylo nastaveno na 60 % a doba měření na 1 s. Z naměřených křivek byl vyhodnocen maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (Fv/Fp). Obsah chlorofylu byl měřen pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko) (obr. 4).

Oba druhy měření byly provedeny na svrchní straně intaktních listů rostlin a od každé varianty bylo změřeno 10 listů. Posléze byly listy odděleny a položeny do příslušných roztoků (tab. 1 a 2). Měření na oddělených listech probíhalo obdobným způsobem. Před samotným měřením Fv/Fp fluorimetrem PEA byly listy vždy na 30 minut zatemněny. Poté byly pomocí pinzety vytaženy z příslušného roztoku, osušeny a následně změřeny. Posléze byly vráceny do příslušného roztoku a odneseny zpět do fytokomory, kde byly ponechány do dalšího měření.

Měření obsahu chlorofylu chlorofylmetrem SPAD-502 probíhalo podobným způsobem. Měření se provádělo na každém listu na 3 různých místech, pro získání přesnějšího výsledku. Z těchto tří hodnot byl stanoven průměr pro daný list.

K vyhodnocení výsledků měření fluorimetrem PEA byl použit program Biolyzer3a od firmy Hansatech a výsledky zpracovány pomocí Excelu. Protože hodnoty Fv/Fp nevykazují symetrické rozdělení, uvedeny jsou mediány a kvartily (Lazár a Nauš 1998). Statistická analýza měření obsahu chlorofylu i Fv/Fp byla vypracována pomocí programu Origin 8.5.1. K vyhodnocení statistické významnosti rozdílů byly použity Bonferroniho a Turkeyho testy s hladinou významnosti $\alpha=0,05$.



Obr. 3: Fluorimetr PEA (Plant Efficiency Analyser) firmy Hansatech (King's Lynn, Anglie).

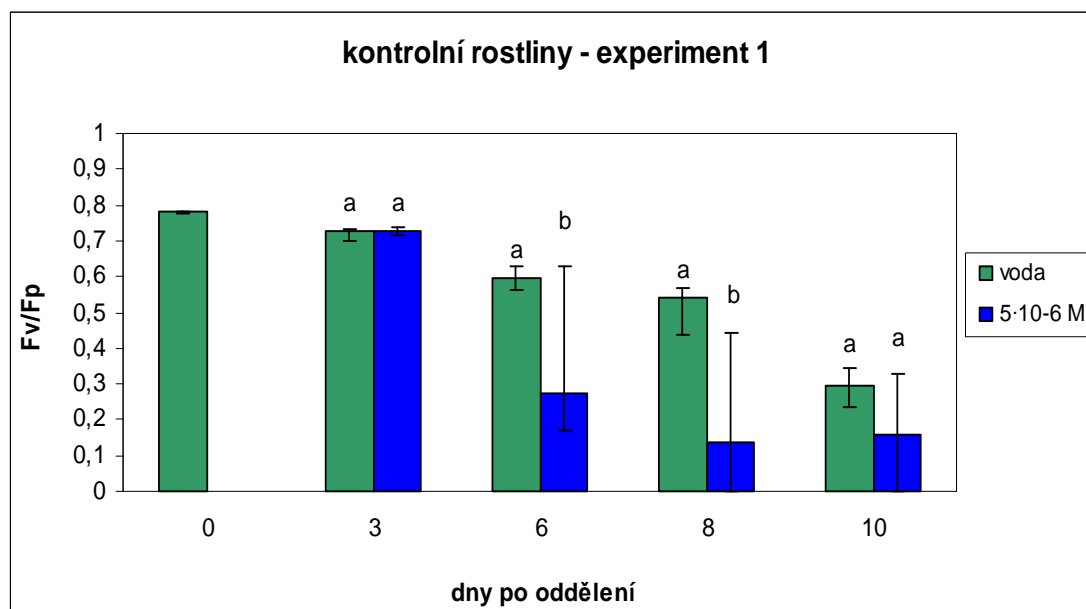


Obr. 4: Chlorofylmetr SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Japonsko).

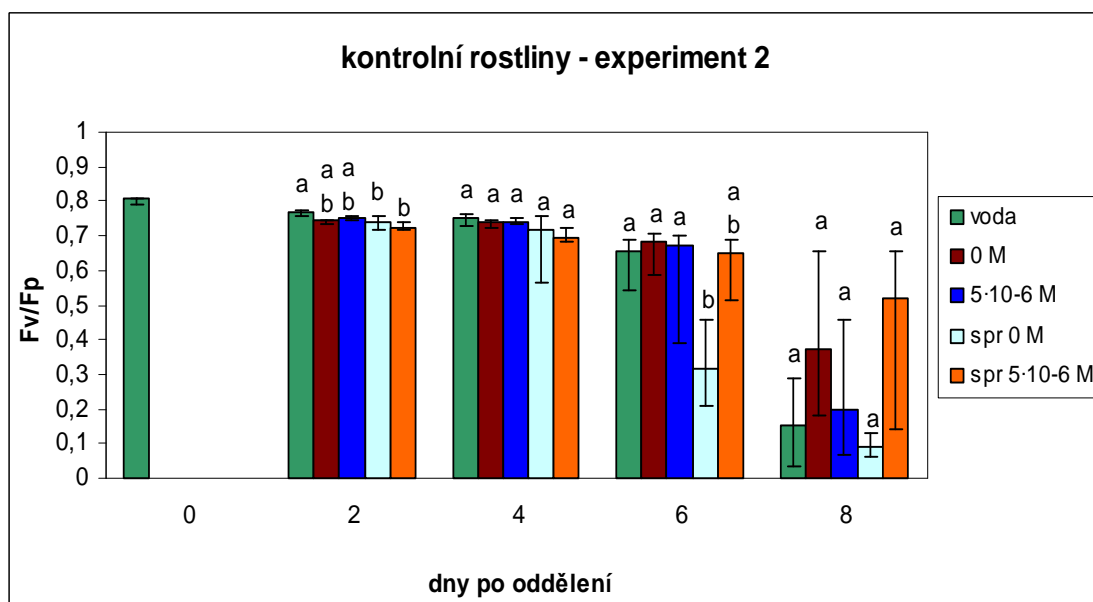
5. VÝSLEDKY

5.1. Vliv aplikace 17- β -estradiolu na Fv/Fp v listech huseníčku rolního

U listů kontrolních rostlin položených na vodě byl zaznamenán pokles Fv/Fp s průběhem senescence (graf 1, 2). Jelikož kontrolní rostliny v prvním experimentu obtížně rostly a byl získán menší počet listů, byl 17- β -estradiol aplikován pouze v koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M v 0,1% Tweenu 20, přičemž tato koncentrace vyvolala ve srovnání s listy ve vodě statisticky významně rychlejší pokles Fv/Fp v průběhu senescence (graf 1, 6. a 8. DPO). Při zopakování stejné aplikace v druhém experimentu urychlení poklesu nebylo významné, ale statisticky významně rychlejší pokles byl naměřen při aplikaci stejné koncentrace 17- β -estradiolu ve spreji (graf 2, 2. DPO). Tento negativní účinek pravděpodobně nebyl způsoben samotným 17- β -estradiolem, ale 0,1% Tweenem 20, který byl použit pro zlepšení pronikání 17- β -estradiolu do listů. Což bylo potvrzeno v druhém experimentu (graf 2, 2. a 6. DPO).



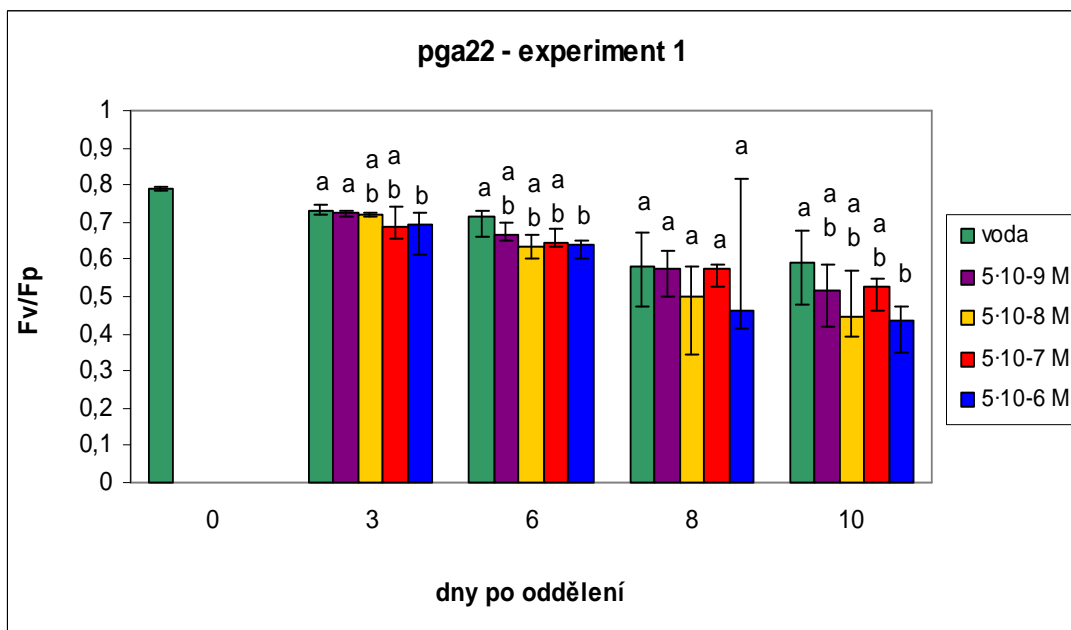
Graf 1: Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (Fv/Fp) oddělených listů kontrolních rostlin, plovoucích na vodě nebo na $5 \cdot 10^{-6}$ M roztoku 17- β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20. Uvedeny jsou mediány a kvartily, $n = 8 - 10$.



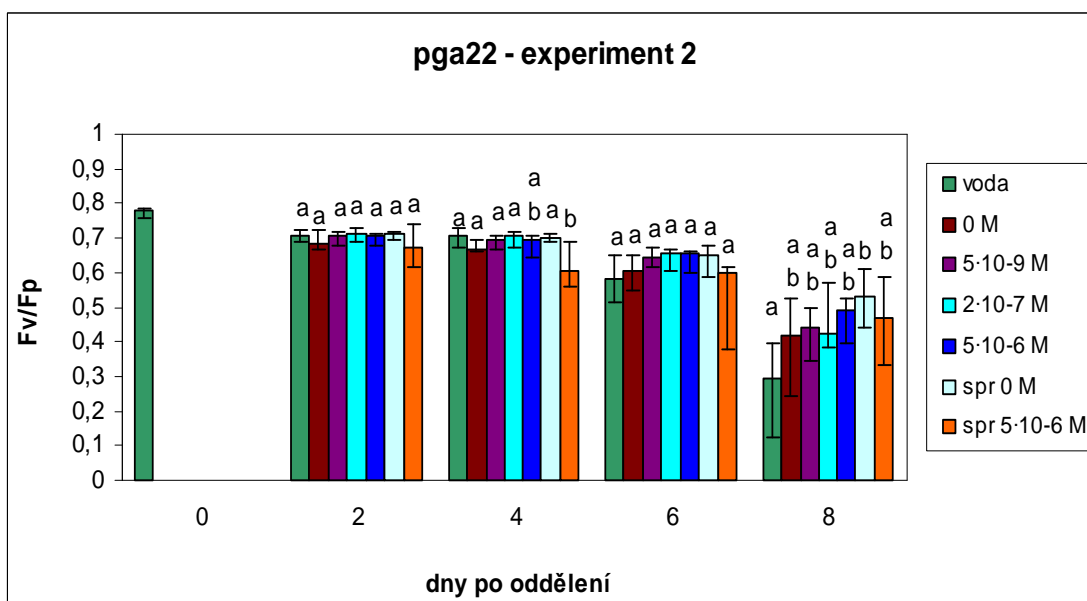
Graf 2: Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (Fv/Fp) oddělených listů kontrolních rostlin, plovoucích na vodě, 0,1% Tweenu 20 nebo na 5·10⁻⁶ M roztoku 17-β-estradiolu v 0,1% Tweenu 20, anebo postříkaných spreji 0 M či 5·10⁻⁶ M 17-β-estradiolu v 0,1% Tweenu 20 a následně plovoucích na vodě. Uvedeny jsou mediány a kvartily, n = 10.

U listů *pga22* v prvním experimentu jediný statisticky významně rychlejší pokles Fv/Fp ve srovnání s listy ve vodě vyvolala nejvyšší použitá koncentrace 5·10⁻⁶ M 17-β-estradiolu v 0,1% Tweenu 20 (graf 3). A to nejen oproti listům ve vodě, ale i oproti listům v 5·10⁻⁹ M 17-β-estradiolu v 0,1% Tweenu 20 (graf 3, 3. DPO). U listů *pga22* tedy neměl negativní účinek pouze 0,1% Tween 20, ale významné urychlení senescence bylo zaznamenáno i působením samotného 17-β-estradiolu.

V druhém experimentu u listů nastříkaných 5·10⁻⁶ M 17-β-estradiolem v 0,1% Tweenu 20 byl zjištěn statisticky významně rychlejší pokles Fv/Fp oproti listům ve vodě (graf 4, 4. DPO). A opět i proti listům plovoucích na 0,1% Tweenu 20 nebo sprejovaných samotným 0,1% Tweenem 20. Překvapivě byl zaznamenán pomalejší pokles Fv/Fp u listů postříkaných 0,1% Tweenem 20 oproti listům ve vodě (graf 4, 8. DPO). U kontrolních rostlin v 6. DPO měl sprej s tímto roztokem opačný účinek (graf 2).



Graf 3: Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_p) oddělených listů mutanta *pga22*, plovoucích na vodě nebo na $5 \cdot 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-7}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ M roztocích 17- β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20. Uvedeny jsou mediány a kvartily, $n = 10$.

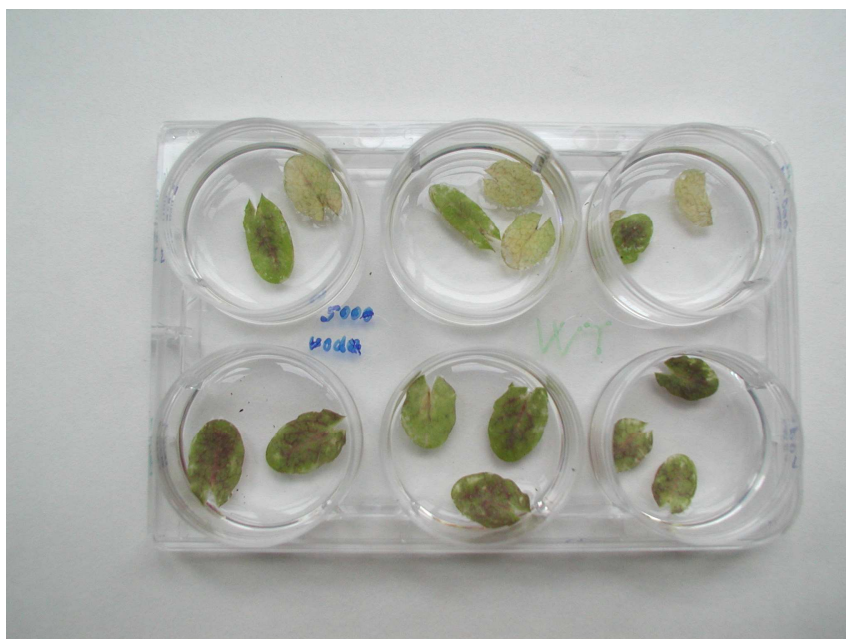


Graf 4: Maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (F_v/F_p) oddělených listů mutanta *pga22* plovoucích na vodě, 0,1% Tweenu 20 nebo na $5 \cdot 10^{-9}$, $2 \cdot 10^{-7}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ M roztocích 17- β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20, anebo postříkaných spreji 0 M či $5 \cdot 10^{-6}$ M 17- β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20 a následně plovoucích na vodě. Uvedeny jsou mediány a kvartily, $n = 10$.

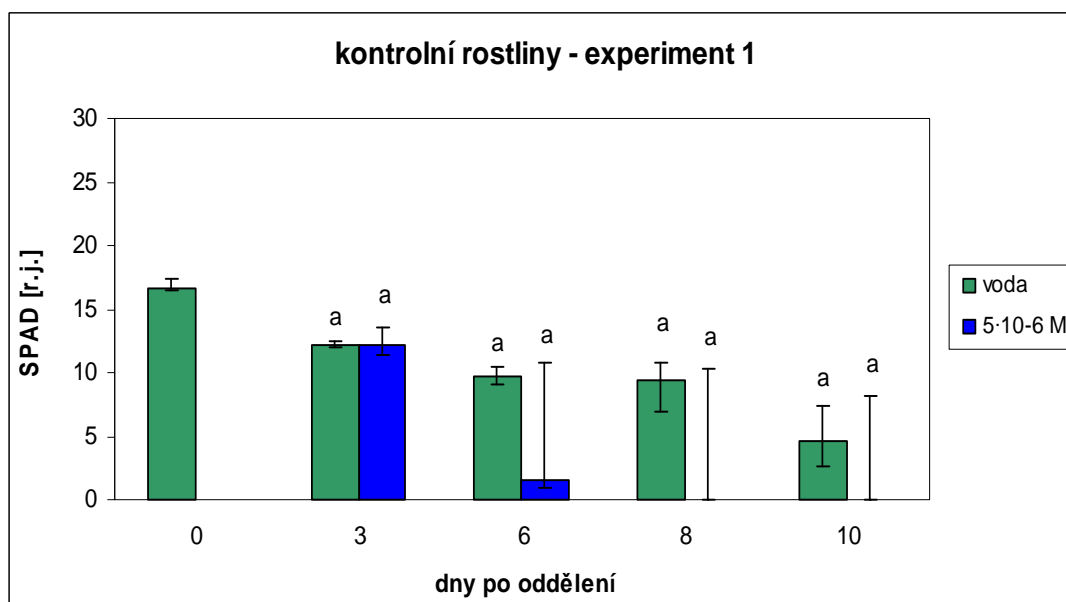
5.2. Vliv aplikace 17- β -estradiolu na obsah chlorofylu v listech huseníčku rolního

Pokles obsahu chlorofylu v průběhu senescence byl zaznamenán v prvním experimentu a rovněž také u druhého experimentu a to u listů oddělených z kontrolních rostlin i z mutantů *pga22* (graf 5-8). V prvním experimentu koncentrace $5 \cdot 10^{-6}$ M v 0,1% Tweenu 20 vyvolala u listů kontrolních rostlin zrychlení poklesu obsahu chlorofylu (obr. 5, graf 5).

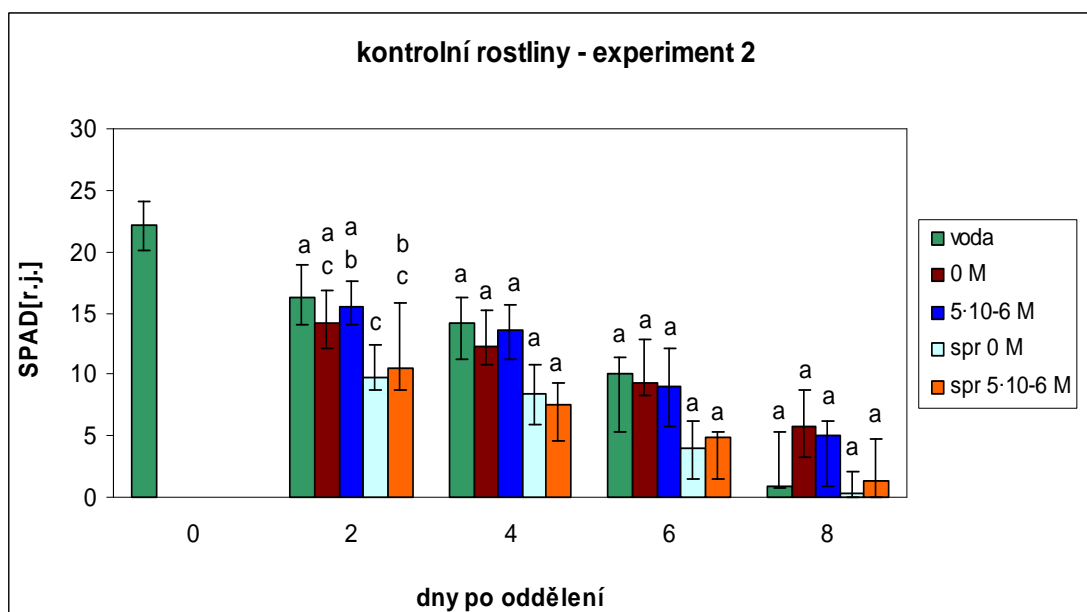
Stejná koncentrace byla v druhém experimentu aplikovaná sprejem a vyvolala statisticky významně rychlejší pokles obsahu chlorofylu ve srovnání s listy ve vodě (graf 6, 2. DPO). I zde se ovšem, podobně jako u Fv/Fp, potvrdilo, že se pravděpodobně nejednalo o negativní účinek 17- β -estradiolu, ale 0,1% Tweenu 20, jehož sprej měl na listy kontrolních rostlin prokazatelně negativní účinek ve smyslu urychlení senescence při srovnání s listy ve vodě (graf 6, 2. DPO).



Obr. 5: Listy kontrolních rostlin ve vodě (dolní řada) a 17- β -estradiolu v koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M v 0,1% Tweenu 20 (horní řada) v 6. den po oddělení listů.



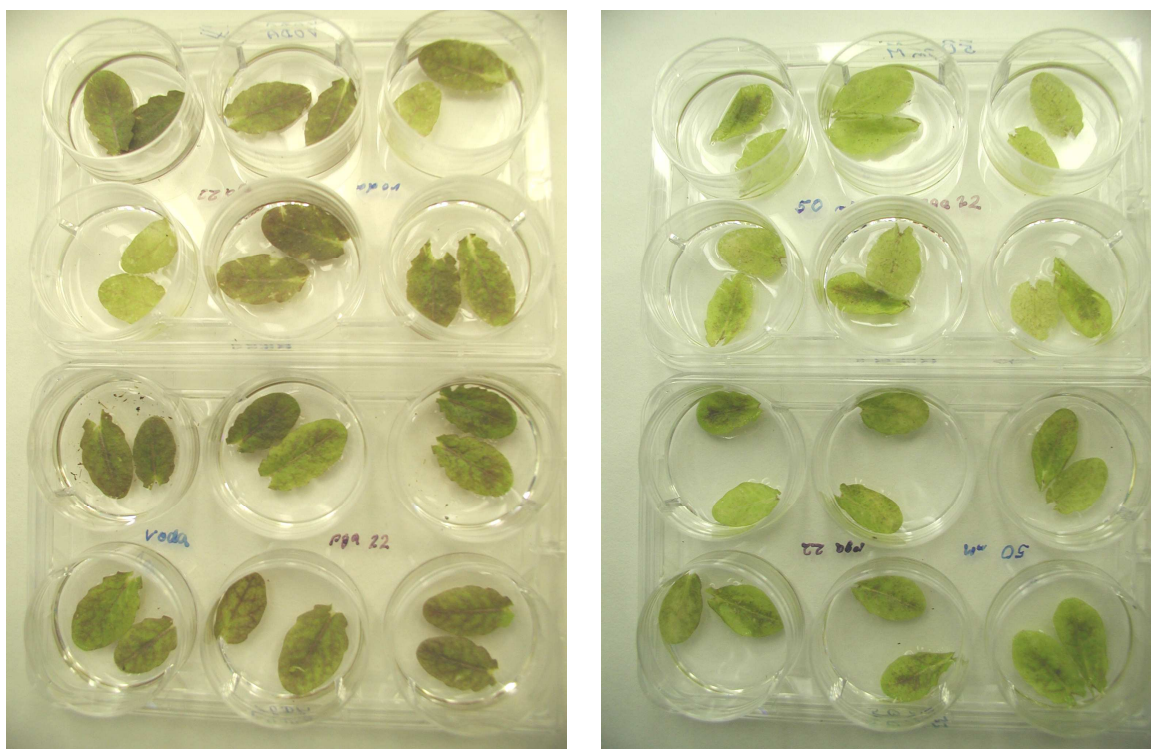
Graf 5: Obsah chlorofylu oddělených listů kontrolních rostlin, plovoucích na vodě nebo na $5 \cdot 10^{-6} M$ roztoku $17\text{-}\beta\text{-estradiolu}$ v $0,1\%$ Tweenu 20. Uvedeny jsou mediány a kvartily, $n = 8 - 10$.



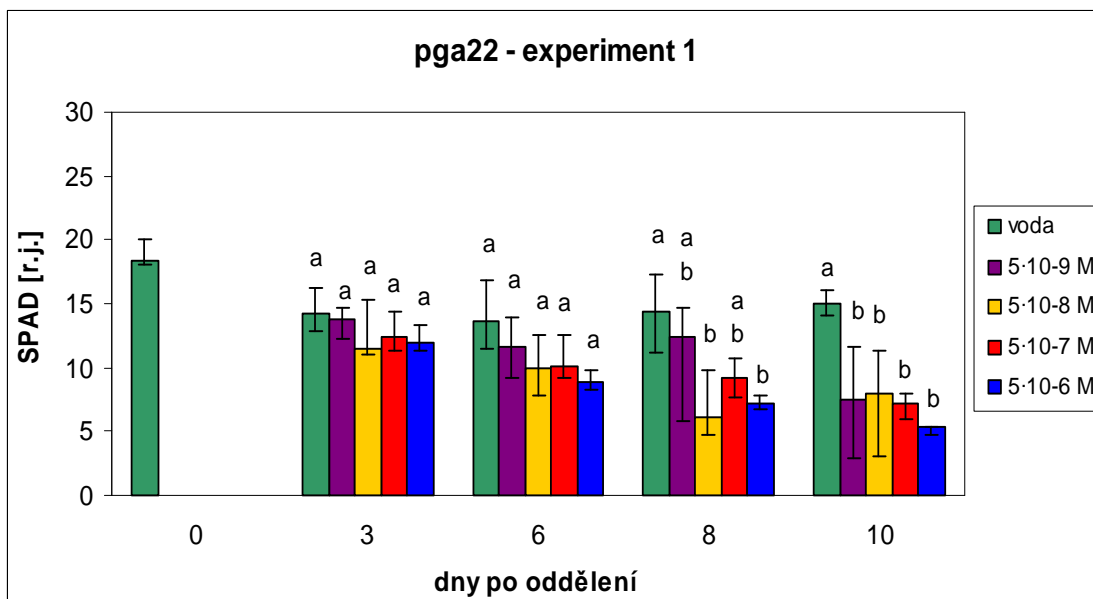
Graf 6: Obsah chlorofylu oddělených listů kontrolních rostlin, plovoucích na vodě, $0,1\%$ Tweenu 20 nebo na $5 \cdot 10^{-6} M$ roztoku $17\text{-}\beta\text{-estradiolu}$ v $0,1\%$ Tweenu 20, anebo postříkaných spreji $0 M$ či $5 \cdot 10^{-6} M$ $17\text{-}\beta\text{-estradiolu}$ v $0,1\%$ Tweenu 20 a následně plovoucích na vodě. Uvedeny jsou mediány a kvartily, $n = 10$.

U listů *pga22* vyvolala přítomnost 17- β -estradiolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-8}$ M v 0,1% Tweenu 20 ve srovnání s listy ve vodě statisticky významně rychlejší pokles obsahu chlorofylu v průběhu senescence (graf 7, 8. a 10. DPO, obr 6). Všechny použité koncentrace 17- β -estradiolu v prvním experimentu měly prokazatelně negativní účinek na obsah chlorofylu (graf 7, 10. DPO).

Ve výsledcích měření obsahu chlorofylu v druhém experimentu bylo zjištěno, že přítomnost 17- β -estradiolu o koncentraci $2 \cdot 10^{-7}$ M v 0,1% Tweenu 20 vyvolala ve srovnání s listy položenými ve vodě statisticky významné zpomalení poklesu obsahu chlorofylu v průběhu senescence (graf 8, 8. DPO).

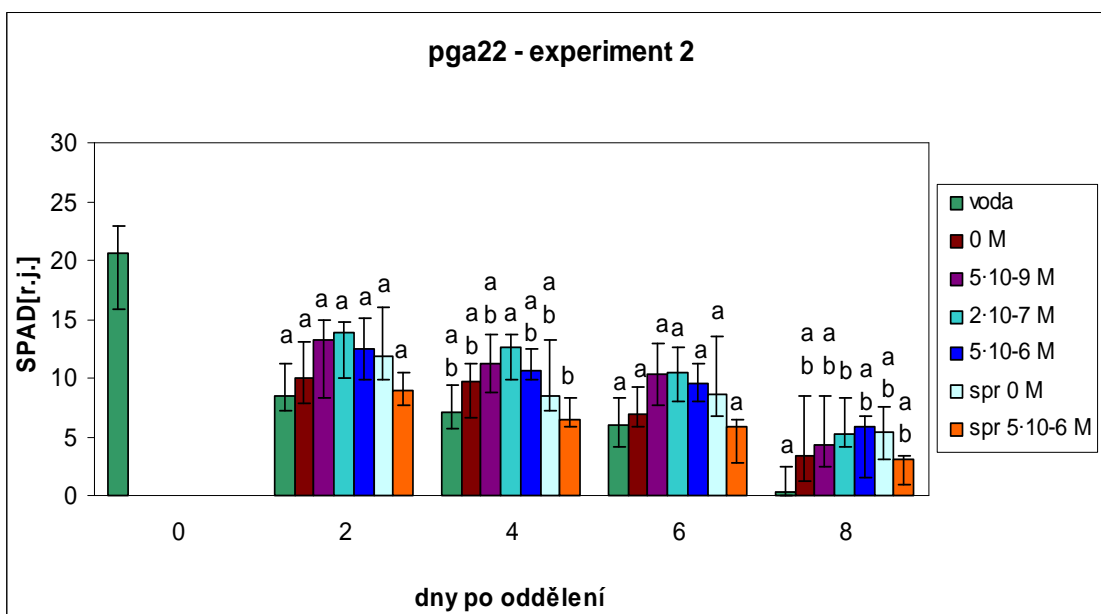


Obr. 6: Listy oddělené z mutantů *pga22* v prvním experimentu. Vlevo plovoucí na vodě, vpravo na 17- β -estradiolu v koncentraci $5 \cdot 10^{-8}$ M v 0,1% Tweenu 20 v 8. den po oddělení listů.



Graf 7: Obsah chlorofylu oddělených listů mutanta *pga22*, plovoucích na vodě nebo na $5 \cdot 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-7}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ M roztocích 17- β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20.

Uvedeny jsou mediány a kvartily, $n = 10$.



Graf 8: Obsah chlorofylu oddělených listů mutanta *pga22*, plovoucích na vodě, 0,1% Tweenu 20 nebo na $5 \cdot 10^{-9}$, $2 \cdot 10^{-7}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ M roztocích 17- β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20, anebo postříkaných spreji 0 M či $5 \cdot 10^{-6}$ M 17- β -estradiolu v 0,1% Tweenu 20 a následně plovoucích na vodě. Uvedeny jsou mediány a kvartily, $n = 10$.

6. DISKUSE

Jak je známo, cytokinininy jsou rostlinné hormony a zpomalují průběh senescence (Zacarias a Reid 1990, Rulcová a Pospíšilová 2001, Wu a kol. 2012), avšak otázkou zůstává mechanismus jejich působení. Pro studium vlivu cytokininů na senescenci lze s výhodou využít mutantů s indukovatelným zvýšením hladiny endogenních cytokininů, jakými jsou mutanti *pga22* (Sun a kol. 2003). S mutanty *pga22* pracovali i Sun a kol. (2003), kteří ve svých experimentech aktivovali gen pro *AtIPT8* 17- β -estradiolem, čímž indukovali syntézu cytokininů. Své experimenty prováděli na intaktních rostlinách, které rostly na agaru s 17- β -estradiolem o různých koncentracích, z nichž jako optimální určili $5 \cdot 10^{-6}$ M (Sun a kol. 2003). Na oddělení biofyziky se zabýváme studiem senescence navozené umělým oddělením listů a vlivem cytokininů na průběh této senescence. Pro tyto účely je potřeba indukovat *AtIPT8 pga22* mutantů u oddělených listů. Cílem této práce bylo tedy najít nejvhodnější způsob aplikace 17- β -estradiolu na oddělené listy. Účinek 17- β -estradiolu na průběh umělé senescence byl vyhodnocován z měření obsahu chlorofylu a Fv/Fp. O těchto parametrech je známo, že během senescence klesají (Zacarias a Reid 1990, Pospíšilová a kol. 2001, Carimi a kol. 2003, Wu a kol. 2012) a že exogenní aplikace (Pospíšilová a kol. 2001, Wu a kol. 2012) i endogenní zvýšení hladiny CK (Belintani a kol. 2012) vede ke zpomalení průběhu senescence. V naší práci jsme 17- β -estradiol aplikovali sprejem na listy intaktních rostlin a ty jsme po oddělení položili na vodu nebo jsme oddělené listy položily rovnou do roztoků 17- β -estradiolu. Pro lepší pronikání 17- β -estradiolu do listů jsme, podobně jako Sun a kol. (2003), použili 0,1% Tween 20. Naše výsledky ukázaly, že na kontrolní rostliny měl 0,1% Tween 20 negativní účinek, což se projevilo zrychlením poklesu obsahu chlorofylu i Fv/Fp. U kontrolních rostlin 17- β -estradiol změny sledovaných parametrů nijak neovlivnil a to oproti listům v 0,1% Tweenu 20. U listů mutantů *pga22* nebyl pozorován negativní účinek samotného 0,1% Tweenu 20, ale v prvním experimentu bylo pozorováno urychlení senescence po aplikaci 17- β -estradiolu, a to jak u poklesu obsahu chlorofylů (graf 7), tak Fv/Fp (graf 3). Přičemž, rychlejší pokles byl zaznamenán při aplikaci vyšších koncentrací. Protože je známo, že aplikace vysokých koncentrací cytokininů může vést k urychlení senescence (Zacarias a Reid 1990, Carimi a kol. 2003), je možné, že urychlená senescence byla

způsobena nadměrným zvýšením endogenního obsahu cytokininů v listech *pga22* už při aplikaci nejnižší použité koncentrace 17- β -estradiolu. Avšak druhým experimentem byla tato hypotéza vyvrácena, jelikož nebylo pozorováno urychlení senescence. Zjištěn byl pomalejší pokles obsahu chlorofylu u listů v $2 \cdot 10^{-7}$ M 17- β -estradiolu oproti listům ve vodě. Zpomalení senescence bylo rovněž pozorováno u listů v 0,1% Tweenu 20.

Na fotografiích bylo vidět výraznější zřívání listů na vodě, způsobené antokyany, jež pravděpodobně zkreslily změřené hodnoty obsahu chlorofylu získané přístrojem SPAD, a proto by bylo dobré v budoucnu použít k měření obsahu chlorofylu jinou metodu, tak aby byl vyloučen vliv antokyanů. Jelikož byl zjištěn také negativní účinek 0,1% Tweenu 20 bylo by vhodné použít pro další experimenty jinou látku např. Silvet. Jelikož naše výsledky vlivu 17- β -estradiolu přímo na oddělené listy byly nejednoznačné, navrhujeme v budoucnu vytvořit experiment, v němž by byla v intaktních rostlinách indukována syntéza cytokininů sprejem 17- β -estradiolu a po dvou dnech by byly odděleny listy se zvýšeným obsahem cytokininů a sledovány změny v senescenci. Tato práce by mohla být také podkladem pro zjišťování vlivu různých intenzit světla na oddělené listy se změněnými obsahy cytokininů.

7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo najít nejvhodnější způsob aplikace 17- β -estradiolu pro plánované studium vlivu indukované syntézy cytokininů na umělou senescenci. Pro experimentální práci byli použiti mutanti rostlin huseníčku rolního, označovaní jako *pga22* u nichž po aplikaci 17- β -estradiolu dochází k indukci syntézy cytokininů. Byly provedeny dva experimenty, v nichž byl posouzen vliv 17- β -estradiolu na senescenci indukovanou oddělením listů. Pro vyhodnocení účinku 17- β -estradiolu na indukci syntézy cytokininů v oddělených listech byl měřen obsah chlorofylu a fotosyntetický parametr Fv/Fp. Jak je z literatury známo, pokles těchto parametrů během senescence je do značné míry ovlivněn hladinou cytokininů. Výsledky ukázaly pokles obsahu chlorofylu i Fv/Fp s průběhem senescence a to u kontrolních rostlin i *pga22*. V prvním experimentu 17- β -estradiol o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M v 0,1% Tweenu 20 urychlil senescenci listů z kontrolních rostlin, což se projevilo snížením obsahu chlorofylu i Fv/Fp. Obdobný účinek měla stejná koncentrace aplikovaná v druhém experimentu sprejem. Lze tedy říct, že zrychlená senescence listů kontrolních rostlin byla způsobena 0,1% Tweenem 20 a ne 17- β -estradiolem. U listů *pga22* byl v prvním experimentu zjištěn statisticky významně rychlejší pokles obsahu chlorofylu i Fv/Fp ve srovnání s listy ve vodě při použití 17- β -estradiolu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M v 0,1% Tweenu 20. Na základě fotografií jsme usoudili, že v listech položených na vodě bylo pravděpodobně zvýšené množství antokyanů, které pravděpodobně zkreslilo měření obsahu chlorofylu v těchto listech a ty pak nemohly být objektivní kontrolou k posouzení obsahu chlorofylu v listech se 17- β -estradiolem. Navzdory očekávání byl v druhém experimentu u listů *pga22* zjištěn nárůst obsahu chlorofylu v listech se 17- β -estradiolem o koncentraci $2 \cdot 10^{-7}$ M v 0,1% Tweenu 20 ve srovnání s listy položenými ve vodě. Použité způsoby aplikace pravděpodobně nevedly k indukci syntézy cytokininů v takovém množství, aby došlo k zpomalení senescence, anebo aby překonalo negativní účinek 0,1% Tweenu 20. Jelikož zvolená metoda SPAD pravděpodobně zkreslila obsah chlorofylu množstvím antokyanů, jak je vidět na fotografiích, navrhuje využití ke stanovení obsahu chlorofylu v listech jinou metodu např. extrakci pigmentu pomocí acetonu s následným spektrofotometrickým stanovením.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Belintani N. G., Guerzoni J. T. S., Moreira R. M. P., Vieira L. G. E. (2012) Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the *ipt* gene under a cold inducible promoter. *Biologia plantarum* 56 (1): 71-77

Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F. (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421

Carimi F., Terzi M., De Michele R., Zottini M., Lo Schiavo F. (2004) High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Science* 166: 963-96

Gan A., Amasino R. M. (1995) Inhibitor of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* (270): 5244

Hess D. (1983) *Fyziologie rostlin*, pp. 223-225, Academia, Praha.

Lazár D., Nauš J. (1998) Statistical properties of chlorophyll fluorescence induction parameters. *Photosynthetica* 35: 121-127

Luštinec J., Žárský V. (2005) *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*, pp. 179, 195-196, Karolinum, Praha.

Mlejnek P., Procházka S. (2002) Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215, 158-166.

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 abscisic acid, cytokinin and brassinosteroid in detached tomato leaves. *Plant Growth Regul* 60: 175-182

Pastýrik L. (1979) Fyziológia rastlín, pp. 159, 271, Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava.

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

Pospíšilová J., Rulcová J., Vomáčka J. (2001) Effect of benzyladenine and hydroxybenzyladenosine on gas exchange of bean and sugar beet leaves. Biologia plantarum 44 (4): 523-528

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998) Fyziologie rostlin, pp. 253-258, 394-396, 450-451, Academia, Praha.

Rulcová J., Pospíšilová J. (2001) Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. Biologia Plantarum 44 (1): 75-81

Stirbet A., Govindjee, Strasser B. J., Strasser R. J. (1998) Chlorophyll *a* fluorescence induction in Higher plants: Modelling and numerical simulation. J. theor. Biol 193. 131-151

Strasser R. J., Srivastava a., Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. Photochemistry and Photobiology (61): 32-42

Sun J., Niu Q. W., Tarkowski P., Zheng B., Tarkowska D., Sandberg G., Chua N. H., Zuo J. (2003) The *Arabidopsis* AtIPT8/PGA22 Gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. Plant Physiology 131: 167-176

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schilling T. (2003) Cytokinin- deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity, Plant Cell 15, 2532-2550.

Wu X., Zhu Z., Li X., Zha D. (2012) Effects of cytokinin on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence parameters and antioxydative systém in seedlings of eggplant (*Solanum melongena* L.) under salinity stress. Acta Physiol Plant 34 (6): 2105 - 2114

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