

Cvičení z fyziologie rostlin

Senescence

Teoretický úvod

Senescence je vysoce řízeným vývojovým procesem programované degradace vedoucí ke smrti, který je iniciován různými vnitřními (např. fytohormony, stáří, fyziologický stav) a vnějšími (např. světlo, teplota, patogenez, dostupnost vody) faktory. Během tohoto procesu zůstávají buňky životaschopné a dochází k expresi specifických genů. Při senescenci dochází k zastavení fotosyntézy, rozpadu chloroplastů a proteinů společně s poklesem obsahu chlorofylu a aminokyselin. Viditelným projevem senescence a jedním z jejích indikátorů je pak změna barvy listu, zpravidla žloutnutí, vyvolaná degradací chlorofylu. Chlorofyl však není jediným rostlinným pigmentem, k jehož degradaci v průběhu přirozené i indukované senescence dochází. Degradovány jsou rovněž karotenoidy – karoteny a xantofyly, v případě chlorofylu ale probíhá rozklad zpravidla ve větší míře, což má za následek žluté zbarvení senescentních listů.

Cytokininy jsou velice důležitou skupinou rostlinných hormonů. Ovlivňují celou řadu vývojových a fyziologických procesů jako je buněčné dělení, vznik a regenerace orgánů, apikální dominance, de-etiolizace, metabolismus živin, obrana vůči patogenům a listová senescence. V průběhu senescence dochází ke snížení obsahu cytokininů v rostlinách. Exogenní aplikací či zvýšením jejich endogenní hladiny je možné senescenci oddálit. Ke stanovení biologické aktivity cytokininů jsou používány tři standardní biotesty – amaranthový, kalusový a senescenční. V těchto biotestech je hodnocena aktivita látky v daném fyziologickém procesu.

Senescenční biotest je založen na schopnosti cytokininů oddalovat degradaci chlorofylu (typický znak senescence). Je prováděn na listech rostlin pšenice (*Triticum aestivum* L.) starých sedm dní, kdy jsou jejich první listy již plně vyvinuté a druhé listy začínají růst. Špičky prvních listů jsou odděleny a bazální stranou ponořeny do roztoku testovaného cytokininu. Segmenty jsou takto inkubovány ve tmě (standardně po dobu 96 h), poté jsou z nich extrahovány pigmenty a jejich obsah je spektrofotometricky stanoven.

Extrakt fotosyntetických pigmentů ze zelených částí vyšších rostlin obsahuje zejména chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a směs karotenoidů (β -karoten a xantofyly). Pro zjištění obsahu chlorofylu *a* a *b* v acetonovém extraktu se používá měření absorbance ve vybraných vlnových délkách. K následnému výpočtu obsahu pigmentů z naměřených hodnot absorbance jsou využívány např. Lichtenthalerovy rovnice. Obsah pigmentů v listech je možné uvádět v jednotkách množství (mol) nebo hmotnosti (kg, g, mg) vztažených na jednotku plochy listu, jednotku čerstvé hmotnosti nebo sušiny, případně i na jinou vztažnou veličinu (např. celkový obsah proteinů, objem listu, atd.).

Praktická část: Senescenční biotest

Rostlinný materiál: sedmidenní rostliny pšenice (*Triticum aestivum* L.) pěstované za definovaných podmínek

Pomůcky: třecí miska s tloučkem, skalpel, nůžky, pipety, špičky, spektrofotometr, mikrozkušavky, kyvety, pravítko, milimetrový papír, centrifuga, folie, lihový fix, špachtle

Chemikálie: MgCO₃, 80% aceton, roztoky cytokininů o různých koncentracích

Postup:

Úkol č. 1: Založení senescenčního biotestu

1. Naředit zásobní roztok cytokininu na požadované koncentrace (1 μM, 10 μM, 100 μM)
2. Do jamek mikrotitrační desky napipetovat 200 μl roztoků cytokininů nebo DMSO.
3. Z listů pšenice oddělit segment o délce 5 cm od špičky listu, segmenty obkreslit na folii a umístit je řezem do příslušného roztoku.
4. Desku opatrně umístit do tmy.
5. Oddělit kontrolní listy, obkreslit je a připravit z nich acetonový extrakt (postup viz úkol č. 2).
6. Provést spektrofotometrické stanovení obsahu pigmentů kontrolních listů ke zjištění počátečního obsahu pigmentů v listech.

Úkol č. 2: Vyhodnocení biotestu a extrakce pigmentů (7 dní po založení testu)

1. Vizuálně zhodnotit senescenční biotest.
2. Segmenty obkreslit na folii.
3. Ze segmentů připravit acetonový extrakt:
 - segment rozstříhat do třecí misky, přidat špetku MgCO₃ a důkladně rozetřít tloučkem
 - přidat 1 ml 80% acetonu a opět homogenizovat, poté obsah misky slít do popsané mikrozkušavky
 - misku vypláchnout 1 ml 80% acetonu a obsah znovu slít do mikrozkušavky
 - centrifugovat po dobu cca 5 min., max rpm, t=4°C
 - po centrifugaci slít supernatant a na spektrofotometru změřit jeho absorbanci při vlnových délkách 646,8 a 663,2 nm v jednocentimetrové kyvetě
 - supernatant případně zředit tak, aby absorbance při vlnové délce 663,2 nm byla v rozmezí 0,4 – 0,8
 - zapsat si přesný objem supernatantu!!! (po zředění)
4. Z naměřených hodnot absorbancí (A) v příslušné vlnové délce vypočítat podle následujících rovnic obsah chlorofylů *a* a *b* v extraktu:

$$\text{Chl } (a+b) = 7,15 (A_{663,2} - A_{750}) + 18,71 (A_{646,8} - A_{750}) \quad [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

získanou hodnotu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] vynásobit celkovým objemem extraktu [ml] a podělit hodnotou listové plochy [cm^2] – výsledek je hodnotou obsahu chlorofylu/karotenoidů na plochu v jednotlivých listových segmentech [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$].