

---

Maja Maličević

## Uticaj različitih citokinina na retenciju hlorofila kod mahovina *Conocephalum conicum* (L.) Underw i *Plagiomnium undulatum* (Hedw.)

---

Citokinini predstavljaju grupu biljnih hormona koji utiču na brojne procese u biljkama, a između ostalog i na starenje listova. U ovom radu je ispitavan uticaj dve supstance sa citokniškom aktivnošću, BAP i TDZ, i jednog sintetičkog citokinina (kinetin) na retenciju hlorofila kod mahovina *Conocephalum conicum* (L.) Underw i *Plagiomnium undulatum* (Hedw.). Cilj je bio da se ispita da li ove supstance imaju efekat retencije hlorofila kod mahovina, i ako ga imaju kojim intenzitetom se ispoljava u zavisnosti od vrste primenjenog citokinina, kao i da se utvrdi da li TDZ ima isti efekat kod mahovina kao i kod vaskularnih biljaka (imitira citokininsku aktivnost). Kao osnovna metoda korišćen je biološki test retencije hlorofila. Sumiranjem podataka dobijenih testom pokazalo se da BAP i kinetin verovatno nemaju efekat retencije hlorofila kod mahovina.

---

### Uvod

Citokinini predstavljaju posebnu grupu fitohormona koji su svoj naziv dobili po svojoj osnovnoj funkciji – stimulaciji ćelijskih deoba (citokineza). Njihovom otkriću u značajnoj meri su doprineli eksperimenti Skoog-a i saradnika koji su uočili da se u autoklaviranim i degradiranim preparatima DNA izolovane iz gljive nalazi supstanca koja podstiče deobu ćelija. Ona je kasnije izolovana i nazvana *kinetin*. Živi organizmi ne sadrže kinetin, te se smatra da je on sintetički citokinin. Prisustvo citokinina u biljkama je utvrđeno tek kasnije, kada je iz endosperma semena kukuruza izolovan prirodni citokinin, *zeatin*. Posmatrajući hemijsku strukturu citokinina vidi se da su oni derivati purina, odnosno adenina. Po hemijskoj građi kinetin je 6-(2)-furfuril-aminopurin dok je zeatin 4-hidroksi-3-metilbut-2enil-aminopurin (Kastori 1995). Postoji veliki broj supstanci sa citokininskom aktivnošću, a u eksperimentu su korišćeni: benzil-aminopurin (BAP) i N-fenil-N'-1,2,3-tidiazol-5-il urea (TDZ).

TDZ nije po hemijskoj prirodi citokinin, ali je u raznovrsnim biološkim testovima pokazao snažnu, citokininima sličnu aktivnost. U kulturi *in vitro* primena TDZ-a je izazvala reakciju rasta kod kalusnih kultura, isto

---

Maja Maličević  
(1982), Subotica,  
Petra Petrekanovića  
32, učenica 3.  
razreda Gimnazije  
"Svetozar Marković"  
u Subotici

MENTOR:

Ivana Dragicević,  
Biloški Fakultet,  
Beograd

kao kod primene velikih koncentracija citokinina. Utvrđeno je da TDZ ima citokininima sličnu aktivnost uključujući tu oslobađanje bočnih pupoljaka od apikalne dominacije i formiranje izdanaka kod brojnih vrsta biljaka (Hess 1975). Precizan mehanizam delovanja TDZ-a još nije sasvim razjašnjen.

O biosintezi i razgradnji citokinina se malo zna. Pretpostavlja se da su glavno mesto sinteze citokinina mladi korenovi, odakle se pomoću transpiracionog toka prenose u druge organe. Veće količine citokinina se nalaze u mladim semenima i plodovima gde se verovatno i sintetišu. Drugim rečima, ispostavlja se da koren nije jedino mesto sinteze (Kastori 1995).

Citokinini su polifunkcionalna grupa biljnih hormona. Utiču na veliki broj fizioloških procesa u organizmu biljke: deoba ćelija, sinteza proteina i RNA, transport materija, apikalna dominacija, itd. U velikom broju slučajeva citokinini utiču na formiranje organa, povećavaju toleranciju biljaka prema visokim i niskim temperaturama kao i gljivičnim infekcijama (Kastori 1995). Jedan od najzanimljivijih efekata citokinina je njihov uticaj na senescenciju (starenje) listova.

Starenje listova je biološki proces pri kojem dolazi do usporavanja brojnih biohemijskih procesa, među kojima su i promet belančevina i nukleinskih kiselina, a manifestuje se gubitkom hlorofila u listovima. Endogeni sadržaj fitohormona koji usporavaju senescenciju (citokinini) se smanjuje tokom starenja listova, dok se endogeni sadržaj fitohormona koji ga pospešuju (apscisinska kiselina, etilen) povećava (Kastori 1995). Starenje listova često počinje neposredno posle njihovog potpunog razvoja.

Odlučujuća pojava koja doprinosi starenju listova je smanjenje sadržaja proteina i RNA. U toku senescencije u listovima se usporava sinteza ovih supstanci, a usled povećane aktivnosti RNA-za i proteaza ubrzava se njihova razgradnja. Obrazuju se i hidrolaze koje, kad ćelijske membrane postepeno počinju da gube selektivnu propustljivost, prodiru u citoplazmu čime počinje autoliza ćelijskih organela i s tim u vezi uginuće ćelije. U toku perioda starenja dolazi i do povećanja intenziteta disanja, a aminokiseline podležu dezaminaciji. Takođe dolazi i do nakupljanja asparagina i glutamina, a istovremeno se uočava i dezorganizacija hloroplasta i s tim u vezi smanjenja sadržaja hlorofila. Smanjenje količine hlorofila u listovima koje se dešava prilikom starenja, posledica je degradacije proteina za koje je hlorofil vezan u kompleks u membranama tilakoida u hloroplastu. Na taj način se preko količine hlorofila u listovima može odrediti intenzitet starenja lista.

Budući da se zna da citokinini obnavljaju sintezu proteina i zaustavljaju njihovo propadanje, može se zaključiti da oni takođe utiču i na zadržavanje hlorofila u listovima. Naime, kada se obnavljaju proteini automatski se sprečava i destrukcija hlorofila odnosno dolazi do retencije hlorofila i usporava se starenje.

Vaskularne biljke sintetišu različite vrste biljnih hormona, između ostalog i citokinine. Pretpostavlja se da i mahovine sadrže citokinine, ali se ne zna u kojoj količini. Još nije pouzdano utvrđeno da li citokinini isto deluju kod mahovina kao kod vaskularnih biljaka. S obzirom da su mahovine više biljke i da sadrže hlorofil *a* i *b*, može se pretpostaviti da će citokininski tretman odsečaka talusa i kauloida sa filoidima određenih vrsta mahovina dovesti do zadržavanja hlorofila u njima, odnosno usporiće senescenciju.

Cilj ovog rada je da se ispita da li citokinini imaju efekat retencije hlorofila kod mahovina, i ako ga imaju kojim intenzitetom se ispoljava u zavisnosti od vrste primenjenog citokinina. Takođe, hteli smo da proverimo da li TDZ ima isti efekat kod mahovina kao i kod vaskularnih biljaka, odnosno da imitira citokininsku aktivnost.

## Materijal i metode

Kao osnovna metoda, korišćen je biološki test retencije hlorofila (Ćulafić *et al.* 1992). Kao biljni materijal korišćene su mahovine *Conocephalum conicum* (L.) Underw. (jetrenjača) i *Plagiomnium undulatum* (Hedw.). Kao model sistem za test korišćen je ovas (*Avena sativa* L.). Od svake biljke su uzimani samo najmlađi delovi. Kod vrste *P. undulatum* to su bili vršni delovi kaluoida sa filoidima, kod vrste *C. conicum* su to bili vršni delovi talusa, dok su kod ovsa korišćeni odsecci mladih listova (sa biljaka starih nedelju dana). Sveža masa (FW) svih uzoraka je iznosila 70 mg.

Uzorci su bili tretirani rastvorima tri sintetička citokinina (BAP, KIN, TDZ) u sledećim koncentracijama:

BAP i KIN: 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 g/mL

TDZ: 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 g/mL

Kontrolni uzorci su stajali u destilovanoj vodi. Svaka eksperimentalna postavka sadržala je 10 mL rastvora odgovarajuće koncentracije. Sve postavke su držane u mraku na sobnoj temperaturi (oko 25°C). Uzorci obe vrste mahovina su bili potopljeni u vodene rastvore citokinina 4 dana, a odsecci ovsa 2 dana. Mahovine su bile potopljene duže zbog toga što je kod kontrolnog uzorka mahovina značajnija destrukcije hlorofila uočena tek posle 4 dana, za razliku od ovsa gde se destrukcija videla već posle dva dana. Eksperiment je ponavljen dva puta.

Nakon isteka vremena određenog za inkubiranje, uzorci su izvađeni iz rastvora, osušeni i prebačeni u avane. Nakon toga je izvršena ekstrakcija, odnosno homogenizovanje biljnog materijala tretiranog citokininima, uz pomoć kvarcnog peska i 80%-og acetona (oko 6 mL po uzorku). Homogenati su centrifugirani u trajanju od pet minuta brzinom od 3000 obrtaja u sekundi. Posle toga je određivana zapremina supernatanta i merena

apsorbancija na talasnim dužinama od 652 nm i 720 nm. Apsorpcioni spektri hlorofila *a* i *b* seku se na talasnoj dužini od 652 nm, što omogućava određivanje koncentracije ukupnog hlorofila merenjem apsorbancije na toj talasnoj dužini. Apsorbancija na 720 nm je merena da bi se eliminisala apsorbancija koja potiče od nečistoća, jer na toj talasnoj dužini hlorofili ne apsorbuju. Pre postavke eksperimenta određena je količina ukupnog hlorofila u svežim uzorcima (FW = 70 mg) biljnog materijala za sve tri korišćene vrste.

Koncentracija ukupnog hlorofila je izračunavana po formuli

$$C_{chl} = \frac{A_{652} - A_{720}}{32.5} \times 1000$$

gde je  $C_{chl}$  – koncentracija ukupnog hlorofila u nanomolima po mililitru ( $10^{-9}$  mol/mL); 32.5 predstavlja molarni ekstinkcioni koeficijent za hlorofile *a* i *b* na talasnoj dužini od 652 nm, a broj 1000 označava faktor razblaženja.

Količina ukupnog hlorofila  $m_{chl}$  je izračunavana po formuli

$$m_{chl} = C_{chl} \times V$$

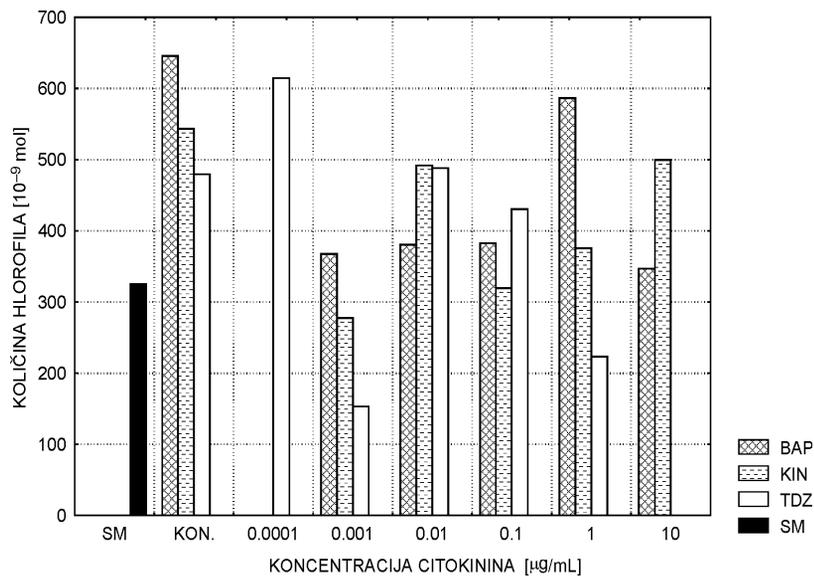
( $V$  zapremina supernatanta), a potom preračunata na gram sveže mase uzorka.

## Rezultati i diskusija

Količina hlorofila po gramu sveže mase za mahovinu *P. undulatum* data je na slici 1, a za jetrenjaču (*C. conicum*) na slici 2. Grafik na slici 3 predstavlja rezultate testa na retenciju hlorofila kod ovsa (*A. sativa*) koji je uzet kao model-sistem.

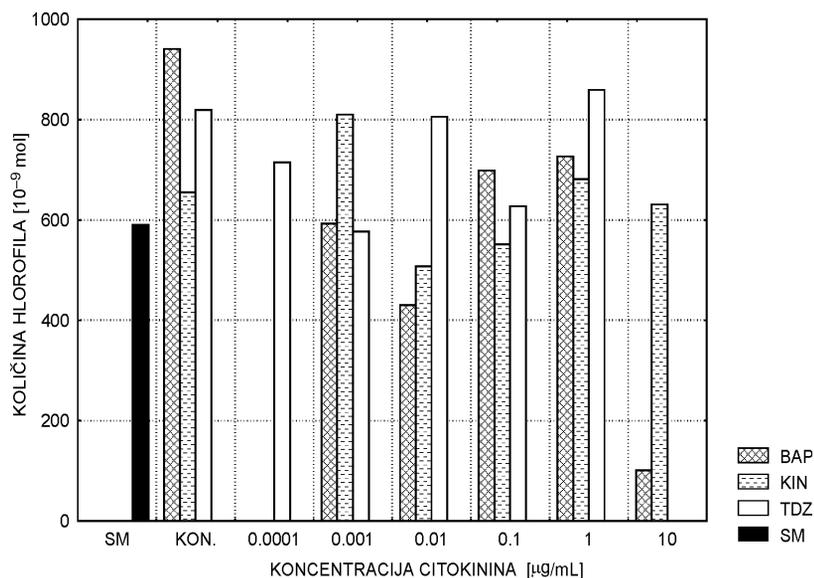
Vidi da je kinetin, kao što se i očekivalo, izazvao retenciju hlorofila na model-sistemu ovsa, tj. sa povećanjem koncentracije kinetina, povećava se i količina hlorofila po gramu sveže mase (slika 3). Kada su u pitanju efekti na mahovinama (slike 1 i 2), ni u jednom slučaju se ne dobija jasna slika. Izuzetak je možda jedino BAP koji najverovatnije ima inhibitorno dejstvo kod obe mahovine. Kada je u pitanju kinetin, kod jetrenjače se ne uočava nikakva korelacija između upotrebljenih koncentracija citokonina i dobijenih količina hlorofila. U slučaju mahovine *P. undulatum* moguće da kinetin deluje čak i inhibitorno, budući da je količina hlorofila najveća na kontrolnom uzorku, iako se ne može uočiti nikakva veza između koncentracija citokinina i količine hlorofila kod ostalih uzoraka.

Interesantno je to što je jedino TDZ, (koji nije citokinin, ali ima citokininima sličnu aktivnost u nekim fiziološkim procesima), pokazao mali efekat zadržavanja hlorofila kod vrste *P. undulatum* i to pri najmanjoj kon-



Slika 1.  
Količina hlorofila po gramu sveže mase kod mahovine *Plagiomnium undulatum*

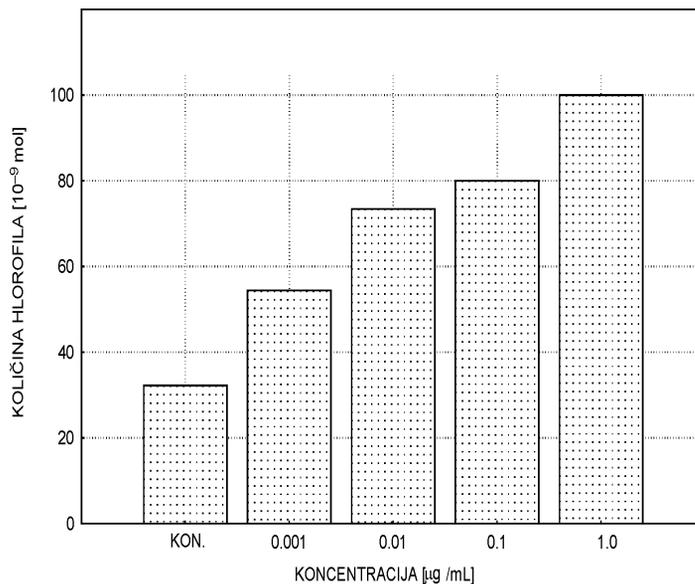
Figure 1.  
Chlorophyll content per gram of fresh weight in moss (*Plagiomnium undulatum*)



Slika 2.  
Količina hlorofila po gramu sveže mase kod jetrenjače *Conocephalum conicum*

Figure 2.  
Chlorophyll content per gram of fresh weight in liverwort (*Conocephalum conicum*)

centraciji (slika 1). Međutim, postavlja se pitanje da li je to zaista tako, ili je u pitanju promašeni opseg koncentracija. Naime, u eksperimentu su korišćeni rastvori koncentracija koje odgovaraju vaskularnim biljkama. Uzimajući ovo u obzir, moguće je da su te koncentracije prevelike i da se zbog toga javio suprotan efekat od očekivanog, tj. da je opseg osetljivosti testa na retenciju hlorofila kod mahovina pomeren ka nižim koncentracijama, pošto je količina endogenih citokina kod vaskularnih biljaka veća nego kod mahovina.



Slika 3.  
Rezultati standardnog testa na retenciju hlorofila na ovsu (*Avena sativa*)

Figure 3.  
Standard test results to chlorophyll retention in oats (*Avena sativa*)

Najmanja količina hlorofila je dobijena u svežem materijalu, a najveća u kontrolnim uzorcima, što je potpuno suprotno očekivanjima. Ovo se može objasniti činjenicom da su obe mahovine bile sa vlažnih staništa. Pre ekstrakcije hlorofila iz svežeg materijala, mahovine su stajale u vlažnoj sredini, ali ne u vodi, pa je verovatno zbog toga došlo do veće destrukcije hlorofila nego kod filoida koji su bili potopljeni u destilovanu vodu.

Sa grafika 1 i 2 se vidi da je kod vrste *C. conicum* količina hlorofila veća nego kod vrste *P. undulatum*. Ova pojava ima više mogućih objašnjenja. Za najverovatnije objašnjenje bi se mogao uzeti uticaj svetlosti na sadržaj hlorofila u hloroplastima biljaka. Obe vrste su uzete sa istog lokaliteta, ali su bile izložene različitom intenzitetu svetlosti. Povećana količina hlorofila kod jetrenjače mogla bi se objasniti i činjenicom da biljke koje su manje izložene svetlosti imaju veći sadržaj hlorofila od onih koje su njoj direktno izložene. Isto tako, moguće je da se količina hlorofila razlikuje zbog toga što su u pitanju različite vrste, odnosno zbog genetskih predispozicija.

## Zaključak

U ovom radu nije utvrđeno da li sintetički citokinini (BAP i kinetin) utiču na retenciju hlorofila kod mahovina. Najverovatnije je da sintetički citokinini nemaju efekat retencije hlorofila kod mahovina, mada postoji mogućnost da je opseg osetljivosti pomenen ka nižim koncentracijama u odnosu na korišćene koncentracije koje su predviđene za vaskularne biljke, pa se zbog toga postiže i suprotan efekat. TDZ možda ima uticaja pri nižim koncentracijama, bar u slučaju mahovine *P. Undulatum*.

Može se pretpostaviti da bi efekat TDZ-a pri manjim koncentracijama bio puno jači, dok se za BAP i kinetin to ne može sa sigurnošću tvrditi, pošto ova dva citokinina nisu pokazivala nikakav efekat retencije hlorofila, čak ni pri najnižim koncentracijama, za razliku od TDZ-a koji je pokazao blagu reakciju. Vrlo je verovatno da je opseg dejstva TDZ-a (kao i druga dva hormona) kod mahovina pomenen ka puno nižim koncentracijama, pa bi celokupan test trebalo ponoviti sa koncentracijama manjim za nekoliko redova veličine.

---

## Literatura

Ćulafić Lj., Cerović Z., Naunović G., Konjević R. 1992. *Fiziologija biljaka – praktikum*. Beograd: Naučna knjiga

Hess, D. 1975. *Plant Physiology*. Springer Verlag

Kastori R. 1995. *Fiziologija biljaka*. Beograd: Nauka

Popović Ž. 1987. *Fiziologija biljaka-ishrana i metabolizam*. Beograd: Naučna knjiga

Sarić M., Krstić B., Stanković Ž. 1991. *Fiziologija biljaka*. Beograd: Nauka

---

*Maja Maličević*

### The Influence of Various Cytokinins to Chlorophyle Retention in Bryophytes *Conocephalum conicum* (L.) Underw and *Plagiomnium undulatum* (Hedw.)

Cytokinines represent a group phytohormones which affects numerous processes in plants, among others aging of leaves. The project deals with the influence of two substances with cytokinine activity, BAP and TDZ, as well as the synthetic cytokinine (kinetine) on retention of chlorophile of mosses *Conocephalum conicum* (L.) Underw. and *Plagiomnium undulatum* (Hedw.). The aim was to test whether these substances produce the effect of chlorophile retention of mosses, and if they do what is the intensity of retention depending on type of used cytokinine. The intention was also to see whether TDZ has the same effect on mosses as it has on vascular plants (imitation of cytokinine activity). The biological test of chlorophile retention was used as the primary method.

The quantity of chlorophile per gram FW (fresh weight) for both types is represented on figures 1 and 2. It is obvious by looking at them that for *C. conicum* the quantity of chlorophile is bigger than for *P. un-*

*dulatum*. This phenomenon has several possible explanations. Most probably it is a matter of the influence of light on quantity of chlorophyll in chloroplasts of plants. Both types were taken from the same place, but were exposed to different quantities of light. The higher amount of chlorophyll in *C. conicum* could be explained by the fact that plants which have less exposure to light have more chlorophyll than those which are directly exposed to light. Even more, the amount of chlorophyll could vary for this reason: we are talking about different types with different genetic background.

This project didn't show for sure whether synthetic cytokinins (BAP and kinetin) affect chlorophyll retention of mosses. It is most likely that synthetic cytokinins don't have effect of chlorophyll retention of mosses, although it is possible that a range of sensitivity was shifted towards lower concentrations when compared to the used ones which were supposed to be used for vascular plants. Because of this the opposite effect can be achieved. TDZ may have influence when lower concentrations are used, at least this is the case with moss *P. undulatum*

