

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Změny světlem indukovaného pohybu chloroplastů během senescence rostlin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Tereza Cyříková
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok: 2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

.....

Tereza Cyříková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Martině Špundové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, čas, který mi věnovala, a hlavně za ochotu a trpělivost, kterou se mnou během psaní této bakalářské práce měla. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Kučerové za pomoc a čas, který mi věnovala při řešení experimentální části bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Cyříková
Název práce	Změny světlem indukovaného pohybu chloroplastů během senescence rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Jedním z procesů, kterými rostlina reaguje na dynamicky se měnící světelné podmínky okolního prostředí, je pohyb chloroplastů. V případě silného světelného záření se chloroplasty snaží vyhnout poškození fotosyntetického aparátu pomocí únikového pohybu, naopak při nedostatku světelného záření se snaží zvýšit rychlost fotosyntézy pomocí akumulárního pohybu. Důležitou fází života rostliny nebo listu, která nastává před jejich odumřením, je senescence umožňující recyklaci látek. Aby tato recyklace byla efektivní, musí být v senescentních listech regulována absorpce světla. K této regulaci může kromě jiných procesů přispívat právě světlem vyvolaný pohyb chloroplastů. Tato práce je tedy zaměřena na studium změn v pohybech chloroplastů během senescence rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L., ekotyp Col-0), pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) a tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Pohyb chloroplastů byl určován ze změn kolimované transmitance listů. Ze studovaných rostlinných druhů byla pozorována největší míra únikového pohybu chloroplastů u huseníčku, menší u tabáku a nejmenší u pšenice. Vlivem senescence došlo u huseníčku a tabáku ke snížení únikového pohybu chloroplastů. U pšenice se tento trend změn pohybu chloroplastů nepotvrdil. U všech měřených druhů rostlin jsme zaznamenali vyšší rozsah pohybu chloroplastů u listů v juvenilní fázi než u listů v reprodukční fázi.

Klíčová slova	Pohyb chloroplastů, transmitance, fototropin, huseníček, tabák, pšenice
Počet stran	44
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tereza Cyříková
Title	Changes in light-induced chloroplast movement during plant senescence
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

One of the processes allowing adaptation to fluctuating environmental light conditions is chloroplast photorelocation movement. In the case of strong light, chloroplasts can avoid photodamage through avoidance movement, while under low-light they can optimize photosynthetic activity through accumulation movement. The last phase, which occurs before the death of plant or leaf is called senescence. This process allows the plant to recycle substances from the leaves to other parts of the plant. Regulation of light absorption in senescing leaves is important for effective recycling. This bachelor thesis is aimed to find out, whether there are changes in chloroplast movements during plant senescence in *Arabidopsis thaliana* L. (ecotype Col-0), *Triticum aestivum* L. (cv. Aranka) and *Nicotiana tabacum* L. (cv. Samsun). Chloroplast movements were estimated from changes in collimated leaf transmittance. The highest extent of chloroplast avoidance movement was observed in *A. thaliana*, smaller in *N. tabacum* and the lowest in *T. aestivum*. During senescence, the avoidance movement of chloroplasts was reduced in *A. thaliana* and tobacco. In wheat, this trend of changes in chloroplast movement was not confirmed. In all measured plant species, we recorded a higher extent of chloroplast movement in leaves of plants in the juvenile phase than in the reproductive phase.

Keywords	Chloroplast movement, transmittance, phototropin, arabidopsis, tobacco, wheat
Number of pages	44
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	3
2.1	Význam chloroplastů.....	3
2.2	Pohyb chloroplastů.....	3
2.2.1	Mechanismus pohybu chloroplastů.....	5
2.2.2	Změny pohybu chloroplastů způsobené abiotickými stresovými faktory...9	
2.3	Senescence.....	10
2.3.1	Degradace chloroplastů během senescence	12
2.3.2	Pohyb chloroplastů během senescence	13
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1	Rostlinný materiál	16
3.1.1	Použité přístroje	16
3.2	Metody.....	16
3.2.1	Měření pohybu chloroplastů	16
3.2.2	Stanovení relativního obsahu chlorofylu	18
3.2.3	Stanovení skutečného obsahu chlorofylu.....	18
3.2.4	Stanovení parametru F_V/F_M	19
3.2.5	Zpracování získaných dat.....	20
4	VÝSLEDKY	21
4.1	Únikový a akumulární pohyb chloroplastů a parametr F_V/F_M v listech huseníčku rolního	21
4.2	Únikový a akumulární pohyb chloroplastů a parametr F_V/F_M v listech tabáku virginského	25
4.3	Únikový a akumulární pohyb chloroplastů a parametr F_V/F_M v listech pšenice seté 29	
5	DISKUZE	33
5.1	Různý rozsah pohybu chloroplastů v různých rostlinných druzích.....	34
5.2	Změny pohybu chloroplastů během senescence.....	35
5.3	Rozdíly v pohybu chloroplastů v listech rostlin v juvenilní a reprodukční fázi 36	
6	ZÁVĚR	37
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	44

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma změn chloroplastů během senescence rostlin a mechanismu pohybu chloroplastů vyvolaného světlem
2. Zjistit, zda a jak se mění pohyb (akumulační a únikový) chloroplastů vyvolaný modrým světlem u různě zelených listů během juvenilní a reprodukční fáze rostlin huseníčku rolního, pšenice seté a tabáku virginského pomocí měření změn optické propustnosti listu (přístroj Spectrapen)
3. V listech použitých k měření pohybu chloroplastů stanovit obsah chlorofylu a účinnosti fotochemie fotosystému II (parametr F_v/F_M) za účelem posouzení míry jejich senescence

1 ÚVOD

Světlo je nezbytnou podmínkou pro přežití téměř všech organismů na Zemi a je klíčové zejména pro rostliny, neboť ty jsou schopné světlo absorbovat a využít ve fotosyntéze. Také se jedná o jeden z mnoha faktorů, které rostliny ovlivňují během jejich růstu a vývoje. Při působení světla na rostliny hraje důležitou roli, jak dlouho na ně světlo působí a v jaké intenzitě. Tyto charakteristiky mohou mít vliv na procesy, které se světlem spouštějí a v konečném důsledku také mohou ovlivnit stárnutí rostliny.

Světelné podmínky nejsou stále stejné a během sezóny či dne se mění, často také kolísají kvůli přítomnosti oblačnosti. Na změnu světelných podmínek rostliny reagují zejména pomocí fotoreceptorů. V rostlinách existuje řada mechanismů, které jim umožňují přizpůsobit se světelným podmínkám, jedním z nich jsou fotorelokační pohyby chloroplastů.

Pohyb chloroplastů nastává při změně světelných podmínek – působením světla o určité intenzitě se chloroplasty přesunou do pozice, ve které setrvávají, pokud nedojde k další změně světelných podmínek. Při působení světla o nízké intenzitě vykonávají chloroplasty akumulární pohyb – hromadí se v oblastech ozářených světlem, aby zvýšily účinnost fotosyntézy. Naopak při působení světla o vysoké intenzitě dochází k únikovému pohybu – chloroplasty se pohybují směrem od světla, aby zabránily absorpci nadměrného světla a tím případnému poškození fotosyntetického aparátu.

Součástí životního cyklu rostlin je i senescence, což je zpravidla poslední fáze, která nastává před odumřením rostliny, případně listu. Jedná se o řízený proces, který umožňuje rostlině recyklaci látek ze stárnoucích listů do jiných částí, jako jsou semena, vyvíjející se listy, pupeny nebo plody. Aby recyklace látek proběhla efektivně, musí být proces senescence regulován, mimo jiné proto, aby se předcházelo absorpci nadměrné ozářenosti a následnému riziku fotooxidativního poškození buněk.

Nejčasnější změny spojené se senescencí listů nastávají právě v chloroplastech, protože je v nich alokováno velké množství látek (hlavně dusíku jako součásti velkého množství chloroplastových proteinů), které rostlina v průběhu senescence přesouvá. Degradací procesy v chloroplastech postupně vedou k jejich zmenšování a poklesu jejich počtu. Doposud není jasné, do jaké míry zůstává při senescenci funkční světlem vyvolaný pohyb chloroplastů jako jeden z fotoprotektivních mechanismů, který by mohl přispívat k optimálnímu průběhu senescence.

Změny pohybu chloroplastů během senescence rostlin zatím nebyly systematicky studovány. Jako první se této problematice částečně věnovala ve své diplomové práci Rolencová (2008). Zjistila, že s klesajícím obsahem chlorofylu došlo v listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) ke snížení rychlosti a rozsahu pohybu chloroplastů vyvolaného světlem.

Další informace o těchto změnách jsou zmíněny v pracích Nauš et al. (2010) a Nauš et al. (2016). V rámci studia pohybu chloroplastů v jiných souvislostech uvedení autoři zjistili, že u tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) (Nauš et al., 2010) a ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) (Nauš et al., 2016) byl rozsah pohybu chloroplastů v reprodukční fázi rostlin menší než u rostlin v juvenilní fázi. Dále bylo u listů tabáku potvrzeno zmenšování rozsahu únikového pohybu s klesajícím obsahem chlorofylu v listech (Nauš et al., 2010).

V návaznosti na tyto informace jsme se rozhodli zjistit, zda a jak se mění světlem vyvolaný pohyb chloroplastů v závislosti na obsahu chlorofylu u listů huseníčku rolního a pšenice seté a srovnat tyto změny s již popsányými změnami v listech tabáku virginského. Je totiž známo, že rozsah pohybu chloroplastů se obecně může lišit u různých rostlinných druhů, tudíž by se mohly lišit i jeho změny způsobené senescencí. Pohyb chloroplastů byl sledován pomocí měření změn optické propustnosti listu, a to jak v juvenilní, tak v reprodukční fázi rostlin.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Význam chloroplastů

Chloroplasty jsou buněčné organely zprostředkovávající fotosyntézu, která je nezbytná pro životní procesy rostlin. Rostliny, které jsou schopné využít světlo, jako zdroj energie pro fotosyntézu, se nazývají fototrofní. Přísun světla je regulován, jinak by po nadměrném osvětlení mohlo docházet k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), oxidativnímu poškození a následné inhibici fotosyntézy.

Chloroplasty dosahují velikosti 2 – 5 μm . Jsou tvořeny vnější obálkou, stromatem a vnitřním membránovým systémem – tylakoidy. V tylakoidních membránách jsou uloženy pigment-proteinové komplexy, jejichž součástí jsou proteiny a pigmenty chlorofyly a karotenoidy. Vnitřní prostor tylakoidů se nazývá lumen. Základní barvu všem fotosyntetizujícím rostlinám dává zelená barva hlavního fotosyntetického pigmentu chlorofylu, která je dána jeho absorpcí v modré a červené části světelného spektra. Karotenoidy mají kromě pomocné světlosběrné funkce také funkci ochrannou – zabraňují absorpci přebytečného světelného záření a tím chrání fotosyntetický aparát před poškozením.

Chloroplasty zaujímají v buňce různou pozici, pohybují se. Pohyb chloroplastů v listech rostlin je regulován intenzitou světla dopadajícího na list, která určuje, uspořádání chloroplastů v buňce. Cílem pohybu chloroplastů je efektivní hospodaření listu s dopadajícím světlem. Při nízkých intenzitách se chloroplasty uskupí tak, aby zachytily co nejvíce světla. Při působení světla o vyšší intenzitě chloroplasty ve svrchní vrstvě listu ustupují k bočním stěnám buněk a světlo tak může projít k chloroplastům ve spodních vrstvách listu (Rolencová 2008). Zároveň se tímto způsobem chloroplasty chrání před nadměrnou ozářeností a případným (foto)oxidativním poškozením.

2.2 Pohyb chloroplastů

Pohyb chloroplastů vyvolaný světlem byl pozorován téměř ve všech skupinách rostlin od řas až po vyšší rostliny. Chloroplasty mají různé umístění v buňkách podle světelných podmínek, kterým jsou vystaveny. Jejich pohyb se mění na základě intenzity světla. Míra pohybu se může lišit u různých druhů rostlin (Kagawa a Wada, 2002; Königer a Bollinger, 2012). Rozeznáváme 2 druhy pohybu chloroplastů vyvolaného světlem:

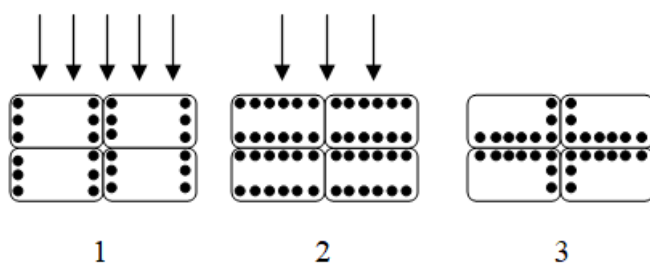
1) Únikový pohyb („avoidance response“ – z angl. vyhýbat se)

Tento typ pohybu nastává tehdy, když na rostlinu působí světlo o větší intenzitě. Dochází k pohybu chloroplastů z oblasti ozářené světlem směrem k buněčným stěnám rovnoběžným s dopadajícím zářením, do tzv. pozice parastrophe (Obr. 1). Chloroplasty tímto pohybem zabraňují případnému poškození fotosyntetického aparátu nadměrnou ozářeností (Kagawa a Wada, 2002; Wada, 2016; Gotoh et al., 2018). Tento pohyb také přispívá k proniknutí světla k chloroplastům v hlubších vrstvách listu, což může vést k rovnoměrnější distribuci světla mezi chloroplasty a zvýšení celkové fotosyntézy (Brugnoli a Björkman, 1992).

2) Akumulační pohyb („accumulation response“ – z angl. shromažďovat se)

Tento pohyb nastává, když na rostlinu působí světlo o malé intenzitě. Dochází ke shromažďování chloroplastů podél buněčných stěn kolmých k dopadajícímu světlu – v pozici diastrophe (Obr. 1). Chloroplasty tímto pohybem zvyšují účinnost fotosyntézy a produkci rostlinné biomasy (Kagawa a Wada, 2002; Wada, 2016; Gotoh et al., 2018).

Když je rostlina přenesena ze světla do tmy, zajmou chloroplasty po určité době tzv. pozici – apostrophe (Wada, 2016).



Obr. 1 Schématické znázornění umístění chloroplastů v buňce při působení různé intenzity světla. Parastrophe (1), diastrophe (2), apostrophe (3). Počet šipek znázorňuje míru ozářenosti.

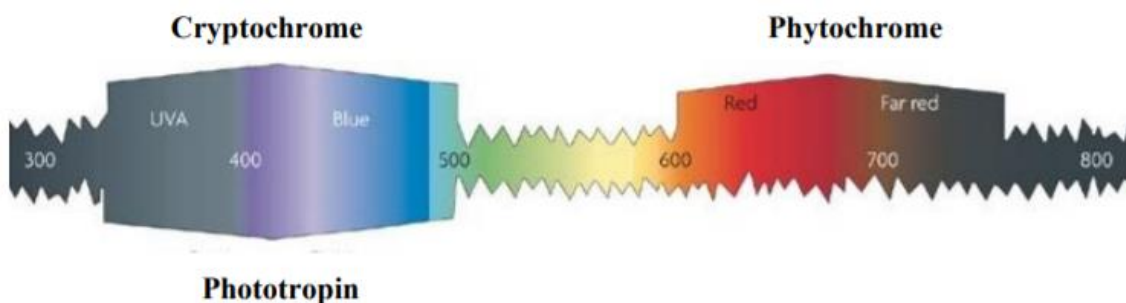
Srovnáním pohybu chloroplastů u různých druhů vyšších rostlin se zabývaly Königer a Bollinger (2012). Tyto autorky zjistily, že rozsah a rychlost pohybu chloroplastů je větší u rostlin preferujících vyšší intenzitu světla v porovnání se stínomilnými rostlinami. Největší míra únikového pohybu v porovnání s ostatními zkoumanými rostlinami byla zaznamenána u huseníčku rolního (*A. thaliana*). Königer a Bollinger (2012) nepotvrdily hypotézu uvedenou v práci Augustynowicz a Gabrys

(1999) na kaprořorostech, podle které mají větší rozsah a rychlost pohybu chloroplastů rostliny rostoucí v proměnlivých světelných podmínkách oproti rostlinám rostoucím při stabilnějších světelných podmínkách.

2.2.1 Mechanismus pohybu chloroplastů

Fotomorfogeneze je vývoj rostlin zprostředkovaný světlem. Pro regulaci růstu využívají rostliny různé fotoreceptory, kterými jsou schopny reagovat na světelný podnět (Wada, 2016). Po percepci signálu z vnějšího prostředí specifickými receptory, je signál dále přenášen signálními dráhami do své cílové oblasti, kde plní určitou funkci (Suetsugu et al., 2016)

Mezi fotoreceptory řadíme fytochromy, které absorbují červené a daleké červené světlo (620–850 nm) a dále fototropiny a kryptochromy, což jsou specifické receptory reagující na modré světlo a UV-A (320 – 500 nm) (Briggs a Huala, 1999; Christie, 2007). Pohyb chloroplastů je u většiny rostlin řízen modrým světlem o vlnové délce 400 – 500 nm. U většiny nižších rostlin je pohyb indukován červeným světlem o vlnové délce 600 – 700 nm (Brugnoli a Björkman, 1992; Christie, 2007; Kong a Wada, 2014; Park a Runkle, 2018). Červené světlo u většiny vyšších rostlin pohyb chloroplastů nevyvolává (Trojan a Gabrys, 1996; Augustynowicz a Gabrys, 1999).



Obr. 2 Rozdělení fotoreceptorů a jejich vlnové délky, ve kterých absorbují (upraveno podle Jiao et al., 2007).

2.2.1.1 Fototropiny

Fototropiny jsou rostlinné fotoreceptory, které se nacházejí v různých typech rostlin – od jednobuněčných řas až po vyšší rostliny (Suetsugu a Wada, 2007). Jsou zodpovědné za fotorelokační pohyby chloroplastů u vyšších rostlin (Wada et al., 2003).

Fototropiny se kromě pohybu chloroplastů podílejí i na regulaci řady dalších fyziologických odpovědí. Tyto odpovědi lze rozdělit do dvou kategorií: dlouhodobé odezvy, jako je fototropismus, a krátkodobé odezvy, jako je otevírání průduchů a pohyby chloroplastů. Posledně jmenovanými odezvami rostlina reaguje na rychlé změny světelných podmínek prostředí (Briggs a Christie, 2002; Christie, 2007; Wada a Kong, 2011).

Ve vyšších rostlinách jsou známy dva druhy fototropinů, fototropin1 (phot1) a fototropin2 (phot2) (Briggs a Christie, 2002). Jak phot1, tak phot2 zprostředkovávají akumulární pohyb chloroplastů, přesto se phot2 zapojuje hlavně v únikovém pohybu. Phot1 se sice také zapojuje do tohoto pohybu, ale jeho účast není tak významná. Zatímco phot1 řídí reakce vyvolané menší intenzitou světla a dává tak signál cytoskeletu, který pohybuje chloroplasty směrem k dopadajícímu záření, phot2 řídí reakce vyvolané vyšší intenzitou světla a dává signál cytoskeletu pro únik chloroplastů od dopadajícího záření (Kagawa, 2001; Kasahara et al., 2002; Luesse et al., 2010).

Jak phot1, tak phot2 jsou ve tmě primárně lokalizovány na plazmatické membráně. V reakci na modré světlo se phot1 přemísťuje z plazmatické membrány do cytoplazmy. Toto přesouvání umožňuje kinasová doména. Phot2 nacházející se, jak na plazmatické membráně, tak na obálce chloroplastů se působením modrého světla přesouvá směrem ke Golgiho aparátu. Toto přesouvání umožňuje C-terminální doména (Sakamoto a Briggs, 2002; Kong et al., 2006, 2013; Kong a Wada, 2014; Galvão a Fankhauser, 2015).

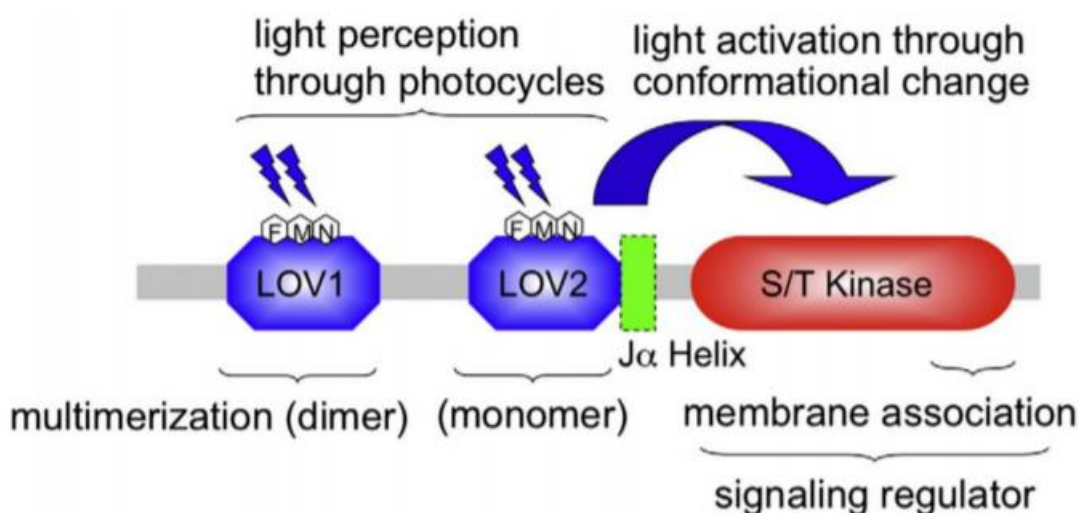
Základem struktury fototropinů je protein, který se skládá z 900 – 1 000 aminokyselinových zbytků, a dále dvě molekuly flavinového mononukleotidu (FMN), který funguje jako chromofor (Niyogi, 1999; Li et al., 2009). C-terminální oblast proteinu obsahuje serin/threoninovou kinasu (Briggs a Christie, 2002). V N-terminální oblasti proteinu jsou dvě domény, LOV1 a LOV2. Tyto domény jsou regulovány faktory jako je světlo, kyslík a napětí, podle toho vznikla jejich zkratka LOV (light, oxygen and voltage) (Briggs et al., 2001). Obě tyto domény se z velké části podílejí na fotorelokačním pohybu chloroplastů, tím že se zapojují do fototropinové signalizace (Wada a Kong, 2011).

Domény LOV v N-terminální oblasti proteinu jsou nezbytné pro fototropinovou signalizaci, protože tvoří vazebné místo pro navázání FMN. Ten je zodpovědný za absorpci modrého světla (Kong a Wada, 2014). FMN je na LOV2 v základním stavu

doménu navázán nekovalentně, absorpcí světla pak dochází k vytvoření přechodné kovalentní vazby mezi FMN a sousedním cysteinovým zbytkem v jádru LOV domény (Chen et al., 2004; Jones et al., 2013; Lukšíková, 2017).

Absorpcí světla doména LOV2 indukuje konformační změny $J\alpha$ helixu a následně dochází k aktivaci C-terminální kinasové domény. Předpokládá se, že $J\alpha$ helix interaguje s C-terminální kinasovou doménou a umožňuje ji tak regulovat (Aihara et al., 2008). Aktivace C-terminální kinasové domény vede k autofosforylaci fototropinu a iniciaci fototropinové signalizace v reakci na modré světlo (Briggs et al., 2001; Suetsugu a Wada, 2007; Christie, 2007; Kong et al., 2007). Autofosforylace molekuly fototropinu je považována za jeden z klíčových kroků, který spouští pohyb chloroplastů (Reiland et al., 2009).

Domény LOV1 a LOV2 jsou si navzájem velmi podobné. Sdílejí přibližně 60% sekvenční identitu a mají tak společnou sekundární a terciární strukturu (Crosson a Moffat, 2001; Christie, 2007; Nakasako et al., 2008). LOV2 doména je významnější, protože funguje jako hlavní světelný senzor regulující signalizaci receptoru a je tak důležitá pro základní funkci fototropinů (Cho et al., 2007; Kaiserli et al., 2009). LOV1 reguluje působení LOV2 (Okajima et al., 2014).



Obr. 3 Schéma signální dráhy fototropinů. Fototropiny obsahují LOV1 a LOV2 doménu na N-konci a serin/threoninovou protein kinasu na svém C-konci. Po absorpci světla LOV2 doména indukuje konformační změny $J\alpha$ helixu a působí jako molekulární přepínač kinasové domény. LOV1 na druhou stranu zeslabuje citlivost přepínače (LOV2 domény) na světlo (převzato z Kong a Wada, 2014).

2.2.1.2 Zapojení dalších fotoreceptorů do pohybu chloroplastů

Jedním z dalších fotoreceptorů, který se zapojuje do regulace pohybu chloroplastů je fytochrom. Jde o fotoreceptor, který absorbuje červené a dlouhovlnné červené světlo. Molekula fytochromu se skládá ze dvou podjednotek, z nichž každá je složena z polypeptidu s jedním tetrapyrrolem, který je zodpovědný za vnímání světla. Fytochromy jsou zvláště významné pro regulaci klíčení semen, ovlivnění buněčného dělení, doby kvetení a senescence (Quail, 1997; Schäfer a Nagy, 2006).

U rostlin se nenachází jen jeden typ fytochromu, může jich být i více. Ty se pak od sebe liší ve složení proteinu, který je kódován různými geny (Azari et al., 2010). U modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byla molekulárním výzkumem zjištěna existence pěti genů kódujících fytochromy phyA, phyB, phyC, phyD a phyE (Sharrock a Quail, 1989; Clack et al., 1994).

U fytochromů bylo objeveno, že se mohou podílet na modulaci pohybu chloroplastů. Mutanti huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s defektem ve phyA a phyB vykazovaly zvýšený rozsah únikového pohybu chloroplastů vyvolaného modrým světlem ve srovnání s divokým typem *A. thaliana*. Rostliny *A. thaliana* se zvýšenou expresí phyA a phyB vykazovaly zvýšený rozsah akumulárního pohybu chloroplastů vyvolaného modrým světlem oproti divokému typu *A. thaliana*. Z těchto výsledků vyplynulo, že fytochromy pravděpodobně ovlivňují přechody mezi pohybem chloroplastů vyvolané nižší a vyšší intenzitou modrého světla v *A. thaliana* (DeBlasio et al., 2003).

2.2.1.3 Cp – aktinová vlákna a zapojení Ca^{2+}

Pohyb chloroplastů je po spuštění fototropinové signalizace zprostředkován cp-aktinovými vlákny (chloroplastová-aktinová vlákna). Zapojení cp-aktinových vláken do pohybu chloroplastů bylo poprvé pozorováno v kaprad'orostru netíku (*Adiantum capillus-veneris*) a v mechu čepence odstálé (*Physcomitrella patens*) (Yamashita et al., 2011; Tsuboi a Wada, 2012).

Cp-aktinová vlákna jsou aktinovými strukturami, které jsou lokalizovány v prostoru mezi chloroplastem a plazmatickou membránou. Chloroplasty jsou schopny se podél těchto vláken pohybovat. Výskyt cp-aktinových vláken byl popsán u mnoha druhů rostlin (Kadota et al., 2009; Kong a Wada, 2011). Do fotorelokačního pohybu chloroplastů se kromě cp-aktinových vláken zapojují pravděpodobně i myosiny (Kong

a Wada, 2011). Mechanismus jejich zapojení do pohybu chloroplastů však zatím nebyl objasněn. Cp-aktinová vlákna se od aktinových filamentů liší v délce, tvaru, a regulačních mechanismech (Kadota et al., 2009; Kong et al., 2013). Jsou velmi křehká a snadno se rozpadají, což komplikuje jejich detekci (Wada a Kong, 2018). I z toho důvodu je o jejich fungování stále málo informací.

Přeskupení cp-aktinových vláken v určitém místě chloroplastů je předpokladem pro změnu jejich pozice v reakci na modré světlo. Při vyšší intenzitě modrého světla se na neozářené straně chloroplastů hromadí nově polymerizovaná cp-aktinová vlákna, na ozářené straně naopak dochází k rychlé depolymerizaci vláken. Toto přeskupení vláken pak vyvolává únikový pohyb chloroplastů z ozářeného místa. Působením nízké intenzity modrého světla se cp-aktinová vlákna hromadí na ozářené straně chloroplastů, chloroplasty se tedy pohybují směrem k ozářenému místu – dochází k jejich akumulárnímu pohybu (Kadota et al., 2009; Wada a Kong, 2011; Kong et al., 2013). Přeuspořádání aktinových vláken je obecně zprostředkováno koordinovanými procesy nukleace vláken, růstu a dělení (Hussey et al., 2006). Při působení konstantních světelných podmínek jsou cp-aktinová vlákna distribuována rovnoměrně po obvodu chloroplastu a chloroplasty se nacházejí ve stacionární pozici (Kong a Wada, 2014). Na organizaci cp-aktinových vláken se podílí specifický protein zvaný CHUP1 (CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1). Ten je lokalizován na povrchu chloroplastů a je nezbytný pro jejich umístění v buňce (Schmidt von Braun a Schleiff, 2008; Oikawa et al., 2008).

V průběhu let se došlo ke zjištění, že se na přenosu signálu z fotoreceptoru k chloroplastům podílí Ca^{2+} (Wada et al., 2003). Zapojení Ca^{2+} do pohybu chloroplastů bylo zkoumáno u netíku (*Adiantum capillus-veneris*) (Sato et al., 2001, 2003a) čepenky odstálé (*Physcomitrella patens*) (Sato et al., 2003b) a huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Stoelzle et al., 2003). Uvedení autoři došli k závěru, že se Ca^{2+} zapojují do regulace pohybu chloroplastů. Předpokládá se, že fototropiny aktivují kanály pro Ca^{2+} (Stoelzle et al., 2003). Role Ca^{2+} v pohybu chloroplastů vyvolaném světlem je ale stále nejasná.

2.2.2 Změny pohybu chloroplastů způsobené abiotickými stresovými faktory

Bylo zjištěno, že pohyb chloroplastů vyvolaný světlem je ovlivňován působením některých abiotických stresových faktorů.

Změny pohybu chloroplastů vyvolané vysokoteplotním stresem byly zkoumány u tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Působením vyšších teplot ($\geq 40^\circ\text{C}$) došlo k inhibici únikového a akumulárního pohybu chloroplastů (Frolec et al., 2010). Pohyb chloroplastů byl studován také při nízké teplotě v buňkách kaprad'orostu netíku (*Adiantum capillus-veneris*). Působením nízké intenzity světla při teplotě 25°C se chloroplasty shromažďovaly podél buněčných stěn kolmých k dopadajícímu světlu (vykonávaly akumulární pohyb), avšak při 4°C se chloroplasty působením stejné intenzity světla přemístily k buněčným stěnám rovnoběžným s dopadajícím zářením, šlo tedy o pohyb únikový. Při použití vyšší intenzity světla chloroplasty vykonávaly únikový pohyb mnohem rychleji (Kodama et al., 2008).

V práci Kondo et al. (2004) bylo zjištěno, že při nedostatku vody vytvořily chloroplasty v listech sukulentních rostlin shluky v jedné nebo někdy ve dvou oblastech cytoplazmy, aniž by došlo k jejich poškození. U různých druhů sukulentních rostlin se během zasychání výskyt shluků lišil. Listy se shluky chloroplastů vykazovaly vyšší transmitanci ve srovnání s kontrolními listy, které měly chloroplasty rozptýlené v buňce. Podle autorů vyšší transmitance v zasychajících listech odpovídala nižší absorpci světla právě z důvodu shluknutí chloroplastů. Dá se předpokládat, že shlukování chloroplastů v důsledku zasychání by mohlo vést k inhibici jejich pohybu vyvolaného světlem, což ale autoři v práci neřešili.

Vlivem nedostatku vody přímo na pohyb chloroplastů se zabývali Nauš et., al. (2016). Zasychání listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) a ječmene (*Hordeum vulgare* L. cv. Akcent) vedlo k inhibici únikového pohybu chloroplastů v buňkách, ačkoliv funkce fotosyntézy zůstala neovlivněna. Přesný mechanismus inhibice světlem vyvolaného pohybu chloroplastů v důsledku zasychání rostlin, nebyl zatím objasněn. Nicméně Śniegowska-Świerk et al. (2015) zjistili, že v zasychajících listech dochází ke změnám uspořádání aktinového cytoskeletu, což by podle autorů mohlo vést k inhibici pohybu chloroplastů.

2.3 Senescence

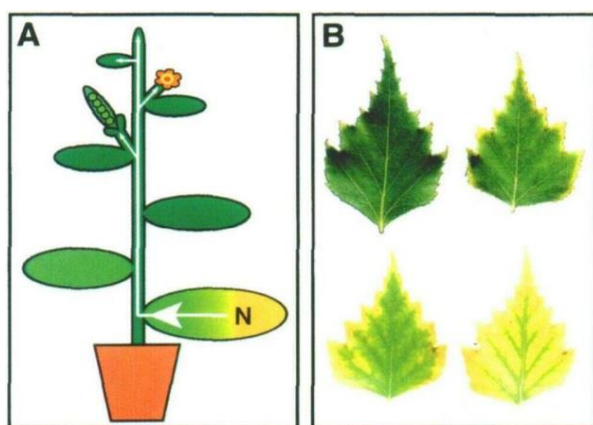
Senescence je typ programované buněčné smrti, která je řízena geneticky (Nam, 1997). U rostlin můžeme charakterizovat dva typy senescence: mitotickou a post-mitotickou. Mitotická je typická pro listy rostlin v počátečním stádiu vývoje a post-mitotická nastává u dospělých listů (Gan, 2007). Pojem senescence se většinou používá ve významu senescence post-mitotické a tak je tomu i v této práci. Pro studium senescence

jsou často využívány rostliny pšenice, rýže a ječmene (jednoleté) z důvodu jejich významu pro zemědělství. Kromě těchto rostlin je pro studium senescence využívána i modelová rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), také jednoletá (Srivalli a Khanna-Chopra, 2004).

U rostlin během senescence dochází k remobilizaci živin (dusíku, fosforu, síry, kovových iontů) z již senescentních částí rostlin do těch, které přežívají. V jednoletých rostlinách jsou živiny přesouvány zpravidla do semen, u vytrvalých rostlin se živiny ukládají v přežívajících orgánech (kmen, pupeny, kořeny).

Proces senescence zahrnuje postupnou degradaci buněčných organel, buněk a tkání. Nejčasnější změny, které u senescence nastávají, jsou u chloroplastů, protože je zde alokováno velké množství látek (hlavně dusíku), které rostlina recykluje (Makino a Osmond, 1991). Dochází k masivní degradaci chloroplastových komponent, zejména proteinů a pigmentů, především chlorofylů (viz kapitola 2.3.1). Postupně tak dochází k redukci velikosti a počtu chloroplastů, zatímco jádra a mitochondrie zůstávají neporušená do poslední fáze stárnutí (Leshem, 1987; Gan a Amasino, 1997). Během senescence je také postupně inhibována funkce chloroplastů včetně fotosyntézy (viz kapitola 2.3.1).

U senescentních listů probíhá senescence zpravidla heterogenně v jejich ploše či průřezu. Pletivo v oblasti cévních svazků listů zůstává zelené a fotosynteticky aktivní až do poslední fáze stárnutí, což umožňuje efektivní relokaci živin ze senescentního listu do zbytku rostliny (Obr. 4) (Gan a Amasino, 1997; Niewiadomska et al., 2009).



Obr. 4 A: Recyklace živin v průběhu senescence. Některé z živin, jako je N, jsou transportovány do vyvíjejících se semen a mladých orgánů na vrcholu výhonku. B: Změna pigmentace listu břízy, která začíná postupně od okraje listu a postupuje směrem do středu. Pletivo v oblasti cévních svazků stárne později, aby byl zajištěn transport živin ze senescentních buněk (převzato z Gan a Amasino, 1997).

Senescence je jednak výsledkem přirozeného stárnutí rostlin, jednak může být iniciována v reakci na biotické a abiotické stresové faktory (Woolhouse, 1967; Smart, 1994; Gan a Amasino, 1997). Biotickými faktory se rozumí např. vzájemné stínění rostlin nebo infekce patogeny. Mezi abiotické stresové faktory patří kupříkladu vysoká nebo nízká teplota, nedostatek nebo nadbytek vody, přítomnost toxických látek, nízká nebo nadměrná intenzita světla, slanost půdy a nedostatek živin (Lim, 2003). Senescence je v případě působení stresových faktorů výrazně ovlivněna, může docházet i k jejímu předčasnému zahájení (Kyseláková et al., 2011).

2.3.1 Degradace chloroplastů během senescence

Chloroplasty jsou první organely, u kterých dochází ke změnám během přirozené nebo stresem indukované senescence. Proteiny obsažené v chloroplastech včetně enzymu RUBISCO (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa) jsou postupně degradovány a účinnost fotosyntézy se snižuje. Na degradaci chloroplastů se podílí několik intracelulárních degradačních drah. Jednou z nich je degradační dráha zahrnující tělíska obsahující RUBISCO (RCB – rubisco containing bodies) a dalším příkladem je autofagie celých chloroplastů (chlorofagie) (Ishida et al., 2014; Xie et al., 2015; Masclaux-Daubresse et al., 2017; Izumi a Nakamura, 2018). Předpokládá se různá míra zapojení jednotlivých způsobů degradace chloroplastů nebo jejich kombinace, mimo jiné v závislosti na podmínkách, při kterých senescence probíhá (Izumi a Nakamura, 2018).

U proteinu RUBISCO je již dlouho prokázáno, že se jeho obsah během senescence snižuje ještě dříve, než se sníží počet chloroplastů. To vedlo k hypotéze, že k jeho degradaci dochází mimo chloroplasty (Wittenbach et al., 1982). Pozdější výzkumy ukázaly, že RUBISCO přechází během jednoho z autofagických procesů do RCB, ty se přesouvají do centrální vakuoly a jejich obsah je ve vakuole degradován. Zbývající část chloroplastu (včetně tylakoidních membrán a jejich proteinů) je rozložena procesem chlorofagie, opět ve vakuole. Chiba et al. (2003) se domnívají, že za současného vytvoření RCB se chloroplasty mobilizují do vakuoly přes degradační dráhu autofagie. RCB se vyskytují už v rané fázi senescence, když se obsah RUBISCO začíná zmenšovat, i přesto, že obsah chlorofylů ještě nezačal klesat (Izumi a Nakamura, 2018).

Předpokládá se, že dráha degradace chloroplastů prostřednictvím RCB převládá za podmínek nízké ozářenosti nebo tmy, kdy rostlina nebo list trpí nedostatkem asimilátů v důsledku inhibice fotosyntézy. Na druhou stranu autofagie celých chloroplastů může

převládat za podmínek nadměrné intenzity světla (Izumi a Nakamura, 2018). Způsob degradace chloroplastů se může taktéž lišit u různých druhů rostlin. Ve výzkumu, který se zabýval senescencí listů pšenice seté (*Triticum aestivum*) a ječmene setého (*Hordeum vulgare*), bylo zjištěno, že se velikost a počet chloroplastů postupně zmenšovaly (Camp et al., 1982; Ono et al., 1995; Springer et al., 2015). Kromě pšenice a ječmene byl tento jev pozorován u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) (Wada et al., 2009). Naopak u fazole obyčejné (*Phaseolus vulgaris* L.) byl počet chloroplastů na buňku nezměněn až do poslední fáze stárnutí listů (Jenkins a Woolhouse, 1981).

Kromě snížení počtu a velikosti chloroplastů se mění během senescence i jejich ultrastruktura. Tyto změny zahrnují kupříkladu postupný zánik tylakoidních membrán, rozpadání gran. Současně dochází ke zvýšení počtu a velikosti plastoglobulí (Lichtenthaler a Sprey, 1966; Tuquet a Newman, 1980; Ghosh et al., 2001; Špundová et al., 2003; Tominaga et al., 2018). Senescence je obvykle doprovázena inhibicí fotosyntézy. Snížení funkce fotosyntézy v souvislosti se senescencí je způsobeno jak inhibicí reakcí Calvin-Bensonova cyklu (sekundární fáze fotosyntézy), tak primárních fotosyntetických reakcí na tylakoidních membránách. Inhibice sekundární fáze fotosyntézy souvisí se snížením aktivity a obsahu proteinu RUBISCO, stejně tak jako aktivity ostatních stromálních proteinů. (Lu a Zhang, 1998; Tang et al., 2005; Špundová et al., 2005; Sobieszczuk-Nowicka et al., 2018). K inhibici primárních reakcí fotosyntézy včetně fotochemie PSII dochází později (Camp et al., 1982; Grover, 1993; Špundová et al., 2005; Vlčková et al., 2006). Díky nerovnováze ve fungování primárních a sekundárních fotosyntetických procesů, může při senescenci docházet k akumulaci ROS a následnému oxidativnímu poškození chloroplastů i celých buněk (Vlčková et al., 2006).

2.3.2 Pohyb chloroplastů během senescence

Pro rostlinu je důležité, aby senescence probíhala efektivním způsobem kvůli zajištění maximální recyklace živin. Při senescenci narůstá riziko fotooxidativního poškození buněk v důsledku větší míry inhibice sekundárních fotosyntetických reakcí, v porovnání s reakcemi primárními (Camp et al., 1982; Grover, 1993; Špundová et al., 2005; Vlčková et al., 2006). Z tohoto hlediska je pro rostlinu důležité, do jaké míry zůstává v listech funkční pohyb chloroplastů. Jde hlavně o pohyb únikový, kterým chloroplasty zabráňují případnému poškození fotosyntetického aparátu nadměrnou ozářeností (Brugnoli a Björkman, 1992; Kagawa a Wada, 2002; Wada, 2016; Gotoh et al., 2018).

Nicméně světlem indukovaný pohyb v senescentních listech rostlin zatím nebyl systematicky studován, i když lze předpokládat jeho zhoršení. Rolencová (2008) se tímto částečně zabývala ve své diplomové práci na listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Pohyb chloroplastů byl sledován pomocí měření optické propustnosti (transmitance) listu při vlnové délce 436 nm spektrálním radiometrem. Na rostlině tabáku bylo vybráno 9 různě zelených listů, od tmavě zeleného po žlutý. Listy adaptované na tmu po dobu 30 minut byly vystaveny modrému světlu o vysoké intenzitě ($400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) po dobu 30 minut a následně 30 minut nižší intenzitě světla ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Bylo zjištěno, že u nejzelenějšího listu s relativním obsahem chlorofylu 41 vzrostla transmitance po aplikaci světla o vysoké intenzitě 18x, což bylo nejvíce v rámci měřených listů a chloroplasty se pohybovaly nejrychleji. U listu s relativním obsahem chlorofylu přibližně polovičním (hodnota 20) vzrostla transmitance jen 4x. U senescenčního listu (hodnota 5) k pohybu chloroplastů po aplikaci světla nedošlo. U listů s relativním obsahem chlorofylu ≥ 30 se chloroplasty po 30 minutách slabého světla vracely do původní pozice (v jaké byly před působením silného modrého světla), u listů s menším relativním obsahem chlorofylu pak docházelo k postupné inhibici tohoto pohybu. S klesajícím obsahem chlorofylu tedy došlo v listech tabáku ke snížení rychlosti a rozsahu pohybu chloroplastů vyvolaného světlem.

Další informace o změnách pohybu chloroplastů v různě starých listech tabáku s rozdílným obsahem chlorofylu byly zmíněny v práci Nauš et al. (2010), která se zabývala studiem pohybu chloroplastů v jiných souvislostech. Měření pohybu chloroplastů bylo prováděno na různě zelených listech, od tmavě zeleného po žlutý u mladších a starších rostlin tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Únikový pohyb chloroplastů byl v tomto případě vyvolán modrým světlem o intenzitě ($340 \pm 20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) působícím po dobu 30 minut, následně byl vyvolán akumulární pohyb chloroplastů působením světla o nízké intenzitě ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) po dobu 30 minut. V pozici parastrophe (tj. po únikovém pohybu) a diastrophe (tj. po akumulárním pohybu) autoři změřili pomocí přístroje SPAD relativní obsah chlorofylu. Toto měření je založeno na měření transmitance, má na něj tedy vliv pozice chloroplastů, což může na jedné straně způsobit nesprávné stanovení obsahu chlorofylu, na straně druhé toho ale lze využít právě pro stanovení pozice, resp. pohybu chloroplastů

Autoři zjistili, že hodnota SPAD naměřená na listu s chloroplasty v pozici parastrophe může být až o 35 % nižší než hodnota naměřená na stejném listu s chloroplasty v pozici diastrophe, navzdory nezměněnému obsahu chlorofylu. Rozdíl je

způsoben právě pouze různou pozicí chloroplastů, kdy v pozici parastrophe je světlo v listu méně absorbováno, což přístroj mylně vyhodnotí jako nižší obsah chlorofylu. Ze srovnání rozdílů v hodnotách SPAD v čelní a boční pozici u mladších a starších rostlin vyplynulo, že tyto rozdíly byly menší u starších rostlin, což naznačuje menší rozsah pohybu chloroplastů. Podle autorů není jasné, zda byl pohyb chloroplastů u starších rostlin skutečně inhibován anebo mohl být menší rozsah změn transmitance vyvolaných pohybem chloroplastů způsoben odlišnými optickými vlastnostmi listů starších rostlin.

Inhibice únikového pohybu u listů starších rostlin oproti listům rostlin mladších je okrajově zmíněna také v práci Nauš et al. (2016) u ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.). Působením modrého světla ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) po dobu 25 minut došlo u listů mladšího ječmene k vyvolání výrazného únikového pohybu. Naopak u listů staršího ječmene byl působením stejného světla vyvolán méně než poloviční rozsah únikového pohybu.

Bylo zjištěno, že při senescenci dochází také k narušení obvyklého uspořádání chloroplastů v buňce, zřejmě z důvodu porušení ukotvení chloroplastů na plazmatickou membránu (Wittenbach et al., 1982; Vlčková et al., 2006).

V souvislosti s výše uvedenými informacemi jsme se rozhodli zjistit, zda a jak se mění světlem vyvolaný pohyb chloroplastů v závislosti na různém obsahu chlorofylu u listů huseníčku rolního, pšenice seté a tabáku virginského, a objasnit do jaké míry zůstává v senescentních listech pohyb chloroplastů funkční.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Rostlinný materiál

Všechna měření byla prováděna na listech tří druhů rostlin – huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L., ekotyp Col-0), pšenice seté (*Triticum aestivum* L. cv. Aranka) a tabák virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Pro pěstování rostlin byly použity květináče o velikosti 7x7 cm naplněné pěstebním substrátem Potgrond H (Klasmann Deilmann, Německo). Následně byla pro jejich vypěstování využita fytokomora (Snijders Scientific, Nizozemí) s podmínkami: teplota 21 °C, 16 h světlo/8 h tma, ozáření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, relativní vlhkost vzduchu 50 %. Rostliny byly pravidelně zalévány vodou z vodovodního řádu, jednou týdně pak Knopovým živným roztokem. Experimenty byly prováděny na různě zelených listech rostlin v juvenilní a reprodukční fázi. Měření huseníčku rolního proběhlo v dubnu 2019, listopadu 2019 a březnu 2020. Pšenice byla měřena v červnu a říjnu 2019 a tabák v březnu, červnu a září 2019.

3.1.1 Použité přístroje

zdroj studeného světla KL-2500 (Schott Glass, Mainz, Německo)

integrální radiometr LI-250A (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA)

spektrální radiometr Spectrapen SP-100 (PSI, Drásov, Česká republika)

chlorofylmetr SPAD-502 (Konica Minolta, Japonsko)

centrifuga 5430R (Eppendorf, Hamburg, Německo)

spektrofotometr UNICAM UV - 550 (Thermo Spectronic, Cambridge, Velká Británie)

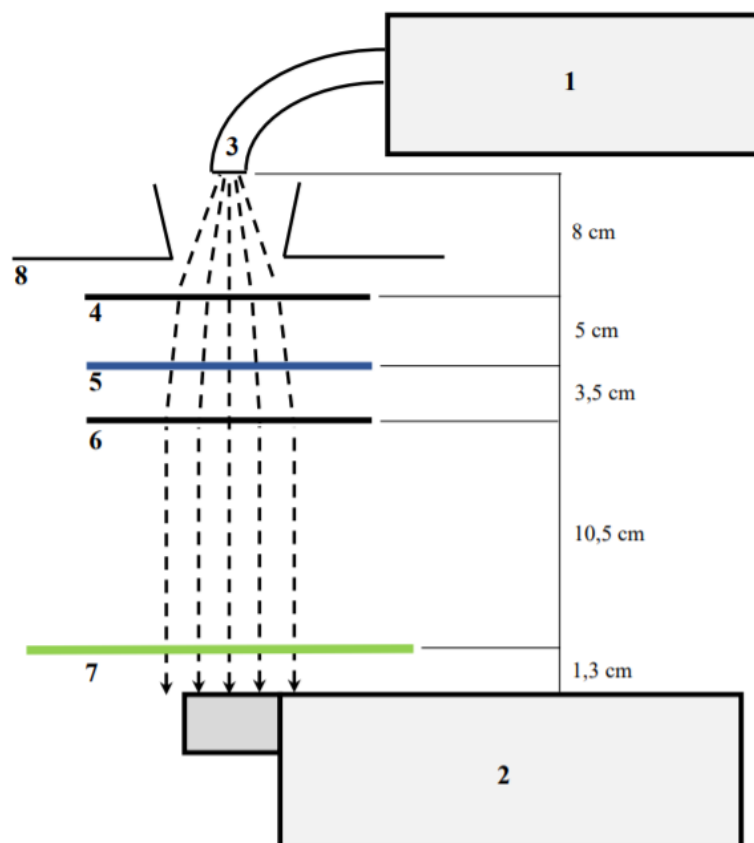
fluorimetr PEA (Hansatech, King's Lynn, Velká Británie)

3.2 Metody

3.2.1 Měření pohybu chloroplastů

Pohyb chloroplastů byl sledován pomocí měření změn kolimované transmitance listu. Transmitance (optická propustnost) vyjadřuje množství světla, které projde vzorkem. Působením modrého světla (s maximem kolem 460 nm) na listy zatměných rostlin byly vyvolány změny v transmitanci odrážející pohyb chloroplastů. Modré světlo bylo generováno pomocí zdroje studeného světla KL-2500 a modrého filtru BG12 (Schott Glass, Wiesbaden, Německo) (Obr. 5). Stejně světlo (pouze s vyšší intenzitou) bylo

použito jako měřicí. Intenzita světla byla měřena v μmol fotonů fotosynteticky aktivního záření (400 – 700 nm) dopadajících na m^2 za sekundu pomocí integrálního radiometru LI-250A.



Obr. 5 Schéma aparatury pro měření kolimované transmittance (optické propustnosti) listu. (1) zdroj studeného světla KL-2500, (2) Spectrapen SP-100, (3) světlovod, (4) kolimátor I, (5) modrý filtr, (6) kolimátor II, (7) měřený vzorek – list, (8) stínítko. Vyznačeny vzdálenosti mezi jednotlivými komponentami aparatury (cm). (Převzato ze Savara, 2018).

Pomocí spektrálního radiometru Spectrapen SP-100 byly měřeny změny kolimované transmittance vyvolané modrým světlem na listech oddělených od rostliny. Umístění čidla radiometru v malé vzdálenosti (1,3 cm) pod listem umožňuje detekovat převážně kolimované paprsky procházející listem, díky čemuž je tato metoda citlivá. Před měřením bylo důležité ponechat rostliny ve tmě (minimálně po dobu 30 minut), aby se chloroplasty nacházely ve stejné výchozí pozici. Nejprve bylo změřeno spektrum měřicího světla dopadajícího na list (I_0 - měření bez vloženého listu; intenzita světla $450 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Poté následovalo změření spektra s vloženým listem (I). Z poměru I/I_0 bylo získáno spektrum kolimované transmittance, ze kterého byla odečtena hodnota při 436 nm. Tato vlnová délka byla zvolena z důvodu citlivé reakce transmittance na pohyb chloroplastů. Poté bylo po dobu 40 minut aplikováno silné modré světlo

($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vyvolávající únikový pohyb chloroplastů a následně po dobu 20 minut slabé modré světlo ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pro vyvolání akumulčního pohybu. Každých 10 minut bylo změřeno spektrum s vloženým listem. Vypočítané hodnoty transmitance při 436 nm v jednotlivých časech měření byly nanormovány na výchozí hodnotu kolimované transmitance před působením silného modrého světla. Řapíky oddělených listů byly obaleny buničinou a vlhčeny během měření, aby nedocházelo k zasychání listu. Celkově měření jednoho listu probíhalo 60 minut. V obrázcích jsou prezentovány jednak relativní hodnoty kolimované transmitance (Rel. Tc) během působení modrého světla, jednak závislost relativní kolimované transmitance naměřené po 40 min působení silného modrého světla (jako maximální dosažené hodnoty; Rel. Tc (40 min)) na obsahu chlorofylu.

3.2.2 Stanovení relativního obsahu chlorofylu

Pro nedestruktivní měření relativního obsahu chlorofylu byl využit chlorofylmetr SPAD-502. Stanovení obsahu chlorofylu v listech rostlin přístrojem SPAD-502 je neinvazivní, bez nutnosti extrakce pigmentů. Nicméně použití chlorofylmetru je problematické z důvodu heterogenity obsahu chlorofylů v ploše listů, která bývá právě u senescentních listů velká. Měření pomocí chlorofylmetru bylo tedy použito pouze k výběru listů s různým obsahem chlorofylu, u kterých byl následně měřen pohyb chloroplastů, resp. změny kolimované transmitance. Před měřením byly rostliny umístěny na 20 – 30 minut do tmy, aby se chloroplasty nacházely ve stejné výchozí pozici, protože pozice chloroplastů může ovlivnit hodnotu naměřenou přístrojem (Nauš et al., 2010). Ve zvolené části listu byla hodnota relativního obsahu chlorofylu odečtena pětikrát až šestkrát a průměrná hodnota z těchto měření byla vyhodnocena jako reprezentativní pro daný list.

3.2.3 Stanovení skutečného obsahu chlorofylu

Pro stanovení skutečného obsahu chlorofylu v různě zelených listech byla využita destruktivní metoda – spektrofotometrické stanovení. Po změření změn kolimované transmitance listu radiometrem Spectrapen SP-100 byla měřená část listu oddělena a obkreslena fixou na folii pro zjištění listové plochy v programu ImageJ. U tabáku byl pro získání listového segmentu použit korkovrt s průměrem 12 mm, u pšenice byly zvoleny listové segmenty o velikosti přibližně 3x1 cm a u huseníčku přibližně 2x2 cm. Listové segmenty byly zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Z jednotlivých segmentů byl poté připraven acetonový extrakt následujícím způsobem: segment byl rozetřen v třecí misce spolu s malým množstvím $MgCO_3$ (váže buněčné kyseliny a zabraňuje přeměně chlorofylu na feofytin) a 80% acetonu. Poté byl extrakt (po opakovaném vypláchnutí misky 80% acetonem) slit do centrifugační kyvety (celkové množství acetonu 1 ml). Jednotlivé kyvety byly vyváženy a vloženy do stolní centrifugy 5430R, která byla nastavena na 3600 g, 15 minut a 4 °C. Poté byla na spektrofotometru UNICAM UV - 550 změřena absorbance supernatantu při vlnové délce 470;646,8;663,2;750 nm (tloušťka kyvety byla 1 cm). Supernatant byl případně zředěn tak, aby absorbance při vlnové délce 663,2 nm byla v rozmezí 0,4 – 0,8. Byl zapsán přesný objem supernatantu. Příprava extraktu a manipulace se supernatantem probíhala při slabém zeleném světle. Z naměřených hodnot absorbance se vypočítal obsah chlorofylů (a + b) podle Lichtenthalera (1987). Získaná hodnota se vynásobila celkovým objemem extraktu a vydělila se hodnotou plochy listového segmentu, která byla zjištěna v programu ImageJ. Výsledkem byla hodnota obsahu chlorofylu na plochu v jednotlivých listových segmentech.

Lichtenthalerova rovnice:

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

$$Chl (a + b) = \frac{\text{získaná hodnota [}\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}\text{]} * \text{objem extraktu [ml]}}{\text{listová plocha [cm}^2\text{]}}$$

3.2.4 Stanovení parametru F_v/F_M

Parametr F_v/F_M stanovovaný z chlorofylové fluorescence měřené *in vivo* na listech adaptovaných na tmou odráží maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II. Vypočítá se jako poměr variabilní fluorescence F_v ($F_v = F_M - F_0$) a maximální fluorescence F_M , kde F_0 je minimální intenzita fluorescence. U plně funkčních listů dosahuje hodnoty kolem 0,8. V bakalářské práci byl tento parametr použit k posouzení funkčnosti fotosystému II v různých zelených listech, protože tato funkčnost během senescence (tj. s poklesem obsahu chlorofylu) klesá (Špundová et al., 2003). K měření F_v/F_M byl použit fluorimetr PEA, listy byly před měřením zatemněny po dobu 20 – 30 minut. Fluorescenční signál byl snímán z adaxiální strany listů. Měření bylo provedeno v přibližně stejné oblasti listu jako měření obsahu chlorofylu a kolimované

transmitance. Intenzita měřicího světla byla $5400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (50 % maximální intenzity přístroje) a doba měření byla nastavena na 2 s.

3.2.5 Zpracování získaných dat

Data byla zpracována v programu Microsoft Office Excel a ImageJ.

4 VÝSLEDKY

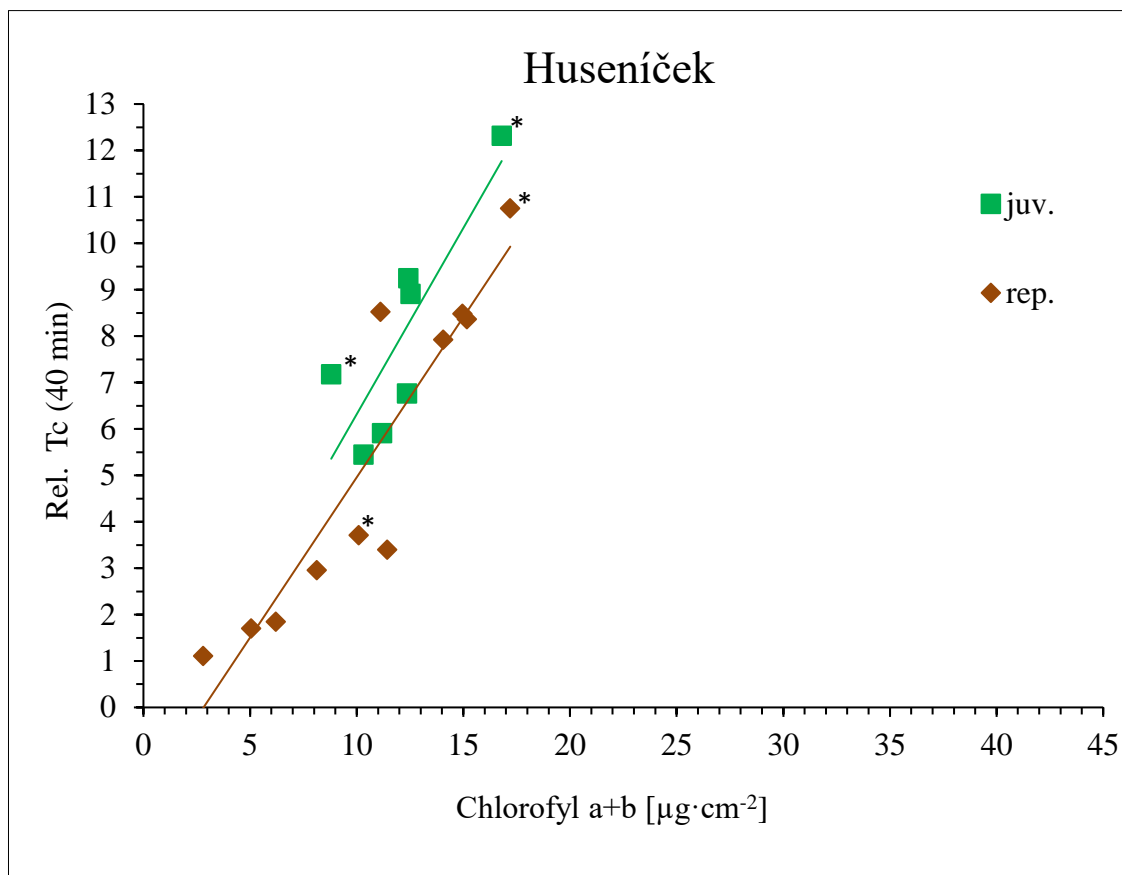
V našem experimentu bylo zkoumáno, zda a jak se mění pohyb chloroplastů v listech huseníčku rolního, pšenice seté a tabáku virginského během jejich senescence. Pro experiment byly pomocí chlorofylmetru SPAD-502 z rostlin v juvenilní a reprodukční fázi vybrány listy s různým obsahem chlorofylu. Pohyb chloroplastů byl měřen přístrojem Spectrapen SP-100, který zaznamenával změny kolimované transmitance. Pohyb chloroplastů byl vyvolán modrým světlem o vyšší intenzitě (únikový pohyb) nebo nízké intenzitě (akumulační pohyb). Toto měření jsme doplnili spektrofotometrickým stanovením obsahu chlorofylu. Dále nás zajímalo, jestli byla u měřených listů ovlivněna účinnost fotosystému II (parametr F_v/F_M), tu jsme změřili fluorimetrem PEA.

4.1 Únikový a akumulační pohyb chloroplastů a parametr F_v/F_M v listech huseníčku rolního

Obrázek 6 zobrazuje hodnoty relativní kolimované transmitance (T_c) naměřené po 40 minutách působení modrého světla ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) na různě zelených listech huseníčku rolního v juvenilní a reprodukční fázi. Tato relativní hodnota T_c odráží maximální dosažený rozsah únikového pohybu chloroplastů vyvolaného daným světlem. Obsah chlorofylu v měřených listech byl v rozmezí 3 až $17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Zelené listy v juvenilní fázi rostlin byly charakteristické velkým rozsahem únikového pohybu chloroplastů. Největší míra pohybu byla naměřena u zeleného listu s přibližným obsahem chlorofylu $17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Relativní T_c se oproti výchozí hodnotě T_c tohoto listu se zvětšila více než 12 krát. S klesajícím obsahem chlorofylu docházelo postupně k poklesu rozsahu únikového pohybu chloroplastů. Nejmenší rozsah pohybu chloroplastů byl změřen u listu s obsahem chlorofylu přibližně $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Jeho relativní T_c se zvětšila 5 krát po 40 minutách působení silného modrého světla, byla tedy nižší o 60 % ve srovnání se zmíněným nejzelenějším listem.

Podobně jako v případě listů rostlin v juvenilní fázi, u rostlin v reprodukční fázi byla v zelených listech zjištěna větší míra únikového pohybu ve srovnání se žlutými listy. Nejvyšší rozsah pohybu byl změřen u zeleného listu s obsahem chlorofylu přibližně $17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Relativní T_c tohoto listu se zvětšila 12 krát po 40 minutách působení silného modrého světla. Naopak u žlutého listu s obsahem chlorofylu $3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ byl pohyb chloroplastů téměř zcela inhibován, jelikož se jeho T_c v podstatě

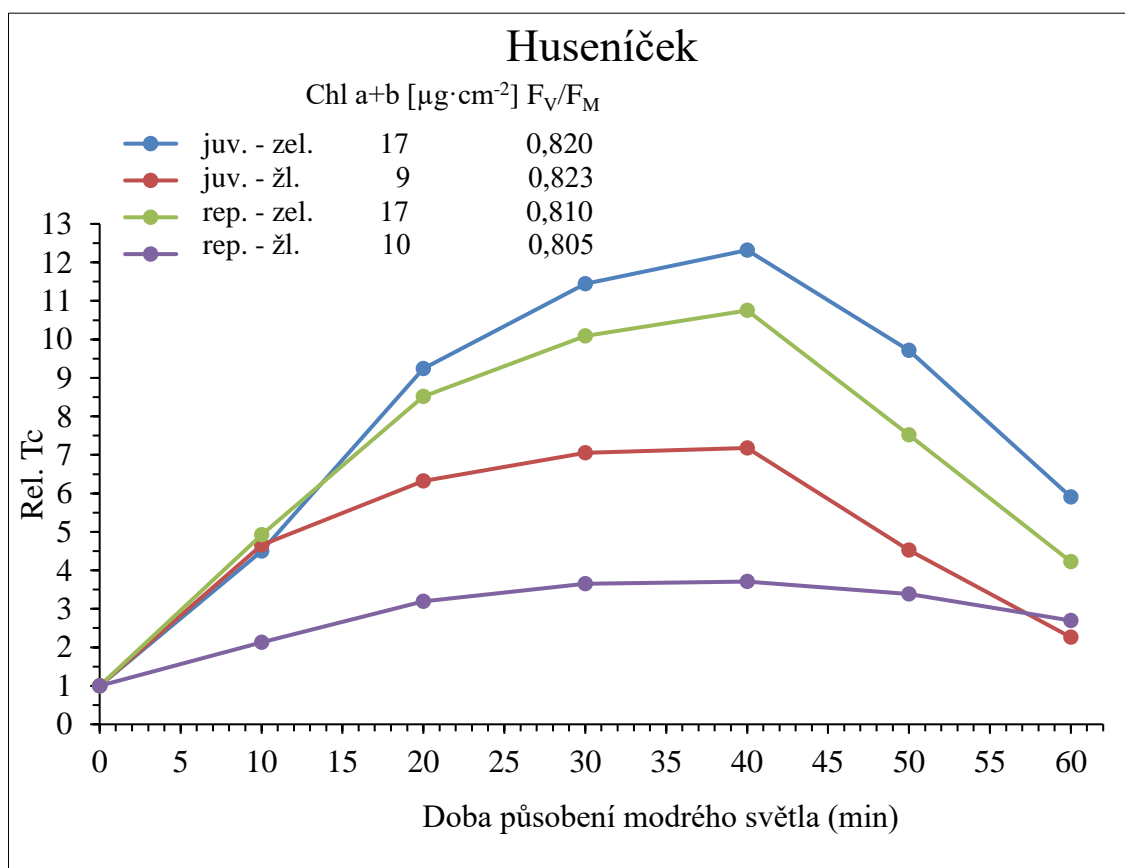
nezměnila po 40 minutách působení silného světla. Celkově byl rozsah pohybu chloroplastů u listů v reprodukční fázi nižší přibližně o 20 % ve srovnání s listy v juvenilní fázi s podobným obsahem chlorofylu.



Obr. 6 Relativní kolimovaná transmittance listů huseníčku rolního změřená po 40 minutách působení modrého světla ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vyvolávajícího únikový pohyb chloroplastů. Vztaheno k počáteční hodnotě Tc listů adaptovaných na tmu (tj. před aplikací modrého světla). Měřeno 7 listů v juvenilní fázi (juv.) a 11 v reprodukční fázi (rep.) rostlin. Hvězdičky označují reprezentativní listy vybrané pro znázornění změn Tc během působení modrého světla v Obr. 7.

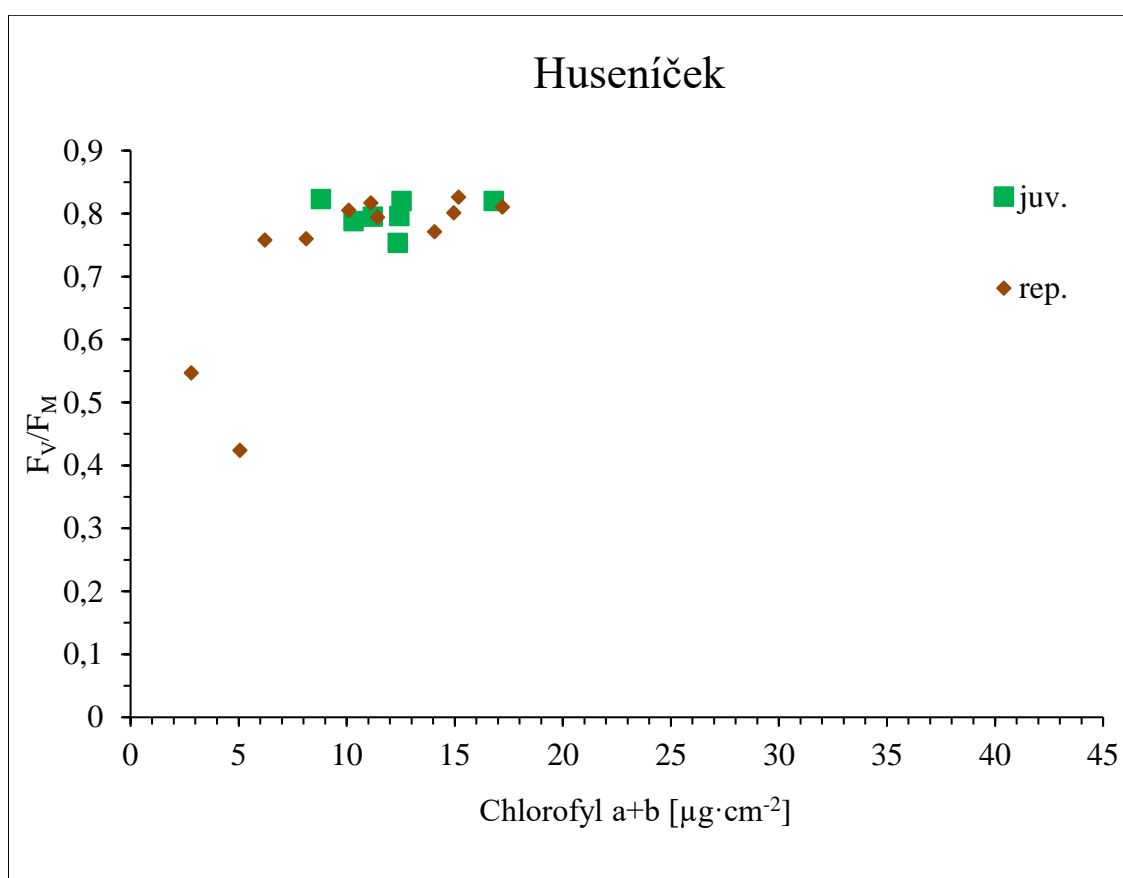
V Obr. 7 jsou prezentovány všechny hodnoty relativní Tc naměřené během 40 minut působení silného modrého světla a následujících 20 minut působení slabého modrého světla u vybraných listů. Byly vybrány listy rostlin v juvenilní a reprodukční fázi s přibližně stejným (vyšším a nižším) obsahem chlorofylu (označené * v Obr. 6). Nárůst relativní Tc během prvních 40 minut odráží únikový pohyb chloroplastů, kdy se chloroplasty pohybují z oblasti ozářené světlem směrem k buněčným stěnám rovnoběžným s dopadajícím zářením, aby zabránily absorpci nadměrného světla a případnému poškození fotosyntetického aparátu. Největší rozsah únikového a akumulárního pohybu byl zjištěn u zeleného listu v juvenilní fázi („juv. – zel.“, obsah chlorofylu $17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), jak bylo patrné už v Obr. 6. Chloroplasty v tomto listu nejlépe

reagovaly na silné světlo, už po 20 minutách jeho působení se relativní T_c zvětšila 9 krát, po 40 minutách 12 krát. Po 40 minutách silného světla bylo na listy aplikováno světlo o nízké intenzitě ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a chloroplasty tak postupně začaly vykonávat akumulární pohyb, tedy přesun k buněčným stěnám kolmým k dopadajícímu záření, aby mohly absorbovat více světla a zvýšily účinnost fotosyntézy. Jak už bylo řečeno, nejvyšší únikový i akumulární pohyb byl zaznamenán u zeleného listu v juvenilní fázi, mírně menší únikový pohyb byl pak u zeleného listu v reprodukční fázi („rep. – zel.“). Akumulární pohyb u tohoto listu byl podobného rozsahu jako u listu „juv. – zel.“. U žlutého listu v juvenilní fázi („juv. – žl.“) byl únikový pohyb menší než v předešlých dvou listech, nicméně akumulární pohyb byl u něj relativně funkční. U žlutého listu v reprodukční fázi („rep. – žl.“) byly výrazně inhibovány oba typy pohybu, přestože se nejednalo o list v pokročilé fázi senescence. U listu s nejmenším obsahem chlorofylu ($3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, rostlina v reprodukční fázi) byl v podstatě zcela inhibován jak únikový (Obr. 6), tak akumulární pohyb (data nedoložena).



Obr. 7 Relativní kolimovaná transmittance vybraných listů huseníčku rolního při únikovém a akumulárním pohybu chloroplastů. Vybrány listy rostlin v juvenilní a reprodukční fázi s podobným obsahem chlorofylu. Únikový pohyb chloroplastů byl vyvolán modrým světlem o intenzitě $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (0 – 40 min), akumulární pohyb modrým světlem o intenzitě $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (40 – 60 min). Uvedeny hodnoty obsahu chlorofylu a parametr F_v/F_M měřených listů.

U většiny listů huseníčku rolního v juvenilní i reprodukční fázi byla zjištěna podobná hodnota F_V/F_M , přestože se listy lišily v obsahu chlorofylu (Obr. 8). Hodnota parametru F_V/F_M kolem 0,8 (0,76 – 0,82) indikuje, že ve většině měřených listů (včetně nejméně zelených listů rostlin v juvenilní fázi s přibližně polovičním obsahem chlorofylu oproti nejzelenějším listům) nebyly narušeny primární reakce fotosyntézy a nedocházelo k inhibici funkce fotosystému II. U dvou listů v reprodukční fázi s obsahem chlorofylu 3 a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ však již došlo k poklesu maximální účinnosti fotosystému II, vzhledem k výraznému poklesu F_V/F_M . Tento pokles byl způsoben pokročilou senescencí těchto listů.

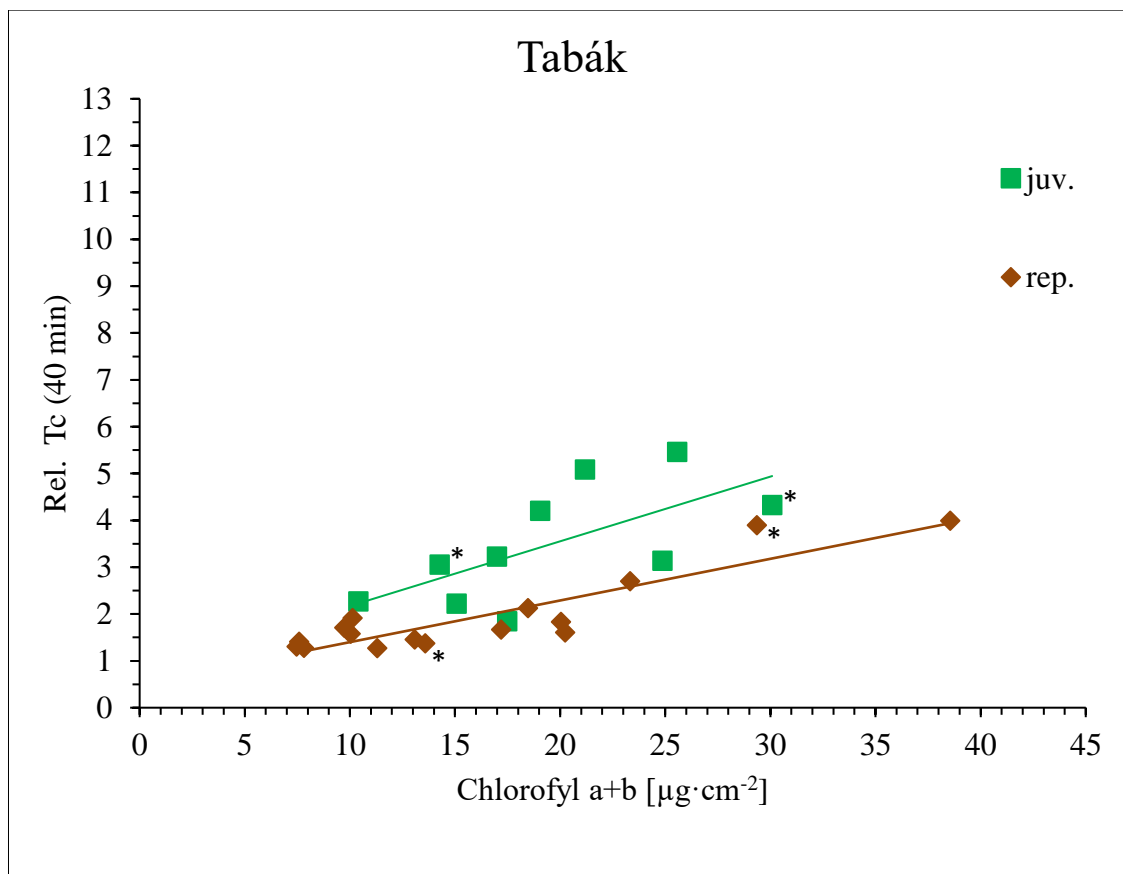


Obr. 8 Maximální účinnost fotochemie fotosystému II (parametr F_V/F_M) u listů huseníčku rolního použitých k měření pohybu chloroplastů. Měřeno 7 listů v juvenilní fázi a 11 v reprodukční fázi rostlin.

4.2 Únikový a akumulční pohyb chloroplastů a parametr F_v/F_M v listech tabáku virginského

Hodnoty relativní T_c naměřené na listech tabáku virginského po 40 minutách působení modrého světla ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), které odrážejí rozsah únikového pohybu chloroplastů, jsou znázorněny na Obr. 9. Obsah chlorofylu v měřených listech byl v rozmezí 7 až $39 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, což bylo největší rozmezí v rámci studovaných rostlinných druhů. Listy v juvenilní fázi byly stejně jako u huseníčku rolního charakteristické větším rozsahem únikového pohybu chloroplastů než listy v reprodukční fázi, jak napovídají vyšší hodnoty relativní T_c listů se srovnatelným obsahem chlorofylu. Největší míra pohybu byla naměřena u zeleného listu v juvenilní fázi s přibližným obsahem chlorofylu $26 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Obr. 9). Nicméně relativní T_c tohoto listu se oproti výchozí hodnotě T_c zvětšila pouze 5 krát, což je v porovnání s listem huseníčku s největším rozsahem únikového pohybu méně než poloviční nárůst, i přesto, že byl obsah chlorofylu v listu tabáku větší. Stejně jako u huseníčku (Obr. 6) docházelo u listů juvenilního tabáku postupně s klesajícím obsahem chlorofylu k poklesu rozsahu únikového pohybu chloroplastů (Obr. 9). U huseníčku i tabáku byl rozdíl rozsahu únikového pohybu mezi nejvíce a nejméně zelenými listy podobný, relativní T_c (40 min) klesla z 12 na 6 u huseníčku a z 5 na 2,5 u tabáku, což představuje přibližně 50% pokles.

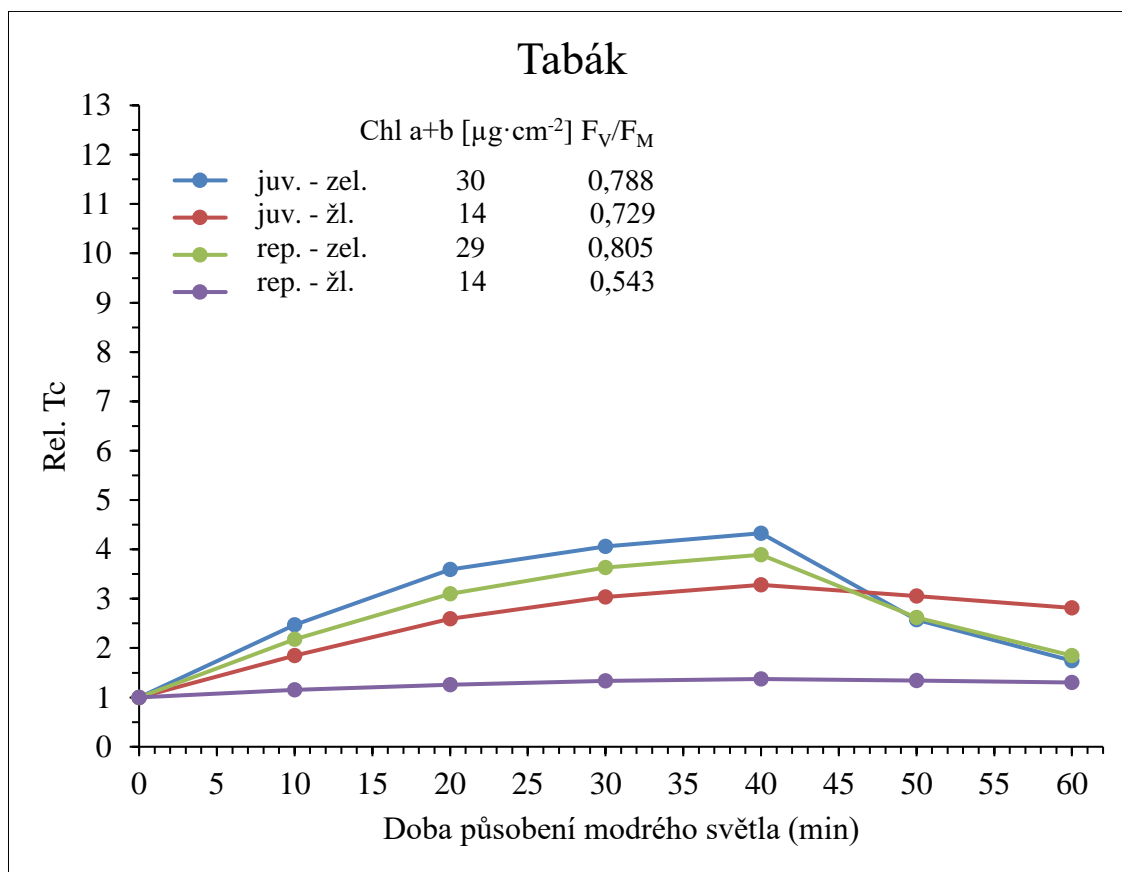
U zelených listů rostlin v reprodukční fázi byla opět zjištěna větší míra únikového pohybu ve srovnání se žlutými listy, což byl obdobný výsledek jako u huseníčku. Celkově byl rozsah pohybu chloroplastů u listů v reprodukční fázi nižší přibližně o 30 % ve srovnání s listy v juvenilní fázi s podobným obsahem chlorofylu. V porovnání s listy huseníčku bylo tedy snížení rozsahu pohybu v reprodukční fázi oproti juvenilní mírně vyšší. Nejvyšší rozsah pohybu chloroplastů u listů tabáku v reprodukční fázi byl zjištěn u listu s obsahem chlorofylu přibližně $39 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Obr. 9). Relativní T_c tohoto listu se zvětšila přibližně 4 krát po 40 minutách působení silného modrého světla. U listů s obsahem chlorofylu pod $14 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ byl únikový pohyb chloroplastů inhibován, jelikož se jejich relativní T_c téměř nezvětšila působením silného světla. Relativní T_c žlutých listů tak byla nižší přibližně o 65 % ve srovnání s posledně zmíněným zeleným listem. V porovnání s listy huseníčku byly hodnoty relativní T_c u listů tabáku v reprodukční fázi nižší, podobně jako u rostlin v juvenilní fázi (Obr. 9).



Obr. 9 Relativní kolimovaná transmitance listů tabáku virginského změřená po 40 minutách působení modrého světla ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vyvolávajícího únikový pohyb chloroplastů. Vztaheno k počáteční hodnotě Tc listů adaptovaných na tmu (tj. před aplikací modrého světla). Měřeno 10 listů v juvenilní fázi (juv.) a 16 v reprodukční fázi (rep.) rostlin. Hvězdičky označují reprezentativní listy vybrané pro znázornění změn Tc během působení modrého světla v Obr. 10.

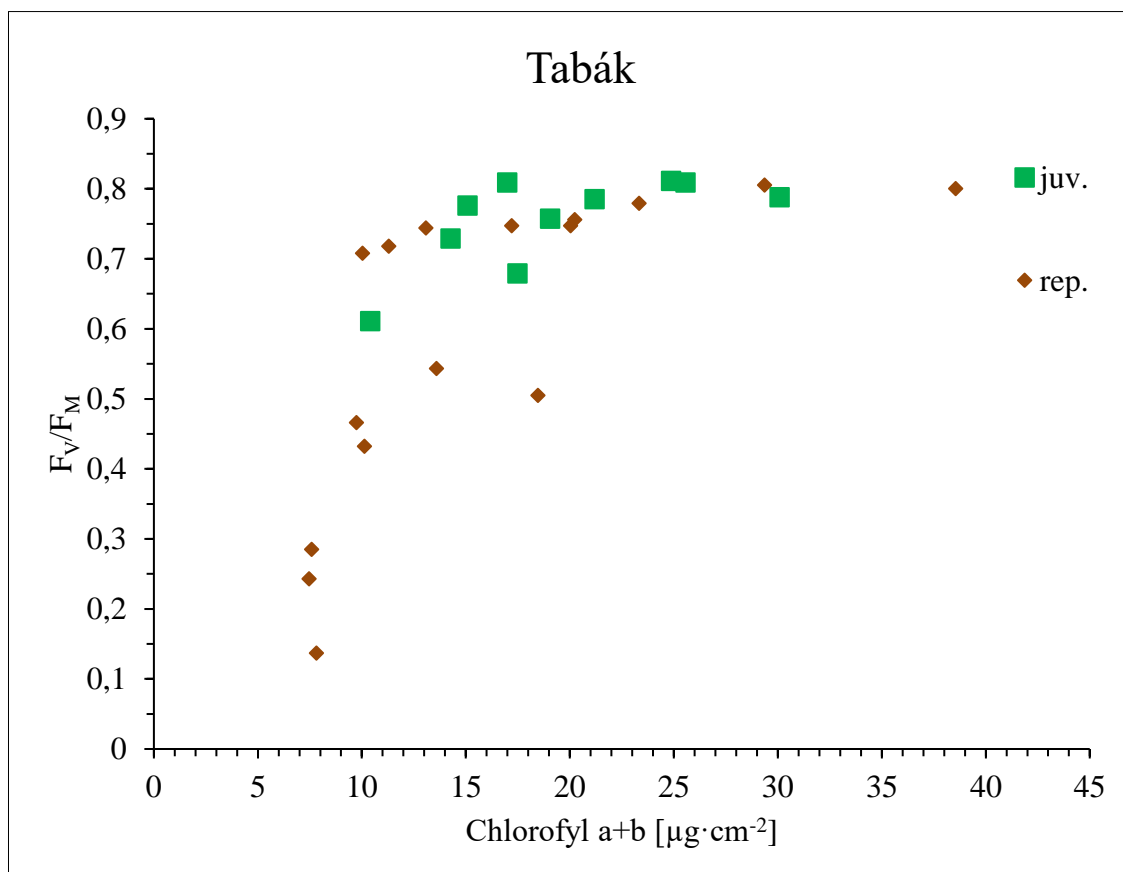
Na Obr. 10 jsou znázorněny hodnoty relativní Tc odrážející pohyb chloroplastů u vybraných listů tabáku během působení silného a slabého modrého světla. Největší rozsah únikového pohybu v rámci vybraných listů byl změřen u zeleného listu v juvenilní fázi („juv. zel.“). Chloroplasty v tomto listu reagovaly na světlo nejlépe a byly tak schopny vykonávat únikový pohyb nejrychleji a v největším rozsahu. Působením slabého světla se také rychle vrátily do své původní pozice. Jen o něco menší únikový pohyb byl zaznamenán u zeleného listu v reprodukční fázi („rep. zel.“). Akumulační pohyb u tohoto listu vypadal podobně jako v případě listu „juv. zel.“. U žlutého listu v juvenilní fázi („juv. – žl.“) byl rozsah únikového pohybu menší než u obou zelených listů, avšak jeho Tc se během působení silného modrého světla zvýšila, na rozdíl od Tc žlutého listu v reprodukční fázi. Jeho akumulární pohyb byl však inhibován, protože během aplikace slabého světla Tc neklesla. U žlutého listu v reprodukční fázi („rep. – žl.“) se relativní Tc za celou dobu působení modrého světla

nezměnila a lze tedy říci, že chloroplasty nevykonávaly žádný pohyb, ačkoliv byl obsah chlorofylu tohoto listu ještě relativně velký. Stejný obsah chlorofylu byl zjištěn u prezentovaného žlutého listu v juvenilní fázi („juv. – žl.“), u toho však relativní T_c během silného světla ještě mírně narůstala (Obr. 10), což svědčí o alespoň částečně funkčním únikovém pohybu chloroplastů.



Obr. 10 Relativní kolimovaná transmitance vybraných listů tabáku při únikovém a akumulčním pohybu chloroplastů. Vybrány listy rostlin v juvenilní a reprodukční fázi s podobným obsahem chlorofylu. Únikový pohyb chloroplastů byl vyvolán modrým světlem o intenzitě $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (0 – 40 min), akumulční pohyb modrým světlem o intenzitě $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (40 – 60 min). Uvedeny hodnoty obsahu chlorofylu a parametr F_v/F_M měřených listů.

U listů tabáku, u kterých byl měřen pohyb chloroplastů, docházelo s poklesem obsahu chlorofylu k poklesu maximální účinnosti fotochemie fotosystému II, zejména u listů rostlin v reprodukční fázi (Obr. 11). Většina listů v juvenilní fázi měla podobnou maximální účinnost fotosystému II, jak indikuje parametr F_v/F_M dosahující hodnot kolem 0,8 (0,75 – 0,81). Tento výsledek ukazuje, že nebyly narušeny primární reakce fotosyntézy a nedocházelo k inhibici funkce fotosystému II. U sedmi listů v reprodukční fázi byla snížená účinnost fotosystému II, nicméně pohyb chloroplastů nebyl inhibovaný u všech těchto listů, ale jen u některých. Ačkoliv u listů s obsahem chlorofylu 10, 14 a 18 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ došlo k poklesu maximální účinnosti fotosystému II, o čemž svědčil výrazný pokles F_v/F_M (0,43 – 0,54), jejich zhoršená funkce F_v/F_M nebyla doprovázena zhoršeným pohybem chloroplastů, což znamená, že maximální účinnost fotosystému II a pohyb chloroplastů nebudou v příčinné souvislosti.

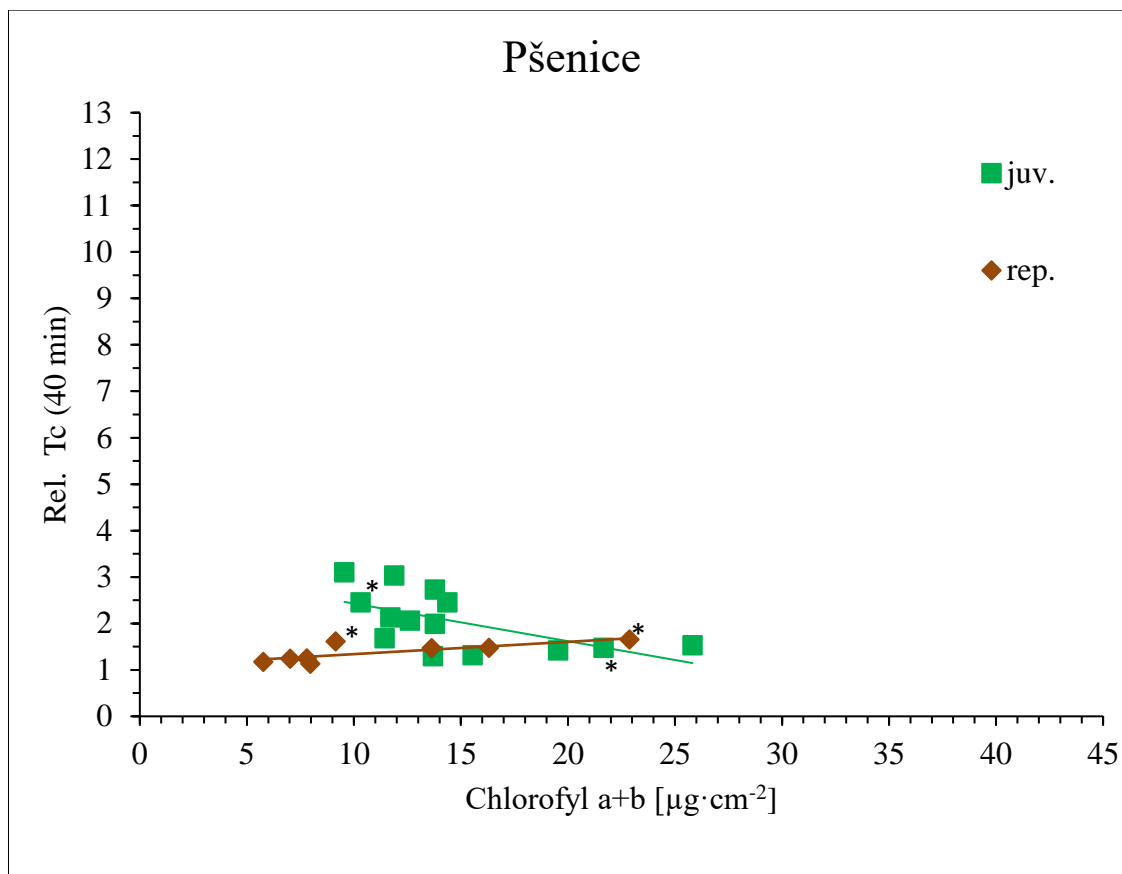


Obr. 11 Maximální účinnost fotochemie fotosystému II (parametr F_v/F_M) u listů tabáku použitých k měření pohybu chloroplastů. Měřeno 10 listů v juvenilní fázi a 16 v reprodukční fázi rostlin.

4.3 Únikový a akumulární pohyb chloroplastů a parametr F_v/F_M v listech pšenice seté

U pšenice byla obecně zaznamenána nejmenší míra pohybu chloroplastů v rámci měřených rostlinných druhů, a to včetně zelených listů, jak demonstrují hodnoty relativní T_c listů v juvenilní i reprodukční fázi, které byly nižší než v listech huseníčku a tabáku. Obsah chlorofylu v měřených listech rostlin pšenice v juvenilní a reprodukční fázi byl v rozmezí 6 až 26 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Obr. 12).

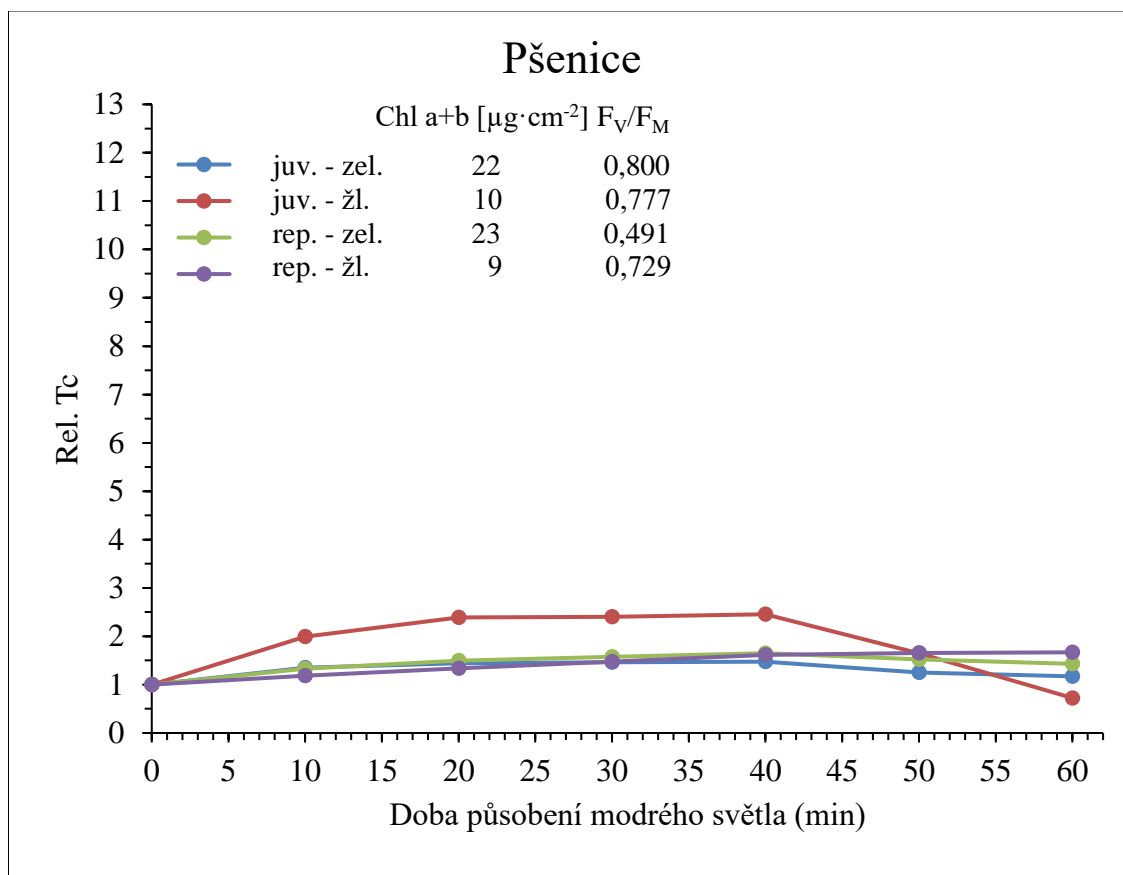
Největší míra únikového pohybu chloroplastů byla zjištěna u listu v juvenilní fázi s přibližným obsahem chlorofylu 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Relativní transmitance tohoto listu se zvětšila přibližně 3 krát. U listu s největším obsahem chlorofylu 26 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ relativní T_c narostla jen asi o 50%. V případě pšenice tedy listy s menším obsahem chlorofylu vykazovaly spíše větší míru únikového pohybu chloroplastů než listy zelenější, což je opačný trend než u huseníčku či tabáku. U listů pšenice v reprodukční fázi byla ve žlutých listech naopak zjištěna menší míra únikového pohybu ve srovnání se zelenými listy, což odpovídalo běžnému trendu zaznamenanému v našich měřeních. Nejvyšší míra pohybu byla změřena u zeleného listu s obsahem chlorofylu přibližně 23 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Relativní T_c se tohoto listu zvětšila pouze 2 krát po 40 minutách působení silného modrého světla, což indikuje jen velmi malý rozsah únikového pohybu. U listů s obsahem chlorofylu menším než 9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ byl únikový pohyb chloroplastů jen minimální, jelikož se působením silného světla relativní T_c téměř nezvětšila.



Obr. 12 Relativní kolimovaná transmittance listů pšenice seté změřená po 40 minutách působení modrého světla ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) vyvolávajícího únikový pohyb chloroplastů. Vztaženo k počáteční hodnotě Tc listů adaptovaných na tmu (tj. před aplikací modrého světla). Měřeno 14 listů v juvenilní fázi (juv.) a 8 v reprodukční fázi (rep.) rostlin. Hvězdičky označují reprezentativní listy vybrané pro znázornění změn Tc během působení modrého světla v Obr. 13.

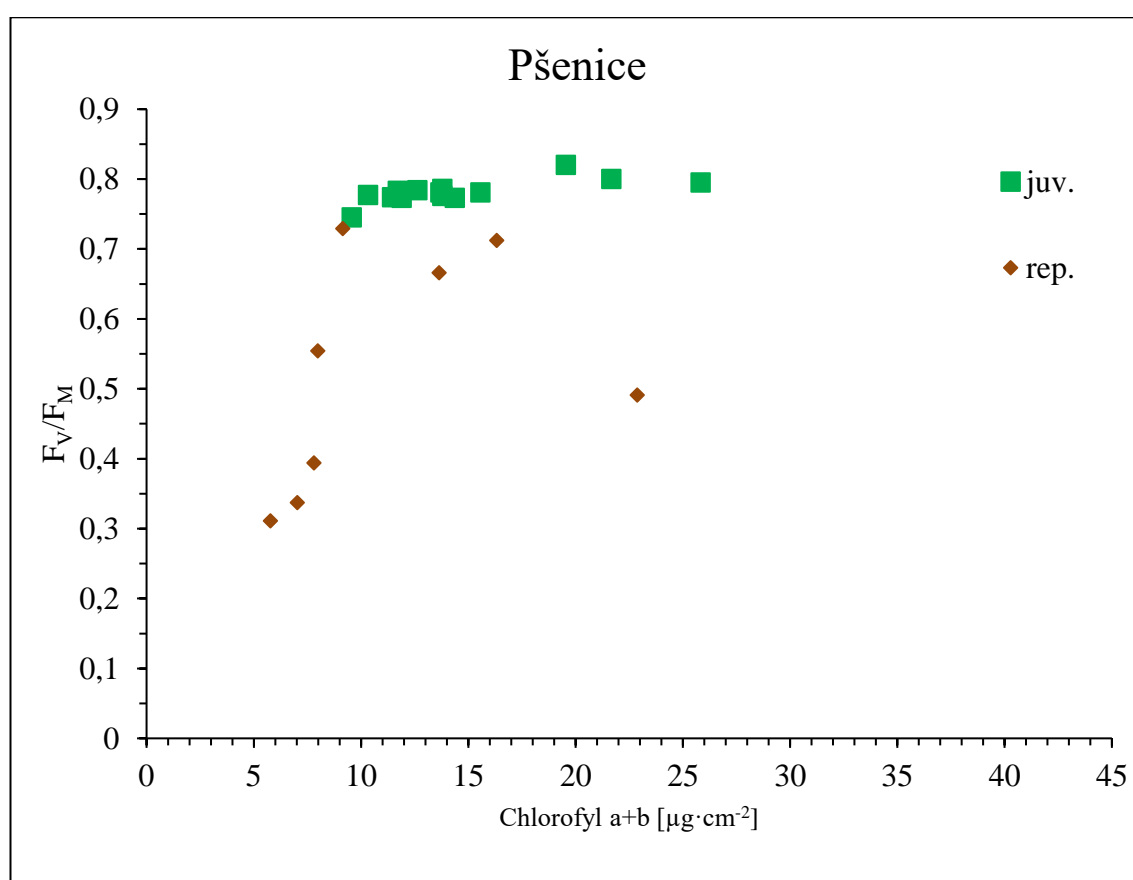
Na Obr. 13 jsou zobrazeny hodnoty relativní Tc odrážející pohyb chloroplastů u vybraných listů pšenice během působení silného a slabého modrého světla. I z tohoto obrázku je patrné, že rozsah pohybu chloroplastů byl u listů pšenice velmi malý. Největší rozsah únikového pohybu v rámci vybraných listů byl změřen u žlutého listu v juvenilní fázi („juv. – žl.“, obsah chlorofylu $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Po 40 minutách působení silného světla relativní Tc tohoto listu dosáhla hodnoty 2. V porovnání se změnami relativní Tc v listech huseníčku a tabáku (Obr. 7 a 10) byly tedy maximální změny Tc zaznamenané u listů pšenice výrazně menší. V rámci vybraných listů, chloroplasty v listu „juv. – žl.“ nejlépe reagovaly na světlo a tak, i přes menší obsah chlorofylu, vykazovaly vyšší míru pohybu než zelené listy v juvenilní i v reprodukční fázi (s obsahem chlorofylu $23 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). U listu „rep. – zel.“ navíc nižší hodnota F_v/F_M ukazovala na to, že tento list byl nějakým způsobem stresovaný. U žlutého listu v reprodukční fázi („rep. – žl.“, obsah chlorofylu $9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) se chloroplasty

nepohybovaly, podobně jako tomu bylo u zelených listů, i když v tomto listu byla hodnota F_V/F_M relativně vysoká (0,729).



Obr. 13 Relativní kolimovaná transmittance vybraných listů pšenice seté při únikovém a akumulčním pohybu chloroplastů. Vybrány listy rostlin v juvenilní a reprodukční fázi s podobným obsahem chlorofylu. Únikový pohyb chloroplastů byl vyvolán modrým světlem o intenzitě $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (0 – 40 min), akumulční pohyb modrým světlem o intenzitě $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (40 – 60 min). Uvedeny hodnoty obsahu chlorofylu a parametr F_V/F_M měřených listů.

Listy pšenice v juvenilní a reprodukční fázi měly rozdílnou maximální účinnost fotochemie fotosystému II (Obr. 14). Přestože se obsah chlorofylu u jednotlivých listů v juvenilní fázi lišil, všechny měly podobnou maximální účinnost fotosystému II, jak indikuje parametr F_V/F_M dosahující hodnot kolem 0,8 (0,77 – 0,83). Tento výsledek ukazuje, že ani v nejméně zelených listech pšenice v juvenilní fázi, nebyly narušeny primární reakce fotosyntézy a nedocházelo k inhibici funkce fotosystému II. U listů v reprodukční fázi už byla funkce fotosystému II většinou zhoršená. Nejmenší maximální účinnost fotosystému II byla naměřena u listu s nejmenším obsahem chlorofylu ($6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), jehož hodnota F_V/F_M byla 0,31.



Obr. 14 Maximální účinnost fotochemie fotosystému II (parametr F_V/F_M) u listů pšenice seté použitých k měření pohybu chloroplastů. Měřeno 14 listů v juvenilní fázi a 8 v reprodukční fázi rostlin.

5 DISKUZE

Pohyb chloroplastů je jedním z mechanismů, kterými rostlina reaguje na změny světelných podmínek. Rozsah pohybu se může lišit u různých rostlinných druhů (Kagawa a Wada, 2002; Königer a Bollinger, 2012). Napomáhá rostlině jak v podmínkách nízké ozáření, kdy upořádání chloroplastů v pozici diastrophe zvyšuje účinnost fotosyntézy (Kagawa a Wada, 2002; Wada, 2016; Gotoh et al., 2018), tak v podmínkách vysoké ozáření, kdy přeskupení chloroplastů do pozice parastrophe zabráňuje fotooxidativnímu poškození fotosyntetického aparátu (Kagawa a Wada, 2002; Wada, 2016; Gotoh et al., 2018), případně umožňuje pronikání světla k chloroplastům ve spodních vrstvách listu a zvýšení celkové fotosyntézy listu (Brugnoli a Björkman, 1992).

Senescence je řízený proces, který umožňuje rostlině recyklaci látek ze stárnoucích listů do jiných částí. Je obvykle doprovázena snížením rychlosti fotosyntézy, které nejprve zahrnuje inhibici sekundárních reakcí fotosyntézy a v pozdější fázi také primárních fotosyntetických reakcí (Camp et al., 1982; Lu a Zhang, 1998; Tang et al., 2005; Špundová et al., 2005; Vlčková et al., 2006; Sobieszczuk-Nowicka et al., 2018). Díky nerovnováze fungování těchto dvou fází fotosyntézy může docházet k tvorbě ROS a následnému oxidativnímu poškození chloroplastů (Vlčková et al., 2006). Pro efektivní recyklaci živin je potřeba zabránit výraznějšímu oxidativnímu poškození v senescentních listech. Jak bylo uvedeno, právě pomocí únikového pohybu se chloroplasty brání oxidativnímu poškození způsobenému silným světlem (Kong a Wada 2014). Otázkou však je, do jaké míry zůstává světlem vyvolaný pohyb chloroplastů (jako jeden z fotoprotektivních mechanismů) funkční během senescence a přispívá tak k jejímu optimálnímu průběhu. Je známo, že rozsah pohybu chloroplastů se liší u různých rostlinných druhů (Kagawa a Wada, 2002; Königer a Bollinger, 2012), proto jsme se v bakalářské práci rozhodli zjistit, jestli a jak se mění světlem vyvolaný pohyb chloroplastů v závislosti na různém obsahu chlorofylu u listů různých druhů rostlin – u huseníčku rolního, pšenice seté a tabáku virginského. Pohyb chloroplastů byl sledován v juvenilní a reprodukční fázi rostlin.

5.1 Různý rozsah pohybu chloroplastů v různých rostlinných druzích

U různých rostlinných druhů má pohyb chloroplastů různý rozsah (Kagawa a Wada, 2002; Königer a Bollinger, 2012). Bylo zjištěno, že rozsah pohybu chloroplastů vyvolaného světlem závisí na tom, zdali rostlina preferuje růst na slabším nebo silnějším světle (Königer a Bollinger, 2012) a na tom, zda roste ve stabilních nebo proměnlivých světelných podmínkách (Augustynowicz a Gabryś, 1999). Dá se předpokládat, že pokud je rozsah pohybu chloroplastů v dané rostlině omezený, rostlina může disponovat jinými účinnými fotoprotektivními mechanismy (Königer a Bollinger, 2012; Wada, 2013).

Výsledky bakalářské práce ukázaly, že se vybrané rostlinné druhy lišily v míře únikového pohybu. U zelených listů huseníčku v juvenilní a reprodukční fázi byl zjištěn nejvyšší rozsah únikového pohybu v rámci měřených druhů rostlin. U těchto listů nebyly narušeny primární reakce fotosyntézy. Jak je patrné ze srovnání Obr. 6 a Obr. 9, v případě listů s největší mírou pohybu byl nárůst relativní T_c asi o 100 % větší u huseníčku než u tabáku. Z výsledků usuzujeme, že u huseníčku má únikový pohyb chloroplastů velký význam ve fotoprotekci rostlin. Největší únikový pohyb chloroplastů huseníčku v rámci 11 zkoumaných rostlinných druhů byl zaznamenán také v práci Königer a Bollinger (2012).

Menší rozsah únikového pohybu chloroplastů byl zaznamenán u zelených listů tabáku v juvenilní a reprodukční fázi (Obr. 9). U listů s obsahem chlorofylu 14 a 18 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ bylo navíc zjištěno, že ačkoliv u nich byly narušeny primární reakce fotosyntézy, k inhibici únikového pohybu nedošlo. Tento výsledek ukazuje, že zhoršená funkce fotosystému II nesouvisela se zhoršeným pohybem chloroplastů. Rolencová (2008) ve své práci taktéž uvedla, že nenalezla žádnou souvislost mezi poškozením funkce fotosystému II a pohybem chloroplastů u tabáku. Z výsledků únikového pohybu chloroplastů lze usuzovat, že jeho význam ve fotoprotekci tabáku by mohl být menší než u huseníčku – chloroplasty na silné modré světlo reagovaly únikovým pohybem, nicméně v menším rozsahu než u huseníčku.

U zelených listů pšenice v juvenilní a reprodukční fázi byl zaznamenán minimální rozsah únikového pohybu chloroplastů (Obr. 12). Výsledky naznačují, že význam únikového pohybu chloroplastů ve fotoprotekci bude u pšenice minimální. Přestože u listů v juvenilní fázi nebyl zaznamenán pokles v účinnosti fotosystému II, došlo

se zvyšujícím se obsahem chlorofylu postupně k inhibici únikového pohybu chloroplastů.

Nutno poznamenat, že rostliny zkoumaných druhů byly v naší práci pěstovány při relativně nízké a stabilní ozáření (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ve fytokomoře) oproti světelným podmínkám v přirozeném prostředí čili naše výsledky z tohoto důvodu nemusí odrážet situaci v rostlinách, které rostou v přirozených (polních) podmínkách.

5.2 Změny pohybu chloroplastů během senescence

Dá se předpokládat, že udržení pohybu chloroplastů při senescenci bude různě důležité pro rostliny s konstitutivně různým rozsahem pohybu, pravděpodobně důležitější pro rostliny s vyšším rozsahem pohybu.

V naší práci byl u použitých rostlinných druhů zjištěn obecný trend inhibice pohybu chloroplastů s klesajícím obsahem chlorofylu – tedy s mírou senescence. U huseníčku bylo zaznamenáno, že se zmenšujícím se obsahem chlorofylu byl pohyb chloroplastů inhibován nejvíce, popřípadě u některých méně zelených listů došlo k inhibici únikového i akumulárního pohybu. Menší inhibice pohybu chloroplastů byla zaznamenána u senescentních listů tabáku. Rolencová (2008) a Nauš et al. (2010) ve své práci taktéž uvedli, že s klesajícím obsahem chlorofylu došlo v listech tabáku ke snížení rychlosti a rozsahu pohybu chloroplastů vyvolaného světlem. V případě pšenice se naopak trend změn pohybu chloroplastů v závislosti na obsahu chlorofylů nepotvrdil, což odpovídá předpokládanému malému významu únikového pohybu chloroplastů u tohoto rostlinného druhu.

Jedním ze senescenčně-indukovaných procesů, který by mohl souviset s inhibicí (únikového) pohybu chloroplastů, může být narušení ukotvení chloroplastů na plazmatickou membránu zjištěné v senescentních listech (Wittenbach et al., 1982; Vlčková et al., 2006), což by mohlo mít negativní vliv na pohyb chloroplastů vyvolaný světlem.

Je možné, že pokles změn transmitance vyvolaných působením modrého světla v senescentních listech byl způsoben nejen inhibicí pohybu chloroplastů, ale také jinými procesy, které ovlivnily optické vlastnosti listů. Jedním z těchto procesů je degradace chloroplastů, která může mít vliv na změny v transmitanci. Pokud při senescenci docházelo k degradaci chloroplastů, což je pravděpodobné vzhledem k poklesu obsahu chlorofylu a též na základě poznatků z literatury (Camp et al., 1982; Ono et al., 1995; Wada et al., 2009; Springer et al., 2015), změna transmitance listu v důsledku pohybu

chloroplastů mohla být menší z důvodu menší plochy chloroplastů vzhledem k měřené ploše listu. K ověření toho, čím jsou inhibovány změny Tc v senescentních listech – zda inhibicí pohybu chloroplastů nebo spíše změnami optických vlastností listu, by mohlo přispět stanovení strukturních změn na úrovni listu, buněk a zjištění počtu a velikosti chloroplastů pomocí mikroskopických studií.

5.3 Rozdíly v pohybu chloroplastů v listech rostlin v juvenilní a reprodukční fázi

Dalším výsledkem bakalářské práce bylo, že jsme u všech zkoumaných druhů rostlin zaznamenali obecně vyšší rozsah pohybu chloroplastů u listů rostlin v juvenilní fázi než u listů rostlin v reprodukční fázi, pokud byly srovnány listy s podobným obsahem chlorofylu. Největší rozdíl byl zaznamenán u huseníčku (Obr. 6, 7), menší pak u tabáku (Obr. 9, 10). U pšenice nebyl rozdíl tak zřejmý vzhledem k malému rozsahu pohybu chloroplastů (Obr. 12, 13). Informace o změnách různém rozsahu pohybu chloroplastů v různě starých listech tabáku (od tmavě zeleného po žlutý u mladších a starších rostlin) byly zmíněny v práci Nauš et al. (2010), ve které byl taktéž uveden menší rozsah pohybu chloroplastů u listů starších rostlin tabáku než u listů mladších rostliny. V práci autoři použili mladší dvouměsíční a starší šestiměsíční rostliny tabáku. Inhibice únikového pohybu u listů starších rostlin ječmene oproti listům mladších rostlin byla také zmíněna v práci Nauš et al. (2016). Naše výsledky jsou tedy v souladu s výsledky uvedených prací, i když autoři neuvádějí, zda v jejich případech byly starší měřené rostliny už v reprodukční fázi či nikoliv. U huseníčku jsme zjistili podobný výsledek jako u tabáku – čili inhibici pohybu v reprodukční fázi. U pšenice jsme naopak tento trend nezaznamenali. Norén et al. (2003) předpokládají, že pro rostlinu po přechodu do fáze kvetení přestane být fotoprotekce listů a fotosyntetického aparátu tak důležitá. Předpokládáme tedy, že by méně funkční pohyb chloroplastů v listech rostlin v reprodukční fázi mohl souviset s menší potřebou fotoprotekce. K ověření této hypotézy a odhalení mechanismu, kterým je pohyb chloroplastů v reprodukční fázi inhibován, je potřeba dalšího výzkumu.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit, zda a jak se mění pohyb chloroplastů (zejména únikový) vyvolaný modrým světlem u různě zelených listů během juvenilní a reprodukční fáze huseníčku rolního, pšenice seté a tabáku virginského pomocí měření změn optické propustnosti listu.

U huseníčku jsme u zelených listů zaznamenali největší rozsah únikového pohybu chloroplastů v rámci měřených druhů rostlin. Menší rozsah únikového pohybu chloroplastů byl zaznamenán u zelených listů tabáku a nejmenší u pšenice. U těchto dvou druhů rostlin jsme navíc zaznamenali, že některé listy měly narušeny primární reakce fotosyntézy, aniž by u nich došlo k inhibici únikového pohybu. Z těchto výsledků vyvozujeme, že funkce fotosystému II a pohyb chloroplastů nejsou v příčinné souvislosti. Dále předpokládáme, že význam únikového pohybu ve fotoprotekci listů je velký u huseníčku, menší u tabáku a nejmenší u pšenice, přinejmenším u rostlin pěstovaných za daných světelných podmínek. Tento předpoklad by ale bylo třeba ověřit dalším studiem.

Během senescence došlo u huseníčku a tabáku k inhibici únikového i akumulárního pohybu chloroplastů s klesajícím obsahem chlorofylu. U listů pšenice v juvenilní fázi jsme naopak zjistili, že listy s menším obsahem chlorofylu vykazovaly spíše větší míru únikového pohybu chloroplastů než listy zelenější. Naše práce tedy potvrdila výsledky předchozích prací (Rolencová, 2008; Nauš et al., 2010), ve kterých byla zjištěna inhibice pohybu chloroplastů v senescentních listech tabáku, a nově pak ukázala podobné chování chloroplastů v senescentních listech huseníčku a minimální změny v pohybu chloroplastů během senescence listů pšenice. Není vyloučeno, že na poklesu změn T_c vyvolaným působením modrého světla v senescentních listech se podílely také procesy ovlivňující optické vlastnosti listů, zejména degradace chloroplastů. Ke zjištění toho, čím jsou změny T_c v senescentních listech skutečně způsobeny a co je příčinou inhibice pohybu chloroplastů bude třeba dalšího studia včetně mikroskopických experimentů.

U všech měřených druhů rostlin jsme zaznamenali vyšší rozsah pohybu chloroplastů v juvenilní fázi než v reprodukční fázi. Studium změn pohybu chloroplastů během juvenilní a reprodukční fáze rostlin je zatím stále v počátcích, příčina menšího rozsahu pohybu v reprodukční fázi není známa.

Senescence, ve které dochází k recyklaci látek obsažených v listu, přispívá k tvorbě semen a podporuje růst rostliny v následující sezóně. Pro efektivní recyklaci živin je potřeba zabránit fotooxidativnímu poškození v senescentních listech, k čemuž může významně přispívat právě únikový pohyb chloroplastů před silným světlem. Pochopení mechanismů senescentních procesů je důležité nejen z hlediska výzkumu, ale i v souvislosti se zvýšením produktivity zemědělských rostlin. Bylo by dobré tento směr výzkumu dále rozvíjet, protože právě zachování fungujícího únikového pohybu chloroplastů jako jednoho z fotoprotektivních mechanismů, by mohlo přispívat k optimálnímu průběhu senescence.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aihara, Y., Tabata, R., Suzuki, T., Shimazaki, K., Nagatani, A. (2008): Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *The Plant Journal* **56**, 364-375.
- Augustynowicz, J., Gabryś, H. (1999): Chloroplast movements in fern leaves: correlation of movement dynamics and environmental flexibility of the species. *Plant, Cell & Environment* **22**, 1239-1248.
- Azari, R., Tadmor, Y., Meir, A., Reuveni, M., Evenor, D., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Levin, I. (2010): Light signaling genes and their manipulation towards modulation of phytonutrient content in tomato fruits. *Biotechnology Advances* **28**, 108-118.
- Briggs, W.R., Beck, C.F., Cashmore, A.R., Christie, J.M., Hughes, J., Jarillo, J.A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rudiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., Watson, J.C. (2001): The phototropin family of photoreceptors. *The Plant Cell* **13**, 993-998.
- Briggs, W.R., Christie, J.M. (2002): Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204-210.
- Briggs, W.R., Huala, E. (1999): Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 33-62.
- Brugnoli, E., Björkman, O. (1992): Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to Δ pH and zeaxanthin formation. *Photosynthesis Research* **1992**, 23-35.
- Camp, P.J., Huber, S.C., Burke, J.J., Moreland, D.E. (1982): Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves: basis for the reduction of photosynthesis. *Plant Physiology* **70**, 1641-1646.
- Chen, M., Chory, J., Fankhauser, C. (2004): Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics* **38**, 87-117.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A., Mae, T. (2003): Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology* **44**, 914-921.
- Cho, H.-Y., Tseng, T.-S., Kaiserli, E., Sullivan, S., Christie, J.M., Briggs, W.R. (2007): Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**, 517-529.
- Christie, J.M. (2007): Phototropin blue light receptors. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 21-45.
- Clack, T., Mathews, S., Sharrock, R.A. (1994): The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of phyD and phyE. *Plant Molecular Biology* **25**, 413-427.
- Crosson, S., Moffat, K. (2001): Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2995-3000.
- DeBlasio, S.L., Mullen, J.L., Luesse, D.R., Hangarter, R.P. (2003): Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**, 1471-1479.
- Frolec, J., Řebíček, J., Lazár, D., Nauš, J. (2010): Impact of two different types of heat stress on chloroplast movement and fluorescence signal of tobacco leaves. *Plant Cell Reports* **29**, 705-714.
- Galvão, V.C., Fankhauser, C. (2015): Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology* **34**, 46-53.
- Gan, S. (2007): Mitotic senescence in plants. In: *Senescence Processes in Plants*, vol 26 eds., Blackwell Publishing Oxford, London, The United Kingdom, 1-11.
- Gan, S., Amasino, R.M. (1997): Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). *Plant Physiology* **113**, 313-319.
- Ghosh, S., Mahoney, S.R., Penterman, J.N., Peirson, D., Dumbroff, E.B. (2001): Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during Brassica napus senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 777-784.

- Gotoh, E., Suetsugu, N., Yamori, W., Ishishita, K., Kiyabu, R., Fukuda, M., Higa, T., Shirouchi, B., Wada, M. (2018): Chloroplast accumulation response enhances leaf photosynthesis and plant biomass production. *Plant Physiology* **178**, 1358-1369.
- Grover, A. (1993): How do senescing leaves lose photosynthetic activity. *Current Science* **64**, 226-233.
- Hussey, P.J., Ketelaar, T., Deeks, M.J. (2006): Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 109-125.
- Ishida, H., Izumi, M., Wada, S., Makino, A. (2014): Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**, 512-521.
- Izumi, M., Nakamura, S. (2018): Chloroplast protein turnover: the influence of extraplastidic processes, including autophagy. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 828.
- Jenkins, G.I., Woolhouse, H.W. (1981): Photosynthetic electron transport during senescence of the primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: Non-cyclic electron transport. *Journal of Experimental Botany* **32**, 467-478.
- Jiao, Y., Lau, O.S., Deng, X.W. (2007): Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* **8**, 217-230.
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H., Waaland, S. (2013): The molecular life of plants. 1st ed., Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, Hoboken, N.J, 766 stran.
- Kadota, A., Yamada, N., Suetsugu, N., Hirose, M., Saito, C., Shoda, K., Ichikawa, S., Kagawa, T., Nakano, A., Wada, M. (2009): Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13106-13111.
- Kagawa, T. (2001): Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**, 2138-2141.
- Kagawa, T., Wada, M. (2002): Blue light-induced chloroplast relocation. *Plant and Cell Physiology* **43**, 367-371.
- Kaiserli, E., Sullivan, S., Jones, M.A., Feeney, K.A., Christie, J.M. (2009): Domain swapping to assess the mechanistic basis of Arabidopsis phototropin 1 receptor kinase activation and endocytosis by blue light. *The Plant Cell* **21**, 3226-3244.
- Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M., Wada, M. (2002): Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**, 829-832.
- Kodama, Y., Tsuboi, H., Kagawa, T., Wada, M. (2008): Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue-light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes. *Journal of Plant Research* **121**, 441-448.
- Kondo, A., Kaikawa, J., Funaguma, T., Ueno, O. (2004): Clumping and dispersal of chloroplasts in succulent plants. *Planta* **219**.
- Kong, S.G., Arai, Y., Suetsugu, N., Yanagida, T., Wada, M. (2013): Rapid severing and motility of chloroplast-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**, 572-590.
- Kong, S.G., Kinoshita, T., Shimazaki, K., Mochizuki, N., Suzuki, T., Nagatani, A. (2007): The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses: phot2 kinase triggers physiological responses. *The Plant Journal* **51**, 862-873.
- Kong, S.G., Suzuki, T., Tamura, K., Mochizuki, N., Hara-Nishimura, I., Nagatani, A. (2006): Blue light-induced association of phototropin 2 with the golgi apparatus. *The Plant Journal* **45**, 994-1005.
- Kong, S.G., Wada, M. (2011): New insights into dynamic actin-based chloroplast photorelocation movement. *Molecular Plant* **4**, 771-781.
- Kong, S.G., Wada, M. (2014): Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**, 522-530.
- Königer, M., Bollinger, N. (2012): Chloroplast movement behavior varies widely among species and does not correlate with high light stress tolerance. *Planta* **236**, 411-426.

- Kyseláková, H., Prokopová, J., Nauš, J., Novák, O., Navrátil, M., Šafářová, D., Špundová, M., Ilík, P. (2011): Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by pea enation mosaic virus: a coordinated decrease in efficiencies of CO₂ assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 1279-1289.
- Leshem, Y.Y. (1987): Membrane phospholipid catabolism and Ca²⁺ activity in control of senescence. *Physiologia Plantarum* **69**, 551-559.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B., Niyogi, K.K. (2009): Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 239-260.
- Lichtenthaler, H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods Enzymology*, **148**, (Douce, R. and Packer, L. eds.), Academic Press Inc., New York, 350-382.
- Lichtenthaler, H.K., Sprey, B. (1966): Über die osmiophilen globulären lipideinschlüsse der chloroplasten. *Zeitschrift für Naturforschung* **21**, 690-697.
- Lim, P. (2003): Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **8**, 272-278.
- Lu, Zhang (1998): Changes in photosystem II function during senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **104**, 239-247.
- Luesse, D.R., DeBlasio, S.L., Hangarter, R.P. (2010): Integration of phot 1, phot 2, and PhyB signalling in light-induced chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4387-4397.
- Lukšíková, K. (2017): *Zapojení fototropinů v reakcích rostlin k abiotickým stresům*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Makino, A., Osmond, B. (1991): Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology* **96**, 355-362.
- Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q., Havé, M. (2017): Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current Opinion in Plant Biology* **39**, 8-17.
- Nakasako, M., Hirata, M., Shimizu, N., Hosokawa, S., Matsuoka, D., Oka, T., Yamamoto, M., Tokutomi, S. (2008): Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the LOV1 domains of phototropin 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* **64**, 617-621.
- Nam, G.H. (1997): The molecular genetic analysis of leaf senescence. In: *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 200-207.
- Nauš, J., Prokopová, J., Řebíček, J., Špundová, M. (2010): SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynthesis Research* **105**, 265-271.
- Nauš, J., Šmecko, S., Špundová, M. (2016): Chloroplast avoidance movement as a sensitive indicator of relative water content during leaf desiccation in the dark. *Photosynthesis Research* **129**, 217-225.
- Niewiadomska, E., Polzien, L., Desel, C., Rozpadek, P., Miszalski, Z., Krupinska, K. (2009): Spatial patterns of senescence and development-dependent distribution of reactive oxygen species in tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Journal of Plant Physiology* **166**, 1057-1068.
- Niyogi, K.K. (1999): Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 333-359.
- Norén, H., Svensson, P., Stegmark, R., Funk, C., Adamska, I., Andersson, B. (2003): Expression of the early light-induced protein but not the PsbS protein is influenced by low temperature and depends on the developmental stage of the plant in field-grown pea cultivars. *Plant, Cell and Environment* **26**, 245-253.
- Oikawa, K., Yamasato, A., Kong, S.G., Kasahara, M., Nakai, M., Takahashi, F., Ogura, Y., Kagawa, T., Wada, M. (2008): Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiology* **148**, 829-842.
- Okajima, K., Aihara, Y., Takayama, Y., Nakajima, M., Kashojiya, S., Hikima, T., Oroguchi, T., Kobayashi, A., Sekiguchi, Y., Yamamoto, M., Suzuki, T., Nagatani, A., Nakasako, M.,

- Tokutomi, S. (2014): Light-induced conformational changes of LOV1 (Light Oxygen Voltage-sensing domain 1) and LOV2 relative to the kinase domain and regulation of kinase activity in *Chlamydomonas* phototropin. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 413-422.
- Ono, K., Hashimoto, H., Katoh, S. (1995): Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant and Cell Physiology*. **36**, 9-17.
- Park, Y., Runkle, E.S. (2018): Spectral effects of light-emitting diodes on plant growth, visual color quality, and photosynthetic photon efficacy: white versus blue plus red radiation. *PLOS ONE* **13**, e0202386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202386.t001>
- Quail, P.H. (1997): An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**, 657-665.
- Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W., Baginsky, S. (2009): Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiology* **150**, 889-903.
- Rolencová, M. (2008): *Teoretické a experimentální studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem světla různé úrovně a lokálního stresu*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Sakamoto, K., Briggs, W.R. (2002): Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *The Plant Cell* **14**, 1723-1735.
- Sato, Y., Kadota, A., Wada, M. (2003b): Chloroplast movement: dissection of events downstream of photo and mechano perception. *Journal of Plant Research* **116**, 1-5.
- Sato, Y., Wada, M., Kadota, A. (2003a): Accumulation response of chloroplasts induced by mechanical stimulation in bryophyte cells. *Planta* **216**, 772-777.
- Sato, Y., Wada, M., Kadota, A. (2001): External Ca²⁺ is essential for chloroplast movement induced by mechanical stimulation but not by light stimulation. *Plant Physiology* **127**, 497-504.
- Savara, O. (2018): *Světlem indukovaný pohyb chloroplastů u fotomorfogenních mutantů rajčete*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Schäfer, E., Nagy, F. (2006): *Photomorphogenesis in plants and bacteria*, 3rd edn., Dordrecht, The Netherlands, Springer. 662 stran.
- Schmidt von Braun, S., Schleiff, E. (2008): The chloroplast outer membrane protein CHUP1 interacts with actin and profilin. *Planta* **227**, 1151-1159.
- Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1989): Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes & Development* **3**, 1745-1757.
- Smart, C.M. (1994): Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419-448.
- Śniegowska-Świerk, K., Dubas, E., Rapacz, M. (2015): Drought-induced changes in the actin cytoskeleton of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**, 73.
- Sobieszczyk-Nowicka, E., Wrzesiński, T., Bagniewska-Zadworna, A., Kubala, S., Rucińska-Sobkowiak, R., Polcyn, W., Misztal, L., Mattoo, A.K. (2018): Physiogenetic dissection of dark induced leaf senescence and timing its reversal in barley. *Plant Physiology* **178**, 654-671.
- Springer, A., Acker, G., Bartsch, S., Bauerschmitt, H., Reinbothe, S., Reinbothe, C. (2015): Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence in barley. *Journal of Plant Physiology* **176**, 180-191.
- Špundová, M., Popelková, H., Ilík, P., Skotnica, J., Novotný, R., Nauš, J. (2003): Ultrastructural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1051-1058.
- Špundová, M., Slouková, K., Hunková, M., Nauš, J. (2005): Plant shading increases lipid peroxidation and intensifies senescence-induced changes in photosynthesis and

- activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in wheat. *Photosynthetica* **43**, 403-409.
- Srivalli, B., Khanna-Chopra, R. (2004): The developing reproductive ‘sink’ induces oxidative stress to mediate nitrogen mobilization during monocarpic senescence in wheat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 198-202.
- Stoelzle, S., Kagawa, T., Wada, M., Hedrich, R., Dietrich, P. (2003): Blue-light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1456-1461.
- Suetsugu, N., Higa, T., Gotoh, E., Wada, M. (2016): Light-induced movements of chloroplasts and nuclei are regulated in both Cp-actin-filament dependent and independent manners in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* **11**. e0168318. <https://doi.org/10.1371/journal.pon.0168318>
- Suetsugu, N., Wada, M. (2007): Phytochrome dependent photomovement responses mediated by phototropin family proteins in cryptogam plants. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 87-93.
- Tang, Y., Wen, X., Lu, C. (2005): Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 193-201.
- Tominaga, J., Nakahara, Y., Horikawa, D., Tanaka, A., Kondo, M., Kamei, Y., Takami, T., Sakamoto, W., Unno, K., Sakamoto, A., Shimada, H. (2018): Overexpression of the protein disulfide isomerase AtCYO1 in chloroplasts slows dark-induced senescence in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* **18**, 80.
- Trojan, A., Gabryś, H. (1996): Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L.) depends on light conditions during growth. *Plant Physiology* **111**, 419-425.
- Tsuboi, H., Wada, M. (2012): Chloroplasts move towards the nearest anticlinal walls under dark condition. *Journal of Plant Research* **125**, 301-310.
- Tuquet, C., Newman, DW. (1980): Aging and greening in soybean cotyledons: ultrastructural changes in plastids and plastoglobuli. *Cytobios* **9**, 43-59.
- 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.
- Wada, M. (2013): Chloroplast movement. *Plant Science* **210**, 177-182.
- Wada, M. (2016): Chloroplast and nuclear photorelocation movements. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **92**, 387-411.
- Wada, M., Kagawa, T., Sato, Y. (2003): Chloroplast movement. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 455-468.
- Wada, M., Kong, S.G. (2011): Analysis of chloroplast movement and relocation in Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology*, **774**, 87-102.
- Wada, M., Kong, S.G. (2018): Actin-mediated movement of chloroplasts. *Journal of Cell Science* **131**.
- Wada, S., Ishida, H., Izumi, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Mae, T., Makino, A. (2009): Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology* **149**, 885-893.
- Wittenbach, V.A., Lin, W., Hebert, R.R. (1982): Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiology* **69**, 98-102.
- Woolhouse, HW. (1967): The nature of senescence in plants. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **21**, 179-213.
- Xie, Q., Michaeli, S., Peled-Zehavi, H., Galili, G. (2015): Chloroplast degradation: one organelle, multiple degradation pathways. *Trends in Plant Science* **20**, 264-265.
- Yamashita, H., Sato, Y., Kanegae, T., Kagawa, T., Wada, M., Kadota, A. (2011): Chloroplast actin filaments organize meshwork on the photorelocated chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **233**, 357-368.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Phot1 - fototropin 1

Phot2 - fototropin 2

Tc - kolimovaná transmitance

Cp - aktinová vlákna - chloroplastová aktinová vlákna

LOV - Light, Oxygen and Voltage

RUBISCO - ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa

RCB - Rubisco Containing Bodies

ROS - Reactive Oxygen Species