

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem globálního
abiotického a biotického stresu

(Study of chloroplast movement in leaves under the effect of global
abiotic and biotic stress)

Vypracoval: Jiří Řebíček

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jan Nauš, CSc.

Děkuji vedoucímu práce, panu Prof. RNDr. Janu Naušovi, CSc., za odborný dohled při realizaci experimentů, za konzultaci výsledků, dohled nad fytokomorou a za důležité rady a poznámky při psaní diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Frolcovi za spolupráci při realizaci experimentů a Mgr. Janu Hlavinkovi za pomoc s pěstováním rostlin pro experimenty. Děkuji také docentu RNDr. Dušanu Lazárovi, Ph. D. za pomoc se statistickým vyhodnocením výsledků a RNDr. Michaele Sedlářové, Ph. D. za inokulaci rostlin.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením Prof. RNDr. Jana Nauše, CSc. a za použití literatury uvedené v seznamu literatury.

V Olomouci dne 7. 5. 2009

.....

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- F_0 - minimální fluorescence
 F_I - fluorescenční indukce
 F_I - signál fluorescence v I vlně
 F_{IJ} - fluorescenční indukční jev
 F_J - signál fluorescence v J vlně
 F_M - maximální fluorescence
 F_V - variabilní fluorescence
HFR - **H**igh **F**luence **R**ate
I - inokulovaná rostlina
K - kontrolní rostlina
LED - dioda emitující světlo (light emitting diode)
LFR - **L**ow **F**luence **R**ate
LOV - **L**ight, **O**xygen a **V**oltage
PAR - fotosynteticky aktivní záření
PEA - Plant Efficiency Analyser
PSII - fotosystém II
RCII - reakční centrum fotosystému II
 T_C - propustnost v částečně kolimovaném světle
 T_K - vybraná (koncová) teplota
WT - přirozený typ (wild-type)

SOUHRN

V experimentální části této diplomové práce byly řešeny tři projekty.

První projekt byl zaměřen na studium vlivu vyšší teploty na světlem indukovaný pohyb chloroplastů v listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*). Měření pohybu chloroplastů bylo rozděleno na dva podprojekty, kdy jsme použili dva různé teplotní režimy: skokový (doba inkubace 5 min) a lineární teplotní režim (rychlost ohřevu/chlazení 2 °C/min). V obou podprojektech jsme měřili pohyb chloroplastů pomocí speciální svorky, světlovodu a spektrometru LI-1800. Z křivek kinetiky propustnosti T_C (časový průběh změny propustnosti T_C) listu tabáku jsme vyhodnotili parametry H_1 , H_2 [(rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou)/(hodnota T_C v čase $t = 25$ min)], relativní směrnice S_1 , S_2 (vyhodnocení podle rychlosti nárůstu, resp. poklesu) a udělali průměry grafů. Při skokovém teplotním stresu dochází k poklesu hodnot parametrů H_1 , H_2 a relativních směrnic S_1 , S_2 od teploty 40 °C. Při lineárním teplotním stresu začíná pokles od 42 °C. Pro uvedené teplotní režimy bylo zjištěno, že lineární teplotní režim je k pohybu chloroplastů šetrnější než skokový teplotní režim. Pravděpodobným důvodem ustání pohybu chloroplastů vlivem vyšší teploty se jeví roztrhání a zmizení vláken aktinu během teplotního stresu.

Druhý projekt byl zaměřen na sledování vlivu teplotního stresu na segmentech listu tabáku pomocí měření fluorescenční indukce. Fluorescenční indukce (FI) byla měřena vždy před a po teplotním stresu. Použili jsme dva teplotní režimy stresu: skokový (doba inkubace 5 min) a lineární teplotní režim (rychlost ohřevu 2 °C/min). Fluorescenční indukci jsme měřili vždy na segmentech listu adaptovaných na tmu. Z křivek FI jsme vyhodnocovali 6 základních parametrů (F_0 , F_V/F_P , V_J , V_L , S_m , M_0). Při skokovém teplotním stresu dochází u F_0 , S_m , M_0 při teplotě 45 °C k nárůstu hodnot, naopak u F_V/F_P a V_L dochází k poklesu. U parametru V_J není žádný prokazatelný rozdíl hodnot. Při lineárním teplotním stresu dochází při teplotě 45 °C k nárůstu hodnot u F_0 , S_m a M_0 a naopak u F_V/F_P , V_J a V_L k poklesu. Z porovnání parametrů pohybu chloroplastů a parametrů fluorescence chlorofylu

pro uvedené teplotní režimy vyplývá, že parametry pohybu chloroplastů jsou citlivější na teplotu než parametry fluorescence chlorofylu. To platí především pro skokový teplotní režim. U lineárního teplotního režimu už rozdíl tak prokazatelný není.

Cílem třetího projektu bylo studium vlivu biotického stresu na světlem indukovaný pohyb chloroplastů v listech slunečnice (*Helianthus annuus* L.). Sledovali jsme časový vývoj vlivu plísně slunečnicové (*Plasmopara halstedii*) na pohyb chloroplastů v listech. Z časového průběhu změny propustnosti T_C listu jsme vyhodnotili parametr H_1 [(rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou)/(hodnotu T_C v čase $t = 20$ min)], relativní směrnici S_1 (vyhodnocení podle rychlosti nárůstu) a udělali průměry grafů. Hodnoty vyhodnocovaných parametrů však neukázaly statisticky významný rozdíl mezi inokulovanými a kontrolními rostlinami. Vliv plísně slunečnicové na pohyb chloroplastů v listech slunečnice se však u inokulovaných rostlin projevil vyšší minimální a maximální hodnotou T_C a větším rozsahem T_C mezi minimální a maximální hodnotou.

ABSTRACT

In experimental part of the graduation thesis three issues were discussed.

The first project was focused on the study of the influence of higher temperature on the light-induced chloroplast movement in the leaves of tobacco. (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*). The measuring of chloroplast movement was divided into two subprojects. We used two different temperature regimes: incubation (time of incubation for 5 minutes) and linear heating stress (heating/cooling rates of 2°C/min). In both projects we measured the chloroplast movement using leaf clip, light guide and spektroradiometer LI-1800. From the curves of transmittance T_C (time course of the change of transmittance T_C) of tobacco leaves we got the parameters H_1 , H_2 [(range T_C between maximum and minimum value)/(value of T_C in time $t = 25$ min)], relative directives S_1 , S_2 (evaluation according to the speed of growth, or descent) and we made the averages of the graphs. During the incubation heat stress, we observed the decrease of the values of the parameters H_1 , H_2 and of relative directives S_1 , S_2 from the temperature of 40 °C. During the linear heating stress the decrease began at the temperature of 42 °C. It was discovered that for the stated temperature regimes that linear heating is more considerate to chloroplast movement than incubation heat stress. The reason for termination of chloroplast movement by higher temperature seems to be fact of disruption and disappearance of actine cytoskeleton during temperature stress.

The second project was based on the observation of the influence of the temperature stress on tobacco leaves segments by the measuring of fluorescence induction. Fluorescence induction (FI) was always measured before and after the temperature stress. We used two temperature regimes of stress: incubation (time of incubation for 5 minutes) and linear heating stress (heating/cooling rates of 2°C/min). We always measured fluorescence induction on the leaves segments which were adapted on the darkness. From the FI curves we evaluated 6 basic parameters (F_0 , F_V/F_P , V_J , V_L , Sm , M_0). During the incubation heat stress we could see that in F_0 , Sm , M_0 at the temperature of 45 °C the increase of the values happened, on

the other hand in F_V/F_P and V_I the decrease occurred. In the parameter V_J the difference of the values was not visible. During the linear heating stress at the temperature of 45 °C we observed the increase of the values in F_0 , S_m and M_0 and vice versa in F_V/F_P , V_J and V_I the decrease happened. After the parameters of chloroplast movement and parameters of chlorophyll fluorescence comparison it appeared that the parameters of chloroplasts movement are more sensible to temperature than the parameters of the chlorophyll fluorescence. It is valid mainly for the incubation heat stress. But this is not so provable at the linear heating stress.

The aim of the third project was the study of the influence of the biotic stress on the light-induced chloroplast movement in the leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). We observed the time progress of the influence of the downy mildew of sunflower (*Plasmopara halstedii*) on the chloroplast movement in the leaves. From the time course of the change of the transmittance T_C in the leaf we analysed the parameter H_1 [(the range T_C between maximum and minimal value)/(value of T_C in time $t = 20$ min)], relative directive S_1 (stated according to the speed of increase) and we made the graphs averages. The values of the evaluated parameters did not show the significant difference between the control and inoculated flowers. However, the influence of the downy mildew of sunflower on the chloroplast movement in the leaves of sunflower of the inoculated flowers showed higher minimal and maximum value of T_C and wider range of T_C between minimal and maximum value.

OBSAH

1.	Úvod	1
2.	Cíl práce	2
3.	Přehled problematiky	3
3.1	Pohyb chloroplastů	3
3.2	Fotoreceptory	5
3.2.1	Fototropiny	6
3.3	Genetické studie s mutanty.....	8
3.3.1	Fototropismus	8
3.3.2	Pohyb chloroplastů aktivovaný modrým světlem	9
3.3.3	Otvírání průduchů indukované modrým světlem.....	10
3.4	Přenos signálu.....	10
3.5	Mechanismus pohybu chloroplastů	11
3.6	Význam pohybu chloroplastů	13
3.7	Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů	16
3.8	Fluorescence chlorofylu.....	18
4	Materiál a metody	20
4.1	Rostlinný materiál	20
4.2	Příprava segmentů	21
4.3	Teplotní režimy stresu	23
4.3.1	Skokový teplotní režim.....	24
4.3.2	Lineární teplotní režim	26
4.4	Měření pohybu chloroplastů	27
4.4.1	Měření pohybu chloroplastů pomocí speciální svorky a světlovodu.....	27
4.4.2	Sledování pohybu chloroplastů pomocí chlorofylmetru.....	29
4.4.3	Sledování vlivu teplotního stresu pomocí fluorescence chlorofylu	30
4.5	Vyhodnocení parametrů	33
4.5.1	Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech.....	33
4.5.2	Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů v listech	35
4.5.3	Statistické zpracování výsledků	37
5	Výsledky	38

5.1	Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech.....	38
5.1.1	Pohyb chloroplastů pod vlivem skokového teplotního stresu	39
5.1.2	Pohyb chloroplastů pod vlivem lineárního teplotního stresu	43
5.2	Vliv vyšší teploty na fluorescenční indukci.....	46
5.2.1	Skokový teplotní stres.....	46
5.2.2	Lineární teplotní stres	49
5.3	Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů v listech	52
6	Diskuze.....	56
6.1	Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech.....	56
6.2	Vliv vyšší teploty na fluorescenční indukci.....	59
6.3	Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů.....	61
7	Závěr	63
7.1	Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech.....	63
7.2	Vliv vyšší teploty na fluorescenční indukci.....	63
7.3	Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů v listech	64
8	Seznam literatury.....	65

1. Úvod

Základní požadavek pro fotoautotrofní organismy je optimalizovat získávání světla pro fotosyntézu. U rostlin se vyvinuly dvě důležité krátkodobé reakce k vnímání a přizpůsobení se přírodním světelným podmínkám: fototropismus a pohyb chloroplastů. Chloroplasty jsou specifické orgány v rostlinných buňkách, jejich pozice uvnitř fotosyntetizujících buněk závisí na směru, vlnové délce a intenzitě světla. Za nízké intenzity osvětlování se chloroplasty pohybují směrem ke světlu a shromažďují se u nejvíce osvětlených buněčných stěn. Naopak za světla o vysoké intenzitě se chloroplasty vyhýbají nejvíce ozářeným místům a pohybují se ke stěnám buňky, které jsou rovnoběžné se směrem světla.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na studium vlivu faktorů vnějšího prostředí na pohyb chloroplastů. Sledovali jsme vliv vyšší teploty a vliv plísňě slunečnicové na pohyb chloroplastů. Pohyb chloroplastů byl sledován měřením změn v propustnosti listu v čase jako funkce aktuálního rozdělení chloroplastů v buňkách. Vliv teplotního stresu jsme sledovali také pomocí měření fluorescenční indukce. Mohli jsme tak sledovat vliv vyšší teploty na fotosyntetický aparát i na pohyb chloroplastů a porovnat parametry obou měření.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- 1) Zpracovat přehled problematiky vlivu globálních abiotických a biotických stresů na pohyb chloroplastů.
- 2) Zvládnout metodiku sledování pohybu chloroplastů pomocí chlorofylmetru, speciální svorky, světlovodu a spektrálního radiometru LI-COR 1800.
- 3) Proměřit závislost kinetických parametrů pohybu chloroplastů na teplotě listu nebo rostliny.
- 4) Studovat změny v pohybu chloroplastů vyvolané biotickým stresem (plísňové onemocnění).

3. Přehled problematiky

3.1 Pohyb chloroplastů

Chloroplasty jsou buněčné organely obsahující primární fotosyntetický aparát rostlin. Jejich pozice uvnitř fotosyntetizujících buněk závisí na směru, vlnové délce a intenzitě světla (Gabryš 2004). Světlem indukované pohyby chloroplastů jim dovolují přesunout se do vhodné polohy v buňce pro zefektivnění fotosyntézy a také uniknout z nebezpečného silného záření. Pohyb chloroplastů v reakci na světlo už je znám pro více jak 100 let. Z ekofyziologického hlediska představují pohyby chloroplastů dva základní typy uspořádání:

- a) HFR reakce (High - Fluence - Rate): reakce na světlo o vysoké intenzitě

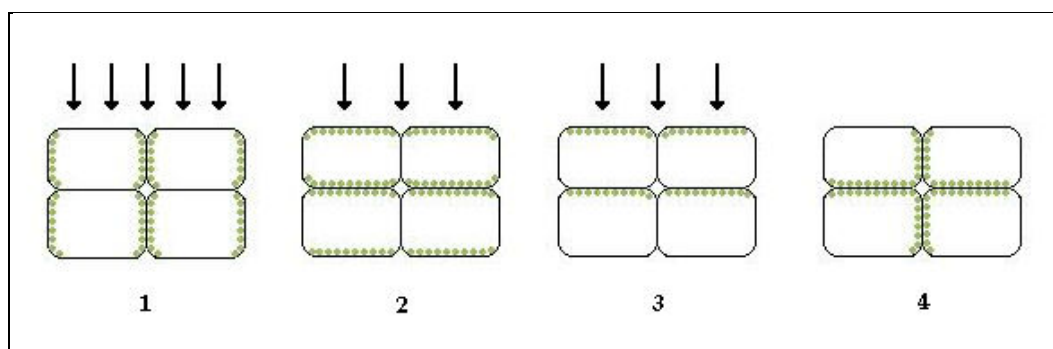
Jestliže jsou rostliny ozářeny silným světlem, tak by chloroplasty v buňkách, které se nedokážou vyhnout dopadajícímu světlu, mohly být vážně poškozeny (Kagawa a Wada 2002). Za světla o vysoké intenzitě se chloroplasty vyhýbají nejvíce ozářeným místům („*avoidance response*“ - vyhnutí se) a pohybují se ke stěnám buňky, které jsou rovnoběžné se směrem světla (parastrofe) (obr. 1). Tímto způsobem se chloroplasty vyhýbají poškození fotosyntetického aparátu (Haupt a Scheurlein 1990, Malec a kol. 1996, Kagawa a Wada 1999, Deblasio a kol. 2003, Gabryš 2004, Grabalska a Malec 2004).

- b) LFR reakce (Low - Fluence - Rate): reakce na světlo o nízké intenzitě

Za nízké intenzity osvětlování se chloroplasty pohybují směrem ke světlu („*accumulation response*“ - akumulace) a shromažďují se u nejvíce osvětlených buněčných stěn (kolmých na světelné paprsky). Dochází k největší světelné absorpci a tím k možnosti dosáhnout maximální rychlosti fotosyntézy (Haupt a Scheurlein 1990, Malec a kol. 1996, Deblasio a kol. 2003, Kagawa a Wada

2002, Wada a kol. 2003, Gabryš 2004, Grabalska a Malec 2004). Může nastat buď diastrofické (chloroplasty se přemístí k oběma stěnám buňky, které jsou kolmé ke směru dopadajícího světla) nebo epistrofické uspořádání chloroplastů (chloroplasty jsou na předních stěnách buňek kolmých ke směru dopadajícího světla) (obr. 1).

Ve tmě chloroplasty pokrývají co největší absorpční plochu a shromažďují se prioritně u stěn, které jsou společné se sousedními mezofylními buňkami (apostrofe) (obr. 1). Poměr počtu chloroplastů rozmístěných podél kolmých a rovnoběžných stěn závisí na světelných podmínkách, ve kterých rostlina vyrůstala. Ve tmě jsou chloroplasty v buňkách rostlin rostoucích za slabého světla v čelní pozici (diastrofe), zatímco u rostlin rostoucích za silného světla zůstala většina chloroplastů v pozici parastrofe (Trojan & Gabryš 1996).



Obr. 1. Uspořádání chloroplastů v buňkách v reakci na různé intenzity osvětlení. 1 - parastrofe, 2 - diastrofe, 3 - epistrofe, 4 - apostrofe. Počet šipek znázorňuje relativní intenzitu světla.

3.2 Fotoreceptory

Aby rostliny přežily, používají k řízení svého růstu a morfologických změn signály z okolní přírody. Na tyto procesy mají rozhodující vliv světelné signály. Poskytují informace o intenzitě, trvání, spektrálním složení a směru šíření energie potřebné k uskutečnění fotosyntézy. Světlo je vnímáno rostlinnými fotoreceptory, kterými jsou fytochromy, kryptochromy a fototropiny. Získané informace jsou přeměněny na vnitřní signál, který následně řídí vývojové reakce (Christie a Briggs 2001, Kagawa 2003).

V buňkách většiny zkoumaných rostlinných druhů je pohyb chloroplastů řízen modrým světlem a světlem v blízké ultrafialové oblasti. Pouze světlo o vlnových délkách pod 500 nm je schopno způsobit pohyb chloroplastů v listech rostlin (Brugnoli a Björkman 1992). Přesná akční spektra jsou k dispozici pro různé organismy od řas až ke kvetoucím vyšším rostlinám. Podobné tvary akčního spektra byly získány pro obě reakce chloroplastů (LFR a HFR reakce) (Yatsushashi 1996).

U zelené řasy *Mougeotia scalaris* (Haupt 1982), mechu *Physcomitrella patens* (čepenka odstálá) (Kadota a kol. 2000), kapradiny *Adiantum capillus-veneris* (netík Venušin vlas) (Yatsushashi 1996) a dalších druhů kapradin jsou fotoindukované pohyby chloroplastů řízeny červeným světlem, stejně jako modrým světlem (Kagawa a Wada 2002).

Pro reakce řízené červeným světlem byl identifikován fotoreceptor, který je znám jako fytochrom (Fankhauser 2002). Fytochrom existuje ve dvou konformacích. První reaguje na světlo o vlnové délce 660 nm (red), druhá reaguje na světlo o vlnové délce 730 nm (far-red). Po působení záření je schopna přecházet jedna v druhou. Fytochrom ovlivňuje mnoho vývojových reakcí včetně klíčení semen, inhibici růstu hypokotylu a zelenání (Kagawa 2003).

Kryptochromy byly objeveny u *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) jako receptor pro modré světlo (Christie a Briggs 2001, Banerjee a Batschauer 2002). Pomáhají řídit fyziologické reakce, jako jsou délka hypokotylu a načasování kvetení (Kagawa 2003).

3.2.1 Fototropiny

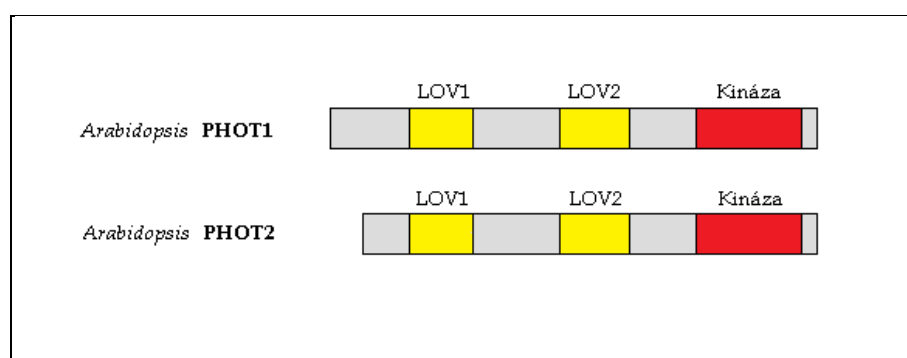
Pohyby chloroplastů indukované modrým světlem (LFR a HFR reakce) jsou řízeny fotoreceptorem pro modré světlo, fototropinem. Fototropin byl původně objeven u mutanta *nph1* (*non-phototropic hypocotyl 1*) (Briggs a Christie 2001, Jarillo a kol. 2001, Briggs a Christie 2002, Celaya a Liscum 2005) modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. U tohoto mutanta nedochází k fototropickému ohybu hypocotylu vlivem působení modrého světla. Z tohoto důvodu byl gen odpovědný za fenotyp *nph1* pojmenován fototropin (*phot1*). U *Arabidopsis thaliana* byl již naklonován také druhý gen *npl1* (*non-phototropic hypocotyl 1-like1*), který byl později pojmenován *phot2* (Sakai a kol. 2001). Každý z těchto genů kóduje dvě LOV domény (Light, Oxygen nad Voltage) a doménu kinázy. Fototropiny neřídí pouze přemisťování chloroplastů, ale také fototropické reakce, roztahování listu a otvírání průduchů. Z nedávných genetických analýz u *A. thaliana* se jeví, že PHOT1 a PHOT2 se ve svých funkcích překrývají. PHOT1 je aktivní převážně ve slabém světle a PHOT2 v silném světle. Uspořádání chloroplastů v pozici diastrofe či epistrofe (LFR reakce) se zdá být zprostředkováno pomocí PHOT1 a PHOT2, zatímco samotný PHOT2 řídí pohyb chloroplastů z místa vysokého ozáření (HFR reakce). (Briggs a Christie 2002, Kagawa 2003, Gabryš 2004, Kasahara a kol. 2004).

3.2.1.1 LOV domény

LOV domény (obr. 2) (Christie a kol. 1999, Briggs a Christie 2002, Kay a kol. 2003, Celaya a Liscum 2005) molekuly fototropinu jsou oblasti odpovědné za absorpci modrého světla. Fotochemické analýzy, provedené u bakterie *Escherichia coli*, vyjádřily LOV domény jako směs proteinů a poskytly systém ke studiu fotochemických vlastností fototropinu (Christie a Briggs 2001). Tyto proteiny váží typ flavinu, riboflavin-5'-mononukleotid (FMN) a absorbují fialové a modré světlo.

3.2.1.2 Doména kinázy

Doména kinázy (obr. 2) (Matsuoka a Tokutomo 2005), která je spojena především s transdukcí signálu, katalyzuje fosforylaci aminokyselin serinu a threoninu (Briggs a Christie 2002). Proto se tato část proteinu také nazývá serin/threonin (Ser/Thr) protein kináza.



Obr. 2. Proteinová struktura PHOT1 a PHOT2 fotoreceptoru u *Arabidopsis thaliana*. LOV domény jsou vyznačeny žlutě, doména kinázy červeně. (Upraveno podle Briggs a Christie 2002)

3.2.1.3 Umístění fototropinů v buňkách

Jedna z důležitých otázek je lokalizace fotoreceptoru v buňkách. Velmi brzy bylo postulováno spojení receptoru modrého světla s buněčnou membránou. Tato hypotéza byla potvrzena díky použití specifických geneticky modifikovaných rostlin *Arabidopsis* (Sakamoto a Winslow 2002). Další rozbory odhalily, že jak PHOT1, tak PHOT2 jsou umístěny převážně v plazmatické membráně (Gabrys 2004).

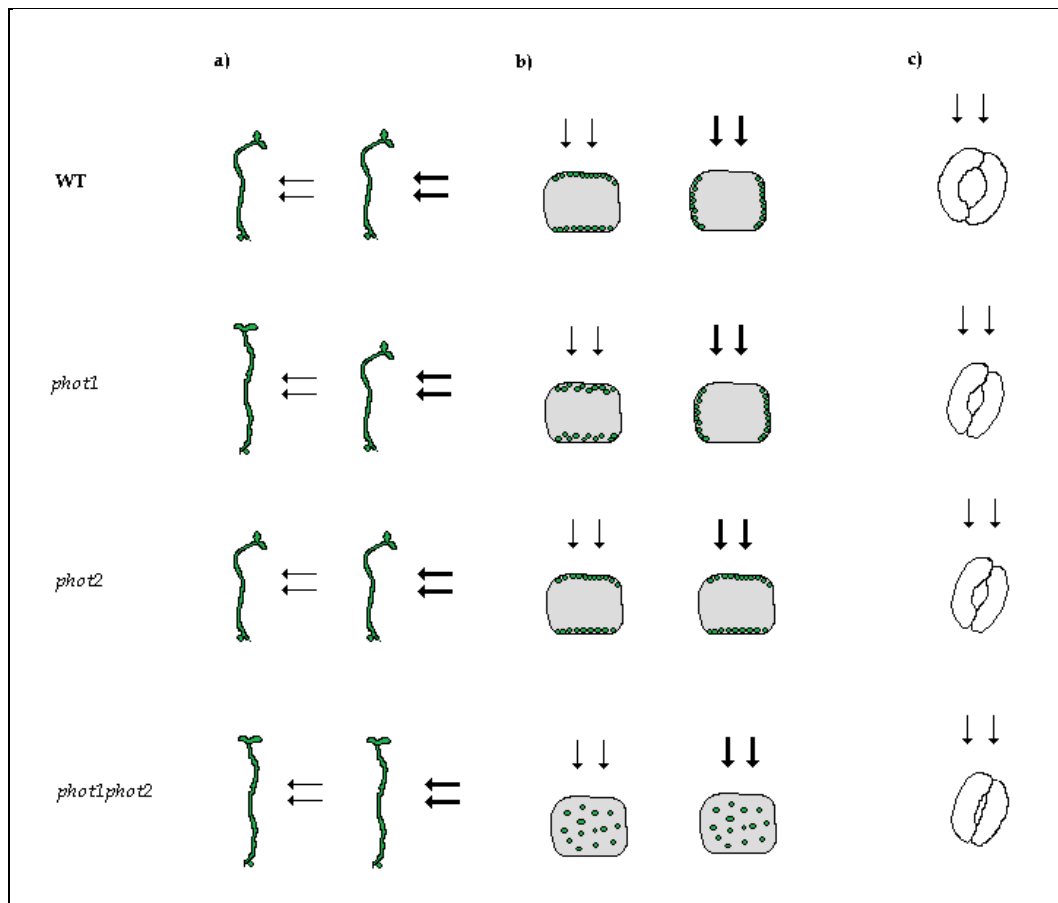
3.3 Genetické studie s mutanty

V minulosti brzdily identifikaci receptorů pro modré záření dva hlavní problémy:

- 1) Akční spektra naznačovala, že flavoprotein je fotoreceptorem pro fototropismus, přemisťování chloroplastů a otvírání průduchů. Avšak rostliny obsahují mnoho rozličných flavoproteinů. Mimoto i volné flaviny a flavoproteiny mohou být za určitých podmínek fotochemicky aktivní.
- 2) Ukázalo se, že se PHOT1 a PHOT2 v regulaci fyziologických reakcí funkčně překrývají. Z toho vyplývá, že experimenty s mutanty s jedním fotoreceptorem jsou méně než přesvědčivé. Pouze, když mutantům chybí jak PHOT1, tak PHOT2, nastane vhodná situace pro všechny tři reakce (fototropismus, pohyb chloroplastů, otvírání průduchů). (Briggs a Christie 2002)

3.3.1 Fototropismus

Fototropismus poskytuje výborný příklad problému překrývání funkcí fototropinu. Původně byli *nph1* (*phot1*) mutanti popsáni absencí fototropismu hypokotylu v reakci na nízkou intenzitu světla. Avšak bylo pozorováno, že *phot1* mutanti si uchovávají citlivost na modré světlo o vysoké intenzitě. Druhý fotoreceptor PHOT2 může zprostředkovávat fototropismus, ale pouze při vysokých intenzitách ozáření. Pouze u *phot1phot2* mutanta, kde chyběly oba geny, byla reakce na vysokou intenzitu osvětlení vážně poškozena. Jak PHOT1, tak PHOT2 zprostředkovávají fototropismus, avšak PHOT2 pouze za vysoké intenzity ozáření. Fototropické reakce přirozeného typu (wild-type) a mutantů u *Arabidopsis* za nízké a vysoké ozáření modrým světlem jsou ukázány na obr. 3. (Briggs a Christie 2002)



Obr. 3. Fototropické reakce, pohyby chloroplastů a otvírání průduchů indukované modrým světlem u přirozeného typu (WT) rostliny *Arabidopsis* a mutantů této rostliny postrádajících fototropin (*phot1*, *phot2* a *phot1phot2*). (a) Reakce na modré světlo o nízké a vysoké intenzitě. (b) Reakce chloroplastů v buňkách. (c) Reakce otvírání průduchů. Velikost černých šipek ukazuje relativní intenzitu modrého světla. (Upraveno podle Briggs a Christie 2002)

3.3.2 Pohyb chloroplastů aktivovaný modrým světlem

Jako u fototropismu, PHOT1 a PHOT2 ukazují pro pohyby chloroplastů indukované světlem částečné překrývání funkcí. Oba PHOT1 a PHOT2 mohou za nízké intenzity modrého světla zprostředkovávat pohyby chloroplastů do pozice diastrofe či epistrofe, ačkoli PHOT2 je poněkud méně citlivý. Samotný PHOT2 zprostředkovává pohyb chloroplastů z místa vysokého ozáření do pozice parastrofe.

Různé reakce chloroplastů u přirozeného typu (WT) a mutantů rostliny *Arabidopsis* jsou ukázány na obr. 3. (Briggs a Christie 2002)

3.3.3 Otvírání průduchů indukované modrým světlem

Oba mutanti v jednom genu (*phot1* a *phot2*) reagují na modré světlo zvětšením průduchové štěrbin, jsou však nepatrně méně citlivé než přirozený typ (WT). Naopak mutant *phot1phot2* neukázal žádnou průduchovou reakci na modré světlo. Tedy, stejně jako u fototropismu a akumulace chloroplastů, oba PHOT1 a PHOT2 zprostředkovávají otvírání průduchů, ačkoli se mohou lišit v jejich relativní fotocitlivosti. Průduchové reakce přirozeného typu *Arabidopsis*, stejně jako mutantů, jsou ukázány na obr. 3. (Briggs a Christie 2002)

3.4 Přenos signálu

Změny molekuly fotoreceptoru vyvolávají sérii sekundárních procesů, které jsou označovány jako signální řetězec nebo přenos signálu. Přesný signál přenesený z fotoreceptorů k chloroplastům není zatím znám, ale zajímavé informace byly získány částečným ozařováním buněk mikropaprsky (Kagawa a Wada 1999). Pohyb chloroplastů byl vyvolán částečným ozářením buněk kapradiny *Adiantum capillus-veneris* mikropaprsky modrého světla o vysoké intenzitě. Výsledky ukázaly, že 1) modré světlo o vysoké intenzitě vyvolává jak signál pro akumulaci, tak i pro vyhnutí se, 2) signál pro akumulaci chloroplastů se může pohybovat napříč buňkou, zatímco signál pro vyhnutí se zůstává uvnitř osvětlené oblasti, 3) signál pro vyhnutí se je dominantní nad akumulací a 4) trvání signálu pro akumulaci je delší než pro vyhnutí se. Tyto výsledky naznačily, že signály pro obě reakce jsou rozdílné.

Jako kandidát pro přenos signálu z fotoreceptorů k chloroplastům jsou ionty vápníku (Wada a kol. 2003). Role Ca^{2+} jako potenciálního nitrobuňčného posla byla

zkoumána v modelové rostlině *Lemna trisulca* (okřehek trojbrázdý) (Tlalka a Gabryš 1993, Tlalka a Fricker 1999), u kapradiny *Adiantum capillus-veneris* (Sato a kol. 2001b, 2003a), mechu *Physcomitrella patens* (čepenka odstálá) (Sato a kol. 2003b) a u *Arabidopsis thaliana* (Stoelzle a kol. 2003). V těchto pracích byly získány důkazy pro relativně silné zapojení vnitřních zásob Ca^{2+} v regulaci pohybu chloroplastů. Avšak výsledky neposkytly žádná vodítka, jak by mohl být kontrolován směr pohybu (Gabryš 2004).

3.5 Mechanismus pohybu chloroplastů

Signály vyvolané světlem a mechanickým stresem musí být nakonec přeneseny ke složkám cytoskeletu, což má za následek pohyb chloroplastů (Wada a kol. 2003). Předpokládá se, že hlavní roli ve vytváření mechanické síly pro pohyb hraje aktin. Chloroplasty se pohybují podél vnějších vláken, které jsou složeny z mnoha svazků mikrofilament (Haupt & Scheuerlein 1990). Na základě strukturálních a farmakologických výzkumů je již dlouho známo zapojení aktinu v pohybu chloroplastů v buňkách různých druhů rostlin. Změny v uspořádání aktinových vláken během světlem kontrolovaného pohybu chloroplastů byly dokumentovány u *Vallisneria* (Takagi 2003, Sakurai a kol. 2005, Sakai & Takagi 2005), u *L. trisulca* (Tlalka & Gabryš 1993, Malec a kol. 1996, Grabalska & Malec 2004), u *A. capillus-veneris* (Kadota & Wada 1992), u *Nicotiana tabacum* (Augustynowicz a kol. 2001) a u *Arabidopsis thaliana* (Krzyszowiec a kol. 2007).

Epidermis vodní krytosemenné rostliny *Vallisneria gigantea* (zákruticha obrovská) se stal modelovým systémem, ve kterém je mechanismus pohybu chloroplastů nejvíce prozkoumán. U *Vallisneria* jsou chloroplasty přesunovány tekoucí cytoplazmou. Buď jsou uvězněny ve slabě osvětlených bodech, nebo při nadměrném osvětlení plují pryč z těchto oblastí. Umístění chloroplastů v těchto rostlinách kontrolují dvě spektrální oblasti, červená a modrá (Takagi 2003). Vztah mezi reakcemi chloroplastů a cytoplazmatickým prouděním není zjevný u vyšších

suchozemských rostlin, kde jsou reakce chloroplastů aktivovány pouze modrým světlem (Gabrys 2004).

Kandasamy & Meagher (1999) pracovali, s využitím imunofluorescentního barviva, na strukturálním vztahu mezi chloroplasty a cytoskeletem u rostliny *Arabidopsis thaliana*. Chloroplasty byly vyrovnány podél aktinových svazků nebo byly úzce spjaty s tenkými vlákny, které náhodně tvořily koše okolo nich. Analýza obrázků vedla autory k závěru, že některé chloroplasty migrují podél aktinových vláken, zatímco ostatní jsou taženy tenkými aktinovými vlákny.

Sato a kol. (2001b) studovali v pohybu chloroplastů u mechu *Physcomitrella patens* zapojení dvou systémů vláken (mikrotubul a mikrofilament). Používali cytoskeletární inhibitory Cremart a cytochalasin B, které roztrhaly systém mikrotubul, resp. mikrofilament. Objevili v pohybu chloroplastů vedle zapojení mikrofilament (aktinu) také zapojení systému mikrotubulí. Zjistili, že reakce fytochromu využívají pouze systém mikrotubulí, zatímco reakce fotoropinu mají dvojí možnost způsobu pohybu, buď podél mikrotubulí nebo mikrofilament.

Krzeszowiec a kol. (2007) zkoumali, zda modré světlo, které spouští charakteristické reakce chloroplastů (LFR a HFR reakce) také ovlivňuje uspořádání F-aktinu v mezofilních buňkách *Arabidopsis thaliana*. Srovnávali způsob a tvar rozdělení tkání při osvětlení silným a slabým modrým a červeným světlem. Prostorové uspořádání F-aktinových sítí neutrpělo žádné změny, které by mohly být připsány výslovně modrému světlu. Uspořádání aktinových vláken bylo podobné u modře osvětlených přirozených typů rostlin a *phot2* mutantů, kteří postrádali reakci chloroplastů na silné světlo. Avšak významné rozdíly ve tvaru a rozdělení F-aktinu byly pozorovány mezi mezofilními buňkami *phot2* mutantů osvětlených silným a slabým červeným světlem. Tyto změny nejsou patrné v listech přirozených typů. Došli k závěru, že aktin se nejvíce může stát hlavním cílem pro signál orientace chloroplastů vlivem modrého světla. Způsoby zapojení aktinu v přemisťování chloroplastů jsou jiné u vodních a suchozemských rostlin. Výsledky naznačily, že při řízeném uspořádání aktinu u *Arabidopsis thaliana* existuje spolupráce mezi fotoreceptory pro červené a modré světlo.

Funkce vláken aktinu během pohybu chloroplastů není ještě plně poznána. Není známo, zda chloroplasty jsou prostě přenášeny podél nachystaného systému sítí aktinu nebo jestli používají nově polymerizovaná vlákna aktinu po určení směru pohybu fotoreceptorem. Více informací o způsobu zapojení aktinu může být získáno díky *chup1* (*chloroplasts unusual positioning 1*) mutantu *Arabidopsis* (Kasahara a kol. 2002, Oikawa a kol. 2003). Tito rostlinní mutanti nevykazovali ani LFR reakci (přesun chloroplastů do pozice diastrofe či epistrofe), ani HFR reakci (uspořádání chloroplastů v pozici parastrofe) a jejich chloroplasty zůstávali v relativně pevné pozici především na jedné straně mezofilních buněk (Gabryš 2004).

Kasahara a kol. (2002) měřili pomocí dvou druhů mutantů rostliny *Arabidopsis*, *phot2* a *chup1*, pohyb chloroplastů a míru poškození PS II. Tyto dvě rozdílné třídy mutantů jsou defektní v reakci chloroplastů na silné světlo. Autoři ukázali, že tyto mutanti jsou více citliví na poškození silným světlem než přirozené typy rostlin. Za vysoké intenzity světla u nich docházelo rychleji k poškození fotosyntetického aparátu a následnému vybělení barvy listu a jeho nekróze. Z těchto výsledků usoudili, že reakce chloroplastů na vysokou intenzitu světla (přesun do pozice parastrofe) snižuje množství absorbovaného světla chloroplasty.

3.6 Význam pohybu chloroplastů

Skutečnost, že orientovaný pohyb chloroplastů je obecný jev v rostlinné říši, vede k závěru, že tyto pohyby plní důležitou funkci v životě rostliny (Haupt & Scheuerlein 1990).

Park a kol. (1996) studovali fotoinhibici PS II ozářením silným světlem s ohledem na pohyb chloroplastů u stínomilné rostliny *Tradescantia albiflora* (poděnká) v porovnání k světlomilnému *Pisum sativum* (hrách setý). PS II u *T. albiflora* ukázal větší odolnost na světelný stres než *Pisum sativum*. Navrhli, že pohyb chloroplastů u stínomilných rostlin může být lepší strategie pro zvládnutí fluktuace světelné intenzity.

Trojan & Gabryš (1996) studovali vztah mezi pohybem chloroplastů a světelnými podmínkami během růstu rostliny. Pěstovali *Arabidopsis thaliana* za různých světelných podmínek (na silném a slabém světle). Rostliny byly ozařovány silným či slabým světlem nebo drženy ve tmě a byly pozorovány zákonitosti rozdělení chloroplastů. Výsledky ukázaly překvapující rozdíly v uspořádání ve tmě a pouze nepatrné rozdíly v uspořádání za slabého světla. Ve tmě byly chloroplasty v buňkách rostlin rostoucích za slabého světla v čelní pozici (diastrofe či epistrofe), zatímco u rostlin rostoucích za silného světla zůstala většina chloroplastů v pozici parastrofe. U rostlin rostoucích za slabého i silného světla silné světlo vždy vyvolalo pohyb chloroplastů do pozice parastrofe. Tyto výsledky naznačily, že reakce chloroplastů na silné světlo (HFR reakce) je primárně důležitá a dominuje nad jinými orientacemi chloroplastů.

Augustynowicz & Gabryš (1999) zvažovali ekologický význam pohybu chloroplastů za přírodních podmínek. Pohyby chloroplastů v reakci na měnící se hodnoty a vlnové délky světla byly vyšetřovány na listech čtyřech druhů kapradin žijících v různých ekologických nikách: *Adiantum capillus-veneris* (netík Venušin vlas), *Adiantum caudatum* (netík), *Adiantum diaphanum* a *Pteris cretica* (křídelnice). *A. capillus-veneris* a *Pteris cretica* měly vysoký stupeň přírodní flexibility a vykazovaly velkou citlivost na pohyby chloroplastů při osvětlování silným a slabým modrým světlem. *A. caudatum*, vyžadující intenzivní světlo pro růst, neprodělával téměř žádný pohyb chloroplastů, zatímco *A. diaphanum* (stínomilný druh) vykazoval pouze slabý pohyb chloroplastů. Jejich výsledky ukázaly, že pohyb chloroplastů je nezbytný nebo užitečný pro rostliny rostoucí za přírodních podmínek, kde intenzity světla velmi kolísají, ale není důležitý pro rostliny žijící spíše za stálých světelných podmínek.

Jeong a kol. (2002) studovali, jak velikost chloroplastů ovlivní efektivitu jejich pohybu. Měřili na transgenních rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* cv *Xanthi*) obsahující pouze jeden až tři zvětšené chloroplasty v mezofilní buňce listu. Tyto rostliny byly použity pro zkoumání výhod, zda mít radši velkou populaci malých chloroplastů, spíše než pár větších chloroplastů. U přirozených typů rostlin

docházelo k normálním reakcím chloroplastů na světle (LFR a HFR reakce), avšak uspořádání chloroplastů u uvedené transgenní rostliny nebylo patrné. Došli tedy k závěru, že přítomnost velkého množství malých a rychle se pohybujících chloroplastů v buňkách dovoluje jejich efektivnější pohyb a účinnější využití slabého světla a naopak za silné intenzity světla chrání před poškozením fotosyntetický aparát.

Všeobecně se předpokládá, že pohyb chloroplastů do pozice diastrofe či epistrofe (LFR reakce) maximalizuje fotosyntetickou aktivitu a uspořádání chloroplastů v pozici parastrofe (HFR reakce) minimalizuje jejich poškození. Kasahara a kol. (2002) studovali důležitost HFR reakce chloroplastů využívající dva rozdílné druhy mutantů, *phot2* a *chup1* (mutant postrádající protein, který váže aktin a mutant s neobvyklým rozložením chloroplastů). Tito mutanti byli použiti k demonstraci toho, že pokud chloroplasty nemohou uniknout pryč ze silného světla, dojde k jejich trvalému zničení, prasknutí buněk a k nekróze listů. Kagawa a Wada (2004) testovali vztah mezi rychlostí přemisťování chloroplastů a intenzitou osvětlení. Ukázali, že rychlost úniku chloroplastů ze silného světla je závislá na intenzitě ozáření bílým světlem. Za vyšší intenzity světla byla rychlost pohybu chloroplastů vyšší a za nižší intenzity světla nižší. Rychlost je také závislá na množství *phot2*, heterozygotní mutant rostliny vykazuje sníženou rychlost pohybu ve srovnání s homozygotním přirozeným typem rostliny.

Pohyb chloroplastů byl studován u mnoha rostlin, ale hlavně jako modelový systém pro světelné signály. Avšak bylo ukázáno, že u kapradiny *Adiantum capillus-veneris* je pohyb chloroplastů indukován mechanickou stimulací, právě tak jako světelnou stimulací (Sato a kol. 2003a). Po velmi krátkém doteku (<1 min) mikrokapiláry na část buňky, se chloroplasty pohybovaly pryč od strany mechanické stimulace (Sato a kol. 1999). Nočekávaně byl však u mechu *Physcomitrella patens* pozorován opačný směr pohybu chloroplastů. Mechanická stimulace byla aplikována kapilárou přímo na část buňky. V 30 minutách po začátku stimulace se chloroplasty pohybovaly směrem na stranu tlaku a shromažďovaly se zde (Sato a kol. 2003b). Rozdíl ve směru pohybu mezi kapradinami a mechem *Physcomitrella*

patens nebyl dán složením použitého růstového média, protože směr pohybu se nezměnil, ani když byly reakce zkoumány ve stejném růstovém médiu, jaké bylo použito pro buňky kapradiny. Stejná reakce byla pozorována pro další mechy, bylo tedy navrženo, že tento jev platí obecně pro mechorosty (Sato a kol. 2003b).

3.7 Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů

Pohyb chloroplastů v reakci na světlo je již znám už více jak 100 let. Chloroplasty jsou specifické orgány v rostlinných buňkách, které dokážou měnit svoji polohu v buňce v reakci na rozdílné světelné podmínky. Za nízké intenzity osvětlování se chloroplasty pohybují směrem ke světlu a shromažďují se u nejvíce osvětlených buněčných stěn. Naopak za světla o vysoké intenzitě se chloroplasty vyhýbají nejvíce ozářeným místům a pohybují se ke stěnám buňky, které jsou rovnoběžné se směrem světla. Avšak efekty dalších faktorů vnějšího prostředí na pohyb chloroplastů nejsou zatím dobře popsány. (Kodama a kol. 2008)

Před 100 lety zkoumal Senn pohyb chloroplastů u různých organismů, jako jsou *Funaria hygrometrica* (zkrutek vláhojemný), *Striatella unipunctata*, *Lemna trisulca* (okřehek trojbrázdý) a *Phaseolus vulgaris* (fazol obecný). Popsal efekty různých vnějších faktorů na pohyb chloroplastů jako je světlo, tma, nízká a vysoká teplota, gravitace, mechanický stres a chemikálie. (Kodama a kol. 2008)

Teplota je jeden z kritických faktorů v životě rostliny. Pro rostliny mohou být nízko a vysoko teplotní režimy obzvláště škodlivé. Vyšší teploty mají v rostlinách vliv primárně na fotosyntetickou funkci (měny fluorescence a poškození fotosyntetického aparátu). (Holzinger a kol. 2007)

Pohyb chloroplastů byl studován u mnoha rostlin, ale hlavně jako modelový systém pro světelné signály. Brugnoli & Björkman (1992) ukázali, že světlem indukované pohyby chloroplastů jsou silně závislé na teplotě. Stupeň uspořádání chloroplastů u *Oxalis oregana* (šřavel oregonský) rostl silně ze vzrůstající teplotou do 30 °C a prudce klesal při dalším zvýšení teploty. Teplotní koeficient Q_{10} byl mezi

20 - 30 °C roven 2,7 a 5,5 mezi teplotami 10 - 20 °C. Kadoma a kol. (2008) studovali pohyb chloroplastů indukovaný nízkou teplotou v buňkách kapradiny *Adiantum capillus-veneris*. Za nízké intenzity světla při teplotě 25 °C se chloroplasty shromažďovaly podél stěn kolmých na světelné záření, ale při 4 °C se chloroplasty stěhovaly směrem ke stěnám rovnoběžným se směrem záření. Při vysoké intenzitě světla došlo ještě k zesílení této reakce. U *phot2* mutantů však nic takového nepozorovali. Také Walczak & Gabrys (1980) zjistili, že přemísťování chloroplastů v listech u *Tradescentia* (voděnka) a *Ajuga* (zběhovce) bylo silně ovlivněno změnami teploty. Zkoumali teplotní závislost reakcí chloroplastů na vysokou intenzitu světla (HFR reakce) pro tři teploty: 5, 10 a 20 °C. Zjistili, že snížením teploty se zvýšila citlivost na světlo pro oba typy reakcí chloroplastů (LFR a HFR reakce). Gabrys a kol. (1997) studovali interakci mezi kryptochromem a fytochromem u *Mougeotia*. Reakce byla indukována záblesky modrého a následně červeného světla. Zjistili, že interakce mezi kryptochromem a fytochromem nastala při 2 °C a dosáhla maxima po 10 min.

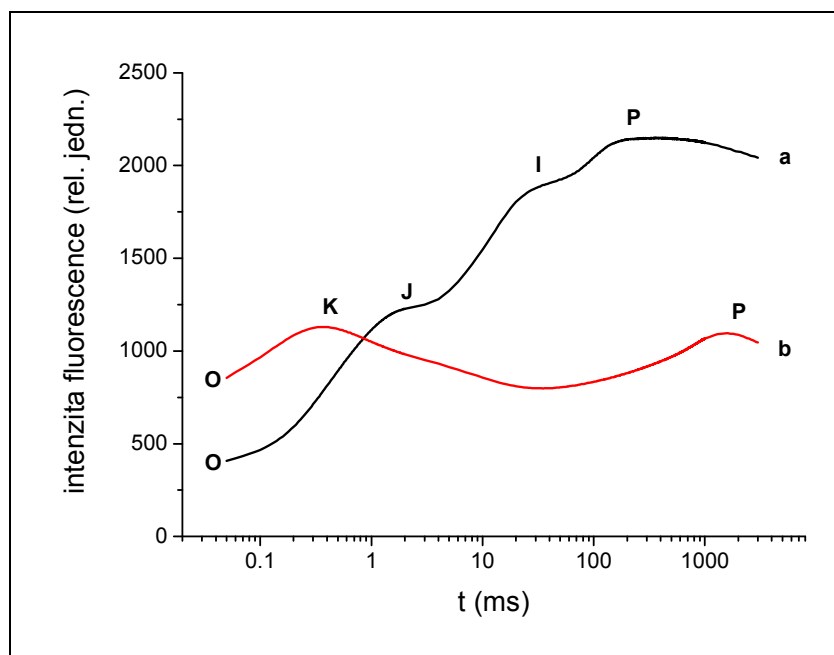
Vysoká teplota významně ovlivňuje anatomickou strukturu ne pouze v tkáních a na buněčné úrovni, ale také na subbuněčné úrovni. Na subbuněčné úrovni se hlavní změny způsobené teplotním stresem vyskytují v chloroplastech, což vede k výrazným změnám ve fotosyntéze. Holzinger a kol. (2007) studovali vliv teploty na samotné chloroplasty. Sestrojili speciální komůrku pro použití se světelným mikroskopem, kde mohli kontrolovat teplotu s přesností $\pm 0,1$ °C v rozmezí od 0 do 60 °C. Byl nalezen teplotně závislý výskyt výčnělků na chloroplastech. Tyto struktury dosáhly délky 3 - 5 μm . Při nízkých teplotách (5 - 15 °C) nebyly nalezeny téměř žádné výčnělky chloroplastů. Výčnělky se začaly objevovat až při vysokých teplotách (35 - 45 °C).

3.8 Fluorescence chlorofylu

Bylo dokázáno, že světlem indukované pohyby chloroplastů způsobují změny ve fluorescenci chlorofylu. Pohyby chloroplastů mají významný vliv na efektivitu využití světla pro fotosyntézu (Brugnoli & Björkman 1992). Ve většině prací byla studována míra poškození (fotoinhibice) PSII s ohledem na pohyb chloroplastů (Park a kol. 1996, Augustynowicz & Gabrys 1999, Joeng a kol. 2002, Kasahara a kol. 2002). Fluorescence chlorofylu je obecně rozšířená metoda užívaná ve výzkumu fotosyntézy. Měření fluorescence chlorofylu je neinvazivní, velmi citlivé, rychlé a poskytuje důležité informace o fotosyntetickém aparátu. Fluorescence chlorofylu *a* představuje jednu z forem přeměny absorbované energie světla.

Fluorescenční indukční jev (FIJ) je časová závislost intenzity fluorescence chlorofylu a systému dostatečně adaptovaného na tmu po náhlém ozáření silným kontinuálním (aktinickým) světlem, které vyvolá fotochemické reakce fotosyntézy. Podle charakteru osvitů a doby detekce může být FIJ rozdělen na velmi rychlý, rychlý a pomalý. Každá křivka fluorescenční indukce (FI) jde z minimální intenzity fluorescence F_0 (všechna RCII otevřena) k maximální intenzitě fluorescence F_M (všechna RCII uzavřena), jejich význam vysvětluje parametr F_V/F_M (potenciální maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII) (Lazár 1999). V ideálním případě $F_V/F_M \sim 0,823$, tato hodnota se nazývá biologická konstanta a je pro většinu rostlin stejná. Odráží funkční stav PSII a při působení stresu F_V/F_M klesá. Všechny vlny křivky nárůstu fluorescence chlorofylu mohou být zřetelně odhaleny, když je časová osa x v logaritmickém měřítku. Křivka FI má obvykle typický O-J-I-P průběh, který závisí na stavu použitého materiálu a intenzitě excitačního záření (obr. 4). O vlna znamená F_0 , J vlna se objevuje při 2 - 3 ms, I se objevuje při 30 - 50 ms a P vlnu reprezentující F_M obvykle dosáhneme při 200 - 500 ms (Lazár 1999).

Efekt rostoucí teploty se u fluorescence chlorofylu projevuje nárůstem v minimální intenzitě fluorescence F_0 . Při teplotní stresu rostlinného materiálu se okolo 300 μ s objevuje nová vlna označovaná, jako K. K vlna je způsobena inhibicí OEC, pravděpodobně spolu s inhibicí akceptorové strany PSII. (Lazár 2006)

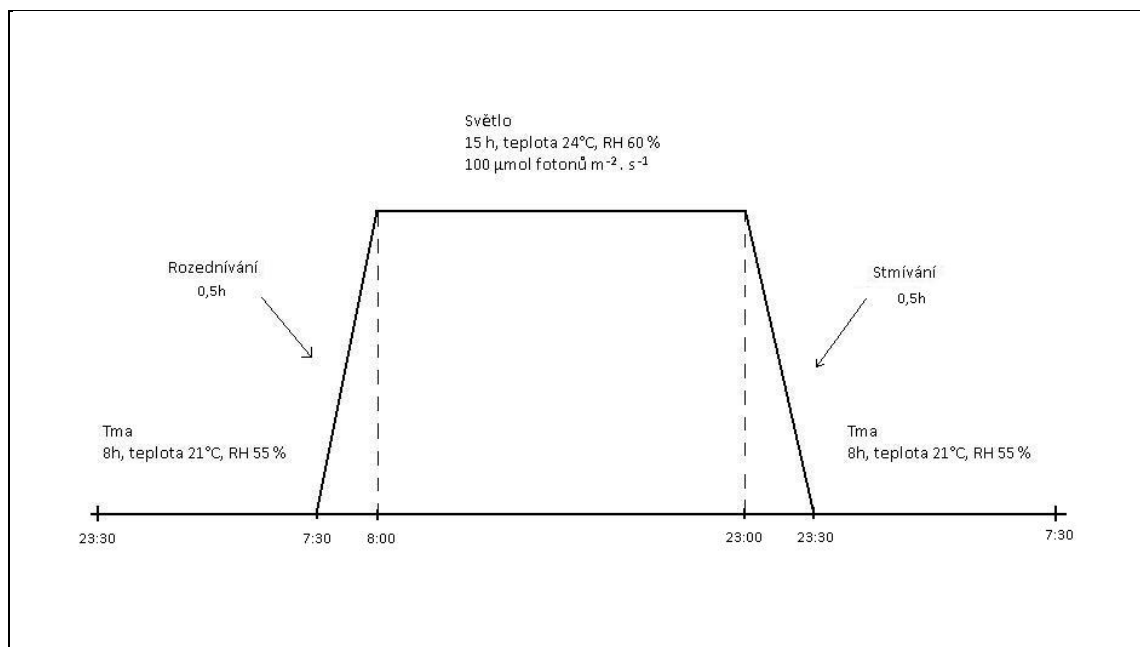


Obr. 4. Teplotní závislost křivek FI měřené na segmentech listu tabáku adaptovaném na tmu (15 min) fluorimetrem PEA ($1000 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, červené světlo s maximem okolo 650 nm). Křivka a) kontrolní segment listu ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), b) segment listu v alobalovém pouzdře byl ohříván v destilované vodě lineárně z teploty $25 \text{ }^\circ\text{C}$ rychlostí $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ až po koncovou teplotu $50 \text{ }^\circ\text{C}$ a následně ochlazován stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev, opět do teploty $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Křivky FI byly měřeny při $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O, J, I, P, K vlny jsou vyznačeny. Časová osa x je v logaritmickém měřítku.

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Světlem indukovaný pohyb chloroplastů pod vlivem vyšší teploty (lineární a skokový teplotní stres) byl měřen na listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*). Použité rostliny byly sázené 8. 12. 08 a pěstované v plastových květináčcích v Zahradnickém substrátu (AGRO CS a.s., Česká Skalice, Česká Republika) ve fotokomoře SGC.170.PFX.J (Weiss-Gallenkamp, Loughborough, England) při světelném režimu 8 h tma (teplota 21°C, relativní vlhkost 55 %), 30 min rozednívání, 15 h světlo (teplota 24°C, relativní vlhkost 60 %), 30 min stmívání (obr. 5). Intenzita světla ve fotokomoře byla 100 μmol fotonů $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ fotosynteticky aktivního záření (PAR) ve výšce 30 cm pod vrchem. Pro měření byly použity rostliny ve stáří 2,5 – 3,5 měsíce.

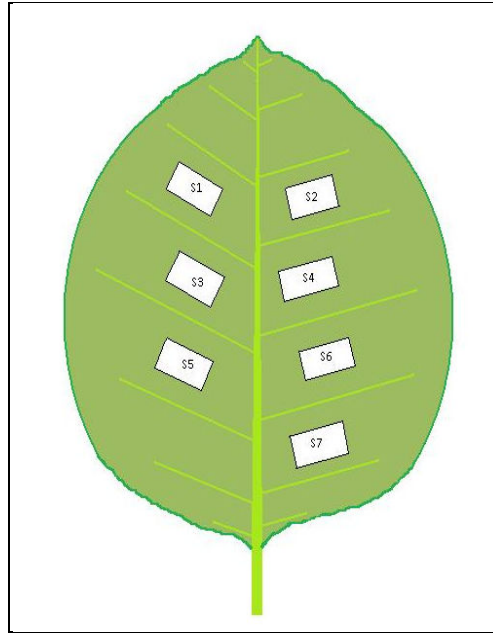


Obr. 5. Režim jednoho cyklu fytokomory SGC.170.PFX.J (Weiss-Gallenkamp, Loughborough, England).

Pro studium světlem indukovaného pohybu chloroplastů pod vlivem biotického stresu jsme použili rostliny slunečnice roční (*Helianthus annuus* L. - náchylný genotyp *Peredovik*). Rostliny byly sázené 20. 1. 09 a byly pěstované jednotlivě v plastových květináčích s perlitem. Jednou týdně byly pak přihnojovány přípravkem KRISTALON start (Hydro Agri Rotterdam, Rotterdam, Netherlands). Prvních 7 dní byly rostliny pěstovány na Katedře botaniky PřF UP Olomouc (Oddělení fytopatologie a mikrobiologie) v růstové komoře MLR 350 HT (Sanyo, Osaka, Japan) za režimu 10 h tma (teplota 18°C, relativní vlhkost 75 %), 14 h světlo (teplota 23 °C, relativní vlhkost 75 %), intenzita světla byla 100 μmol fotonů PAR $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Poté byly převezeny k nám na Katedru experimentální fyziky UP Olomouc (Oddělení biofyziky), kde byly pěstovány v upravené fytokomoře Calex (Calex, Zlaté Moravce, Slovenská Republika). Teplotu a denní režim jsme udržovali stejné, relativní vlhkost byla 65 %, intenzitu světla se nám podařilo dosáhnout pouze 50 μmol fotonů PAR $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Pro měření světlem indukovaného pohybu chloroplastů pod vlivem biotického stresu byly rostliny inokulovány v suspenzi plísně slunečnicové (*Plasmopara halstedii*) rasa 700. Inokulace naklíčených rostlin proběhla 4. den stáří rostliny při teplotě 15 °C po dobu 3 hodin ve tmě. Pohyb chloroplastů byl měřen 18., 21., 24. a 27. den stáří rostliny.

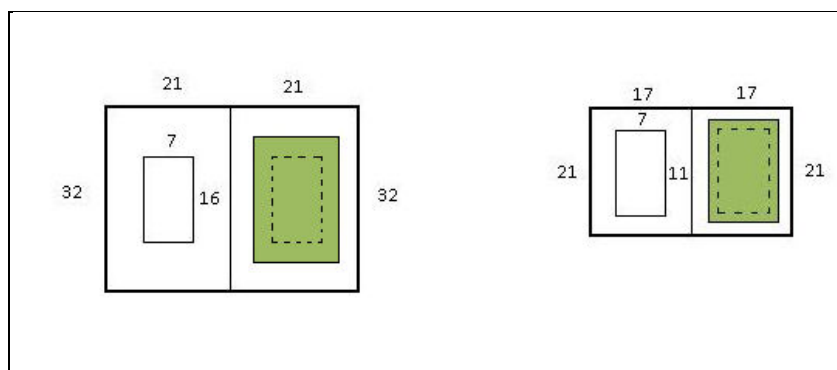
4.2 Příprava segmentů

Měření světlem indukovaného pohybu chloroplastů pod vlivem teplotního stresu bylo prováděno na segmentech listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*). Z listu bylo odstříženo 7 segmentů o velikosti 0,9 x 2 cm pro skokový teplotní režim a 8 segmentů o velikosti 0,9 x 1,5 cm pro lineární teplotní režim. Odstřížení segmentů z listu je znázorněno na obr. 6. Snažili jsme se, aby bylo v segmentu co nejméně žilnatiny, která má odlišné optické vlastnosti od zbytku listu.

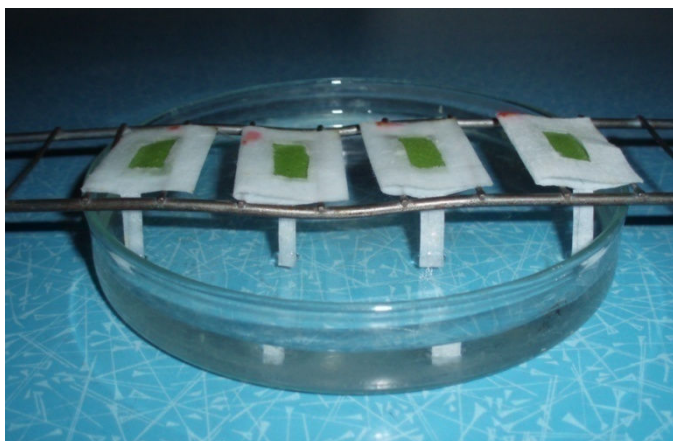


Obr. 6. Znárodnění odstřížení segmentů z listu pro skokový teplotní režim. Z listu je odstříženo 7 segmentů o velikosti 0,9 x 2 cm. Vybíráme místa s minimálním zastoupením žilnatiny.

Po odstřížení byl segment listu vložen do rámečku z filtračního papíru (obr. 7), kde byl připevněn kouskem průsvitné lepicí pásky. Rámeček se segmentem jsme položili na kovový žebříček, který byl umístěn na Petriho misce naplněné vodou. Rámečky z filtračního papíru jsme použili z důvodu zabránění vysychání segmentu po odstřížení z listu. Segmenty byly vlhčeny pomocí proužku filtračního papíru, který spojuje rámeček s vodní hladinou (obr. 8). Takto připravené segmenty byly poté dány na 15 minut na slabé bílé světlo pod zářivku (PHILIPS TLD 36W/33). Intenzita světla byla $20 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teplota 22°C a relativní vlhkost 24 %.



Obr. 7. Nákres rámečků z filtračního papíru s vloženým segmentem listu. Vlevo je rámeček pro skokový teplotní režim, vpravo rámeček pro lineární teplotní režim. Čísla představují rozměry rámečku v milimetrech.



Obr. 8. Způsob uložení a vlhčení rámečku z filtračního papíru se segmentem listu. Takto připravené segmenty byly poté dány na 15 minut na slabé bílé světlo pod zářivku.

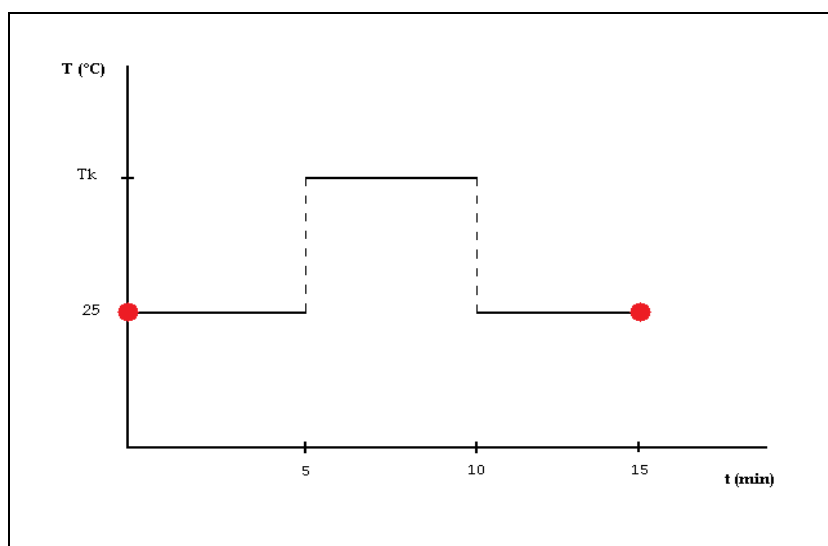
4.3 Teplotní režimy stresu

Po 15 minutách inkubace na slabém světle byl segment listu v rámečku z filtračního papíru vložen na 15 minut do tmy. V našem případě jsme segment vložili do připravené alobalové obálky. Toto jsme provedli z důvodu měření fluorescence chlorofylu, která poté následovala.

Takto připravené vzorky jsme inkubovali ve vodní lázni, kde jsme na ně aplikovali teplotní stres. Pro zabránění infiltrace segmentu vodou a zajištění přenosu tepla jsme použili alobalové pouzdro, do kterého jsme segment umístili po vyjmutí z alobalové obálky. Podle teplotního režimu jsme měření vlivu vnější teploty na pohyb chloroplastů rozdělili na dva podprojekty: 1) skokový teplotní režim, 2) lineární teplotní režim.

4.3.1 Skokový teplotní režim

Segment listu jsme inkubovali ve vodní lázni při dané teplotě T . Časový režim inkubace je znázorněn na obr. 9. Celá procedura se skládala ze tří kroků. Nejprve jsme segment v alobalovém pouzdře (obr. 10) vložili do vody o teplotě 25°C . Další krok inkubace probíhal v termostatu Termostat U10 (VEB MLW PRUFGERATE-WERK MEDINGEN, Drážďany, Německo) pro teploty $T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45^{\circ}\text{C}$ (pro každou teplotu T_K byl z listu odstřížen jeden segment). Poslední krokem bylo opět vložení vzorku do vody o teplotě 25°C , kterou jsme udržovali v termostatu Transsonic T460/H(Elma, Singen, Německo). Doba každého kroku trvala 5 minut, celkem tedy procedura trvala 15 minut.



Obr. 9. Časový průběh teploty pro skokový teplotní režim. Inkubace se skládala ze tří kroků. Nejprve jsme segment v alobalovém pouzdře vložili do vody o teplotě 25 °C, poté byl vložen do vodní lázně o teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C). Nakonec jsme segment opět vložili do vody o teplotě 25 °C. Každý krok trval 5 minut, celková doba procedury byla tedy 15 minut. Červené tečky označují měření fluorescence (fluorescenční indukce měřena vždy před a po teplotním stresu).



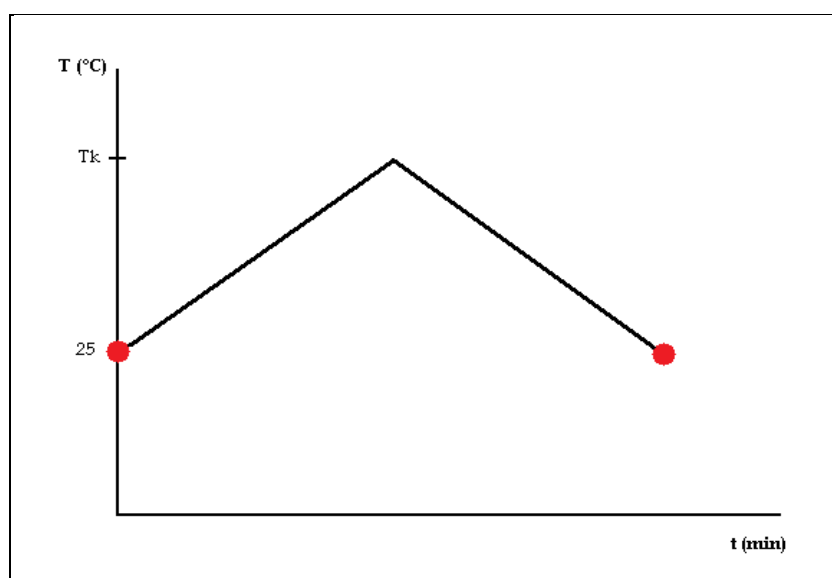
Obr. 10. Segment v rámečku z filtračního papíru jsme z důvodu zabránění infiltrace a zajištění přenosu tepla vložili do alobalového pouzdra. Aby pouzdro neplavalo na hladině, bylo zatíženo měděným plíškem.

4.3.2 Lineární teplotní režim

Teplotní režim vzorku zajišťovala nekomerční aparatura, která byla sestrojena RNDr. Pavlem Krchňákem, Ph.D. Schéma aparatury a popis teplotních režimů je podrobně popsán v Frolcovi a kol. (2008).

Segment listu v alobalovém pouzdře byl fixován k držáku, který byl ponořen do destilované vody ve skleněné kádince. Kádinka (průměr 3 cm, výška 4 cm) byla postavena na magnetickou míchačku, která udržovala homogenitu teploty destilované vody. Kromě držáku se vzorkem bylo přes uzávěr do kádinky zavedeno ještě teplotní čidlo (termočlánek) a těleso k regulaci teploty.

Pro měření byly použity segmenty o velikosti 0,9 x 1,5 cm. Ohřívacím médiem byla destilovaná voda o objemu 17,5 ml. Ohřev vzorku probíhal lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po vybranou (koncovou) teplotu T_k . Koncové teploty byly zvoleny $T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C. Poté následovalo jeho lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev (obr. 11).



Obr. 11. Časový průběh lineárního teplotního režimu. Ohřev vzorku probíhal lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po koncovou teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C). Poté následovalo jeho lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev.

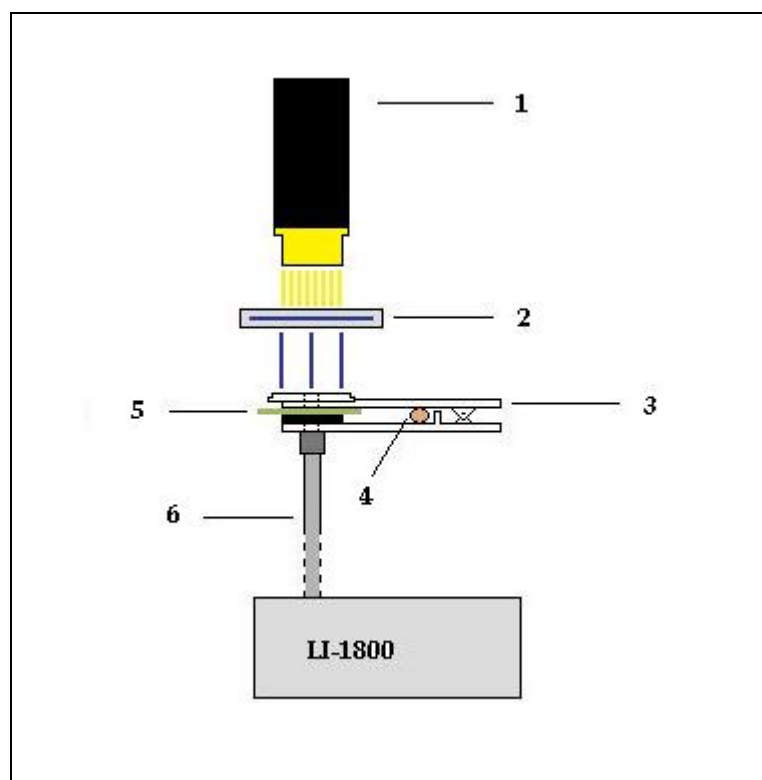
4.4 Měření pohybu chloroplastů

Pohyb chloroplastů byl vyvolán studeným bílým světlem z osvětlovací soustavy KL 2500 (Schott Glas, Wiesbaden, Německo) s průměrem světlovodu 15 mm. Pro měření jsme použili modrý filtr BG-12 (Schott, Wiesbaden, Německo), kde jsme využili dobře známého faktu, že pohyb chloroplastů je indukován modrým světlem. Intenzita budícího světla byla měřena přístrojem LI-COR Quantum/Radiometer/Photometer model LI-189 (Lincoln, Nebraska, USA), který měří fotosynteticky aktivní záření (PAR). List, popřípadě segment listu, byl osvětlován vždy z adaxiální strany.

4.4.1 Měření pohybu chloroplastů pomocí speciální svorky a světlovodu

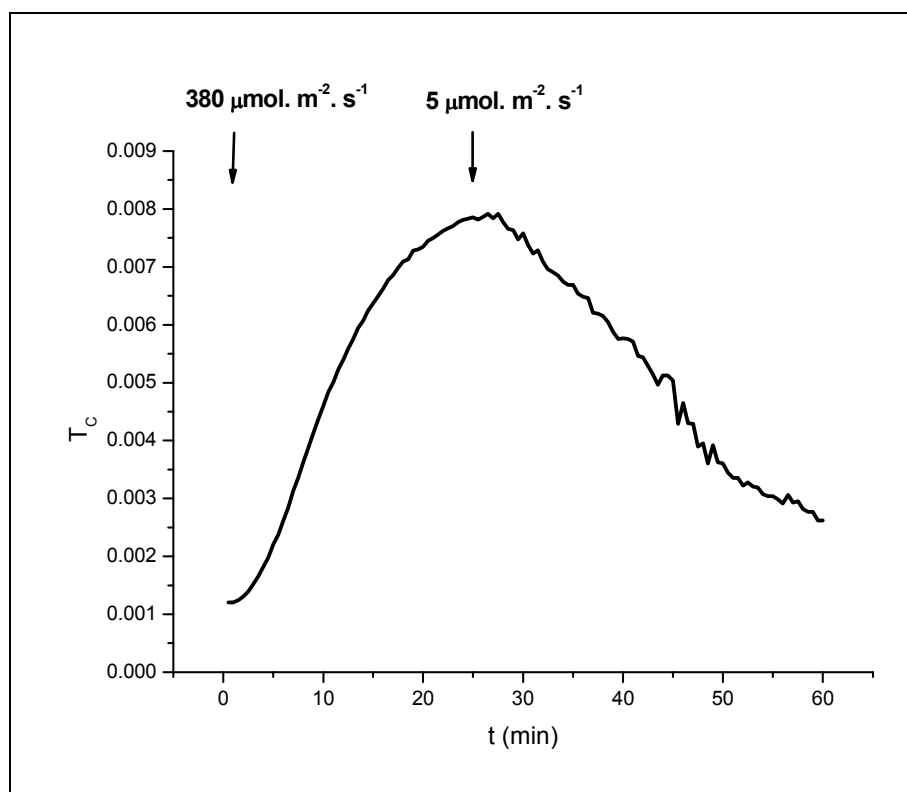
Pohybu chloroplastů, pomocí speciální svorky a světlovodu, jsme měřili pomocí metody, kterou vyvinula Rolencová (2008). Při této metodě se přímo měří změny propustnosti listu v čase, které jsou způsobené pohybem chloroplastů při osvětlování. Pro měření propustnosti používáme spektrometr LI-1800 (LI-COR, Lincoln, USA), světlovod (Storz, Tuttlingen, Německo) o průměru 3,5 mm a upravenou svorku firmy Hansatech k měření fluorescence.

Schéma aparatury je znázorněno na obr. 12. Svorka na měření fluorescence je provrtaná naskrz, aby mohl signál procházet na spodní světlovod, který je připojen na spektrometr LI-1800. Osvětlená část listu, na které měříme, je kruh o průměru 4,5 mm. List je od horního světlovodu (zdroj světla) vzdálen 4,8 cm. Vstupní konec spodního světlovodu je ve vzdálenosti 8 mm pod listem. Při takto sestavené aparatuře měříme v částečně kolimovaném světle a měření propustnosti je velice citlivé na pohyb chloroplastů (Nauš a kol. 2008, Rolencová 2008).



Obr. 12. Schéma aparatury na měření pohybu chloroplastů pomocí speciální svorky a světlovodu. 1 – světlovod zdroje studeného bílého světla, 2 – modrý filtr, 3 – upravená svorka firmy Hansatech, 4 – podložka, 5 – segment listu, 6 – světlovod vedoucí k spektrometri LI-1800.

Spektroradiometr je nastaven na režim point screen (PT), který snímá každou sekundu intenzitu dopadající světla při dané vlnové délce. Pro modré světlo jsme nastavili vlnovou délku 436 nm. Pro vypočtení hodnot propustnosti listu (T_C) jsme museli každých 30 s odečíst první tři hodnoty a udělat z nich průměr. Výsledné číslo jsme poté vydělili hodnotou intenzity dopadajícího záření bez listu. Při přepnutí světla na jinou intenzitu je někdy potřeba provést korekce tak, aby na sebe hodnoty propustnosti přímo navazovaly. Průběh kinetiky propustnosti T_C můžete vidět na obr. 13.



Obr. 13. Průběh kinetiky propustnosti T_C segmentu listu tabáku při vlnové délce 436 nm. Segment listu byl osvětlován po dobu 25 minut modrým světlem o intenzitě $380 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka) a následně po dobu 35 minut modrým světlem o intenzitě $5 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka).

Rolencová (2008) také ukázala, že na pohyb chloroplastů má vliv intenzita stisku svorky, proto jsme mezi horní a dolní díl svorky vložili podložku, aby svorka na list netlačila, ale jenom ho přidržovala ve stejné poloze.

4.4.2 Sledování pohybu chloroplastů pomocí chlorofylmetru

K měření relativního obsahu chlorofylu v listech rostlin jsme používali komerční chlorofylmetr SPAD 502DL (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan). Přístroj SPAD-502 měří změny propustnosti světla skrze vzorek pro dvě vlnové délky (650 nm - oblast maxima absorpce chlorofylů a 940 nm - pozadí), za použití dvou

LED diod se spektrální pološířkou 15 nm (650 nm), resp. 50 nm (940 nm). Na displeji se ukazuje hodnota M v relativních jednotkách SPAD. Hodnotu M udávající relativní obsah chlorofylu spočteme jako:

$$M = \log[I'_{940}/I_{940}] - \log[I'_{650}/I_{650}] = \log T_{940} - \log T_{650},$$

kde I_{650} a I_{940} jsou signály bez vzorku a I'_{650} a I'_{940} jsou signály se vzorkem.

Díky tomuto přepočtu propustnosti na relativní obsah chlorofylu jsme mohli pomocí přístroje SPAD-502 neinvazivně sledovat pohyb chloroplastů, kdy se zvyšovala nebo snižovala propustnost listu vlivem různého uspořádání chloroplastů. Pro přesný údaj obsahu chlorofylu v listech tabáku by bylo třeba změřit kalibrační křivku.

Přístrojem SPAD-502 se měří propustnost ve světle difúzním. Pro měření pohybu chloroplastů jsme však v této diplomové práci použili aparaturu se speciální svorkou, světlovodem a spektrálním radiometrem LI-1800, kdy měříme ve světle částečně kolimovaném. Toto měření propustnosti se ukázalo na pohyb chloroplastů citlivější (Nauš a kol. 2008, Rolencová 2008). Přístroj SPAD-502 jsme používali pro kontrolu, jestli vlivem záření nedošlo k rozkladu chlorofylů a při výběru listů, abychom měřili na listech o stejném obsahu chlorofylů. Plošný obsah chlorofylů v listu má totiž podstatný vliv jak na hodnotu počáteční propustnosti, tak na hodnotu maximální dosažené relativní změny propustnosti (Rolencová 2008).

4.4.3 Sledování vlivu teplotního stresu pomocí fluorescence chlorofylu

Měření fluorescence probíhá z adaxiální strany listu. Před měřením jsou segmenty listu zatemněny na 15 minut v alobalovém pouzdře. U obou teplotních režimů měříme fluorescenční indukci vždy před a po teplotním stresu. Poté následuje měření pohybu chloroplastů.

4.4.3.1 Skokový teplotní režim

Velmi rychlá fluorescenční indukce (vrFIJ) byla měřena pomocí ručního fluorimetru FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments, Brno, Česká Republika). Intenzita záření byla nastavena na 100 % (3000 μmol fotonů $\text{PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Doba měření byla 2 sekundy. Osvětlujeme modrým světlem o vlnové délce 455 nm.

Měřená data jsou ukládána do paměti přístroje a mohou být znovu vyvolána pro přepis do počítače. Fluorimetr FP 100 z křivek vyhodnocuje množství parametrů podle Strasser a kol. (2000), které jsou poté v počítači ukázány v přehledné tabulce.

4.4.3.2 Lineární teplotní režim

Měřili jsme vrFIJ pomocí fluorimetru PEA (Hansatech, King's Lynn, England), použitá intenzita excitačního záření byla 3000 μmol fotonů $\text{PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (30 % maximální intenzity světla přístroje PEA), zdrojem záření jsou LED diody s maximem emise u 650 nm. Pro měření byla použita listová svorka firmy Hansatech. Doba měření byla 3 sekundy.

Z křivek velmi rychlé fluorescenční indukce se pomocí programu Biolyzer vyhodnocuje tzv. JIP test (Strasser & Strasser 1995).

Vyhodnocovali jsme 6 základních parametrů, které jsme poté srovnávali pro oba teplotní režimy stresu.

Vybrané základní parametry fluorescenční indukční křivky:

F_0 - minimální fluorescence (JIP test: intenzita fluorescence při 50 μs)

F_V / F_P - maximální kvantový výtěžek PS II fotochemie (JIP test: místo F_M se používá

F_P - intenzita fluorescence vlny P, $F_V = F_M - F_0$)

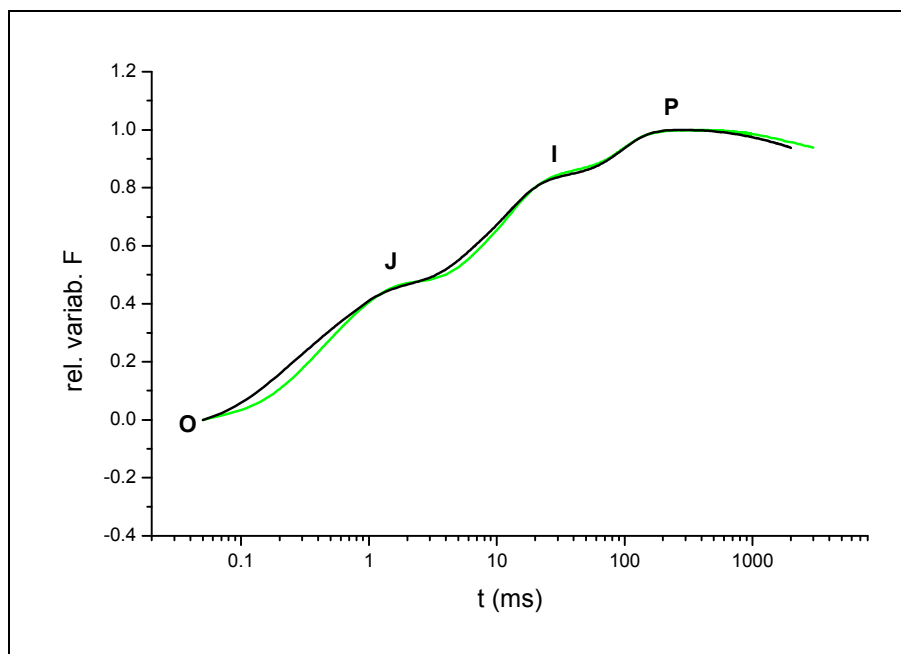
$V_J - (F_J - F_0) / (F_M - F_0)$ (relativní proměnná fluorescence při 2 ms)

$V_I - (F_I - F_0) / (F_M - F_0)$ (relativní proměnná fluorescence při 30 ms)

$M_0 - dV/dt_0$ (směrnice v počátku náběhu fluorescence)

$S_m - \text{Area} / (F_M - F_0)$ (normovaná plocha nad křivkou)

Z technických důvodů jsme museli pro každý teplotní režim měřit fluorescenční indukční jev jiným přístrojem, na obr. 14 je však vidět, že výsledné křivky jsou srovnatelné.

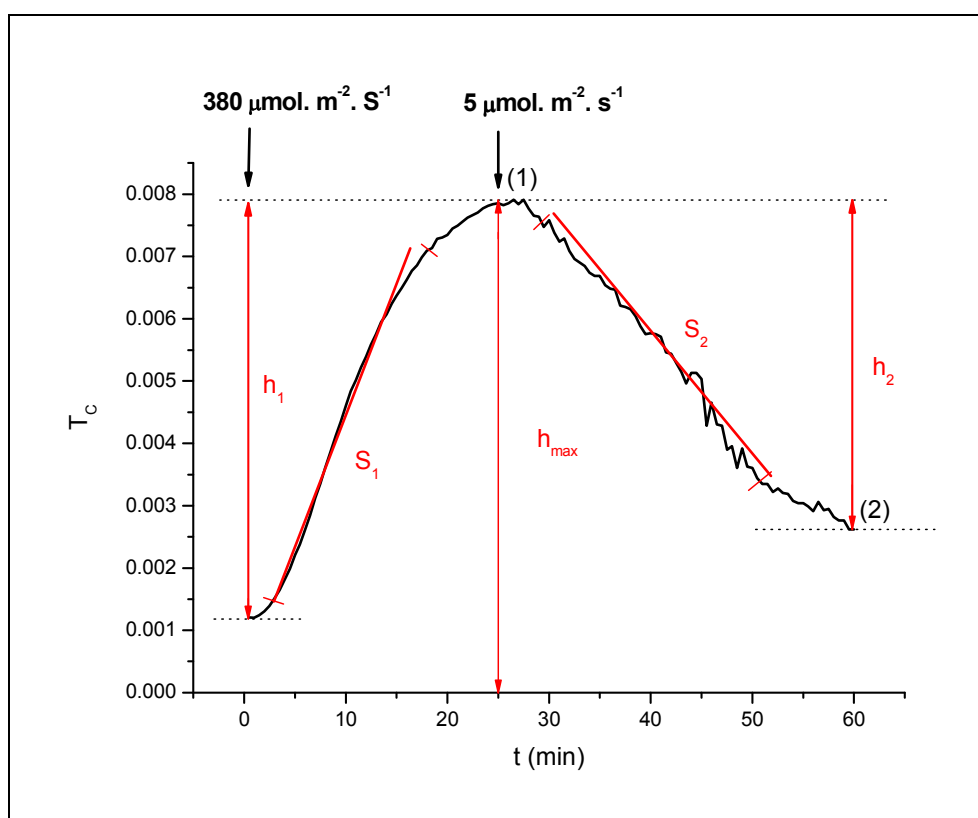


Obr. 14. Porovnání křivek velmi rychlého fluorescenčního indukčního jevu (vrFIJ). Pro skokový teplotní režim byl vrFIJ měřen ručním fluorimetrem FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments, Brno, Česká Republika) - černá křivka. Při lineárním teplotním režimu byl použit fluorimetr PEA (Hansatech, King's Lynn, England) - zelená křivka. Křivky byly měřeny na listu tabáku adaptovaném na tmu (15 min). Obě křivky jsou průměry z pěti měření ($n = 5$) pro teplotu 25 °C. Časová osa x je v logaritickém měřítku.

4.5 Vyhodnocení parametrů

4.5.1 Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech

Měřili jsme pohyb chloroplastů pomocí speciální svorky, světlovodu a spektrometru LI-1800. Na každý segment, který prošel teplotním stresem, jsme aplikovali jeden cyklus silného a slabého modrého světla. Výsledkem byly křivky kinetiky propustnosti, na kterých jsme vyhodnocovali parametry (obr. 15).



Obr. 15. Parametry průběhu kinetiky propustnosti T_C segmentu listu tabáku při vlnové délce 436 nm. Segment listu byl osvětlován po dobu 25 minut modrým světlem o intenzitě $380 \mu\text{mol}$ fotonů $\text{PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz šipka) a následně po dobu 35 minut modrým světlem o intenzitě $5 \mu\text{mol}$ fotonů $\text{PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz šipka). Vyhodnocujeme: h_1 a h_2 - rozsah propustnosti T_C , h_{max} - hodnota propustnosti T_C v čase $t = 25$ min, S_1 a S_2 - směrnice nárůstu a poklesu v daném časovém intervalu.

1) Parametr H_1 a H_2

Parametry H_1 , resp. H_2 jsme definovali jako:

$$H_1 = h_1/h_{max}, \text{ resp. } H_2 = h_2/h_{max},$$

kde h_1 je rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou při osvětlování silným modrým světlem, kdy se chloroplasty přesunou do polohy 1 (1). Rozsah T_C při osvětlováním slabým modrým světlem, kdy se chloroplasty přesunou do polohy 2 (2), h_2 je pak definován stejným způsobem:

$$h_1 = (T_{max} - T_{min}), \text{ resp. } h_2 = (T_{max} - T_{min}).$$

Parametr h_{max} znamená hodnotu T_C v čase $t = 25$ min pro křivku kinetiky propustnosti při teplotě 25°C (standard pro každou sérii měření).

2) Relativní směrnice S_1 a S_2

Vyhodnocení podle rychlosti nárůstu do polohy 1 (S_1), resp. pokles do polohy 2 (S_2). Pro pohyb do polohy 1 jsme vybrali časový interval 3 - 18 minut. Směrnici jsme počítali pomocí programu Excel (přidat spojnicí trendu – lineární typ trendu + zobrazit rovnici regrese + hodnotu spolehlivosti R – číslo u x (upravit počet desetinných míst). Pro pohyb do polohy 2 jsme zvolili časový interval 30 - 50 minut. Postup výpočtu zůstal stejný. Hodnoty S_1 a S_2 jsou normované (dělíme největší směrnici pro danou sérii) a tedy bezrozměrné.

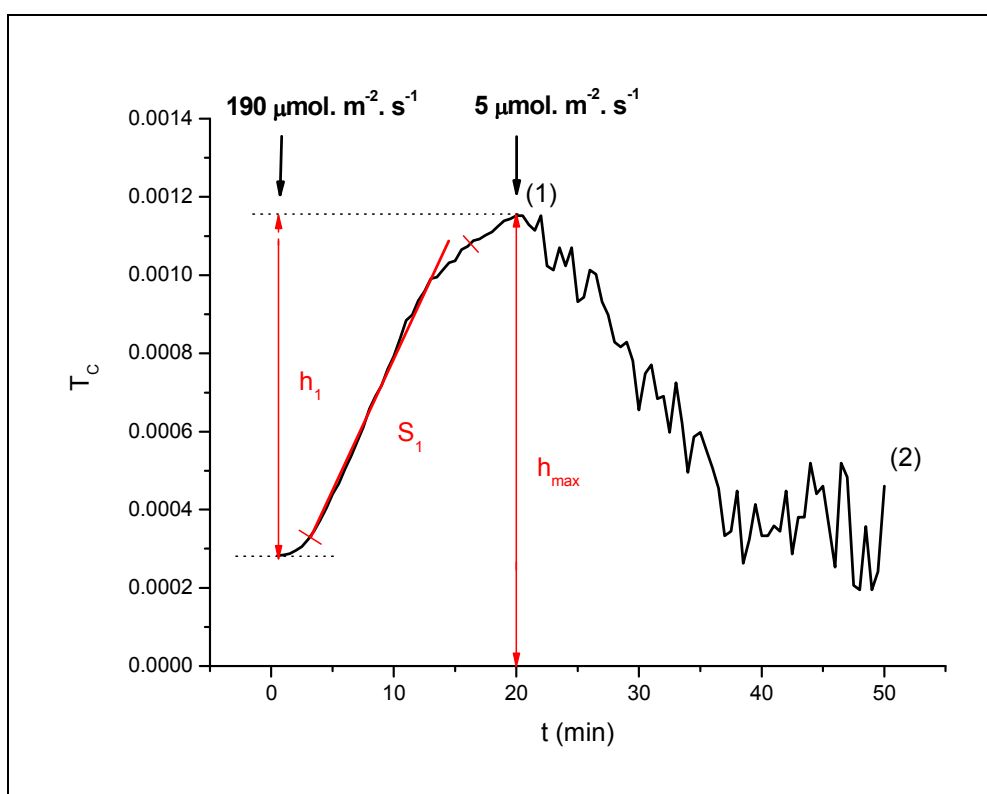
Výsledky jsme poté zpracovali statisticky. Pro oba teplotní režimy (lineární (ls) a skokový teplotní stres (ss)) jsme měřili každou sérii 5krát. Pro každou teplotu T_K (ls: $T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50^\circ\text{C}$, ss: $T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45^\circ\text{C}$) jsme z vypočtených parametrů a směrníc spočítali průměry a směrodatné odchylky.

3) Průměry grafů

Graf se skládá z křivek, které jsou průměry z pěti měření pro každou teplotu v sérii (obr. 18 a 21).

4.5.2 Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů v listech

Měřili jsme pohyb chloroplastů, na kontrolních a inokulovaných slunečnicích, pomocí speciální svorky, světlovodu a spektrometru LI-1800 během jednoho cyklu osvětlování silným a slabým modrým světlem. Z výsledných křivek kinetiky propustnosti jsme vyhodnocovali parametry (obr. 16) a výsledky pro kontrolní a inokulované rostliny spolu porovnali.



Obr. 16. Průběh kinetiky propustnosti T_C listu slunečnice při vlnové délce 436 nm. List byl osvětlován po dobu 20 minut modrým světlem o intenzitě $190 \mu\text{mol}$ fotonů $\text{PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz šipka) a následně po dobu 30 minut modrým světlem o intenzitě $5 \mu\text{mol}$ fotonů $\text{PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz šipka). Vyhodnocujeme: h_1 - rozsah propustnosti, h_{max} - hodnota propustnosti T_C v čase $t = 20$ min a S_1 - směrnici nárůstu v časovém intervalu 3 - 16 minut.

1) Parametr H_1

Parametry H_1 jsme definovali jako:

$$H_1 = h_1 / h_{max},$$

kde h_1 je rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou, kdy se po osvětlování silným modrým světlem přesunou chloroplasty do poloha 1 (1) a je definován jako:

$$h_1 = (T_{max} - T_{min}).$$

Parametr h_{max} znamená hodnotu T_C v čase $t = 20$ min pro danou křivku kinetiky propustnosti.

2) Relativní směrnice S_1

Vyhodnocení podle rychlosti nárůstu do polohy 1 (S_1). Pro pohyb do polohy 1 jsme vybrali časový interval 3 - 16 minut. Směrnici jsme počítali pomocí programu Excel (přidat spojnicí trendu – lineární typ trendu + zobrazit rovnici regrese + hodnotu spolehlivosti R – číslo u x (upravit počet desetinných míst). Hodnota S_1 je normovaná (dělíme největší směrnici pro danou sérii kontrol a inokulovaných rostlin) a tedy bezrozměrné.

Výsledky jsme zpracovali statisticky. Z vypočtených parametrů a směrnic jsme počítali průměry a směrodatné odchylky. Výsledky pro kontrolní a inokulované rostliny jsme poté porovnali.

3) Průměry grafů

Graf se skládá z křivek, které jsou průměry z každého měření (každé měření se skládá z pěti kontrol a pěti inokulovaných rostlin) (obr. 28). Zvlášť jsou průměrovány hodnoty pro kontrolní a inokulované rostliny.

4.5.3 Statistické zpracování výsledků

Standardně byl počítán rozdíl v sousedních hodnotách pomocí t-testu (porovnává průměry) pro kritickou hodnotu $\alpha = 0,05$. Je-li P hodnota testu větší než alfa, neexistuje statisticky významný rozdíl v datech. Oprávněnost použití t-testu byla zjišťována testováním normálnosti dat a rovnosti jejich rozptylu. Pokud data nebyla normální nebo neměly rovné rozptyly, tak místo t-testu byl použit Mann-Whitney Rank Sum test (porovnává mediány). Byla počítána také síla testu. Ta určuje, zdali jsou daná data pro danou alfa vůbec schopna odhalit nějaké rozdíly v nich. Pokud síla testu je menší než požadovaná kritická hodnota síly testu (0,8), pak je třeba zjištěné rozdíly či nerozdíly v datech interpretovat opatrně.

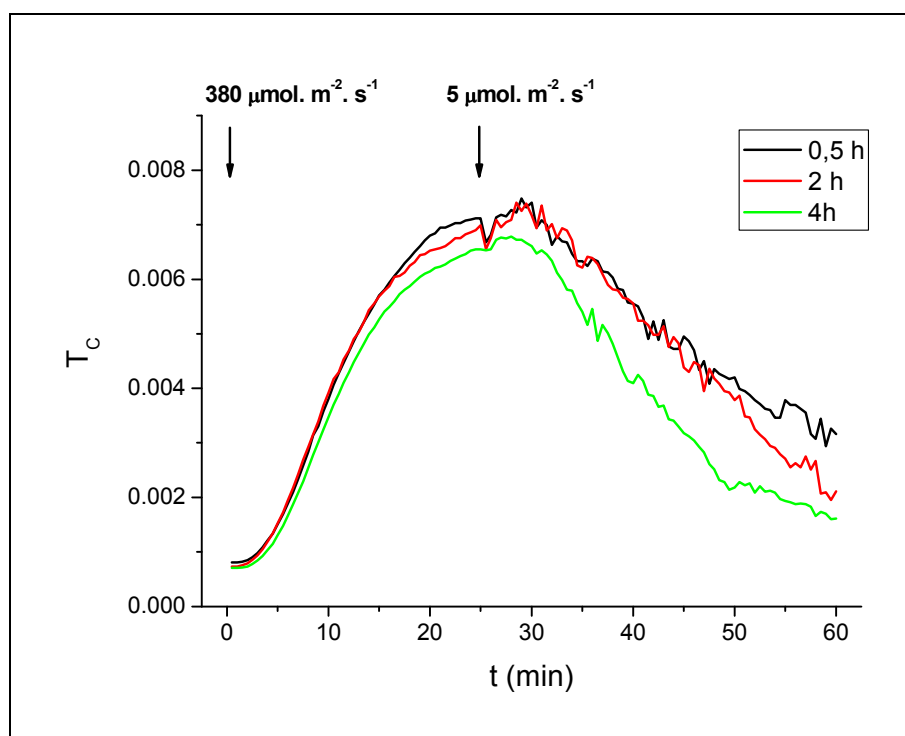
5 Výsledky

5.1 Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech

Tento projekt byl zaměřen na studium vlivu vyšší teploty na světlem indukovaný pohyb chloroplastů v listech. Měření pohybu chloroplastů bylo rozděleno na dva podprojekty, kdy jsme použili dva různé teplotní režimy: skokový a lineární teplotní režim.

V obou podprojektech jsme měřili pohyb chloroplastů pomocí speciální svorky, světlovodu a spektrometru LI-1800. Listy jsme osvětlovali studeným bílým světlem z osvětlovací soustavy KL 2500 za použití modrého filtru BG-12. Každé měření se skládalo z 25 minut ozařování listu modrým světlem o intenzitě $380 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 35 minut ozařování modrým světlem o intenzitě $5 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Měření probíhalo na segmentech listu tabáku. Abychom se ujistili, že odstřížení segmentu z listu nemá vliv na pohyb chloroplastů, provedli jsme kontrolní měření vlivu odstříhnutí a stárnutí na segmentech. Z listu jsme odstříhli tři segmenty, které jsme vložili do rámečku z filtračního papíru a položili je na slabé světlo ($20 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), aby se chloroplasty před měřením pohybu přesunuly ke stěnám kolmým na směr dopadajícího světla (LFR reakce) (minimální hodnota T_C). Pohyb chloroplastů byl měřen 0,5, 2 a 4 hodiny od odstřížení segmentu z listu (obr. 17). Z křivek kinetiky propustnosti T_C listu jsme vyhodnotili parametr H_1 [(rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou)/(hodnota T_C v čase $t = 25 \text{ min}$)] a směrnici S_1 (vyhodnocení podle rychlosti nárůstu). Změny v těchto parametrech však nebyly větší jak 5 %, z čehož vyplývá, že odstřížení segmentů, při současném zajištění dostatku vlhkosti, má minimální vliv na pohyb chloroplastů.



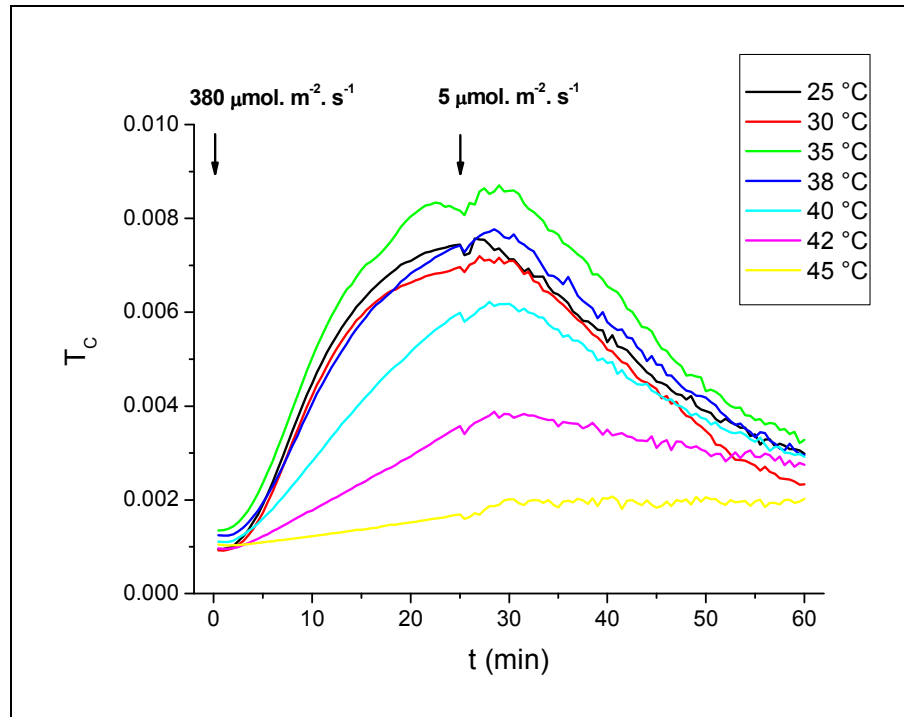
Obr. 17. Vliv doby po odstřižení segmentu z listu na pohyb chloroplastů. Měřena závislost propustnosti T_C segmentu listu tabáku při vlnové délce 436 nm na čase. Propustnost T_C jsme měřili 0,5, 2 a 4 hodiny od ustřižení segmentu z listu. Segment listu byl osvětlován po dobu 25 minut modrým světlem o intenzitě $380 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka) a následně po dobu 35 minut modrým světlem o intenzitě $5 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka).

5.1.1 Pohyb chloroplastů pod vlivem skokového teplotního stresu

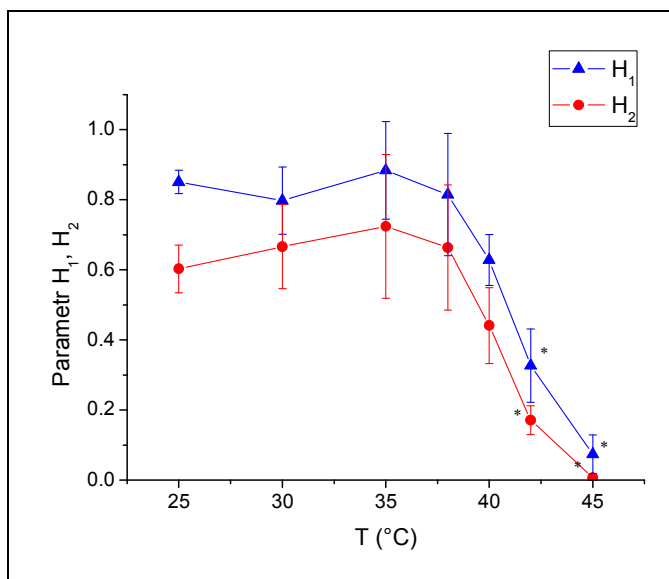
K experimentu byly použity rostliny tabáku ve stáří 2 měsíců. Měření probíhalo na segmentech listu (vždy jsme použili třetí list od shora). Segment listu byl odstřižen, vložen do rámečku z filtračního papíru a dán na 15 minut na slabé světlo ($20 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Po 15 minutách na slabém světle byl list vložen na dalších 15 minut do tmy (z důvodu adaptace na tmou před měřením fluorescenční indukce (viz kapitola 5.2)). Takto adaptovaný segment jsme vložili do alobalového pouzdra a inkubovali po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25°C , poté dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45^\circ\text{C}$) a následně

opět 5 minut ve vodě o teplotě 25 °C. Po teplotním stresu následovalo měření pohybu chloroplastů.

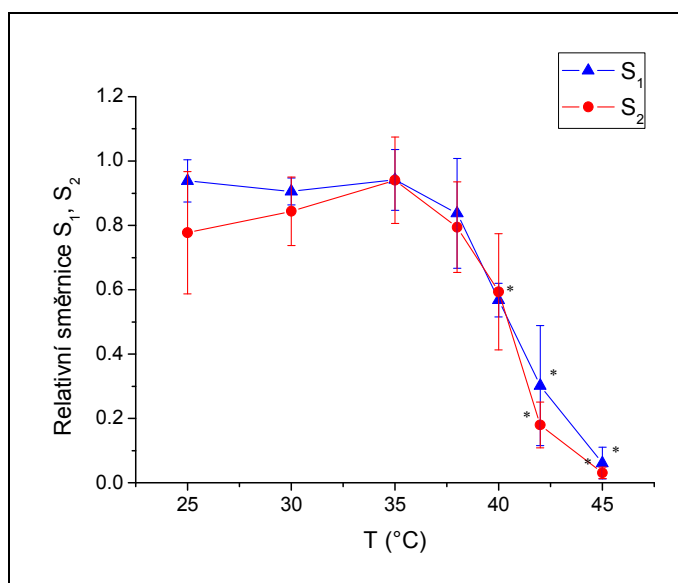
Každou sérii měření pohybu chloroplastů pod vlivem skokového teplotního stresu jsme opakovali 5krát. Z křivek kinetiky propustnosti listu jsme vyhodnotili parametry H_1 , H_2 (obr. 19), relativní směrnice S_1 , S_2 (obr. 20) a udělali průměry grafů (obr. 18). Z výsledků je patrné, že křivky a parametry křivek se téměř neliší do teploty 38 °C, pouze u teploty 35 °C vidíme nepatrný nárůst hodnot parametrů. Od 40 °C pak začíná pokles hodnot parametrů H_1 , H_2 a relativních směrnic S_1 , S_2 . U směrnic S_1 , S_2 je pokles nepatrně rychlejší. Při teplotě 45 °C jsou všechny hodnoty téměř nulové (nedochází již k téměř žádnému pohybu chloroplastů). Statistický významný rozdíl v datech ($P < 0,05$) byl zjištěn u sousedních hodnot parametrů H_1 , H_2 měřených při teplotě 40 a 42 °C a 42 a 45 °C. U relativní směrnice S_1 pak mezi sousedními hodnotami při 38 a 40 °C, 40 a 42 °C a 42 a 45 °C a u S_2 při 40 a 42 °C a 42 a 45 °C.



Obr. 18. Vliv skokového teplotního stresu na časový průběh změny propustnosti T_C listu tabáku při vlnové délce 436 nm. Segmenty listu v alobalovém pouzdře byly inkubovány po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C, poté dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) a opět dalších 5 minut ve vodě o teplotě 25 °C. Vlastní měření pohybu chloroplastů probíhalo při 25 °C. Segment listu byl osvětlován po dobu 25 minut modrým světlem o intenzitě 380 μmol fotonů $\text{PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka) a následně po dobu 35 minut modrým světlem o intenzitě 5 μmol fotonů $\text{PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka). Výsledné křivky jsou průměry z pěti měření pro každou teplotu ($n = 5$).



Obr. 19. Závislost hodnot parametrů H_1 , H_2 vypočtených z časového průběhu změny propustnosti T_C listu tabáku na teplotě. Pro každou teplotu inkubace T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) jsou výsledné hodnoty parametrů H_1 , H_2 průměry z pěti měření ($n = 5$). U každé hodnoty znázorněna směrodatná odchylka. Vyznačen statisticky významný rozdíl (*) v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližze nižší). Parametry H_1 a H_2 jsou rozlišeny barevně.

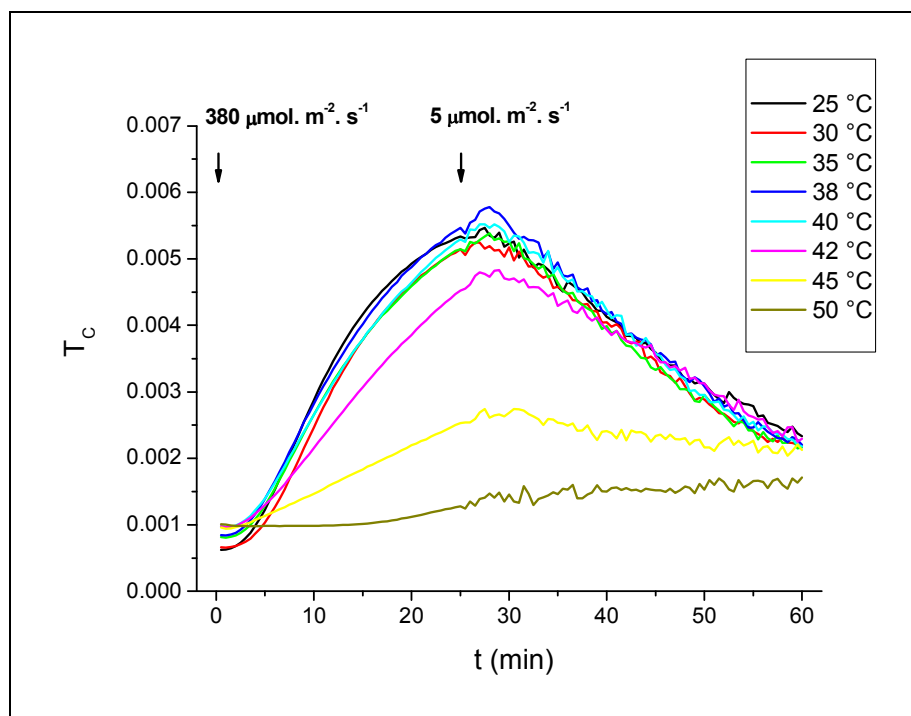


Obr. 20. Závislost hodnot relativních směrnic S_1 , S_2 vypočtených z časového průběhu změny propustnosti T_C listu tabáku na teplotě. Pro každou teplotu inkubace T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) jsou výsledné hodnoty relativních směrnic S_1 , S_2 průměry z pěti měření ($n = 5$). U každé hodnoty znázorněna směrodatná odchylka. Vyznačen statisticky významný rozdíl (*) v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližze nižší). Relativní směrnice S_1 , S_2 jsou rozlišeny barevně.

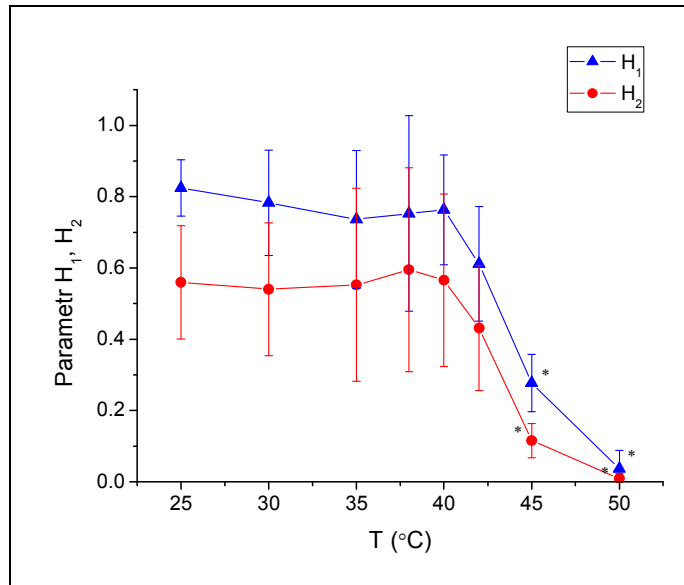
5.1.2 Pohyb chloroplastů pod vlivem lineárního teplotního stresu

Pohyb chloroplastů pod vlivem lineárního teplotního stresu byl měřen na rostlinách tabáku starých 2,5 měsíce. Měření probíhalo na segmentech listu (vždy jsme použili třetí list od shora). Segment listu byl odstřižen, vložen do rámečku z filtračního papíru a dán na 15 minut na slabé světlo. Po 15 minutách na slabém světle byl segment listu vložen na dalších 15 minut do tmy. Na takto adaptovaný vzorek jsme aplikovali lineární teplotní stres. Segment listu byl ohříván lineárně z teploty 25 °C (standard) rychlostí 2 °C/min až po vybranou (koncovou) teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C). Poté následovalo jeho lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev. Po teplotním stresu následovalo měření pohybu chloroplastů.

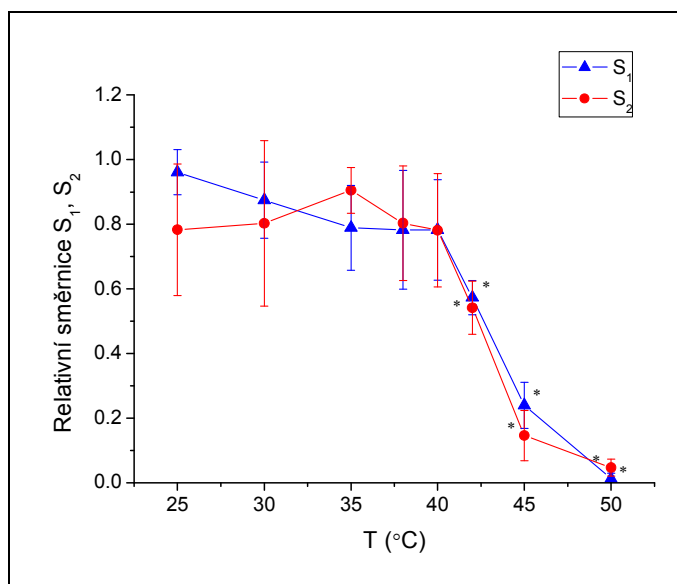
Každou sérii měření pohybu chloroplastů pod vlivem lineárního teplotního stresu jsme opakovali 5krát. Z křivek kinetiky propustnosti listu jsme vyhodnotili parametry H_1 , H_2 (obr. 22), relativní směrnice S_1 , S_2 (obr. 23) a udělali průměry grafů (obr. 21). Z výsledků je patrné, že křivky a parametry křivek se téměř neliší do teploty 40 °C a od 42 °C začíná pokles v hodnotách parametrů H_1 , H_2 a relativních směrnic S_1 , S_2 . Při teplotě 50 °C jsou pak všechny hodnoty téměř nulové (nedochází již k téměř žádnému pohybu chloroplastů). Statistický významný rozdíl v datech ($P < 0,05$) byl zjištěn u sousedních hodnot parametrů H_1 , H_2 měřených při 42 a 45 °C a 45 a 50 °C. U relativních směrnic S_1 , S_2 pak mezi sousedními hodnotami při 40 a 42 °C, 42 a 45 °C a 45 a 50 °C.



Obr. 21. Vliv lineárního teplotního stresu na časový průběh změny propustnosti T_C listu tabáku při vlnové délce 436 nm. Segmenty listu v alobalovém pouzdře byly ohřívány lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po vybranou (koncovou) teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C). Poté následovalo jejich lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev. Vlastní měření pohybu chloroplastů probíhalo při 25 °C. Segment listu byl osvětlován po dobu 25 minut modrým světlem o intenzitě $380 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka) a následně po dobu 35 minut modrým světlem o intenzitě $5 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (viz šipka). Výsledné křivky jsou průměry z pěti měření pro každou teplotu ($n = 5$).



Obr. 22. Závislost hodnot parametrů H_1 , H_2 vypočtených z časového průběhu změny propustnosti T_C listu tabáku na teplotě. Pro každou teplotu T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) jsou výsledné hodnoty parametrů H_1 , H_2 průměry z pěti měření ($n = 5$). U každé hodnoty je znázorněna směrodatná odchylka. Vyznačen statisticky významný rozdíl (*) v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližší nižší). Parametry H_1 a H_2 jsou rozlišeny barevně.



Obr. 23. Závislost hodnot relativních směrnic S_1 , S_2 vypočtených z časového průběhu změny propustnosti T_C listu tabáku na teplotě. Pro každou teplotu T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) jsou výsledné hodnoty relativních směrnic S_1 , S_2 průměry z pěti měření ($n = 5$). U každé hodnoty znázorněna směrodatná odchylka. Vyznačen statisticky významný rozdíl (*) v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližší nižší). Relativní směrnice S_1 a S_2 jsou rozlišeny barevně.

5.2 Vliv vyšší teploty na fluorescenční indukci

V tomto experimentu jsme pomocí měření fluorescenční indukce sledovali vliv teplotního stresu na segmenty listu tabáku. Fluorescenční indukce byla měřena vždy před a po teplotním stresu, poté následovalo měření pohybu chloroplastů pomocí speciální svorky, světlovodu a spektrometru LI-1800. Tak jsme na stejném segmentu listu mohli sledovat vliv vyšší teploty na fotosyntetický aparát i na pohyb chloroplastů a porovnat parametry obou měření. Použili jsme dva teplotní režimy stresu: skokový a lineární teplotní režim.

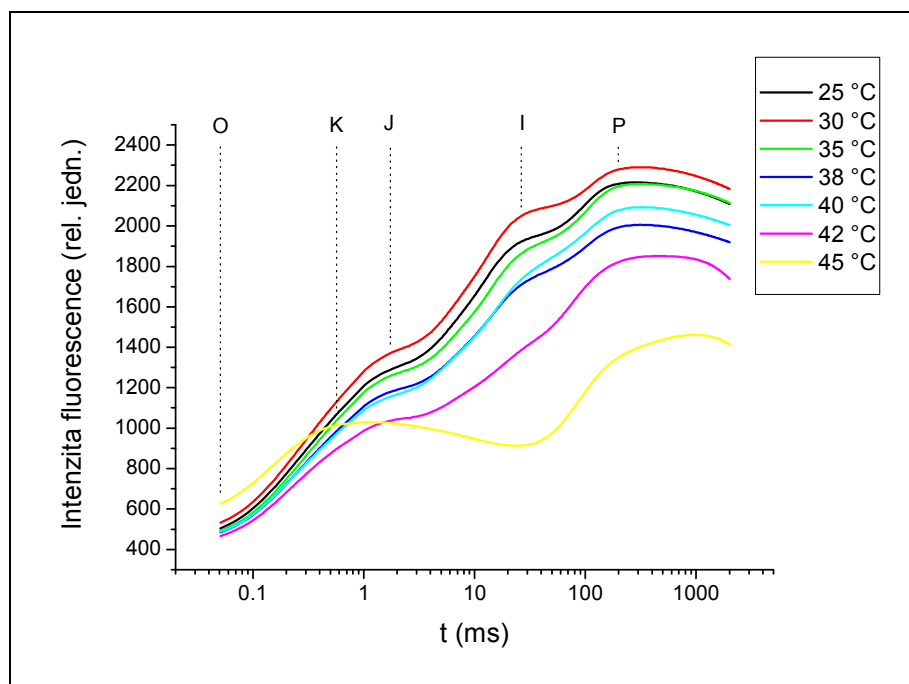
Fluorescenční indukci (FI) jsme měřili vždy na segmentech listu adaptovaných na tmu. Doba adaptace byla 15 minut, při delší adaptaci se již změny v parametrech F_0 a F_V/F_M pohybovaly pod 10 % a bylo tedy zbytečné segmenty adaptovat delší dobu. U obou teplotních režimů jsme měřili (FI) pro každou teplotu 5krát a z křivek poté udělali průměry. Z křivek FI jsme vyhodnocovali 6 základních parametrů (F_0 , F_V/F_P , V_J , V_L , Sm , M_0).

5.2.1 Skokový teplotní stres

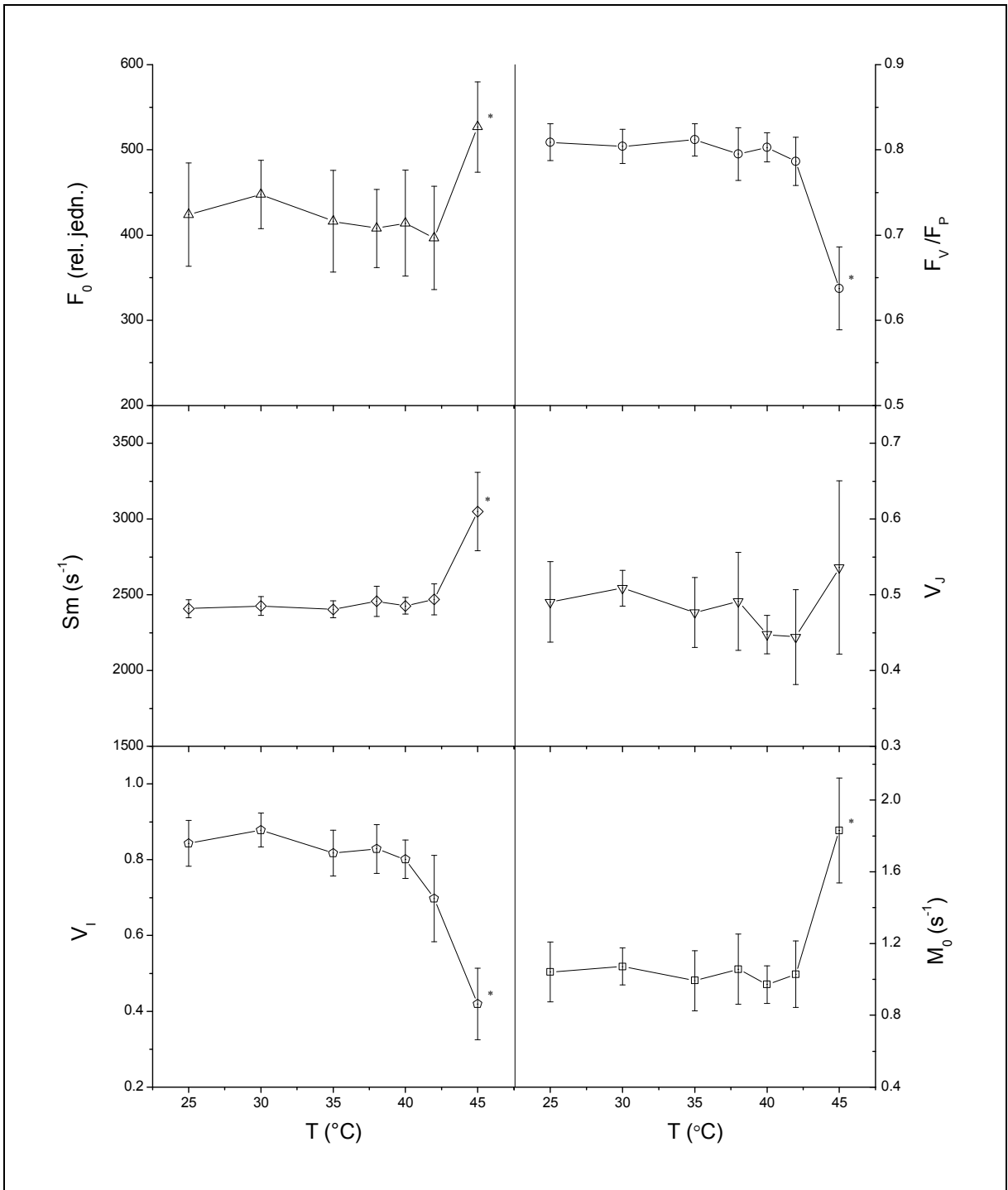
Po odstrižení byl segment listu dán na 15 minut na slabé světlo. Poté jsme segment vložili na dalších 15 minut do tmy. Na takto adaptovaném segmentu listu jsme změřili fluorescenční indukční jev. Tyto hodnoty jsme brali jako standard ($T_K = 25\text{ °C}$). Poté jsme segment vložili do alobalového pouzdra a inkubovali po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C , poté dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45\text{ °C}$) a opět 5 minut ve vodě o teplotě 25 °C . Po teplotním stresu jsme změřili FI. Měření FI probíhalo při teplotě 25 °C .

Sérii sledování vlivu skokového teplotního stresu pomocí fluorescenční indukce jsme opakovali 5krát. Z FI křivek jsme vyhodnocovali parametry F_0 , F_V/F_P , V_J , V_L , Sm , M_0 (obr. 25) a udělali průměry křivek pro každou teplotu (obr. 24). S rostoucí teplotou dochází k nárůstu minimální fluorescence F_0 a poklesu F_P . Při teplotě 45 °C se objevuje K vlna. U parametrů FI křivky na obr. vidíme, že do teploty 42 °C není

průkazný téměř žádný rozdíl sousedních hodnot. U parametrů F_0 , F_V/F_P , Sm , V_I a M_0 existuje statisticky významný rozdíl sousedních hodnot ($P < 0,05$) až mezi teplotami 42 - 45 °C. U F_0 , Sm , M_0 dochází při teplotě 45 °C k nárůstu hodnot, naopak u F_V/F_P a V_I dochází k poklesu. U parametru V_J není žádný prokazatelný rozdíl hodnot.



Obr. 24. Teplotní závislost křivek FI měřené na listu tabáku adaptovaném na tmu (15 min) ručním fluorimetrem FP 100max ($3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, modré světlo s maximem okolo 455 nm). Segmenty listu v alobalovém pouzdře byly inkubovány po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C, poté dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) a opět dalších 5 minut ve vodě o teplotě 25 °C. Křivky FI byly měřeny při 25 °C. Typický O-J-I-P průběh fluorescenčních křivek do teploty 42 °C, při teplotě 45 °C se objevuje K vlna. O, J, I, P, K vlny jsou vyznačeny. Výsledné křivky jsou průměry z pěti měření pro každou teplotu ($n = 5$). Časová osa x je v logaritmickém měřítku.

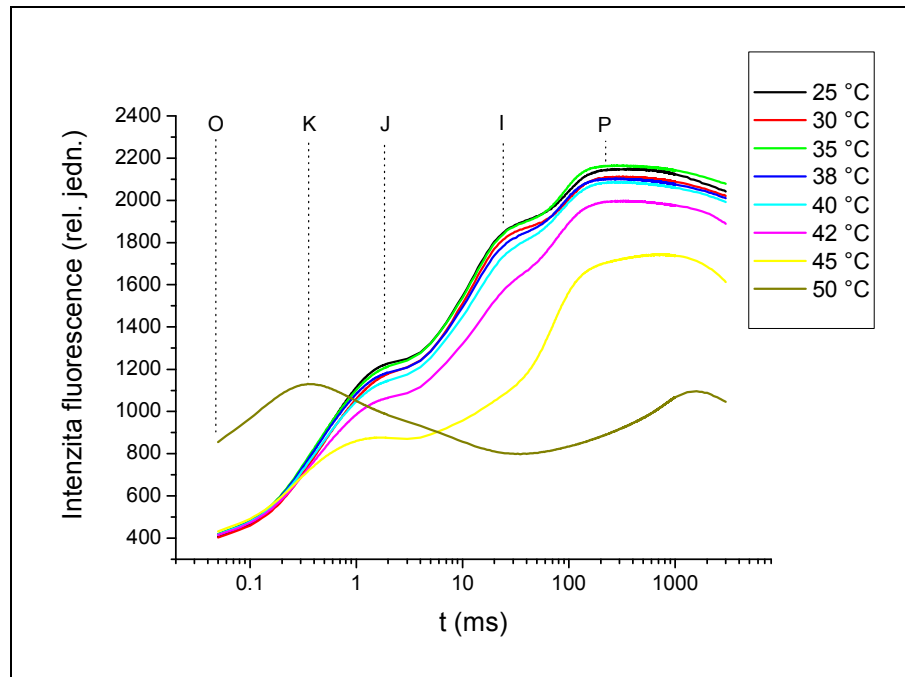


Obr. 25. Závislost hodnot parametrů (F_0 , F_v/F_p , Sm , V_j , V_i , M_0) vypočtených z křivek FI na teplotě. Segmenty listu v alobalovém pouzdře byly inkubovány po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C, poté dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) a opět 5 minut ve vodě o teplotě 25 °C. Pro každou teplotu T_K jsou výsledné hodnoty parametrů průměry z pěti měření ($n = 5$). U každé hodnoty je znázorněna směrodatná odchylka. Vyznačen statisticky významný rozdíl (*) v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližší nižší).

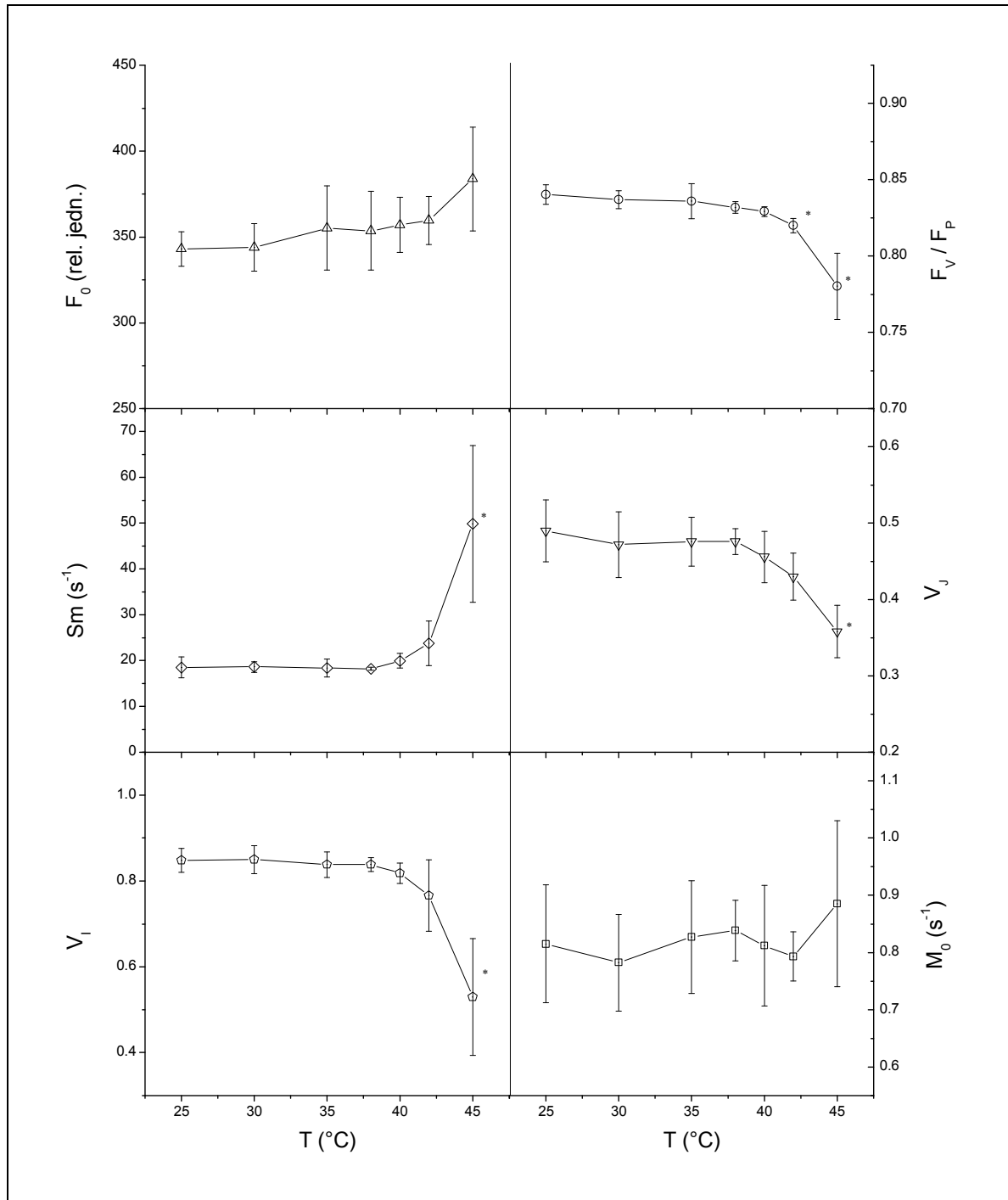
5.2.2 Lineární teplotní stres

Po odštížení byl segment listu dán na 15 minut na slabé světlo. Poté jsme segment vložili na dalších 15 minut do tmy. Na takto adaptovaném segmentu listu jsme změřili fluorescenční indukční jev. Tyto hodnoty jsme brali jako standard ($T_K = 25\text{ °C}$). Segment v alobalovém pouzdře jsme následně ohřívali v destilované vodě lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po vybranou (koncovou) teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50\text{ °C}$). Poté následovalo jeho lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev. Po teplotním stresu jsme opět změřili FI. Měření proběhlo při teplotě 25 °C .

Sérii sledování vlivu lineárního teplotního stresu pomocí fluorescenční indukce jsme opakovali 5krát. Z FI křivek jsme vyhodnocovali parametry F_0 , F_V/F_P , V_J , V_I , Sm , M_0 (obr. 27) a udělali průměry křivek pro každou teplotu (obr. 26). S rostoucí teplotou roste minimální fluorescence F_0 a klesá F_P . Při teplotě 50 °C se objevuje K vlna. U parametrů FI křivky na obr. 27 vidíme, že existuje statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) sousedních hodnot mezi 42 a 45 °C u Sm , V_J , V_I . U F_V/F_P existuje rozdíl sousedních hodnot už i mezi teplotami 40 a 42 °C . U F_0 a M_0 dochází k žádné změně. Obecně platí, že při ohřevu segmentu listu v destilované vodě lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min a následném ochlazováním stejnou rychlostí opět do teploty 25 °C dochází při teplotě 45 °C k nárůstu hodnot u F_0 , Sm a M_0 a naopak u F_V/F_P , V_J a V_I k poklesu. Na obr. 27 nejsou znázorněny hodnoty parametrů pro teplotu 50 °C , kdy u parametrů FI křivky dochází k výraznému nárůstu (F_0 , Sm , M_0) nebo poklesu hodnot (F_V/F_P , V_J , V_I) a grafy by se tak staly nepřehledné.



Obr. 26. Teplotní závislost křivek FI měřené na listu tabáku adaptovaném na tmu (15 min) fluorimetrem PEA ($1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, červené světlo s maximem okolo 650 nm). Segmenty listu v alobalovém pouzdře byly ohřívány v destilované vodě lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po vybranou (koncovou) teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) a následně ochlazovány stejnou rychlostí opět do teploty 25 °C. Křivky FI byly měřeny při 25 °C. Typický O-J-I-P průběh fluorescenčních křivek do teploty 45 °C, při teplotě 50 °C se objevuje K vlny. O, J, I, P, K vlny jsou vyznačeny. Výsledné křivky jsou průměry z pěti měření pro každou teplotu ($n = 5$). Časová osa x je v logaritmickém měřítku.



Obr. 27. Závislost hodnot parametrů (F_0 , F_V/F_P , Sm , V_J , V_I , M_0) vypočtených z křivek FI na teplotě. Segmenty listu v alobalovém pouzdře byly ohřívány v destilované vodě lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po vybranou (koncovou) teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) a následně ochlazovány stejnou rychlostí opět do teploty 25 °C. Pro každou teplotu T_k jsou výsledné hodnoty parametrů průměry z pěti měření ($n = 5$). U každé hodnoty je znázorněna směrodatná odchylka. Vyznačen statisticky významný rozdíl (*) v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližší nižší). Hodnoty parametrů pro teplotu 50 °C nejsou znázorněny (u parametrů FI křivky dochází k výraznému nárůstu (F_0 , Sm , M_0) nebo poklesu hodnot (F_V/F_P , V_J , V_I)).

5.3 Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů v listech

Tento projekt byl zaměřen na studium vlivu biotického stresu na světlem indukovaný pohyb chloroplastů v listech. Pro měření pohybu chloroplastů jsme použili aparaturu se speciální svorkou, světlovodem a spektrometrem LI-1800. Listy jsme osvětlovali studeným bílým světlem z osvětlovací soustavy KL 2500 za použití modrého filtru BG-12. Každé měření se skládalo z 20 minut ozařování listu modrým světlem o intenzitě $190 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a z 30 minut ozařování modrým světlem o intenzitě $5 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

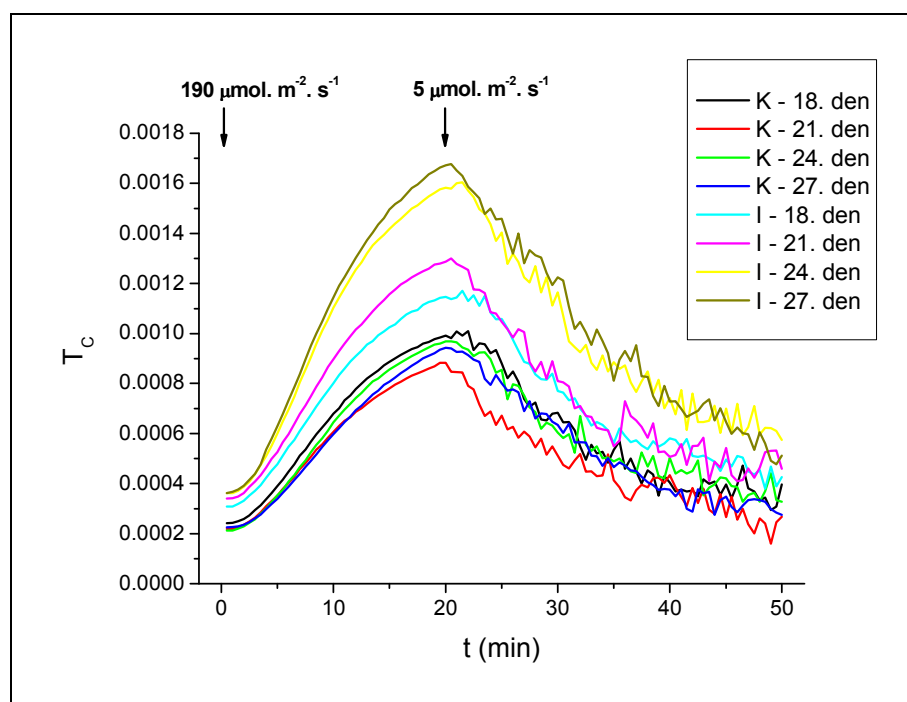
Sledovali jsme na listech slunečnice časový vývoj vlivu plísně slunečnicové na pohyb chloroplastů. Pohyb chloroplastů jsme měřili na prvním pravém listu 18., 21., 24. a 27. den stáří rostliny. V jeden den jsme měřili vždy na pěti kontrolních a pěti inokulovaných rostlinách. Na prvním pravém listu každé rostliny jsme udělali značku (červené kolečko), abychom pohyb chloroplastů mohli sledovat stále na stejném místě. Před každým měřením byla rostlina adaptována 30 minut na slabém světle o intenzitě $20 \mu\text{mol fotonů PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Vývoj nemoci jsme sledovali tak, že před každým měřením pohybu chloroplastů jsme na rostlině měřili 4 parametry (výšku, počet listů, velikost listu a relativní obsah chlorofylů). Naměřené parametry pro inokulované a kontrolní rostliny jsou uvedeny v tab. 1. Inokulované rostliny byly v průměru o 12 % nižší, velikost listu, na kterém jsme měřili, byla o 13 % menší, relativní obsah chlorofylů, měřený chlorofylmetrem SPAD-502, byl průměrně nižší o 6 % a počet listů byl téměř stejný (u některých kontrolních rostlin rostly nové listy dříve). Kromě těchto parametrů nebyly mezi inokulovanými a kontrolními rostlinami žádné pozorovatelné rozdíly (např. barva listu).

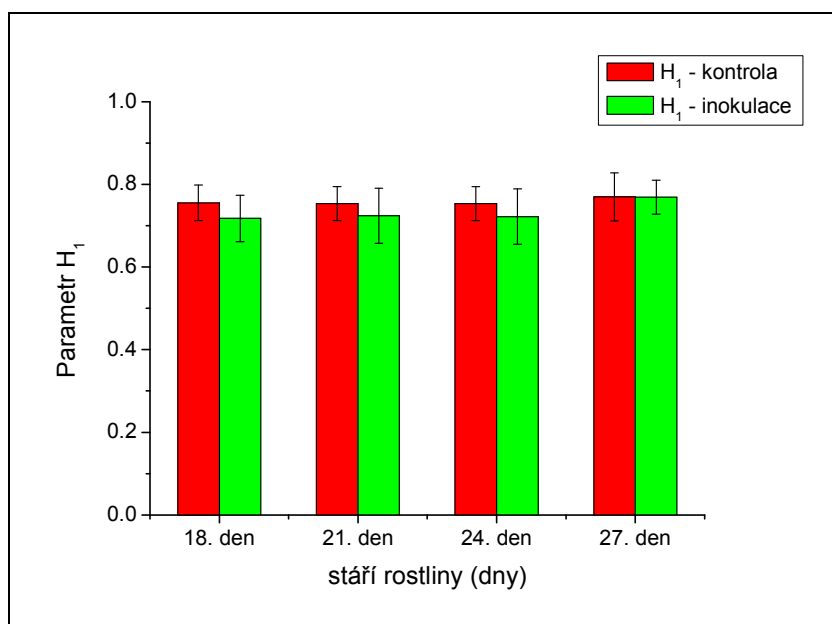
Tab. 1. Časový vývoj vlivu plísňě slunečnicové na inokulované rostliny slunečnice (I₁ - I₅) v porovnání s kontrolními rostlinami (K₁ - K₅). Na každé rostlině sledujeme 4 parametry (výšku, počet listů, velikost listu a relativní obsah chlorofylů). Výška rostliny a velikost listu je měřena v cm. Minimální velikost započteného listu je 0,5 cm. Relativní obsah chlorofylů je měřen chlorofylmetrem SPAD-502 (rel. jedn. SPAD) na prvním pravém listu každé rostliny, hodnoty jsou průměry ze tří měření (n = 3). Tyto parametry byly měřeny 18., 21., 24. a 27. den stáří rostliny.

Rostlinný materiál	Parametry rostliny	stáří rostliny			
		18. den	21. den	24. den	27. den
K1	Výška (cm)	6	6,5	8	9,5
	Počet listů	4	6	6	6
	Velikost listu (cm)	4	5	5,5	6
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	41,4	39,1	39,4	41,4
K2	Výška (cm)	6	7	8	10,5
	Počet listů	4	6	6	8
	Velikost listu (cm)	4,5	5	5,5	6,5
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	31,2	33,6	34,7	36,8
K3	Výška (cm)	6	6,5	8	9
	Počet listů	4	6	6	6
	Velikost listu (cm)	4	5	5,5	6
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	33,8	34,8	38,3	40,2
K4	Výška (cm)	5	5	6	7,5
	Počet listů	4	6	6	8
	Velikost listu (cm)	4,5	5	6	6,5
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	41,6	40,2	42,0	39,3
K5	Výška (cm)	7	7	8,5	9,5
	Počet listů	4	4	6	6
	Velikost listu (cm)	4	5	6	6,5
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	40,2	40,7	39,1	39,0
I1	Výška (cm)	6	6	8	9,5
	Počet listů	4	4	6	6
	Velikost listu (cm)	3	4	5,5	6,5
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	40,8	39,5	40,3	40,5
I2	Výška (cm)	4	4	5,5	7,5
	Počet listů	4	4	6	6
	Velikost listu (cm)	4	4,5	5,5	6
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	38,2	38,3	37,7	38,6
I3	Výška (cm)	5	6	7,5	8,5
	Počet listů	4	4	6	6
	Velikost listu (cm)	2,5	3,5	4,5	5
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	28,8	32,5	31,3	34,1
I4	Výška (cm)	6	7	9	10
	Počet listů	4	4	6	6
	Velikost listu (cm)	3,5	4	5,5	6
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	41,8	38,9	39,9	41,2
I5	Výška (cm)	4	4,5	5	6,5
	Počet listů	4	4	4	6
	Velikost listu (cm)	2	3	5	5,5
	Relativní obsah chlorofylů (SPAD)	29,6	29,8	30,7	29,0

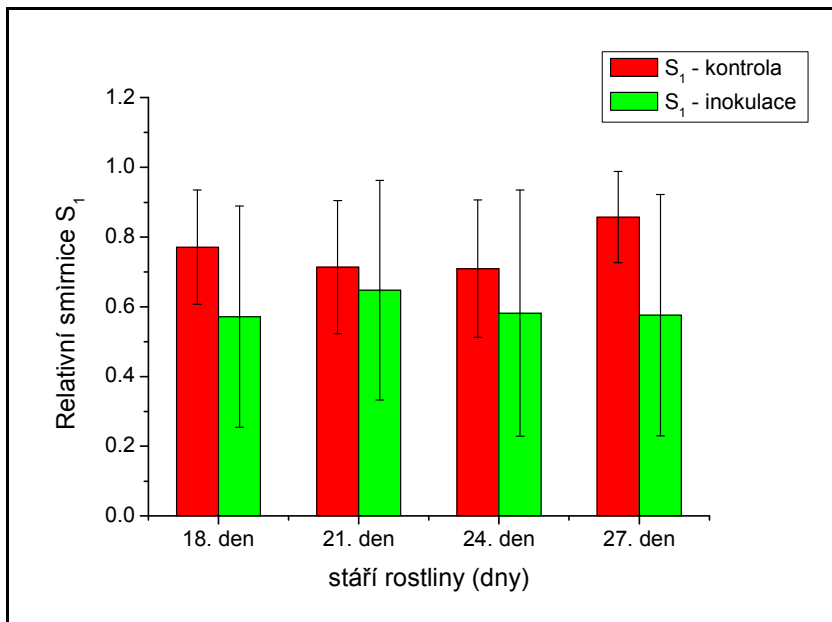
Každou sérii měření pohybu chloroplastů pod vlivem biotického stresu jsme opakovali 5krát. Z časového průběhu změny propustnosti T_C listu slunečnice jsme vyhodnotili parametr H_1 [(rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou)/(hodnota T_C v čase $t = 20$ min)] (obr. 29), relativní směrnicí S_1 (vyhodnocení podle rychlosti nárůstu) (obr. 30) a udělali průměry grafů (obr. 28). Na obr. 28 jsou průměrné křivky kinetiky propustnosti T_C kontrolních a inokulovaných rostlin pro každý den měření. Vidíme, že průměrné křivky propustnosti kontrolních rostlin jsou téměř shodné, což potvrzuje i vyhodnocení podle parametru H_1 (obr. 29) a relativní směrnicí S_1 (obr. 30), kdy nastává nepatrné zvýšení hodnoty směrnicí S_1 27. den stáří rostliny. Průměrné křivky kinetiky propustnosti inokulovaných rostlin se naopak liší. Rozsah propustnosti T_C mezi minimální a maximální hodnotou je u inokulovaných rostlin vyšší, ale vzhledem k vysokému pozadí (minimální hodnota T_C) jsou hodnoty parametru H_1 nakonec nepatrně nižší (obr. 29). Relativní směrnicí S_1 (obr. 30) dosahuje u inokulovaných rostlin nižších hodnot než u kontrolních.



Obr. 28. Křivky kinetiky propustnosti T_C měřené na kontrolních a inokulovaných listech slunečnice při vlnové délce 436 nm. Propustnost T_C byla měřena 18., 21., 24. a 27. den stáří rostliny. Měření proběhlo při teplotě 25 °C. Každé měření se skládalo z 20 minut ozařování listu modrým světlem o intenzitě 190 μmol fotonů $\text{PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz šipka) a z 30 minut ozařování modrým světlem o intenzitě 5 μmol fotonů $\text{PAR m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (viz šipka). Výsledné křivky jsou průměry z pěti měření ($n = 5$).



Obr. 29. Hodnoty parametru H_1 [(rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou)/(hodnota T_C v čase $t = 20$ min)] vypočtené z křivek kinetiky propustnosti T_C měřených na kontrolních a inokulovaných rostlinách slunečnice. Propustnost T_C byla měřena 18., 21., 24. a 27. den stáří rostliny. Každý sloupec představuje průměrnou hodnou parametru z pěti měření ($n = 5$). Znázorněny směrodatné odchylky.



Obr. 30. Hodnoty relativní směrnice S_1 (vyhodnocení podle rychlosti nárůstu) vypočtené z křivek kinetiky propustnosti T_C měřených na kontrolních a inokulovaných rostlinách slunečnice. Propustnost T_C byla měřena 18., 21., 24. a 27. den stáří rostliny. Každý sloupec představuje průměrnou hodnou směrnice z pěti měření ($n = 5$). Znázorněny směrodatné odchylky.

6 Diskuze

6.1 Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech

Měřili jsme vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech tabáku při jednom cyklu silného a slabého modrého světla. Už Augustynowicz a kol. (2001) navrhli rostlinu tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*) jako výborný materiál pro další zkoumání mechanismu pohybu chloroplastů. Pohyb chloroplastů jsme sledovali pomocí speciální svorky, světlovodu a spektrometru LI-1800. Při této metodě se přímo měří změny propustnosti listu v čase, které jsou způsobené pohybem chloroplastů při osvětlování. Pohyb chloroplastů byl sledován nepřímo měřením změn v propustnosti jako funkce aktuálního rozdělení chloroplastů v buňkách v řadě dalších prací (Walczak & Gabryś 1980, Gabryś a kol. 1981, Zurzycki a kol. 1983, Brugnoli & Björkman 1992, Malec a kol. 1996, Augustynowicz & Gabryś 1999, Tlalka & Fricker 1999, Tlalka a kol. 1999, Augustynowicz a kol. 2001, DeBlasio a kol. 2003, Grabalska & Malec 2004, Nauš a kol. 2008).

Pohyb chloroplastů byl studován u mnoha rostlin, ale především jako modelový systém pro světelné signály, kdy závisí na spektrálním složení nebo intenzitě světla (Wada a kol. 2003). Avšak efekty dalších faktorů vnějšího prostředí na pohyb chloroplastů nejsou zatím dobře popsány. V tomto experimentu jsme měřili efekt vyšší teploty na světlem indukovaný pohyb chloroplastů v listech. Použili jsme dva různé teplotní režimy: skokový [5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C, dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) a opět 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C] a lineární teplotní režim [ohřev v destilované vodě lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) a následné lineární ochlazování stejnou rychlostí]. U obou teplotních režimů jsme z křivek kinetiky propustnosti T_C (časový průběh změny propustnosti T_C) listu tabáku vyhodnotili parametry H_1, H_2 [(rozsah T_C mezi maximální a minimální hodnotou)/(hodnota T_C v čase $t = 25$ min)], relativní směrnici S_1, S_2 (vyhodnocení podle rychlosti nárůstu, resp. poklesu) a udělali průměry grafů.

V tab. 2 je uvedeno srovnání parametrů (parametry H_1 , H_2 a relativní směrnice S_1 , S_2) pro oba teplotní režimy. Při skokovém teplotním režimu jsme inkubovali pouze do teploty 45 °C, kdy při této teplotě již nedocházelo k téměř žádnému pohybu chloroplastů a bylo tedy zbytečné pokračovat v další inkubaci.

Tab. 2. Srovnání parametrů (parametr H_1 , H_2 a relativní směrnice S_1 , S_2) vypočtených z křivek propustnosti T_C listu tabáku při skokovém [5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C, dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) a opět 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C] a lineárním teplotním režimu [ohřev v destilované vodě lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) a následné lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev]. Hvězdička (*) vyznačuje statisticky významný rozdíl pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližší nižší). Křížek (X) značí žádný rozdíl.

Parametry	Teplota (°C)							
	25	30	35	38	40	42	45	50
Skokový teplotní režim								
H_1	-	X	X	X	X	*	*	
H_2	-	X	X	X	X	*	*	
S_1	-	X	X	X	*	*	*	
S_2	-	X	X	X	X	*	*	
Lineární teplotní režim								
H_1	-	X	X	X	X	X	*	*
H_2	-	X	X	X	X	X	*	*
S_1	-	X	X	X	X	*	*	*
S_2	-	X	X	X	X	*	*	*

Z tabulky je patrné, že rychlost nárůstu (S_1), resp. poklesu (S_2) křivek kinetiky propustnosti je až na výjimku (S_1 u skokového teplotního režimu) citlivější na teplotu než parametry H_1 , H_2 . Vlivem teplotního stresu tedy dojde nejdříve ke zpomalení rychlosti pohybu chloroplastů.

Podobné charakteristiky křivky kinetiky propustnosti používali Augustynowicz & Gabrys (1999). Sledovali působení slabého a následně silného světla na listy kapradiny adaptované na tmu. Z křivek vyhodnocovali dva parametry: 1) dT/dt -

rychlost změny propustnosti v lineární části křivky, 2) t_{70} - čas nutný k dosažení 70 % amplitudy propustnosti.

Naše měření vlivu vyšší teploty na světlem indukovaný pohyb chloroplastů v listech ukázala silnou teplotní závislost pohybu chloroplastů. Použitím skokového a lineárního teplotního režimu jsme také zjistili, že pohyb chloroplastů závisí na použitém teplotním režimu. U skokového teplotního stresu byla teplota ustání pohybu chloroplastů okolo 45 °C. U lineárního teplotního stresu byla teplota ustání pohybu chloroplastů až okolo 50 °C. Pro uvedené teplotní režimy bylo tedy zjištěno, že lineární teplotní režim (rychlost ohřevu/chlazení 2 °C/min) je k pohybu chloroplastů šetrnější než skokový teplotní režim (doba inkubace 5 min).

Teplotní závislost pohybu chloroplastů indukovaného světlem ukázali také Brugnoli & Björkman (1992). Stupeň uspořádání chloroplastů u *Oxalis oregana* rostl silně s rostoucí teplotou listu až do teploty 30 °C, zatímco další zvýšení teploty listu způsobilo výrazný pokles. Brugnoli & Björkman (1992) se však teplotní závislostí zabývali pouze okrajově a z této práce není patrná doba ani režim inkubace listu, proto nemůžeme naše výsledky s jejich porovnat. Pokud je nám známo, další práce věnující se přímo vlivu vyšší teploty na pohyb chloroplastů indukovaný světlem zatím nejsou publikovány.

Předpokládá se, že hlavní roli ve vytváření mechanické síly pro pohyb chloroplastů hraje aktin. Müller a kol. (2007) studovali reakce cytoskeletu na teplotní stres, který představuje jeden z hlavních přírodních problémů pro rostliny. Ukázali, že vlivem teplotního stresu téměř kompletně zmizí aktin ve všech druzích epidermálních buněk rostliny *Arabidopsis thaliana*. Toto roztrhání vláken aktinu bylo dosaženo při teplotě 40 - 42 °C a době inkubace 7 - 25 min. Přímá reakce aktinu na teplo byla nezávislá na typu a vývojovém stádiu buňky. Teplota 42 °C odpovídá také v našem experimentu teplotě, kdy ustává pohyb chloroplastů. K úplnému vymizení pohybu chloroplastů dojde až při 45 °C (u lineárního teplotního režimu až okolo 50 °C), což je zřejmě způsobené kratší dobou inkubace oproti práci Müller a kol. (2007). Pravděpodobný důvod ustání pohybu chloroplastů vlivem vyšší teploty se tedy jeví roztrhání a zmizení vláken aktinu během teplotního stresu.

Většina publikací uvádí jako důvod pohybu chloroplastů regulaci využití světla v listu a ochranu fotosyntetického aparátu před fotoinhibicí (Park a kol. 1996, Trojan & Gabrys 1996, Augustynowicz & Gabrys 1999, Jeong a kol. 2002, Kasahara a kol. 2002). Z našich výsledků vyplývá, že při vyšší teplotě dochází k nedostatečnému pohybu chloroplastů, což by tedy mohlo mít za následek zesílení fotoinhibice.

6.2 Vliv vyšší teploty na fluorescenční indukci

Vztah mezi pohybem chloroplastů a fotosyntézou byl sledován v publikacích Brugnoli & Björkman (1992), Rojas & García (1993), Park a kol. (1996), Sinclair & Williams (2001), Gorton a kol. (2003), Grabalska & Malec (2004). Rojas & García (1993) navrhli pohyb chloroplastů v buňkách jako další faktor, který ovlivňuje světelnou absorpci a tím i fotosyntetickou aktivitu. Brugnoli & Björkman (1992) ukázali, že uspořádání chloroplastů může změnit parametry fotosyntézy. Všeobecně se předpokládá, že pohyb chloroplastů za nízké intenzity osvětlování maximalizuje fotosyntetickou aktivitu a pohyb chloroplastů za silného osvětlení chrání fotosyntetický aparát před fotoinhibicí. Park a kol. (1996) navrhli, že pohyb chloroplastů u *Tradescantia albiflora* pomáhá chránit PSII proti světelnému stresu. Sinclair & Williams (2001) však dospěli k závěru, že pohyb chloroplastů na silném světle nechrání listy před fotoinhibicí. Navzdory jejich výsledkům však připustili, že pohyb chloroplastů na silném světle by mohl zvýšit práh intenzity světla, který způsobuje fotoinhibici. Nauš a kol. (2008) navrhli, že pohyb chloroplastů je vysoce robustní a nezávislý na fotosyntetických parametrech. Je regulován pouze lokálně a nezávisle na systémových signálech v rostlině.

V tomto experimentu jsme pomocí měření fluorescenční indukce sledovali vliv teplotního stresu na segmenty listu tabáku. Fluorescenční indukce byla měřena vždy před a po teplotním stresu, poté následovalo měření pohybu chloroplastů. Tak jsme na stejném segmentu listu mohli sledovat vliv vyšší teploty na fotosyntetický aparát i na pohyb chloroplastů a porovnat parametry obou měření. Použili jsme dva teplotní

režimy stresu: skokový (doba inkubace 5 min) a lineární teplotní režim (rychlost ohřevu/chlazení 2 °C/min). V tab. 3 a 4 můžete vidět porovnání parametrů pohybu chloroplastů (parametry H_1 , H_2 a relativní směrnice S_1 , S_2) a parametrů fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_P , V_J , V_I , S_m , M_0) pro skokový teplotní režim (tab. 3) a pro lineární teplotní režim (tab. 4). Jelikož byla fluorescenční indukce z technických důvodů měřena u každého teplotního režimu jiným přístrojem, porovnáваме jenom měření pohybu chloroplastů a fluorescenční indukce pro stejný režim a neporovnáваме navzájem měření fluorescenčních parametrů.

Tab. 3. Srovnání parametrů pohybu chloroplastů (parametry H_1 , H_2 a relativní směrnice S_1 , S_2) a parametrů fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_P , V_J , V_I , S_m , M_0) pro skokový teplotní režim [5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C, dalších 5 minut ve vodní lázni o dané teplotě T_K ($T_K = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) a opět 5 minut ve vodní lázni o teplotě 25 °C]. Hvězdička (*) vyznačuje statisticky významný rozdíl v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbliže nižší). Křížek (X) značí žádný rozdíl.

Parametry	Teplota (°C)						
	25	30	35	38	40	42	45
Pohyb chloroplastů							
H_1	-	X	X	X	X	*	*
H_2	-	X	X	X	X	*	*
S_1	-	X	X	X	*	*	*
S_2	-	X	X	X	X	*	*
Fluorescence chlorofylu							
F_0	-	X	X	X	X	X	*
F_V/F_P	-	X	X	X	X	X	*
S_m	-	X	X	X	X	X	*
V_J	-	X	X	X	X	X	X
V_I	-	X	X	X	X	X	*
M_0	-	X	X	X	X	X	*

Tab. 4. Srovnání parametrů pohybu chloroplastů (parametry H_1 , H_2 a relativní směrnice S_1 , S_2) a parametrů fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_P , V_J , V_I , Sm , M_0) pro lineární teplotní režim [ohřev v destilované vodě lineárně z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) a následné lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev]. Hvězdička (*) vyznačuje statisticky významný rozdíl v datech pro $P < 0,05$ (porovnávány hodnoty pro danou teplotu a teplotu nejbližší nižší). Křížek (X) značí žádný rozdíl.

Parametry	Teplota (°C)							
	25	30	35	38	40	42	45	50
Pohyb chloroplastů								
H_1	-	X	X	X	X	X	*	*
H_2	-	X	X	X	X	X	*	*
S_1	-	X	X	X	X	*	*	*
S_2	-	X	X	X	X	*	*	*
Fluorescence chlorofylu								
F_0	-	X	X	X	X	X	X	*
F_V/F_P	-	X	X	X	X	*	*	*
Sm	-	X	X	X	X	X	*	*
V_J	-	X	X	X	X	X	*	*
V_I	-	X	X	X	X	X	*	*
M_0	-	X	X	X	X	X	X	*

Pro uvedené teplotní režimy bylo zjištěno, že u skokového teplotního stresu (tab. 3) jsou změny v parametrech pohybu chloroplastů citlivější na vyšší teplotu než parametry fluorescence. Pokud bychom vzali v potaz závěr z předchozího experimentu, mohli bychom tedy říci, že cytoskelet je náchylnější na teplotní stres než fotosyntetický aparát. U lineárního teplotního režimu (tab. 4) už rozdíl ale tak prokazatelný není.

6.3 Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů

Pohyb chloroplastů je závislý především na intenzitě a spektrálním složení dopadajícího světla (Wada kol. 2003) nebo na mechanické stimulaci cílových buněk (Sato a kol 1999, 2003a). My jsme se v tomto projektu zaměřili na studium vlivu biotického stresu na světlem indukovaný pohyb chloroplastů v listech. Sledovali

jsme na listech slunečnice časový vývoj vlivu plísně slunečnicové na pohyb chloroplastů. Vývoj nemoci jsme sledovali tak, že před každým měřením pohybu chloroplastů jsme na rostlině změřili 4 parametry (výšku, počet listů, velikost listu a relativní obsah chlorofylů) (tab. 1). Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi inokulovanými a kontrolními rostlinami byl u velikosti prvního pravého listu, na kterém byl měřen pohyb chloroplastů. U výšky, počtu listů a u relativního obsahu chlorofylů nebyl zjištěn mezi inokulovanými a kontrolními rostlinami statisticky významný rozdíl.

Z časového průběhu změny propustnosti T_C listu slunečnice jsme vyhodnotili parametr H_1 (obr. 29) a relativní směrnici S_1 (obr. 30). Nebyl však prokázán žádný statisticky významný rozdíl (pro kritickou hodnotu $\alpha = 0,05$) mezi inokulovanými a kontrolními rostlinami v těchto parametrech. Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi inokulovanými a kontrolními rostlinami byl však u minimální a maximální hodnoty T_C křivek kinetiky propustnosti T_C (obr. 28) a u rozsahu T_C mezi minimální a maximální hodnotou. Vyšší minimální hodnota T_C u inokulovaných rostlin by mohla být dána nižším relativním obsahem chlorofylů, kdy relativní obsah chlorofylů u inokulovaných rostlin byl průměrně o 6 % nižší. Vlivem plošného obsahu chlorofylů v listu se podrobně zabývala Rolencová (2008). Zjistila, že s klesajícím relativním obsahem chlorofylů v listu roste počáteční propustnost listu a klesá rozsah a rychlost relativní změny propustnosti T_C . U relativního obsahu chlorofylů však nebyl mezi inokulovanými a kontrolními rostlinami zjištěn statisticky významný rozdíl a navíc rozsah propustnosti T_C u inokulovaných rostlin byl větší než u kontrolních rostlin. Vyšší minimální hodnota T_C a větší rozsah T_C mezi minimální a maximální hodnotou tedy zřejmě není dán relativním obsahem chlorofylů, ale je způsoben vlivem plísně slunečnicové.

Toto měření vlivu plísně slunečnicové na pohyb chloroplastů však bylo bráno jako testovací a tímto problémem je potřeba se zabývat více podrobně.

7 Závěr

Cílem experimentální části této diplomové práce byly tři projekty. Závěry z jednotlivých projektů jsou uvedeny níže.

7.1 Vliv vyšší teploty na pohyb chloroplastů v listech

- Pohyb chloroplastů jsme sledovali pomocí speciální svorky, světlovodu a spektrometru LI-1800. Segmenty listu tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*) jsme osvětlovali studeným bílým světlem z osvětlovací soustavy KL 2500 za použití modrého filtru BG-12.
- Pohyb chloroplastů v listech byl závislý na použitém teplotním režimu. U skokového teplotního stresu [inkubace 5 min ve vodní lázni o teplotě 25 °C, poté dalších 5 minut ve vodní lázni o teplotě T_k ($T_k = 25, 30, 35, 38, 40, 42, 45$ °C) a opět 5 minut ve vodě o teplotě 25 °C] byla teplota ustání pohybu chloroplastů okolo 45 °C. U lineárního teplotního stresu [lineární ohřev z teploty 25 °C rychlostí 2 °C/min až po koncovou teplotu T_k ($T_k = 30, 35, 38, 40, 42, 45, 50$ °C) a následně lineární ochlazování stejnou rychlostí, jakou probíhal ohřev] byla teplota ustání pohybu chloroplastů až okolo 50 °C.
- Lineární teplotní režim (rychlost ohřevu/chlazení 2 °C/min) byl k pohybu chloroplastů šetrnější než skokový teplotní režim (doba inkubace 5 min).

7.2 Vliv vyšší teploty na fluorescenční indukci

- Pomocí měření fluorescenční indukce jsme sledovali vliv teplotního stresu na segmenty listu tabáku. Použili jsme dva teplotní režimy stresu: skokový (doba inkubace 5 min) a lineární teplotní režim (rychlost ohřevu/chlazení 2 °C/min).
- Fluorescenční indukce byla měřena na stejném segmentu, na kterém byl následně měřen pohyb chloroplastů. Tak jsme na stejném segmentu listu

mohli sledovat vliv vyšší teploty na fotosyntetický aparát i na pohyb chloroplastů a porovnat parametry obou měření.

- Parametry pohybu chloroplastů byly citlivější na teplotu než parametry fluorescence chlorofylu. To platilo především pro skokový teplotní režim. U lineárního teplotního režimu už rozdíl tak prokazatelný nebyl.

7.3 Vliv biotického stresu na pohyb chloroplastů v listech

- Sledovali jsme na listech slunečnice časový vývoj vlivu plísně na pohyb chloroplastů. Pohyb chloroplastů jsme měřili na prvním pravém listu 18., 21., 24. a 27. den stáří rostliny.
- Vliv plísně slunečnicové na pohyb chloroplastů v listech slunečnice se u inokulovaných rostlin projevil vyšší minimální a maximální hodnotou T_C a větším rozsahem T_C mezi minimální a maximální hodnotou.

8 Seznam literatury

- Augustynowicz J, Gabryś H** (1999) Chloroplast movements in fern leaves: correlation of movement dynamics and environmental flexibility of the species. *Plant Cell Environ* **22**, 1239 – 1248
- Augustynowicz J, Lekka M, Burda K, Gabryś H** (2001) Correlation between chloroplast motility and elastic properties of tobacco mesophyll protoplasts. *Acta Physiol Plant* **23**, 291-302
- Banerjee R, Batschauer A** (2002) Plant blue- light receptors. *Planta* **220** : 498 – 502
- Briggs RW, Christie JM** (2001) The Phototropin Family of Photoreceptors. *The Plant Cell* **13**, 993 – 997
- Briggs RW, Christie JM** (2002) Phototropins 1 and 2 : versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204 – 210.
- 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* **32**, 23 – 35
- Celaya BR, Liscum E** (2005) Phototropins and Associated Signaling : Providing the Power of Movement in Higher Plants. *Photochemistry and Photobiology* **81**, 73 – 80
- Deblasio LS, Mullen LJ, Luesse RD, Hangarter PR** (2003) Phytochrome Modulation of Blue Light-Induced Chloroplast Movements in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 1471 - 1479
- Fankhauser C** (2002) Light perception in plants : cytokinins and red light join forces to keep phytochrome B active. *TRENDS in Plant Science* **7**, 143 – 145
- Frolec J, Ilík P, Krchňák P, Sušila P, Nauš J** (2008) Irreversible changes in barley leaf chlorophyll fluorescence detected by the fluorescence temperature curve in a linear heating/cooling regime. *Photosynthetica* **46**, 537-546
- Gabryś H, Walczak T, Zurzycki J** (1981) Chloroplast translocation induced by light pulses. *Planta* **152**: 553-556.

- Gabryś H, Walczak T, Malec P** (1997) Interaction between phytochrome and the blue light photoreceptor system in *Mougeotia*: temperature dependence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* **38**, 35 – 39
- Gabryś H** (2004) Blue light-induced orientation movements of chloroplasts in higher plants: Recent progress in the study of their mechanisms. *ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM* **26**, 476 - 478
- Gorton HL, Herbert SK, Vogelmann TC** (2003) Photoacoustic analysis indicates that chloroplast movement does not alter liquid-phase CO₂ diffusion in leaves of *Alocasia brisbanensis*. *Plant Physiology* **132**(3), 1529-1539
- Grabalska M, Malec P** (2004) Blue light-induced chloroplast reorientations in *Lemna trisulca* L. are controlled by two separable cellular mechanisms as suggested by different sensitivity to Wortmannin. *Photochemistry and Photobiology* **79**(4), 343 – 348
- Haupt W** (1982) Light-mediated movement of chloroplasts. *Ann Rev Plant Physiol* **33**, 205-233
- Haupt W, Scheurlein R** (1990) Chloroplast movement. *Plant, Cell Environment* **13**, 595 – 614
- Holzinger A, Buchner O, Lütz C, Hanson MR** (2007) Temperature-sensitive formation of chloroplast protrusions and stromules in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **230**, 23 - 30
- Christie MJ, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs RW** (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1) : Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Sci USA* **96**, 8779 – 8783
- Christie JM, Briggs WR** (2001) Blue light sensing in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 11457 – 11460
- Jarillo JA, Gabryś H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**, 952-954

- Jeong WJ, Park YI, Suh KH, Raven JA, Yoo OJ, Liu JR** (2002) A large population of small chloroplasts in tobacco leaf cells allows more effective chloroplast movement than a few enlarged chloroplasts. *Plant Physiol* **129**, 112-121
- Kadota A, Wada M** (1992) Photoinduction of formation of circular structures by microfilaments on chloroplasts during intracellular orientation in protonemal cells of fern *Adiantum capillus-veneris*. *Protoplasma* **167**, 97-107
- Kadota A, Sato Y, Wada M** (2000) Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by blue-light receptor. *Planta* **210**, 932 – 937
- Kagawa T, Wada M** (1994) Brief irradiation with red or blue light induces orientational movement of chloroplasts in dark-adapted prothallial cells of the fern *Adiantum*. *J Plant Res* **107**, 389-398
- Kagawa T, Wada M** (1999) Chloroplast-avoidance response induced by high-fluence blue light in prothallial cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Physiol* **119**, 917-923
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, et al.** (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 Cell Physiol* **43**, 367-371
- Kagawa T** (2003) The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *J Plant Res* **116**, 77-82
- Kagawa T, Wada M** (2004) Velocity of chloroplast avoidance movement is fluence rate dependent. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 592-595
- Kandasamy M.K., Meagher, R.B.** (1999) Actin-organelle interaction: Association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **44**(2), 110-118
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M** (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**, 829-832

- Kasahara M, Kagawa T, Sato Y, Kiyouse T, Wada M** (2004) Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* **135**, 1388 - 1397
- Kay CWM, Schleicher E, Kuppig A, Hofner H, Rüdiger W, Schleicher M, Fisher M, Bachers A, Weber S, Richter G** (2003) Blue Light Perception in Plants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 10973 - 10982
- 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. *J Plant Res* **121**, 441 - 448
- Krzyszowiec W, Rajwa B, Dobrucki J, Gabryś H** (2007) Actin cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* under blue and red light. *Biology of the cell* **99**(5), 251-260
- Lazár D** (1999) Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1412**, 1 - 28
- Lazár D** (2006) The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Functional Plant Biology* **33**, 9 - 30
- Malec P, Rinaldi RA, Gabryś H** (1996) Light-induced chloroplast movements in *Lemna trisulca*. Identification of the motile system. *Plant Sci* **120**, 127-137
- Matsuoka D, Tokutomo S** (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *PNAS* **102**, 13337 - 13342
- Müller J, Menzel D, Šamaj J** (2007) Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress. *Protoplasma* **230**, 231 - 242
- Nauš J, Rolencová M, Hlaváčková V** (2008) Is chloroplast movement in tobacco plants influenced systemically after local illumination or burning stress? *Journal of Integrative Plant Biology* **50** (10), 1292 - 1299
- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kavasa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M** (2003) Chloroplast unusual positioning is Essential for Proper Chloroplast positioning. *The Plant Cell* **15**, 2805 - 2815

- Park YI, Chow WS, Anderson JM** (1996) Chloroplast movement in the shade plant *Tradescantia albiflora* helps protect photosystem II against light stress. *Plant Physiol* **111**, 867-875
- Rojas NM, García FAJ** (1993) Phototactic movements of chloroplasts and their relation to photosynthetic activity in *Valisneria spiralis* L. *Internac J Exp Bot* **54**, 29-35
- Rolencová M** (2008) Teoretické a experimentální studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem světla různé úrovně a lokálního stresu. *Diplomová práce, UP Olomouc*
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie J, Briggs WR, Wada M, Okada K** (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6969-74
- Sakai Y, Takagi S** (2005) Reorganized actin filaments anchor chloroplasts along the anticlinal walls of *Vallisneria* epidermal cells under high-intensity blue light. *Planta* **221**, 823-830
- Sakamoto K, Briggs WR** (2002) Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *The Plant Cell* **14**, 1723 - 1735
- Sakurai N, Domoto K, Takagi S** (2005) Blue-light induced reorganization of the actin cytoskeleton and the avoidance response of chloroplasts in epidermal cells of *Vallisneria gigantea*. *Planta* **221**, 66-74
- Sato Y, Kadota A, Wada M** (1999) Mechanically induced avoidance response of chloroplasts in fern protonemal cells. *Plant Physiol* **121**, 37-44
- Sato Y, Wada M, Kadota A** (2001a) Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differently controlled by phytochrome and a blue light receptor. *Journall of Cell Science* **114**, 269 - 279
- Sato Y, Wada M, Kadota A** (2001b) External Ca²⁺ Is Essential for Chloroplast Movement Induced by Mechanical Stimulation But Not by Light Stimulation. *Plant Physiology* **127**, 497 - 504

- Sato Y, Wada M, Kadota A** (2003a) Accumulation response of chloroplasts induced by mechanical stimulation in bryophyte cells. *Planta* **215**, 772 - 777
- Sato Y, Kadota A, Wada M** (2003b) Chloroplast movement: dissection of events downstream photo- and mechano-perception. *J Plant Res* **116**, 1-5
- Sinclair J, Williams T** (2001) Photosynthetic energy storage efficiency, oxygen evolution and chloroplast movement. *Photosynth Res* **70**, 197-205
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1456-1461
- Strasses RJ, Strasser BJ** (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In: 'Photosynthesis: from light to biosphere. Vol V'. (Ed. P Mathis) pp. 977 - 980. (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht)
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M** (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation (M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty, eds.), Taylor and Francis, UK, Chapter **25**, 445 - 483
- Takagi S** (2003) Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells. *J Exp Biol* **206**, 1963-1969
- Tlalka M, Gabryś H** (1993) Influence of calcium on blue-light-induced chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Planta* **189**, 491 - 498
- Tlalka M, Fricker M** (1999) The role of calcium in blue-light-dependent chloroplast movement in *Lemna trisulca*. *The Plant Journal* **20**: 461 - 473
- Tlalka M, Runquist M, Fricker M** (1999) Light perception and the role of the xanthophyll cycle in blue-light dependent chloroplast movements in *Lemna trisulca* L. *Plant J* **20**, 447-459
- Trojan A, Gabryś H** (1996) Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L.) depends on light conditions during growth. *Plant Physiol* **111**, 419-425
- Wada M, Kagawa T, Sato Y** (2003) Chloroplast movement. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 455-468

- Walczak T, Gabryś H** (1980) New type of photometer for measurements of transmission changes corresponding to chloroplast movements in leaves. *Photosynthetica* **14**, 65-72
- Yatsunami H** (1996) Photoregulation systems for light-oriented chloroplast movement. *J. Plant Res.* **109**, 139-146
- Zurzycki J, Walczak T, Gabryś H, Kajfusz J** (1983) Chloroplast translocations in *Lemna- trisulcva* L induced by continuous irradiation and by light-pulses. Kinetic analysis. *Planta* **157**(6), 502-510