

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

**CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ
A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv zasychání listu na pohyb chloroplastů

(Influence of leaf's drying process on chloroplast movement)

Vypracoval: Slavomír Šmecko

Studijní obor: Biofyzika

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

Ďakujem vedúcemu bakalárskej práce, pánovi Prof. RNDr. Janovi Naušovi, CSc., za odborný dohľad pri realizácii experimentov, za konzultácie výsledkov, dohľad nad fyto komorou a za všetky dôležité rady a poznámky, ktoré mi pri písaní bakalárskej práce veľmi pomohli.

Táto práca vznikla s finančnou podporou projektu LO1204 z Národného programu udržateľnosti I, MŠMT a IGA PĚF_2015_025.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne, pod vedením pána Prof. RNDr. Jana Nauša, CSc. a za použitia literatúry uvedenej v závere práce.

V Olomouci dňa 20. 05. 2015

.....

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ATP – adenzíntrifosfát

CAM – Crassulacean acid metabolism

Cp-aktínové filamenty - Chloroplastové aktínové filamenty

HFR – high fluence rate

LED – Light Emitting Diode

LFR – low fluence rate

LHCI – svetlozberný komplex I

LHCII – svetlozberný komplex II

NADPH – nikotínamid adenín dinukleotid fosfát

OEC – komplex vyvíjajúci kyslík

P680 – reakčné centrum fotosystému II

phot1 - fototropín 1

phot2- fototropín 2

PSI – fotosystém I

PSII – fotosystém II

Q_A – chinónový jedno-elektrónový prenášač

Q_B – chinónový dvoj-elektrónový prenášač

ZHRNUTIE

Cieľom práce bolo sledovanie vplyvu zasychania listu tabaku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*) na pohyb chloroplastov. Meranie metódou kolimovanej transmitancie nám poskytlo parametre rozsahu a rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie, ktoré sa menia v dôsledku pohybu chloroplastov v liste. Zisťovali sme aj aký má vplyv zasychanie listu na rýchly fluorescenčný indukčný jav. Pre určenie vodného stavu v listoch sme použili parametre vodného potenciálu listu Ψ a relatívneho obsahu vody v liste *RWC*.

Výsledky ukazujú, že pôsobenie vodného stresu na list inhibuje pohyb chloroplastov. Pri hodnotách vodného potenciálu listu $\Psi = -1,6$ MPa a relatívneho obsahu vody v liste *RWC* = 68,39 % sa rozsah a rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie, za ktoré je fyziologicky zodpovedný pohyb chloroplastov, znížil o 90 % voči hodnote čerstvého listu. Hodnoty parametrov rýchleho fluorescenčného indukčného javu boli voči vodnému stresu menej citlivé v porovnaní s parametrami metódy kolimovanej transmitancie. Zistili sme, že reakcie parametrov charakterizujúcich stav a činnosť reakčných centier PSII na vodný stres boli slabé a nepozorovali sme u nich žiadny trend zmeny v nami pozorovanom rozsahu vodného stresu. Meranie rýchleho fluorescenčného indukčného javu preto neposkytuje presnú informáciu o vodnom stave listu v nami skúmanom rozsahu vodného stresu.

Kľúčové slová: pohyb chloroplastov, zasychanie, kolimovaná transmitancia, vodný potenciál

ABSTRACT

The aim of bachelor thesis was to study the influence of leaf's drying process on chloroplast movement in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*). Collimated transmittance measurement gave us the parameters of the range and rate of change in collimated transmittance which changes as a result of chloroplast movement. We have examined, how the leaf's drying process affects the fast fluorescence induction, as well. To determine the water state in leaves, we have used parameters of leaf's water potential Ψ and leaf's relative water content RWC.

The results have shown, that the effect of water stress inhibits chloroplast movement. Given the values of leaf's water potential $\Psi = -1.6$ MPa and leaf's relative water content RWC = 68.39%, the range and rate of change in collimated transmittance, which is physiologically responsible for chloroplast movement, decreased by 90 % in respect of the control leaf's value. Parameters' values of the fast fluorescence induction were less sensitive with respect to water stress in comparison with parameters of collimated transmittance measurement. We have found that the reactions of parameters evaluating the state and activity of PSII reaction centers, related to water stress, were weak and we did not observe any trends in these parameters within the water stress range used. Therefore, the measurement of fast fluorescence induction does not provide accurate information about leaf's water state within the water stress range used.

Key words: chloroplast movement, leaf's drying process, collimated transmittance, water potential

OBSAH

1. Úvod	1
2. Cieľ práce	2
3. Prehľad problematiky	3
3.1 Chloroplasty	3
3.2 Pohyb chloroplastov	4
3.3 Fotoreceptory	6
3.4 Mechanizmus pohybu chloroplastov.....	7
3.5 Význam pohybu chloroplastov	9
3.6 Optická detekcia pohybu chloroplastov	9
3.6.1 Mikroskopické metódy.....	10
3.6.2 Fotometrická metóda.....	10
3.6.3 Meranie spektier pomocou spektorradiometru LI-COR 1800 s integračnou guľou.....	11
3.6.4 Meranie kolimovanej transmitancie.....	12
3.7 Vodný stres.....	12
3.8 Fluorescenčný indukčný jav.....	13
4. Materiál a metódy	15
4.1 Rastlinný materiál	15
4.2 Stanovenie obsahu chlorofylu pomocou SPAD 502 Chlorophyll meter	15
4.3 Fluorescenčná metóda FluorPen100	16
4.4 Metóda kolimovanej transmitancie	17
4.5 Tlaková metóda.....	20
4.6 Stanovenie relatívneho obsahu vody v liste RWC.....	23
5. Výsledky	24
6. Diskusia	33
7. Záver	35
8. Zoznam použitej literatúry	36

1. Úvod

Rastliny umožňujú život na Zemi. Procesom zvaným fotosyntéza premieňajú slnečnú energiu na energiu chemických väzieb. Vytvárajú kyslík O₂, biomasu a sú primárnym zdrojom organických molekúl. Fotosyntéza prebieha prevažne v chloroplastoch buniek listových mezofýlov. Chloroplasty sa môžu v bunkách pohybovať v závislosti na svetelných podmienkach a tým za slabého svetla optimalizovať využitie svetelnej energie pre procesy fotosyntézy alebo naopak, za silného svetla dokážu svojím pohybom ochrániť fotosyntetický aparát pred poškodením. Táto bakalárska práca si kladie za cieľ preskúmať závislosť pohybu chloroplastov na jednom z najvýznamnejších abiotických stresorov – vodnom strese. Druhá kapitola obsahuje ciele tejto práce. Stručný prehľad problematiky a doposiaľ získaných poznatkov je uvedený v tretej kapitole. Štvrtá kapitola obsahuje zhrnutie použitých metód a informácie o použitom rastlinnom materiáli. Jadrom práce je kapitola obsahujúca výsledky. Rozbor zmeraných závislostí je diskutovaný v šiestej kapitole. Poslednou kapitolou je záver, ktorý sumarizuje prácu, nasledovaný zoznamom použitej literatúry.

2. Cieľ práce

Cieľom predloženej bakalárskej práce bolo:

- 1) Spracovať stručný prehľad problematiky pohybu chloroplastov, mechanizmov pohybu chloroplastov, optickej detekcie pohybu chloroplastov a vplyvu vodného stresu na tento pohyb.
- 2) Premerať závislosť parametrov pohybu chloroplastov a fluorescencie chlorofylu na stave vody v liste.
- 3) Vyhodnotiť namerané výsledky a diskutovať závislosť pohybu chloroplastov a chlorofylovej fluorescencie na vodnom strese.

3. Prehľad problematiky

3.1 Chloroplasty

Chloroplasty sú semiuonómne organely s dvojitou vonkajšou membránou, nachádzajúce sa prevažne v listovom mezofyle rastlín. Vnútro chloroplastu vyplňa stróma, v ktorej sú uložené membránovo uzavreté systémy mechúrikovitého tvaru nazývané thylakoidy. Thylakoidy delíme podľa ich tvaru na granálne – silne sploštené kruhové mechúriky obsahujúce integrálne proteínové komplexy – fotosystémy I (PSI) na povrchu grán a fotosystém II (PSII) nachádzajúci sa aj na styčných plochách medzi membránami thylakoidu. Druhým typom sú intergranálne thylakoidy – sploštené trubky spájajúce graná a tieto spojnice obsahujú najmä PSI. Priestor vnútri thylakoidov nazývame lumen.

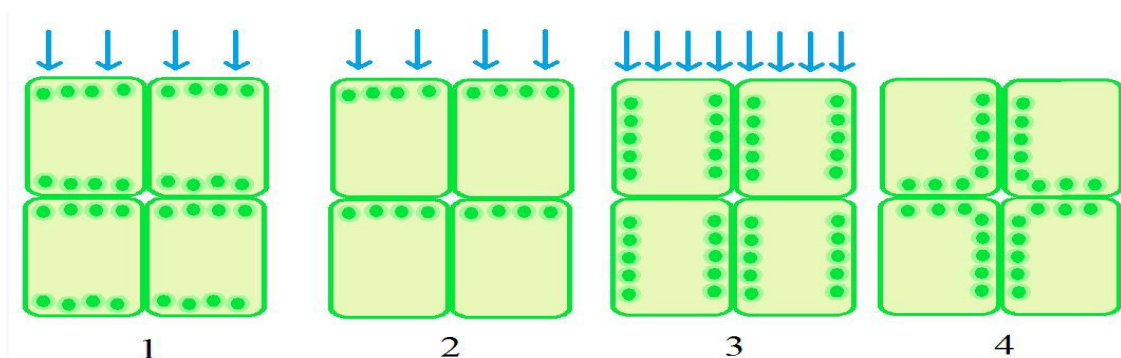
Na thylakoidných membránach sa nachádzajú zelené farbivá - chlorofyly *a* a *b*. Úlohou chlorofylov je absorpcia svetelného žiarenia. Chlorofyl *a* má absorpčné maximum v modrej oblasti spektra na 435 nm a v červenej oblasti spektra na 675 nm. Chlorofyl *b* má absorpčné maximá približne na 470 nm a 650 nm. Ďalšími fotosyntetickými pigmentmi nachádzajúcimi sa v chloroplastoch sú karotenoidy (Rolencová, 2008). Tie zabezpečujú chlorofylom ochrannú funkciu pred prebytočným svetelným žiarením a niektoré majú aj pomocnú funkciu – prenášajú prijatú energiu na chlorofyl *a*.

Svetelná energia prijatá listom je zachytávaná svetlozbernými komplexami (LHCI a LHCII, každý fotosystém má svoj svetlozberný komplex), ktoré sú tvorené listovými farbivami (xantofyly, karotenoidy, chlorofyl *a* a *b*) a táto energia je prenášaná do reakčného centra PSI a PSII. PSII má vo svojom reakčnom centre (P680) chlorofyl *a*. Ten je po prijatí dostatočnej energie schopný uvoľniť elektrón, ktorý postupuje ďalej v kaskáde redoxno-oxidačných procesov svetelnej (primárnej) fázy fotosyntézy. Elektrón z excitovaného P680* postupuje na feofytín, ktorý ďalej redukuje chinónový jedno-elektrónový prenášač Q_A. Ten prenáša elektrón ďalej na chinónový dvoj-elektrónový prenášač Q_B. Z Q_B sú elektróny využité v ďalšom slede oxidačno-redukčných reakcií. P680* sa po odovzdaní elektrónu stane silným oxidans a prijme elektrón od donora P680 – tyrozínu Y_Z. Ten získal elektrón z komplexu vyvíjajúceho kyslík (OEC). OEC je mangánový komplex schopný štiepiť molekuly vody na kyslík

O₂, protóny H⁺ a elektróny. Molekuly kyslíku O₂ sú uvoľňované do atmosféry, elektróny a protóny H⁺ sú využité na tvorbu produktov primárnej fázy fotosyntézy NADPH a ATP.

3.2 Pohyb chloroplastov

Ďalším spôsobom ochrany chloroplastov pred prebytočným svetelným žiarením je samotný pohyb chloroplastov. V dôsledku osvetlenia listu dochádza vo vnútri bunky k pohybu chloroplastov. Tento pohyb je závislý na spektrálnom zložení, intenzite, smere dopadu a polarizácii dopadajúceho žiarenia (Nauš a kol., 2008; Rolencová, 2008). Silu intenzity svetelného žiarenia je potrebné posudzovať odlišne, v závislosti na druhu rastliny, rastových podmienkach a ontogenéze rastliny (Nauš a kol., 2010). Rozloženie chloroplastov v bunke v tme v pozícii „apostrofe“ pri susedných bunkách v mezofyle listu vidíme na obr. 1. Fyziologická úloha tohto rozloženia chloroplastov zatiaľ nie je známa (Wada, 2013).



Obr. 1 Formácie chloroplastov v palisádových bunkách listového mezofylu v závislosti na intenzite modrého svetla. 1 – pozícia „diastrofe“, 2 – pozícia „epistrofe“, 3 – pozícia „parastrofe“, 4 – pozícia „apostrofe“. (Prevzaté a upravené od Řebíčka, 2009)

V prípade, že na list dopadá kolmo k povrchu kolimované svetlo s veľkou intenzitou z adaxiálnej strany listu, chloroplasty sa pohybujú ku antiklinálnym častiam palisádových buniek mezofylu (platí len pre listy, ktoré obsahujú palisádové bunky) a usporadúvajú sa približne rovnobežne s dopadajúcim žiarením, čím znižujú absorpciu dopadajúceho svetla. Zároveň sa tak zvyšuje priepustnosť listu. To má za následok

napríklad aj zníženie hodnoty relatívneho obsahu chlorofylu v liste - SPADu (Nauš a kol., 2010).

Tento pohyb je výsledkom únikovej odozvy, kedy sa chloroplasty dostanú do pozície „parastrofe“, čo sa nazýva aj HFR reakciou (**H**igh **F**luence **R**ate) – reakcia na svetlo s vysokou intenzitou (Kagawa a Wada, 2002). Fotosyntetický aparát je tak lepšie ochránený pred prebytočným svetelným žiarením (Haupt a Scheurlein, 1990).

Ak je list osvetlený svetlom s nízkou intenzitou, chloroplasty sa pohybujú smerom ku periklinálnym častiam palisádových buniek mezofylu za účelom maximalizácie absorpcie dopadajúceho svetelného žiarenia a tým zlepšenia využitia žiarenia pre fotosyntézu. Táto akumulčná odozva na svetlo s nízkou intenzitou môže viesť ku dvojitému usporiadaniu chloroplastov v bunkách – pozícia „diastrofe“ – v ktorej sú chloroplasty umiestnené pri obidvoch stenách palisádovej bunky kolmých ku smeru dopadajúceho svetelného žiarenia alebo pozícia „epistrofe“ – chloroplasty sú umiestnené iba pri stene bližšej k dopadajúcemu svetlu (Řebíček, 2009; Wada, 2013). Počas akumulčného pohybu chloroplastov sa znižuje priepustnosť listu (Nauš a kol., 2010; Wada, 2013; Williams a kol., 2003). Reakcia na svetlo s nízkou intenzitou sa nazýva LFR reakcia (**L**ow **F**luence **R**ate) (Kagawa a Wada, 2002).

K pohybu chloroplastov môže dôjsť aj v prípade mechanického stimulu rastliny. Sato a kol. (2003) zistili, že v protonemálnych (prvoklíčkových) bunkách machu *Physcomitrella patens* dôjde po 30 min od začiatku mechanického stimulu k akumulčnému pohybu chloroplastov. V staršej štúdií (Sato a kol., 1999) dokázali, že aplikáciou rovnakého mechanického stimulu v prípade paprade *Adiantum capillus-veneris* došlo k únikovému pohybu chloroplastov.

Nauš a kol. (2008) zistili, že pohyb chloroplastov je minimálne niekoľko hodín nezávislý od dodávky energie z chloroplastov a navrhli, že hlavným zdrojom energie pre tento pohyb je bunkové dýchanie v mitochondriách.

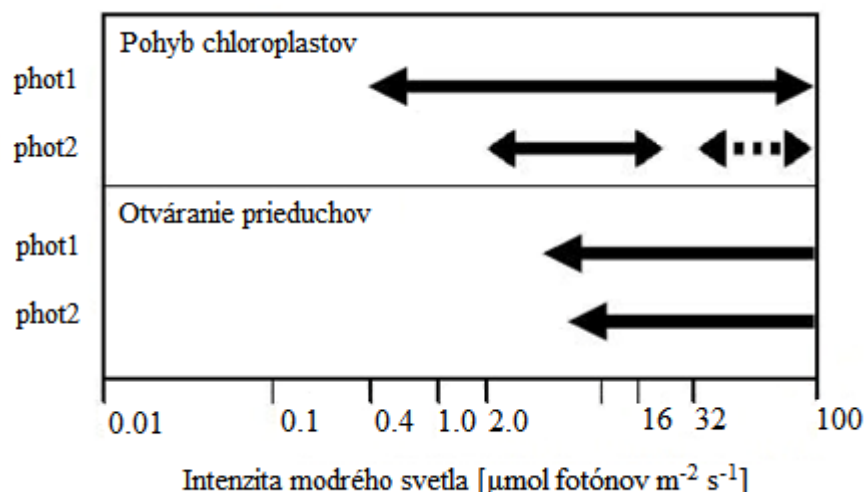
3.3 Fotoreceptory

Fotoreceptory sa delia podľa oblastí ich absorpčných maxím na fotoreceptory červeného, modrého/UV-A/UV-C a UV-B svetla. Fytochrómy absorbujú červené svetlo v rozmedzí $\lambda = 600-750$ nm. Podieľajú sa na regulácii procesov spojených s klíčením, kvitnutím a inhibíciou rastu hypokotylu. Pre väčšinu vyšších rastlín však nebol vplyv červeného svetla na pohyb chloroplastov detekovaný (Banaš a kol., 2012; Glosová, 2010; Rolencová, 2008; Řebíček 2009). Nauš a kol. (2010) zistili, že červené svetlo nevyvoláva pohyb chloroplastov v rastlinách tabaku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*).

Fotoreceptor UV-B svetla ($\lambda = 282-320$ nm) zatiaľ nebol identifikovaný (Glosová, 2010). Fotoreceptory detekujúce modré, UV-A ($\lambda = 320-500$ nm) a UV-C ($\lambda = 100-280$ nm) svetlo sú fototropíny, kryptochrómy a zeaxantín.

Fototropíny sú fotoreceptory vplyvajúce na pohyb chloroplastov. Fototropín 1 (phot1) a fototropín 2 (phot2) sú umiestnené prevažne v plazmatickej membráne bunky, pričom phot2 sa nachádza aj na vonkajšej membráne chloroplastov. Signály sprostredkujúce akumuláciu pohybu zabezpečujú phot1 aj phot 2, zatiaľ čo únikový pohyb chloroplastov riadi iba phot2. Fototropíny riadia aj fototropizmus a otváranie prieduchov (Glosová, 2010; Řebíček, 2009).

Na obr. 2 vidíme závislosť účasti phot 1 a phot2 v signálnych dráhach pre pohyb chloroplastov a otváranie prieduchov na intenzite dopadajúceho svetelného žiarenia. Akumulácia pohybu začne byť ovplyvňovaná phot1 približne pri intenzite modrého svetla od $0,4 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ do $100 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Phot2 sa do regulácie akumulácie pohybu chloroplastov zapojí medzi $2 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ až $16-32 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Phot2 pri intenzitách dopadajúceho modrého svetla vyšších ako $32 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sprostredkúva signály vedúce k únikovému pohybu chloroplastov. Otváranie prieduchov začnú obidva fototropíny regulovať takmer naraz, približne pri hodnote intenzity modrého svetla $4 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$



Obr. 2 Funkcie a fotosenzitivita phot1 a phot2. Plné šípky pri pohybe chloroplastov znázorňujú akumuláciu odpovede a prerušovaná šípka predstavuje unikovú odpoveď. (Prevzaté a upravené od Glosovej, 2010)

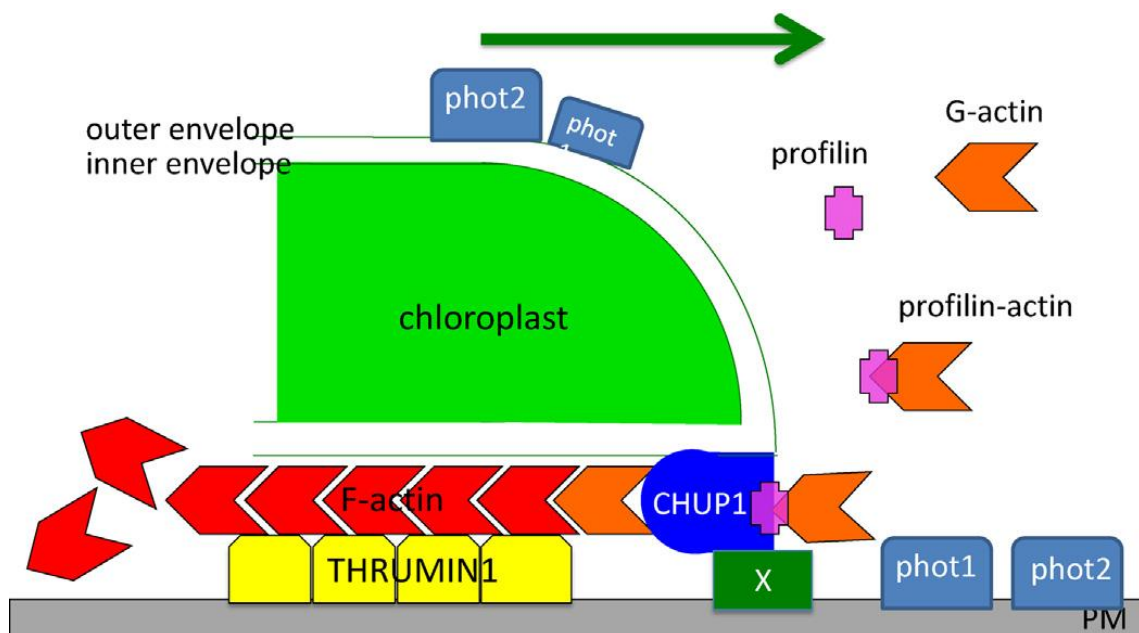
3.4 Mechanizmus pohybu chloroplastov

Každý chloroplast sa môže pohybovať nezávisle na ostatných, z čoho podľa Suetsugu a kol. (2010) vyplýva, že mechanizmus regulácie chloroplastov nie je riadený jadrom ani cytosolom, ale zodpovedá za každý chloroplast sám. Chloroplasty tak môžu reagovať aj na priestorovo veľmi špecifickú zmenu intenzity dopadajúceho svetla.

Po osvetlení rastliny sú signály z phot1 a phot2 odovzdané cytoskeletu, ktorý zodpovedá za vlastný pohyb chloroplastov. Sato a kol. (2002) uvádzajú, že v papradi *Adiantum capillus-veneris* sa chloroplasty pohybujú pozdĺž aktínových filamentov, zatiaľ čo v prípade machu *Physcomitrella patens* sa pohybujú pozdĺžne aktínových filamentov iba pri pomalom pohybe a pre rýchly pohyb využívajú mikrotubuly. Tieto pohyby boli vyvolané mechanickým stimulom rastliny.

Wada a kol. (2003) uvádzajú, že v rastline *Arabidopsis thaliana* dochádza k pohybu chloroplastov pozdĺž aktínových filamentov. Tiež tvrdia, že v prípade machu *Physcomitrella patens* sú signály z fotoreceptoru červeného svetla fytochrómu odovzdávané mikrotubulovým filamentom a signály modrého svetla sú odovzdávané aktínovým aj mikrotubulovým filamentom. Zdôvodnili to tým, že pri použití 10- μM Cremart, ktorý depolymerizuje mikrotubuly sa za pôsobenia červeného svetla chloroplasty nepohybovali. Pri použití 0,1mM cytochalasinB, ktorý depolymerizuje

aktínové filameny sa za pôsobenia červeného svetla chloroplasty pohybovali. Naopak, v prípade použitia modrého svetla došlo k akumulárnemu aj úníkovému pohybu chloroplastov iba keď neboli použité spoločne obidva inhibítory. V rastline *Arabidopsis thaliana* sa chloroplasty pohybujú vďaka chloroplastovým aktínovým filamentom, ktoré sú polymerizované proteínom CHUP1 (**Chloroplast Unusual Positioning1**) na prednej strane chloroplastu v smere jeho pohybu (Wada, 2013). Model mechanizmu pohybu chloroplastov vidíme na obr. 3.



Obr. 3 Model pohybu chloroplastov v rastline *A. thaliana*. CHUP1 sa viaže na membránu chloroplastu pomocou N-terminálu a môže sa zakotviť aj v plazmatickej membráne pomocou doposiaľ nezisteného membránového proteínu X. CHUP1 zapája profilaktín (profilín/aktín komplex) a polymerizuje F-aktín vsunutím G-aktínu medzi seba a už existujúci F-aktínový filament. THRUMIN1 na plazmatickej membráne viaže výsledné F-aktínové filameny a slúži im ako kotva. Preto sú CHUP1 a chloroplast potlačené vsunutým G-aktínom, čím sa vytvára hybná sila pohybu chloroplastov v dôsledku pôsobenia svetla. Chloroplastové aktínové filameny sú depolymerizované na konci. Zelená šípka znázorňuje smer pohybu chloroplastu. (Prevzaté a upravené od Wadu, 2013)

3.5 Význam pohybu chloroplastov

Význam pohybu chloroplastov skúmali Augustynowicz a kol. (1999) na rastlinách papradí *Adiantum capillus-veneris*, *Adiantum caudatum*, *Adiantum diaphanum* a *Pteris cretica*. Zistili, že *Adiantum caudatum* a *Adiantum diaphanum* majú nižšiu rýchlosť a rozsah pohybu chloroplastov ako *Adiantum capillus-veneris* a *Pteris cretica*. *Adiantum caudatum* je svetlomilná rastlina, zatiaľ čo *Adiantum diaphanum* je tieňomilná rastlina, teda obidve rastú za relatívne stálych svetelných podmienok a obidve disponujú obmedzenou schopnosťou pohybu chloroplastov. Paprade *Adiantum capillus-veneris* a *Pteris cretica* sú v prírode schopné prispôbiť sa väčším rozdielom intenzít svetla a pravdepodobne aj preto boli odozvy pohybu chloroplastov na týchto rastlinách dynamickejšie. Schopnosť rastliny pohybovať chloroplastmi je prostriedkom pre optimalizáciu fotosyntézy v dôsledku akumuláčného pohybu a zároveň možnosťou ako ochrániť fotosyntetický aparát pred prebytočným ožiarением v prípade únikového pohybu.

Podľa Davisa a Hangartera (2012) dochádza k menšiemu poškodeniu fotosystému PSII v dôsledku fotoinhibície počas pôsobenia svetla s vysokou intenzitou v únikovej pozícii chloroplastov v porovnaní s akumuláčnou polohou chloroplastov. Navyše v prípade akumuláčnej pozície chloroplastov je poškodzovaný povrch listu, zatiaľ čo v únikovej pozícii chloroplastov sa poškodenie rozloží hlbšie smerom do listu.

Trojan a Gabryšová (1996) skúmali závislosť pohybu chloroplastov na svetelných podmienkach, v akých rastlina *Arabidopsis thaliana* rástla. Chloroplasty prvej varianty vystavenej nedostatku svetla počas rastu sa pri osvetlení svetlom slabšej intenzity pohybovali za účelom akumulácie dopadajúceho žiarenia viac ako chloroplasty druhej varianty, ktorá rástla s dostatkom svetla a nikdy preto nepotrebovala optimalizovať jeho využitie. Odpoveď na svetlo s vysokou intenzitou obidvoch variantov bola približne rovnaká. Z toho usúdili, že úniková odozva chloroplastov na silné svetlo je pre rastlinu najdôležitejšia a má prednosť pred dlhodobými schémami umiestnenia chloroplastov.

3.6 Optická detekcia pohybu chloroplastov

V nasledujúcich kapitolách sú zhrnuté základné metódy optickej detekcie pohybu chloroplastov.

3.6.1 Mikroskopické metódy

Najjednoduchší spôsob ako sledovať pohyb chloroplastov je pomocou svetelného mikroskopu. Chloroplasty sú pre použitie takéhoto spôsobu detekcie ich pohybu dostatočne veľké. Svetelný mikroskop slúži k pozorovaniu chloroplastov na bunkovej úrovni a v spojení s kamerou umožňuje napríklad zaznamenávať ich pohyb v reálnom čase (Sato a kol., 1999; Takagi, 2002). Taktiež umožňuje počítanie chloroplastov v bunkách napríklad za rôznych svetelných podmienok (Trojan a Gabrys, 1996).

Často je limitujúcim faktorom pre použitie svetelnej mikroskopie hrúbka listu, preto sa využívajú konfokálne mikroskopy poskytujúce vyššiu rozlišovaciu schopnosť danú detekciou svetla prichádzajúceho len z ohniskovej roviny objektívu. Táto metóda zároveň poskytuje možnosť vytvárania 3D obrazov skúmaných štruktúr. (Königer a Bollinger, 2012). V práci Wadu (2013) autor uvádza, že ich výskumná skupina používa epifluorescenčný mikroskop. Využívajú dva zdroje svetla, ktoré toto usporiadanie ponúka. Modrým svetlom sa indukuje pohyb chloroplastov, ktorý je následne vyhodnocovaný vďaka zdroju infračerveného svetla (preto infračervené svetlo, lebo pretože má dlhšiu vlnovú dĺžku než červené svetlo, ktoré indukuje pohyb chloroplastov v machoch a papradiach skúmaných ich skupinou).

3.6.2 Fotometrická metóda

Berg a kol. (2006) zostrojili fotometrický prístroj, principiálne vychádzajúci z Walzcaka a Gabryšovej (1980). Disponuje dvomi dvojfarebnými LED diódami. Modrým svetlom vyvoláva pohyb chloroplastov v liste a červené neaktinické svetlo slúži na detekciu tohto pohybu v dôsledku zmeny priepustnosti listu. Zmenu intenzity červeného svetla prechádzajúceho vzorkou zaznamenáva fototranzistor. Detekcia zmien priepustnosti listu prebieha v 100 μ s trvajúcich časových oknách, kedy je vypnuté modré aktinické svetlo a zapnuté červené meracie svetlo. Túto metódu použili aj v článku Königerovej a Bollingerovej (2012).

DeBlasio a kol. (2003) skúmali možný vplyv fytochrómov na riadenie prechodu medzi akumuláčnou a únikovou odozvou chloroplastov v *Arabidopsis*. Merali priepustnosť listu v oblasti vlnových dĺžok modrého svetla $\lambda = 450 \pm 25$ nm, v oblasti

červeného svetla $\lambda = 650 - 670$ nm a v oblasti ďalekého červeného svetla $\lambda = 750 \pm 50$ nm. Pre merania použili rôzne usporiadania aparátúry pozostávajúcej z osvetľovacej časti, farebných filtrov a spektorradiometru LI-COR 1800. Metódu využili aj v ďalšom článku (DeBlasio a kol., 2005).

Pre merania priepusnosti listu na vlnovej dĺžke $\lambda = 654$ nm v prirodzených podmienkach vyvinuli Williams a kol. (2003) prenosný prístroj. Používa červenú LED diódu emitujúcu svetlo vlnovej dĺžky $\lambda = 654$ nm s intenzitou $25 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na úrovni listu a frekvenciou pulzov 400 Hz umiestnenú tak, aby príliš neclonila prenikaniu aktinického denného svetla (LED dióda je umiestnená pod uhlom 30° od kolmice ku osvetlenej ploche listu). K detekcii zmien intenzity červeného svetla slúži fotodióda. Tá je počas slnečných dní chránená pred prisilným žiarením a zahltením pásmovým filtrom, prepúšťajúcim len $\lambda = 654$ nm. Prevádzková teplota LED diódy je udržiavaná pomocou Peltierovho článku. Fotosynteticky aktívne žiarenie je detekované pomocou senzoru LI-190. Limitujúcim faktorom tejto techniky je hrúbka listu. V hrubších listoch nemusí byť zmena priepusnosti zaznamenaná. Výsledky merania aparátúry porovnali s meraniami v laboratórnych podmienkach so spektrálnym radiometrom LI-1800 s integračnou guľou LI-1800-12S. Dospeli k záveru, že aj napriek istým rozdielom sú výsledky obidvoch aparátúr kvalitatívne porovnateľné.

3.6.3 Meranie spektier pomocou spektorradiometru LI-COR 1800 s integračnou guľou

Zmeny optických vlastností listu v dôsledku pohybu chloroplastov je možné merať pomocou aparátúry s integračnou guľou. Jej vnútro tvorí dokonale odrážajúci biely povrch. Je možné umiestniť ju do polopriestoru nad listom pre meranie spektra odrazivosti listu alebo do polopriestoru pod listom pre meranie spektra priepusnosti. Merania sú neinvazívne a umožňujú zmenu meracích vlnových dĺžok v kroku po 1 nm. Získaný signál je delený signálom štandardu, ktorý predstavuje doštička s ideálne difúzne odrážajúcim bielym povrchom. Meranie s integračnou guľou využili vo svojich prácach (Nauš a kol., 2010; Rolencová, 2008; Williams a kol., 2003). Bolo zistené, že silné modré svetlo spôsobuje značný rast difúznej priepusnosti listu, nepatrný rast difúznej odrazivosti listu a pokles difúznej absorbtancie z adaxiálnej strany listu (Rolencová, 2008).

3.6.4 Meranie kolimovanej transmitancie

Priepustnosť listu ako dôsledok pohybu chloroplastov v liste môžeme merať aj pomocou metódy vyvinutej na katedre biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci (Nauš a kol., 2008; Rolencová, 2008). Zdroj svetla je umiestnený nad listom. List pridrža svorka skonštruovaná tak, aby nedošlo k mechanickej stimulácii listu. Svetlovod umiestnený v presne definovanej pozícii pod listom vedie signál do spektorrádiometru. Ten je možné nastaviť do režimu point screen, ktorý sníma hodnotu intenzity dopadajúceho svetelného žiarenia každú sekundu. Pre praktické merania stačí využívať priemer prvých troch hodnôt každých 30 sekúnd. Pre získanie hodnoty priepustnosti listu T_C je potrebné zaznamenané dáta vydeliť hodnotou intenzity dopadajúceho svetla bez vzorku. Meranie prebieha v čiastočne kolimovanom svetle a preto je citlivejšie na pohyb chloroplastov. Toto usporiadanie umožňuje aj meranie spektra kolimovanej priepustnosti.

Frolec a kol. (2010) zistili, že teplotný stres začal ovplyvňovať pohyb chloroplastov skôr než funkčnosť fotosystému PSII. Meraním kolimovanej transmitancie je teda možné sledovať stres vyvolaný vysokou teplotou.

3.7 Vodný stres

Nedostatok vody je jedným z najväčších stresorov rastlín, obmedzuje ich rast a produktivitu. Rastliny (s výnimkou CAM rastlín, ktoré majú listy s relatívne malým povrchom ku ich objemu, hrubú kutikulu, veľké vakuoly a CO_2 zo vzduchu prijímajú v noci) nemajú veľké zásoby vody a sú závislé na dopĺňaní týchto zásob často nepravidelnými zrážkami. Už relatívne malý nedostatok vody spôsobuje spomalenie rastu rastlín, vyšší deficit má za následok zatváranie prieduchov, čo vedie ku zníženiu transpirácie, výmeny plynov, a teda aj k spomaleniu fotosyntézy. Veľký nedostatok vody môže mať za následok dokonca odumretie orgánu alebo celej rastliny (Procházka a kol., 1998).

Zhang a kol. (2015) skúmali dva kultivary cukru, silne odolný voči suchu F172 a slabo rezistentný voči suchu YL6. Zistili, že za priaznivých životných podmienok sa anatomické vlastnosti listov a stav chloroplastov príliš nelíšili. So zvyšujúcim sa nedostatkom vody sa znížil počet zelených listov na rastlinách, listy vädli, strácali pevnosť a znížil sa aj obsah chlorofylov v liste. Stenšila sa kutikula, dochádzalo

k plazmolýze, chloroplasty sa presunuli od bunkových stien do stredu bunky, z dlhých oválnych chloroplastov sa stali takmer okrúhle a zväčšili sa škrobové zrná. Pri veľkom nedostatku vody si kultivar F172 zachoval integritu chloroplastov, ale chloroplasty kultivaru YL6 boli značne deformované a ich tvary sa stali nejasnými.

Śniegowska-Świerk a kol. (2015) skúmali oddelené listy sucho-odolného kultivaru jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) (cv. 'CAM/B1/CI') a sucho-citlivého kultivaru (cv. 'Maresi') v reakcii na nedostatok vody. Zistili, že kultivar tolerantný voči suchu sa na nedostatok vody adaptuje zmenou organizácie aktínových filamentov. Kruhové usporiadanie aktínových filamentov môže zabezpečovať istý typ usporiadania chloroplastov jačmeňa. Ich experimenty potvrdili, že nedostatok vody má značný vplyv na chloroplasty a preskupenie aktínových filamentov mezofylu. V mezofyle sucho-odolného kultivaru cv. 'CAM/B1/CI' bolo suchom vyvolané premiestňovanie chloroplastov obmedzené na perifériu bunky. Nedostatok vody mal za následok organizovanie aktínových filamentov do kratších oblúkov.

3.8 Fluorescenčný indukčný jav

Energiu prijatú zo svetla využíva rastlina v procesoch fotochémiie. Energia, ktorú rastlina nedokáže využiť v procesoch fotochémiie je disipovaná na teplo, prípadne emitovaná v podobe fluorescencie. Za hlavný zdroj fluorescencie pri teplote $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ je považovaný *chlorofyl a* svetlozberných komplexov fotosystému II (PSII) (Lazár, 1999). Podľa Strassera a kol. (2000) vykazuje excitovaný PSII s otvorenými reakčnými centrami (chinónové jedno-elektrónové prenášače Q_A sú oxidované) nižšiu úroveň fluorescencie, zatiaľ čo excitovaný PSII so zatvorenými reakčnými centrami (Q_A sú redukované) vykazuje vyššiu úroveň fluorescencie. Zároveň uvádza, že vzorka adaptovaná na tmú má všetky reakčné centrá otvorené a vzorka na silnom svetle má všetky reakčné centrá zatvorené. Preto súvisí nárast rýchlej fluorescencie u vzorky adaptovanej na tmú z počiatočnej hodnoty fluorescencie F_0 na hodnotu F_M s postupnou redukciou Q_A na Q_A^- . Hodnota parametru F_0 teda odpovedá minimálnemu výťažku fluorescencie, kedy je najvyššia účinnosť fotochémiie.

Podľa Lazára a kol. (1997) sa hodnota tohto parametra zvyšuje so zvyšujúcim sa zastúpením zatvorených PSII aj po dlhšom čase v tme. Naopak hodnota parametru F_M odpovedá stavu, kedy je výťažok fluorescencie najvyšší, pretože schopnosť reakčného

centra separovať náboj je v dôsledku redukovanosti Q_A malá a tak aj účinnosť fotochémiie klesá k nule (Soukupová a Roháček, 2005).

Podľa Ilíka a kol. (2006) odráža časť fluorescenčného indukčného javu medzi bodmi O až J redukciiu chinónového akceptora Q_A elektrónov PSII. Lazár a kol. (1997) uvádzajú, že v prípade, keď elektrón nepokračuje z Q_A na (chinónový dvoj-elektrónový prenášač) Q_B alebo sa tak deje len veľmi pomaly, dochádza k navýšeniu vlny J. Ďalej uvádzajú, že v dôsledku pomalšej funkcie komplexu vyvíjajúceho kyslík (OEC) dochádza k poklesu celej krivky rýchlej fluorescenčnej indukcie, pričom klesajú vlny J a I.

Hodnota maximálneho kvantového výťažku fotochémiie PSII zdravých rastlín je $F_V/F_M = 0,83$ (Lazár, 1999). Pôsobením stresu dochádza k znižovaniu tejto hodnoty.

Popis parametrov a prístroja použitého na meranie rýchleho fluorescenčného indukčného javu je uvedený v nasledujúcej kapitole.

4. Materiál a metódy

4.1 Rastlinný materiál

Na meranie pohybu chloroplastov boli použité listy rastlín tabaku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*). Rastliny boli pestované v pôdnom substráte (Potgrond H, Klasmann-Deilman GmbH., Geeste, Nemecko) vo fytokomore s pravidelným režimom svetelných podmienok – 8 hodín tma/16 hodín svetlo s 1 hodinou svitania a 1 hodinou stmievania. Intenzita svetla vo fytokomore bola približne $100 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, teplota vo fytokomore bola počas dňa $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a v noci $18 \text{ }^\circ\text{C}$, vlhkosť vzduchu počas dňa bola 45 % a vlhkosť vzduchu v noci bola 55 %.

Merania prebiehali na nepoškodených, dospelých listoch odstrihnutých z približne 3 mesiace starých rastlín, zvyčajne v pozícii 3 – 6 od vrcholu rastliny. Pred odstrihnutím listu boli rastliny poliate a umiestnené do tmy minimálne na 15 minút. Všetky listy zasychali celé aj so stopkou v tme pri teplote vzduchu $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a vlhkosti vzduchu 47 %. Listy boli priemerne dlhé 8,6 cm a široké 5,6 cm s plochou listu $38,5 \text{ cm}^2$. Najmenší bol dlhý 7,5 cm, široký 4 cm s plochou $22,5 \text{ cm}^2$ a najväčší list bol dlhý 10,8 cm a široký 6,7 cm s plochou $48,5 \text{ cm}^2$. Najzaschnutejší list zasychal po dobu 38 hodín. Kontrolný list sme merali ihneď po odstrihnutí. Všetky listy boli pred meraním, počas merania a po meraní vážené. Po poslednom meraní bol každý list niekoľko hodín umiestnený v sušiarňi pri $105 \text{ }^\circ\text{C}$ pre určenie sušiny listu. Teplota vzduchu miestností, v ktorých prebiehali merania bola priemerne $23,6 \text{ }^\circ\text{C}$ a vlhkosť vzduchu 41,9 %. Pred odstrihnutím listu sme zmerali jeho hodnotu relatívneho obsahu chlorofylu SPAD, potom naledovalo meranie rýchleho fluorescenčného indukčného javu, nasledované meraním kolimovanej transmitancie listu. Posledným meraním bolo meranie vodného potenciálu listu.

4.2 Stanovenie relatívneho obsahu chlorofylu pomocou SPAD 502DL

Listy určené pre merania boli vybrané na základe podobného veku. Snažili sme sa vyberať listy s čo najpodobnejším relatívnym obsahom chlorofylu, pretože relatívny obsah chlorofylu v liste môže ovplyvniť meranie kolimovanej transmitancie. Výber

listov pre merania prebiehal pomocou prístroja na určenie obsahu chlorofylu v listoch SPAD 502DL (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan). Prístroj meria priepustnosť listu na vlnových dĺžkach $\lambda = 650$ nm (oblasť blízka absorbnému maximu chlorofylu) a $\lambda = 940$ nm (pozadie) emitovaných 2 LED diódami. Každé meranie bolo vykonané na adaxiálnej strane listu. Displej zobrazuje hodnotu M v relatívnych jednotkách SPAD. Parameter M je definovaný pomocou vzorca:

$$M = \log \left[\frac{I'_{940}}{I_{940}} \right] - \log \left[\frac{I'_{650}}{I_{650}} \right] = \log T_{940} - \log T_{650}, \quad (1)$$

kde I_{650} a I_{940} sú signály bez vzorku, I'_{650} a I'_{940} sú signály so vzorkou, T_{940} je priepustnosť listu na vlnovej dĺžke $\lambda = 940$ nm a T_{650} je priepustnosť listu vlnovej dĺžke $\lambda = 650$ nm. Pre každý list sme získali $n = 5$ hodnôt SPAD, ktoré boli následne spriemerované.

4.3 Fluorescenčná metóda FluorPen FP 100

Pred meraním kolimovanej transmitancie sme pre možnosť porovnania týchto dvoch metód merali fluorescenčné parametre rôzne zaschnutých listov tabaku. Použitý bol ručný fluorimeter FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments, Brno, Česká Republika). Doba merania rýchlej fluorescencie bola 2 sekundy na vlnovej dĺžke $\lambda = 455$ nm s intenzitou $2100 \mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Prístroj vyhodnocuje množstvo parametrov podľa Strassera a kol. (2010).

Merania prebiehali vždy na približne rovnakých miestach na liste, pričom bolo vybrané také miesto, aby nebolo ovplyvnené ďalšie meranie kolimovanej transmitancie. Všetky merania boli vykonané z adaxiálnej strany listu a všetky listy boli pred meraním umiestnené minimálne 15 minút v tme. Pre každý list bolo získaných $n = 5$ hodnôt fluorescenčných parametrov a tieto boli následne spriemerované a boli k nim určené smerodatné odchýlky ($\pm\text{SD}$). Vybrali sme 5 fluorescenčných parametrov, ktoré sme neskôr porovnávali s parametrami kolimovanej transmitancie v reakcii na zasychanie listu.

Vybrané fluorescenčné parametre:

$F_0 \rightarrow$ intenzita fluorescencie v $50 \mu\text{s}$

$F_M \rightarrow$ maximálna intenzita fluorescencie

$F_V = F_M - F_0 \rightarrow$ maximálna variabilná fluorescencia

$F_V/F_M \rightarrow$ maximálny kvantový výťažok fotochémiie PSII

$V_J = (F_{2ms} - F_0) / (F_M - F_0) \rightarrow$ relatívna premenná fluorescencia v 2 ms

$V_I = (F_{60ms} - F_0) / (F_M - F_0) \rightarrow$ relatívna premenná fluorescencia v 60 ms

$M_0 = 4 (F_{300\mu s} - F_0) / (F_M - F_0) \rightarrow$ smernica nábehu fluorescencie do vlny J v krivke fluorescencného indukčného javu normovanej na variabilnú fluorescenciu

(FluorPen FP 100 Series – Operational Manual; Řebíček, 2009; Strasser a kol., 2010)

4.4 Metóda kolimovanej transmitancie

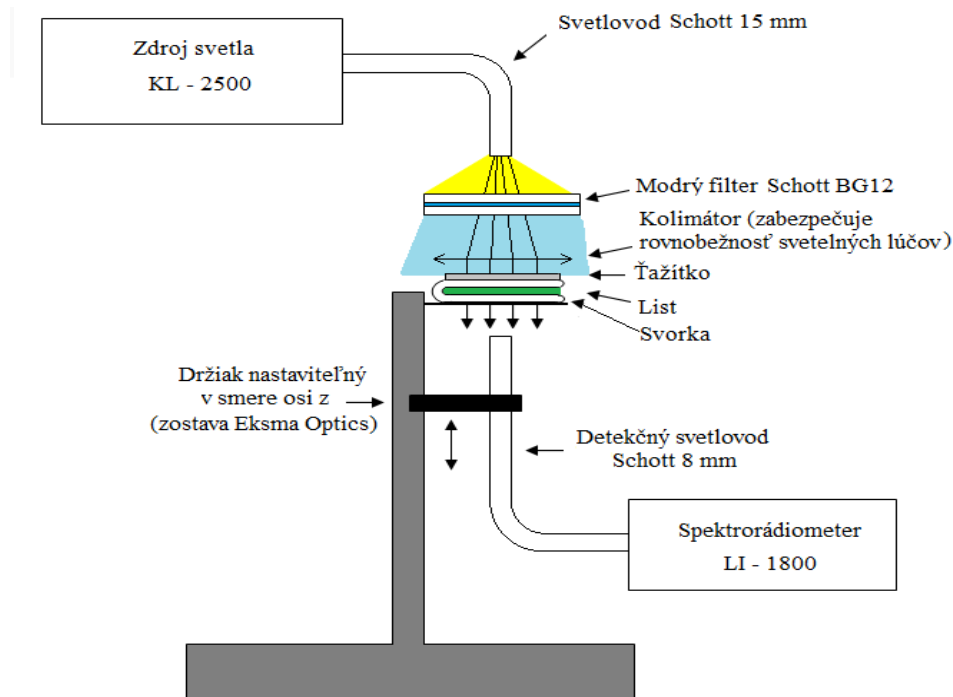
Metódou kolimovanej transmitancie, vyvinutou na katedre biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci (Nauš a kol., 2008; Rolencová, 2008), sme merali zmeny kolimovanej transmitancie v čase. Listy sme osvetľovali z adaxiálnej strany listu a zmeny kolimovanej transmitancie v čase sme merali z abaxiálnej strany listu. Ako zdroj svetla slúžila osvetľovacia sústava KL 2500 (Schott Glas, Wiesbaden, Nemecko) s priemerom svetlovodu 15 mm. Na odfiltrovanie nechcených vlnových dĺžok bol použitý modrý filter Schott BG 12 (Schott, Wiesbaden, Nemecko), prepúšťajúci svetlo s vlnovou dĺžkou $\lambda = 436$ nm. Intenzita modrého svetla v mieste dopadu na list bola 40 $\mu\text{mol fotónov m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Táto hodnota vyvoláva únikový pohyb chloroplastov (Glosová, 2010). List bol umiestnený v tmavom puzdre s kruhovým otvorom s polomerom 50 mm slúžiacim na osvetlenie listu. Zároveň sme list mierne zaťažili tak, aby bol kolmo k dopadajúcemu svetlu, ale aby sme prílišným mechanickým stimulom nepoškodili vzorku. Vo všetkých osiach posuvný svetlovod (Storz, Tuttlingen, Nemecko) s priemerom 3,5 mm, umiestnený 20 mm pod listom, privádzal svetlo do spektorrádiometra LI-1800 (LI-COR, Lincoln, USA).

Spektorrádiometer bol nastavený na režim PT (point screen) na hodnotu vlnovej dĺžky $\lambda = 436$ nm, pretože pri tejto hodnote je najmenšia priepustnosť listu a meranie kolimovanej transmitancie je najcitlivejšie na pohyb chloroplastov. Hodnoty intenzity

listom prešlého svetla boli zaznamenávané v sekundových intervaloch, pričom každých 30 sekúnd boli odčítané 3 hodnoty a z nich vytvorený priemer bol zapísaný. Pred meraním každého listu bola zaznamenaná aj intenzita žiarenia bez listu, aby sme overili, že svetelný zdroj má konštantné parametre a aby sme mohli vypočítať hodnotu kolimovanej transmitancie T_C pomocou vzorca:

$$T_C = \frac{I_V}{I_0}, \quad (2)$$

kde I_V je intenzita modrého svetla prešlého listom a I_0 je intenzita modrého svetla bez listu. Merania kolimovanej transmitancie prebiehali 22 minút, vždy na liste adaptovanom na tmu. Z pomocných meraní vieme, že predĺžením tejto doby sa už hodnota T_C príliš nezvyší. Na liste sme pre meranie kolimovanej transmitancie vždy vybrali približne rovnaké miesto na liste pri strednej žilke listu, ale tak, aby detekované svetlo neprechádzalo cez žilku, prípadne cez čo najmenší počet žiliek listu. Žily majú odlišnú anatomickú stavbu od mezofy listu. Schému aparatury na meranie kolimovanej transmitancie vidíme na obr. 4.



Obr. 4 Schéma aparatury na meranie kolimovanej transmitancie listu. (Prevzaté a upravené od Nauša a Husičkovej, 2013)

Z kriviek závislosti zmeny kolimovanej transmitancie na čase v dôsledku pohybu chloroplastov v listoch tabaku sme vyhodnocovali parameter rozsahu zmeny kolimovanej transmitancie H a parameter rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie S . Rozsah zmeny kolimovanej transmitancie H je daný vzorcom:

$$H = \frac{h}{h_{\min}}, \quad (3)$$

kde h_{\min} je minimálna hodnota T_C a h je dané pomocou vzorca:

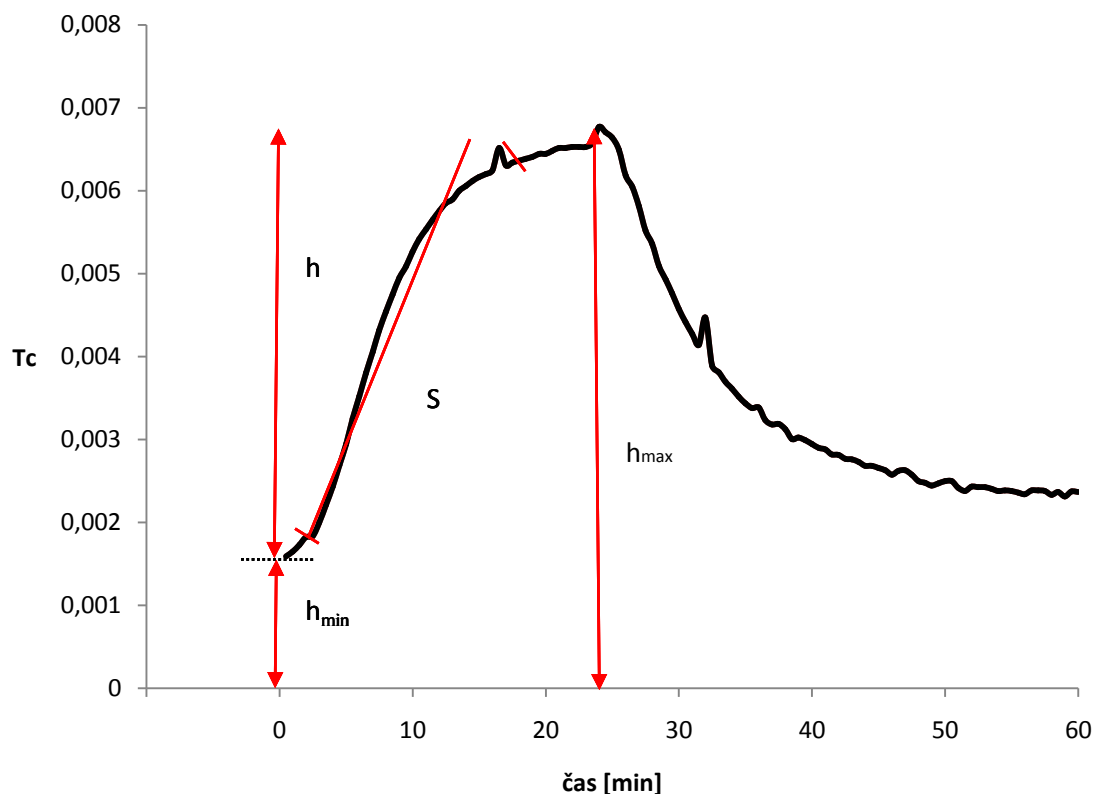
$$h = (h_{\max} - h_{\min}), \quad (4)$$

kde h_{\max} je maximálna hodnota T_C .

Rýchlosť pohybu chloroplastov S sme vyhodnocovali medzi 3. až 18. minútou merania. V programe Excel sme počas zobrazenia grafu zvolili cestu: pridať spojnicu trendu, tu sme vybrali lineárny typ trendu, nastavili sme zobrazenie rovnice regresie a hodnoty spoľahlivosti R . Číslo pri "x" sme ďalej vydělili číslom 15, aby sme získali hodnotu rýchlosti zmeny priepustnosti listu v našom usporiadaní v rozmere min^{-1} .

Nami meranému parametru rozsahu zmeny kolimovanej transmitancie H fyziologicky najpravdepodobnejšie odpovedá rozsah pohybu chloroplastov. Zároveň tak aj parametru rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie odpovedá rýchlosť pohybu chloroplastov. Nauš a kol. (2010) uviedli, že akumulčný pohyb chloroplastov po osvetlení svetlom s nízkou intenzitou je znakom, že nedošlo k rozloženiu chlorofylu a detekované zmeny transmitancií reprezentujú pohyb chloroplastov.

Schéma postupu výpočtu parametrov H a S vidíme na obr. 5.



Obr. 5 Schéma postupu výpočtu rozsahu zmeny kolimovanej transmitancie H a rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie S z typickej pohybovej krivky chloroplastov v liste tabaku. Naše merania kolimovanej transmitancie prebiehali do 22. minúty. (Prevzaté a upravené od Řebíčka, 2009)

4.5 Tlaková metóda

Vodný potenciál listu Ψ je veličina reflektujúca vodný stav listu a udáva sáciu silu rastlinných pletív. Je daná vzťahom:

$$\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m, \quad (5)$$

kde Ψ_{π} je osmotický potenciál, Ψ_p je tlakový potenciál, Ψ_g je gravitačná zložka vodného potenciálu a Ψ_m je matričný potenciál. Veľkosť gravitačnej zložky vodného potenciálu je v prípade merania vodného potenciálu listu zanedbateľná. Podľa Boyera (1995) môžeme vodu v rastlinách považovať za uzavretú v dvoch rôznych oblastiach oddelených semipermeabilnou membránou – plazmatickou membránou každej bunky.

Prvou oblasťou sú protoplasty, súhrnne zvané symplast a druhou oblasťou sú bunkové steny a xylém tvoriace apoplast. V protoplaste je koncentrovaný roztok a tlak zvyčajne vyšší než atmosférický tlak – turgorový tlak, vodný potenciál je tu preto daný pomocou vzorca:

$$\Psi_{(p)} = \Psi_{\pi(p)} + \Psi_{p(p)}, \quad (6)$$

kde $\Psi_{\pi(p)}$ je osmotický potenciál protoplastu a $\Psi_{p(p)}$ je tlakový potenciál protoplastu. V apoplaste je zriedený roztok a žiadny turgor. Namiesto toho sú tu ale pórovité povrchy bunkových stien generujúce matričný potenciál Ψ_m . Môžeme ho chápať ako pnutie v dôsledku adsorpcie vody na póry bunkových stien. Vodný potenciál apoplastu je teda daný pomocou vzorca:

$$\Psi_{(a)} = \Psi_{\pi(a)} + \Psi_{m(a)}. \quad (7)$$

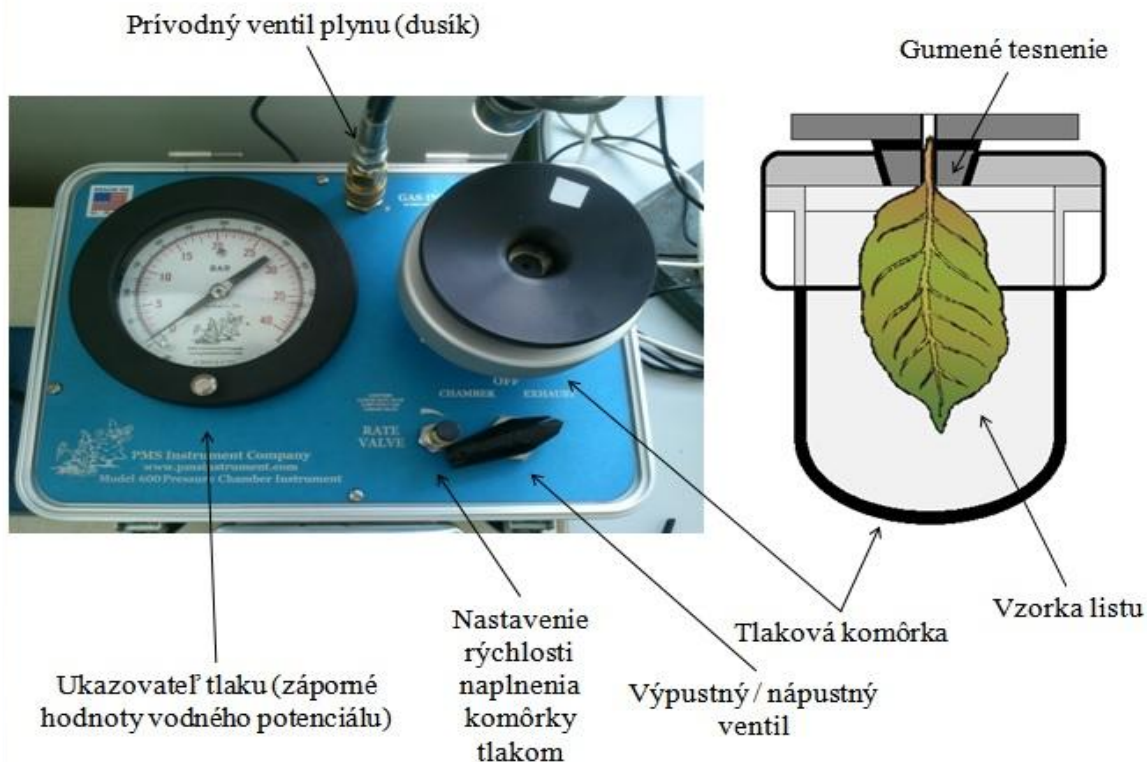
Vodný potenciál každého protoplastu je takmer vždy rovnaký ako v jeho bunkovej stene. Môžeme preto písať:

$$\Psi_{\pi(a)} + \Psi_{m(a)} = \Psi_{\pi(p)} + \Psi_{p(p)}. \quad (8)$$

Vidíme teda, že komponenty tvoriace vodný potenciál v protoplaste a apoplaste sa líšia, ale lokálne sa navzájom vyrovnávajú. Počas merania v tlakovej komore dochádza ku navyšovaniu tlaku pričítajúcemu sa k turgorovému tlaku. To má za následok zvýšenie vodného potenciálu bunky oproti vodnému tlaku xylému, následkom čoho je, že voda tečie do xylému. Pri hodnote balančného tlaku P_{bal} je teda uvoľnené pnutie v xyléme a platí vzorec:

$$-P_{bal} = \Psi_{m(a)}. \quad (9)$$

Záporná hodnota zobrazená tlakomerom aparatóry na meranie vodného potenciálu listu preto ukazuje saciu silu xylému – matričný potenciál apoplastu. Meranie vodného potenciálu listu tlakovou metódou prebiehalo na aparátúre firmy PMS Instrument Company, Model 600, Oregon, USA. Popis použitej aparatóry vidíme na obr. 6.



Obr. 6 Aparatúra Model 600 (PMS Instrument Company, Oregon, USA) na meranie vodného potenciálu listu a jej schéma

Pred meraním sme každému listu tabaku skalpelom odrezali stopku tak, aby bol rez dobre viditeľný priemyslovým mikroskopom MZK 1701 (INTRACO MICRO, spol. s r.o., Tachlovice, Česká republika). Každý list bol umiestnený v nastavci na tlakovú komôrku. Stopka listu bola stiahnutá gumovým tesnením, aby z komôrky neunikal narastajúci tlak. Pracovným plynom aparatúry bol dusík N₂. Rýchlosť naplnenia komôrky mohla byť upravovaná v závislosti na potrebách konkrétnych meraní. Povrch stopky listu v priečnom reze sme snímali priemyslovým mikroskopom MZK 1701, aby sme mohli zachytiť moment, kedy sa objaví kvapka xylémového roztoku v dôsledku vyrovnania tlakov v xyléme a v komôrke. USB-kamera snímala tlakomer aparatúry v tom istom čase. Záznamy priemyslového mikroskopu a USB-kamery sme nahrávali do počítača. Neskôr sme odčítali hodnoty vodného potenciálu každého meraného listu.

4.6 Stanovenie relatívneho obsahu vody v liste

Každý list bol vážený hneď po jeho odstrihnutí, čím sme stanovili jeho čerstvú hmotnosť m_{ξ} . Listy boli vážené aj pred samotným meraním fluorescenčného indukčného javu. Nasledovalo meranie kolimovanej transmitancie listu, po ktorom sme list opäť zvážili. Priemerom týchto dvoch hmotností sme získali hodnotu aktuálnej hmotnosti m_a . Ďalej nasledovalo meranie vodného potenciálu listu. Každý list bol po tomto meraní vložený do kovovej nádoby a uložený niekoľko hodín v sušiarňi pri 105 °C. Následne bola zvážená hmotnosť nádoby so sušinou a hmotnosť samotnej nádoby. Rozdielom týchto dvoch hodnôt sme získali hmotnosť sušiny listu m_s . Z technických dôvodov sme nemohli dosycovať vodou každá meraný list, ale pre výpočet hodnoty RWC sme potrebovali hmotnosť turgescenčného listu m_t . Pomocné merania ukázali, že listy rastlín zaliatych včas pred meraním mali narozdiel od plne turgescenčných listov po dosycovaní približne o 2% nižšiu hmotnosť (hodnota m_t bola približne o 2 % väčšia ako hodnota m_{ξ}). Túto odchýlku sme zahrnuli do našich výpočtov. Relatívny obsah vody v liste v percentách bol stanovený pomocou vzorca:

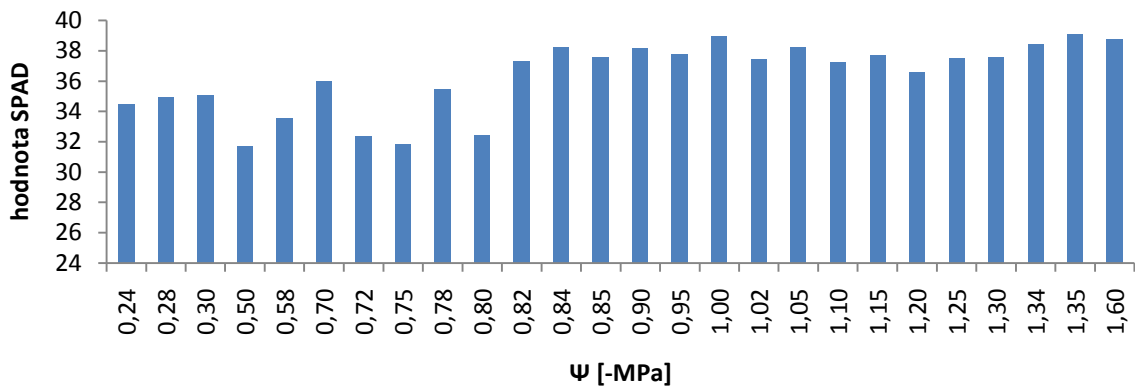
$$RWC = \left(\frac{m_a - m_s}{m_t - m_s} \right) * 100 , \quad (10)$$

kde m_t je v našom prípade dané pomocou vzorca:

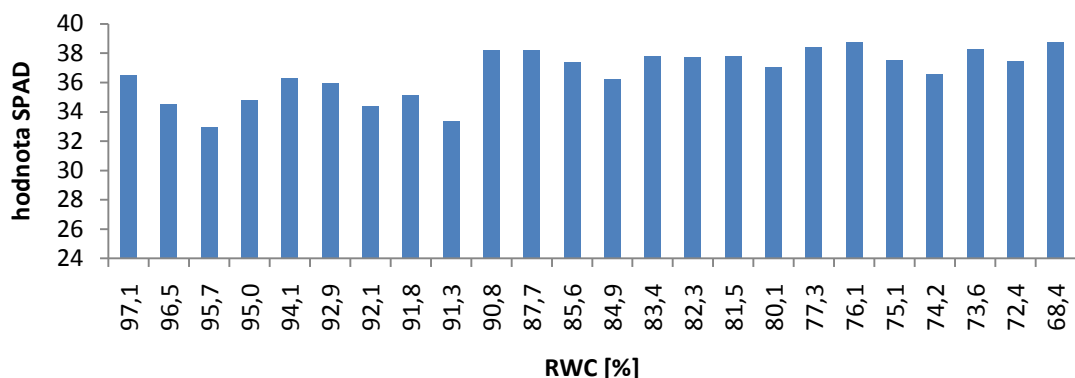
$$m_t = m_{\xi} * 1,02 . \quad (11)$$

5. Výsledky

Cieľom práce bolo zistenie závislosti pohybu chloroplastov na vysychaní listu a porovnanie citlivosti parametrov metód kolimovanej transmitancie a rýchlej fluorescence na tento pohyb. Každý list bol vybraný na základe meraní relatívneho obsahu chlorofylu pomocou chlorofylmetra SPAD 502DL (obr. 7 a 8). Tým sme zabezpečili čo možno najpodobnejší relatívny obsah chlorofylu v listoch. Táto hodnota je dôležitá, pretože môže ovplyvniť počiatočnú hodnotu kolimovanej transmitancie (Nauš a kol., 2010; Rolencová, 2008).

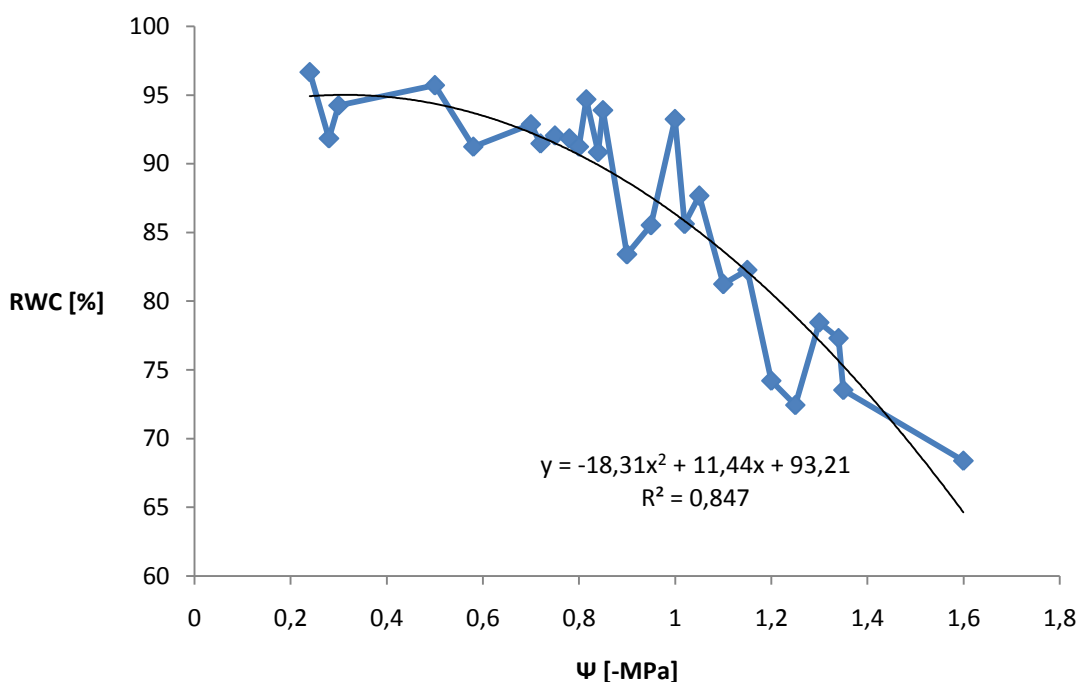


Obr. 7 Závislosť hodnôt relatívneho obsahu chlorofylu v listoch SPAD na vodnom potenciáli listov Ψ



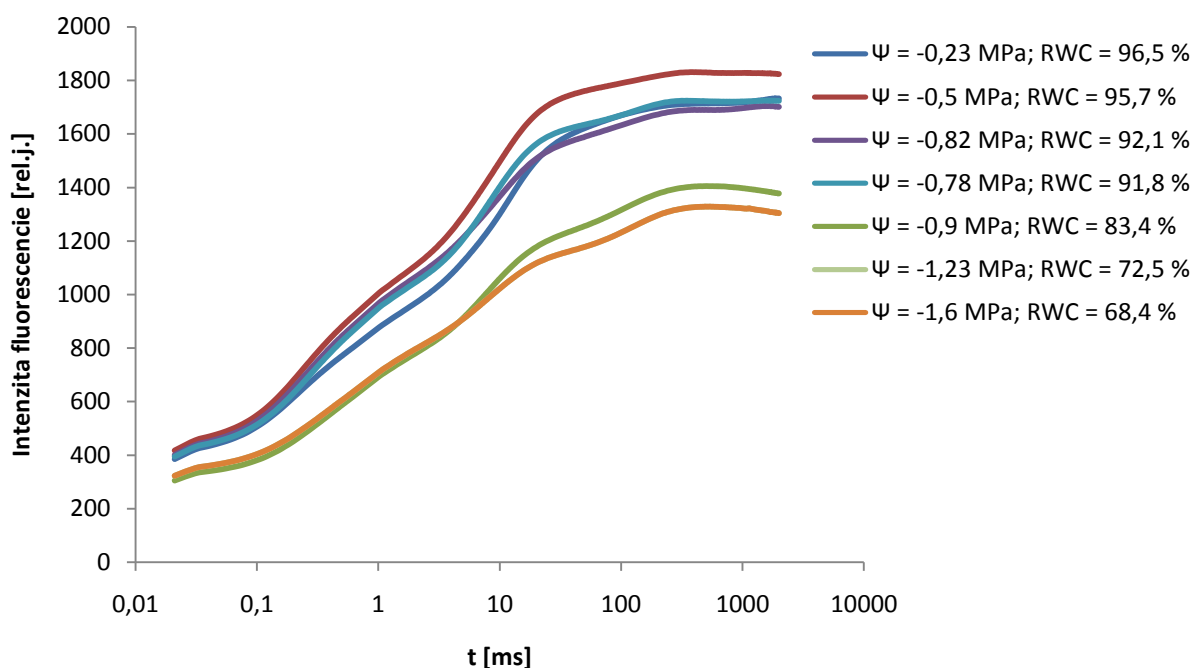
Obr. 8 Závislosť hodnôt relatívneho obsahu chlorofylu v listoch SPAD na relatívnom obsahu vody v listoch RWC

Na obr. 7 vidíme závislosť vodného potenciálu listu Ψ na relatívnom obsahu vody v liste RWC . Môžeme teda očakávať kvalitatívnu podobnosť porovnávaných výsledkov závislých na vodnom potenciáli listu Ψ a relatívnom obsahu vody v liste RWC .



Obr. 9 Závislosť vodného potenciálu listu Ψ na relatívnom obsahu vody v liste RWC . Zobrazená je rovnica regresie spolu s hodnotou spoľahlivosti R

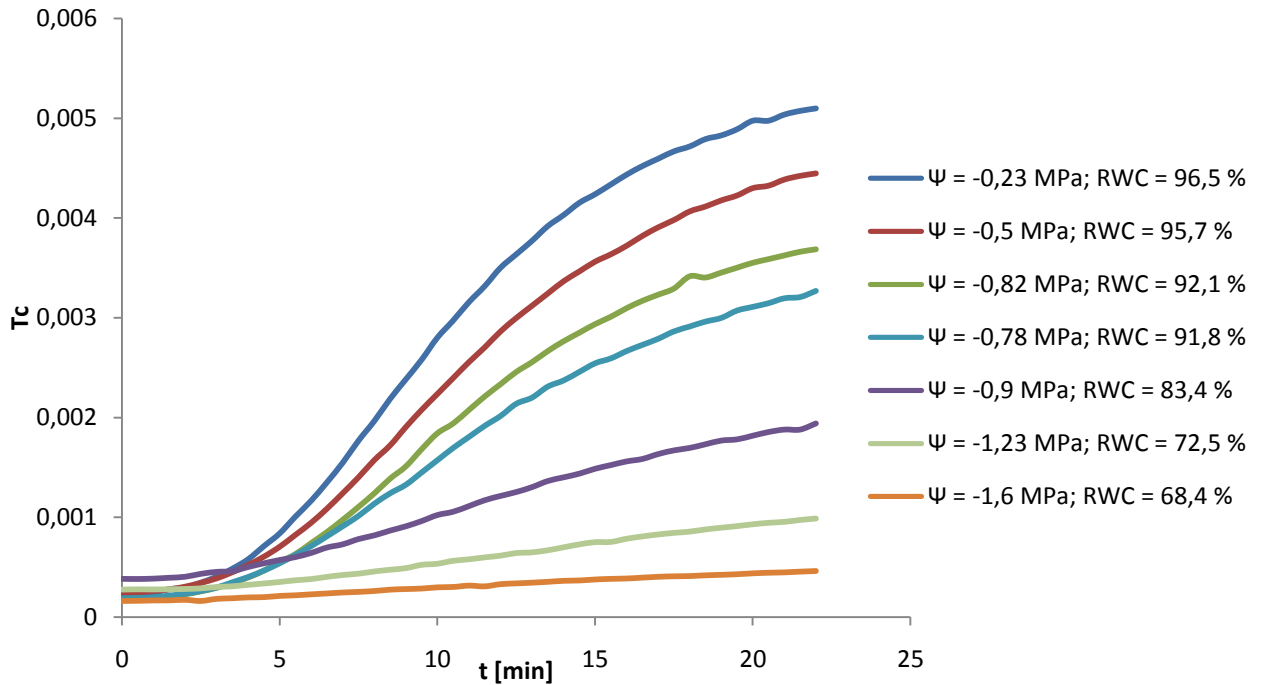
Na obr. 10 vidíme závislosť intenzity fluorescence na čase pre vybrané listy adaptované na tmu. Meranie fluorescenčných parametrov pomocou prístroja FluorPen FP100 trvalo približne 2 sekundy. Výsledkom je typická OJIP krivka. Vidíme, že nedostatok vody nemal na hodnoty fluorescenčných parametrov vplyv približne do hodnôt $\Psi = -0,8$ MPa a $RWC = 90$ %. Listy s nižšími hodnotami Ψ a RWC mali nižšie hodnoty intenzity fluorescence. Ich OJIP krivky sú tvarom porovnateľné s relatívne čerstvými listami, ale minimá a maximá OJIP kriviek zaschnutých listov sú nižšie. Toto pozorovanie sa približne zhoduje s Herákom (2011), ktorý uvádza, že nedostatok vody nemá priamy účinok na činnosť reakčného centra PSII približne do úrovne 25 – 30 % dehydratácie listov.



Obr. 10 Závislosť priebehu intenzity fluorescencie na čase. X-ová os je v logaritmickom merítke. Každá krivka je priemerom z $n = 5$ kriviek.

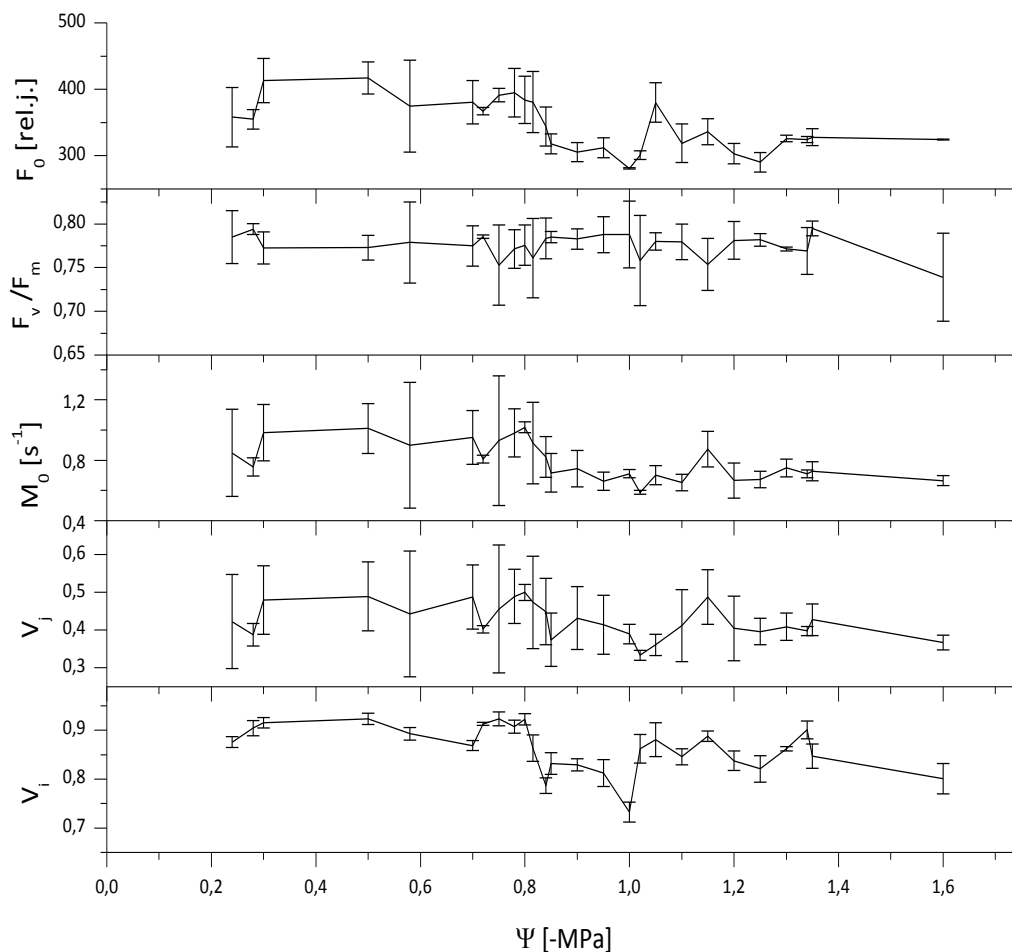
Na obr. 11 vidíme závislosť kolimovanej transmitancie na čase. Každé meranie trvalo 22 minút. Vidíme, že v porovnaní s grafom fluorescenčných parametrov sú krivky kolimovanej transmitancie dynamickejšie. Tento fakt je spôsobený väčšou citlivosťou pohybu chloroplastov na dehydratáciu listu oproti citlivosti reakčných centier PSII listu. Krivky kolimovanej transmitancie rôzne vyschnutých listov začínajú približne v rovnakom bode v dôsledku výberu podobne starých listov s podobnými hodnotami relatívneho obsahu chlorofylu. Na tento fakt, zdá sa, nemá vplyv ani zvyšovanie relatívneho obsahu chlorofylu v liste v dôsledku znižovania medzibunkových priestorov spôsobeného dehydratáciou listu (Procházka a kol., 1998). Tento efekt bude pravdepodobne vyvážený znížením obsahu chlorofylu v liste pri zasychaní listu (Zhang a kol., 2015). Vidíme ale, že aj napriek približne rovnakej počiatkovej hodnote kolimovanej transmitancie rôzne vyschnutých listov sa maximálna hodnota tohto parametru líši práve v závislosti od stupňa dehydratácie listu. Najväčší rozsah zmeny kolimovanej transmitancie aj najvyššia rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie sú zaznamenané u čerstvých, prípadne málo zaschnutých listov. So zvyšovaním efektu zasychania sa rozsah aj rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie

znižujú. Pri zaschnutí listu na úrovni hodnôt $\Psi = -1,6$ MPa resp. $RWC = 68,39$ % boli rozsah aj rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie takmer nulové.



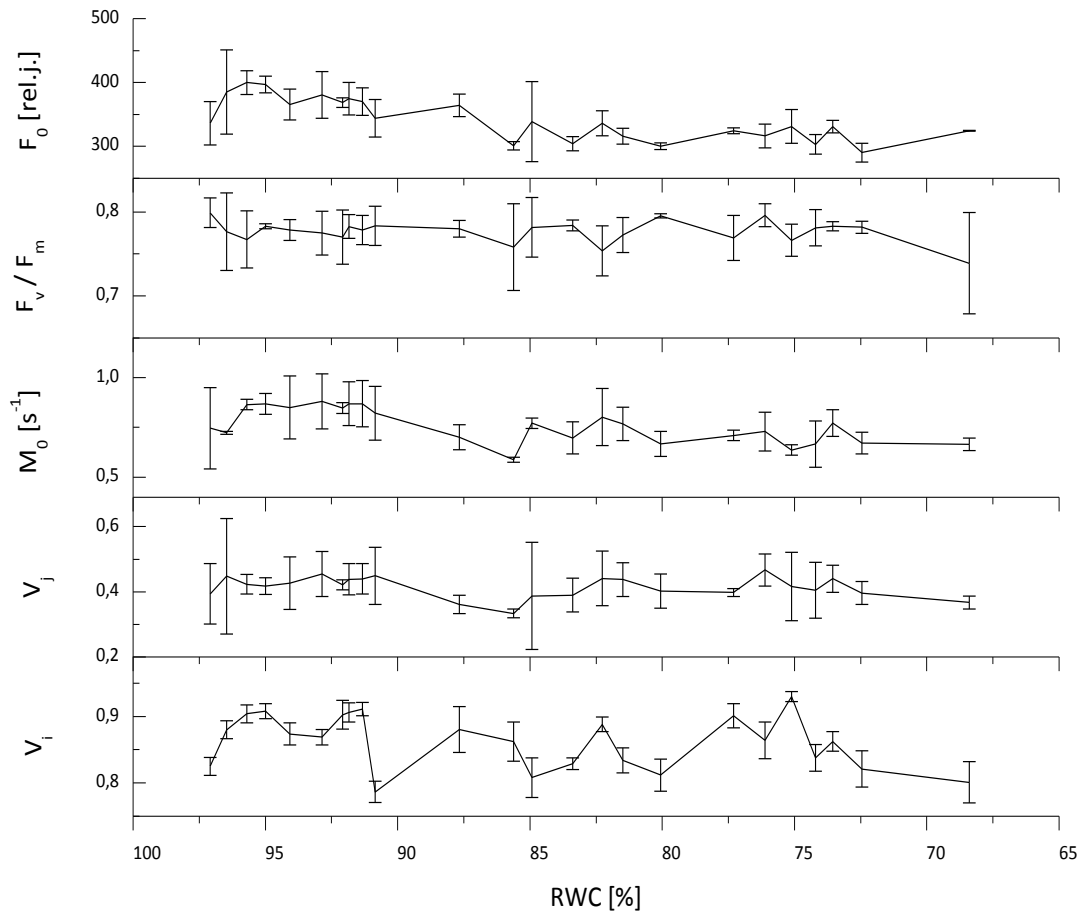
Obr. 11 Závislosť priebehu kolimovanej transmitancie na čase.

Na obr. 12 vidíme závislosť fluorescenčných parametrov F_0 , F_V/F_M , M_0 , V_j a V_i na vodnom potenciáli Ψ . Parametre F_V/F_M , V_j a V_i si držia približne rovnakú počiatočnú hodnotu aj so znižovaním vodného potenciálu listu. Ostatné fluorescenčné parametre so zvyšujúcou sa dehydratáciou listu mierne klesajú, nevidíme u nich však ale žiadny výrazný trend.



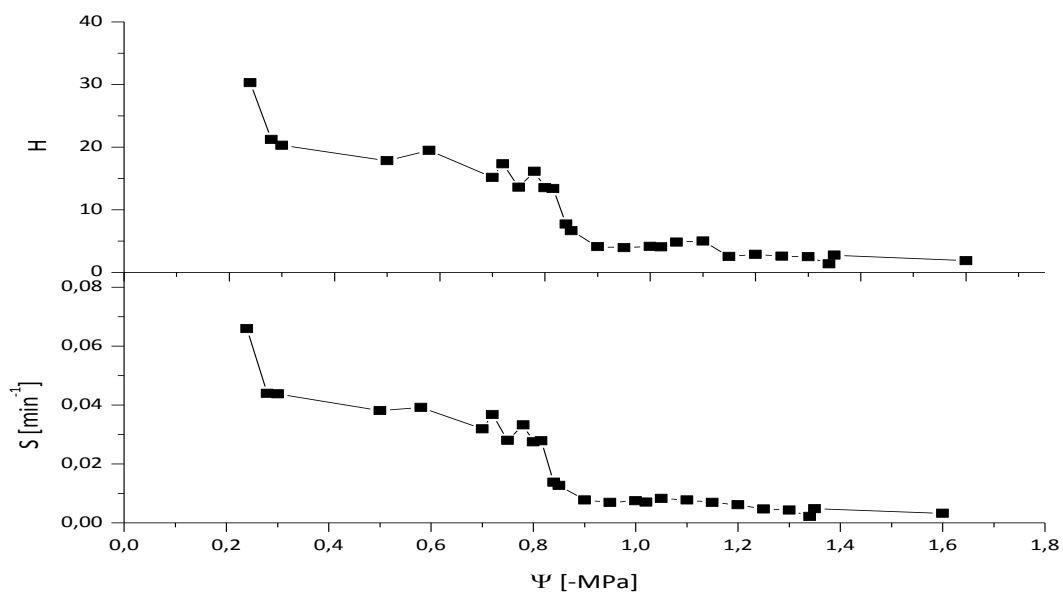
Obr. 12 Závislosť hodnôt parametrov F_0 , F_v/F_M , M_0 , V_j a V_i na vodnom potenciáli listu Ψ . Každá hodnota je výsledkom priemeru z piatich meraní $n = 5$ a ku každej hodnote je uvedená aj smerodatná odchýlka ($\pm SD$)

Na obr. 13 vidíme závislosť fluorescenčných parametrov F_0 , F_v/F_M , M_0 , V_j a V_i na RWC . Výsledky sú tu kvalitatívne zhodné s výsledkami na obr. 12. Je to dané nelineárnou závislosťou vodného potenciálu listu Ψ na relatívnom obsahu vody v liste RWC podľa obr. 9.



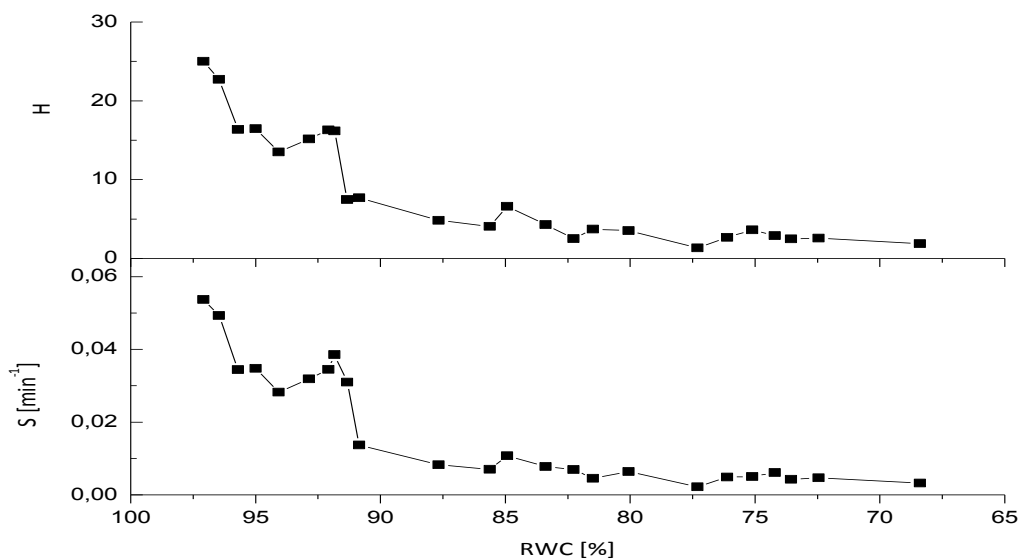
Obr. 13 Závislosť hodnôt parametrov F_0 , F_v/F_m , M_0 , V_j a V_i na relatívnom obsahu vody v liste RWC. Každá hodnota je výsledkom priemeru z piatich meraní $n = 5$ a ku každej hodnote je uvedená aj smerodatná odchýlka ($\pm SD$)

Na obr. 14 vidíme závislosť hodnôt parametrov H a S na vodnom potenciáli Ψ . Rozsah zmeny kolimovanej transmitancie H , tak, ako aj rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie S sa so znižujúcim sa vodným potenciálom znižujú. V okolí hodnoty vodného potenciálu $\Psi = -0,8$ MPa sa rozsah pohybu aj rýchlosť pohybu chloroplastov znižujú výraznejšie. Pri hodnote vodného potenciálu $\Psi = -1,6$ MPa zmeny kolimovanej transmitancie klesli takmer na nulu.



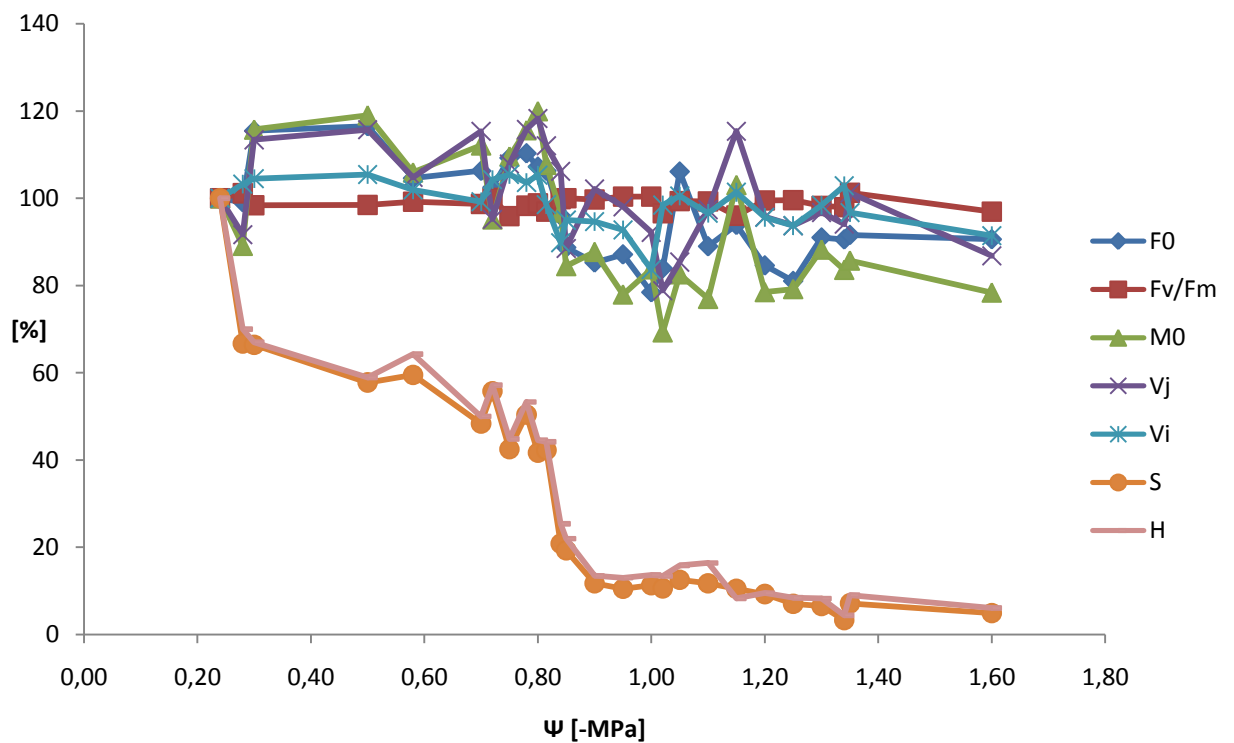
Obr. 14 Závislosť hodnôt parametrov H a S na vodnom potenciáli listu Ψ

Na obr. 15 vidíme závislosť hodnôt parametrov H a S na relatívnom obsahu vody v liste RWC . Rozsah zmeny kolimovanej transmitancie H , tak, ako aj rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie S sa so znižujúcim sa relatívnym obsahom vody v liste znižujú. Pri hodnote $RWC = 66,39\%$ klesli rozsah a rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie takmer na nulu, teda aj v tomto prípade sa jedná o kvalitatívnu zhodu výsledkov závislých na vodnom potenciáli listu Ψ a výsledkov závislých na relatívnom obsahu vody v liste RWC .



Obr. 15 Závislosť hodnôt parametrov H a S na relatívnom obsahu vody v liste RWC

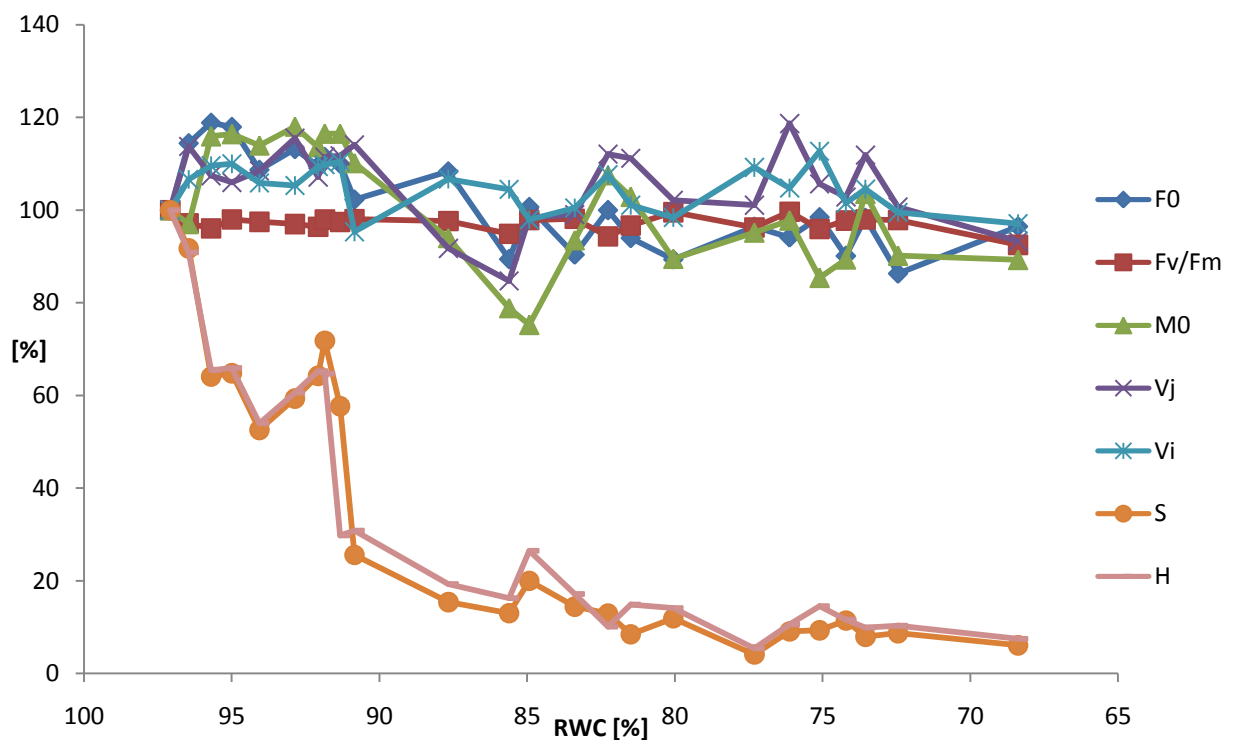
Na obr. 16 vidíme závislosť percentuálnych zmien parametrov F_0 , F_V/F_M , M_0 , V_j a V_i , S a H na vodnom potenciáli listu Ψ . Pre lepšiu porovnateľnosť meraných hodnôt sú všetky hodnoty normované na kontrolu, pričom ako kontrola bol zvolený čerstvý list. Hodnota fluorescenčného parametru F_V/F_M sa v dôsledku zasychania listu nezmenila takmer vôbec. Pokles hodnôt približne o 10 % sme zaznamenali u parametrov F_0 , V_j a V_i . Spomedzi fluorescenčných parametrov sa najviac znížila hodnota M_0 a to približne o 20 %. Naopak, hodnoty parametrov kolimovanej transmitancie reagovali na dehydratáciu omnoho skôr a vo väčšej miere. Rozsah zmeny kolimovanej transmitancie H ako aj rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie S klesla približne o 90 % vzhľadom na kontrolnú hodnotu.



Obr. 16 Závislosť percentuálnych zmien parametrov F_0 , F_V/F_M , M_0 , V_j a V_i , S a H na vodnom potenciáli listu Ψ . Všetky hodnoty sú normované na kontrolu

Na obr. 17 vidíme závislosť percentuálnych zmien parametrov F_0 , F_V/F_M , M_0 , V_j a V_i , S a H na relatívnom obsahu vody v liste RWC . Pre lepšiu porovnateľnosť meraných hodnôt sú všetky hodnoty normované na kontrolu, pričom ako kontrola bol opäť zvolený čerstvý list. Hodnota fluorescenčného parametru F_V/F_M sa v dôsledku

zasychania listu nezmenila takmer vôbec. Hodnoty zvyšných vyhodnocovaných fluorescenčných parametrov oscilujú okolo počiatočnej hodnoty a nemožno u nich pozorovať žiadny trend v závislosti na hodnote relatívneho obsahu vody v liste RWC v nami pozorovanom rozsahu hodnôt relatívneho obsahu vody v liste RWC . Hodnoty parametrov kolimovanej transmitancie reagovali na dehydratáciu už od počiatočnej hodnoty. Rozsah zmeny kolimovanej transmitancie H ako aj rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie S klesla približne o 90 % vzhľadom na počiatok. Priebehy kriviek na obr. 16 a 17 sa kvalitatívne zhodujú.



Obr. 17 Závislosť percentuálnych zmien parametrov F_0 , F_v/F_m , M_0 , V_j a V_i , S a H na relatívnom obsahu vody v liste RWC . Všetky hodnoty sú normované na kontrolu

6. Diskusia

Naše výsledky ukazujú, že zasychanie listu tabaku má vplyv na pohyb chloroplastov. S postupným zasychaním listu tabaku klesá spolu s rozsahom zmeny kolimovanej transmitancie H aj rýchlosť zmeny kolimovanej transmitancie S . Avšak narozdiel od Frolca a kol. (2010) a Řebíčka (2009), ktorí uvádzajú, že teplotný stres má vplyv najskôr na zníženie rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie a až neskôr dôjde ku zmenšeniu rozsahu zmeny kolimovanej transmitancie, naše merania ukazujú, že hodnoty parametrov rozsahu zmeny kolimovanej transmitancie H , ako aj rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie S reagujú na vodný stres listov tabaku približne rovnako citlivo. Podľa Wadu (2013) sa chloroplasty v rastline *Arabidopsis thaliana* pohybujú vďaka chloroplastovým aktínovým filamentom. Śniegowska-Świerk a kol. (2015) zistili, že vplyvom dehydratácie dochádza v liste jačmeňa k zoslabeniu pohybu chloroplastov v centre bunky a aktínové filamenty sa organizujú do kratších oblúkov. Zníženie rozsahu a rýchlosti pohybu chloroplastov v listoch tabaku v dôsledku dehydratácie by teda mohlo byť ovplyvnené zanikajúcimi aktínovými filamentami, prípadne aj ich organizáciou do kratších oblúkov, kedy nemusia byť jednotlivé chloroplasty schopné dostatočného rozsahu pohybu.

Metóda kolimovanej transmitancie sa v porovnaní s metódou rýchlej fluorescencie ukázala ako citlivejšia pre posúdenie vodného stavu listu tabaku približne do nami sledovaných hodnôt vodného potenciálu listu $\Psi = -1,6$ MPa a relatívneho obsahu vody v liste $RWC = 68,39$ %. Naše výsledky sa približne zhodujú s údajom, ktorý uvádza Herák (2011) a to, že nedostatok vody nemá priamy účinok na činnosť reakčných centier PSII približne do úrovne 25 – 30 % dehydratácie listov. Rýchla fluorescencia odráža stav a prípadné zmeny činnosti reakčných centier PSII rastliny. Nauš a kol. (2008) zistili, že pohyb chloroplastov je regulovaný lokálne a nezávisle od systémových signálov v rastline, a že je nezávislý na činnosti reakčných centier PSII rastliny. Je preto možné, že pohyb chloroplastov a činnosť reakčných centier PSII vykazujú rôznu toleranciu voči dehydratácii listu. Hodnoty parametrov rýchlej fluorescencie boli dehydratáciou listu tabaku ovplyvnené len málo. Hodnoty parametru F_V/F_M boli podľa obr. 16 a 17 ku vodnému stresu listov tabaku necitlivé. Na obr. 8 vidíme, že dosiahnutie najväčšieho stresu z nedostatku vody malo v listoch tabaku za následok zníženie kriviek OJIP. Vodný stres v tomto rozsahu by teda mohol mať vplyv

napríklad na zníženie rýchlosti práce komplexu vyvíjajúceho kyslík (OEC) ako ukázali Lazár a kol. (1997). Celkovo sa ale činnosť reakčných centier PSII ukázala ako odolná voči nedostatku vody v nami sledovanom rozsahu hodnôt vodného stresu listov tabaku (obr. 12 a 13), zatiaľ čo (obr. 11, 13 a 15) hodnoty parametrov rozsahu a rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie reagovali práve v tomto rozsahu stresu veľmi citlivo. Únikový pohyb chloroplastov zabezpečuje ochranu proti fotoinhibícii fotosystému PSII (Davis a Hangarter, 2012). Naše výsledky ukazujú, že približne na úrovni vodného stresu, ktorý má za následok výrazné zníženie pohybu chloroplastov sa začína prejavovať aj zhoršenie činnosti reakčných centier PSII. Je teda možné, že by sa oddialením inhibície pohybu chloroplastov v dôsledku vodného stresu mohlo dosiahnuť aj oddialenie zhoršenia činnosti reakčných centier PSII.

7. Záver

V tejto práci sa nám podarilo overiť, že zasychanie listu tabaku má vplyv na pohyb chloroplastov. Zistili sme, že parametre rozsahu zmeny kolimovanej transmitancie, ako aj rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie, sú veľmi citlivé na vodný stres a s postupným zasychaním listu klesajú parametre rozsahu aj rýchlosti zmeny kolimovanej transmitancie. Metóda kolimovanej transmitancie preto predstavuje veľmi dobrý prostriedok na meranie vodného stavu v listoch tabaku virginského v nami sledovanom rozsahu vodného stresu. Zároveň sme ukázali, že reakcie parametrov charakterizujúcich stav a činnosť reakčných centier PSII na vodný stres boli slabé a nepozorovali sme u nich žiadny trend zmeny v nami pozorovanom rozsahu vodného stresu. Meranie rýchleho fluorescenčného indukčného javu preto neposkytuje presnú informáciu o vodnom stave listu v nami skúmanom rozsahu vodného stresu.

8. Zoznam použitej literatúry

- Augustynowicz J, Gabryś H** (1999) Chloroplast movements in fern leaves: correlation of movement dynamics and environmental flexibility of the species. *Plant, Cell and Environment* **22**, 1239-1248
- Banaś AK, Aggarwal Ch, Łabuz J, Sztatelman O, Gabryś H** (2012) Blue light signalling in chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany* **63**, 1559-1574
- Berg R, Königer M, Schjeide BM, Dikmak G, Koher S, Harris GC** (2006) A simple low-cost microcontroller-based photometric instrument for monitoring chloroplast movement. *Photosynthesis Research* **87**, 303-311
- Boyer JS** (1995) Measuring the water status of plants and soils. *Academic press*, 178
- Davis PA, Hangarter RP** (2012) Chloroplast movement provides photoprotection to plants by redistributing PSII damage within leaves. *Photosynthesis Research* **112**, 153-16
- DeBlasio SL, Luesse DL, Hangarter RP** (2005) A Plant-Specific Protein Essential for Blue-Light-Induced Chloroplast Movements. *Plant Physiology* **139**, 101-114
- DeBlasio SL, Mullen JL, Luesse DR, Hangarter RP** (2003) Phytochrome Modulation of Blue Light-Induced Chloroplast Movements in Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**, 1471-1479
- FluorPen FP 100 Series - Operational Manual. [online] Publikované 08/2014 [citované 2015-05-14]. Dostupné z: <http://www.psi.cz/download/document/manuals/fluorpen/FluorPen_Series_Manual.pdf>
- Frolec J, Řebíček J, Lazár D, Nauš J** (2010) Impact of two different types of heat stress on chloroplast movement and fluorescence signal of tobacco leaves. *Plant Cell Reports* **29**, 705-714

- Glosová M** (2010) Vliv světelných podmínek a teplotního stresu na aktivaci antioxidantních mechanismů u *Solanum lycopersicum*. *Diplomová práce, UP Olomouc*
- Herák T** (2011) Hodnotenie účinku stimulačného preparátu na rast, fyziologické parametre a suchovzdornosť plodín. *Diplomová práca, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*
- Ilík P, Schansker G, Kotabová E, Váczi P, Strasser RJ, Barták M** (2006) A dip in the chlorophyll fluorescence induction at 0.2–2 s in *Trebouxia*-possessing lichens reflects a fast reoxidation of photosystem I. A comparison with higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1757**, 12-20
- Lazár D** (1999) Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1412**, 1-28
- Lazár D, Nauš J, Matoušková , Flašarová M** (1997) Mathematical modeling of changes in chlorophyll fluorescence induction caused by herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **57**, 200-210
- Kagawa T, Wada M** (2002) Blue Light-Induced Chloroplast Relocation. *Plant and Cell Physiology* **43(4)**, 367-371
- Königer M, Bollinger N** (2012) Chloroplast movement behavior varies widely among species and does not correlate with high light stress tolerance. *Planta* **236**, 411-426
- Nauš J, Husičková A** (2013) Změna světelného pole pod listem při pohybu chloroplastů. *13. Konference experimentální biologie rostlin Košice (SK)*, 2013-09-09 / 2013-09-13, Přírodovědecká fakulta UPJŠ v Košiciach, Domacia konferencia. ISBN 978-80-8152-032-7
- Nauš J, Prokopová J, Řebíček J, Špundová M** (2010) SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynthesis Research* **105**, 265-271

- Nauš J, 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
- Procházka S a kol.** (1998) *Fyziologie rostlin*. Praha: Academie, 1998, 484 s. ISBN: 80-200-0586-2
- Rolencová M** (2008) Teoretické a experimentální studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem světla různé úrovně a lokálního stresu. *Diplomová práce, UP Olomouc*
- Řebíček J** (2009) Studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem globálního abiotického a biotického stresu. *Diplomová práce, UP Olomouc*
- Sato Y, Kadota A, Wada M** (1999) Mechanically Induced Avoidance Response of Chloroplasts in Fern Protonemal Cells. *Plant Physiology* **121**, 37-44
- Sato Y, Wada M, Kadota A** (2003) Accumulation response of chloroplasts induced by mechanical stimulation in bryophyte cells. *Planta* **216**, 772-777
- Soukupová J, Roháček K** (2005) Fluorescence, fotosyntéza a stres: Jak to spolu souvisí?. *Projekt Otevřená věda, praktický kurz biologie* Nové Hrady (CZ), 2005-08-07 / 2005-08-12, Ústav molekulární biologie rostlin AV ČR, Domácí konference
- 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
- Suetsugu N, Dolja VV, Wada M** (2010) Why have chloroplasts developed a unique motility system? *Plant Signaling & Behavior* **5:10**, 1190-1196
- Śniegowska-Świerk K, Dubas E, Rapacz M** (2015) Drought-induced changes in the actin cytoskeleton of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, **37**, 73

- Takagi S** (2002) Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells. *The Journal of Experimental Biology* **206**, 1963-1969
- Trojan A, Gabryś H** (1996) Chloroplast Distribution in *Arabidopsis thaliana* (L.) Depends on Light Conditions during Growth. *Plant Physiology* **111**, 419-425
- Wada M** (2013) Chloroplast movement. *Plant Science* **210**, 177-182
- Wada M, Kagawa T, Sato Y** (2003) Chloroplast Movement. *Annual Review of Plant Biology* **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
- Williams WE, Gorton HL, Witiak SM** (2003) Chloroplast movements in the field. *Plant, Cell and Environment* **26**, 2005-2014
- Zhang FJ, Zhang KK, Du ChZ, Li J, Xing YX, Yang LT, Li YR** (2015) Effect of Drought Stress on Anatomical Structure and Chloroplast Ultrastructure in Leaves of Sugarcane. *Sugar Tech* **17(1)**, 41-48