

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

CENTRUM REGIONU HANÁ PRO BIOTECHNOLOGICKÝ A ZEMĚDĚLSKÝ VÝZKUM



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Sledování elektrické, fotosyntetické i chemické reakce rostlin rajčete
na lokální poškození současně s vlivem *meta*-topolinu a jeho nového
derivátu na tuto reakci**

Vypracovala: Tereza Schlattauerová

Studijní program: B1701 – Fyzika

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D, která mi umožnila pracovat na tomto tématu. Děkuji za obětavost a čas, který mi věnovala při všech měřeních, za poskytnuté konzultace a rady do studia. Bez jejího vstřícného a motivujícího přístupu bych tuto bakalářskou práci nebyla schopna dokončit. Dále děkuji konzultantům RNDr. Petru Šmídovi, Ph.D a RNDr. Daliborovi Horvátovi, Ph.D za konzultace nejistot.

Děkuji Mgr. Karlu Doležalovi Dr. za přípravu arabinosidu, roztoku tohoto hormonu, roztoku *meta*-topolinu a poskytnutou literaturu. Dále děkuji doc. Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za změření a analýzu endogenní koncentrace rostlinných hormonů ve vzorcích a paní laborantce Haně Martinkové za extrakci a purifikaci odebraných vzorků pro tuto analýzu.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mi poskytla prostředky, abych mohla na univerzitě studovat, děkuji za její podporu a oporu po celou dobu mého studia. Také bych chtěla poděkovat svému příteli za motivaci a neuhasínající víru v mé schopnosti.

Také chci poděkovat všem, kteří mi poskytli pomoc při studiu a to především Mgr. Marku Jirušovi za konzultace při vytváření programu a Mgr. Pavle Šretrové za diskuze problematik, rady a studijní materiály.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením
Mgr. Vladimíry Nožkové, Ph.D a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne.....

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Tereza Schlattauerová
Název práce:	Sledování elektrické, fotosyntetické i chemické reakce rostlin rajčete na lokální poškození současně s vlivem <i>meta</i> -topolinu a jeho nového derivátu na tuto reakci
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra biofyziky, Přírodovědecká fakulta, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D
Rok obhajoby práce:	2020

Abstrakt:

Ačkoliv byly v posledních desetiletích systémové odpovědi rostlin intenzivně studovány, mnoho tíživých otázek zůstává stále nezodpovězených. Tahle práce se zaměřuje na neinvazivní popis systémových odpovědí rostlin rajčete (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Moneymaker) na lokální popálení po externí aplikaci cytokininu (*meta*-topolin) a jeho nového derivátu (3OHBAPA). Systémová odpověď byla popsána pomocí dvou neinvazivních biofyzikálních metod, měřením výměny plynů a povrchových elektrických potenciálů. Zmíněné biofyzikální metody byly podpořeny destruktivními chemickými analýzami koncentrací endogenních stresových hormonů (jasmonáty a kyselina abscisová KAB) v nepoškozených lístcích. Naše výsledky ukázaly, že všechny varianty rostlin reagují na lokální popálení rychlým ($s - min.$) a významným poklesem výměny plynů (rychlost asimilace CO_2 a transpirace, stomatální vodivost, intercelulární koncentrace CO_2), generováním elektrického signálu a akumulací jasmonátů a ABA v nedotčených systémových lístcích. Ačkoliv měla externí aplikace *mT* pozitivní efekt na obnovu parametrů výměny plynů po lokálním popálení, 3OHBAPA evokoval nárůst míry otevřenosti průduchů, transpirace a maximálního kvantového výtěžku PSII (na světle, F_v'/F_M') v nestresovaných rostlinách. Pokud jde o elektrické signály, pak externí aplikace 3OHBAPA přispěla k nejvyšším amplitudám signálu po popálení, nicméně rychlost signálu byla nejpomalejší. Tato práce demonstruje vysokou citlivost rajčat na lokální popálení a jejich schopnost rozlišit zanedbatelné strukturální změny v hormonálních molekulách, co se projevilo rozdílným metabolismem a jejich efektem v rostlině.

Klíčová slova:	abiotický stres, arabinosid 3OHBAPA, LI-6400, lokální poškození, <i>meta</i> -topolin, měření elektrických signálů, měření <i>in vivo</i> , neinvazivní měření, rostlina rajčete, systémová odpověď,
Počet stran:	46
Počet příloh:	3
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Tereza Schlattauerová
Title of thesis: Monitoring of electrical, photosynthetic and chemical response of tomato plants to local wounding with an effect of meta-topolin and its new derivate on the response.
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Biophysics, Faculty of Science, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University, Olomouc
Supervisor: Mgr. Vladimíra Nožková, Ph.D
The year of defence: 2020

Abstract:

Although systemic responses of plants to local wounding is intensively studied during past decades, many concerned questions are still unresolved. This work was focused on a non-invasive monitoring of systemic response of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Moneymaker) to local burning after external application of cytokinin (*meta*-topolin) and its new prepared derivative (3OHBAPA). The systemic response was described by two non-invasive biophysical methods, i.e. gas exchange and surface electrical potential measurements. The biophysical methods were supplemented by destructive chemical analysis of endogenous concentrations of stressed hormones (jasmonates and abscisic acid, ABA) in measured leaves. Our results revealed that all variants of plants react to local burning by a rapid (s – min) and pronounced decrease in gas exchange (rate of CO₂ assimilation and transpiration, stomatal conductance, intercelular CO₂ concentration), generation of electrical signal and accumulation of jasmonates and ABA in systemic unaffected leaflets. While externally applied *mT* acts positively on gas exchange parameters regeneration after local burning, 3OHBAPA evoked an increase in stomata opening, transpiration rate and maximal quantum yield of PSII (on light, F_V'/F_M') in unaffected plants. Regarding electrical signalling, external application of 3OHBAPA contributed to the highest amplitudes of the signal upon burning, although the speed of the signal was the lowest. Presented work demonstrates a high sensitivity of tomato plants to local burning and its ability to distinguish negligible structural changes in hormone molecules, which is expressed in their different metabolism and action in the plant.

Key words: abiotic stres, arabinosid 3OHBAPA, electric signals measuring, *in vivo* measuring, LI-6400, non-invazive measuring, local wounding, *meta*-topolin, systemic response, tomato plant

Number of pages: 46
Number of attachments: 3
Language: Czech

Seznam zkratek:

ABA	kyselina abscisová
AP	akční potenciál
BAP	6-benzylaminopurin
CRH	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
<i>cis</i> -OPDA	<i>cis</i> -12-oxofytodienová kyselina
CK	cytokinin
DMSO	dimethylsulfoxid
E	elektroda
ES	elektrický signál
F_V/F_M	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosytému 2 pro vzorek adaptovaný na tmu
F_V'/F_M'	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosytému 2 pro vzorek adaptovaný na světlo
GK	gazometrická komůrka
HS	hydraulický signál
CHS	chemický signál
JA	kyselina jasmonová
JA-Ile	jasmonoyl-L-isoleucin
LRR	Laboratoř růstových regulátorů
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
Přf	Přírodovědecká fakulta
PSII	fotosystém 2
ROS	reaktivní formy kyslíku (z ang. „reactive oxygen species“)
SLO	Společná laboratoř optiky
UPOL	Univerzita Palackého v Olomouci
VP	variační potenciál
3MeOBAPA	6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurin (Kučerová a kol. 2020, v rec. říz.)
3OHBAPA	6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurin (Kučerová a kol. 2020, v rec. říz.)

Seznam veličin

A rychlost asimilace CO_2 [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]

c koncentrace [$\text{pmol}\cdot\text{g}^{-1}$]

C_i intercelulární koncentrace CO_2 [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$]

E rychlost transpirace [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]

g_s stomatální vodivost pro vodní páru [$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]

R_H relativní vlhkost vzduchu [%]

t čas [min.]

T teplota [$^{\circ}\text{C}$]

v rychlost [$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$]

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY	2
2.1. LOKÁLNÍ A SYSTÉMOVÁ ODEZVA ROSTLIN A STRES	2
2.2. FYZIKÁLNÍ SIGNÁLY	2
2.3 ELEKTRICKÉ SIGNÁLY	3
2.3.1 Generace a propagace elektrických signálů.....	4
2.3.2 Klasifikace elektrických signálů	5
2.3.3 Měření elektrických signálů.....	7
2.3.4 Elektrické signály, změny ve fotosyntetických veličinách a výměně plynů po lokálním poškození	8
2.4 CHEMICKÉ SIGNÁLNÍ MOLEKULY	9
2.4.1 Rostlinné stresové hormony.....	10
2.5 CYTOKININY	11
2.5.1 Základní klasifikace a působení cytokininů při stresových reakcích	11
2.5.2 Deriváty cytokininů	13
3. CÍLE PRÁCE.....	14
4. MATERIÁL A METODY.....	15
4.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL	15
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A POMŮCKY	16
4.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	16
4.3.1 Gazometrický systém LI – 6400	16
4.3.2 Aparatura pro detekci elektrických signálů	17
4.4 PŘÍPRAVA ROSTLIN RAJČETE K MĚŘENÍ A PROCES PÁLENÍ.....	18
4.5 PRŮBĚH EXPERIMENTU	21
4.6 ZPRACOVÁNÍ DAT	22
4.6.1 Gazometrické veličiny a fluorescenční parametr.....	22
4.6.2 Elektrické signály	22
4.6.3 Stanovení endogenní hladiny stresových hormonů	25
4.6.4 Nejistoty a statistické zpracování	26
5. VÝSLEDKY	27

5.1 GAZOMETRICKÉ VELIČINY A FLUORESCENCE CHLOROFYLU A.....	27
5.2 ELEKTRICKÉ SIGNÁLY.....	35
5.3 CHEMICKÉ SIGNÁLY.....	37
6. DISKUZE	39
7. ZÁVĚR	43
8. SEZNAM LITERATURY.....	44

Přílohy:

PŘÍLOHA A: ŠUM APARATURY PRO MĚŘENÍ ELEKTRICKÝCH SIGNÁLŮ

PŘÍLOHA B: VÝMĚNA BATERIE/AUTOBATERIE U LI-6400

PŘÍLOHA C: APLIKACE NA ÚPRAVU DAT

1. Úvod

Většina rostlin jsou přisedlé organismy, tedy celý život setrvávají na jednom místě, a proto se nemohou proti stresorům bránit útekem jako živočichové. Aby byly rostliny schopny čelit různým stresorům, byly u nich vyvinuty důmyslné fyziologické, molekulární a signální mechanismy, které jim pomáhají v této životní strategii přežít. Tyto mechanismy stále nejsou podrobně objasněny a nad jejich implikacemi vzájemných interakcí je doposud mnoho otazníků.

Odpovědi rostlin na stresové faktory se často měří na jednotlivých buňkách, pletivech či oddělených listech. Takové měření je zatíženo mnoha artefakty a není jej možné aplikovat v zemědělství, protože systém není zkoumán jako celek a reakce intaktních rostlin může být a často je dosti odlišná. Majorita takového výzkumu využívá destruktivních metodik, kdy získaná data jsou superpozicí určité zkoumané stresové reakce a stresových reakcí spojených s měřicí aparaturou či invazivní přípravou měřeného vzorku. Z tohoto důvodu v této práci aplikujeme nedestruktivní měřicí aparatury na celé rostliny *in-vivo*. Přestože je takové měření technicky náročnější a vyžaduje přístrojové vybavení a znalosti napříč přírodovědnými obory, získaná data nám dávají nezkrácený pohled na stresovou reakci rostliny jako celku a jsou podstatně blíže k možné aplikaci v zemědělské praxi.

V práci se zabýváme jen zlomkem studia signálních cest u rostlin po vystavení lokálnímu stresu, tj. biofyzikální odpovědi rostliny rajčete na popálení. Detekujeme změny v generaci a šíření elektrických signálů, změny ve výměně plynů a ve fotosyntetických veličinách. Biofyzikální měření je doplněno o detekci rostlinných stresových hormonů (jasmonáty a ABA) v měřených listech. V neposlední řadě studujeme efekt *meta*-topolinu a jeho nově nasyntetizovaného derivátu na výše uvedené stresové reakce. Nadstandardně se v práci zabýváme také technickými parametry použitých měřících aparatur a prezentujeme nově vyvinutou aplikaci pro ulehčení zpracovávání rozsáhlých datových řad získaných z měření elektrických signálů.

2. Přehled problematiky

2.1. Lokální a systémová odezva rostlin a stres

Reakce rostliny na stres v místě poškození se nazývá lokální reakcí/odezvou. Obranné reakce je možné detekovat i v místech, kde rostlina nebyla poškozena, a to i na velkou vzdálenost od místa poškození. Takové obranné reakce se označují jako systémová odezva (Hlaváčková 2009). Odezvy rostlin na poškození, a to lokální i systémové, jsou často funkčně propojeny. Lokální odezva bývá rychlejší a spouští pomalejší systémovou odezvu.

V práci byl zvolen abiotický stres, který je způsoben neživými faktory prostředí, konkrétně popálením. Stres popálením byl zvolen z důvodu intenzivní obranné reakce rostliny (např. vyvolává všechny typy elektrických signálů) a možnosti přesně lokalizovat a definovat rozsah stresového působení (opakovatelnost). Navíc, oheň je významným stresorem v přírodním prostředí, který v některých ekosystémech má i užitečnou a nezastupitelnou funkci

Obecně můžeme signální cesty rostlin dělit podle jejich charakteristických kritérií. Pro naše účely rozdělujeme signální cesty na chemické (měřitelnou veličinou je koncentrace chemických molekul), na fyzikální (viz kapitola 2.2) a na signály, které jsou tvořené kombinací již zmíněných chemických a fyzikálních signálů (Hlaváčková 2009).

2.2. Fyzikální signály

Fyzikálními signály u rostlin rozumíme postupně šířící se měřitelnou změnu fyzikální veličiny. U rostlin můžeme mluvit např. o změně v její elektrické aktivitě (tj. napětí na buněčných membránách) nebo o tlakových změnách (hydraulické signály) uvnitř rostliny.

Hydraulické signály (dále jen HS) mají nezastupitelnou roli v rychlých systémových odezvách rostlin na abiotický stres, přesto jsou doposud nedostatečně probádané. Přestože v této práci HS neměříme považujeme za důležité zde uvést jejich stručnou charakteristiku. HS úzce souvisí s elektrickými signály (Mancuso 1999), kterým se věnujeme v následujících kapitolách (viz kapitola 3). Termín „hydraulický signál“ je nejednoznačný a je používán pro popis jak změn turgorového tlaku, xylémového toku tak tlakových vln v apoplastu, symplastu a cévních svazcích (Nožková a kol. 2020, v rec. říz.). Tyto signály patří mezi důležité regulační mechanismy rostlin.

Mají vliv na změny fotosyntézy, transpiraci a produkci ABA (Sukhov a kol. 2019). Předpokládá se, že hrají významnou roli v komunikaci mezi podzemními a nadzemními částmi rostlin. Dále je známo, že pomáhají regulovat otevřenost rostlinných průduchů (Galle a kol. 2015).

2.3 Elektrické signály

Je všeobecně známo, že na buněčných membránách v roztoku můžeme naměřit malé hodnoty elektrického napětí (dále jen napětí). To je způsobeno tím, že na jednotlivých stranách membrány jsou odlišné hodnoty elektrických potenciálů (dále jen potenciálů), kdy rozdíl potenciálů je definovaný jako napětí¹ (Záhejský 2002). V práci občas používáme termín „potenciál“, ale pouze z důvodu zachování konzistentnosti tohoto textu s literaturou. Pojem „elektrický signál“ (dále jen ES) se u rostlin používá pro popis jejich elektrické aktivity, která je spojena se změnou membránového potenciálu (Hlaváčková 2009). Výstižnou definici ES přináší Sukhov a kol. (2019), kdy ES popisují jako přechodné změny gradientu elektrického potenciálu napříč plasmatickou membránou.

Elektrická signalizace byla blíže popsána již v 19. století u masožravé rostliny *Dionaea muscipula* L. Burdon-Sandersonem (1873), který zavření její pasti přisuzoval šíření akčního potenciálu (dále jen AP) generovaného při opakovaném podráždění sensorických chloupků hmyzem. Následovala léta výzkumu doprovázeného střídavými útlumy a nevolí vědecké komunity nad důvěrohodností rostlinné elektrofyziologie. Počátky výzkumu se zaměřovaly na tzv. senzitivní rostliny s viditelnou reakcí např. *Dionaea muscipula* L. a *Mimosa pudica* L. kdy byla sledována jejich elektrická reakce např. po ustříhnutí lístků, popálení, přiložení kostky ledu na list, či doteku kovových předmětů listu apod. (např. Houwink 1935; Pickard 1973). až Wildon a kol. (1992) definitivně prolomili pochybnosti oponentů rostlinné elektrofyziologie publikací v časopise *Nature*. Byl prokázán totiž přímý vliv elektrických signálů na akumulaci stresových proteinů *pin* v rostlinách rajčete při inhibici floémové translokace. Dnes se studiu ES v rostlinách zabývá obor elektrofyziologie rostlin, který se v posledních letech začal nazývat i jako „elektromika rostlin“ (Loof 2016).

¹ V biologické literatuře se velmi často setkáváme s terminologicky chybným označením membránový potenciál.

2.3.1 Generace a propagace elektrických signálů

Přes bohatou historii studia těchto signálů není doposud jejich původ zcela zřejmý. Existuje několik hypotéz vzniku ES. Stanković a kol. (1997) a Mancuso (1999) ve své práci uvádí hypotézu, že jeden z typů ES (variační potenciál, dále jen VP) je důsledkem HS. Diskutují, že šíření HS xylémem po popálení má za následek místní změny v aktivitě mechano-senzitivních kanálků podél jeho dráhy, které způsobí indukci ES. Opírají se o fakta, že šíření VP nesplňuje podmínku zákona „vše nebo nic“ a jeho amplituda a rychlost klesá se vzdáleností podobně jako u HS. Mancuso (1999) uvádí, že před detekcí VP bylo pozorováno rychlé nepatrné zúžení stonku u *Vitis vinifera* L. a poté jeho nepatrné rozšíření, kdy tento úkaz interpretuje jako procházející hydraulickou vlnu. Při pohledu na výsledky je tato interpretace ovšem diskutabilní, protože se zdá, že ke změnám průměru stonku (které jsou velmi malé) dochází již se změnami ES. Nožková a kol. (2020, v rec. říz.) detekovali bezkontaktně hydraulickou vlnu u *Nicotiana tabacum* L. pomocí optické aparatury využívající jev Fresnelovy difrakce vyvinuté na Přf UPOL (více o aparatuře v Nožková a kol. 2018) a současně také elektrickou aktivitu. Jejich výsledky prokazují, že ES není vyvolaný HS, protože ES předcházet deformaci stonku, a to i přes to, že detekční systém HS byl umístěn blíže popálenému místu než elektroda pro detekci ES.

Další hypotézou vzniku ES je prostřednictvím chemického signálu (dále jen CHS), který je přenášený v cévních svazcích. CHS (konkrétně ligandy) jsou uvolňovány z poraněné oblasti a stimulují iontové kanály či pumpy v membránách okolních buněk, to způsobí změnu toku iontů přes membránu a následnou změnu membránového potenciálu (Malone 1996, Sambeek a Pickard 1976). Rychlost floémového transportu se obvykle pohybuje v rozmezí 50 až 100 cm·h⁻¹ (Canny 1975). Koziolok a kol. (2003) a Lautner a kol. (2005) zaznamenali změnu elektrické aktivity mnohem dříve, než se mohl do místa teoreticky dostat CHS a indukovat ES.

Další hypotéza o vzniku ES je kombinace výše zmíněných hypotéz, o níž uvažuje ve své práci Malone (1993). Po zranění rostliny dojde v daném místě k uvolnění chemikálií (CHS), které jsou bazipetálně a akropetálně transportovány xylémem pomocí hydraulické vlny (tzv. „hydraulická disperze“). Dále Vodeneev a kol. (2012) uvádí, že po poškození vzniká chemická substance (CHS), jejíž přenos je zprostředkován

pomocí turbulentní difúze v xylému². Přenos látky pomocí turbulentní difúze nevyžaduje fyzické přemísťování vody, není ani nutně spojen se směrem proudu vody v xylému a její rychlost se zvyšuje po poškození.

Z výše uvedených faktů vyplývá, že v generaci i transportu elektrických signálů hrají nezastupitelnou roli cévní svazky. Zmíněné hypotézy vzniku ES obvykle souvisely s tokem látek v xylému, (Hlaváčková 2009, Koziolok a kol. 2003, Malone 1993, Malone 1996, Mancuso 1999, Sambeek a Pickard 1976, Stanković a kol. 1997, Vodeneev a kol. 2018) jež se skládá z mrtvých buněk a rozvádí po rostlině vodu a minerální látky. ES se však mohou šířit i druhým typem vodivého pletiva, floémem (Gallé a kol. 2015, Fromm a kol. 2013, Hedrich a kol. 2016, Lautner a kol. 2005, Nožková a kol. 2020 v rec. říz.), který se na rozdíl od xylému skládá z živých buněk a všesměrně rozvádí po rostlině produkty fotosyntézy. Posledním možným způsobem šíření ES je přes plazmodesmata (Gallé a kol. 2015). Tento způsob šíření je možný pouze na krátké vzdálenosti, kdy šíření ES přes plazmodesmata bylo popsáno u rostlinných druhů jako např. *Mimosa pudica* L, a *Zea Mays* L. (Fromm a Lautner 2006).

2.3.2 Klasifikace elektrických signálů

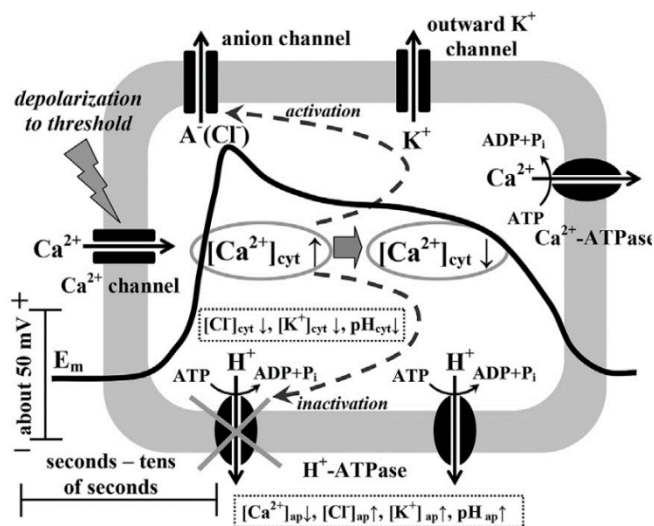
Možností klasifikace ES je mnoho, toto odvětví se neustále dynamicky vyvíjí a vědci přicházejí s novými typy signálů. V této práci představíme pouze základní typy ES, které souvisí s našimi výsledky nebo je považujeme za důležité.

Akční potenciál (AP)

AP je charakterizován jako krátkodobá nerovnováha (detekce píku) v membránovém napětí (trvajícím od jednotek po desítky sekund), který se řídí zákonem „vše nebo nic“. To znamená, že pokud hodnota klidového membránového napětí klesne pod určitou hraniční hodnotu, dojde ke generaci AP s maximální amplitudou. Je popisován jako samostatně „elektrogenně“ se šířící ES s konstantní rychlostí (nejčastěji $0,1-10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) a amplitudou. Jeho šíření je měřeno zejména v živých buňkách floému a vzniká obvykle po aplikaci méně invazivních podnětů, např. elektrická stimulace, změny osvětlení, tepelný šok, dotek apod. (Hedrich a kol. 2016, Hlaváčková 2009, Suškov a kol. 2019, Toledo a kol. 2019, Vodeneev a kol. 2012).

² Toto označení je z důvodu, že turbulentní složka pro cévy tvoří majoritní příspěvek difúze, zatímco molekulární složka minoritní.

Skládá se ze dvou fází, a to rychlé depolarizace způsobené vtokem Ca^{2+} do cytoplasmy, který iniciuje výtok Cl^- z buňky. Depolarizace způsobí výtok K^+ a často nastává částečná hyperpolarizace, Ca^{2+} iniciují přítok Cl^- z vakuoly do cytoplasmy (repolarizace). Poté jsou Ca^{2+} pomocí pump přesunuty do apoplastu a tím je obnoveno klidové napětí na membráně. Schéma generace AP je uvedeno na obrázku č. 1.

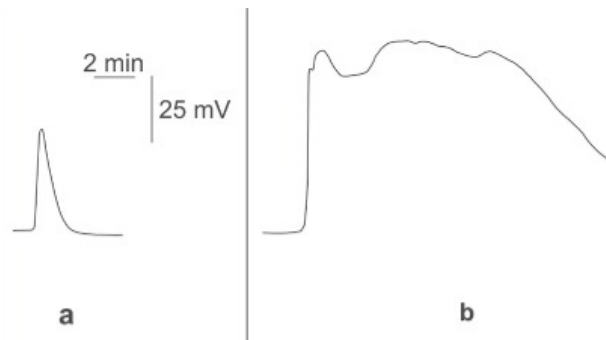


Obr. 1: Schéma generace AP ve vaskulárních svazcích vyšších rostlin. E_m , elektrické napětí na membráně; A, anion Cl^- ; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ap}}$, koncentrace Ca^{2+} v cytoplasmě a apoplastu; $[\text{Cl}^-]_{\text{cyt}}$ a $[\text{Cl}^-]_{\text{ap}}$, koncentrace Cl^- v cytoplasmě a apoplastu; $[\text{K}^+]_{\text{cyt}}$ a $[\text{K}^+]_{\text{ap}}$, koncentrace K^+ v cytoplasmě a apoplastu; pH_{cyt} a pH_{ap} , pH v cytoplasmě a apoplastu. Převzato ze Sukhov a kol. (2019).

Variační potenciál (VP)

VP se na rozdíl od AP neřídí zákonem „vše nebo nic“ a jeho původ je stále předmětem výzkumu (fyzikální, chemický či kombinace viz kap. 3.2). Má dlouhou dobu trvání (minuty, desítky minut a více), nešíří se s konstantní amplitudou, která klesá se vzdáleností od poraněného místa. Tvar VP je zcela odlišný od AP (viz obrázek 2). Vzniká po silných invazivních podnětech biotického (např. požer listu býložravcem) i abiotického původu (popálení, mechanické poranění, působení vysoké teploty atd.). Rychlost šíření se udává mezi $0,02 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ až $2 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, je pomalejší než AP a rychlost klesá ve vzdálenosti od místa poranění. VP jsou přítomné pouze u vyšších rostlin, šíří se i podél mrtvých pletiv xylému (Hlaváčková a kol. 2006, Mancuso 1999, Sukhov a kol. 2019, Vodeneev a kol. 2012).

Depolarizace VP je způsobená stejným mechanismem jako u AP. Repolarizace je oproti AP pomalá a pravděpodobně odráží přechodnou inaktivaci H^+ pump na membráně buňky (Hlaváčková 2009, Vodeneev a kol. 2015).



Obr. 2: Elektrické signály v sazenici dýně vyvolané různými podmínkami. (a) znázorňuje průběh akčního potenciálu (AP) indukovaného ledovou vodou, (b) značí průběh variačního potenciálu (VP) indukovaného popálením lístku. Převzato z Vodeneev a kol. 2015.

Lokální a systémový potenciál

Lokální signál je generovaný při stimulech jako změny teploty, vodního stavu, vlhkosti, záření, koncentrace živin, fytohormonů a při patogenní infekci (Sukhova a kol. 2017). Amplituda lokálního potenciálu je závislá od intenzity a trvání stimulu (neplatí zákon „vše nebo nic“), signál je pravděpodobně generován přechodnou inaktivací H^+ – ATPázy, zatím je ale velmi málo probádán (Toledo a kol. 2019).

Systémový potenciál je posledním elektrickým signálem v rostlinách, který zde zmíníme. Jedná se o šířící se hyperpolarizaci na membráně, kdy mnoho stresorů mohou indukovat jak systémový potenciál, tak i AP/VP (Zimmermann a kol. 2009). Systémový potenciál se ale šíří i do míst, kde AP či VP neproniknou. Je pravděpodobné, že systémový potenciál je indukován variačním potenciálem, který vzniká po destruktivních stimulech. Šíření a samotný vznik systémového potenciálu závisí na místě působení stimulu (Sukhov a kol. 2019). Tento signál není generován s konstantní amplitudou, tedy neplatí zákon „vše nebo nic“.

2.3.3 Měření elektrických signálů

Měření elektrických signálů je založeno na diferenčním modu. Na rostlinu se umísťují elektrody a referenční elektroda. Referenční elektroda představuje napětí, vůči kterému se měří (nulové napětí, zem). Signály jsou velmi malé a rušení způsobené elektromagnetickým polem může být pro měření fatální, proto se tyto signály měří ve Faradayově kleci. Faradayova klec slouží pro odstínění záření, které má výrazně vyšší vlnovou délku, než je velikost otvorů klece.

Existuje několik přístupů měření ES. Prvním přístupem je měření na povrchu rostliny pomocí povrchových neinvazivních, kdy toto měření je založeno na detekci sumy

celkové bioelektrické aktivity velké skupiny buněk. (Ilík a kol. 2010). Ovšem signál detekovaný na povrchu rostliny nemusí být totožný (např. velikostí amplitudy či polaritou) se signálem uvnitř rostlinných pletiv a buněk. Výhodou ovšem zůstává, že takové měření je neinvazivní. Pro detekci elektrických signálů přímo v buňkách lze použít invazivních mikroelektrod (např. Grams a kol. 2007, Kaiser a kol. 2006, Koziolok a kol. 2004, Lautner a kol. 2005). Nejs sofistikovanejší metodou je měření přímo ve floémových buňkách pomocí styletu (sosáku) mšic. Po přísátí je mikroelektroda napojena na laserem odříznutý stylet mšice (Lautner a kol. 2005). Výhodou tohoto přístupu je detekce reálných napětí na buňkách floému, nevýhodou, že může dojít k ovlivnění v místě vpichu sosáku. Další zajímavou realizací měření je práce Hedricha a kol. (2016), kde také využili mšici, která se sosákem napíchla do floému, elektrodu však umístili na abdomen (zadeček) mšice.

2.3.4 Elektrické signály, změny ve fotosyntetických veličinách a výměně plynů po lokálním poškození

Po vystavení rostliny stresovému faktoru se ES podílí na regulaci i tak významného procesu jako je fotosyntéza. Jednotlivé typy signálů mohou ovlivnit fotosyntézu jinak, např. u rostliny *Zea mays* L. VP indukoval snížení *A* zatímco AP nikoliv (Fromm a kol. 2013). Vodeneev a kol. (2018) přišli s myšlenkou, že ovlivnění fotosyntézy u sazenic *Pisum sativum* L. je závislé nejen na typu ES, ale i na parametrech signálu, které souvisí s použitým stimulem. U popálení a tepelného stresu zaznamenali progresivnější signál VP, který se šířil na větší vzdálenosti než VP indukovaný mechanickým poškozením. S tím by mohl souviset i fakt, kdy VP, který byl indukovaný popálením ale v jeho dráze byla část rostliny *Populus trichocarpa* L. chlazená vodou o teplotě 4 °C (nejspíše došlo k poklesu amplitudy VP) fotosyntézu neovlivnil (Lautner a kol. 2005). Grams a kol. (2007) ochlazovali část rostliny *Zea mays* L. ve směru šíření VP, kdy opět nedošlo k inhibici fotosyntézy. Jak uvádí Vodeneev a kol. (2018), amplituda VP nejspíše u těchto dvou zmíněných prací poklesla na úroveň, kdy už není schopna vyvolat fotosyntetickou reakci.

Stres popálením většinou indukuje elektrický signál, který je složený z více klasifikovaných typů ES (Stanković a kol. 1998)³. V mnoha pracích je uvedeno, že VP

³ Přesto ho většina autorů chybně pojmenovává jako VP, budeme se proto držet zavedené terminologie, abychom opět zachovali konzistentnost s literaturou.

indukovaný popálením či tepelným stresem ovlivnil fotosyntetické veličiny v listech, kde k stresu nedošlo. Poté, co byl ES detekován v měřeném listu, byl za několik sekund až minut pozorován přechodný pokles měřených veličin: např. asimilace CO_2 (A), intercelulární koncentrace CO_2 (C_i), maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (F_V/F_M), a stomatální vodivosti (g_s) (Fromm a Lautner 2007, Kaiser a kol. 2006, Koziolok a kol. 2004, Lautner a kol. 2005, Sukhov a kol. 2012). Velmi zajímavé výsledky pro stomatální vodivost jsou uvedené v pracích Kaiser a kol. (2006) a Koziolok a kol. (2004). U zafixovaných listů (bylo znemožněné jejich sklopení) rostliny *Mimosa pudica* L. se krátce po popálení stomatální vodivost zvýšila na několik sekund, následně byl zaznamenán prudký pokles hodnot. Koziolok a kol. (2004) uvádí, že ES se do místa detekce g_s dostal po 15 s po popálení a první změny g_s byly detekovány 40 s po popálení. Kaiser a kol. (2006) uvádí, že po popálení se ES do místa měření g_s dostal přibližně za 60 s, kdy 100 s po popálení byly detekovány změny g_s . Tento jev diskutují tak, že okamžité otevření průduchů je způsobeno hydropasivně (v důsledku ztráty turgoru okolních epidermálních buněk) a poté ES nejspíše indukuje jejich zavírání. Dále uvádí, že pokles je časově opožděn, protože průduchy nereagují na depolarizaci membránového potenciálu epidermálních buněk ale na signál šířící se skrz plasmodesmata (takový signál se šíří pomaleji).

2.4 Chemické signální molekuly

Jak již bylo v předchozím textu uvedeno, ES může být stimulován i chemicky, proto považujeme za důležité alespoň letmo zmínit tyto v současnosti diskutované signální molekuly. Mezi prvními zmíníme reaktivní formy kyslíku (dále jen ROS), které vznikají např. při tepelném stresu a stresu vyvolaném vysokou ozářeností (Gilroy a kol. 2016). Vlna ROS je šíří poměrně rychle, může dosahovat až rychlosti $0,14 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (Miller a kol. 2009). Šíření ROS je zprostředkováno pomocí oxidačního vzplanutí („burst“), které indukuje oxidáza homolog G, ta je aktivována v buňkách pomocí ES (Gilroy a kol. 2016). Je ale zajímavé i překvapující, že ROS, které jsou aktivovány teplotním stresem, mohou dále indukovat ES. Procházející vlna ROS aktivuje glutamátové receptory nebo jiné iontové kanálky, které indukují vznik ES. Další významnou signální molekulou je Ca^{2+} , jež je zapojená v širokém spektru fyziologických odpovědí na biotický a abiotický stres, změna membránového potenciálu aktivuje Ca^{2+} kanály a dochází tak k šíření Ca^{2+} signálu. (Nožková a kol. 2020, v rec. říz.). Mezi další

velmi diskutované molekuly v posledních letech patří glutamát (viz Toyota a kol. 2018) a systemin (viz Zhang a kol. 2020)

2.4.1 Rostlinné stresové hormony

Další velká skupina možných signálních molekul jsou rostlinné stresové hormony, např. kyselina abscisová a jasmonová. Kyselina abscisová (ABA) je důležitou signální molekulou zejména při abiotickém stresu suchem. Působí jak v místě stresu, tak i systémově (Hlaváčková 2009). Tato kyselina dokáže přímo regulovat stomatální vodivost (Acharya a kol. 2009), s čímž souvisí i regulace transpirace, asimilace CO₂ a intercelulární koncentrace CO₂. Mezi obsahem ABA a parametry výměny plynů byla zjištěna negativní korelace na systémovém listu po lokálním popálení (Hlavinka a kol. 2012). Navíc koncentrace ABA se mění v závislosti na uplynulou dobu od působení stresu. V práci Hlaváčkové a kol. (2006) měřili koncentraci ABA v systémové odpovědi na popálení listu *Nicotiana tabacum* L., kdy nejvyšší koncentraci zaznamenali 15 minut po popálení (jiného listu) a poté koncentrace klesla, v 60 minutách po popálení se téměř rovnala koncentraci, která byla detekována před popálením.

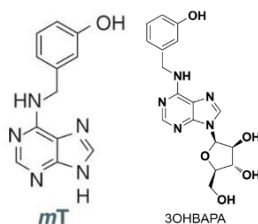
Kyselina jasmonová (JA) je další velmi důležitou signální molekulou, která hraje roli v odpovědi na biotický a abiotický stres. Je jednou z nejvýznamnějších signálních molekul v odpovědi rostliny na lokální poškození (Howe 2010). Prekurzory této kyseliny se označují *cis*-OPDA a aktivní formy JA-Ile Tato kyselina dokáže v rostlinách regulovat genovou expresi a obranné reakce na biotický i abiotický stres. Kyselina jasmonová má spojitost s ES, práce Farmer a kol. (2020) a Mousavi a kol. (2013) uvádí několik důkazů o tom, že VP indukuje syntézu JA. Ukázalo se, že JA má pouze částečný vliv na stomatální vodivost, protože působí společně s ABA (Herde a kol. 1997). V práci Hlavinka a kol. (2012) změřili po popálení značný nárůst obsahu JA (detekováno 85 minut po popálení) v popáleném lístku u všech měřených variant *Lycopersicon esculentum* L. (lokální reakce) i v nestresovaných lístcích (systémová reakce). Koncentrace akumulované JA je stabilnější po delší časový úsek než ABA, Nožková a kol. (2006) demonstrovali, že koncentrace JA v systémovém listu *Nicotiana tabacum* L. po popálení jiného listu začala prudce stoupat od 8. do 30. minuty po popálení, koncentrace ale vzrůstala až do konce měření (tj. 60 min. od popálení).

2.5 Cytokininy

2.5.1 Základní klasifikace a působení cytokininů při stresových reakcích

Tyto rostlinné hormony neřadíme primárně mezi hormony stresové, přesto značně rostliny ovlivňují a to tím, že regulují jejich růst a vývoj, ovlivňují diferenciaci a dělení buněk, mají anti-senescenční účinek a vliv na fotosyntézu (Špundová 2019). O cytokinech (dále jen CK) je také známo, že mají vliv na rostliny při působení různých abiotických stresů (Cortleven a kol. 2014). Z toho důvodu se domníváme, že CK jsou zahrnuty i v signálních cestách po aplikaci abiotického stresu. Doposud tato souvislost nebyla publikována. V bakalářské práci jsme se pokusili o pilotní experiment v této oblasti včetně bonusového otestování vlivu jednoho z nově nasynthetizovaných derivátů CK.

Přirozeně vyskytující se CK jsou deriváty adeninu, které v závislosti na konfiguraci postranního řetězce na N^6 pozici jsou rozděleny do dvou skupin: izoprenoidní a aromatické. CK označované izoprenoidní (např. zeatin, hydrozeatin) mají toto označení, protože nesou na N^6 pozici izoprenoidní postranní řetězec s jednoduchou či dvojnou vazbou. Aromatické CK (např. *ortho*-, *meta*-, *para*- topolin) mají na N^6 pozici aromatickou benzylovou či hydroxybenzylovou skupinu. Chemické vzorce CK báží, se kterými se v této práci setkáme, jsou uvedené na obrázku 3 (Doležal a Strnad 2017, Janečková 2018, Špundová 2019).



Obr. 3: Chemické vzorce CK báží a jeho nově nasynthetizovaného derivátu. Zleva: *mT* – *meta*-topolin (aromatický CK), 3OHBAPA – 6-(3-hydroxybenzylamino)-9-β-D-arabinofuranosylpurin (aromatický CK, derivát *mT*). Převzato z Doležal, Strnad (2017) (*mT*) a Kučerová (2020, v rec. říz.) (3OHBAPA).

CK použitý v této práci, *meta*-topolin – 6-(3-hydroxybenzylamino)purin patří mezi přirozeně se vyskytující aromatické CK (viz obrázek 3). Poprvé byl izolován z listů topolu, podle kterých je pojmenován (Strnad a kol., 1997). Jeho zastoupení v rostlinách je hojné, vyskytuje se od nejprimitivnějších řas po vyšší rostliny a má zde řadu fyziologických účinků včetně ochranných.

Byť nebyla dosud studována souvislost cytokininů se změnou membránového napětí, jejich ochranná funkce pro fotosyntetický aparát rostlin při aplikaci stresu je nasnadě. Velmi důležitá u CK je ochranná funkce pro PSII při vysokém ozáření, např. u *Arabidopsis thaliana* L. se sníženým množstvím CK byla zvýšená fotoinhibice PSII (pokles F_V/F_M) z důvodu poškození proteinu D1 v PSII (Cortleven a kol. 2014). Aplikace 0,2 μM *mT* do pěstebního média 4. týdenních *in vitro* sazenic jabloní zvýšila hodnoty intercelulární koncentrace CO_2 v listech sazenic jabloně Royal Gala oproti sazenicím jabloně Freedom (Dobrąnszky 2014). Také uvádí, že aplikace 0,6 i 0,2 μM *mT* způsobila nízké hodnoty stomatální vodivosti u obou druhů sazenic (pro koncentraci 0,6 μM *mT* uvádí hodnoty 0.0704 a 0.0711 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Závěr jejich práce poukázal, že ovlivnění sazenic záleželo jak na koncentraci CK, tak na typu sazenice (Royal Gala, Freedom). Rosa a kol. (2018) uvádí nepřímou úměru mezi koncentrací BAP (aplikovaného do kořenového media) a funkčnosti stomat (snímková metoda) u rostlin *Aechmea blanchetiana* L. Ke stejnému závěru také u rostlin *Aechmea blanchetiana* L. došli i Martins a kol. (2018). Dále uvádí, že BAP negativně působí na obsah chlorofylů, 120 dnů po aplikaci BAP byla naměřena nepřímá úměrnost mezi obsahem chlorofylů a koncentrací BAP. Zajímavá je i interakce mezi CK a patogenezí u odebraných listů *Lactuca sativa* L., které byly napadeny patogenní infekcí *Bremia lactucae* Regel a byly položeny adaxiální stranou na filtrační papír namořený v roztocích CK *mT* a BAP. U zdravých listů aplikace CK (*mT*, BAP) způsobila pokles F_V/F_M , zatímco u napadených listů CK zpomalil rozvoj patogenu a obnovil funkčnost fotosyntetického aparátu odrážející se v nárůstu F_V/F_M do podobných hodnot jako u zdravých listů (Prokopová a kol. 2010). Přestože se obecně uvádí, že CK mají pozitivní účinky na výměnu plynů a fotosyntézu z tohoto odstavce ovšem plyne následující závěr. Ne všechny CK mají pozitivní účinek u jednotlivých druhů rostlin, tedy přestože u jednoho rostlinného druhu daný CK měl pozitivní účinek tak u jiného rostlinného druhu jej mít nemusí a může mít i negativní dopad u tohoto druhu. Také u míry dopadu ovlivnění rostlin je velmi důležitá koncentrace daného CK.

Při vystavení rostliny vysoké teplotě dochází k poškození buněčných komponent (ROS) a denaturaci proteinů. CK zvyšují odolnost proti tepelnému stresu, důkazy nasvědčují i tomu, že se CK podílejí na adaptačních mechanismech tepelného stresu (Cortleven a kol. 2018). Zajímavé poznatky uvedli ve své práci Liu a kol. (2002), exogenní aplikace zeatin ribosidu do kořenového média *Agrostis palustris* L. vedla ke zvýšené koncentraci endogenního CK. Koncentrace 0,1 a 10 μM zeatin ribosidu

aplikovaného do kořenového média, vedla k nejefektivnějšímu anti-senescenčnímu účinku a nejefektivnější inhibici lipidové peroxidace při tepelném stresu.

2.5.2 Deriváty cytokininů

Kromě přirozeně se vyskytujících CK existuje velké množství uměle připravených (nasyntetizovaných) derivátů CK, které mají často odlišný mechanismus působení oproti CK. U derivátů CK je snahou nasyntetizovat takovou strukturu, která zajistí zachování ochranné funkce a anti-senescenčního účinku CK a současně bude maximálně potlačen negativní vliv aplikace na rostlinu. V této práci používáme jeden z nově nasyntetizovaných derivátů Oddělením chemické biologie a genetiky (CRH, PřF UPOL). Jedná se o arabinosid aromatického CK *meta*-topolinu – *mT* o strukturním vzorci 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurin (3OHBAPA, viz obrázek 3). Ačkoliv je zatím známo velmi málo o možné signální a ochranné funkci CK arabinosidů při stresu rostlin, pilotní studie již byly provedeny v souvislosti s rostlinnou senescencí. Oddělené listy *Arabidopsis thaliana* L., které byly 6 dnů ponořeny adaxiální stranou listů v roztoku arabinosidu 6-(3-methoxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (dále jen 3MeOBAPA) (10 μ M + 0.1% DMSO) měly vyšší hodnotu maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII (F_V/F_M) než listy v ponořené roztoku s 3OHBAPA (10 μ M + 0.1% DMSO) a nebo v roztoku s BAP (10 μ M + 0.1% DMSO). Zatímco listy *Triticum aestivum* L., které byly ponořeny adaxiální stranou v roztoku s 3OHBAPA (1 μ M + 0,1% DMSO; 10 μ M + 0,1% DMSO) měly vyšší hodnotu F_V/F_M oproti listům ponořených v roztoku s 3MeOBAPA (1 μ M + 0,1% DMSO; 10 μ M + 0,1% DMSO) a BAP (1 μ M + 0,1% DMSO; 10 μ M + 0,1% DMSO). V listech *Triticum aestivum* L. v roztoku 3OHBAPA (10 μ M + 0,1% DMSO) byl naměřen vyšší obsah chlorofylu než u listů v roztoku s 3MeOBAPA (10 μ M + 0,1% DMSO) a BAP (10 μ M + 0,1% DMSO). Také produkce etylenu (stimuluje senescenci) byla nižší u listů *Triticum aestivum* L. i *Arabidopsis thaliana* L. ponořených v roztoku s 3OHBAPA (10 μ M + 0,1% DMSO) oproti roztoku s 3MeOBAPA (10 μ M + 0,1% DMSO) a BAP (10 μ M + 0,1% DMSO) (Bryksová a kol. 2020, Kučerová a kol. 2020 v rec. říz.).

Uvedené anti-senescenční a ochranné funkce arabinosidů si zaslouží větší pozornost včetně jejich působení při abiotickém stresu. Bude důležité (ale o to složitější) studium mechanismů a jejich působení v podmínkách *in-vivo* a na kulturně významných plodinách, aby mohl být zúročen jejich možný potenciál aplikace do zemědělské praxe.

3. Cíle práce

- Vypracování rešerše o (1) elektrických a souvisejících chemických signálních cestách v rostlinách po vystavení abiotickému stresu a (2) stručná charakteristika cytokininů, jejich derivátů a působení při abiotickém stresu.
- Zvládnutí metod měření (1) povrchových elektrických signálů, (2) gazometrických parametrů na intaktních listech rostliny rajčete. (3) Odběr listů rajčete pro stanovení endogenní koncentrace stresových hormonů.
- Zvládnutí vlastního experimentu: Současné neinvazivní měření elektrických, gazometrických i fluorescenčních parametrů na intaktním lístku rostliny rajčete po popálení lístku vedlejšího.
- Naměřená a získaná data vyhodnotit v programu Origin a statisticky zpracovat.
- Interpretace výsledků v souvislosti s literaturou. Elektrické, gazometrické a chemické parametry změřené po lokálním popálení a po aplikaci různých zálivek konfrontovat mezi sebou a diskutovat s dostupnou literaturou.

4. Materiál a Metody

4.1 Rostlinný materiál

Měření bylo provedeno na biologickém materiálu rostliny rajčete *Lycopersicon esculentum* L. cv. Moneymaker. Rostliny rajčete byly po celou dobu růstu umístěny ve fytofotoarce AR-100L3 (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA) v definovaných podmínkách: 21 °C, RH 60%, 16 h světlo (100 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR)/ 8 h tma. Rostliny rajčete byly pěstovány ze semen v kompostové půdě po dobu 7 týdnů.

Výsadbový substrát byl sterilizován při teplotě 75 °C po dobu 40 minut. Po zchlazení substrátu bylo v květináči zasazeno 50 semen. Mezi 2. a 3. týdnem byly rostliny rozsazeny do samostatných květináčů, které byly předtím i s výsadbovým substrátem sterilizovány (75 °C, 40 minut) a zchlazeny. Pro rozsazení byly vybrány sazenice s podobným vzrůstem. Rostliny rajčete byly 1× týdně hnojeny (hnojivem Kristalon Start) a zalévány 2× týdně. Pro měření byly vybrány zdravé rostliny rajčat s podobným vzrůstem (obrázek 4).



Obr. 4: Reprezentativní rostlina rajčete (7 týdnů) vybraná pro měření experimentu. Vzrůst nadzemní části rostlin se pohyboval okolo 15 cm.

4.2 Použité chemikálie a pomůcky

Tab. 1: Chemikálie potřebné pro experiment

název chemikálie	zkratka chemikálie	koncentrace
dimethylsulfoxid	DMSO	0,1 %
<i>meta</i> -topolin	<i>mT</i>	10 μ M
<i>meta</i> -topolinový arabinosid	3OHBAPA	10 μ M
ethanol	-	96 %
natronové vápno	-	100 %
síran vápenatý	-	100 %

Pro experiment byly potřebné chemikálie uvedené v tabulce 1. Mezi dalšími použitými pomůckami byly laboratorní stojan s příslušenstvím, pravítko, zapalovač, pipeta, špičky, kuchyňské špejle, injekční stříkačka, alobal, izolepa, PVC trubka, stopky, 2 skleněné mřížky a otočné mechanické laboratorní klouby vypůjčené z optické laboratoře (SLO, PřF UPOL).

4.3 Použité přístroje

4.3.1 Gazometrický systém LI – 6400

Pro měření fotosyntetických parametrů a výměny plynů byl použitý přístroj LI - 6400 (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, U.S.A.) s externí tlakovou lahví CO₂, listovou komůrkou s fluorometrem LCF a chemikáliemi ve vysoušečích: CaO/NaOH⁴ a CaSO₄⁵. Vysoušeče slouží k regulaci koncentrace CO₂ a vlhkosti vzduchu v měřící komůrce.

Před zapnutím přístroje byly každé ráno vyměněny chemikálie ve vysoušečích za nové. Po výměně a zapnutí byl přístroj zkalibrován. K napájení LI – 6400 byly použity originální baterie (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, U.S.A.) a autobaterie (Shorai Inc., California, U.S.A.) z důvodu eliminace šumu při napájení ze sítě. Napájení přístroje LI – 6400 pomocí baterií a autobaterie je problematické v tom, že přístroj má velký příkon a během měření může dojít k poklesu napětí pod kritickou hodnotu, v tomto momentě je potřeba baterii/autobaterii vyměnit. Po připojení docházelo ke krátkodobému nárůstu tzv. špičkového proudu, který způsobil (0,5-1 minuty) rapidní umělý nárůst

⁴ Chemikálie slouží k zachycení CO₂ ze vzduchu.

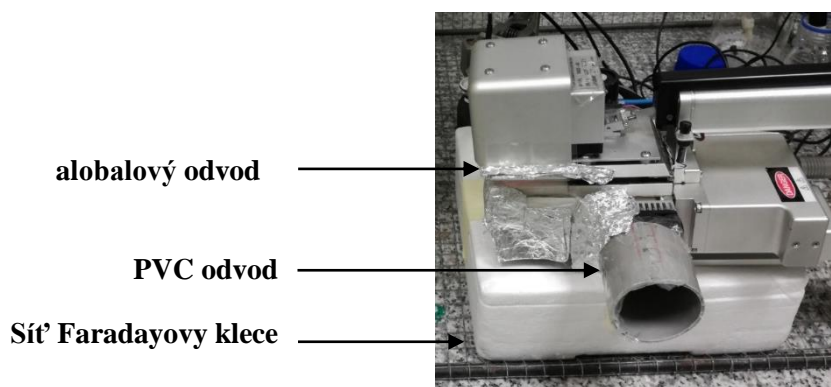
⁵ Chemikálie slouží k zachycení vlhkosti ze vzduchu

amplitudy dat, názorně pozorovatelné například u g_s , příloha B. Tyto hodnoty byly klasifikovány jako hrubé chyby měřidla, a byly ze souboru dat vyloučeny.

V měřicí komůrce byly nastaveny následující hodnoty parametrů: koncentrace CO_2 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, teplota $21 \text{ }^\circ\text{C}$, relativní vlhkost 60 %, stomatální koeficient 0, intenzita světla $350 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, rychlost toku vzduchu $250 \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$. Nastavení parametrů světla pro fluorescenční měření vzorku adaptovaného na světlo bylo následující: měřicí světlo – Intenzita 5, Frekvence 20 kHz, Filtr 1, Zesílení 10; saturační pulz – Typ Obdélníkový, Doba 0.8 s, Intenzita 8, Frekvence 20 kHz, Filtr 50, Tmavý pulz – Trvání 6 s, Intenzita 8, Frekvence 0.25 kHz, Filtr 1 Hz.

Před vlastním měřením byl list vložen do gazometrické komůrky (dále jen GK) a byl stabilizován na podmínky v komůrce, dokud měřené hodnoty nedosáhly ustáleného stavu. Poté bylo spuštěno vlastní měření, které trvalo 65 minut a interval vzorkování byl 20 s. Byly měřeny hodnoty rychlosti asimilace CO_2 (A), stomatální vodivosti pro vodní páru (g_s), intercelulární koncentrace CO_2 (C_i), rychlosti transpirace (E) a maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII pro vzorek adaptovaný na světlo (F_V'/F_M').

Součástí měřicí hlavy jsou ventilátory sloužící pro její chlazení. Vzduch, který z těchto ventilátorů proudil uhasínal plamen (stresor), z toho důvodu byla měřicí hlava doplněna o ručně vyrobené odvody vzduchu z PVC trubky, alobalu a izolepy, aby byl proud vzduchu odkloněn a odveden mimo plamen (znázorněno na obrázku 5).



Obr. 5: Měřicí hlava přístroje LI - 6400 s odvodovým systémem proudu vzduchu z ventilátorů (PVC trubka, drážky z alobalu a izolepy) umístěná ve Faradayově kleci na polystyrenové podložce.

4.3.2 Aparatura pro detekci elektrických signálů

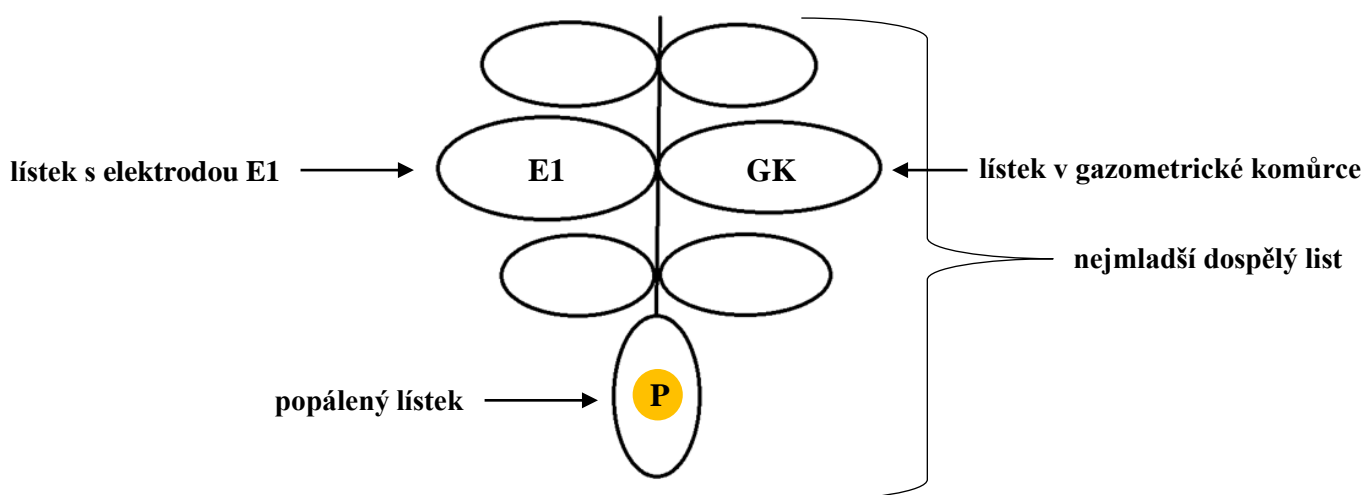
Pro měření elektrických signálů byla použita čtyřkanálová aparatura pro detekci elektrických signálů vyrobená v laboratoři Biofyziky (Ilík et al. 2010). Povrchové elektrody Ag/AgCl (Scanlab Systems, Prague, Czech Republic) byly vodivě spojeny s adaxiální stranou listu pomocí EKG gelu (HELLADA, Prague, Czech Republic)

a referenční elektroda byla umístěna v podmisce květináče naplněné vodou do 1 cm výšky. Po připojení měřících elektrod na list a ustálení signálu (cca 15 minut), bylo spuštěno vlastní měření, které trvalo 70 minut s intervalem vzorkování 30 ms.

4.4 Příprava rostlin rajčete k měření a proces pálení

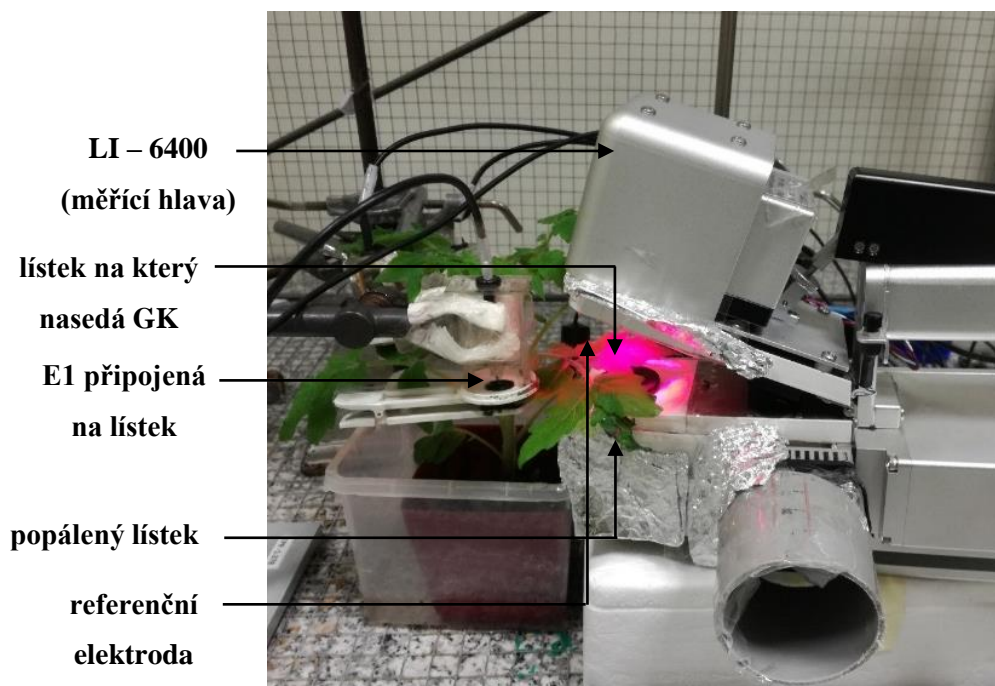
Den před vlastním měřením bylo vybráno 5 stejně starých (7 týdnů) rostlin rajčete s podobným vzrůstem, vitalitou a stavbou listů. Rajčata byla rozříděna do několika skupin podle zálivky (50 ml) s různými chemickými látkami, tj.: voda (z vodovodního řadu) DMSO (0,1%), *mT* (10 μ M + 0.1% DMSO) a 3OHBAPA (10 μ M + 0.1% DMSO). Po zalití odpovídajícím roztokem podle označení byly rostliny rajčete vráceny do fytokomory.

Následující den byla vybrána jedna z připravených rostlin rajčat. V laboratoři byl květináč s měřenou rostlinou rajčete položen do podmisky s vodou (vodní sloupec přibližně 1 cm) umístěnou ve Faradayově kleci. Do podmisky byla následně ponořena referenční elektroda, aby bylo zajištěno vodivé spojení s kořeny. Nejmladší dospělý list (první od shora) byl neinvazivně umístěn do gazometrické komůrky s již nastavenými parametry. Gazometrická komůrka byla vždy umístěna na druhý lístek vpravo od vrcholového lístku rostliny rajčete podle obrázku 6. Přestože většina podmínek (T , R_H) v listové komůrce byla navolena stejně jako ve fytokomoře, list vložený do GK byl stabilizován na podmínky v komůrce po dobu cca 15 min. Po vložení daného lístku do měřící GK byla na protistojný lístek umístěna měřící elektroda E1.



Obr. 6: Schematicky znázorněné uspořádání měřících metod pro nejmladší dospělý list rajčete. Na obrázku je vyznačeno umístění měřící gazometrické komůrky (GK) a měřící elektrody (E1) a místo popálení rajčete plamenem P na vrcholovém lístku.

Bylo potřeba elektrodu E1 a list rostliny rajčete dobře vodivě spojit pomocí EKG gelu. Vrstva gelu byla okolo 3 mm vysoká, protože během měření gel vysychá a mohlo by dojít ke ztrátě kontaktu mezi elektrodou a listem. Elektroda byla umístěna nad hlavním cévním svazkem listu, protože elektrický signál by měl být na cévních svazcích dobře detekovatelný. Realizace umístění elektrody a měřící GK na rostlinu rajčete je na obrázku 7.

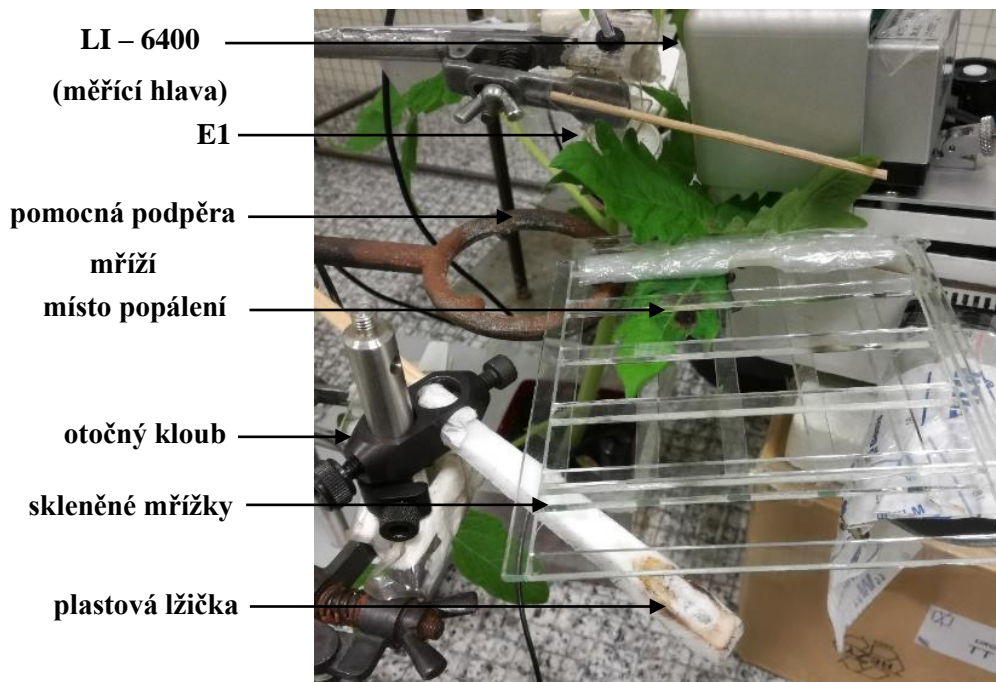


Obr. 7: Rostlina rajčete umístěná ve Faradayově kleci s připojenou elektrodou E1 a otevřenou gazometrickou komůrkou. Fotografie byla pořízena po dokončení měření a odstranění skleněných mříží a stojanu s plastovou lžičkou na otočném kloubu. Na obrázku je znázorněná podmiska, ve které je umístěn květináč a zezadu referenční elektroda (viditelná jen část).

Také bylo třeba zajistit, aby se listy rostliny rajčete nedotýkaly kovových částí gazometrické měřící hlavy a laboratorních stojanů ve Faradayově kleci, či samotné Faradayovy klece, protože by došlo k nechtěnému uzemnění. Možným řešením při dotyku listů rajčete kovových částí bylo vložení kousku kuchyňského ubrousku mezi dotýkající se místa. Vnitřní části GK byly oblepeny lepicí páskou, taktéž byly oblepeny odvody vzduchu z alobalu. Po celou dobu připojování měřících komponent na listy rostliny rajčete bylo třeba velmi opatrné a pomalé manipulace, aby nedošlo k poškození listů, či jinému poškození rostliny, které by mohlo ovlivnit následující měření. Celá příprava rostliny k měření trvala 20 – 40 minut.

Popalován byl vrcholový lístek nejmladšího dospělého listu, který nesl elektrodu E1 a současně i GK (obrázek 8). Lístek, který byl chystán k popálení byl opatrně položen na skleněnou mřížku, kde byl poté fixován pomocí shora přiložené druhé skleněné mřížky

(tzv. „sendvič“ uspořádání). Díky této fixaci bylo možné zajistit konstantní vertikální vzdálenost mezi zdrojem plamene a místem popálení (11 mm). Abychom zajistili, že poškození, které vzniklo po popálení plamenem, bylo reprodukovatelné, byl vyvinut vlastní popalovací aparát, skládající se z (1) lžičky z nehořlavého plastu, která se mohla pohybovat pod připraveným listem v horizontálním směru pomocí otočného kloubu a (2) držáků zapůjčených z optické laboratoře (SLO, PřF UPOL). Před vlastním popálením bylo na lžičku napipetováno 50 μ l etanolu, který byl zapálen (v odklonu od listu) a lžička byla poté otočena pomocí otočného kloubu na definované místo pod listem, špejlí byla zajištěna zarážka pro lžičku. Objem ethanolu zajistil dostatečnou dobu života plamene, tj. přibližně 25 s. Stopkami bylo odměřeno působení plamene na vrcholový lístek po dobu 15 s, poté byl plamen od lístku oddálen. Místo popálení bylo vybráno v polovině hlavního cévního svazku vrcholového lístku (z důvodu dobrého šíření ES). Přestože plamen byl aplikován pouze na vrcholový lístek, byly špejlí nejbližší lístky rostliny rajčete odkloněny, aby nedošlo k teplotnímu stresu. Takto bylo zajištěno definované působení stresu co do intenzity, délky a místa působení u každé popálené rostliny rajčete. Detailní foto tohoto uspořádání je uvedeno na obrázku 8.



Obr. 8: Detail experimentálního uspořádání nejmladšího dospělého listu s jeho fixací pomocí skleněných mřížek ve Faradayově kleci. Na obrázku je znázorněna plastová lžička, do které byl pipetován ethanol, po jeho zapálení pomocí otočného kloubu byla lžička otočena pod místo určené k popálení, kdy po uplynutí 15 s byla zpět oddálena od listu.

4.5 Průběh experimentu

Po kontrole funkčnosti a stabilizace elektrody E1 a listu v GK (15 – 30 minut) bylo zapnuto současně měření jak elektrických signálů, tak i gazometrických parametrů. Zhruba po 1,5 minutě měření byla změřena ustálená hodnota maximálního kvantového výtěžku pro vzorek adaptovaný na světlo (F_V'/F_M'). Půl minuty před vlastním popalováním byl pipetován ethanol na lžičku, zapálen a otočen na definované místo pod listem. Popálení probíhalo 15 s v 5. minutě po spuštění měření, okamžik popálení byl pro obě metody přesně zaznamenán. Po 15 s byla lžička s dohasínajícím plamenem otočena zpět mimo působení na rostlinu rajčete. Měření pokračovalo zhruba 60 minut po popálení.

Po dokončení měření byla znovu změřena hodnota F_V'/F_M' pro vzorek adaptovaný na světlo. Z rostliny rajčete byla sejmuta elektroda, GK a rostlina byla odnesena do laboratoře s laboratorními váhami. Listy, na kterých byla umístěna elektroda, GK i popálený list, byly ustříhnuty a zváženy. Dále byly změřeny jednotlivé vzdálenosti mezi E1 a místem popálení, aby posléze byla dopočitatelná rychlost šíření ES signálů. Ustřížené listy byly vloženy do alobalu a ihned zamraženy v tekutém dusíku a poté umístěné do hlubokomrazícího boxu (-80°C).

V souvislosti s experimentem byly změřeny na návrh autorky BP doplňující technické informace ohledně aparatury pro měření elektrických signálů. Z důvodu obtížné manipulace s plamenem, byla Faradayova klec během měření otevřena, což vyžadovalo prověření případné změny hodnoty šumu aparatury v otevřené kleci. Byly změřeny hodnoty klidového signálu rostliny rajčete po připojení elektrod E1 – E4 po dobu 1 minuty se zavřenou Faradayovou klecí. Dále byly změřeny hodnoty klidového signálu rostliny rajčete po dobu 1 minuty s otevřenou Faradayovou klecí⁶. V poslední řadě byly změřeny hodnoty klidového signálu detekovaného elektrodami E1 – E4 rostliny rajčete po vložení protistojného lístku vůči elektrodě E1 rajčete do GK s otevřenou Faradayovou klecí⁶ (data a komentáře k nim jsou uvedené v příloze A).

⁶ Nedošlo k žádné manipulaci s elektrodami připojených na lístky rostliny rajčete.

4.6 Zpracování dat

4.6.1 Gazometrické veličiny a fluorescenční parametr

Získaná data veličin A , E , C_i , g_s byly normovány vůči hodnotám v okamžiku popálení. Normování bylo provedeno z důvodu, že u některých rostlin rajčete hodnoty veličin v ustáleném stavu před popálením měly jiný ofset a porovnávání v grafické podobě by bylo obtížné. Z nenormovaných ustálených pěti hodnot parametru před popálením byly vypočteny průměrné hodnoty veličin A , E , C_i , g_s pro jednotlivé rostliny s danou zálivkou (voda, DMSO, mT a 3OHBAPA) a poté byl z průměrů jednoho typu zálivky (např. A (voda - 1), A (voda - 2), A (voda - 3), A (voda - 4)) vypočten průměr z těchto čtyřech hodnot charakterizující konkrétní typ zálivky, zde A (voda). Z celého souboru normovaných parametrů A , E , C_i , g_s byly vypočteny průměrné hodnoty pro jednotlivé zálivky. Data, která byla naměřena po výměně baterie/autobaterie byla ze souboru vyloučena a průměrné hodnoty byly v těchto intervalech počítány z menšího souboru dat. Intervaly, které byly ze souboru vyloučeny jsou znatelné v průměrných grafech s nejistotami, kdy dochází k nárůstu nejistot a jejich odskoku.

Byly vypočteny mediány a kvartily maximálního kvantového výtěžku fotochemie PSII u vzorku adaptovaného na světlo (F_V'/F_M') v čase $t = 1,5$ min. (před popálením) a $t = 65$ min (60 minut po popálení).

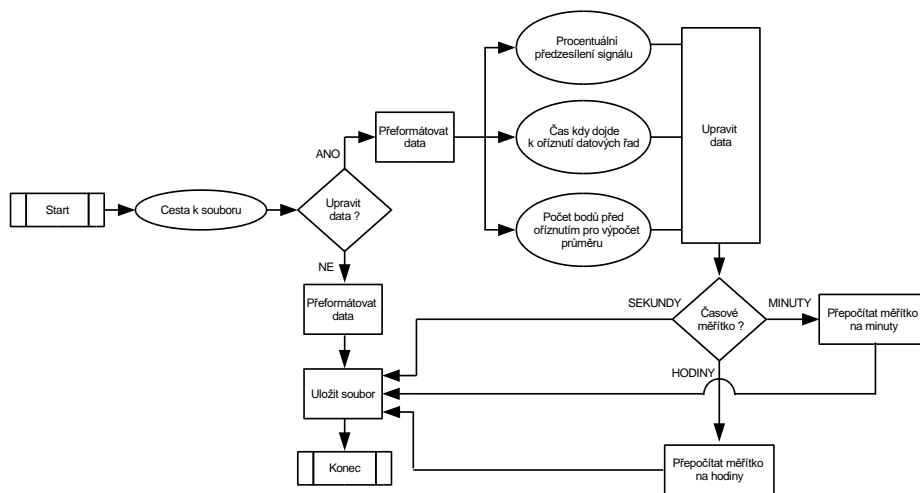
4.6.2 Elektrické signály

Aparatura pro měření elektrických signálů je ovládaná pomocí programu ScopeWin (Tedia, Czech Republic), z něhož jsou data ukládána do textového souboru s komplikovaným datovým formátem, to často způsobuje obtíže a časovou náročnost při zpracování dat. Z tohoto důvodu byla naprogramována aplikace v LabVIEW (National Instruments, U.S.A), která původní textové soubory převede na čitelnější datový formát zpracovatelný běžnými tabulkovými procesory.

V závislosti na vzorkovací frekvenci a délce měření můžeme pracovat s malým či velkým množstvím dat (pro naše měření měla jedna datová řada cca 140 000 hodnot). Pro vyhodnocení je potřeba od celé datové řady odečíst tzv. ofset, protože měříme v diferenčním módu, jelikož ruční nastavení nulového ofsetu (např. pomocí potenciometrů) je téměř nemožné. Mezi další úpravy patří ořezání začátku datové řady⁷

⁷ Aparatura se spouští zpravidla s časovým předstihem, aby během této doby mohlo dojít ke kontrole funkčnosti elektrod

a případný přepočítání časové osy na minuty či hodiny. Nejstěžejnějším krokem je pak přepočítání amplitudy signálu. Detekce malých napětí (mV) je obtížná, a proto je součástí měřicího zařízení předzesilovač. Z tohoto důvodu je potřeba přepočítat zesílené amplitudy na hodnoty, které byly reálně detekovány elektrodou. Zmíněné úpravy jsou běžně proveditelné ve většině programů na zpracování textu a datových řad. Nicméně z důvodu jejich časové náročnosti a repetitivní povahy byl vytvořen autorkou BP specializovaný program. Funkční schéma aplikace je uvedeno na obrázku 9 a uživatelský panel aplikace je uveden na obrázku 10.



Obr. 9: Funkční schéma aplikace na úpravu dat.

Následující popis slouží jako manuál k aplikaci, číselné a písmenné označení souhlasí s obrázkem 10. Po spuštění aplikace je nejprve důležité zvolit cestu k souboru (1). Nově vygenerovaný textový soubor bude mít stejné umístění, jeho název je ale pozměněn (původnínázevsouboru_EDIT.txt). Původní soubor je tedy zachován beze změny. Dále uživatel volí – (2), zda chce pouze přeformátovat textový soubor (= *neupravovat data*) nebo po přeformátování i data upravit (= *upravovat data*). Pokud uživatel chce soubor pouze přeformátovat, tak po tomto kroku zvolí krok RUN (7). Pokud uživatel zvolí v druhém kroku *upravovat data*, je třeba vyplnit další informace, které budou použity při výpočtech. V kolonce (3) je třeba zadat hodnotu předzesilovače. UPOZORNĚNÍ: je nutné měřit se stejným zesílením pro jednotlivé kanály, pokud uživatel nastaví potenciometry rozdílné zesílení u kanálů (např. 40 × pro E1, 50 × pro E2) data nelze upravovat v této aplikaci. Dále uživatel vyplní (4) čas, kde dojde k ořezání souboru (hodnoty před zvoleným časem jsou smazány a časová osa začíná na hodnotě 0 s v bodě ořezání), pokud chceme před časem, kde například došlo ke stresu mít několik hodnot, tak čas (4) se vyplní např. o 1 minutu dříve. Dalším krokem (5) je vyplnění počtu hodnot, ze kterých před ořezáním je vypočten průměr, který je následně

odečten od ořezaných datových řad. Následně uživatel volí měřítko časové osy (6) a poté RUN (7). Pokud zadaný čas (4) neexistuje, je zaokrouhlen na nejbližší existující hodnotu. Uživatel je vyskakovacím oknem o zaokrouhlení informován a potvrdí jej pomocí tlačítka OK (8).

7

1 Cesta k souboru
3 Úroveň předzesilovače
4 Začátek stresu [s]
5 Počet bodů k průměrování
D Průměr 1 (ch 1)
 Průměr 2 (ch 2)
 Průměr 3 (ch 3)
 Průměr 4 (ch 4)
2 Neupravovat data--- Upravit data
6 Měřítko časové osy
8 Zadaný čas začátku stresu v datovém souboru neexistuje!
 Čas začátku stresu byl zaokrouhlen k nejbližší existující hodnotě - 168,990
A
B
C

Obr. 10: Uživatelský panel aplikace na úpravu dat. Pole 1-8 volí uživatel, A-D jsou vyplněny programem. 1 – značí cestu k souboru, 2 – výběr z dvou možností datových úprav aplikace: upravovat data, neupravovat data. 3 – úroveň předzesilovače, 4 – čas kde dojde k ořezání dat, 5 – počet bodů zvolených pro výpočet průměru, 6 – volba měřítka časové osy, 7 – spuštění úprav, 8 – informační okno o zaokrouhlení času vyplněného v 4. A – zobrazení dat použitých k výpočtu průměru, B – zobrazení původní datových řad, C – zobrazení datových řad po úpravách, D – informační hodnoty průměrů jednotlivých datových řad.

Samotný program aplikace pro úpravu dat je k nahlédnutí v příloze C, pro zájemce je kompletní program i s instalačním balíčkem poskytnut po kontaktování autorky BP.

Textové soubory byly jednotlivě nahrány do aplikace na úpravu dat. Hodnota zesílení byla nastavena na 40, počet bodů pro průměrování byl 100, čas začátku stresu byl zadán o 120 s dříve, než došlo k začátku popalování (aby bylo v datových řadách několik hodnot stabilizovaného stavu), časová osa byla nastavena na minuty.

Rychlost šíření ES byla vypočtena podle

$$v = \frac{d}{t_E}, \quad (1)$$

kde t_E značí čas, který trval od okamžiku popálení po detekování první změny elektrického signálu na elektrodě E1 a d je vzdálenost od místa popálení od elektrody E1.

4.6.3 Stanovení endogenní hladiny stresových hormonů

Extrakce, purifikace a kvantifikace studovaných hormonů v odebraných lístcích byla provedena v Laboratoři růstových regulátorů (LRR, Přf UPOL). Následující postup byl poskytnut Laboratoři růstových regulátorů (LRR, Přf UPOL). Vzorky byly homogenizovány v třecí misce a rozváženy po 10 mg čerstvé hmoty. Koncentrační hladiny fytohormonů byly stanoveny pomocí ultra – vysokoúčinné kapalinové chromatografie – tandemové hmotnostní spektrometrie (UHPLC – MS/MS) za použití vnitřních standardů značenými stabilními izotopy (Rittenberg a foster, 1940).

Endogenní hladiny jasmonátů (kyselina jasmonová JA, jasmonoyl-L-isoleucin JA-Ile, a kyselina *cis*-12-oxo-fytodienová *cis*-OPDA) a kyseliny abscisové (ABA) byly stanoveny v 10 mg rostlinného materiálu metodou popsanou ve Flokové a kol. (2014). Fytohormony byly extrahovány pomocí vodného roztoku methanolu (10%) a do každého vzorku byla přidána směs vnitřních standardů označených stabilními izotopy: 10 pmol [²H₆] JA, [²H₂] JA-Ile a [²H₆] ABA, 20 pmol [²H₅] OPDA (vše od Olchemim Ltd). Extrakty byly přečištěny pomocí kolon Oasis HLB (30 mg/1 ml, Waters) kondiciovanými 1 ml 100% methanolu a ekvilibrovanými 1 ml 0,1% HCOOH. Po nanesení vzorku byl sorbent promyt 1 ml 10% methanolu a analyty byly poté eluovány pomocí 3 ml 80% methanolu. Eluent obsahující neutrální a kyselé sloučeniny byl odpařen do sucha pod proudem dusíku a vzorky uloženy při – 20°C.

Před UHPLC-MS/MS analýzou byly vzorky rozpuštěny v 15% acetonitrilu (jasmonáty a ABA), přeneseny do chromatografických vialek a nastříknuty po 10 µl jednotlivých vzorků. Stanovení fytohormonů bylo provedeno pomocí systému Acquity UPLC® I-Class System

(Waters) propojeném s hmotnostním spektrometrem Xevo™ TQ-S MS (Waters) s využitím ionizace pomocí elektrospreje v pozitivním a negativním módu. Separace jasmonátů a ABA proběhla za optimalizovaných podmínek (Floková a kol., 2014) na koloně Acquity UPLC® CSH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm; Waters).

Stanovení uvedených hormonů bylo provedeno ve 3 – 5 nezávislých biologických opakováních. Ze získaných endogenních koncentrací JA, JA-Ile, *cis*-OPDA, a ABA byly vypočteny průměrné hodnoty a SD pro jednotlivé typy zálivek

4.6.4. Nejistoty a statistické zpracování

U dat gazometrického systému LI-6400 (uvedené v obrázcích 11 – 18) byly k průměrům vypočteny nejistoty typu A, které byly korigovány na Studentovo rozdělení o stupni volnosti 3, případně 2 (v závislosti na počtu měření). Rozšíření bylo provedeno, aby konfidenční interval odpovídal 95 % pomocí koeficientu $k = 2,353$ (stupeň volnosti 3) a $k = 2,920$ (stupeň volnosti 2). Pro gazometrické veličiny před popálením, rychlosti šíření ES a pro CHS byly vypočteny nejistoty typu A s Gaussovým rozdělením o konfidenčním intervalu 68,3 % pro $n = 3 - 4$ (z důvodu statistických testů).

Nejistoty typu A, které jsou vypočteny podle základních vzorců udávají v konfidenčním intervalu 68,3 % pravděpodobnost výskytu pravé hodnoty pro $n \leq 10$. Ovšem pro menší počet měření věrohodnost nejistoty obnáší spekulace, proto se provádí korekce na počet měření například pomocí koeficientů, která převádí Gaussovo rozdělení na Studentovo. Toto rozdělení je definované pomocí stupňů volnosti, které jsou o jedničku menší, než počet měření a dále pravděpodobností, se kterou se pravá hodnota v intervalu se nachází.

Statistické zpracování hodnot F_V'/F_M' bylo provedeno pomocí *Mann – Whitneyova* testu v programu Origin (OriginLab Corporation, Massachusetts, U.S.A). Statistické zpracování gazometrických veličin před popálením, rychlosti šíření ES, hodnot JA, JA-Ile, *cis*-OPDA a ABA bylo provedeno pomocí *ANOVA* – testu (konkr. Tukey test) v programu Origin. Testován byl vždy jeden parametr vzhledem k jednotlivým zálvkám (např. hodnota asimilace CO₂ u vody, DMSO, *mT* a 3OHBAPA).

5. Výsledky

5.1 Gazometrické veličiny a fluorescence chlorofylu *a*

V této podkapitole se podíváme na získaná data z gazometrie a fluorescence chlorofylu *a* pro ustálené rostliny rajčete před popálením a po popálení.

Tab. 2: Průměrné hodnoty nenormovaných veličin rychlosti asimilace CO₂ (*A*), stomatální vodivosti pro vodní páru (*g_s*), rychlosti transpirace (*E*) a intercelulární koncentrace CO₂ (*C_i*) pro jednotlivé typy záливок (voda, DMSO, *mT*, 3OHBAPA) před popálením s nejistotami, n = 3–4. Signifikantní výsledky ($P \leq 0,05$) jsou označeny ***b***, signifikance, které jsou pouze mezi dvojicemi záливок jsou navíc označeny ***c***.

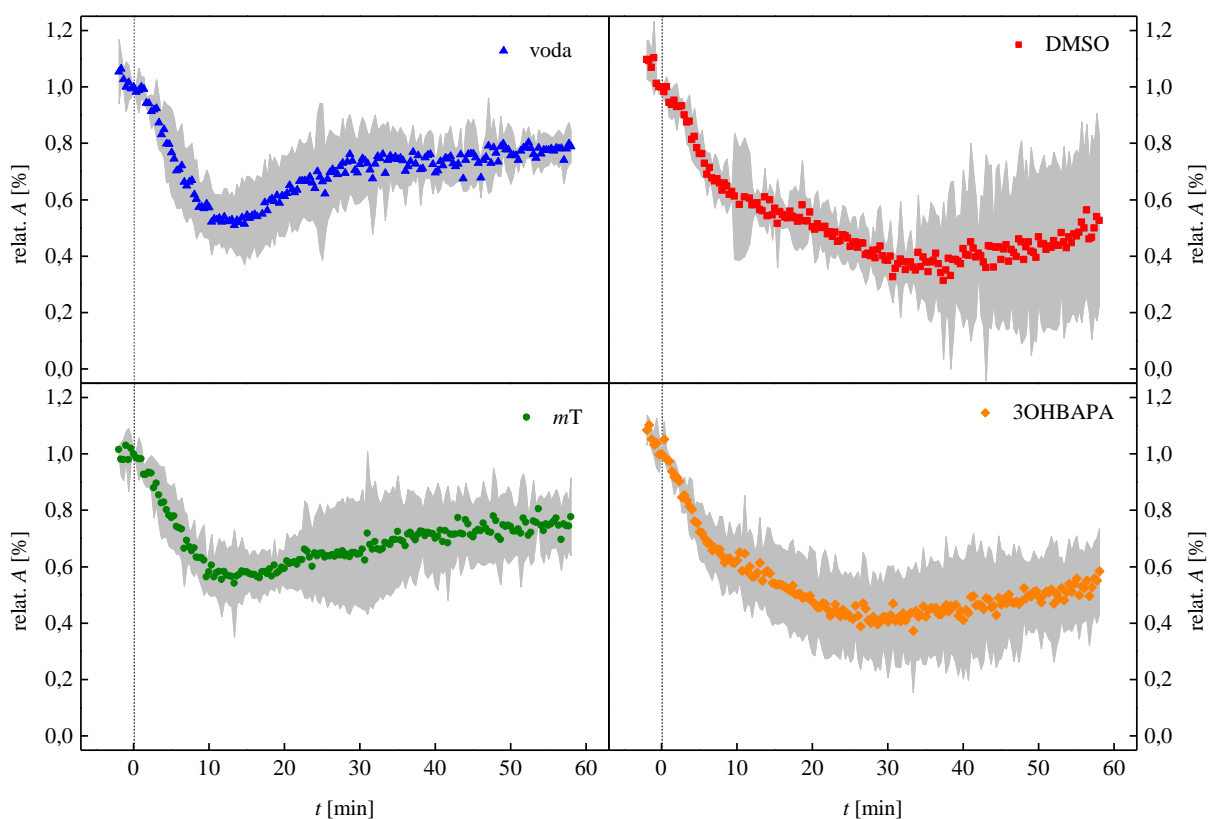
	voda	DMSO	<i>mT</i>	3OHBAPA
<i>A</i> [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	9,0±0,5 <i>a</i>	9±1 <i>a</i>	9,0±0,4 <i>a</i>	11,5±0,3 <i>b</i>
<i>g_s</i> [$\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	0,20±0,02 <i>a</i>	0,18±0,02 <i>bc</i>	0,202±0,006 <i>a</i>	0,254±0,006 <i>bc</i>
<i>E</i> [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	2,2±0,5 <i>a</i>	2,0±0,5 <i>bc</i>	2,2±0,1 <i>a</i>	2,7±0,2 <i>bc</i>
<i>C_i</i> [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$]	317±6 <i>a</i>	315±4 <i>a</i>	319±4 <i>a</i>	318±1 <i>a</i>

V tabulce 2 je poukázáno na dopad jednotlivých záливок na rostliny rajčete ještě před aplikováním stresového faktoru – popálení. Z uvedených výsledků můžeme průkazně uvést, že rajčata se záličkou 3OHBAPA měla nejrychlejší asimilaci CO₂ (*A*) ze všech záливок rostlin rajčete a otevřenější průduchy (*g_s*) oproti rostlinám ošetřených záličkou DMSO. Otevřenost průduchů u rostlin se záličkou 3OHBAPA se projevila i na průkazně vyšší hodnotě transpirace (*E*) oproti rostlinám se záličkou DMSO, protože tyto veličiny spolu úzce souvisí. Zajímavé je, přestože rajčata se záličkou DMSO měla méně otevřené průduchy (*g_s*) a s tím spojený nižší příjem CO₂, tak asimilace (*A*) probíhala s podobnou rychlostí jako u rajčat ošetřených *mT* a vodou. S tím souvisí i nižší hodnota koncentrace CO₂ v intercelulárách.

Tab. 3: Mediány kvantového výtěžku fotochemie PSII u vzorku adaptovaného na světlo (F_V'/F_M') pro n = 3 – 4, před popálením (1,5 min. před popálením) a po popálení (60 min. po popálení) s uvedenými horními a dolními kvartily pro jednotlivé typy záливок (voda, DMSO, *mT*, 3OHBAPA). Signifikantní výsledky ($P \leq 0,05$) jsou označeny ***b***.

	F_V'/F_M' <i>před</i> <i>popálení</i>	Horní kvartil	Dolní kvartil	F_V'/F_M' <i>po</i> <i>popálení</i>	Horní kvartil	Dolní kvartil
voda	0,636 <i>a</i>	0,645	0,625	0,599 <i>a</i>	0,605	0,591
DMSO	0,627 <i>a</i>	0,631	0,618	0,540 <i>b</i>	0,543	0,540
<i>mT</i>	0,638 <i>a</i>	0,645	0,631	0,585 <i>a</i>	0,595	0,578
3OHBAPA	0,683 <i>b</i>	0,689	0,679	0,598 <i>a</i>	0,605	0,583

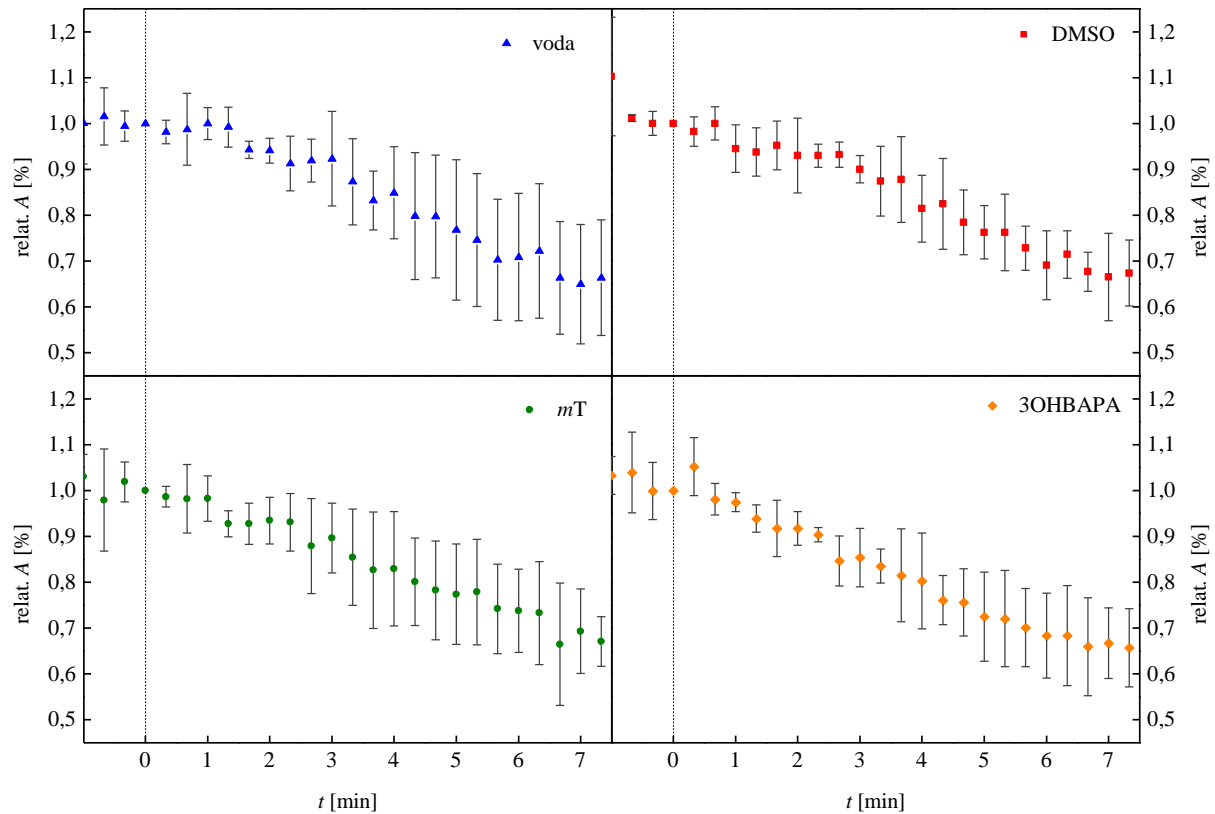
Pokud porovnáme hodnoty F_V'/F_M' uvedené v tabulce 3, pro rostliny rajčete s jednotlivými zálvkami před popálením dojdeme k zjištění, že průkazně nejlépe jsou na tom opět (v porovnání s tabulkou 2) rostliny ošetřené roztokem 3OHBAPA, u kterých byl kvantový výtěžek fotochemie PSII nejvyšší. Po popálení u rostlin rajčete ošetřených DMSO byl sledován největší průkazný pokles hodnoty F_V'/F_M' , tedy tyto rostliny byly na tom prokazatelně nejhůře.



Obr. 11: Průměrné hodnoty vybraných normovaných veličin A pro jednotlivé typy zálivek (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku popálení ($t = 0$ min.) je označen přerušovanou čarou.

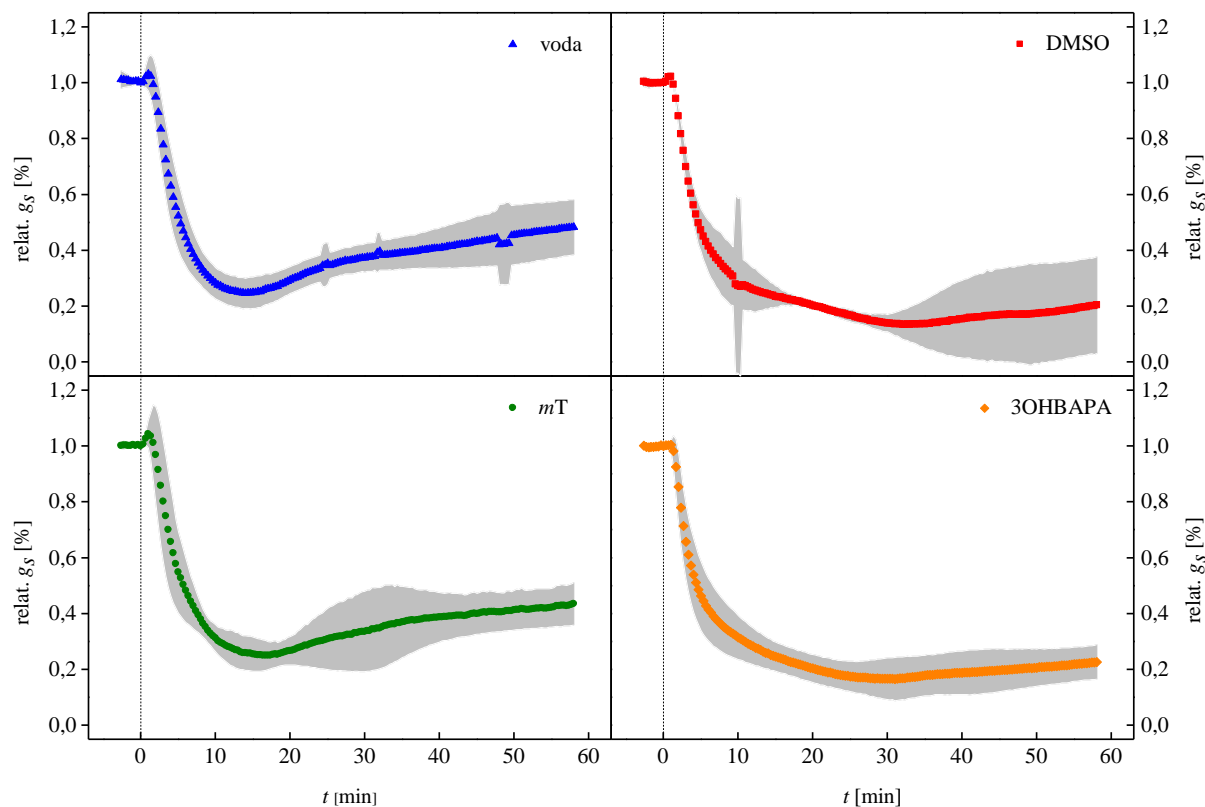
V obrázku 11 můžeme vidět, že po popálení došlo k poklesu rychlosti asimilace CO_2 (A) pro všechny typy zálivek. Výsledky měření můžeme rozdělit do dvou pomyslných skupin. Do první můžeme zařadit rostliny rajčete ošetřené vodou a mT , do druhé DMSO a 3OHBAPA. U první skupiny došlo po popálení k poklesu hodnot na minimum (cca 10. minuta měření) a následoval zpětný nárůst hodnot, který se cca ve 40. minutě měření téměř zastavil. Přesto se hodnota veličiny A velmi pomalu zvyšovala až do konce měření (cca 60 minut). U rostlin rajčete se zálvkou DMSO a 3OHBAPA došlo po popálení k poklesu veličiny, minimální hodnoty se ale nacházely až okolo 30. minuty měření.

Nejistoty DMSO mají výrazně vyšší hodnotu, než nejistoty ostatních zálivek, to je způsobeno korekcí na počet rostlin (3) oproti ostatním zálivkám (4). Nejistoty u vody a DMSO mají několik ztlačených hodnot, to je způsobené korekcí nejistot po vyloučení dat při výměnách baterie/autobaterie (platí i pro veličiny E , C_i , g_s).



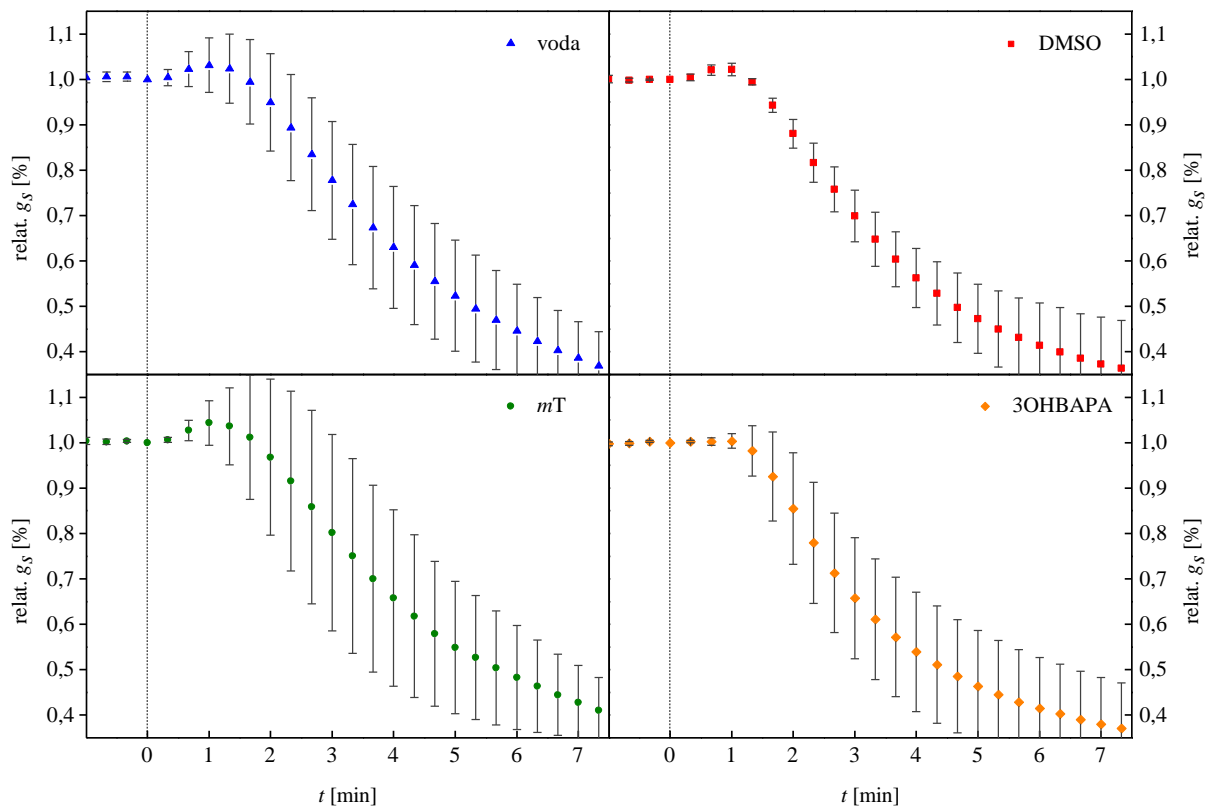
Obr. 12: Detailní zobrazení průběhu průměrných hodnot během 7. minut po popálení vybraných normovaných veličin A pro jednotlivé typy zálivek (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku popálení ($t = 0$ min.) je označen přerušovanou čarou.

V obrázku 12 jsou znázorněné změny, které nastaly během 7. minut po popálení. Po popálení došlo v rozmezí 1. a 2. minuty k poklesu veličiny u všech typů zálivek. Nejsou patrné rozdíly v poklesu rychlosti asimilace CO_2 mezi jednotlivými zálivkami, které nastaly během 7. minut po popálení.



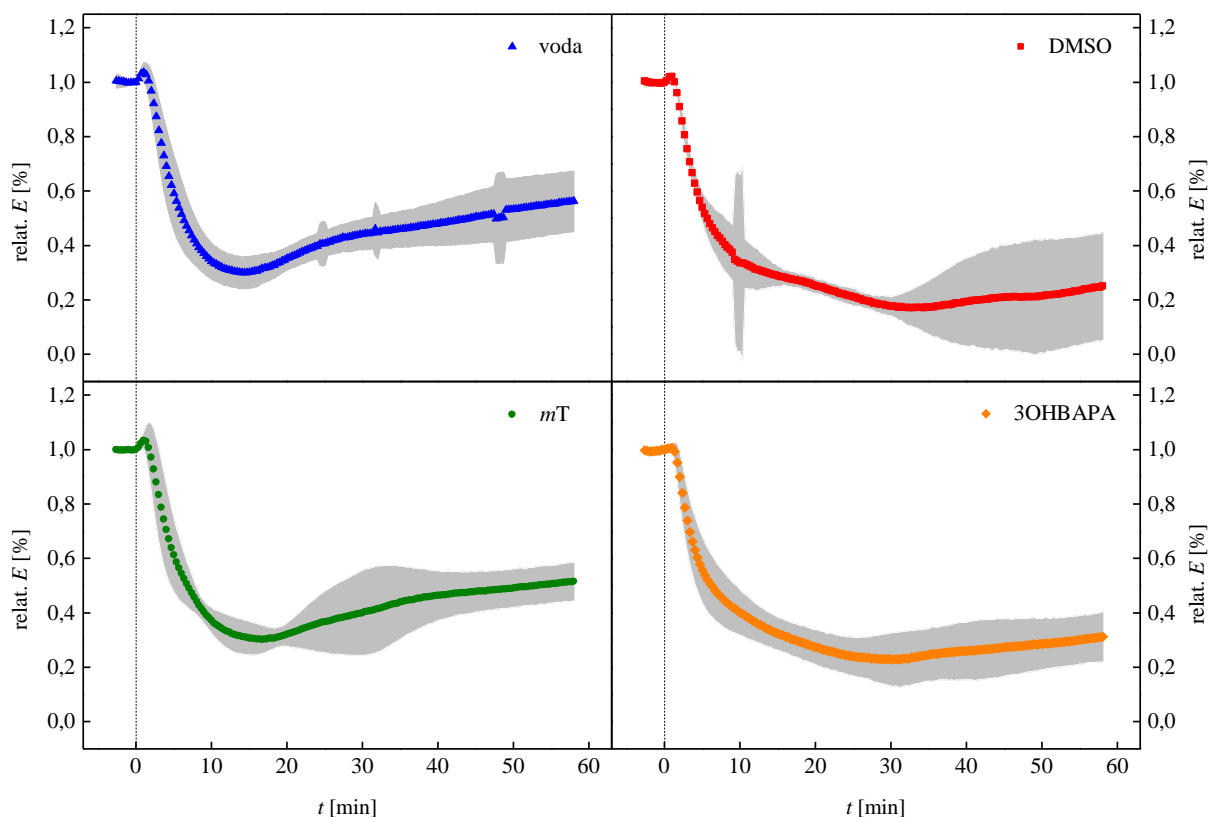
Obr. 13: Průměrné hodnoty vybraných normovaných veličin g_s pro jednotlivé typy zálivek (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku ($t = 0$ min.) popálení je označen přerušovanou čarou.

V obrázku 13 můžeme pozorovat, že po popálení začalo postupné uzavírání průduchů u všech typů zálivek rostlin rajčat, které se projevilo jako pokles stomatální vodivosti (g_s). Stejně jako v obrázku 12 lze pozorovat koincidenci mezi dvojicemi voda, mT a DMSO, 3OHBAPA. U vody a mT se minimum a následný růst nacházelo okolo 15. minuty, zatímco u DMSO a 3OHBAPA až okolo 30. minuty, opětovný růst byl (v korelaci s obrázkem 12) pomalejší než u vody a mT .



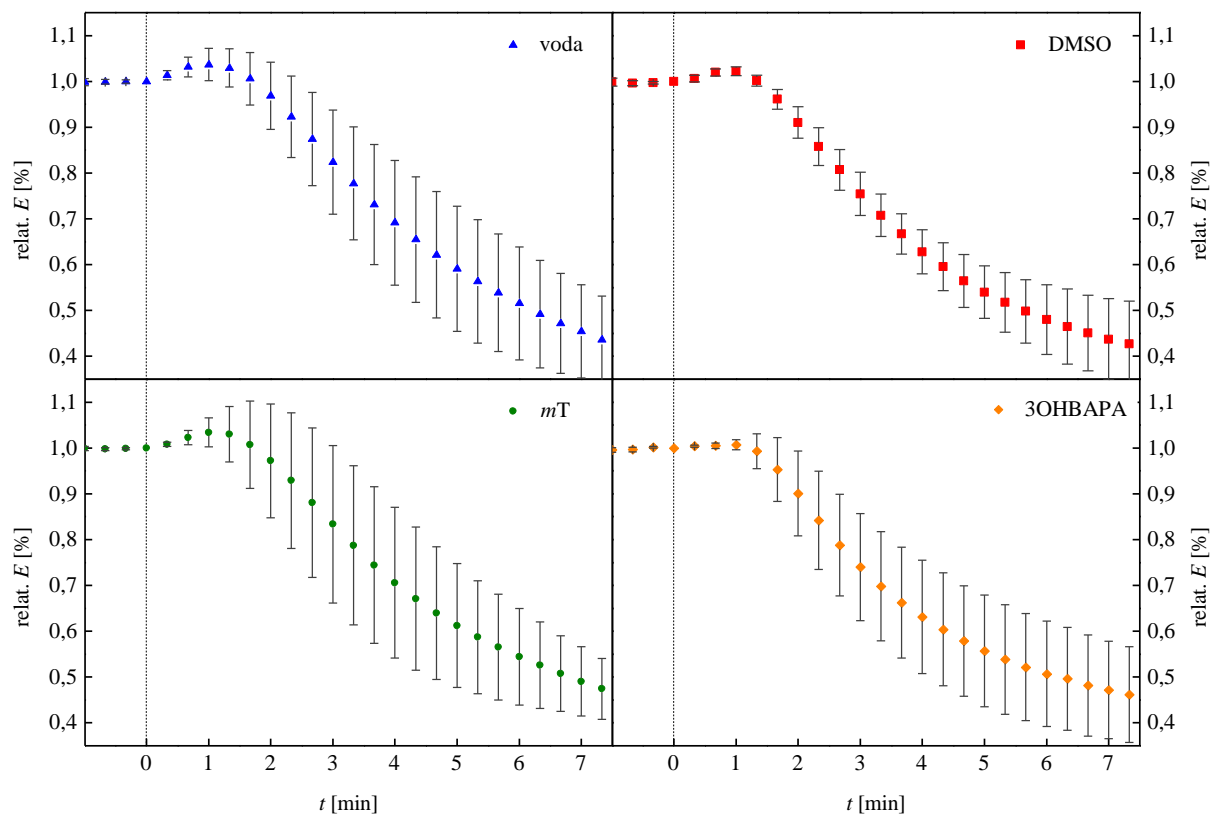
Obr. 14: Detailní zobrazení průběhu průměrných hodnot během 7. minut po popálení vybraných normovaných veličin g_s pro jednotlivé typy záливок (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku popálení ($t = 0$ min.) je označen přerušovanou čarou.

Pozorný čtenář si povšimnul jistých prvotních nárůstů u g_s po popálení v obrázku 13. Tyto změny jsou vyobrazeny v obrázku 14, v němž jsou uvedené změny, které nastaly během 7. minut po popálení. Přibližně 20 s po popálení došlo u všech rostlin k tomu, že se průduchy nejprve začaly více otevírat (po dobu 40 s) a až poté došlo k jejich postupnému zavírání. Z obrázku 14 je také možné si povšimnout, že tento přechodný nárůst g_s je u rostlin se záličkou 3OHBAPA minimální, zatímco nejrapidnější nárůst byl pozorován u záličky mT .



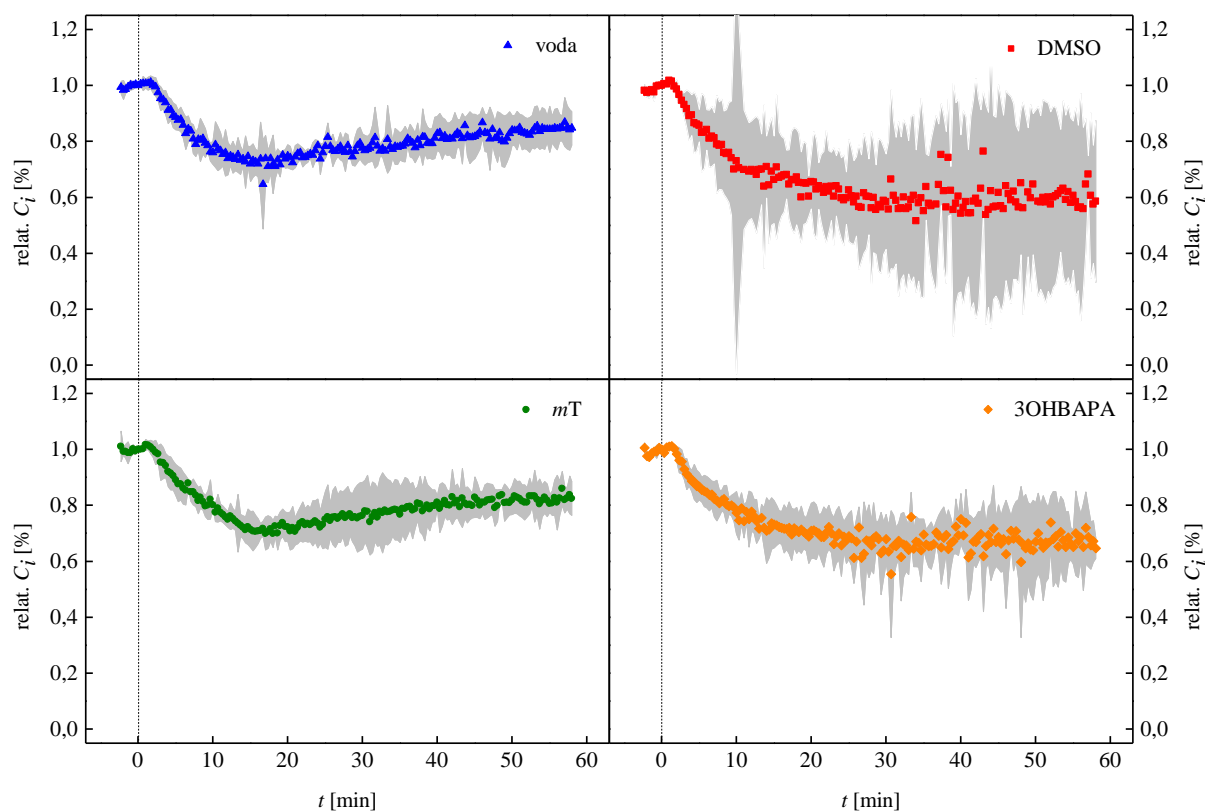
Obr. 15: Průměrné hodnoty vybraných normovaných veličin E pro jednotlivé typy zálivek (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku ($t = 0$ min.) popálení je označen přerušovanou čarou.

V obrázku 15 jsou vyobrazeny hodnoty veličiny E pro rostliny s jednotlivými typy zálivek. Tato veličina je úzce spojena s veličinou g_s , protože veličina E je vzorcem počítána z g_s . Můžeme tedy pozorovat téměř totožné průběhy jako u g_s (v obrázku 13), protože míra otevřenosti průduchů při konstantních podmínkách reguluje výpar vody. Pokud jsou průduchy uzavřené, tak je transpirace minimální a analogicky pokud jsou otevřené, tak dochází k nejvyšší transpiraci (při uvážení konstantních podmínek po celou dobu).



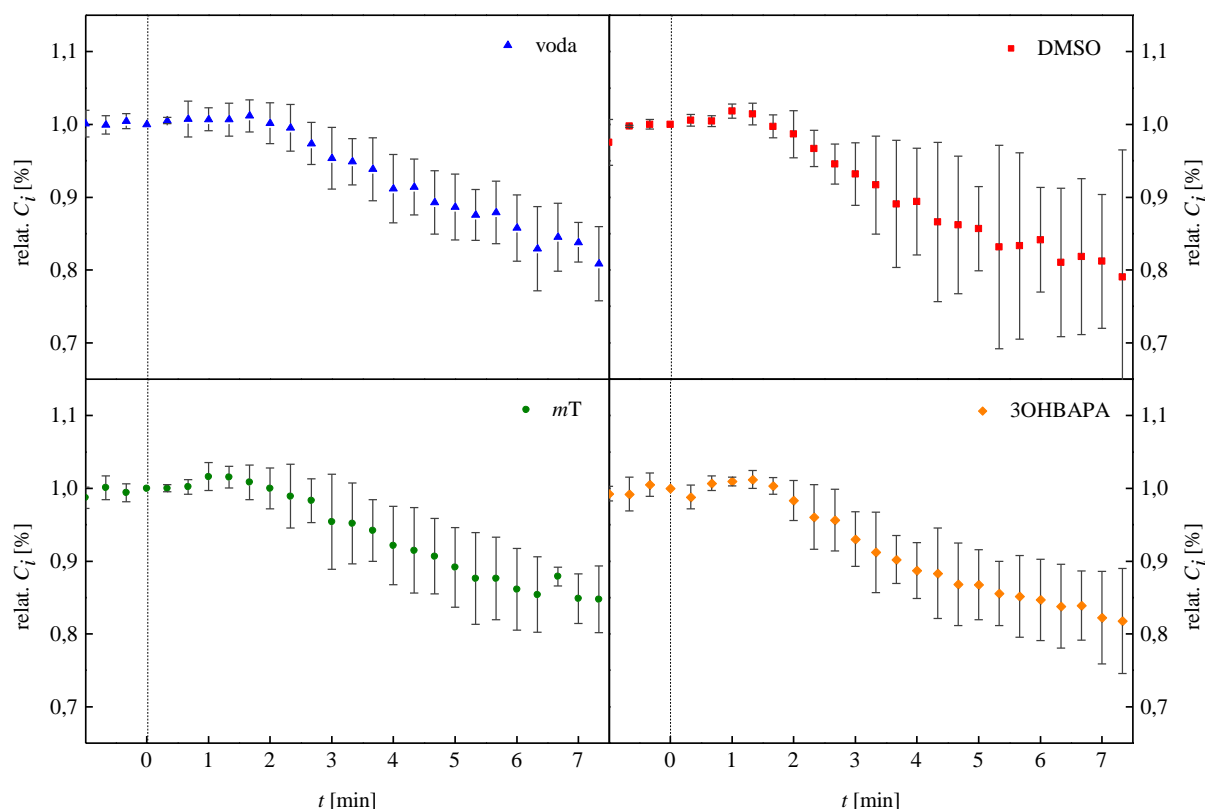
Obr. 16: Detailní zobrazení průběhu průměrných hodnot během 7. minut po popálení vybraných normovaných veličin E pro jednotlivé typy zálivek (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku popálení ($t = 0$ min.) je označen přerušovanou čarou.

V obrázku 16 jsou vyobrazeny změny průběhu veličiny E , které nastaly během 7. minut po popálení. Jak už bylo zmiňováno u komentáře obrázku 15, transpirace je úzce svázána se stomaty. I zde můžeme vidět korelující datové řady veličiny E s datovými řadami v obrázku 14, kde byly uvedeny změny g_s , které nastaly během 7. minut po popálení. Tedy opět můžeme říct, že nejvyšší dočasný nárůst byl detekován u rostlin se zálvkou mT a naopak nejnižší, či téměř nepozorovatelný byl pozorován u rostlin se zálvkou 3OHBAPA.



Obr. 17: Průměrné hodnoty vybraných normovaných veličin C_i pro jednotlivé typy zálievek (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku popálení ($t = 0$ min.) je označen přerušovanou čarou.

V obrázku 17 jsou uvedené hodnoty veličiny C_i pro rostliny rajčete ošetřené pomocí jednotlivých typů zálievky. Tato veličina se počítá z veličin A , E a celkové vodivosti, je tedy spojena s ostatními veličinami. Z toho důvodu se průběh datových řad v grafu nemění (mění se pouze amplitudy a doma kdy nastalo minimum. Pokles C_i je způsobený tím, že stomata se zavírají rychleji, než klesá asimilace CO_2 .



Obr. 18: Detailní zobrazení průběhu průměrných hodnot během 7. minut po popálení vybraných normovaných veličin C_i pro jednotlivé typy záливок (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. Okamžik počátku popálení ($t = 0$ min.) je označen přerušovanou čarou.

V obrázku 18 jsou uvedeny změny veličiny C_i u rostlin rajčete s jednotlivými typy záливок, které nastaly během 7. minut po popálení. Zde můžeme pozorovat, že po popálení došlo k lehkému nárůstu hodnot u všech typů záливок a poté k poklesu.

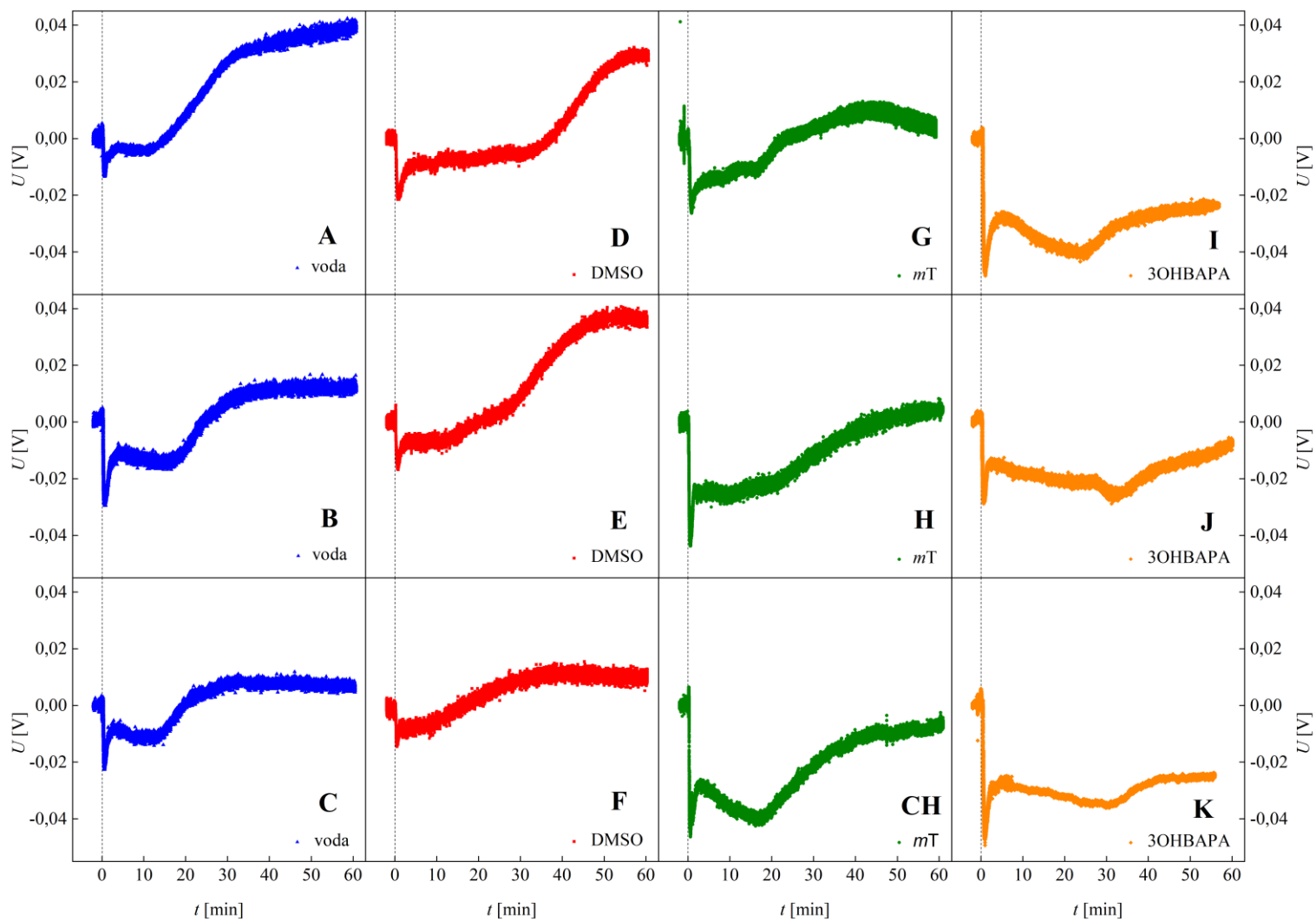
5.2 Elektrické signály

V této podkapitole se zaměříme na průběhy ES a rychlosti šíření ES u jednotlivých záливок.

Tab. 4: Průměrné hodnoty rychlosti šíření v elektrického signálu po popálení mezi místem popálení a elektrodou E1 pro jednotlivé typy záливок (voda, DMSO, mT , 3OHBAPA), $n = 3$. Signifikantní výsledky ($P \leq 0,05$) jsou označeny ***b***.

	voda	DMSO	mT	3OHBAPA
v [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]	$1,76 \pm 0,09$ <i>a</i>	$2,14 \pm 0,04$ <i>a</i>	$2,3 \pm 0,2$ <i>a</i>	$1,0 \pm 0,1$ <i>b</i>

Z údajů uvedených v tabulce 4 průkazně vyplývá, že nejpomaleji se ES šířil u rostlin rajčat ošetřených zálivkou 3OHBAPA. Nejrychleji se šířil ES u rostlin rajčat ošetřených zálivkou mT .



Obr. 19: Průběhy napětí detekované elektrodou E1 pro jednotlivé typy zálivky: voda (A, B, C), DMSO (D, E, F), mT (G, H, CH) a 3OHBAPA (I, J, K). Okamžik počátku popálení ($t = 0$ min.) je označen přerušovanou čarou.

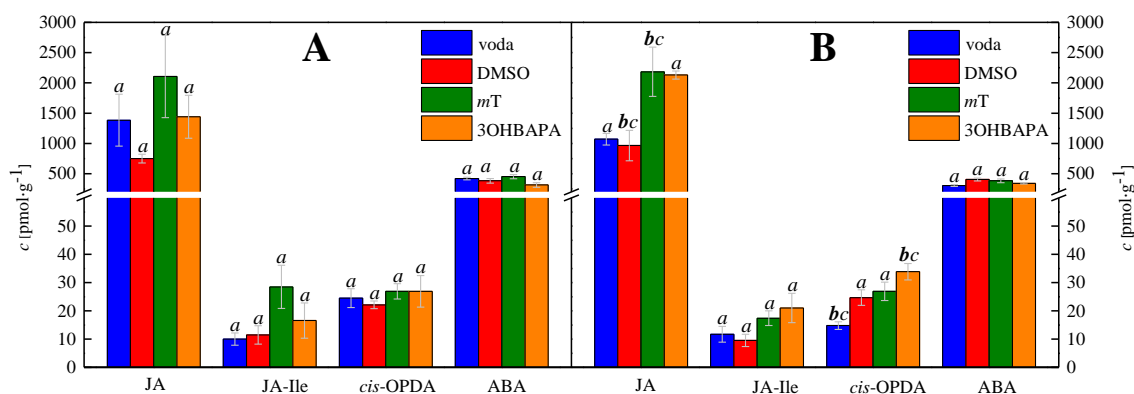
V obrázku 19 jsou uvedeny průběhy napětí detekovaných elektrodou E1 před a po popálení rostlin rajčete s jednotlivými typy zálivky. U všech datových řad došlo ihned po popálení k rychlému počátečnímu poklesu napětí. K nejmenšímu poklesu došlo u rostlin rajčete se zálivkou DMSO (D. E. F), naopak největšímu propadu došlo u rostlin se zálivkou *mT* a 3OHBAPA. Propad byl u rostlin ošetřených zálivkou vody a DMSO následně doprovázel nárůst do stabilního stavu, které bylo vystřídáno rapidním nárůstem až do ustálené hodnoty na konci měření, která několikanásobně (cca 1 – 4 ×) převyšovala hodnoty napětí před popálením. U rostlin ošetřených *mT*, po prudkém počátečním poklesu napětí, byl pozorován nárůst do ustálených hodnot, které se shodovaly s napětím naměřeném před popálením. Rostliny ošetřené roztokem 3OHBAPA reagovaly na popálení nejvíce jak okamžitým výrazným poklesem (až –50 mV) v napětí, tak i druhým podstatně mírnějším poklesem (minimem) v napětí pozorovaným zhruba 30 minut po popálení. Po tomto druhém poklesu napětí se jeho hodnoty začaly pozvolna navracet do původních hodnot před popálením, ale nárůst byl velmi pomalý. Do konce měření nebylo dosaženo ani původních ustálených hodnot.

5.3 Chemické signály

V této kapitole věnujeme pozornost endogenní koncentraci CHS u odebraných lístků rostlin rajčat 75 minut po popálení.

Tab. 5: Průměrné hodnoty výsledků analýzy chemických signálů pro list nesoucí elektrodu E1 a gazometrickou komůrku (GK) 75 minut po popálení vrcholového lístku. V tabulce jsou endogenní koncentrace: kyseliny jasmonové *c*(JA), jasmonoyl-L-iso-leucinu *c*(JA-Ile), *cis*-12-oxofytodienové kyseliny *c*(*cis*-OPDA) a kyseliny abscisové *c*(ABA) pro jednotlivé typy zálivek (voda, DMSO, *mT*, 3OHBAPA) s nejistotami, *n* = 3 – 4. Signifikantní výsledky (*P* ≤ 0,05) jsou označeny **b**, signifikance, které jsou pouze mezi dvojicemi zálivek jsou navíc označeny *c*.

	E1				GK			
	<i>c</i> (JA) [pmol·g ⁻¹]	<i>c</i> (JA-Ile) [pmol·g ⁻¹]	<i>c</i> (<i>cis</i> -OPDA) [pmol·g ⁻¹]	<i>c</i> (ABA) [pmol·g ⁻¹]	<i>c</i> (JA) [pmol·g ⁻¹]	<i>c</i> (JA-Ile) [pmol·g ⁻¹]	<i>c</i> (<i>cis</i> -OPDA) [pmol·g ⁻¹]	<i>c</i> (ABA) [pmol·g ⁻¹]
Voda	1384±430 <i>a</i>	10±2 <i>a</i>	24±3 <i>a</i>	420±22 <i>a</i>	1071±95 <i>a</i>	12±3 <i>a</i>	15±1 <i>bc</i>	304±14 <i>a</i>
DMSO	749±72 <i>a</i>	11±3 <i>a</i>	22±1 <i>a</i>	383±37 <i>a</i>	965±250 <i>bc</i>	10±2 <i>a</i>	25±3 <i>a</i>	405±24 <i>a</i>
<i>mT</i>	2107±680 <i>a</i>	28±8 <i>a</i>	27±3 <i>a</i>	452±36 <i>a</i>	2183±407 <i>bc</i>	17±3 <i>a</i>	27±3 <i>a</i>	383±30 <i>a</i>
3OHBAPA	1441±355 <i>a</i>	17±6 <i>a</i>	27±6 <i>a</i>	314±37 <i>a</i>	2130±67 <i>a</i>	21±5 <i>a</i>	34±3 <i>bc</i>	342±11 <i>a</i>



Obr 20: Průměry výsledků endogenní koncentrace chemických signálů 75 minut po popálení vrcholového lístku, pro lístek nesoucí E1 (A) a gazometrickou komůrku (B) pro jednotlivé typy závlivky (voda, DMSO, *mT*, 3OHBAPA) s nejistotami, $n = 3 - 4$. V obrázku jsou uvedeny výsledky biologických replikátů, kde je JA – kyselina jasmonová, dále JA-Ile – jasmonoyl-L-isoleucin, *cis*-OPDA – *cis*-12-oxofytodienová kyselina a ABA – kyselina abscisová.

V tabulce 5 a obrázku 20 jsou uvedené endogenní koncentrace CHS pro list nesoucí elektrodu E1 a GK. Z výsledků pro lístek nesoucí E1 (tabulka 5 šedé označení, obrázek 20 (A)) vyplývá, že rostliny ošetřené DMSO měly po popálení nejnižší koncentraci kyseliny jasmónové a jejího prekurzoru *cis*-OPDA. Nejvyšší koncentraci kyseliny jasmónové, její aktivní formy JA-Ile a ABA měly rostliny rajčat se závlivkami *mT*. Za zmínku stojí i zvýšená koncentrace jasmonoyl-L-isoleucinu a nejnižší koncentrace kyseliny abscisové u rostlin rajčete se závlivkou 3OHBAPA.

V tabulce 5 (modré označení) a obrázku 20 (B) jsou uvedené výsledky CHS pro list nesoucí GK. Prokazatelně vyšší koncentraci JA měli rostliny rajčete se závlivkou *mT* než rostliny se závlivkou DMSO. Průkazně vyšší koncentraci prekurzoru kyseliny jasmónové *cis*-OPDA měli rostliny rajčete se závlivkou 3OHBAPA nežli rostliny se závlivkou vody. Nejvyšší koncentraci ABA měli rostliny rajčete se závlivkou DMSO a nejnižší se závlivkou tvořenou pouze vodou. Ačkoliv by se výsledky CHS lístku s E1 a GK měly teoreticky rovnat, tak při nahlédnutí do tabulky 5 jsou rozdíly patrné.

6. Diskuze

Gazometrie a fluorescence chlorofylu *a*

Pokud se zaměříme na to, jak zálivky ovlivnily již zmíněné veličiny rostlin rajčete ještě před aplikací stresu popálením, tak se obrátíme na tabulku 2. Průkazné rozdíly byly naměřeny u rostlin se zálivkou s 3OHBAPA. Vyjma intercelulární koncentrace CO₂ byly pro tuto zálivku detekovány nejvyšší hodnoty gazometrických veličin. Při této zálivce jsme současně nepozorovali otvírání stomat na začátku stresu popálením (obr. 14), což by mohlo souviset s tím, že stomata byla otevřená maximálně vlivem působení 3OHBAPA již před samotným působením stresu. Velmi zajímavé byly výsledky pro rajčata se zálivkou DMSO, hodnoty parametrů E a g_s byly v porovnání s ostatními rajčaty nejnižší. Tato rajčata měla nejméně otevřené průduchy, ale rychlost asimilace CO₂ měla podobnou rostlinám rajčat ošetřených vodou. To nasvědčuje tomu, že u rostlin se zálivkou DMSO byl detekován mírný pokles C_i oproti ostatním rajčatům. Za zmínku stojí, že rostliny se zálivkou 3OHBAPA byly v nejlepší funkčním stavu fotosyntézy před popálením (nejvyšší hodnota F_V'/F_M'). Aplikace 3OHBAPA působila za klidového stavu na rostliny rajčete protektivně.

Při pohledu na výsledky gazometrických veličin můžeme říct, že po aplikaci stresu popálením byly detekovány odezvy u rostlin rajčete na tuto událost. V rozmezí 20. až 60. s po popálení byly detekovány první změny (nárůst či pokles) u všech veličin, které následně doprovázel výrazný pokles všech veličin. Toto pozorování koresponduje s literaturou, kdy po popálení byl detekován pokles v rychlosti asimilace CO₂ (A) a uzavření průduchů (pokles g_s) i u jiných rostlinných druhů, např. u *Pelargonium zonale* L. (Sukhov a kol. 2012), *Populus trichocarpa* L. (Lautner a kol. 2005) a rostlin *Mimosa pudica* L. (Kaiser a kol. 2006, Koziolok a kol. 2004). S veličinou g_s přímo souvisí koncentrace CO₂ v intercelulárách (C_i), jenž je limitována tokem CO₂ skrz průduchy a odráží i sekundární fázi fotosyntézy (A). Tedy při uzavírání průduchů, kdy pokles A byl časově opožděný oproti jejich uzavírání jsme očekávali pokles i této veličiny, který se potvrdil v grafech uvedených na obrázku 17 a 18. To také odpovídá literatuře, kdy u rostlin *Pelargonium zonale* L. (Sukhov a kol. 2012) po popálení došlo k poklesu intercelulární koncentrace. Výpar vodní páry rostlinou skrz průduchy neboli transpirace je také funkcí stomatální vodivosti pro vodní páru. Tedy opět jsme očekávali, že při uzavření průduchů transpirace poklesne, což se také potvrdilo v grafech uvedených na obrázcích 15 a 16.

Ovšem vraťme se znovu ke stomatální vodivosti pro vodní páru. U této veličiny po popálení totiž nejprve došlo k nárůstu a poté rapidnímu poklesu. To znamená, že se průduchy nejprve více otevřely a až poté následovalo jejich zavření. Tento úkaz byl pozorován i u fixovaných listů rostlin *Mimosa pudica* L. (Kaiser a kol. 2006, Koziolok a kol. 2004). Tento jev autoři vysvětlují hydropasivním otevřením stomat v důsledku poklesu turgoru epidermálních buněk a následné dlouhotrvající uzavření průduchů připisují působení přichozího ES (Kaiser a kol. 2006). Ovšem pokud by se průduchy opravdu hydropasivně otevřeli ještě před ovlivněním ES, čekali bychom tuto událost mnohem dříve, než bylo zde detekováno. Lze si povšimnout, že nárůst g_s nebyl pro všechny typy zálivky rostlin stejný. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u rostlin rajčat ošetřených roztokem mT . U rostlin rajčat se zálivkou 3OHBAPA byl tento nárůst minimální až žádný. Odůvodnění, proč tyto rostliny přechodně průduchy neotevřely, můžeme hledat v práci, kterou publikovali Rosa a kol. (2018). Uvádějí přímou spojitost mezi poklesem funkčnosti neboli „paralýzou“ průduchů u rostlin *Aechmea blanchetiana* L. se zvyšující koncentrací aplikovaného CK (0, 5, 10, 15 a 20 μM) BAP a 6-furfurylaminopurinu. Je tedy možné, že použitá koncentrace 3OHBAPA částečně „paralyzovala“ průduchy u lístku umístěného v GK, které tak již nebyly schopny vykonat malé změny v jejich otevřenosti, jaké byly pozorované u rostlin rajčete s ostatními typy zálivek.

Při pohledu na celkové průběhy (65 minut) datových řad gazometrických veličin si můžeme povšimnout jisté korelace mezi variantami rostlin se zálivkou vody, mT a rostlin se zálivkou DMSO a 3OHBAPA. Lze shrnout, že rostliny ošetřené zálivkou mT a vody nebyly tak výrazně popálením zasaženy⁸ jako rostliny ošetřené zálivkou DMSO a 3OHBAPA. První zmíněná dvojice měla rychlejší i větší schopnost regenerace, gazometrických veličin. Z dat vyplývá, že aplikace velmi často používaného rozpouštědla DMSO negativně ovlivnila průběh reakce rostlin rajčete na popálení. Zdá se, že mT tento negativní efekt DMSO vyrovnal a působil na rostliny rajčete protektivně. U jeho arabinosidu, 3OHBAPA, však stejný závěr vyslovit nemůžeme. Průběhy gazometrických veličin rostlin rajčat po popálení byly totiž podobné s rostlinami rajčete ošetřených zálivkou DMSO. Na základě výsledků tedy usuzujeme, že aplikace 3OHBAPA u rostlin rajčat neměla prakticky žádný protektivní vliv na odezvu rostlin rajčete na popálení u gazometrických veličin.

⁸ Myšleno stresovou reakcí nikoliv jako intenzitou stresoru

Dále jsme u rostlin rajčete sledovali hodnoty parametru F_V'/F_M' . Po popálení byl pozorován pokles parametru F_V'/F_M' u všech rostlin rajčete. To souhlasí s literaturou, kdy po popálení byl detekován pokles F_V/F_M u rostlin *Mimosa pudica* L. (Kaiser a kol. 2006, Koziolok a kol. 2004) a *Pelargonium zonale* L. (Sukhov a kol. 2012). Negativní vliv DMSO se také projevil u tohoto parametru, kdy pro tyto rostliny byly hodnoty F_V'/F_M' nejnižší před i po stresu rostlin rajčete. Je zajímavé, přestože u rostlin se zálivkou 3OHBAPA po stresu popálením byly gazometrické veličiny obdobné jako u DMSO, tak hodnoty F_V'/F_M' byly u těchto rostlin po popálení nejvyšší. Je možné, že u rostlin rajčete se zálivkou 3OHBAPA došlo k protektivní funkci obsahu chlorofylů (pokles degradace). V literatuře je totiž uvedeno, že u utržených listů *Triticum aestivum* L., které byly 6 dnů adaxiální stranou ponořeny v roztoku 10 μ M 3OHBAPA došlo k nižší degradaci chlorofylů (Bryksová a kol. 2020).

Elektrické signály

Na základě poznatku Stankoviće a kol. (1998) a průběhu změřených ES lze usuzovat, že byl měřen komplexní ES složený z několika již popsaných jednoduchých typů ES, tzv. AP, VP a systémového potenciálu. Můžeme pozorovat, že průběh signálů detekovaných u rostlin se zálivkou 3OHBAPA a *mT* se zásadně liší od průběhů rostlin ošetřených vodou a DMSO. Rostliny rajčete se zálivkou 3OHBAPA reagovaly nejsilněji, protože došlo k největšímu poklesu napětí a rajčata na konci měření nedosáhla ani hodnot klidového napětí. Z průběhů signálů můžeme usoudit, že cytokin *mT* a jeho arabinosid 3OHBAPA významně ovlivnily průběh ES u rostlin rajčete po lokálním popálení. Zatímco aplikace DMSO neměla na ES vliv při porovnání s rostlinami rajčat zalitými pouze vodou. ES se šířil nejpomaleji u 3OHBAPA a nejrychleji u *mT*. Přestože se jedná o příbuzné látky, je zřejmé, že účinky na tyto signální dráhy jsou odlišné. Je možné, že 3OHBAPA částečně inhiboval procesy, které doprovází rychlé šíření ES, a naopak *mT* tyto procesy urychloval.

Stresové hormony

Za zmínku stojí vysoká koncentrace JA u všech rostlin po popálení (tabulka 5). V literatuře (Farmer a kol. 2020, Mousavi a kol. 2013) spojují syntézu JA s generací ES, což by odpovídalo i našim výsledkům, že ES indukoval syntézu JA. Je opět pozorovatelný negativní efekt DMSO u rostlin rajčete spojený s nejnižší syntézou JA. Výsledky ABA

jsou ovšem diskutabilní, pokud se opřeme o práci Hlaváčkové a kol. (2006). Koncentrace ABA u rostlin *Nicotiana tabacum* L. začala po 15 minutě od popálení klesat a 60 minut po popálení byla na podobné úrovni jako u klidového stavu. Tedy pro kvalitní analýzu obsahu ABA v listech po popálení by bylo nutné provést detailnější časové odběry. Zajímavé je, že přestože jsme očekávali výsledky analýz u lístků s E1 a gazometrickou komůrkou téměř totožné hodnoty, výsledky se lehce liší. To by mohlo nasvědčovat tomu, že ES se nešíří v rámci svazků cévních symetricky, a tedy akumulace hormonů indukovaných ES také nebyla symetrická.

7. Závěr

V teoretická části byla uvedena rešerše vytyčené problematiky, dále byl představen experiment za použití předem zvládnutých metodik. Naměřená data byla vyhodnocena, statisticky zpracována a diskutována.

Pomocí neinvazivních fyzikálních metod byla sledována korelace mezi změnami odezvy rostlin rajčete na lokální popálení po aplikaci 10 μM zálivky cytokininů v rozpouštědle 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), konkrétně *meta*-topolinu (*mT*) a jeho derivátu 6-(3-hydroxybenzylamino)-9- β -D-arabinofuranosylpurinu (3OHBAPA). Po popálení byly u všech zálivek detekované změny ve gazometrických veličinách, tj. pokles rychlosti asimilace CO_2 , rychlosti transpirace, intercelulární koncentrace CO_2 a stomatální vodivosti pro vodní páru. U všech rostlin rajčete byla po popálení dále pozorována generace elektrického signálu, pokles kvantového výtěžku fotochemie PSII na světle (F_V'/F_M') a zvýšená akumulace kyseliny jasmonové a abscisové. Nečekaným výsledkem tohoto experimentu je negativní dopad rozpouštědla cytokininů, 0,1% roztoku DMSO, na měřené parametry rostliny rajčete v klidovém stavu (přivření průduchů, pokles F_V'/F_M') i po aplikaci stresoru (pokles F_V'/F_M' , silnější reakce gaz.veličin).

Předložená data poukazují na protektivní efekt *meta*-topolinu na stomatální i fotosyntetickou (rychlost asimilace CO_2) odpověď rostlin rajčete po popálení. Ovšem aplikace 3OHBAPA tuto odpověď neovlivnila. Aplikace 3OHBAPA ovlivnila pozitivně pouze stabilizované rostliny rajčete před popálením, kde způsobila větší otevření průduchů, nárůst rychlosti asimilace CO_2 i F_V'/F_M' . 3OHBAPA tedy nejspíše ovlivňuje jak primární, tak sekundární fotosyntetické reakce rostlin rajčete v klidovém stavu.

Ačkoliv u gazometrických veličin měli *mT* a 3OHBAPA odlišný vliv, elektrická aktivita rostlin rajčete po jejich aplikaci vykazuje podobné trendy. Aplikace 3OHBAPA u rostlin rajčete způsobila nejsilnější reakci co do amplitudy signálu a rychlosti repolarizace, byť rychlost šíření elektrického signálu byla u této zálivky nejnižší. Naopak *mT* významně urychlil signální dráhy vedoucí k šíření elektrických signálů.

Z námi uvedené práce je zřejmé, že rostliny rajčete velmi rychle a silně reagují na lokální abiotický stres popálení v systémových pletivech. Klidový stav a stresová reakce fotosyntetického, stomatálního aparátu i elektrická aktivita u těchto rostlin mohou být významně ovlivněny exogenní aplikací cytokininu i jeho derivátu. Z výsledků vyplývá, že i malá změna ve struktuře molekuly cytokininu má dopad na rozličný mechanismus jeho účinku v *in-vivo* rostlině rajčete.

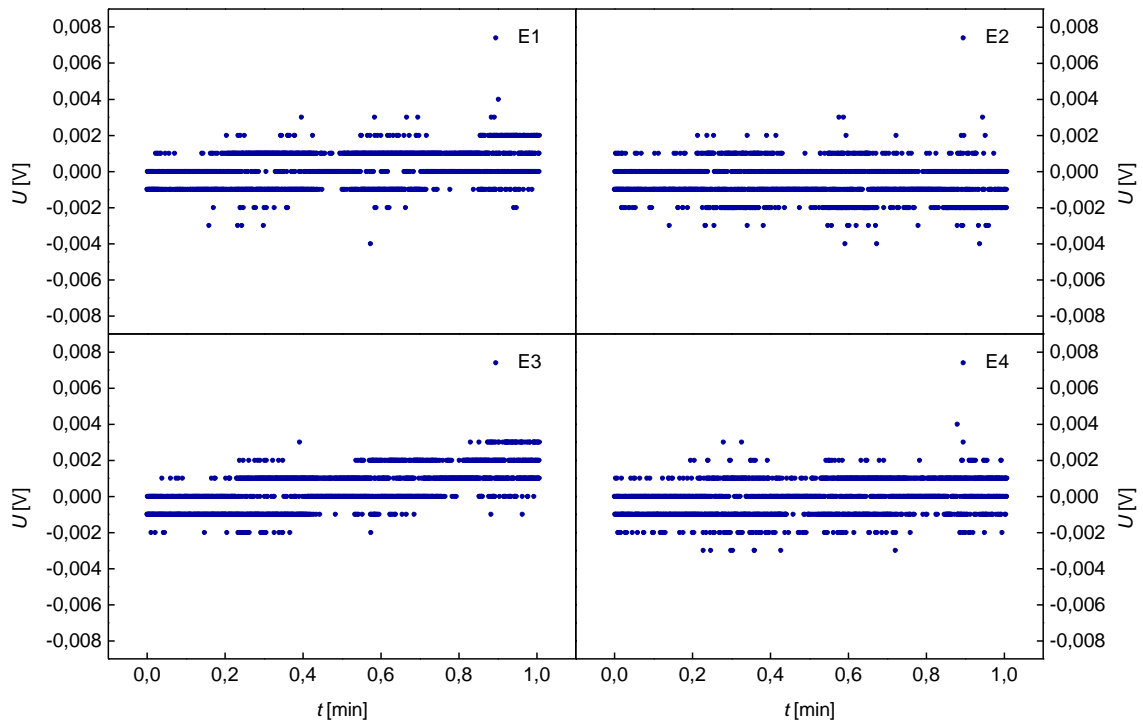
8. Seznam literatury

- Acharya B.R., Assman S.M. (2009) Hormone interactions in stomatal function, *Plant Molecular Biology* **69**: 451 – 462.
- Burdon-Sanderson J. (1873) Note on the electrical phenomena which accompany stimulation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London* **21**, 495 – 496.
- Bryksová M., Dabravolski S., Kučerová Z., Zavadil Kokáš F., Špundová M., Plíhalová L., Takáč T., Grúz J., Hudeček M., Hloušková V., Koprna R., Novák O., Strnad M., Plíhal O., Doležal K. (2020) Aromatic cytokinin arabinosides promote PAMP-like responses and positively regulate leaf longevity. *ACS Chemical Biology* **15**: 1949 – 1963.
- Canny M.J.P. (1975) Mass transfer. In: *Encyclopedia of plant physiology: Transport in Plants, I Phloem Transport*. (Zimmermann M.H., Milburn J.A., eds.), Springer, Berlin, 139 – 153.
- Cortleven A., Leuendorf J. E., Frank M., Pezzetta D., Bolt S., Schmölling T. (2018). Cytokinin action in response to abiotic and biotic stress in plants. *Plant, Cell & Environment* **42**: 998 – 1018.
- Cortleven A., Nitschke S., Klaumünzer M., AbdElgawad H., Asard H., Grimm B., Riefler M., Schmölling T. (2014) A novel protective function for cytokinin in the light stress response is mediated by the *Arabidopsis* histidine kinase2 and *Arabidopsis* kinase3 receptors. *Plant Physiology* **164**: 1470 – 1483.
- De Toledo G. R. A., Parise A. G., Simmi F. Z., Costa A. V. L., Senko L. G. S., Debono M.W., Souza G. M. (2019). Plant electrome: the electrical dimension of plant life. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **31**: 21 – 46.
- Dobránszki J., Mandler–Drienyovszki N. (2014) Cytokinins affect the stomatal conductance and CO₂ exchange of in vitro apple leaves. *International Journal of Horticultural Science* **20**: 25 – 28.
- Doležal K., Strnad M. (2017) Cytokininy–regulátory růstu rostlin, které dokážou mnohem více než jen regulovat dělení buněk. *Živa* **4**: 149 – 152.
- Farmer E.E., Gao Y.Q., Lenzoni G., Wolfender J.L., Wu Q. (2020) Wound and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytologist Trust* **227**: 1037 – 1050.
- Floková K., Tarkowská D., Miersch O., Strnad M., Wasternack C., Novák O. (2014) UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**: 147 – 157.
- Fromm J., Hajirezaei M.R., Becker V.K., Lautner S. (2013) Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Frontiers in Plant Science* **4**: 239.
- Fromm J., Lautner S. (2006) Characteristics and Functions of Phloem-Transmitted Electrical Signals in Higher Plants. In: *Communication in Plants*. (Baluška F., Mancuso S., Volkmann D. eds.), Springer, Berlin, 321 – 329.
- Fromm J., Lautner S. (2007) Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant-Cell and Environment* **30**: 249 – 257.
- Gallé A., Lautner S., Flexas J., Fromm J. (2015) Environmental stimuli and physiological responses: the current view on electrical signalling. *Environmental and Experimental Botany* **114**: 15 – 21.
- Gilroy S., Bialasek M., Suzuki N., Gorecka M., Devireddy A.R., Karpinski S., Mittler R. (2016) ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant Physiology* **171**: 1606 – 1615.
- Grams T.E.E., Koziolok C., Lautner S., Matyssek R., Fromm J. (2007) Distinct roles of electric and hydraulic signals on the reaction of leaf gas exchange upon re-irrigation in *Zea mays* L. *Plant Cell and Environment* **30**: 79 – 84.
- Hedrich R., Salvador-Recatala V., Dreyer I. (2016) Electrical wiring and long-distance plant communication. *Trends in Plant Science* **21**: 376 – 387.
- Herde O., Pena-Cortes H., Willmitzer L., Fisahn J. (1997). Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants. *Plant, Cell & Environment* **20**: 136 – 141.

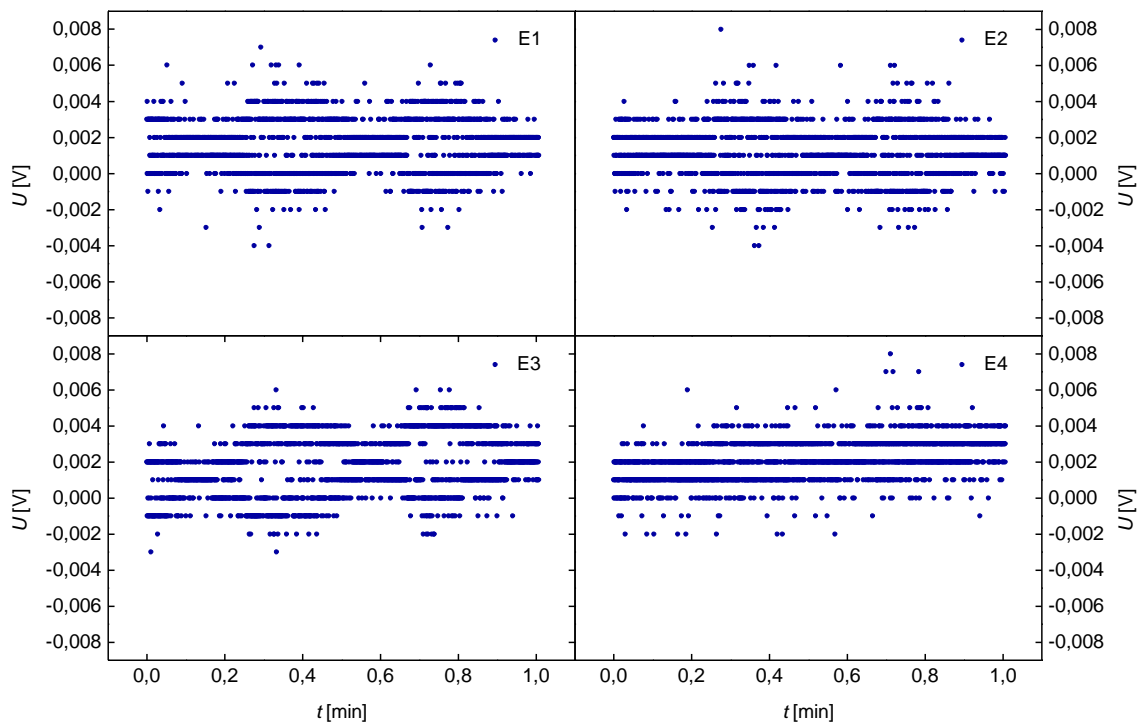
- Hlaváčková V. (2009) Physical and chemical signals and their action in systemic responses of plants to local wounding. In: *New Plant Physiology Research*. (Devane R.T. ed.), Nova Science Publishers, New York, U.S.A., 43 – 95.
- Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J., Novák O., Špundová M., Strnad M. (2006) Electrical and chemical signals involved in short-term systemic photosynthetic responses of tobacco plants to local burning. *Planta* **225**: 235 – 244.
- Hlavinka J., Nožková-Hlaváčková V., Floková K., Novák O., Nauš, J. (2012). Jasmonic acid accumulation and systemic photosynthetic and electrical changes in locally burned wild type tomato, ABA-deficient *sitiens* mutants and *sitiens* pre-treated by ABA. *Plant physiology and biochemistry* **54**: 89 – 96.
- Houwink A. (1935) The conduction of excitation in *Mimosa pudica*. *Recueil des Travaux Botaniques Néerlandais* **32**, 51 – 91.
- Howe G.A. (2010) The roles of hormones in defence against insects and disease. In: *Plant hormones*. (Davides P.J. ed.), Springer, London, U.K., 646 – 680.
- Ilík P., Hlaváčková V., Krchňák P., Nauš J. (2010) A low-noise multi-channel device for the monitoring of systemic electrical signal propagation in plants. *Biologia Plantarum* **54**: 185 – 190.
- Janečková H. (2019) *Effect cytokinins on maintenance of photosystem II function during induced senescence*. Disertační práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Kaiser H., Grams T.E.E. (2006) Rapid hydropassive opening and subsequent active stomatal closure follow heat-induced electrical signals in *Mimosa pudica*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2087 – 2092.
- Koziolek CH., Grams T.E.E., Schreiber U., Matyssek R., Fromm J. (2003) Transient knockout of photosynthesis mediated by electrical signals. *New Phytologist* **161**: 715 – 722.
- Kučerová Z., Rác M., Mikulík J., Plíhal O., Pospíšil P., Bryksová M., Sedlářová M., Doležal K., Špundová M. (2020) Anti-senescence activity of cytokinin arabinosides. *Plant Physiology and Biochemistry*: v recenzním řízení.
- Lautner S., Grams T.E.E., Matyssek R., Fromm J. (2005) Characteristics of electrical signals in poplar and responses in photosynthesis. *Plant Physiology* **138**: 2200 – 2209.
- Liu X., Huang B. (2002). Cytokinin Effects on Creeping Bentgrass Response to Heat Stress: II. Leaf Senescence and Antioxidant Metabolism. *Crop Science* **42**: 466 – 472.
- Loof A.D. (2016) The cells self-generated “electrome” : the biophysical essence of the immaterial dimension of Life? *Communicative Integrative Biology* **1**: e1197446.
- Malone M. (1993) Hydraulic signals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **341**, 33 – 39.
- Malone M. (1996) Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Advances in Botanical Research* **22**, 163 – 228.
- Mancuso S. (1999) Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**, 55 – 61.
- Martins J. P. R., Santos E. R., Rodrigues L. C. A., Gontijo A. B. P. L., Falqueto A. R. (2018) Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of in vitro cultivated *Aechmea blanchetiana*. *Biologia Plantarum* **62**: 793 – 800.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangl J.L., Mittler R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* **84**: ra45.
- Mousavi S.A.R., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S., Farmer E.E. (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**: 422 – 426.
- Nožková V., Šmíd P., Horvát P., Hrabovský M. (2020) Nature of the primary systemic signal in plants after local damage—hydraulic surge or electrical signal? *New Phytologist*: v recenzním řízení.
- Nožková V., Šmíd P., Horváth P., Hrabovský M., Ilík P. (2018) Non-invasive monitoring of hydraulic surge propagation in a wounded tobacco plant. *Plant Methods* **14**: 1 – 9.
- Pickard B.G. (1973) Action potentials in higher plants. *The Botanical Review* **39**, 172 – 201.

- Prokopová J., Špundová M., Sedlářová M., Husičková A., Novotný R., Doležal K., Nauš J., Lebeda A. (2010) Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 716 – 723.
- Rejeb I.B., Pastor V., Mauch-Mani B. (2014) Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants* **3**: 458 – 475.
- Rittenberg D., Foster L. (1940) A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **133**: 727–744
- Rosa W. S., Martins J. P. R., Rodrigues E. S., De Almeida-Rodrigues L. C., Gontijo A. B. P. L., Falqueto A. R. (2018) Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the in vitro multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **133**: 339 – 350.
- Sambeek J.V., Pickard B. (1976) Mediation of rapid electrical, metabolic, transpirational, and photosynthetic changes by factors released from wounds. I. Variation potentials and putative action potentials. *Canadian Journal of Botany* **54**, 2642 – 2650.
- Stanković B., Witters D.L., Zawadzki T., Davies E., (1998). Action potentials and variation potentials in sunflower: an analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiologia Plantarum* **103**, 51 – 58.
- Stanković B., Zawadzki T., Davies E. (1997) Characterization of the variation potential in sunflower. *Plant Physiology* **115**, 1083 – 1088.
- Strnad M., Hanuš J., Vaněk T., Kamínek M., Ballantine J.A., Fussell B., Hanke D.E. (1997) Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus × canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry* **45**, 213 – 218.
- Sukhov V., Orlova L., Mysyagin S., Sinitsina J., Vodenev V. (2012) Analysis of the photosynthetic response induced by variation potential in geranium. *Planta* **235**: 703 – 712.
- Sukhov V., Sukhova E., Vodenev V. (2019). Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **146**: 63 – 84.
- Sukhova E., Akinchits E., Sukhov V. (2017) Mathematical models of electrical activity in plants. *The Journal of Membrane Biology* **250**: 407 – 423.
- Svačinová J., Novák O., Plačková L., Lenobel R., Holík J., Strnad M., Doležal K. (2012) A new approach for cytokinin isolation from *Arabidopsis* tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**: 17.
- Špundová M. (2019) *Leaf senescence as a light-dependent process*. Habilitační práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Toyota M., Spencer D., Sawai-Toyota S., Jiaqi W., Zhang T., Koo A.J., Howe G.A., Gilroy S. (2018) Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* **361**: 1112 – 1115.
- Vodenev V., Akinchits E., Sukhov V. (2015). Variation potential in higher plants: mechanisms of generation and propagation. *Plant Signaling & Behavior* **10**: e1057365.
- Vodenev V., Mudrilov M., Akinchits E., Balalaeva I., Sukhov V. (2018). Parameters of electrical signals and photosynthetic responses induced by them in pea seedlings depend on the nature of stimulus. *Functional Plant Biology* **45**: 160 – 170.
- Vodenev V., Orlova A., Morozova E., Orlova L., Akinchits E., Orlova O., Sukhov V. (2012). The mechanism of propagation of variation potentials in wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* **169**: 949 – 954.
- Wildon D.C., Thain J.F., Minchn P.E.H., Gubb I.R., Reily A.J., Skipper Y.D., Doherty H.M., O'Donnell P.J., Bowles D.J. (1992) Electrical signaling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* **360**: 62 – 65.
- Záhejský J. (2002) *Elektrina a magnetismus*. VUP Olomouc: Univerzita Palackého, 236 s.
- Zhang H., Zhang H., Lin J. (2020). Systemin-mediated long-distance systemic defense responses. *New Phytologist* **226**: 1573 – 1582.
- Zimmermann M.R., Maischak H., Mithofer A., Boland W., Felle H.H. (2009) System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology* **149**: 1593 – 1600.

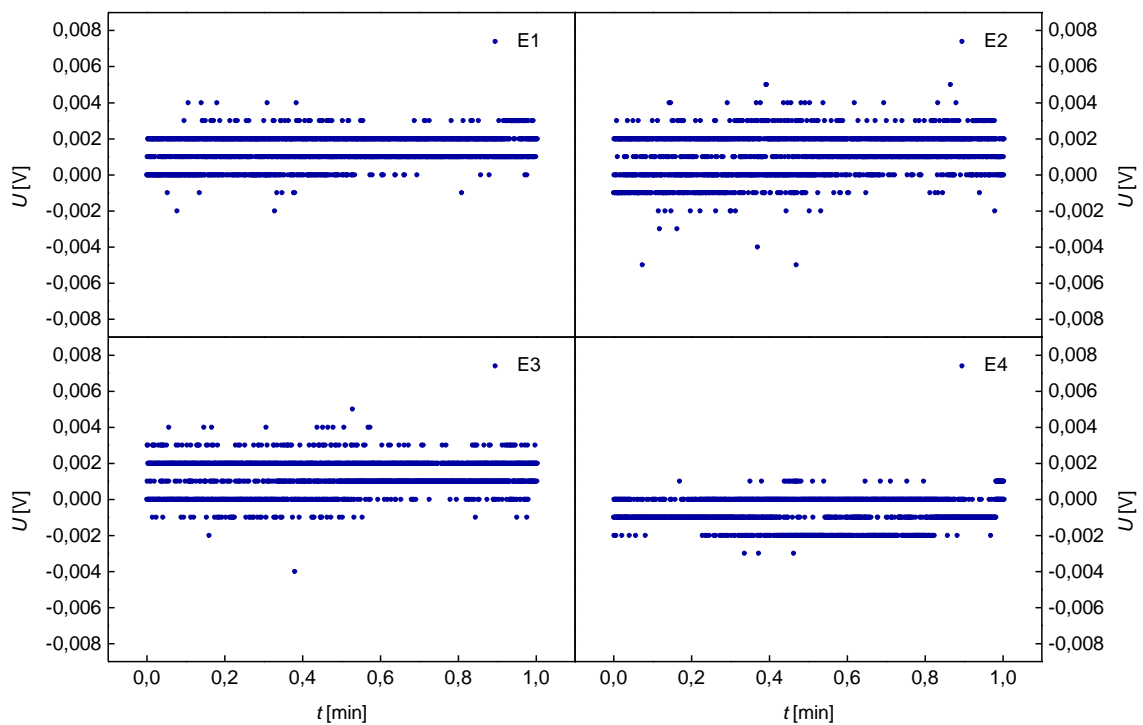
Příloha A: Šum aparatury pro měření elektrických signálů



Obr 1: Průběh signálu detekovaného elektrodami E1-E4 na listech rostliny rajčete po dobu 60 s při vzorkovací frekvenci 33,3 Hz se zavřenou Faradayovou klecí.



Obr. 2: Průběh signálu detekovaného elektrodami E1-E4 na listech rostliny rajčete po dobu 60 s při vzorkovací frekvenci 33,3 Hz s otevřenou Faradayovou klecí.



Obr. 3: Průběh signálu detekovaného elektrodami E1-E4 na listech rostliny rajčete po dobu 60 s při vzorkovací frekvenci 33,3 Hz s otevřenou Faradayovou klecí a připojeném gazometrické komůrky na protistojný lístek elektrody E1.

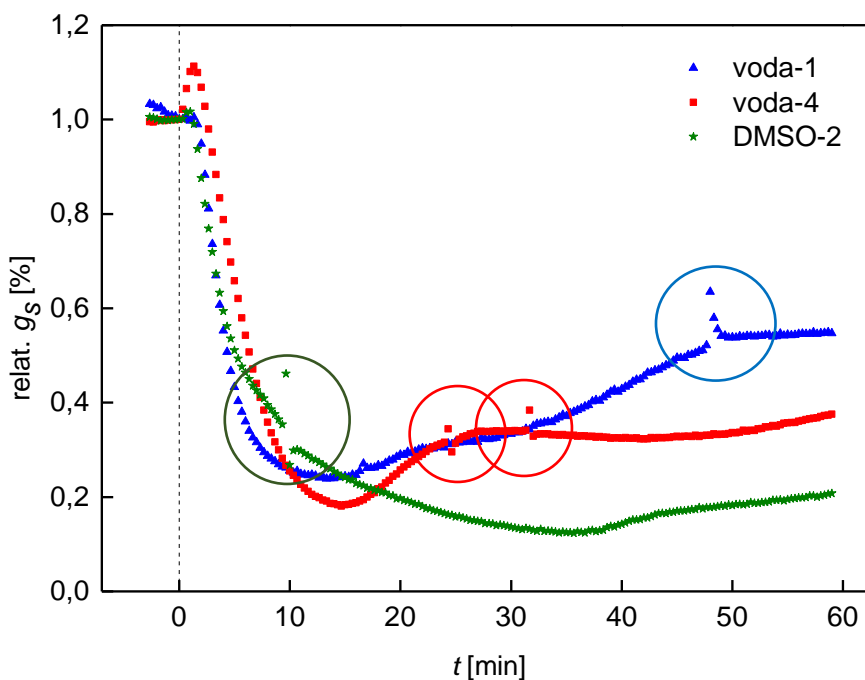
Po připojení elektrod k listům rajčete se úroveň signálu pohybovala mezi hodnotami -4 mV a 6 mV, jak je znázorněno v obrázku 1. Je zajímavé, že obálka signálu má jistý periodický tvar připomínající stojaté kmity. Frekvence těchto kmitů je nízká, dala by se totiž očekávat frekvence kmitů odpovídající frekvenci střídavého napětí ze sítě. Tato nízká frekvence by mohla být způsobena elektronikou předzesilovače, či rušením elektromagnetickým polem o této frekvenci. Měření bylo zopakováno ve stejném nastavení ovšem se zavřenou Faradayovou klecí. Úroveň signálu lehce klesla a jeho hodnota se pohybovala v rozmezí -3 mV až 4 mV, znázorněno v obrázku 2. Z průběhu obálky signálu lze vidět, že se částečně odstranil efekt stojatých vln. Porovnáním těchto průběhů signálu pro jednotlivé elektrody se došlo k závěru, že při otevření klece se zvýší amplituda signálu a efekt periodicity signálu (přítomnost významné nízkofrekvenční složky). Tento fakt ukazuje nejspíše na ovlivnění měření elektromagnetickou vlnou o této frekvenci, které je při zavřené kleci významně utlumeno.

Další otázkou bylo, zda mohl šum aparatury ovlivnit konzole LI-6400 která byla částečně umístěna uvnitř Faradayově kleci. Konzole LI-6400 byla umístěna uvnitř klece a tělo LI-6400 bylo umístěno vedle klece, kdy kostra měřící konzole byla vodivě

spojena s klecí. GK byla umístěna na list rajčete. Poloha elektrod na listech rajčete byla zachována v souladu s předchozím nastavením a klec otevřena. V obrázku 3 je znázorněn změřený signál po připojení GK na lístek. Při takto zopakovaném experimentu se úroveň signálu významně nezměnila a jeho hodnota se pohybovala v rozmezí – 3 mV až 4 mV, takový výsledek jsme neočekávali. Předpokládali jsme, že umístění elektrického zařízení uvnitř klece bude mít dopad v nárůstu šumu aparatury. Tedy lze říct, že umístění měřící cely do prostoru Faradayovy klece neovlivňuje velikost šumu aparatury. Zajímavé ale je, že úroveň signálu (v případě kdy efekt stojatých vln téměř vymizel) poklesla i s porovnáním průběhu signálu při zavřené kleci.

Závěrem můžeme říct, že měření s otevřenou klecí neměl za následek velmi výrazný nárůst šumu, který byl očekáván. Měření experimentů s otevřenou Faradayovou klecí by nemělo být zásadně tímto ovlivněno a je proto možné jej uskutečnit. Ani připojení LI – 6400 šum zásadně neovlivnilo a tedy ani v tomto případě nejsou na místě výhrady k takovému měření.

Příloha B: Výměna baterie/autobaterie u LI-6400

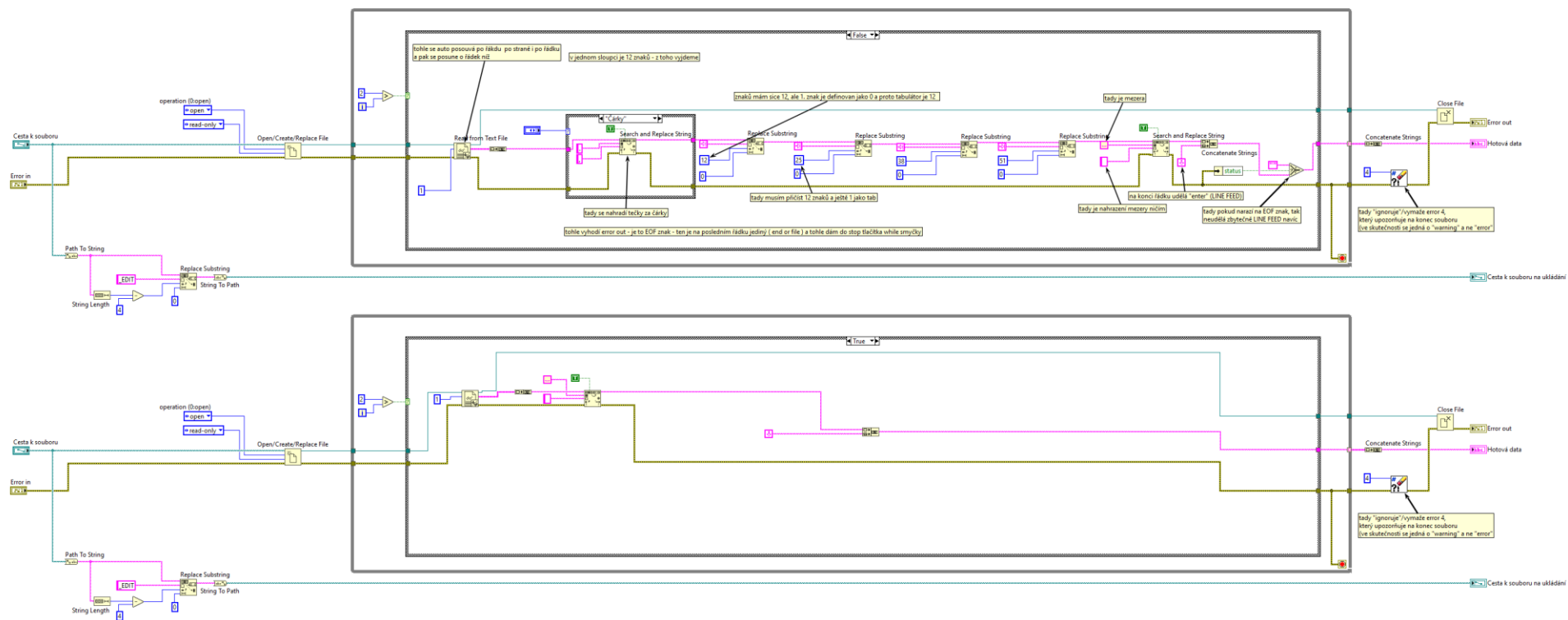


Obr. 1: Znárodné průběhy g_s rostlin rajčete u kterých během měření došlo k výměně baterie/autobaterie. Oblasti datové řady před, během a po výměně baterie/autobaterie jsou vyznačeny kružnicí o barvě, která odpovídá barvě datové řady.

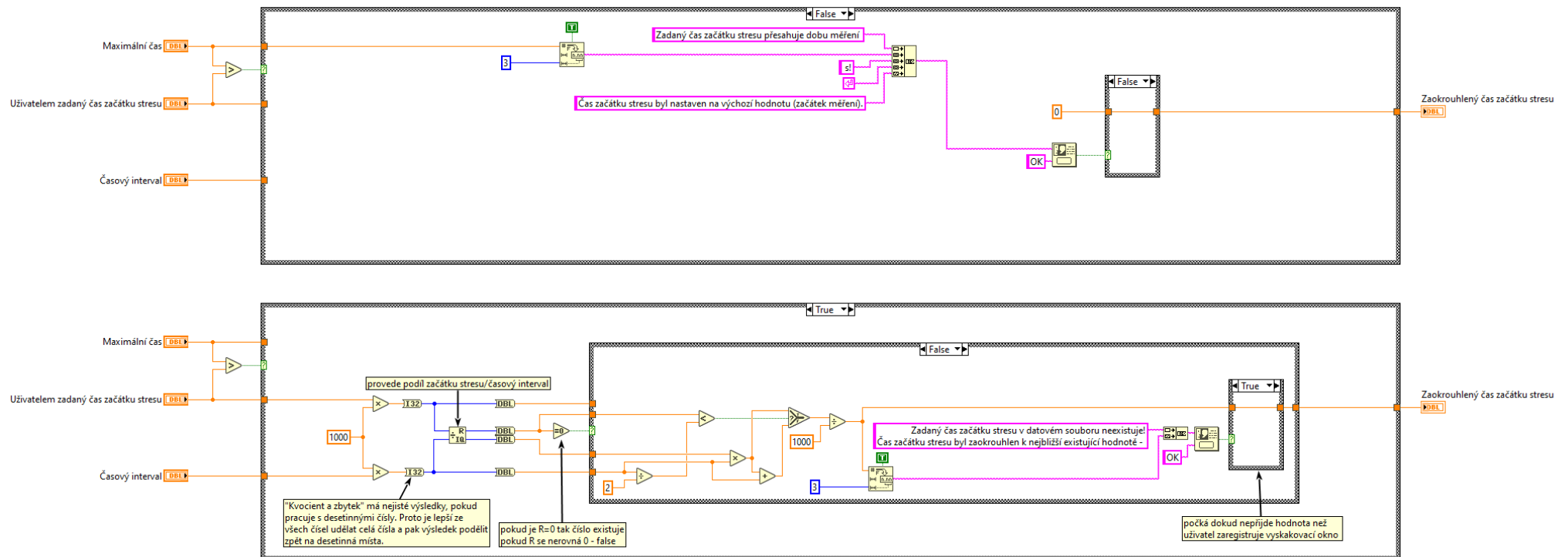
Zdroj napájení LI – 6400 by neměl vnášet šum do měření, z toho důvodu byly pro měření zvoleny baterie a autobaterie. Pokud byl přístroj napájen ze sítě, šum výrazně narostl. LI – 6400 má vysokou hodnotu příkonu a při poklesu kapacity napájecí baterie pod 40 % vyžaduje její výměnu. V obrázku 1 jsou uvedeny rostliny rajčete u kterých při měření došlo k výměně baterie/autobaterie. Jak je z datových řad patrné, po výměně dochází k výskytu artefaktů, a to krátkodobých píků (40 – 80 s). Odskok hodnot je závislý na tom jak silně nabitou baterii či autobaterii nahrazujeme za téměř vybitou baterii či autobaterii. Při výměně baterie za autobaterii je pozorovatelný artefakt silnější (zelená a modrá kružnice) nejspíše z důvodu vyšší kapacity autobaterie. U vody-1 došlo při první výměně omylu a baterie byla vyměněna za baterii s nedostatečnou kapacitou, tedy po několika minutách byla nutná opětovná výměna. Tyto artefakty jsou nejspíše způsobeny krátkým zvýšením napětí v přístroji po připojení plně nabitě baterie/autobaterie, či vzniku přepět'ové špičky po připojení. Pro výpočet jednotlivých měřených veličin přístroj využívá mnoho údajů z měřicí cely, mezi které patří i napětí. Hodnoty, které vykazují tento artefakt po výměně baterie byly ze souboru dat vyloučeny, protože se jedná o přístrojovou funkci. Tento úkaz je problematický, protože ovlivňuje

měření a pokud dojde k výměně baterie v oblastech měření, kdy je třeba detekovat rychlé změny, tak přicházíme o tuto informaci a není možné data interpretovat. Řešením pro dlouhotrvající měření (déle jak 4 h) je použití napájecího napětí ze sítě, kdy bude toto napětí před vstupem do přístroje LI-6400 korigováno pomocí elektronických zařízení vhodných pro minimalizaci šumu ze sítě jakou jsou síťové filtry a EMI filtry. Pro krátkodobé měření je vhodné si zajistit plně nabitě baterie/autobaterii, aby poklesla pravděpodobnost výměny.

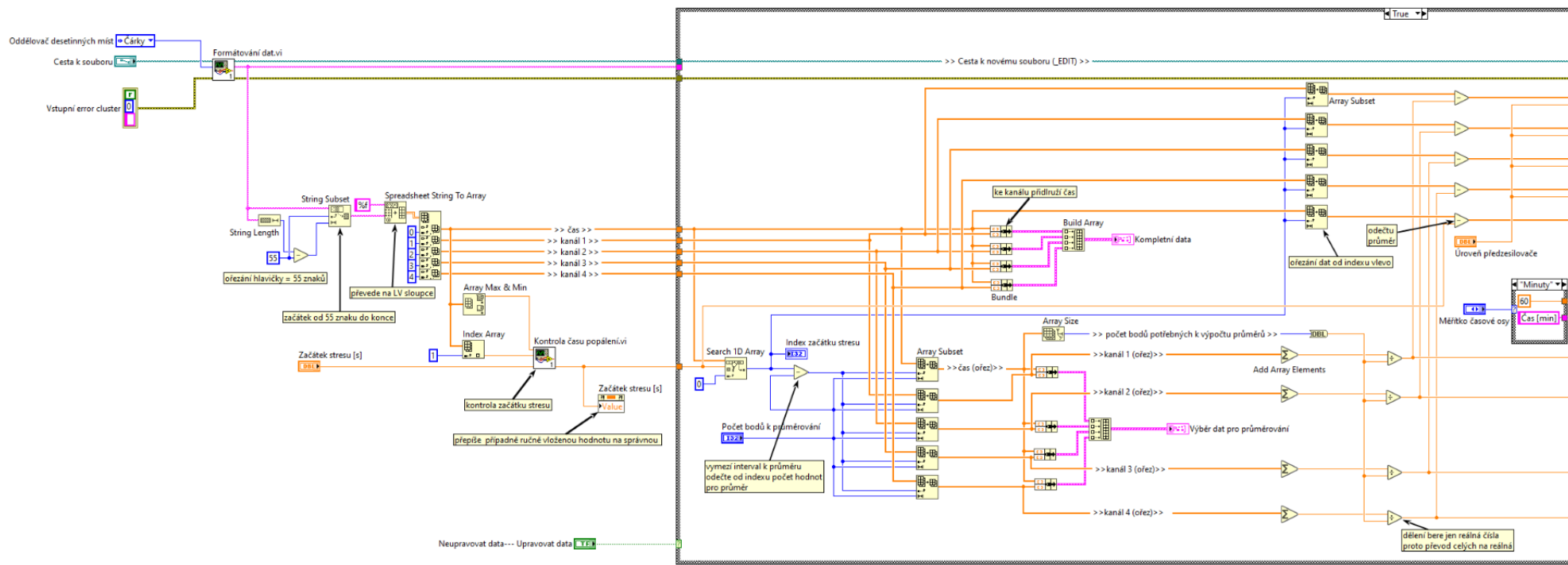
Příloha C: Aplikace na úpravu dat



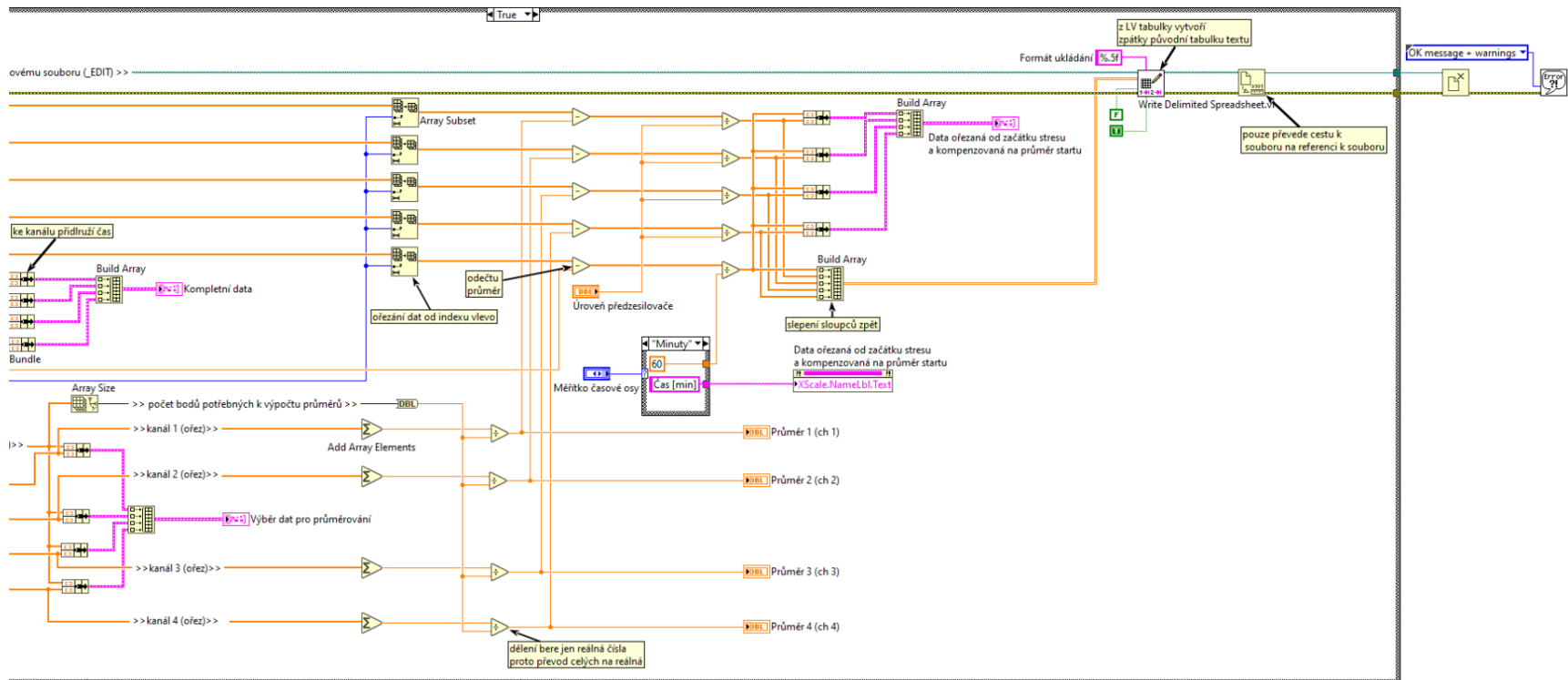
Obrázek 1: LabVIEW podprogram pro formátování dat – blokový True a False diagram.



Obrázek 2: LabVIEW podprogram pro kontrolu zadaného času začátku stresu – blokový True a False diagram.



Obrázek 3: 1/2 LabVIEW hlavního programu.



Obrázek 4: 2/2 LabVIEW hlavního programu.