

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv anestetik na světlem indukovaný pohyb
chloroplastů a otevírání průduchů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Otakar Savara
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok:	2020

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

V Olomouci dne

podpis diplomanta

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Martině Špundové, Ph.D., za příkladné vedení, rady a podněty při vypracování diplomové práce, jako i za věnovaný čas při získávání a zpracování výsledků experimentální části. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D., za vedení a spolupráci při gazometrických experimentech a Mgr. Markovi Rácovi, Ph.D., za vedení a pomoc při pozorování vzorků v konfokálním mikroskopu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Otakar Savara
Název práce	Vliv anestetik na světlem indukovaný pohyb chloroplastů a otevírání průduchů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení biofyziky
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt:

V diplomové práci jsme se zabývali účinkem anestetik éteru a lidokainu na pohyby chloroplastů a otevírání průduchů vyvolané světlem. Tyto procesy řízené rostlinnými fotoreceptory fototropiny (phot1 a phot2) jsou důležité pro efektivní fungování fotosyntézy a tedy i pro růst rostlin. Efekt anestetik na pohyb chloroplastů byl zkoumán u ječmene, lilku rajčete, tabáku a *Arabidopsis thaliana*, jejich efekt na otevírání průduchů byl stanovován u tabáku a *A. thaliana*. Pohyb chloroplastů byl měřen pomocí změn kolimované transmitance listů vyvolaných působením slabého a silného modrého světla v případě tabáku a *A. thaliana* byly dále sledovány pozice chloroplastů konfokálním mikroskopem. Otevírání průduchů bylo měřeno pomocí gazometrie, kdy jsme zároveň stanovovali rychlost fotosyntézy a koncentraci CO₂ v mezibuněčných prostorech. V listech tabáku byla po aplikaci éteru zjištěna statisticky významná inhibice akumulčního pohybu chloroplastů, otevírání průduchů a fotosyntézy. Efekt lidokainu na pohyb chloroplastů a otevírání průduchů jsme u měřených rostlin nepotvrdili. Domníváme se, že v případě vlivu éteru na akumulční pohyb chloroplastů tabáku mohla být ovlivněna funkce fototropinů lokalizovaných u plazmatické membrány. Inhibici otevírání průduchů listů tabáku éterem přisuzujeme jeho možnému inhibičnímu vlivu na H⁺-ATPasy a K⁺ kanály v plazmatické membráně svěracích buněk průduchů. Roli při větším uzavření průduchů po aplikaci éteru mohly sehrát i reaktivní formy kyslíku, které v rostlinách po jeho působení vznikají.

Klíčová slova	Pohyb chloroplastů, otevírání průduchů, fototropin, éter, lidokain
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Otakar Savara
Title	Effect of anesthetics on light-induced chloroplast movement and stomatal opening
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biophysics
Supervisor	doc. RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract:

In diploma thesis we studied effect of anesthetics ether and lidocaine on light-induced chloroplast movements and stomatal opening. These processes controlled by plant photoreceptors phototropins (phot1 and phot2) are important for proper function of photosynthesis and therefore for plant growth. The effect of anesthetics on chloroplast movement was studied in barley, tomato, tobacco and *Arabidopsis thaliana*, their effect on stomatal opening was studied in tobacco and *A. thaliana*. Chloroplast movement was measured by changes of collimated leaf transmittance caused by weak and strong blue light. In tobacco and *A. thaliana* we also determined chloroplast positions by confocal microscope. Stomatal opening was, simultaneously with photosynthetic rate and CO₂ concentration in intercellular spaces, measured by gasometer. Ether caused statistically significant inhibition of chloroplast accumulation movement, stomatal opening and photosynthetic rate in tobacco leaves. After lidocaine application, we did not find significant changes in chloroplast movement and stomatal opening in any of measured plant species. We assume that inhibition of chloroplast accumulation movement in tobacco by ether could be connected with impaired function of phototropins localized at plasma membrane. Inhibition of stomatal opening in tobacco by ether may be caused by his possible effect on H⁺-ATPases and K⁺ channels in plasma membrane of stomatal guard cells. Ether-caused stomatal closure could also be related with production of reactive oxygen species.

Keywords	Chloroplast movement, stomatal opening, phototropin, ether, lidocaine
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
	2.1 Anestezie	3
	2.1.1 Hledání jednotného mechanismu působení anestetik	4
	2.1.2 Anestezie a rostliny	6
	2.1.2.1 Vliv anestetik na chloroplasty.....	6
	2.1.2.2 Vliv anestetik na pohyby rostlin	7
	2.1.2.3 Vliv anestetik na další procesy v rostlinách.....	8
	2.2 Pohyb chloroplastů.....	11
	2.2.1 Molekulární aspekty pohybu chloroplastů.....	13
	2.2.1.1 Fototropiny.....	13
	2.2.1.2 Vápenaté ionty	16
	2.2.1.3 Cp-aktin	16
	2.2.2 Měření pohybu chloroplastů pomocí změn transmitance	18
	2.3 Otvírání průduchů.....	20
	2.3.1 Měření otevřenosti průduchů a rychlosti fotosyntézy	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
	3.1 Materiál a metody.....	24
	3.1.1 Aplikace anestetik	24
	3.1.1.1 Aplikace éteru	24
	3.1.1.2 Aplikace lidokainu	27
	3.1.2 Pohyb chloroplastů.....	28
	3.1.3 Otvírání průduchů.....	32
	3.1.4 Mikroskopická měření	33
	3.1.5 Statistické vyhodnocení	33
	3.1.6 Fotodokumentace	34
4	VÝSLEDKY	35
	4.1 Pohyb chloroplastů.....	35
	4.1.1 Měření na stejném listu jedné rostliny	35
	4.1.1.1 Ječmen	35
	4.1.1.2 Lilek rajče	37
	4.1.1.3 <i>A. thaliana</i>	40
	4.1.2 Měření na různých rostlinách.....	42
	4.1.2.1 <i>A. thaliana</i>	43
	4.1.2.1.1 Vliv éteru	43
	4.1.2.1.2 Vliv lidokainu	45
	4.1.2.2 Tabák	47
	4.1.2.2.1 Vliv éteru	47
	4.1.2.2.2 Vliv lidokainu	49
	4.1.2.2.3 Akumulační pohyb měřený pomocí chlorofylmetru.....	50
	4.2 Otvírání průduchů.....	51
	4.2.1 Tabák.....	51
	4.2.1.1 Vliv éteru	51
	4.2.1.2 Vliv lidokainu	55

4.2.2	<i>A. thaliana</i>	57
5	DISKUSE	60
5.1	Vliv anestetik na pohyb chloroplastů	61
5.2	Vliv anestetik na otevírání průduchů	64
6	ZÁVĚR	67
7	LITERATURA	68
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	74

Cíle práce

Teoretická část:

- Vypracovat přehled problematiky o vlivu anestetik na rostliny (se zaměřením na chloroplasty a reakce průduchů).

Praktická část:

- Vypracovat metodiku aplikace vybraných plynných a kapalných anestetik na listy modelových rostlin v kombinaci s měřením pohybu chloroplastů a otevírání průduchů.
- Seznámit se s metodikou stanovení polohy chloroplastů v buňkách pomocí konfokálního mikroskopu u listů adaptovaných na tmu a po aplikaci intenzivního modrého světla.
- Seznámit se s metodikou gazometrického měření otevřenosti průduchů pomocí gazometru LI-Cor-6400.
- Na vybraných modelových rostlinách změřit světlem indukovaný pohyb chloroplastů a světlem indukované otevírání průduchů bez aplikace a po aplikaci různých anestetik.
- Pro vybrané případy doložit pozici chloroplastů v buňkách snímky z konfokálního mikroskopu.
- Zpracovat výsledky měření, porovnat světlem indukovaný pohyb chloroplastů a otevírání průduchů u rostlin bez vlivu a pod vlivem anestetik, zhodnotit vliv anestetik.

1 ÚVOD

Anestetika byla objevena před více než 170 lety, mechanismus jejich účinku na živé organismy však stále není zcela objasněn. Výzkum anestetik se zaměřuje primárně na živočichy, v posledních letech se však začíná věnovat pozornost i zkoumání jejich vlivu na rostliny. V diplomové práci jsme se zabývali vlivem anestetik na pohyby chloroplastů a otevírání průduchů, rostlinné procesy řízené specifickými rostlinnými fotoreceptory fototropiny.

Pohyby chloroplastů a otevírání průduchů (stomat) na světle jsou procesy společné většině vyšších rostlin. Rozlišujeme dva druhy světlem indukovaného pohybu chloroplastů – únikový a akumulární pohyb. Únikový pohyb je u většiny rostlin vyvoláván silným světlem (přesněji jeho modrou složkou, BL) a slouží k ochraně před poškozením fotosyntetického aparátu nadměrnou ozářeností. Akumulární pohyb nastává v reakci na slabé BL a slouží rostlině k efektivnímu využití světla v podmínkách, kdy je ho nedostatek (Wada, 2013). Průduchy se nacházejí na většině orgánů přicházejících do kontaktu s atmosférou, nejvíce však na spodní (abaxiální) straně listů. Regulují výměnu plynů mezi rostlinou a okolím, optimalizují fixaci oxidu uhličitého a regulují ztrátu vody (Sack, 1987). Pohyby chloroplastů a regulace otevřenosti stomat patří mezi rostlinné procesy důležité pro efektivní fungování fotosyntézy a tedy i pro růst a vývoj rostlin.

Při úvahách o tom, zda mohou být pohyby chloroplastů a otevírání průduchů ovlivněny anestetiky, se musíme zamyslet nad potencionálními cíli jejich působení v signálních kaskádách zkoumaných rostlinných procesů. Jedním z předpokládaných míst působení anestetik v živých buňkách jsou buněčné membrány a iontové kanály, které se v nich nacházejí. Nedávno bylo zjištěno, že působení éteru blokuje vznik akčních potenciálů plazmatické membrány a následně uzavírání listových pastí mucholapky podivné (*Dionaea muscipula* Ellis) a sklápění listů citlivky stydlivé (*Mimosa pudica* L.) po mechanickém stimulu (Yokawa *et al.*, 2018). Předpokládá se, že inhibice zmíněných pohybů rostlinných orgánů by mohla být způsobena vlivem anestetik na napětím řízené vápníkové kanály membrán. Bylo totiž zjištěno, že v případě citlivky stydlivé dochází při sklápění listů k výrazným změnám na úrovni cytoskeletu (Kanzawa *et al.*, 2006), které souvisejí právě s akčním potenciálem membrán a změnami v obsahu Ca^{2+} vyvolanými činností vápníkových kanálů (Yao *et al.*, 2008). U pohybu chloroplastů není signální kaskáda úplně objasněna, neví

se tedy, zda v ní vystupují procesy spojené s přenosem signálu pomocí membránového potenciálu nebo s transportem iontů přes membrány. Je však známo, že při akumulacím pohybu chloroplastů, ke kterému dochází při působení světla o nízké intenzitě, se uplatňují oba typy fototropinů lokalizované u plazmatické membrány (Wada, 2013). V případě fototropinu 1 (phot1), který je při řízení akumulacím pohybu oproti fototropinu 2 (phot2) efektivnější (díky větší citlivosti na světlo), bylo ukázáno, že jeho funkce při signalizaci je obecně spjata s lokalizací u plazmatické membrány (Preuten *et al.*, 2015). U světlem řízeného otevírání průduchů je oproti pohybům chloroplastů známá celá signální kaskáda, ve které hrají klíčovou roli membránové H⁺-ATPasy a K⁺ kanály, potencionální cíle působení anestetik.

Kromě výše zmíněných pohybů rostlinných orgánů mucholapky podivné a citlivky stydlivé mají anestetika vliv na řadu dalších rostlinných procesů. Působí např. na aktinový cytoskelet (Baluška a Mancuso, 2019), fotosyntézu (Šeršeň *et al.*, 1990; Grémiaux *et al.*, 2014), vezikulární transport, syntézu chlorofylu, klíčení semen nebo produkci kyslíkových radikálů (Yokawa *et al.*, 2018). O jejich vlivu na pohyby chloroplastů a otevírání stomat vyvolané světlem není však dle našich informací nic známo.

S využitím doposud známých informací o vlivu anestetik na rostliny mohou výsledky diplomové práce přispět k prohloubení znalostí mechanismu signalizace pohybu chloroplastů a otevírání stomat. Diplomová práce může zároveň sloužit jako zdroj prvotních informací pro případný budoucí výzkum vlivu anestetik na pohyby chloroplastů a otevírání průduchů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Anestezie

Anestezie je definována jako reverzibilní ztráta vědomí nebo lokální znecitlivění určité části lidského těla, anestetikum pak jako látka schopná navodit anestezii. Citlivost vůči anestetikům je vlastností, kterou sdílejí všechny živé organismy (Grémiaux *et al.*, 2014). Dle Sonnera (2008) je schopnost reagovat na anestetika esenciální pro život. První anestetikum bylo objeveno v roce 1846 Williamem T. Mortonem. Jeho veřejná demonstrace použití éteru jako látky, díky níž je možné vyvolat vratnou ztrátu vědomí, znamenala převrat v lidské medicíně. Dnes se pro výkon bolestivých lékařských zákroků využívají podle požadovaného rozsahu působení anestetika celková a lokální. První jmenovaná vyvolávají celkovou anestezii – reverzibilní stav organismu vyznačující se ztrátou vědomí, svalovou relaxací a sníženou odpovědí na stres. Při celkové anestezii jsou zachovány fyziologické funkce. Mezi celková anestetika patří éter, halotan, isofluran nebo oxid dusný (rajský plyn). Lokální anestetika blokují vznik a vedení vzruchů (Strichartz a Ritchie, 1987), což vede ke ztrátě vnímání bolesti v určité oblasti. Mezi lokální anestetika patří např. lidokain, benzokain nebo tetrakain.

Anestetika v živých organismech působí na celou řadu procesů. Mají vliv mj. na dýchací řetězec mitochondrií u rostlin i živočichů (Klein a Koeppel, 1985; La Monaca a Fodale, 2012) a fotosyntézu chloroplastů (Nakao *et al.*, 1998), tedy procesy související s produkcí ATP. Je známo, že některé subcelulární procesy založené na funkci cytoskeletu, jako např. proudění cytoplazmy a fagocytóza, jsou inhibovány působením anestetik (Garcia-Sierra a Frixione, 1993; Kiefer *et al.*, 2003; Baluška a Mancuso, 2019). Poměrně známý fenomén je působení anestetik na receptory neurotransmiterů, na iontové kanály řízené napětím a na kanály, které udržují membránový potenciál (např. Na⁺ a K⁺ kanály) (Huang *et al.*, 2015; Denomme *et al.*, 2019; Kelz a Mashour, 2019). V živých organismech se látky s anestetickými účinky nacházejí i endogenně. U rostlin se předpokládá, že endogenní látky s anestetickými účinky hrají úlohu v situacích, kdy rostliny čelí stresovým faktorům a při navozování a ukončování dormance (Tsuchiya, 2017; Yokawa *et al.*, 2019). V případě hub a bakterií se uplatňuje etylén, který tyto organismy produkují při stresových situacích. U člověka a živočichů jsou indicie existence endogenních anestetik schopných navodit ztrátu vědomí (Sonner a Cantor, 2013). Známé jsou případy dočasné ztráty vědomí při různých stresových situacích,

vážných zraněních nebo silných emocionálních zážitcích (Burton, 1988; Rose da Silva, 2014; Baluška *et al.*, 2016). Tento fenomén pravděpodobně vznikl v dávných dobách jako efektivní obranný mechanismus poskytující mimo jiné ochranu před přílišným zaplavením sensorů vzruchy (Diehl, 2005; Rose da Silva, 2014). Vysoké koncentrace anestetik mohou působit na živé organismy i toxicky a vést u rostlin i živočichů k poškození (De Luccia, 2012; El-Boghdadly *et al.*, 2018). U lidí jsou známé případy předávkování anestetiky vedoucí až k zástavě dýchání a smrti.

2.1.1 Hledání jednotného mechanismu působení anestetik

Variabilita reakcí živých organismů na anestetika je v porovnání s jinými chemickými látkami velmi malá. Na jedné straně máme substance o odlišném chemickém složení, na straně druhé pak velmi podobné účinky, které tyto látky způsobují. To vybízí k hledání jednotného mechanismu působení anestetik, který však nebyl doposud popsán. V následující kapitole jsou chronologicky zmíněny teorie, které se dostaly do popředí.

Claude Bernard byl lékař a jeden z nejvýznamnějších francouzských vědců. I když anestezie nebyla jeho hlavní oblastí působnosti ve vědě, je považován za průkopníka farmakologického výzkumu anestetik a jejich praktických aplikací. Při experimentech s chloroformem si všiml jeho reverzibilního inhibičního efektu na kontrakce svalů a vedení vzruchů nervy. Po vymytí chloroformu fyziologickým roztokem se tkáním citlivost navrátila. Podobný efekt pozoroval i u éteru a alkoholu. Domníval se, že anestetika způsobují vratné srážení chemických složek svalů a nervů, zejm. proteinů. Tyto poznatky uveřejnil v roce 1875 (Leake, 1971).

Nezávisle na sobě vydali Hans Horst Meyer (v roce 1899) a Charles Ernest Overton (v roce 1901) publikace, ve kterých označili jako klíčovou vlastnost, kterou sdílejí látky s anestetickými účinky, rozpustnost v tucích. I když neurčili žádný konkrétní molekulární cíl anestetik, byla jim na základě této teorie často označována lipidová membrána. Odtud pochází označení Meyer-Overtonova „lipoidní“ hypotéza. Meyer a Overton označili rozpustnost v tucích jako vlastnost určující míru anestetického účinku. Čím více je daná látka rozpustná v tucích (v jejich případě v olivovém oleji), tím větší je její anestetický účinek (Meyer, 1937; Krasowski, 2003). Své poznatky potvrdili experimentálními důkazy, nicméně pochybnosti do jejich hypotézy vnášejí látky, které působí anesteticky, ale jejich rozpustnost v tucích je nízká (např. α -chloralosa nebo chloralhydrát), nebo naopak sloučeniny, jejichž rozpustnost v tucích je vysoká, ale

nevyznačují se anestetickými účinky (např. flurothyl). Další skupinou látek, které odporují jejich hypotéze, jsou pak sloučeniny se stejnou rozpustností v tucích, ale s odlišným anestetickým účinkem (např. optické izomery anestetik). Není tedy vyloučeno, že souvislost rozpustnosti látek v tucích a anestetického účinku je náhodná a v širším pojetí nevysvětluje jejich účinnost (Krasowski, 2003).

V roce 1984 přišli N. P. Franks a W. R. Lieb s teorií, že anestetika mohou fungovat na principu kompetitivní inhibice specifických proteinových receptorů (tzv. protein-receptorová hypotéza). Svoji teorii demonstrovali pomocí enzymu luciferasa. V přítomnosti 0,45 mM halotanu (uhlovodíkový halogenderivát používaný jako inhalační celkové anestetikum) se aktivita luciferasy snížila oproti kontrolnímu experimentu na 30 %. Franks a Lieb zjistili, že halotan se váže na luciferasu na vazebném místě pro luciferin (Franks a Lieb, 1984). Toto zjištění bylo důležité z toho hlediska, že byla ukázána interakce anestetik s hydrofobními vazebnými místy proteinů (zatímco Meyer-Overtonova teorie předpokládala, že anestetika interagují s lipidovou membránou) (Miller, 1985). I když byly jako cíle anestetik identifikovány i cytoplazmatické proteiny (např. protein kinasa C; Slater *et al.*, 1993), za nejpravděpodobnější molekulární cíle anestetik jsou nyní považovány Cys-loop receptory (skupina ligandem řízených iontových kanálů) (Franks a Lieb, 1994). Mezi ně patří např. receptory GABA (kyselina γ -aminomáselná). Známe 2 druhy těchto receptorů, A a B. Aktivace GABA_A receptorů působí inhibičně na přenos nervových vzruchů snížením rychlosti šíření akčního potenciálu. Kromě vazebného místa pro kyselinu γ -aminomáselnou obsahují GABA_A receptory i další alosterická vazebná místa, na která se mohou vázat mj. právě anestetika. Velké množství dnes používaných látek s anestetickými účinky (propofol, etomidát, metohexital, tiopental, isofluran, sevofluran a desfluran) působí právě na GABA_A receptory (Garcia *et al.*, 2010; Olsen a Li, 2011; Brohan a Goudra, 2017). Teorie proteinového receptoru jako cíle působení anestetik se jeví jako vhodná, nicméně je stále obtížně představitelné, že by místo na receptoru, které váže chemicky a strukturně specifický ligand, mohlo vázat i širokou škálu dalších molekul působících jako anestetika. Zdá se tedy, že podobně jako jiné, vysvětluje i tato teorie funkci pouze určité skupiny anestetických látek, nikoliv obecný mechanismus působení.

Dnes upřednostňovaný model působení anestetik předpokládá, že se u živočichů a člověka vážou na receptory neurotransmiterů, zejména receptory GABA a glutamátu. V posledních letech bylo zajímavým zjištěním, že se receptory GABA a glutamátu

nacházejí i v rostlinách, kde se zapojují do řízení růstu, vývoje a odpovědi na stres (Žárský, 2015; Weiland *et al.*, 2016). Podobně jako u živočichů a člověka, i u rostlin GABA snižuje a glutamát zvyšuje excitabilitu membrán. Předpokládá se, že u živočichů a člověka působí anestetika na napětím řízené iontové kanály v neuronech (Rinaldi, 2014), v rostlinách se však nacházejí podobné kanály. Z toho lze usuzovat, že by anestetika mohla působit v živých buňkách rostlin i živočichů na podobné cíle (Yokawa *et al.*, 2019).

2.1.2 Anestezie a rostliny

Vliv anestetik na rostliny byl objeven F. W. Clemensem v roce 1847, pouhý rok poté, co byl prokázán jejich účinek na živočichy. O vlivu na rostliny se toho však ví podstatně méně. Přitom se jedná o zajímavou oblast výzkumu, která se v posledních desetiletích dostává více do popředí a může pomoci prohloubit znalosti o účinku anestetik na živočichy, potažmo člověka.

2.1.2.1 Vliv anestetik na chloroplasty

V roce 1878 objevil Claude Bernard inhibiční efekt éteru na fotosyntézu. Rdest (*Potamogeton*) a zelená řasa šroubatka (*Spirogyra*) byly umístěny do uzavřených nádob obsahujících vodu a oxid uhličitý. Nádoby byly umístěny pod světlo při 25-30 °C. Do kontrolní nádoby byla umístěna hubka namočená v destilované vodě a do testovací nádoby hubka namočená v éteru. Posléze byl analyzován plyn v nádobách – v případě kontrolního experimentu byla atmosféra bohatá na kyslík, zatímco u testovací nádoby na oxid uhličitý. Éter tedy dle Bernarda způsobil inhibici fotosyntézy (Grémiaux *et al.*, 2014).

Šeršeň *et al.* (1990) popsali inhibiční vliv amfifilních aminů včetně prokainu, lidokainu, cinchokainu nebo mesokainu (které se používají jako lokální anestetika) na aktivitu donorové strany fotosystému II (PS II) a na aktivitu fotosystému I (PS I) izolovaných chloroplastů špenátu (*Spinacia oleracea* L.). Zmíněné aktivity byly měřeny pomocí elektronové spinové rezonance (ESR). Při aplikaci amfifilních aminů ESR signál odpovídající aktivitě donorové strany PS II klesal, přičemž míra poklesu rostla s koncentrací amfifilních aminů. Aktivita PS I se neměnila. Je známo, že přítomnost amfifilních aminů způsobuje nárůst fluidity lipidových membrán, narušení jejich struktury a uvolňování Ca²⁺ iontů (Račanský *et al.*, 1984). Šeršeň *et al.* (1990) tedy

předpokládali, že inhibice donorové strany lokálními anestetiky byla způsobena narušením struktury tylakoidních membrán, konformačními změnami proteinů v PS II a uvolněním iontů Mn^{2+} a Ca^{2+} . Tuto hypotézu podporuje fakt, že uvolnění Ca^{2+} iontů inhibuje funkci komplexu vyvíjejícího kyslík (OEC) a tedy produkci kyslíku v chloroplastech (De Riso *et al.*, 2006).

Podobný efekt anestetik (tetrakainu) na PS II související s uvolňováním Ca^{2+} z chloroplastů byl popsán i v izolovaných chloroplastech hrachu (*Pisum sativum* L.) (Semin *et al.*, 1990). Na izolovaných chloroplastech hrachu byla také popsána inhibice OEC lokálními anestetiky dibukainem, benzokainem a tetrakainem (Semin *et al.*, 1989). Bylo zjištěno, že inhibiční síla studovaných anestetik roste s iontovou silou a rostoucím pH inkubačního roztoku (Semin *et al.*, 1989). Působení lokálních anestetik na izolované chloroplasty hrachu tedy podle autorů nějakým způsobem souviselo s jejich elektrickým nábojem nebo s nábojem membrán. Inhibice PS II chloroplastů hrachu dibukainem a tetrakainem byla při alkalickém pH popsána i v práci Opanasenko *et al.* (2002).

U chloroplastů je dále známé inhibiční působení anestetik na syntézu chlorofylu. Kotyledony řeřichy seté ošetřené éterem, lidokainem nebo xenonem se vyznačovaly nažloutlou barvou a sníženým obsahem chlorofylu (Yokawa *et al.*, 2018).

2.1.2.2 Vliv anestetik na pohyby rostlin

Poměrně známým příkladem demonstrace efektu anestetik na rostliny je inhibiční účinek éteru na pohyb listů citlivky stýdlivé. Jako první tento experiment provedl v roce 1847 F. W. Clemens. Citlivka stýdlivá má dvojnásobně zpeřené listy. Řapíky se větví ve vřetena, která nesou až 15 párů úzkých, zašpičatělých lístků. Lístky reagují na dotyk, elektrický nebo tepelný podnět sklopením směrem dovnitř – vrchní (adaxiální) strany lístků daného páru se přiblíží k sobě. Řapíky a vřetena reagují na uvedené podněty sklopením dolů. Pohyb orgánů zajišťují pulviny – ztloustlé části, nacházející se na bázi řapíků, vřeten a lístků. Podráždění vyvolá lokální změnu elektrického potenciálu, která spustí řetězec reakcí vedoucích k modifikaci vnitřního tlaku a následné změně tvaru a objemu buněk v pulvinech, což vyvolá pohyb orgánů, které jsou na pulviny připojené (Coté 1995; Moran 2007; Yokawa *et al.*, 2018). Při aplikaci 15% éteru po dobu 1 h byl pohyb listů citlivky v reakci na dotyk kompletně inhibován, po 7 h byl opět plně obnoven (Yokawa *et al.*, 2018). Pohyby orgánů citlivky jsou rovněž závislé na cirkadiálních rytmech – v noci se listy složí, zatímco přes den zůstávají rozložené. Cirkadiální pohyby zůstaly neovlivněny, i když byla citlivost orgánů na vnější podněty

éterem narušena. Zdá se, že anestezie narušuje schopnost rostliny vnímat podnět, avšak schopnost pohybu zůstává nenarušena (Grémiaux *et al.*, 2014).

Dalším příkladem vlivu anestetik na pohyby rostlin je působení éteru na listové pasti mucholapky podivné. Po hodině působení 15% éteru ztratily rostliny mucholapky schopnost uzavřít listové pasti. Rostlina byla následně vyjmuta z atmosféry éteru a schopnost uzavřít listové pasti se po 15 min naplno obnovila. Souběžně byl v rostlině měřen akční potenciál a bylo zjištěno, že po působení éteru docházelo při odpovědi na mechanický stimul k jeho kompletnímu utlumení. Po odstranění éteru se začal obnovovat a po 15 min došlo k jeho kompletnímu obnovení (Yokawa *et al.*, 2018). Po působení éteru byla v mucholapce podivné dále inhibována signalizace pomocí kyseliny jasmonové a s ní spojené změny exprese genů, které jsou touto látkou spouštěny (transportní proteiny a trávicí enzymy vylučované do listových pastí). Po následné externí aplikaci kyseliny jasmonové (při stálém působení éteru) byla exprese genů obnovena, což naznačuje, že reakce nacházející se níže v signální kaskádě spouštěné kyselinou jasmonovou inhibovány nejsou (Pavlovič a Mithöfer, 2019; Pavlovič *et al.*, 2020).

Úponky hrachu setého (*P. sativum* L.) vykazují při růstu za normálních podmínek rotační pohyby, pomocí kterých se snaží ve volném prostranství nalézt oporu. Po působení 15% éteru došlo k okamžitému zastavení těchto pohybů a úponky byly imobilizovány ve stočené pozici. Při aplikaci 1% roztoku lokálního anestetika lidokainu na kořeny hrachu po dobu 5 h došlo k utlumení odpovědi úponků na mechanický podnět (dotyk). Citlivost se úponkům navrátila po 17 h po tom, co byl lidokain nahrazen destilovanou vodou (Yokawa *et al.*, 2018).

2.1.2.3 Vliv anestetik na další procesy v rostlinách

Další rostlinný proces, který je ovlivněn anestetiky, je klíčení semen. Řeřicha setá (*Lepidium sativum* L.) je známá rychlým klíčením semen, které je vyvoláno zvýšenou vlhkostí a teplotou okolo 25-30 °C. Zatímco semena v kontrolních podmínkách začínají klíčit po 2-3 dnech, v případě semen umístěných v nádobě s éterem dochází k zastavení klíčení. Po 4-5 dnech inkubace byl éter odstraněn a semena začala následující den klíčit. Stejných výsledků bylo dosaženo i v případě hlávkového zelí, tuřínu, lnu a ječmene (Grémiaux *et al.*, 2014; Yokawa *et al.*, 2018).

Anestetika mají dále vliv na vezikulární transport a produkci superoxidu. V kořenech *A. thaliana* byla po působení 15% éteru nebo 1% lidokainu zjištěna

kompletní nebo částečná inhibice procesu recyklace endocytotických vezikul (v uvedeném pořadí). Rovněž bylo v kořenech *A. thaliana* po působení 1% lidokainu, 15% éteru a směsi 80% xenonu s 20% kyslíkem pozorováno zvýšené množství superoxidu (Yokawa *et al.*, 2018).

Další strukturou buněk ovlivněnou anestetiky je aktinový cytoskelet. Ačkoliv je to často opomíjeno, aktinový cytoskelet napojený na buněčné membrány je funkčně i mechanicky spřažen s jejich akčními potenciály. Výše popsaná inhibice pohybů orgánů rostlin (listové pasti mucholapky podivné, úponky hrachu a listy citlivky stydlivé) anestetiky byla dle Yokawy *et al.* (2018) způsobena blokadou akčních potenciálů a endocytózy, která je závislá na aktinu. U rostlinných i živočišných buněk se předpokládá, že anestetika působí inhibičně na změny elektrochemického potenciálu (včetně akčních potenciálů) membrán, s čímž souvisí mj. i ovlivnění změn koncentrací Ca^{2+} , které jsou z velké části udržovány vápníkovými kanály řízenými napětím (Aguilera a Vaughan, 2000; White, 2000; Yokawa *et al.*, 2018). Je známo, že pohyby listů citlivky stydlivé jsou spojeny s výraznými změnami na úrovni cytoskeletu (Kanzawa *et al.*, 2006), které jsou ovlivněny právě membránovým potenciálem a změnami v obsahu Ca^{2+} (Yao *et al.*, 2008). Inhibice pohybu listů citlivky anestetiky by tedy mohla být způsobena inhibicí aktinového cytoskeletu blokadou změn membránového potenciálu a obsahu Ca^{2+} . Podobný scénář působení anestetik se předpokládá i u ostatních pohybů rostlin řízených akčními potenciály popsaných výše (úponky hrachu a listové pasti mucholapky podivné) (Yokawa *et al.*, 2018).

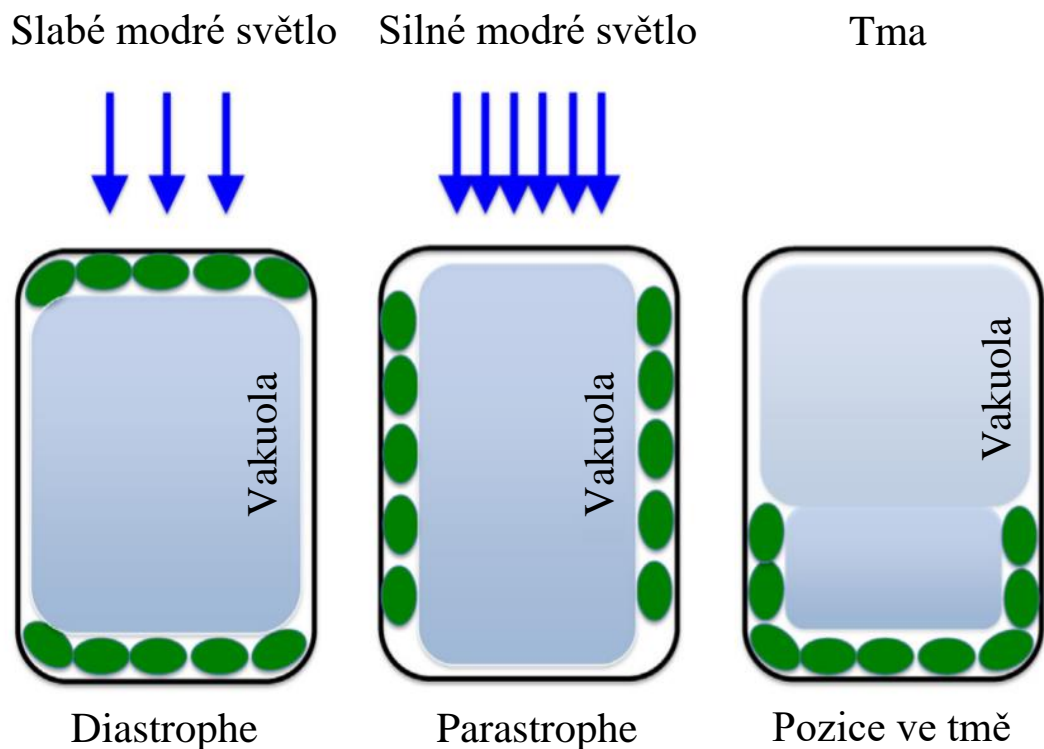
Chen *et al.* (2005) zkoumali vliv isofluranu (derivát éteru) na dynamiku organizace chloroplastů v zelené řase *Acetabularia acetabulum*. Isofluran se používá jako anestetikum, které v buňkách živočichů inhibuje procesy založené na změnách v organizaci aktinu. Chloroplasty *A. acetabulum* jsou mezi sebou spojeny flexibilními můstky, v důsledku čehož se spolu pohybují ve více či méně uspořádaných rovinách. Tyto pohyby jsou zajišťovány právě pomocí aktinového cytoskeletu. Autoři zjistili, že po vystavení buněk *A. acetabulum* 100% isofluranu po dobu 3 nebo 6 min byl měřený parametr zpožděné fluorescence (DL), který odráží dynamiku reorganizace chloroplastů, snížen a ani po vymytí isofluranu se neobnovil. Aplikace 75% isofluranu oproti tomu způsobila inhibici DL, po pár hodinách po vymytí byla však DL obnovena. Po aplikaci 50% isofluranu došlo jen k malým změnám v DL. Dle Chen *et al.* (2005) způsobil isofluran otevření Ca^{2+} kanálů, následné zvýšení koncentrace Ca^{2+} pak mohlo způsobit inhibici procesů založených na dynamice aktinu, mj. i pohybu chloroplastů.

S aktinem spojeným s membránami dále úzce souvisí funkce tzv. lipidových raftů, které jsou rovněž ovlivněny anestetiky (Morrow a Parton, 2005; Bandejas *et al.*, 2013). V budoucnu bude důležité a zajímavé studovat přímý vliv anestetik na aktinový cytoskelet *in vivo* s využitím transgenních linií *A. thaliana*, které exprimují fluorescenčně značený aktin (Baluška a Mancuso, 2019).

Souhrnně tedy model vlivu anestetik na rostliny zahrnuje jejich působení na akční potenciály membrán (plazmatická membrána a tonoplast), produkci reaktivních forem kyslíku a inhibici pohybu endocytotických vezikul spojenou s ovlivněním aktinového cytoskeletu. S působením anestetik na akční potenciály dále souvisejí změny koncentrace intracelulárního vápníku. Potlačení těchto rychlých buněčných odpovědí vede ke ztrátě citlivosti rostlin vůči externím podnětům a k inhibici některých vývojových procesů rostlin (klíčení semen a syntézy chlorofylu). Důležitou charakteristikou působení anestetik je reverzibilita – popsané procesy se po jejich odstranění v krátkém čase obnovily. V diplomové práci jsme se zaměřili na vliv anestetik na světlem indukovaný pohyb chloroplastů a otevírání průduchů, rostlinné procesy důležité pro efektivní fungování fotosyntézy a tedy i pro růst. O vlivu anestetik na tyto procesy není dle našich informací dosud nic známo.

2.2 Pohyb chloroplastů

Při přechodu zelených rostlin z vodního prostředí na souš vyvstala nutnost vytvoření adekvátních reakcí na mnohem proměnlivější světelné podmínky. Na úrovni organel mezi ně řadíme pohyby chloroplastů. Jsou to reakce na změnu intenzity světla vedoucí ke změně uspořádání chloroplastů v buňce. Pohyby chloroplastů můžeme najít v širokém spektru zelených rostlin, zelených i červených řas a fotosyntetizujících zástupcích infraříše Stramenopila (Suetsugu a Wada, 2016). Obecně se chloroplasty pohybují směrem ke slabému světlu, aby ho efektivně využily (akumulační pohyb chloroplastů) a směrem od silného světla, aby se vyhnuly poškození (únikový pohyb chloroplastů). Při akumulacním pohybu se chloroplasty přesouvají ke stěnám buněk kolmým k dopadajícímu záření (Obr. 1, vlevo, pozice diastrophe). Při únikovém pohybu se přesouvají ke stěnám buněk, které jsou rovnoběžné s dopadajícím zářením (Obr. 1, uprostřed, pozice parastrophe). Ve tmě chloroplasty *A. thaliana* obsazují spodní část buněk (Obr. 1, vpravo, pozice ve tmě).



Obr. 1 Schématická distribuce chloroplastů v buňkách mezofylu *A. thaliana* při různých světelných podmínkách. Chloroplasty se nacházejí v tenké vrstvě cytoplazmy mezi plazmatickou membránou a tonoplastem vakuoly. Vlevo: pozice chloroplastů na slabém (modrém) světle. Uprostřed: pozice chloroplastů na silném (modrém) světle. Vpravo: pozice chloroplastů ve tmě (převzato a upraveno z Wada, 2013).

Ústřední roli v pohybu chloroplastů hrají fototropiny, světelné receptory citlivé na UV-A a modrou oblast světelného spektra (360-500 nm). Z hlediska vyvolání pohybu chloroplastů je nejefektivnější BL (430-500 nm), ale některé kapradiny, mechy a zelené řasy reagují i na červené světlo (625-750 nm). V případě pohybu chloroplastů vyvolaného červeným světlem bylo u rostlin *Adiantum capillus-veneris* L. a *Mougeotia scalaris* popsáno řízení pohybu chloroplastů neochromy, které jsou z hlediska struktury chimerickými receptory složenými z fytochromu a fototropinů (Kawai *et al.*, 2003). Dále je známé řízení pohybu chloroplastů červeným světlem v mechorostu *Physcomitrella patens* pomocí fytochromu a fototropinu, které spolu vytvářejí signální komplex (Suetsugu a Wada, 2007; Jaedicke *et al.*, 2012). Ve většině rostlinných druhů jsou pohyby chloroplastů závislé na cp-aktinu (z angl. chloroplast-actin), nicméně některé zelené řasy třídy *Ulvophyceae*, jako např. *Bryopsis* nebo *Dichotomosiphon*, využívají k akumulární reakci chloroplastů zpomalení pohybu cytoplazmy pomocí mikrotubulů (oproti autonomnímu pohybu jednotlivých chloroplastů s využitím cp-aktinu) (Suetsugu a Wada, 2016).

Pohyby chloroplastů nejsou vyvolávány pouze světlem. V buňkách prvoklíčků netíku (*A. capillus-veneris* L.) je popsán únikový pohyb vyvolaný mechanickou stimulací (Sato *et al.*, 1999). Do 30 min po zatlačení na malou část buňky mikrokapilárou se chloroplasty v místě stimulu začaly pohybovat a po přibližně 2 h pohyb ustal. Po ošetření cytochalasinem B (inhibitor aktinu) a diacetyl monoximem (inhibitor myosinu) došlo k inhibici únikového pohybu, což nasvědčuje tomu, že únikový pohyb chloroplastů netíku vyvolaný mechanickou stimulací využívá aktin-myosinový systém. Kolchicin (inhibitor mikrotubulů) inhibici únikového pohybu po mechanické stimulaci nezpůsobil. Sato *et al.* (2003) popsal vyvolání akumulárního pohybu chloroplastů pomocí mechanické stimulace v buňkách mechorostů *P. patens*, *Marchantia polymorpha* L. a *Ceratodon purpureus*. Do 30 min po zatlačení kapilárou na část buňky byl u všech testovaných druhů pozorován akumulární pohyb chloroplastů do místa stimulu. V *P. patens* byl akumulární pohyb chloroplastů inhibován kremartem (inhibitor mikrotubulů), po působení cytochalasinu B k inhibici však nedošlo. Chloroplasty *P. patens* se tedy po mechanické stimulaci pohybují směrem k místu doteku pomocí mikrotubulů, oproti výše popsanému únikovému pohybu *A. capillus-veneris*, který využívá aktin-myosinový systém. V obou případech však bylo zjištěno, že k pohybu chloroplastů po mechanické stimulaci jsou nutné Ca^{2+} ionty (Sato *et al.*, 2001). Při aplikaci La^{3+} iontů (inhibujících vápníkové kanály) o koncentraci 100 μM

nebo Gd^{3+} iontů (inhibujících mechanicky řízené vápníkové kanály) o koncentraci 10 μM došlo k inhibici pohybu chloroplastů po mechanické stimulaci, schopnost chloroplastů reagovat na světlo však zůstala zachována. Ca^{2+} ionty se tedy zdají být zásadní pro signalizaci pohybu chloroplastů po mechanostimulaci.

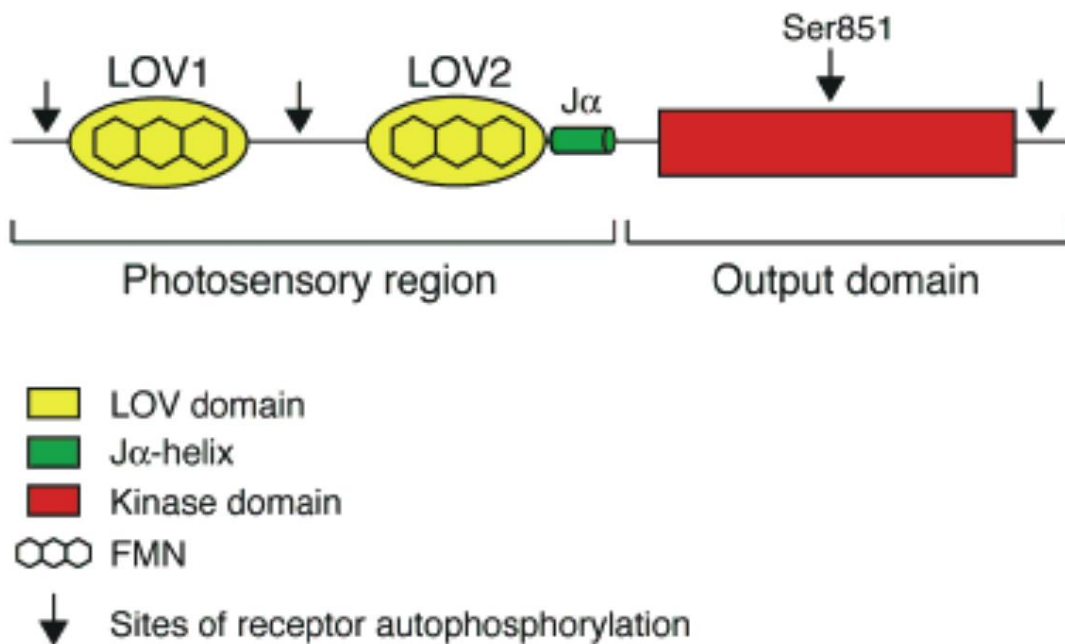
2.2.1 Molekulární aspekty pohybu chloroplastů

Zatímco fyziologické pozadí pohybu chloroplastů bylo popsáno před více než 100 lety (Senn, 1908; Kataoka, 2015), molekulární aspekty tohoto procesu se daří odkrývat teprve v posledních letech, také díky vývoji pokročilých experimentálních technik. Pokrok v chápání molekulární podstaty pohybu chloroplastů začínající aktivací fotoreceptoru vedoucí k reorganizaci cp-aktinu byl z největší části umožněn výzkumem v rostlinách *A. thaliana* (Kong a Wada, 2016). Nadále však zůstávají mnohé otázky, zejména pak v chápání biochemických rolí signálních faktorů nacházejících se v dolní části signální kaskády fototropinů a celkově v přenosu signálu vedoucímu k reorganizaci cp-aktinu.

2.2.1.1 Fototropiny

Fototropiny jsou receptory citlivé na BL. Byly objeveny v roce 1997 v *A. thaliana*. Evoluční kořeny těchto fotoreceptorů sahají k předkům podříše zelených rostlin (*Viridiplantae*). Fototropiny můžeme najít ve všech hlavních skupinách suchozemských rostlin (semenné rostliny, kapradiny, plavuně, mechy, játrovky a hlevíky) (Li *et al.*, 2015).

A. thaliana kóduje 2 proteiny ze skupiny fototropinů, phot1 a phot2, které se z části funkčně překrývají a odděleně řídí unikátní fyziologické funkce. Společně ovládají širokou škálu reakcí na světlo, které ve výsledku optimalizují účinnost fotosyntézy a přispívají ke správnému růstu rostlin (Takemiya *et al.*, 2005). Jedná se o pohyby chloroplastů, uspořádání listů a kontrolu plochého tvaru listové čepele, morfogenezi palisádových buněk, fototropismus a otevírání stomat. Z hlediska pohybu chloroplastů je phot1 zodpovědný za akumulární pohyb v reakci na BL o intenzitě 0,4-100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, zatímco phot2 řídí jak akumulární pohyb (při intenzitách BL v rozmezí



Obr. 2 Schéma struktury fototropinu. N-konec (vlevo) nese 2 LOV domény, které na sebe vážou FMN chromofor. C-konec (vpravo) nese serin/threonin kinasu (převzato z Christie, 2008).

přibližně $2\text{-}20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), tak únikový pohyb v reakci na silné BL o intenzitě $20\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Jarillo *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2001). V rostlinách *A. thaliana* s mutací ve phot1 (které tedy měly aktivní pouze phot2) nastal únikový i akumulární pohyb, ačkoliv akumulární pohyb byl oproti WT vyvolán vyšší intenzitou BL ($2\text{-}20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Kagawa *et al.*, 2001). V *A. thaliana* s mutací ve phot2 nastal při aplikaci BL pouze akumulární pohyb chloroplastů a to při intenzitě BL $0,08 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a vyšší (Luesse *et al.*, 2010). Phot1 je tedy pro řízení akumulárního pohybu oproti phot2 citlivější.

Fototropiny patří do skupiny AGC kinas (Bogre *et al.*, 2003). Strukturně se skládají ze 2 LOV (light, oxygen, or voltage) domén na N-konci a serin/threonin kinasu na C-konci (Briggs *et al.*, 2001). Každá LOV doména váže FMN (flavinmononukleotid) chromofor (Obr. 2). LOV domény mají velikost přibližně 110 aminokyselin a patří do široké skupiny PAS domén (Taylor a Zhulin, 1999). LOV domény jsou regulovány převážně světlem, kyslíkem nebo napětím (odtud název light, oxygen, or voltage). Společně s FMN fungují v rámci fototropinů jako senzory citlivé na BL (Christie *et al.*, 1999; Salomon *et al.*, 2003). Při excitaci světlem dochází ke kovalentnímu spojení mezi konzervovaným cysteinem LOV domény a C (4a) uhlíkem FMN (Jones a Christie, 2008). Ozáření BL dále vyvolá konformační změny mezi LOV doménami a kinasovou doménou fototropinu. Tyto změny způsobí aktivaci kinasové

domény a ta vyvolá autofosforylaci fototropinu (Matsuoka a Tokutomi, 2005; Kinoshita *et al.*, 2008). Fototropiny posílají signál dále pomocí fosforylace signálních faktorů samostatně zapojených např. do fototropismu (ABCB₁₉ a PKS₄) nebo otevírání stomat (BLUS₁) (Christie *et al.*, 2011; Takemiya *et al.*, 2013). Substrát fototropinů, který by byl odpovědný za pohyb chloroplastů, nebyl doposud objeven. Níže v signální kaskádě se však nacházejí signální faktory odpovědné za pohyby chloroplastů, které jsou fosforylovány působením silného BL (Boex-Fontvieille *et al.*, 2014). Usuzuje se, že stejně jako v případě fototropismu nebo otevírání stomat je pro regulaci signální dráhy pohybu chloroplastů klíčová fosforylace fototropiny. Konkrétní povaha signálních kaskád spouštějících pohyb chloroplastů není známá, nicméně předpokládá se, že akumulční a únikové pohyby jsou závislé na odlišných, nebo alespoň částečně nezávislých signálních dráhách (Wada a Kong, 2018).

Z hlediska lokalizace jsou phot1 i phot2 za tmy přidruženy k plazmatické membráně a při osvětlení BL se určitá část přesouvá do cytoplazmy, případně se phot2 připojuje k endomembránovým systémům (např. ke Golgiho aparátu) (Sakamoto a Briggs, 2002; Aggarwal *et al.*, 2014). Kromě plazmatické membrány a cytoplazmy se fototropiny nacházejí také přímo u vnější membrány chloroplastů (Kong *et al.*, 2013b). Množství phot2 na vnější membráně chloroplastů je oproti phot1 více než dvojnásobné (Kong *et al.*, 2013b).

Rozdílná vnitrobuněčná lokalizace fototropinů se ukazuje být jedním z mechanismů specifity jejich různých funkcí. V případě phot2 bylo ukázáno, že pro jeho funkci při únikovém pohybu chloroplastů je důležitá lokalizace na vnější membráně chloroplastu, zatímco jeho funkce při akumulčním pohybu je spojena s lokalizací u plazmatické membrány (Kong *et al.*, 2013b). To je v souladu s tím, že únikový pohyb je vyvolán pouze, když je chloroplast silným BL ozářen přímo (Tsuboi a Wada, 2011). Při signalizaci akumulčního pohybu chloroplastů je důležitá lokalizace obou fototropinů u plazmatické membrány a akumulční pohyb je vyvolán i v případě světelného signálu z místa nacházejícího se ve větší vzdálenosti od chloroplastu (Wada, 2013). V případě phot1 bylo dále ukázáno, že jeho přesun do cytoplazmy při ozáření BL není pro signalizaci důležitý, což naznačuje, že jeho signalizace je iniciována u plazmatické membrány (Preuten *et al.*, 2015).

2.2.1.2 Vápenaté ionty

Pomocí inhibitorů vápníkových kanálů bylo ukázáno, že Ca^{2+} ionty jsou důležité při signalizaci některých procesů řízených fototropiny. Z hlediska signalizace pomocí Ca^{2+} iontů je důležitý zejména phot1, jehož aktivace světlem vede ke zvýšení vnitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů pomocí napětím řízených vápníkových kanálů membrán (Stoelzle *et al.*, 2003; Harada a Shimazaki, 2007). Role vápenatých iontů v pohybech chloroplastů však není doposud příliš objasněná. Jak bylo zmíněno výše, v *A. capillus-veneris* L. a *P. patens* se Ca^{2+} ukázaly být důležité pro přenos signálu pohybu chloroplastů. Jednalo se však o pohyb chloroplastů vyvolaný mechanickou stimulací, u pohybu stimulovaného světlem se role vápenatých iontů ve zkoumaných rostlinách neprokázala (Sato *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2003). V okřešku trojbrázdém (*Lemna trisulca* L.) byl při pohybu chloroplastů vyvolaném pomocí BL pozorován zvýšený obsah Ca^{2+} v cytoplazmě (Tlalka a Fricker, 1999). Z vyšších suchozemských rostlin bylo zjištěno zapojení Ca^{2+} spolu s Mg^{2+} při pohybech chloroplastů vyvolaných světlem u tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) (Anielska-Mazur *et al.*, 2009). V *A. thaliana* bylo zjištěno zapojení fosfatidylinositolů, které pravděpodobně ovlivňují hladiny Ca^{2+} v cytoplazmě při regulaci obou typů pohybu chloroplastů (Aggarwal *et al.*, 2013). Ohledně role vápenatých iontů v signalizaci pohybu chloroplastů se však stále vedou debaty. Tsuboi a Wada (2010) porovnali rychlost přenosu signálu pomocí Ca^{2+} u rostlin a živočichů. V porovnání s dostupnými daty rychlosti šíření signálu pomocí Ca^{2+} u živočichů byl přenos signálu při pohybu chloroplastů vyvolaném světlem u *A. capillus-veneris* 100-200násobně pomalejší. To vnáší pochyby do toho, zda jsou Ca^{2+} ionty v signalizaci pohybu chloroplastů zapojeny.

2.2.1.3 Cp-aktin

Chloroplasty nevykazují polaritu vnitřního uspořádání a mohou se v rámci buňky pohybovat jakýmkoliv směrem (Tsuboi *et al.*, 2009; Tsuboi a Wada, 2011). Jejich pohyb je spojen s rychlým přeskupením cp-aktinu, které je závislé na směru a intenzitě dopadajícího světla. Vlákna cp-aktinu se nacházejí v oblasti mezi plazmatickou membránou a chloroplasty. Nerovnoměrně se pak seskupují na periferiích chloroplastů, a to zejména při únikovém pohybu. Phot2 má oproti phot1 při reorganizaci cp-aktinu hlavní roli (Kong *et al.*, 2013a).

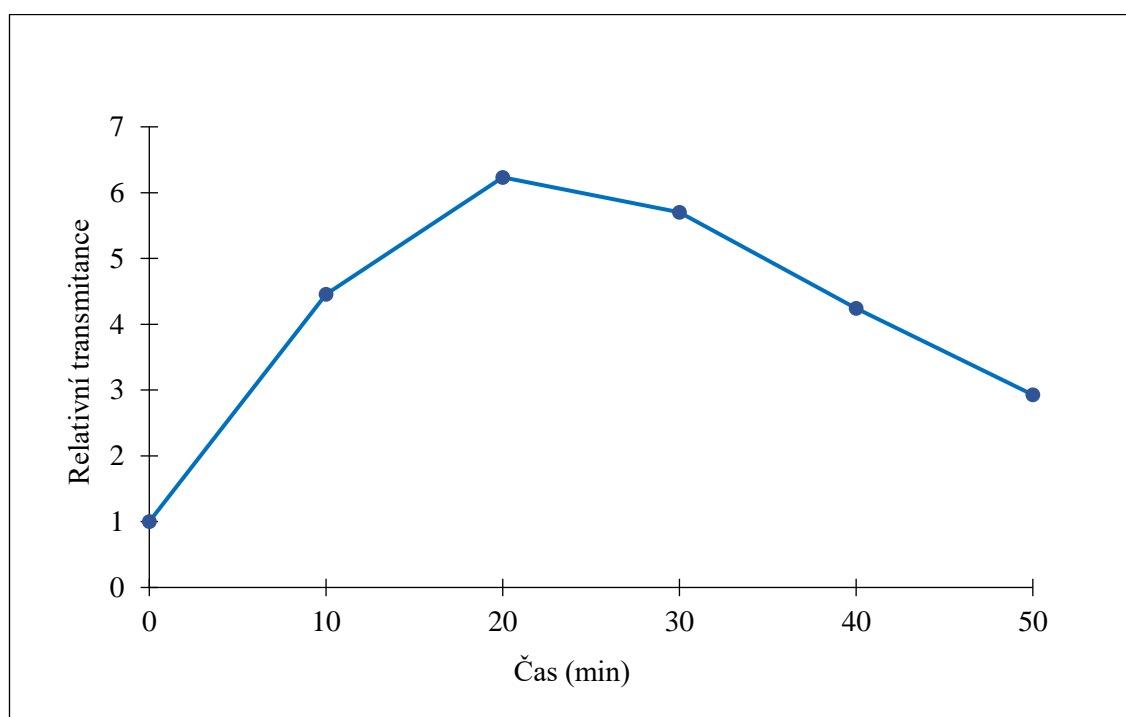
Reorganizace cp-aktinu zahrnuje rychlý rozpad vláken vedoucí k jejich zkrácení a následnému lokálnímu přemístění fragmentů. U zadního (vzhledem ke směru vykonávaného pohybu) okraje chloroplastů jsou vlákna cp-aktinu rychle depolymerizována a u předního okraje rychle polymerizována (Kadota *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2013a). Většímu rozdílu v množství cp-aktinu mezi přední a zadní částí pohybujícího se chloroplastu odpovídá větší rychlost pohybu. Rozdíly v nahromadění cp-aktinu korelují s intenzitou BL a množstvím phot2, který je za reorganizaci cp-aktinu odpovědný (Kagawa a Wada, 2004; Kadota *et al.*, 2009; Kimura a Kagawa, 2009; Kong *et al.*, 2013a). Při únikovém pohybu jsou rozdíly v nahromadění cp-aktinu zřetelnější než při akumulacním pohybu, kdy je cp-aktin distribuován poměrně rovnoměrně na povrchu celého chloroplastu (Kadota *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2013a). To odpovídá i rozdílům v rychlosti únikového a akumulacního pohybu. Při únikovém pohybu chloroplastů je totiž rychlost závislá na intenzitě světla, při akumulacním pohybu se však chloroplasty pohybují téměř konstantní rychlostí nezávisle na světelné intenzitě (Kagawa a Wada, 2004; Higa *et al.*, 2017).

Pohyb chloroplastů a reorganizace cp-aktinu se po aplikaci BL spouštějí téměř ve stejnou chvíli, je tedy těžké určit, zda je reorganizace cp-aktinu důvod nebo důsledek pohybu chloroplastů. Bylo však zjištěno, že reorganizace cp-aktinu není jedinou postačující podmínkou pohybu chloroplastů. Aplikací diacetyl monoximu byly chloroplasty imobilizovány, přeskupení cp-aktinu typické pro únikový pohyb bylo však stále pozorováno (Yamada *et al.*, 2011; Wada a Kong, 2019). Co je hybnou silou, díky které se chloroplasty pohybují, není tedy stále objasněné (Wada a Kong, 2019).

2.2.2 Měření pohybu chloroplastů pomocí změn transmittance

Pro měření pohybu chloroplastů v diplomové práci využíváme změn transmittance (optické propustnosti) listu způsobených právě pohybem chloroplastů. Princip metody je detailně popsán např. v práci Nauš *et al.* (2008) a Frolec *et al.* (2010). V uvedených pracích nepoužili pro měření změn transmittance Spectrapen SP-100 jako my v diplomové práci, princip je však stejný. Při aplikaci silného BL pozorujeme nárůst transmittance, protože silné BL vyvolá únikový pohyb chloroplastů a list propustí více světelných paprsků (Obr. 3, čas 0-20 min). Při aplikaci slabého BL dochází k opačnému jevu. Transmittance klesá, protože slabé BL vyvolá akumulární pohyb chloroplastů a listem projde menší množství světelných paprsků (Obr. 3, čas 20-50 min).

Metoda měření pohybu chloroplastů pomocí změn transmittance listů je velmi citlivá. Změny v pohybech chloroplastů stanovené touto metodou mohou být využity mj. jako indikátor působení určitých stresových faktorů, např. sucha (resp. zasychání listů) (Nauš *et al.*, 2016) nebo vysokých teplot (Frolec *et al.*, 2010).

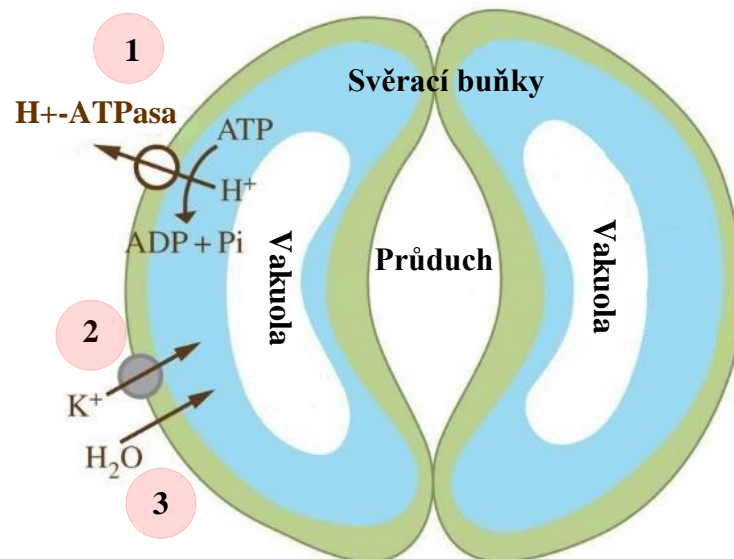


Obr. 3 Obecné změny transmittance listu odrážející pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem. Nárůst transmittance vlivem silného modrého světla (0-20 min, únikový pohyb) a pokles vlivem slabého modrého světla (20-50 min, akumulární pohyb). Převedeno na relativní hodnoty transmittance oproti výchozímu stavu, tj. v čase = 0 min.

Pro měření akumulčního pohybu chloroplastů v listech tabáku jsme dále dle práce Nauš *et al.* (2010) použili chlorofylmetr SPAD-502. Tento přístroj se používá k rychlému a nedestruktivnímu stanovení obsahu chlorofylu na základě měření transmitance listu (při 650 nm a 940 nm). Transmitance a tedy i hodnota relativního obsahu chlorofylu naměřená chlorofylmetrem je však ovlivněna pozicí chloroplastů, což může na jedné straně zkreslit naměřený obsah chlorofylu, na druhé straně toho ale lze využít právě pro stanovení pozice, resp. pohybu chloroplastů (Nauš *et al.*, 2010). Při akumulčním pohybu, kdy se chloroplasty přesouvají do čelních pozic buněk, chlorofylmetr postupně zaznamenává zdánlivé zvyšování obsahu chlorofylu v listu. Naopak při únikovém pohybu se chloroplasty přesouvají ke stěnám buněk rovnoběžným s dopadajícím zářením a SPAD-502 tak zaznamená zdánlivé snížení obsahu chlorofylu.

2.3 Otevírání průduchů

Průduchy jsou struktury vyskytující se u většiny vyšších rostlin. Regulují výměnu plynů mezi rostlinou a okolím, optimalizují fixaci oxidu uhličitého a regulují ztrátu vody. Nacházejí se na většině nadzemních rostlinných orgánů přicházejících do kontaktu s atmosférou, zejm. na spodních stranách listů, na stoncích a květech. Strukturně se skládají ze dvou svěracích buněk ledvinového nebo činkového tvaru, které mezi sebou vytvářejí průduchovou štěrbinu (Obr. 4). Na koncích svěracích buněk se nachází většina organel včetně jádra, ve střední části je obvykle protáhlá vakuola obklopující průduchovou štěrbinu (Obr. 4). Kolem svěracích buněk se obvykle nachází větší podpůrné buňky (Sack, 1987). Stavba, počet a umístění průduchů se liší mezi různými druhy rostlin (Prabhakar, 2004).



Obr. 4 Schéma otevírání průduchů indukovaného světlem. (1) H⁺-ATPasy jsou aktivovány modrým světlem, s využitím ATP dochází k pumpování H⁺ iontů ven ze svěracích buněk, což vyvolá okyselení apoplastu a vtok K⁺ iontů do svěracích buněk (2). Zvýšení koncentrace K⁺ iontů sníží osmotický potenciál svěracích buněk, což vyvolá vtok vody (3) a otevření průduchové štěrbinu (převzato a upraveno ze Segal, 2016).

Otevírání stomat je spojeno s akumulací draselných iontů a/nebo cukrů ve svěracích buňkách, což způsobí osmotický vtok vody do těchto buněk, zvýšení jejich objemu a rozšíření průduchové štěrbin (Fujino, 1967; Fischer, 1968). Výsledný tvar svěracích buněk vytvářející při zvětšování jejich objemu průduchovou štěrbinu je zajištěn asymetrickým uspořádáním mikrofibrilů v buněčné stěně. Uzavírání průduchů je vyvoláno zmenšením svěracích buněk vlivem sucha, tmy, zvýšeným obsahem CO₂ nebo snížením vlhkosti vzduchu. Regulace otevřenosti průduchů probíhá i prostřednictvím abscisové kyseliny (ABA) a dalších rostlinných hormonů, jako jsou auxiny, methyl jasmonát, etylén, brassinosteroidy a cytokininy (Agurla *et al.*, 2018).

Otevírání stomat je vyvoláváno modrým a červeným světlem. BL slouží zejména jako signál pro otevírání, červené světlo zajišťuje otevření průduchu prostřednictvím tvorby asimilátů díky fotosyntéze probíhající v chloroplastech svěracích buněk a buněk mezofylu (Zeiger, 1983; Mott *et al.*, 2008, Suetsugu *et al.*, 2014). BL aktivuje H⁺-ATPasy na plazmatické membráně svěracích buněk. Za spotřeby ATP dochází k pumpování H⁺ iontů ven ze svěracích buněk (Obr. 4; 1), což vede k hyperpolarizaci (snížení záporného membránového potenciálu) membrány. Tímto způsobené okyselení apoplastu vyvolá příjem K⁺ iontů do svěracích buněk pomocí K⁺ kanálů řízených napětím (Obr. 4, 2). Akumulace K⁺ iontů sníží osmotický potenciál svěracích buněk, což způsobí příjem vody svěracími buňkami (Obr. 4; 3) (Kinoshita a Shimazaki, 1999).

Stejně jako při pohybech chloroplastů vyvolaných BL, i v případě otevírání průduchů je primárním krokem autofosforylace fototropinů. Teprve nedávno byl identifikován článek spojující percepci světla fototropiny a aktivaci H⁺-ATPas, protein kinasa BLUS1, která je fosforylována pomocí phot1 na Ser-348. BLUS1 je hlavní regulátor otevírání stomat řízeného světlem. Jde taky o doposud jediný identifikovaný přímý substrát fototropinů, u kterého je známa role v signalizační kaskádě (Takemiya *et al.*, 2013).

Jak bylo zmíněno, v regulaci otevřenosti průduchů hraje roli také ABA. Ta indukuje depolarizaci membrány svěracích buněk a následnou aktivaci K⁺ kanálů, které propouštějí K⁺ ionty ven z buňky, což vede k uzavírání průduchu (Assmann a Shimazaki, 1999; Shroeder *et al.*, 2001). ABA rovněž přispívá k uzavírání průduchů inhibicí fosforylace H⁺-ATPas, čímž je snížena jejich aktivita. Tato inhibice je pravděpodobně způsobena produkcí H₂O₂ pomocí NADPH oxidas v reakci na přítomnost ABA (Goh *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2004). Akumulace peroxidu vodíku

navíc stimuluje produkci oxidu dusnatého, který rovněž přispívá k uzavírání stomat (Kwak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

2.3.1 Měření otevřenosti průduchů a rychlosti fotosyntézy

V diplomové práci jsme měřili otevřenost průduchů gazometrem LI-6400 (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). Veličina odrážející otevřenost průduchů je stomatální vodivost neboli konduktance (g_s). Ta popisuje, jak velké množství vody se průduchy odpaří za jednotku času (v rámci jednotkové plochy listu; jednotka konduktance je $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Princip měření spočívá v detekci rozdílů koncentrace vodní páry ve vzduchu vstupujícím do měřicí komůrky, ve které je umístěn list, a ve vzduchu, který z ní vychází. Čím větší hodnota konduktance je naměřena, tím jsou průduchy otevřenější.

Přístrojem LI-6400 jsme zároveň stanovovali rychlost fotosyntézy (A). Měření je založeno na podobném principu jako při stanovování otevřenosti průduchů, místo H_2O je ale měřena koncentrace CO_2 ve vzduchu vstupujícím do komůrky a z ní vystupujícím. V tomto případě se měří úbytek CO_2 v čase, který je poté převeden na plochu listu ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Úbytek CO_2 je způsoben jeho asimilací listem při osvětlení fotosynteticky aktivním zářením, odráží tedy rychlost fotosyntézy. Gazometrická aparatura měří rychlost tzv. čisté (net) fotosyntézy, ve které je zahrnuta i rychlost respirace, tj. rychlost vývinu CO_2 respiračními procesy v listu.

Shrnutí

Mechanismy působení anestetik na živé organismy stále ještě nejsou plně objasněny. Jedním z předpokládaných cílů jejich účinku jsou membránové potenciály a iontové kanály, které se v membránách nacházejí. U rostlin vedlo omezení šíření změn membránového potenciálu působením anestetik mj. k inhibici pohybu rostlinných orgánů mucholapky podivné nebo citlivky stydlivé (Yokawa *et al.*, 2018). Tato inhibice pravděpodobně souvisela s vlivem anestetik na aktinový cytoskelet a signalizaci pomocí Ca^{2+} (Aguilera a Vaughan, 2000; Kanzawa *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2008). O vlivu anestetik na pohyby chloroplastů a otevírání průduchů vyvolané světlem není dle našich informací nic známo. U otevírání průduchů se předpokládá zapojení procesů souvisejících se změnami membránového potenciálu a iontovým transportem (Kinoshita a Shimazaki, 1999), při signalizaci pohybu chloroplastů však není jisté zapojení těchto

procesů. V kombinaci se současnými znalostmi mechanismů pohybu chloroplastů a otevírání stomat by výsledky diplomové práce mohly sloužit k hlubšímu pochopení obecného působení anestetik. Dále by mohly pomoci prohloubit znalosti signalizace zkoumaných procesů, zejména pohybu chloroplastů. Rovněž je lze využít jako zdroj základních informací při dalším studiu vlivu anestetik na pohyby chloroplastů a otevírání průduchů.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V diplomové práci jsme pomocí měření změn transmitance listů stanovovali pohyby chloroplastů a pomocí gazometrie vodivost průduchů, koncentraci CO₂ v mezibuněčných prostorech a rychlost fotosyntézy. Pro vizualizaci pozice chloroplastů jsme dále použili konfokální mikroskop. Z počátku jsme měření prováděli na stejné rostlině a listu před a po aplikaci anestetika, následně jsme experimenty prováděli s více rostlinami vystavenými anestetiku a příslušnými kontrolními rostlinami bez aplikace anestetik.

3.1 Materiál a metody

Pro experimenty byly použity rostliny lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers), ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bojos), tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) a huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L., ekotyp Columbia-0). Pro pěstování rostlin byly použity květináče o velikosti 5x4 nebo 7x7 cm naplněné pěstebním substrátem Potgrond H (Klasmann-Deilmann GmbH, Německo). Pro pěstování ječmene byl použit perlit. Rostliny byly pravidelně zalévány vodou z vodovodního řádu a jednou týdně byly zality Knopovým roztokem. Rostliny *A. thaliana* byly pěstovány ve fytostronu při krátké fotoperiodě (8 h světlo / 16 h tma), ozáření 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, teplotě 22 °C / 20 °C (den / noc) a relativní vlhkosti vzduchu 60 %. Tabák, lilek rajče a ječmen byly pěstovány ve fytostronu (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA) při dlouhé fotoperiodě (16 h světlo / 8 h tma), ozáření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, teplotě 21 °C a relativní vlhkosti vzduchu 60 %. Stáří rostlin při měření bylo 4-8 týdnů. Byly měřeny 2., 3. nebo 4. pravé listy. V případě *A. thaliana* byly vybírány starší listy s delším řapíkem kvůli usnadnění měření.

3.1.1 Aplikace anestetik

V experimentech jsme používali dva druhy anestetik – plynné anestetikum diethylether (CH₃CH₂)₂O (dále jen éter) a kapalně anestetikum lidokain ve formě hydrochlorid monohydrátu (kvůli jeho snadné rozpustnosti ve vodě; C₁₄H₂₂N₂O·HCl·H₂O).

3.1.1.1 Aplikace éteru

Éter jsme aplikovali dvěma způsoby – s využitím tzv. ZIP sáčku (igelitový sáček uzavíratelný zipem) nebo uzavřené plastové nádoby. Inkubaci v ZIP sáčcích jsme

použili při počátečních experimentech s ječmenem. Nejprve jsme vložili neodstřížený list do malého (12x8 cm) nebo většího (15x10 cm) ZIP sáčku tak, aby uzavíratelný okraj těsně obepínal okraje listu (Obr. 5). Na listu uzavřeném v sáčku jsme změřili pohyb chloroplastů před aplikací éteru. Následně jsme pomocí injekční jehly do sáčku vstříkli éter. Otvor po injekční jehle jsme zalepili lepicí páskou a nechali éter působit po dobu 2 h. Poté jsme měření zopakovali (při měření byl list stále v sáčku s éterem). Při experimentech, ve kterých jsme pro aplikaci éteru využívali ZIP sáček, byla transmittance měřena přes jeho průhledné vrstvy.



Obr. 5 List ječmene v ZIP sáčku pro aplikaci éteru.

Při aplikaci s využitím plastové nádoby jsme nejprve změřili pohyb chloroplastů na rostlině před vložením do nádoby, poté jsme dovnitř vložili rostlinu (zpravidla i s květináčem) (Obr. 6A), nádobu uzavřeli a pomocí injekční jehly vstříkli do skleněné misky na dně krabičky tekutý éter (Obr. 6B). Otvor pro vstříknutí jsme poté zalepili lepicí páskou, přičemž během chvíle došlo v prostoru krabičky k odpaření éteru. Inkubace v atmosféře éteru trvala 2 h. Následně jsme rostlinu z plastové nádoby vyjmuli a opět změřili pohyb chloroplastů (při měření byla tedy rostlina mimo atmosféru éteru). Při experimentech s rostlinami lilku rajčete jsme byli z důvodu velikosti pěstebních květináčů (7x7 cm oproti 5x4 cm u ostatních experimentů) nuceni rostlinu z květináčů vyjmout, obalit kořeny s hlinou alobalem a teprve poté vložit do nádoby pro aplikaci éteru.



Obr. 6 (A) Nádoba pro aplikaci éteru. Černým kruhem je označen otvor pro vstříknutí éteru a vedle lepicí páska pro uzavření otvoru. (B) Aplikace éteru do plastové nádoby pomocí injekční jehly.

V experimentech byly rostliny vystaveny 6, 15 nebo 21% koncentraci par éteru. Množství éteru (v kapalně fázi) nutné pro dosažení určité koncentrace plynu v uzavřeném prostoru s daným objemem jsme vypočítali následovně (uveden příklad pro dosažení 15% koncentrace plynu v nádobě o objemu 0,8 l):

Objem nádoby = 0,8 l; mol. hmotnost éteru = 74,12 g·mol⁻¹; hustota éteru = 0,71 g·cm⁻³;
1 mol plynu = 22,4 l.

$22,4 \text{ l} = 1 \text{ mol éteru}$

$0,8 \text{ l} = 0,0357 \text{ molů éteru}$

$0,0357 \text{ molů éteru} = 2,65 \text{ g éteru}$

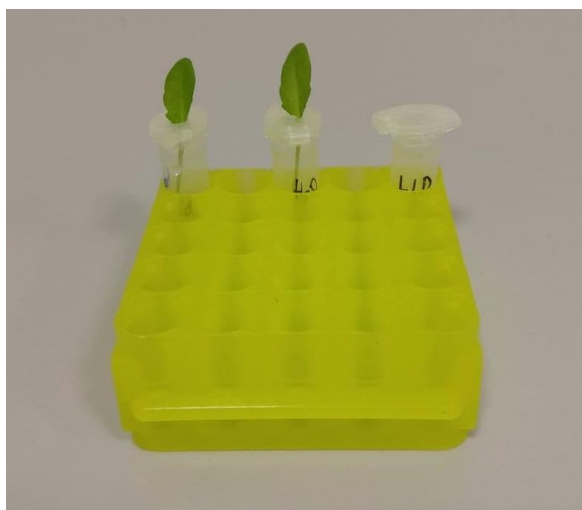
$2,65 \text{ g éteru} = 3,73 \text{ ml éteru (100\%)}$

$3,73 \text{ ml} \cdot 0,15 = \mathbf{0,56 \text{ ml}} \text{ 100\% éteru pro dosažení 15\% koncentrace par.}$

Objem, který v nádobě zabírala rostlina s květináčem, jsme zanedbali.

3.1.1.2 Aplikace lidokainu

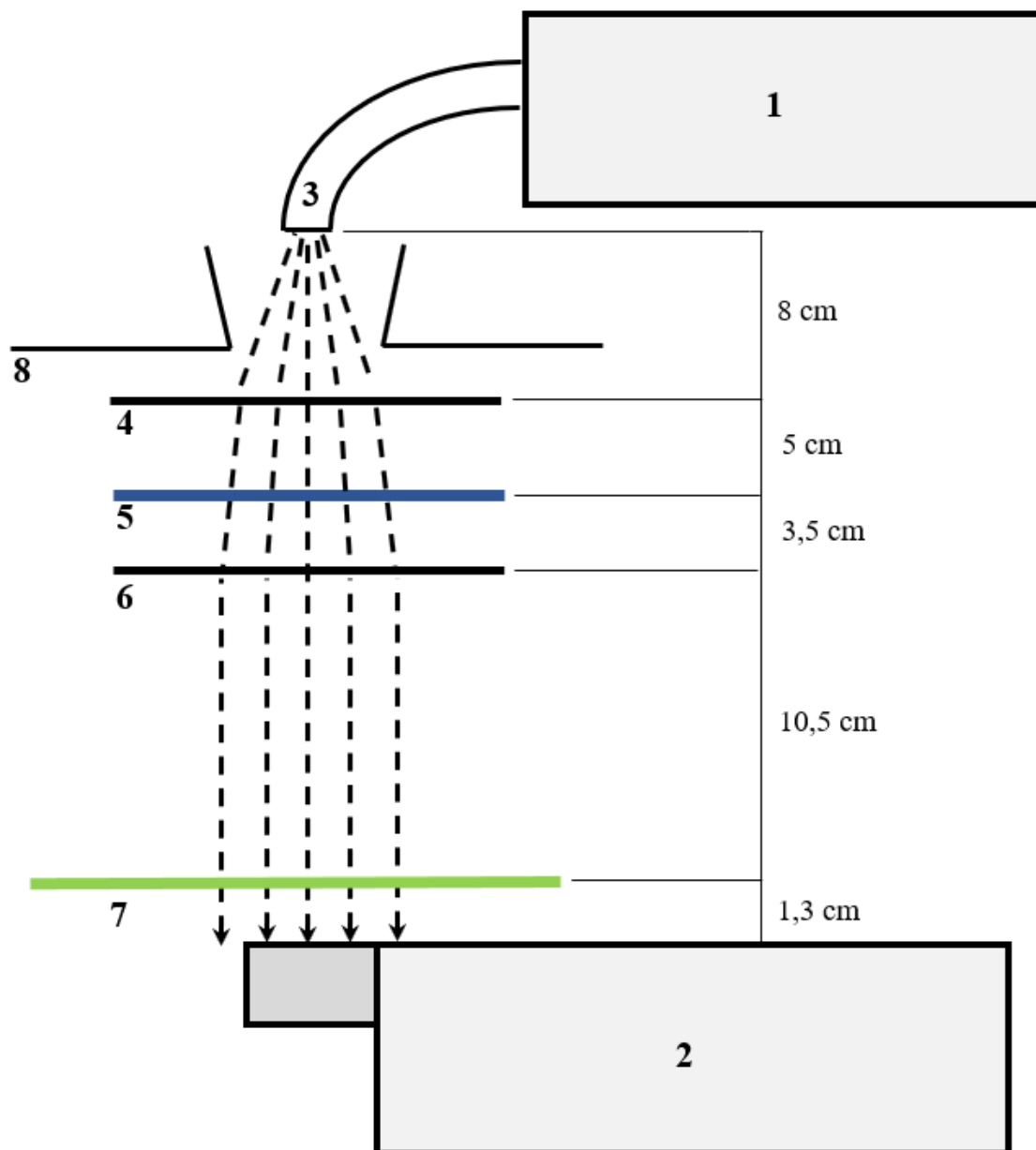
Lidokain jsme aplikovali na uštířené listy *A. thaliana* a tabáku virginského ponořením řapíku do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (Obr. 7). Listy jsme nechali inkubovat po dobu 3 a 16 h (*A. thaliana*) nebo 4 h (tabák). Během měření byly řapíky uštířených listů ponořeny do deionizované vody. Jako kontrolu jsme použili listy ponořené řapíkem v deionizované vodě (po stejnou dobu jako příslušné listy ošetřené lidokainem).



Obr. 7 Aplikace 1% roztoku lidokainu v deionizované vodě řapíkem na uštířené listy *A. thaliana*.

3.1.2 Pohyb chloroplastů

Pohyb chloroplastů byl měřen pomocí změn kolimované transmittance (optické propustnosti) listu. Kolimovaná transmittance byla měřena pomocí spektrálního radiometru Spectrapen SP-100 (PSI, Drásov, Česká republika). Sestava aparatury pro měření pohybu chloroplastů pomocí změn kolimované transmittance je na Obr. 8.

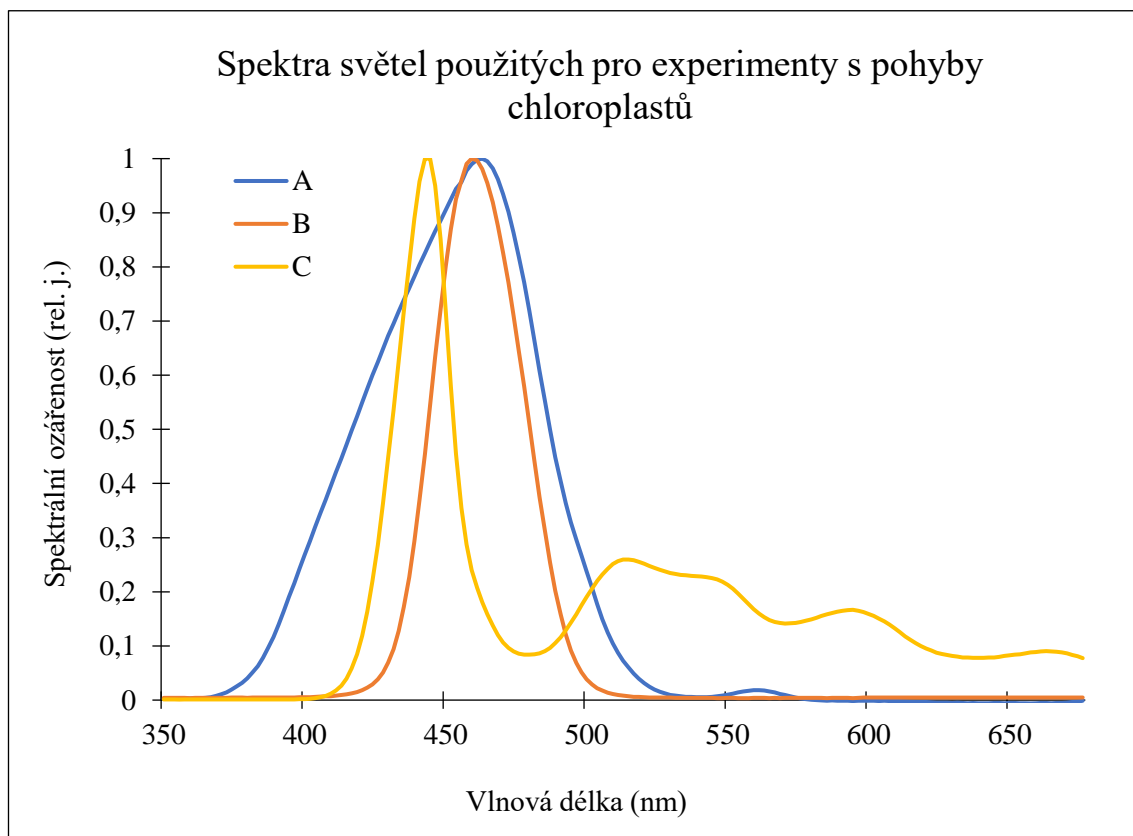


Obr. 8 Schéma aparatury pro měření kolimované transmittance listu. (1) zdroj studeného světla KL-2500, (2) Spectrapen SP-100, (3) světlovod, (4) kolimátor I, (5) modrý filtr, (6) kolimátor II, (7) měřený vzorek (list), (8) stínítko. Vyznačeny vzdálenosti mezi jednotlivými komponentami aparatury (cm)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

Pro vyvolání únikového pohybu chloroplastů bylo použito BL o intenzitě $470 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Toto světlo bylo použito i pro měření změn transmitance vyvolaných pohybem chloroplastů Spectrapenem SP-100. Pro vyvolání akumulčního pohybu chloroplastů bylo použito BL o intenzitě $1,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Dále jsme dle práce Nauš *et al.* (2010) měřili akumulční pohyb chloroplastů tabáku pomocí chlorofylmetru SPAD-502 (Konica Minolta, Tokio, Japonsko). V tomto experimentu byl pohyb chloroplastů vyvolán BL o intenzitě $3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Pro vyvolání únikového pohybu v listech, u nichž byla dokumentována pozice chloroplastů pomocí konfokálního mikroskopu, bylo použito BL o intenzitě $350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

BL bylo generováno pomocí zdroje studeného světla KL-2500 (Schott Glass, Mainz, Německo) v kombinaci s modrým filtrem BG12 (Schott Glass, Wiesbaden, Německo) (Obr. 9A, použito pro navození a následné měření pohybu chloroplastů pomocí radiometru Spectrapen SP-100) nebo s modrou fólií (Obr. 9B, použito pro navození únikového pohybu chloroplastů pro pozorování jejich pozice v konfokálním mikroskopu). V experimentu s akumulčním pohybem chloroplastů tabáku bylo BL generováno pomocí LED panelu (PSI, Drásov, Česká republika) a modré fólie (Obr. 9C, použito pro navození akumulčního pohybu chloroplastů při měření pomocí chlorofylmetru SPAD-502). Intenzita BL byla měřena pomocí integrálního radiometru LI-250A (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) v $\mu\text{mol fotonů fotosynteticky aktivního záření (400-700 nm) m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Spektra BL použitých k navození pohybu chloroplastů byla změřena pomocí spektrálního radiometru Spectrapen SP-100.



Obr. 9 (A) Spektrum světla použitého pro vyvolání pohybu chloroplastů a následné měření pomocí spektrálního radiometru Spectrapen SP-100. (B) Spektrum světla pro vyvolání únikového pohybu chloroplastů při mikroskopických experimentech. (C) Spektrum světla pro vyvolání akumulčního pohybu chloroplastů při měření pomocí chlorofylmetru SPAD-502. Spektra změřena pomocí spektrálního radiometru Spectrapen SP-100 a nanormována na relativní jednotky spektrální ozáření s maximem spekter při hodnotě 1.

Před měřením byly rostliny zatemněny, aby se chloroplasty nacházely ve stejné výchozí pozici. Při prvních experimentech jsme rostliny nechávali při inkubaci s anestetiky (která trvala 2 h) ve fytochomně (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA) na bílém světle ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a na posledních 30 min inkubace jsme je přesunuli do tmy. Následně jsme přešli k inkubaci po celou dobu ve tmě. Doba zatemnění je uvedena v popisných obrázcích experimentů a byla součástí doby inkubace.

Při měření kolimované transmitance pomocí radiometru Spectrapen SP-100 bylo nejprve změřeno spektrum světla (intenzita $470 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bez listu (I_0). Poté následovalo vložení listu do měřicí aparatury a změření spektra světla procházejícího listem (I). Aplikací BL byl vyvolán pohyb chloroplastů a každých 10 min bylo změřeno spektrum světla procházejícího listem. Podílem I/I_0 byla získána spektra kolimované transmitance, ze kterých byla odečtena hodnota transmitance při 436 nm. Tuto vlnovou délku jsme zvolili z důvodu citlivé reakce transmitance na pohyb chloroplastů.

Měření trvalo 50 min (20 min silné BL, 30 min slabé BL, nebo 30 min silné BL a 20 min slabé BL). Při prvních experimentech s éterem jsme měření prováděli na stejném listu téže rostliny. Nejprve byl tedy změřen pohyb chloroplastů na vybraném listu, poté byl aplikován éter a po inkubaci bylo měření na stejném listu zopakováno. Část experimentů byla doplněna o třetí měření (na stejném listu) po uplynutí určité doby od skončení působení éteru. Tato varianta je v experimentech označena jako „regenerace“ a trvala 20 min nebo 24 h, případně 48 h.

V průběhu práce jsme změnili uspořádání experimentu a měřili jsme jednak rostliny uzavřené v plastové nádobě s éterem, jednak rostliny uzavřené po stejnou dobu v plastové nádobě bez éteru (kontrola). V případě obou variant byla provedena 4 opakování. Výsledné hodnoty jsme zprůměrovali, vložili do grafu a pro lepší názornost jsme transmitanci převedli na relativní hodnoty (vztaženo na počáteční hodnotu transmitance v čase $t = 0$ min).

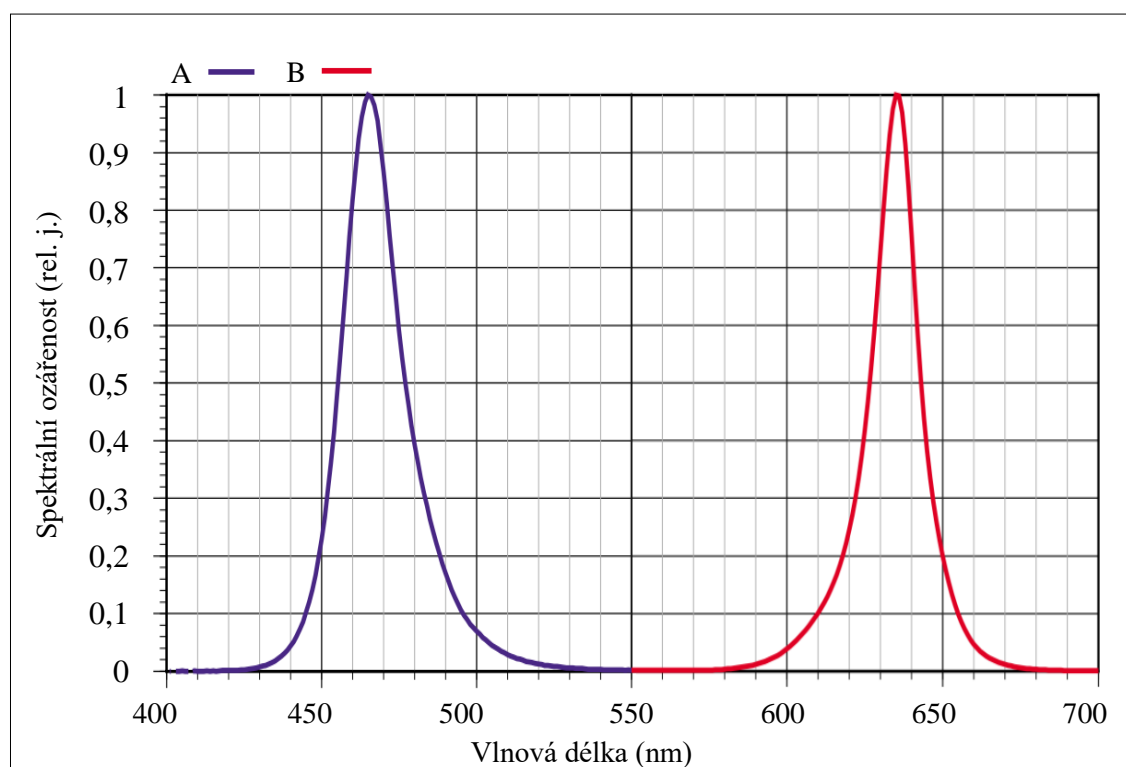
Při vyhodnocování jsme posuzovali nárůst transmitance během únikového pohybu chloroplastů vyvolaného silným BL a následný pokles transmitance během akumulárního pohybu chloroplastů vyvolaného působením slabého BL.

Dále jsme dle práce Nauš *et al.* (2010) měřili pomocí chlorofylmetru SPAD-502 akumulární pohyb chloroplastů tabáku. Rostliny byly zatemněny 4 h před měřením. Bylo měřeno 5 rostlin vystavených poslední 2 h zatemnění 15% éteru a 4 kontrolní rostliny uzavřené poslední 2 h zatemnění do plastové nádoby bez éteru. Poté byly

rostliny přesunuty na slabé BL a v 10min intervalech byly měřeny hodnoty SPAD na 2 nejstarších listech. Měření trvalo 110 min.

3.1.3 Otevírání průduchů

Otevírání průduchů vyvolané světlem jsme sledovali pomocí gazometru LI-6400 a listové komůrky LCF (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). Byla měřena stomatální vodivost (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) odrážející otevřenost průduchů. Dále byla stanovena koncentrace CO_2 v mezibuněčných prostorách (C_i , $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$) a rychlost asimilace CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Během měření byla v gazometrické komůrce teplota $22\text{ }^\circ\text{C}$, relativní vlhkost vzduchu 60 % a koncentrace CO_2 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ vzduchu. Rychlost toku vzduchu přes listovou komůrku byla $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$. Při experimentu s tabákem jsme pro vyvolání otevření průduchů a fotosyntézy použili BL ($265\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Obr. 10A) spuštěné po 5 min od začátku měření. Při experimentu s *A. thaliana* jsme nejprve spustili (v čase 5 min od začátku měření) červené světlo ($600\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, spektrum na Obr. 10B) a v čase 40 min jsme začali současně aplikovat BL ($15\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, spektrum na Obr. 10A).



Obr. 10 Spektra světel použitých v gazometrickém měření. (A) Modré světlo, maximum při 465 nm, (B) červené světlo, maximum při 635 nm (převzato a upraveno z <https://www.licor.com/documents/vtlnaiycs2izvrscnu1>).

Velikost ozářené plochy listu byla 2 cm². Výše uvedené parametry (g_s, C_i, A) byly stanovovány každých 20 s po dobu 55 min. Měření na gazometru bylo provedeno Mgr. Vladimírou Nožkovou, Ph.D.

Éter byl aplikován po dobu 2 h uzavřením rostliny do plastové nádoby s 15% koncentrací jeho par. Kontrolní a regenerované rostliny byly před měřením uzavřeny po dobu 2 h v plastové nádobě bez éteru. Lidokain byl aplikován po dobu 4 h ponořením řápičku ustrížených listů tabáku do jeho 1% roztoku v deionizované vodě, jako kontrola byly použity ustrížené listy tabáku ponořené řápičkem na stejnou dobu do deionizované vody. Rostliny byly před měřením zatemněny po dobu 2 h (doba zatemnění byla součástí doby inkubace).

3.1.4 Mikroskopická měření

Mikroskopicky jsme pozorovali rozmístění chloroplastů v buňkách listů rostlin adaptovaných na tmou a po aplikaci silného BL. Pro pozorování pozice chloroplastů v listech adaptovaných na tmou jsme rostliny uzavřeli na 2 h do plastové nádoby s éterem nebo bez éteru (kontrola) a nechali inkubovat ve tmě. Pro navození únikového pohybu chloroplastů jsme po stejné inkubaci ve tmě rostliny vytáhli z plastové nádoby a 30 min jsme aplikovali silné BL (350 μmol·m⁻²·s⁻¹).

Pro pozorování pozice chloroplastů v buňkách byl použit konfokální laserový skenovací mikroskop Fluoview 1000 (Olympus, Šindžuku, Japonsko). Obrázky z konfokálního mikroskopu byly zpracovány v programu FV10-ASW (Olympus, Šindžuku, Japonsko). Listové segmenty byly před přípravou mikroskopických preparátů zbaveny bublinek vzduchu ponořením do vody v injekční stříkačce a opakovaným vytvořením podtlaku vytažením pístu stříkačky při současném ucpání otvoru hrdla stříkačky. Při pozorování byl použit excitační laser s vlnovou délkou 633 nm a emisní filtr propouštějící světlo o vlnových délkách 655–755 nm. Presentované snímky jsou poskládány z 8-10 optických řezů o šířce 4 μm. Mikroskop byl obsluhován Mgr. Markem Rácem, Ph.D.

3.1.5 Statistické vyhodnocení

Data prezentovaná v grafech byla zpracována v programu Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Statistická významnost rozdílů

v pohybech chloroplastů a měřených gazometrických parametrech u kontrolních a anestetiky ošetřených rostlin byla porovnána pomocí nepárového t-testu.

3.1.6 Fotodokumentace

Prezentované fotografie byly vyfoceny pomocí mobilního telefonu Xiaomi Redmi Note 4 (Beijing Xiaomi Technology, Peking, Čína).

4 VÝSLEDKY

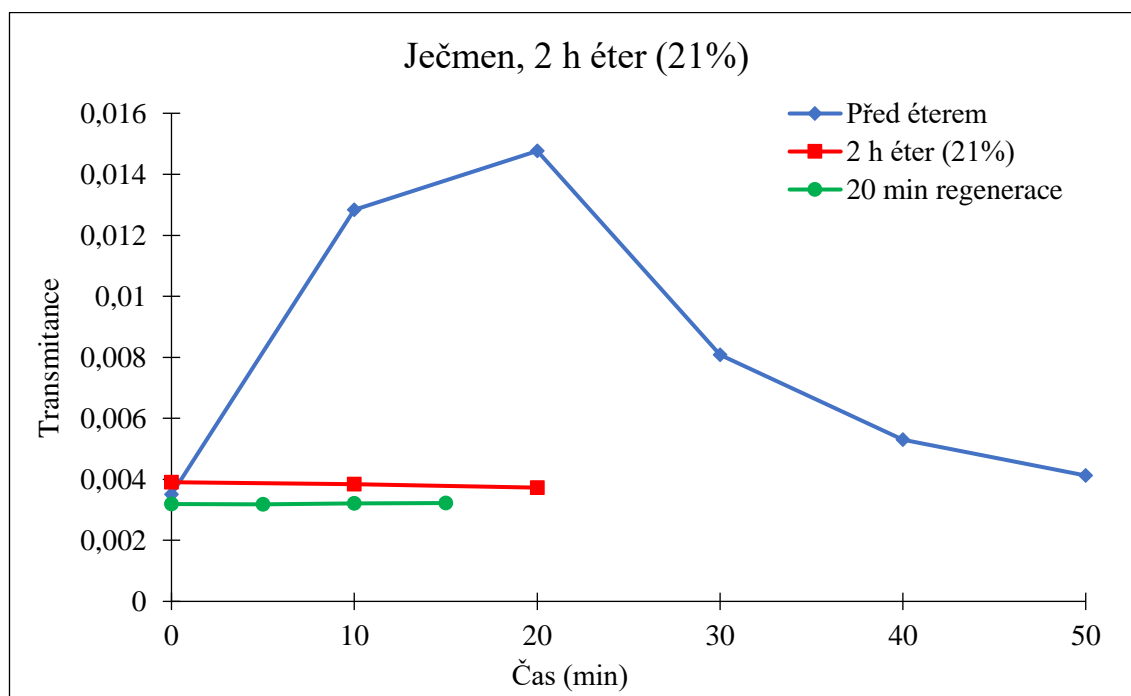
4.1 Pohyb chloroplastů

Nejprve budou popsány výsledky experimentů, ve kterých jsme měřili pohyb chloroplastů na stejném listu jedné rostliny před aplikací éteru, po aplikaci a v některých případech po zvolené době regenerace. Tento způsob jsme zvolili, protože pohyb chloroplastů v jednotlivých listech se může obecně lišit, což by komplikovalo posouzení změn pohybu chloroplastů způsobených aplikací anestetika.

4.1.1 Měření na stejném listu jedné rostliny

4.1.1.1 Ječmen

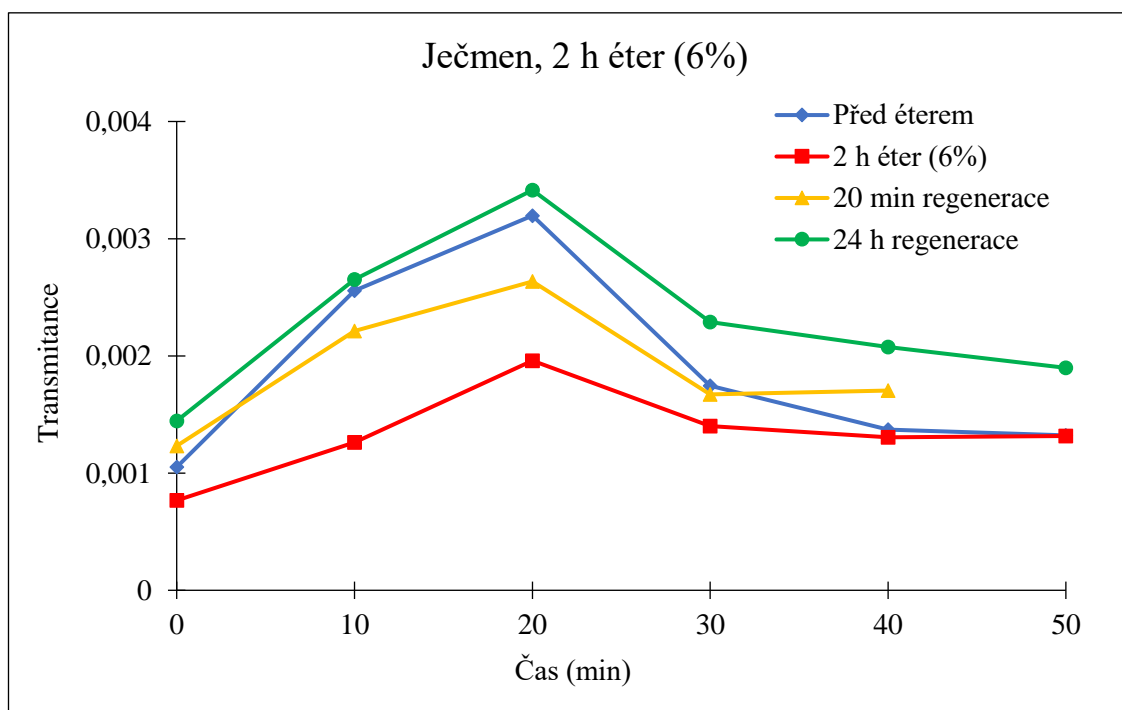
Při experimentech s ječmenem jsme aplikovali éter pomocí ZIP sáčků (transmitance listu byla měřena přes průhledné vrstvy ZIP sáčku; Obr. 5). Při měření s malým ZIP sáčkem byl před aplikací éteru nárůst transmitance (který odráží únikový pohyb chloroplastů) oproti počáteční hodnotě přibližně čtyřnásobný (Obr. 11, modrá křivka, čas 20 min).



Obr. 11 Změna transmitance při únikovém (0-20 min) a akumulacním (20-50 min) pohybu chloroplastů u ječmene. Měřeno před aplikací éteru (modré hodnoty), po 2 h aplikace 21% éteru (červené hodnoty) a po 20 min regenerace (zelené hodnoty). Éter aplikován pomocí malého ZIP sáčku, transmitance (při 436 nm) měřena na listu umístěném v tomto sáčku. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostliny 19 dní. Měřen 2. list.

Aplikací slabého BL byl vyvolán akumulární pohyb chloroplastů, v jehož důsledku transmitance klesá (Obr. 11, modrá křivka, čas 20-50 min). Při měření před aplikací éteru klesla transmitance oproti maximu v čase 20 min na 3 % (Obr. 11, modrá křivka, čas 50 min). Po inkubaci měřeného listu v 21% éteru po dobu 2 h byl únikový pohyb chloroplastů zcela inhibován (Obr. 11, červená křivka). Následně jsme sáček otevřeli, éter vyvětrali a po 20 min měření zopakovali, únikový pohyb chloroplastů byl však stále zcela inhibován (Obr. 11, zelená křivka). Experiment jsme provedli na více rostlinách s podobným výsledkem (data neuvedena). Domníváme se, že zvolená koncentrace éteru 21 % byla příliš vysoká. Roli mohla sehrát i malá velikost ZIP sáčku.

V dalším experimentu jsme použili větší ZIP sáček a menší koncentraci éteru (6 %). Nejprve porovnáme únikový pohyb (Obr. 12, čas 0-20 min). Po 20 min působení silného BL transmitance dosáhla při měření před aplikací éteru trojnásobku počáteční hodnoty (Obr. 12, modrá křivka, čas 20 min). Po inkubaci v éteru byl nárůst transmitance v čase 20 min přibližně 2,5násobný (Obr. 12, červená křivka, čas 20 min). Únikový pohyb chloroplastů byl tedy po aplikaci éteru částečně inhibován. Následně jsme sáček otevřeli, éter vyvětrali a po 20 min regenerace opětovně změřili (Obr. 12, žlutá křivka, čas 20 min).



Obr. 12 Změna transmitance při únikovém (0-20 min) a akumulárním (20-50 min) pohybu chloroplastů u ječmene. Měřeno před aplikací éteru (modré hodnoty), po 2 h aplikace 6% éteru (červené hodnoty) a po regeneraci (20 min žluté hodnoty; 24 h zelené hodnoty). Éter aplikován pomocí velkého ZIP sáčku, transmitance (při 436 nm) měřena na listu umístěném v tomto sáčku. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostliny 19 dní. Měření 3. list.

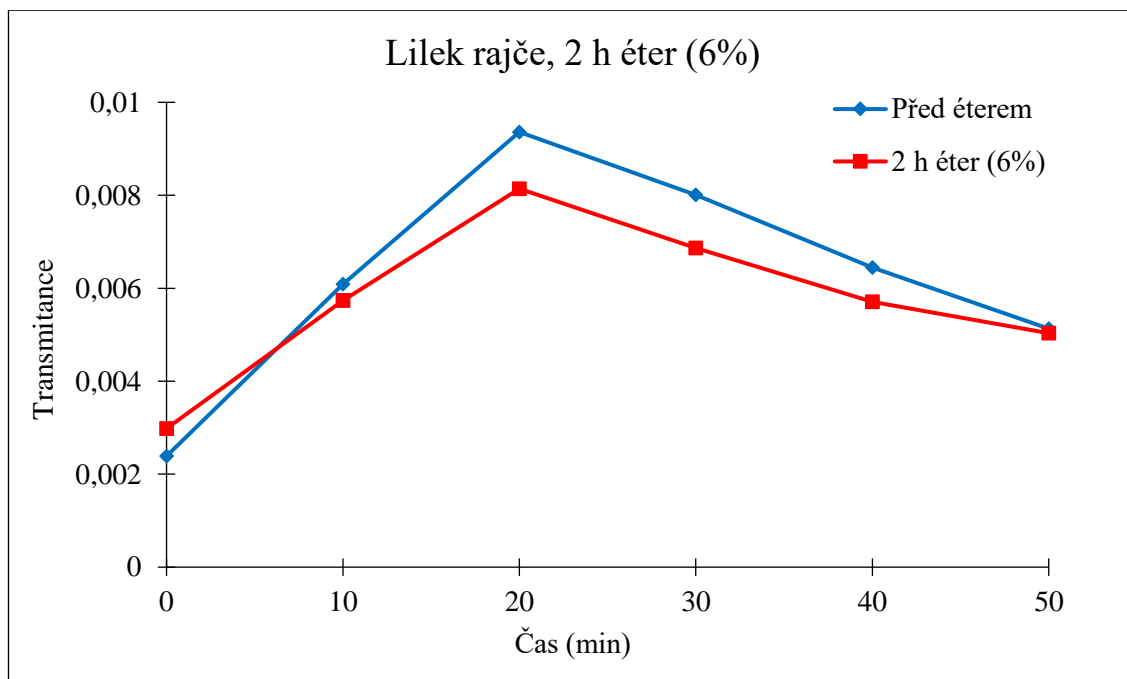
Tentokrát vzrostla transmitance během 20 min působení silného BL pouze dvojnásobně – únikový pohyb se tedy po 20 min regenerace nejen neobnovil, ale byl inhibovaný více než v předchozím měření po aplikaci éteru. Po 24 h jsme měření zopakovali a tentokrát byl nárůst transmitance v čase měření 20 min 2,4násobný (Obr. 12, zelená křivka, čas 20 min). Únikový pohyb chloroplastů nebyl zcela obnoven, absolutní hodnoty transmitance po 24 h regenerace byly však vyšší než při měření před aplikací éteru (Obr. 12, modrá křivka).

V případě akumulčního pohybu chloroplastů klesla transmitance oproti maximu v čase 20 min při měření před aplikací éteru na 13 % (Obr. 12, modrá křivka, čas 50 min). U měření s éterem byl pokles na 46 % maxima (Obr. 12, červená křivka, čas 50 min), po 24 h regenerace na 38 % maxima (Obr. 12, zelená křivka, čas 50 min). Při měření bez éteru byl tedy akumulční pohyb chloroplastů největší, po aplikaci éteru se zhoršil a po 24 h regenerace mírně zlepšil, nicméně nedosáhl takového rozsahu, jako před aplikací éteru.

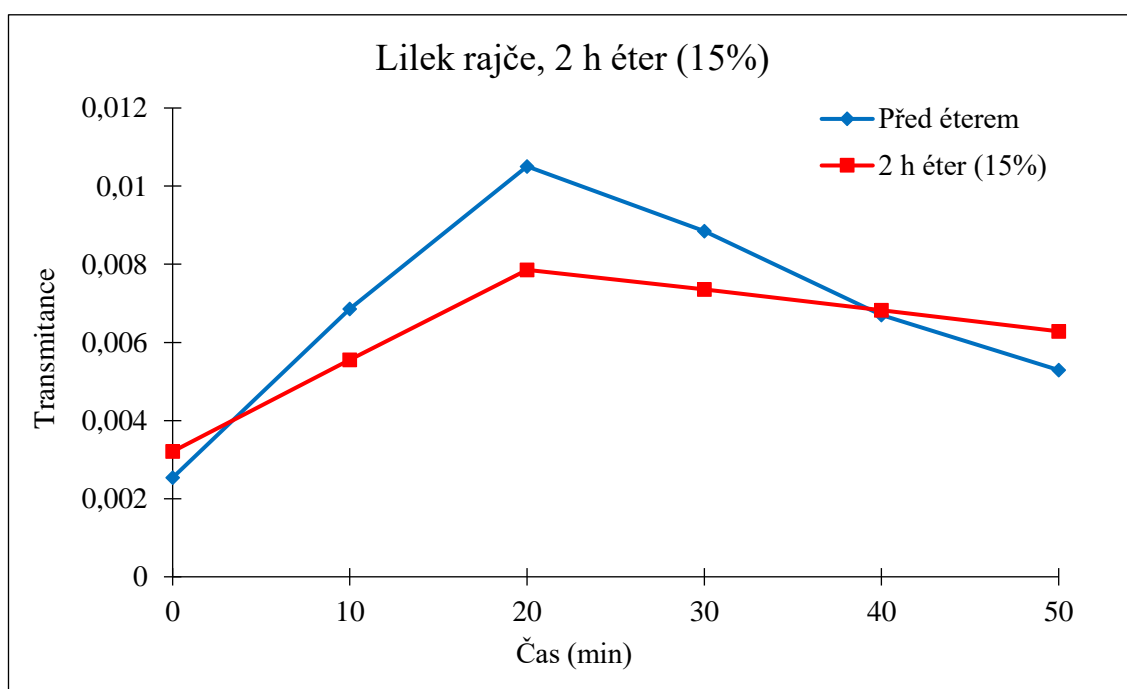
Při měření po 24 h regenerace byl měřený list mírně povadlý. Otázkou tedy je, zda byla snižená míra obou typů pohybu chloroplastů po aplikaci éteru způsobena jeho možnými anestetickými účinky na pohyby chloroplastů nebo případným toxickým efektem použité koncentrace ve spojení s aplikací v ZIP sáčku (nebo kombinací obou efektů). V následujících experimentech jsme pro aplikaci éteru využívali plastovou nádobu o objemu 0,8 l (Obr. 6), ve které se výpary éteru mohly rovnoměrněji rozptýlit.

4.1.1.2 Lilek rajče

Při experimentech s lilkem rajčete jsme použili éter o koncentraci 6 a 15 % a inkubaci rostlin v plastových nádobách (Obr. 6). Při měření před aplikací 6% éteru byl nárůst transmitance po 20 min silného BL přibližně čtyřnásobný a po inkubaci v éteru 2,7násobný (Obr. 13, čas 20 min). Před aplikací 15% éteru byl nárůst transmitance po 20 min působení silného BL opět přibližně čtyřnásobný, po aplikaci éteru 2,5násobný (Obr. 14, čas 20 min). Po aplikaci éteru tedy v případě obou koncentrací došlo k částečné inhibici únikového pohybu chloroplastů, přičemž míra inhibice se mezi použitými koncentracemi příliš nelišila.



Obr. 13 Změna transmittance při únikovém (0-20 min) a akumulčním (20-50 min) pohybu chloroplastů u rostliny lilku rajčete. Měřeno před aplikací éteru (modré hodnoty) a po 2 h inkubace v plastové nádobě s 6% éterem (červené hodnoty). Transmittance měřena při 436 nm. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostliny 4 týdny. Měřeny 2. pravé listy. Měření opakováno na více rostlinách s podobným výsledkem (data neuvedena).



Obr. 14 Změna transmittance při únikovém (0-20 min) a akumulčním (20-50 min) pohybu chloroplastů u rostliny lilku rajčete. Měřeno před aplikací éteru (modré hodnoty) a po 2 h inkubace v plastové nádobě s 15% éterem (červené hodnoty). Transmittance měřena při 436 nm. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostliny 5 týdnů. Měřeny 2. pravé listy.

V případě akumulčního pohybu klesla transmittance při měření před aplikací 6% éteru na 40 % maxima z času 20 min, po aplikaci éteru klesla transmittance během stejného času působení slabého BL na 39 % (Obr. 13, čas 50 min). Po působení 6% éteru tedy nedošlo k výraznější změně v akumulčním pohybu chloroplastů. Po aplikaci 15% éteru jsme však naměřili částečnou inhibici akumulčního pohybu – u měření před aplikací éteru klesla transmittance na 35 % maxima, po působení éteru pouze na 66 % maxima oproti času měření 20 min (Obr. 14, čas 50 min).

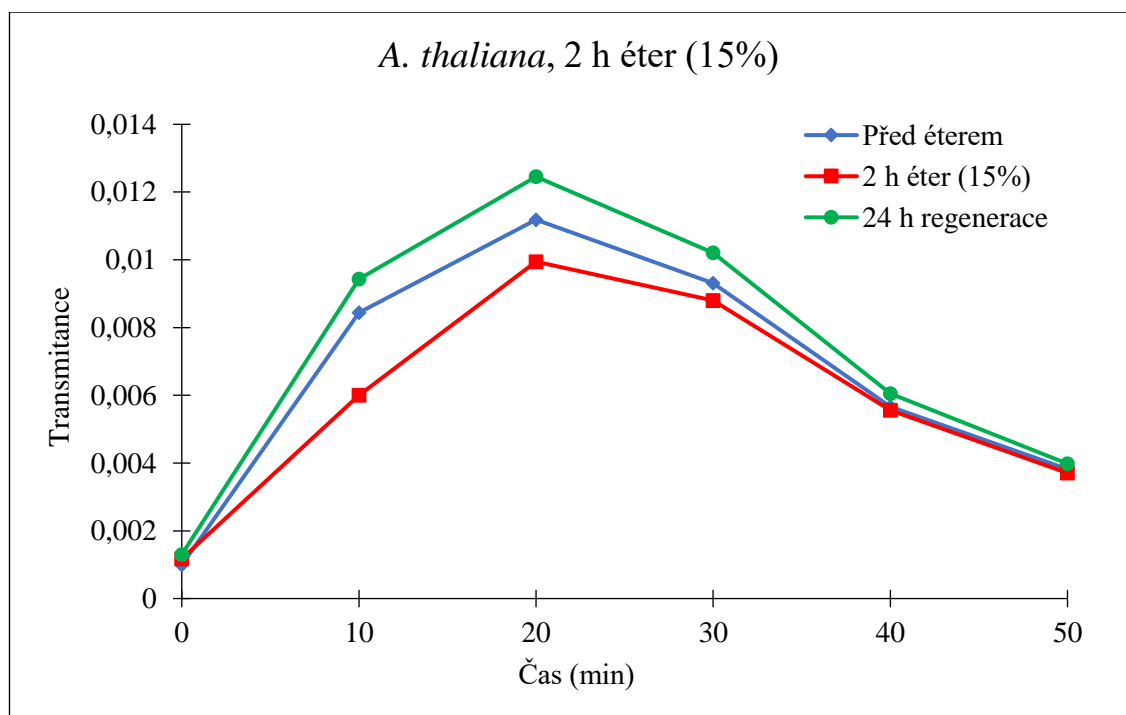
Při experimentech s lilkem rajčete jsme se stejně jako u ječmene potýkali s velkou citlivostí rostlin na éter. Po aplikaci 6% éteru byla rostlina po měření mírně povadlá, po týdnu se jí původní vitální vzhled vrátil. Po aplikaci 15% éteru byla rostlina již výrazně povadlá (Obr. 15) a v následujících dnech uhynula. Je tedy možné, že výše popsaná částečná inhibice únikového a v případě aplikace 15% éteru i akumulčního pohybu chloroplastů mohla být způsobena toxickým efektem éteru na rostliny rajčete než jeho případným anestetickým účinkem.



Obr. 15 Rostlina lilku rajčete 24 h po aplikaci 15% éteru.

4.1.1.3 *A. thaliana*

Výsledek měření změn transmitance odrážejících pohyb chloroplastů u rostlin *A. thaliana* před a po aplikaci 15% éteru je prezentován na Obr. 16. Před aplikací éteru vzrostla transmitance během 20 min působení silného BL na 11,3násobek původní hodnoty, po aplikaci 15% éteru na 8,4násobek a při měření po 24 h regenerace narostla transmitance 9,6krát (Obr. 16, čas 20 min). Po působení éteru tedy došlo k částečné inhibici únikového pohybu chloroplastů, přičemž po 24 h regenerace jsme pozorovali částečné zlepšení únikového pohybu chloroplastů. Změnu v akumulacním pohybu jsme po aplikaci 15% éteru nepozorovali. Při měření před aplikací éteru klesla po 30 min působení slabého BL transmitance na 28 %, po aplikaci éteru na 29 % a 24 h po aplikaci na 24 % maxima z času 20 min (Obr. 16, čas 50 min). Experiment jsme provedli na více rostlinách s podobným výsledkem (data neuvedena).



Obr. 16 Změna transmitance při únikovém (0-20 min) a akumulacním (20-50 min) pohybu chloroplastů rostliny *A. thaliana*. Měřeno před aplikací éteru (modré hodnoty), po 2 h inkubace v plastové nádobě s 15% éterem (červené hodnoty) a po 24 h regenerace (zelené hodnoty). Transmitance měřena při 436 nm. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostliny 8 týdnů. Měření opakováno na více rostlinách s podobným výsledkem (data neuvedena).

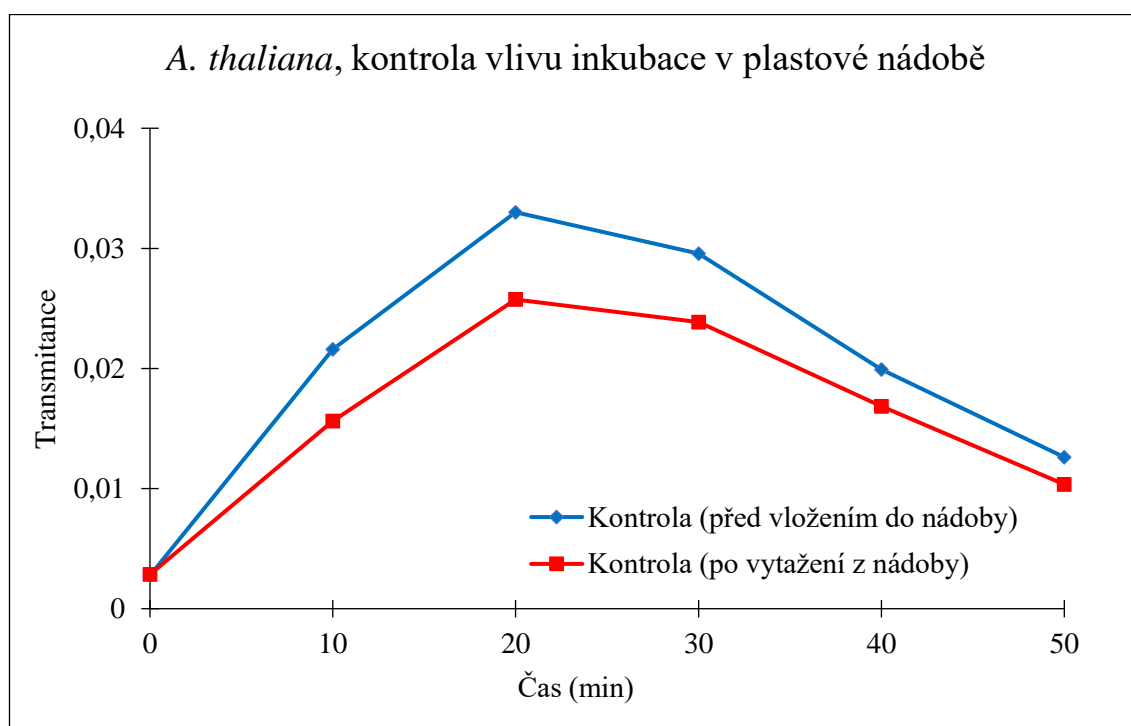
U rostlin *A. thaliana* jsme zaznamenali obecně větší změny transmittance vyvolané BL než u ostatních druhů rostlin, zejména po působení silného BL (Tab. 1). U rostlin *A. thaliana* způsobila aplikace silného BL po dobu 20 min nárůst transmittance v průměru na 1200 % počáteční hodnoty, u rostlin ječmene a lilku rajčete byl tento nárůst pouze přibližně na 400 % počáteční hodnoty.

Tab. 1 Průměrná změna transmittance (n = 3-6) vlivem působení silného ($470 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a slabého ($1,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) modrého světla v experimentech s měřením na stejném listu jedné rostliny (uvedeny hodnoty pro rostliny bez aplikace éteru). Započtena i měření, která nejsou v DP prezentována.

	Nárůst transmittance po 20 min silného modrého světla (% oproti výchozímu stavu v čase měření 0 min)	Pokles transmittance po 30 min slabého modrého světla (% oproti maximu v čase měření 20 min)
Ječmen	360	10
Lilek rajče	400	41
<i>A. thaliana</i>	1160	31

4.1.2 Měření na různých rostlinách

Výše popsaná inhibice pohybu chloroplastů po inkubaci rostlin v uzavřených plastových nádobách s éterem mohla být do určité míry způsobena i samotným uzavřením rostlin v nádobě. Proto jsme provedli experiment, při kterém jsme měřili pohyb chloroplastů před a po inkubaci rostliny v plastové nádobě bez éteru (Obr. 17). Při měření na rostlině před vložením do nádoby vzrostla transmittance v čase měření 20 min 12násobně, po inkubaci 9násobně. Stejný experiment jsme provedli vícekrát a to i na rostlinách tabáku a výsledky byly obdobné (data neuvedena). Tento experiment potvrdil negativní efekt vlastní inkubace rostliny v uzavřené nádobě na pohyb chloroplastů, který jsme původně přisuzovali působení éteru. Z tohoto důvodu jsme tedy začali měřit pohyb chloroplastů zvlášť na rostlinách inkubovaných v nádobě s éterem a na rostlinách inkubovaných v nádobě bez éteru (kontrolní varianta). Zároveň jsme prodloužili dobu působení silného BL z 20 na 30 min za účelem saturace únikového pohybu chloroplastů a dobu působení slabého BL jsme zkrátili z 30 na 20 min.



Obr. 17 Změna transmittance při únikovém (0-20 min) a akumulacním (20-50 min) pohybu chloroplastů u *A. thaliana*. Měřeno před vložením do plastové nádoby (modré hodnoty) a po 2 h inkubace v plastové nádobě bez éteru (červené hodnoty). Transmittance měřena při 436 nm. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostlin 6 týdnů. Měření opakováno na více rostlinách s podobným výsledkem (data neuvedena).

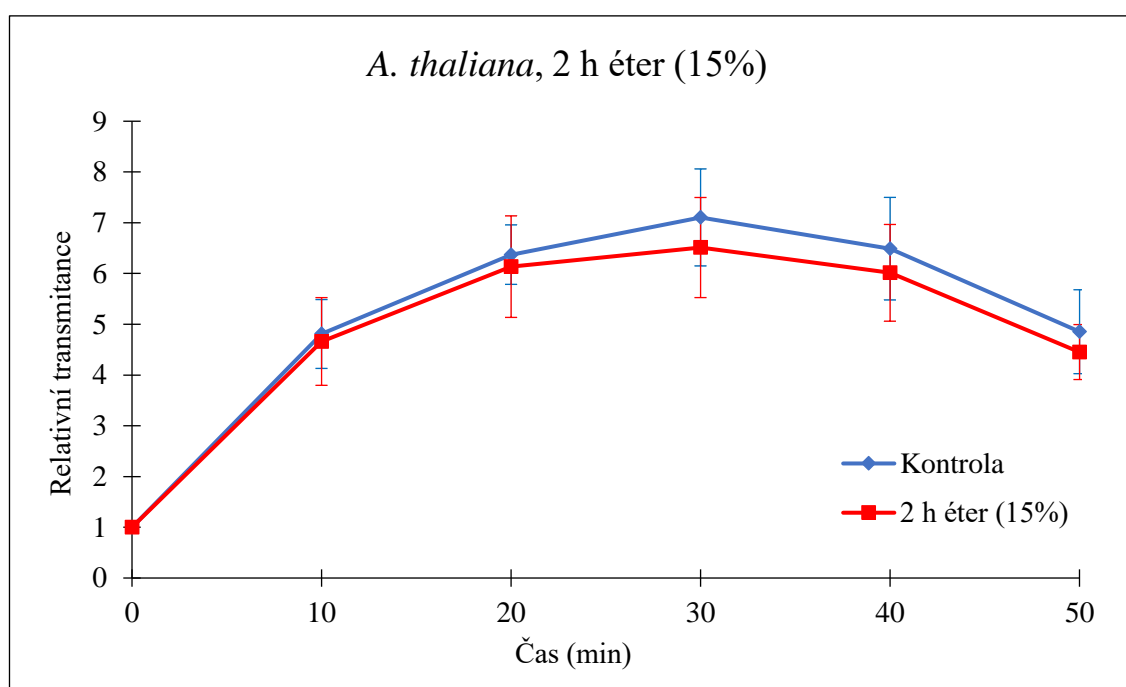
V testovacích experimentech (data neuvedena) jsme ověřili, že po 30 min působení silného BL ($470 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se chloroplasty přesunuli do pozice parastrophe (tj. ke stěnám buněk rovnoběžným s dopadajícím zářením) a došlo k saturaci nárůstu transmittance.

4.1.2.1 *A. thaliana*

4.1.2.1.1 Vliv éteru

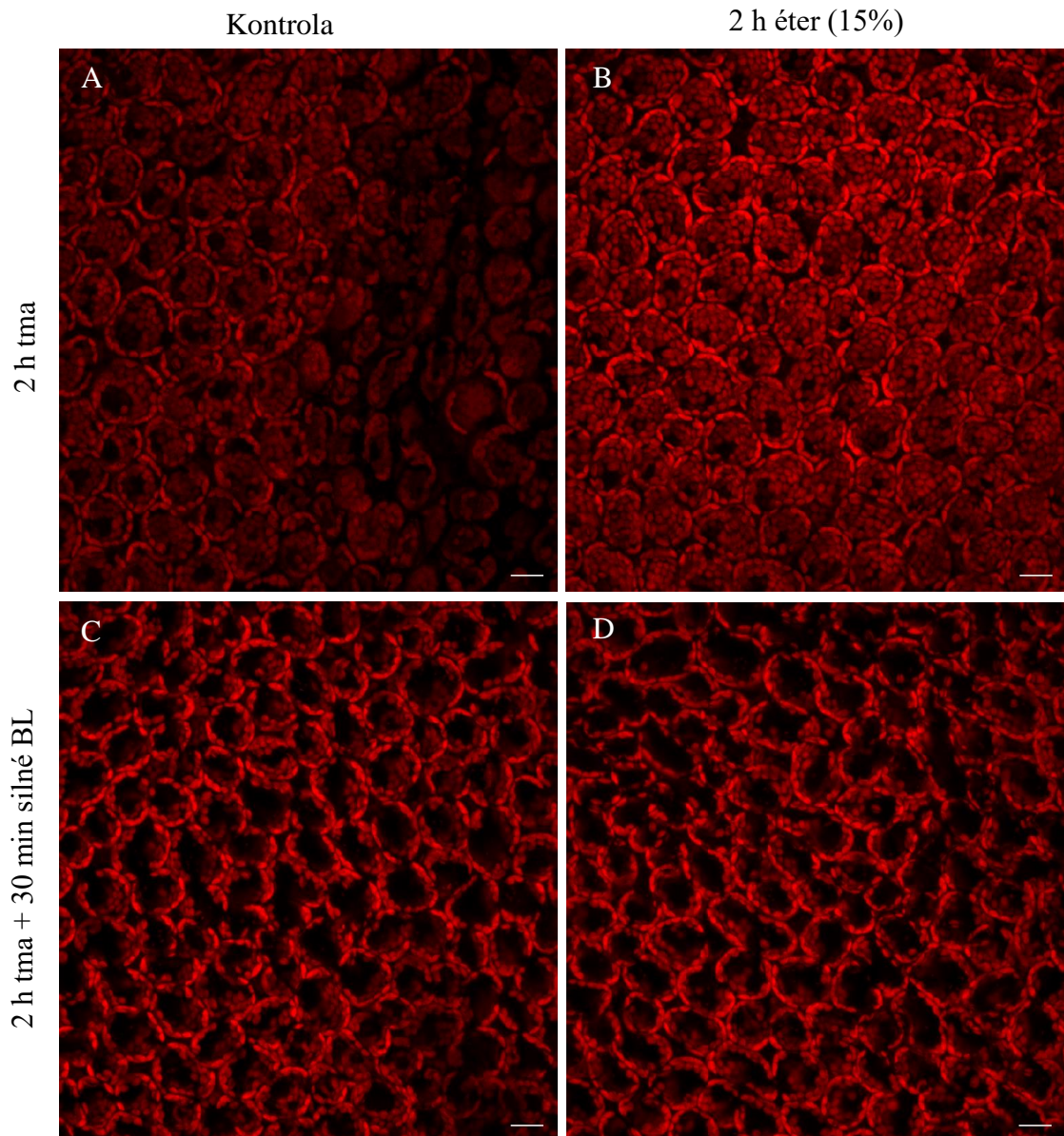
Výsledky získané v nově uspořádaném experimentu stanovujícím vliv éteru na pohyby chloroplastů *A. thaliana* jsou prezentovány na Obr. 18 (nárůst a pokles transmittance převeden na relativní hodnoty). Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v pohybech chloroplastů mezi kontrolními rostlinami a rostlinami inkubovanými po dobu 2 h v 15% éteru.

Výsledky měření pohybu chloroplastů pomocí změn transmittance byly v tomto experimentu doplněny vizualizací pozice chloroplastů pomocí konfokálního mikroskopu.



Obr. 18 Změna relativní transmittance při únikovém (0-30 min) a akumulacním (30-50 min) pohybu chloroplastů u *A. thaliana*. Měření kontrolní rostliny inkubované 2 h v plastové nádobě bez éteru (modré hodnoty) a rostliny inkubované 2 h v plastové nádobě s 15% éterem (červené hodnoty), před měřením byly rostliny z nádob vyjmuty. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n=4$). Transmittance měřena při 436 nm. Před měřením zatměněno 2 h. Stáří rostlin 6 týdnů.

Dokumentovali jsme pozici chloroplastů v listech adaptovaných na tmu a pozici po jejich únikovém pohybu vyvolaném silným BL. Kontrolní rostliny i rostliny inkubované v éteru měly po 2 h ve tmě chloroplasty rovnoměrně rozprostřeny u stěn buněk kolmých k dopadajícímu záření (Obr. 19A, 19B). Po aplikaci silného BL po dobu 30 min byly chloroplasty rostlin obou variant umístěny převážně podél stěn buněk rovnoběžných se směrem silného BL (Obr. 19C, 19D).



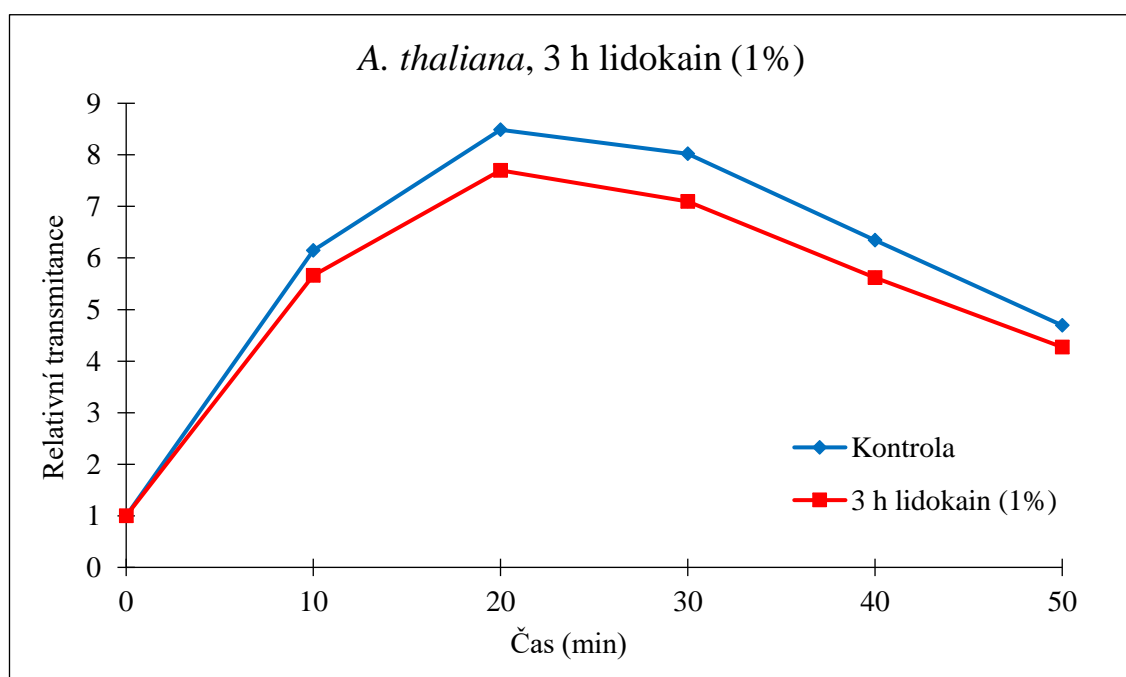
Obr. 19 Konfokální snímky mezofylových buněk listových preparátů *A. thaliana*. (A, B) Pozice chloroplastů po 2 h ve tmě. (C, D) Pozice chloroplastů po 2 h zatemnění a 30 min působení silného modrého světla ($350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). (A, C) Kontrolní rostliny bez aplikace éteru. (B, D) Rostliny po 2 h inkubace v 15% éteru (během zatemnění). (D) Před aplikací silného modrého světla byla rostlina vyjmuta z atmosféry éteru. Stáří rostlin 6 týdnů. Měřítka 50 μm .

Pomocí konfokálního mikroskopu jsme tak potvrdili, že pozice chloroplastů při adaptaci na tmu a po působení silného BL nebyly éterem ovlivněny, tedy že éter neinhiboval únikový pohyb chloroplastů.

Při experimentech s *A. thaliana* jsme na rostlinách po aplikaci éteru nezaznamenali žádné známky poškození.

4.1.2.1.2 Vliv lidokainu

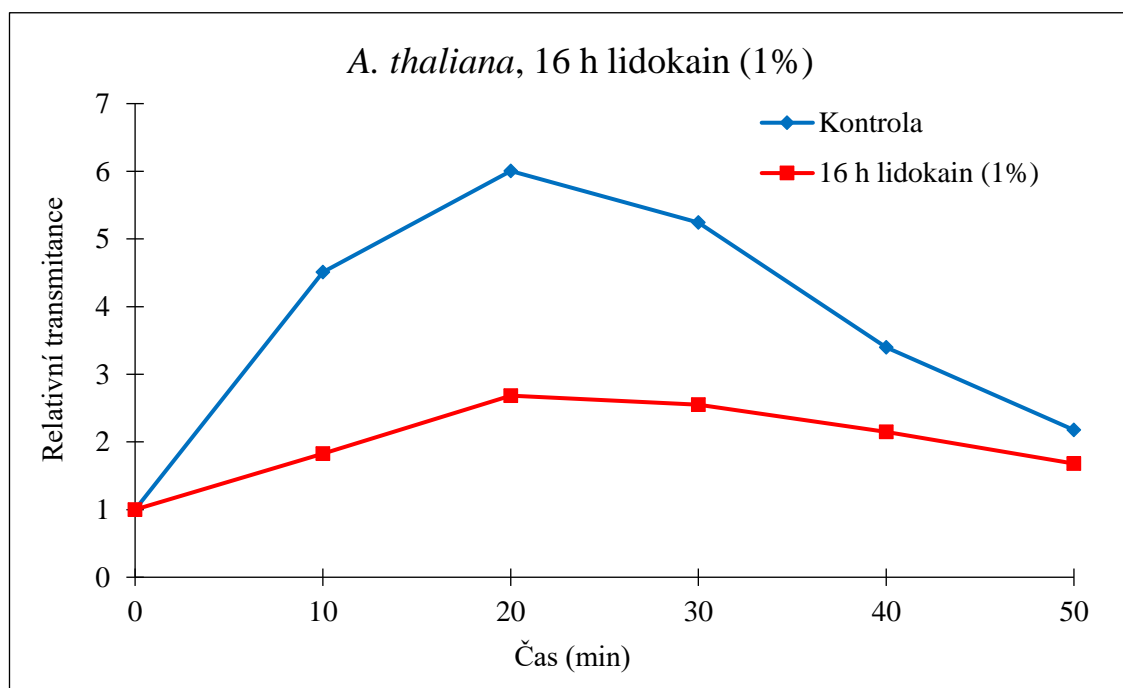
Lidokain jsme aplikovali na ustřížené listy rostlin ponořením řápíku do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (na rozdíl od éteru, který byl aplikován inkubací celé rostliny v jeho parách). Vliv lidokainu na pohyby chloroplastů ustřížených listů *A. thaliana* je zobrazen na Obr. 20 (při tomto experimentu byly ještě použity původní světelné podmínky – 20 min silné BL a 30 min slabé BL). Při měření na kontrolním listu (řápík ponořený do deionizované vody) vzrostla transmitance po 20 min silného BL na 8,5násobek. U listu ošetřeného 1% lidokainem byl tento nárůst 7,7násobný (Obr. 20, čas 20 min). Po působení lidokainu jsme tedy pozorovali částečnou inhibici únikového pohybu chloroplastů, která však nebyla příliš výrazná.



Obr. 20 Změna relativní transmitance při únikovém (0-20 min) a akumulacním (20-50 min) pohybu chloroplastů u *A. thaliana*. Lidokain aplikován na ustřížený list ponořený řápíkem po dobu 3 h do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (červené hodnoty), jako kontrola použita deionizovaná voda (modré hodnoty). Transmitance měřena při 436 nm. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostlin 6 týdnů.

V případě akumulčního pohybu chloroplastů jsme po aplikaci lidokainu změny nepozorovali – při kontrolním měření i při měření s lidokainem klesla transmitance během 30 min slabého BL na přibližně 50 % maximální hodnoty (Obr. 20, čas 50 min).

Při následujícím experimentu jsme listy *A. thaliana* inkubovali v 1% roztoku lidokainu po dobu 16 h. Únikový pohyb byl výrazně inhibovaný - transmitance u kontroly se oproti počáteční hodnotě zvýšila 6krát, u listu ošetřeného lidokainem pouze 2,7krát (Obr. 21, čas 20 min). Při aplikaci slabého BL jsme u listu ošetřeného lidokainem oproti kontrole naměřili částečnou inhibici akumulčního pohybu chloroplastů. V případě kontroly klesla transmitance přibližně na 24 % maxima z času 20 min, u lidokainu pouze na 40 % maxima (Obr. 21, čas 50 min). Tento experiment jsme provedli na ustřižených listech více rostlin s podobným výsledkem (data neuvedena).



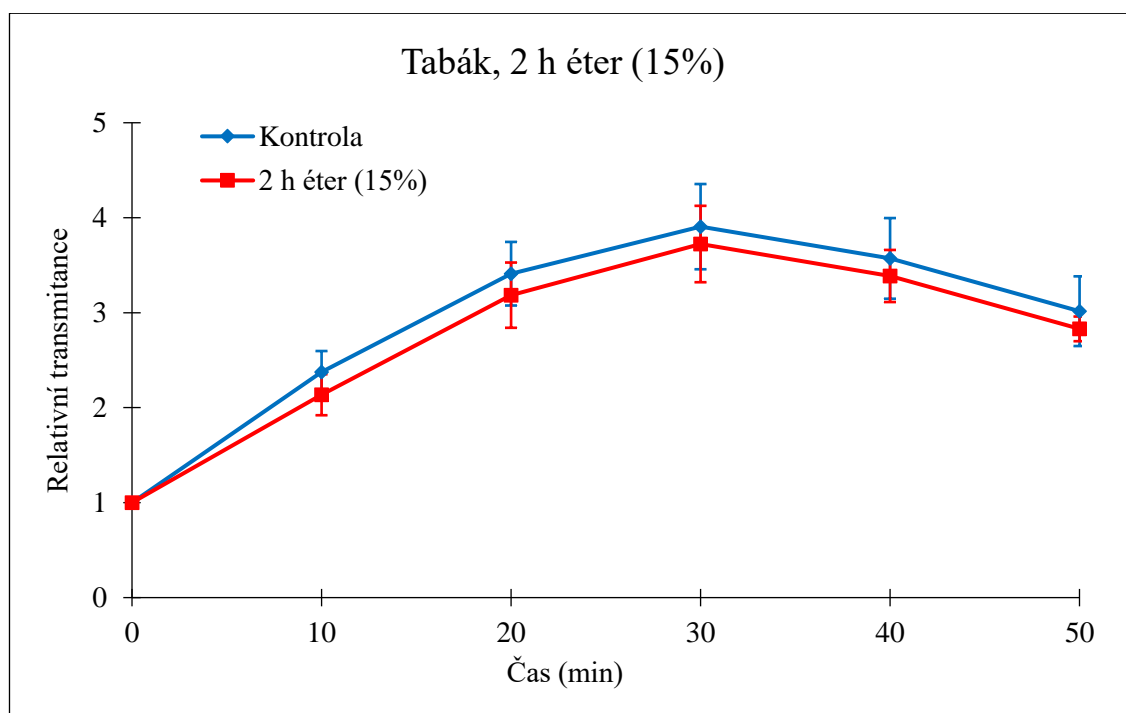
Obr. 21 Změna relativní transmitance při únikovém (0-20 min) a akumulčním (20-50 min) pohybu chloroplastů u *A. thaliana*. Lidokain aplikován na ustřižený list ponořený řapíkem po dobu 16 h do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (červené hodnoty), jako kontrola použita deionizovaná voda (modré hodnoty). Transmitance měřena při 436 nm. Před měřením zatemněno 30 min. Stáří rostlin 6 týdnů. Měření opakováno na více listech různých rostlin s podobným výsledkem (data neuvedena).

Ustřižené listy byly po skončení měření ponořeny řápkem do deionizované vody. Listy, na které byl aplikován lidokain, 2-3 dny po experimentu zcela uvadly, kontrolní listy vydržely v deionizované vodě týden. Otázkou tedy je, zda byla zjištěná inhibice únikového a v případě aplikace lidokainu po dobu 16 h i akumulčního pohybu chloroplastů způsobena jeho anestetickým nebo toxickým efektem (případně jejich kombinací).

4.1.2.2 Tabák

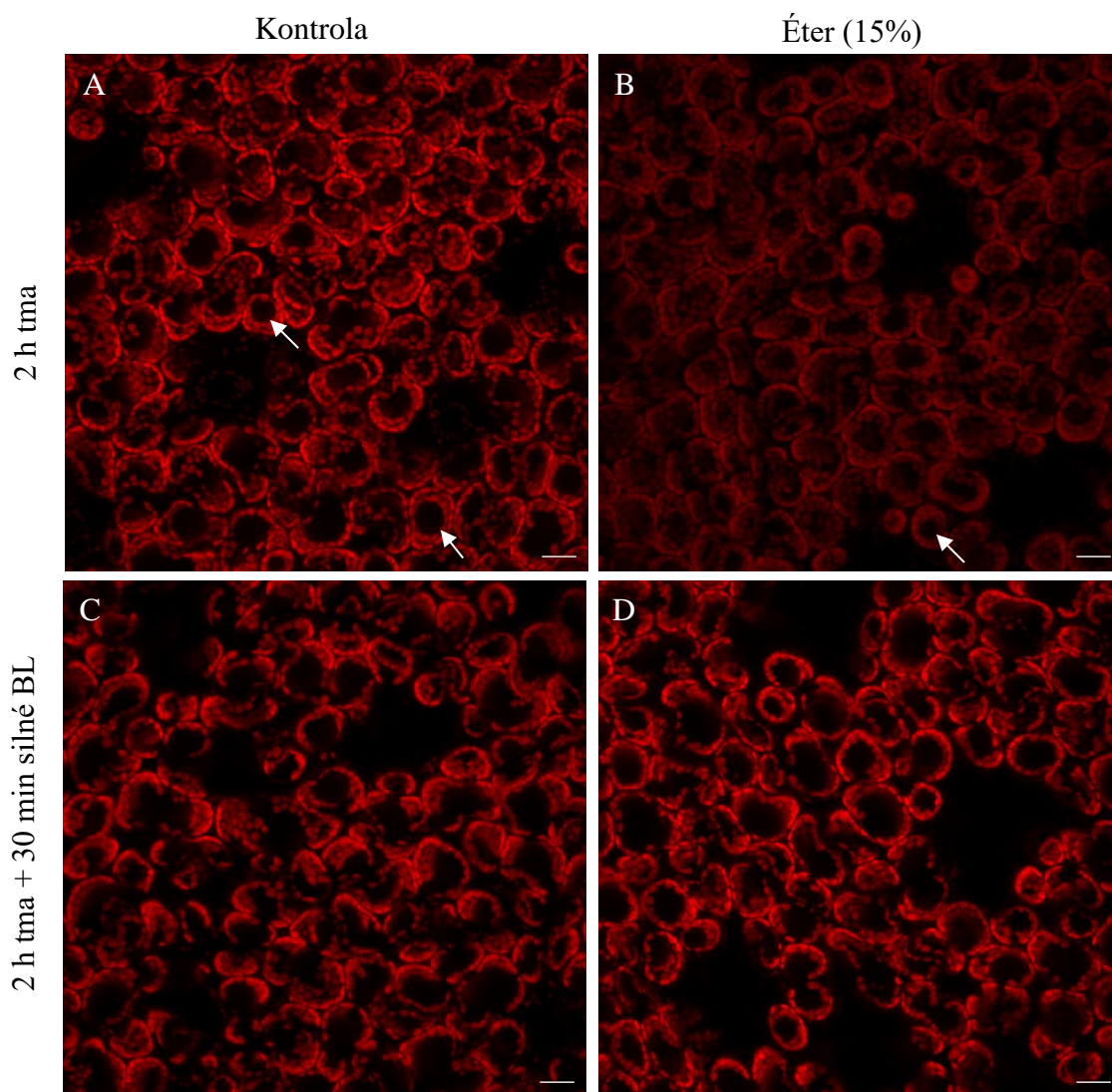
4.1.2.2.1 Vliv éteru

Na rostlinách tabáku jsme stejně jako v případě *A. thaliana* (Obr. 18) nezjistili vliv éteru na pohyb chloroplastů. Únikový ani akumulční pohyb se u kontrolních rostlin a rostlin ošetřených éterem statisticky významně nelišil (Obr. 22).



Obr. 22 Změna relativní transmittance při únikovém (0-30 min) a akumulčním (30-50 min) pohybu chloroplastů u tabáku. Měřeny kontrolní rostliny inkubované 2 h v plastové nádobě bez éteru (modré hodnoty) a rostliny inkubované 2 h v plastové nádobě s 15% éterem (červené hodnoty), před měřením byly rostliny z nádob vyjmuty. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky (n=4). Transmittance měřena při 436 nm. Před měřením zatemněno 2 h. Stáří rostlin 7 týdnů. Měřeny 4. listy od vrcholu.

Z pozorování v konfokálním mikroskopu vyplynulo, že po 2 h ve tmě se chloroplasty buněk kontrolních i éterem ošetřených rostlin tabáku nerozprostřely podél buněčných stěn kolmých k dopadajícímu světlu do takové míry, jako v případě *A. thaliana* (Obr. 19A, 19B). Uprostřed buněk tabáku byly místy mezery s absencí chloroplastů (Obr. 23A, 23B; příklady mezer označeny šipkami). Po aplikaci silného BL se chloroplasty kontrolních rostlin i rostlin ošetřených éterem přesunuly ke stěnám buněk rovnoběžným k dopadajícímu záření (Obr. 23C, 23D).

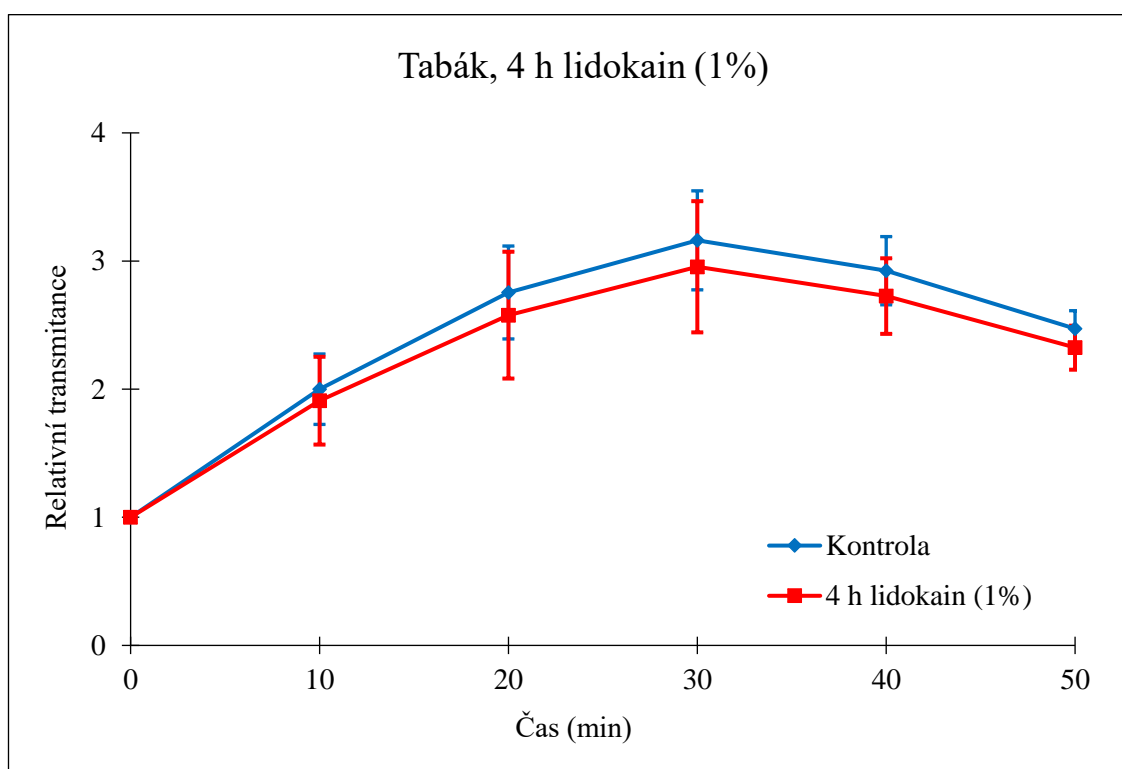


Obr. 23 Konfokální snímky mezofylových buněk listových preparátů tabáku. (A, B) Pozice chloroplastů po 2 h ve tmě. (C, D) Pozice chloroplastů po 2 h zatemnění a 30 min působení silného modrého světla ($350 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). (A, C) Kontrolní rostliny bez aplikace éteru. (B, D) Rostliny po 2 h inkubace v 15% éteru (během zatemnění). (D) Před aplikací silného modrého světla byla rostlina vyjmuta z atmosféry éteru. Stáří rostlin 8 týdnů. Pozorovány 5. listy od vrcholu. Měřítko $50 \mu\text{m}$.

Pomocí konfokálního mikroskopu jsme tedy mezi kontrolními a éterem ošetřenými rostlinami tabáku nepozorovali rozdíly v pozicích chloroplastů při adaptaci na tmou a po působení silného BL, což je v souladu s výsledky měření pohybu chloroplastů tabáku pomocí změn transmittance (Obr. 22).

4.1.2.2 Vliv lidokainu

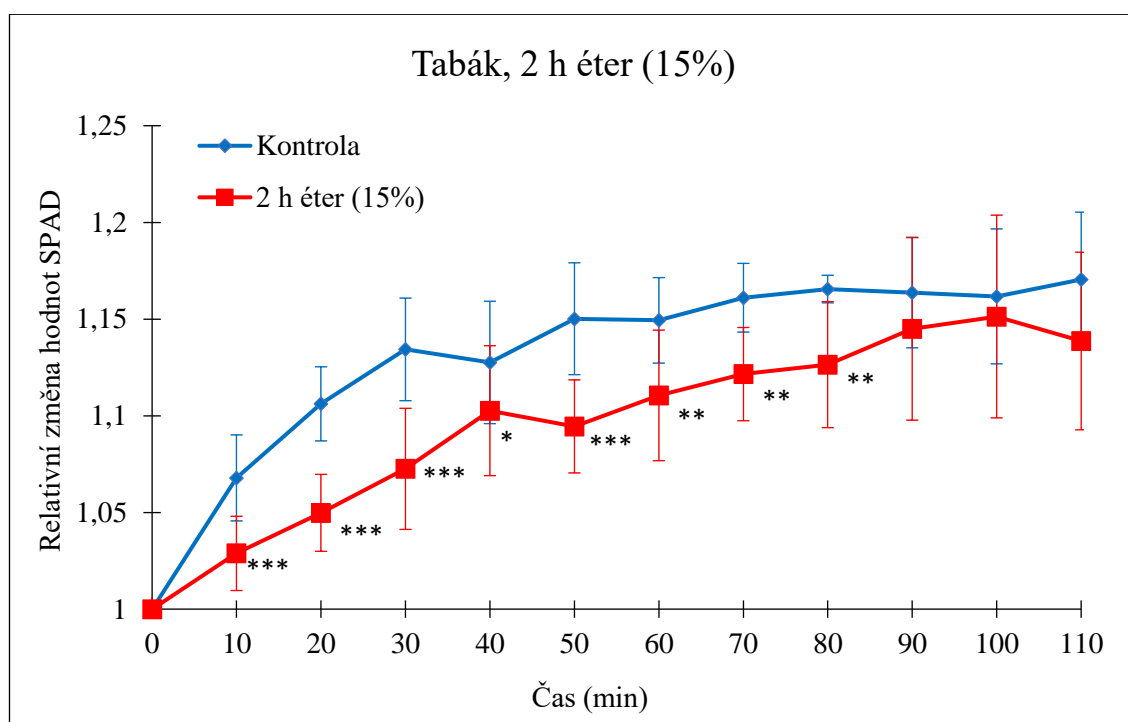
V uštířených listech tabáku jsme po aplikaci 1% lidokainu po dobu 4 h nezjistili statisticky významný rozdíl oproti listům kontrolním (Obr. 24). U obou variant narostla transmittance vlivem silného BL přibližně na trojnásobek počáteční hodnoty (Obr. 24, čas 30 min) a po působení slabého BL klesla na přibližně 70 % maxima (Obr. 24, čas 50 min).



Obr. 24 Změna relativní transmittance při únikovém (0-30 min) a akumulacním (30-50 min) pohybu chloroplastů u tabáku. Lidokain aplikován na uštířené listy ponořené řápkem po dobu 4 h do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (červené hodnoty), jako kontrola použita deionizovaná voda (modré hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky (n=4). Transmittance měřena při 436 nm. Před měřením zatměněno 2 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Měření 4. pravé listy.

4.1.2.2.3 Akumulační pohyb měřený pomocí chlorofylmetru

Výsledky měření akumulčního pohybu chloroplastů tabáku dle metodiky Nauš *et al.* (2010) chlorofylmetrem SPAD-502 jsou zobrazeny na Obr. 25. Při tomto experimentu jsme u rostlin tabáku ošetřených éterem zjistili statisticky významnou inhibici akumulčního pohybu chloroplastů, i když relativní změna hodnot SPAD odrážející tento pohyb není velká. Statisticky významné rozdíly hodnot SPAD mezi kontrolními a éterem ošetřenými rostlinami byly zaznamenány v čase měření 10-80 min (Obr. 25).



Obr. 25 Změna hodnot měřených chlorofylmetrem SPAD-502 při akumulčním pohybu chloroplastů tabáku vyvolaném slabým modrým světlem ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Měření kontrolní rostliny inkubované 2 h v plastové nádobě bez éteru (modré hodnoty) a rostliny inkubované 2 h v plastové nádobě s 15% éterem (červené hodnoty), před měřením byly rostliny z nádob vyjmuty. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky: „kontrola“ ($n=4$), „2 h éter“ ($n=5$). Statisticky významné rozdíly mezi variantami označeny hvězdičkami (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Před měřením zatemněno 4 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Na každé rostlině měřeny 2 nejstarší listy.

4.2 Otevírání průduchů

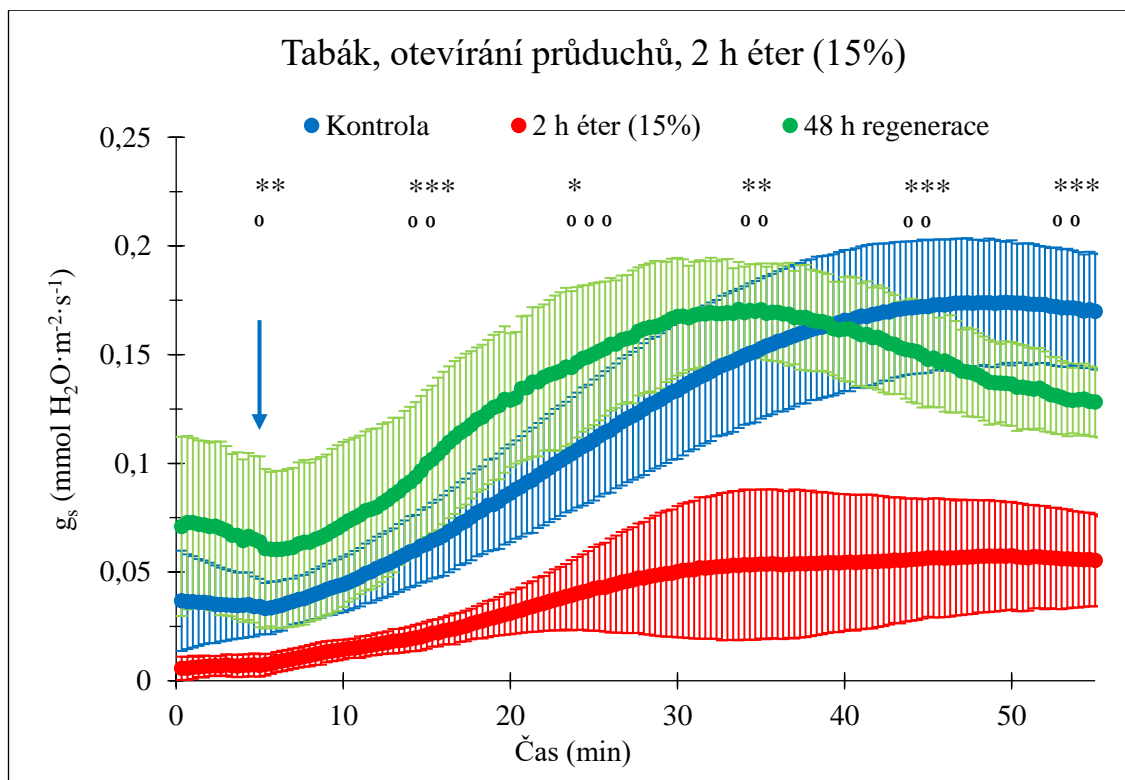
Pomocí gazometrie jsme sledovali, zda je otevírání průduchů vyvolané BL ovlivněné éterem a lidokainem. Konkrétně byly sledovány hodnoty stomatální vodivosti (g_s). Dále jsme stanovovali koncentraci CO_2 v mezibuněčných prostorech (C_i) a rychlost asimilace CO_2 (A), parametru odrážejícího rychlost fotosyntézy. Tyto dva parametry slouží k posouzení, zda je případná inhibice fotosyntézy způsobena větší uzavřeností průduchů (a s tím související limitací příjmu CO_2) nebo spíše inhibicí fotosyntetických reakcí. U tabáku jsme zjišťovali, jestli jsou zmíněné parametry ovlivněny působením éteru a lidokainu, u *A. thaliana* jsme aplikovali pouze éter.

4.2.1 Tabák

4.2.1.1 Vliv éteru

Výsledky vlivu éteru na otevírání průduchů tabáku vyvolané BL jsou zobrazeny na Obr. 26. Modré světlo bylo spuštěno po 5 min měření, během kterých byly listy ve tmě. Po spuštění modrého (aktinického) světla začala růst stomatální vodivost g_s , což odráželo otevírání průduchů.

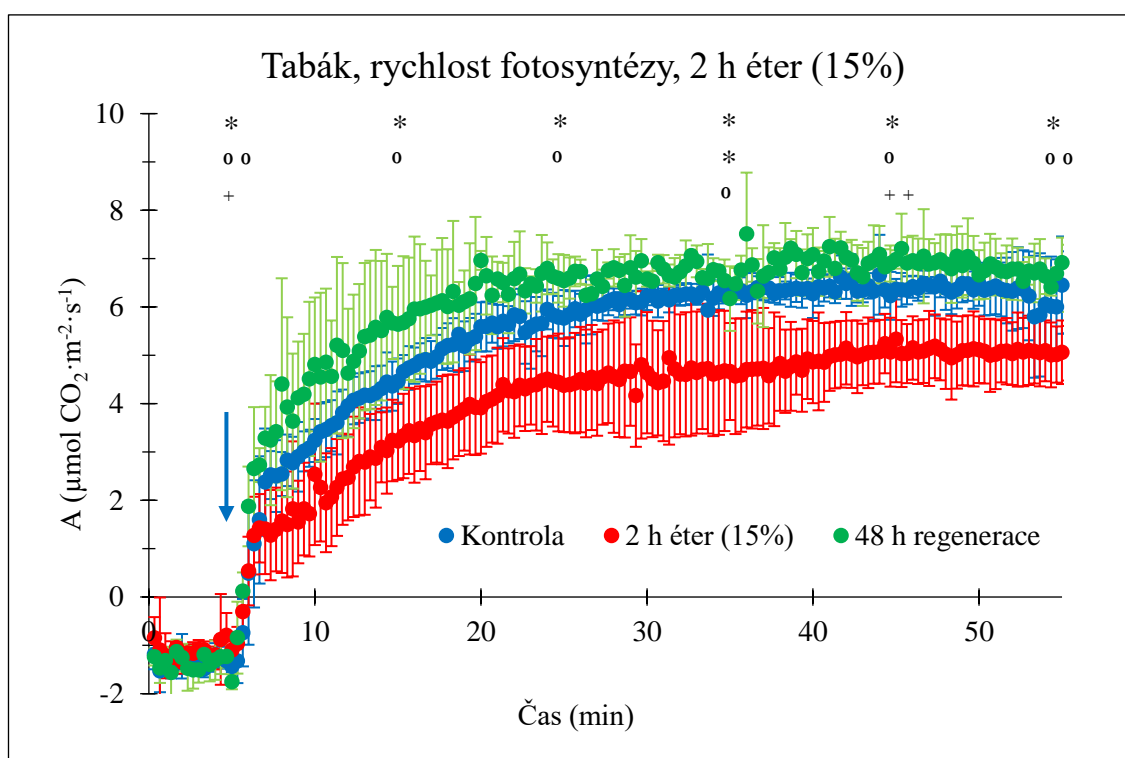
U kontrolních rostlin nastala saturace stomatální vodivosti přibližně v čase 45 min a dosáhla hodnoty $0,17 \text{ mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Obr. 26, modré hodnoty). U rostlin ošetřených éterem (před měřením byly z nádob pro aplikaci éteru vyjmuty) dosáhla stomatální vodivost saturace přibližně ve stejném čase, ale její hodnota byla výrazně nižší – pouze $0,06 \text{ mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Obr. 26, červené hodnoty). Po aplikaci éteru se tedy průduchy vlivem BL otvíraly výrazně méně.



Obr. 26 Stomatální vodivost (g_s) listů tabáku před a po spuštění modrého světla ($265 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou). Měřeny kontrolní rostliny bez aplikace éteru (modré hodnoty), rostliny po 2 h inkubace v éteru (červené hodnoty) a rostliny 48 h po aplikaci éteru (zelené hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky: „kontrola“ a „2 h éter“ ($n=5$), „48 h regenerace“ ($n=3$). Statisticky významné rozdíly označeny hvězdičkami (mezi variantami „kontrola“ a „2 h éter“) a kolečky (mezi variantami „2 h éter“ a „48 h regenerace“) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; platí i pro ostatní kombinace). Statistická významnost rozdílů stanovena v časech 5, 15, 25, 35, 45 a 55 min. Před měřením zatměno 2 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Měření 4. pravé listy.

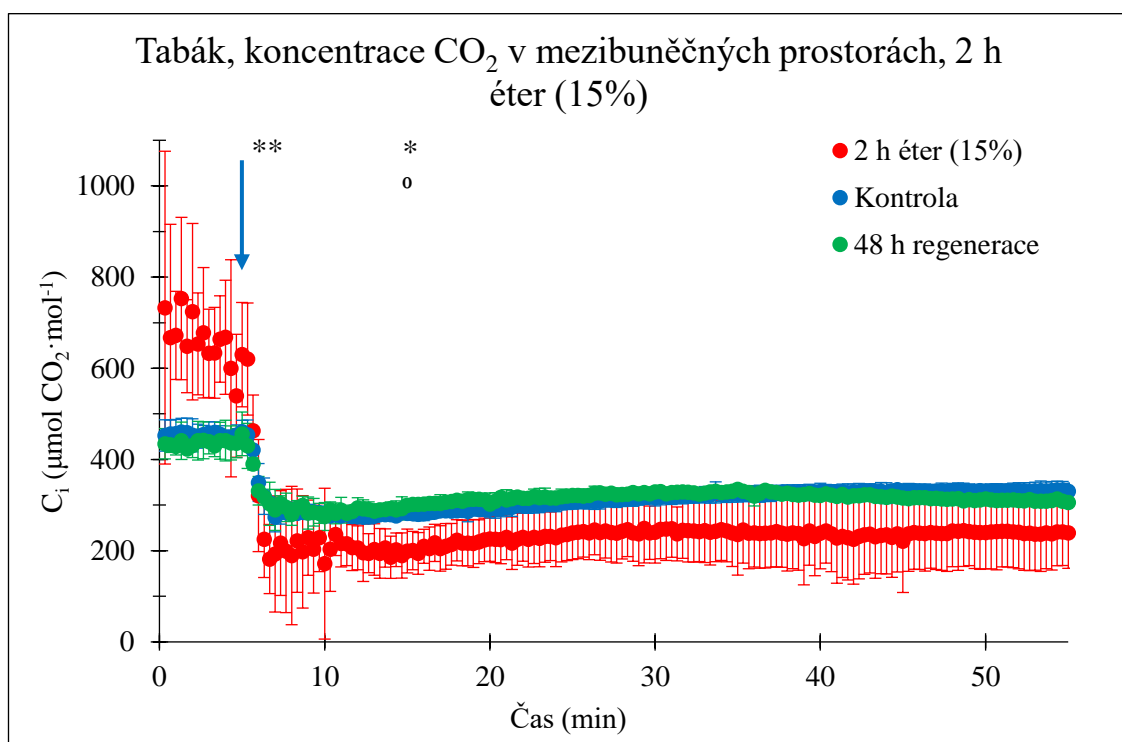
Z časových důvodů jsme provedli gazometrické měření na rostlinách po regeneraci až po 48 h (oproti 24 h u pozdějšího experimentu s *A. thaliana*; Obr. 31). Tentokrát nastala saturace stomatální vodivosti už v čase měření 35 min (oproti 45 min u kontroly a éteru) a dosáhla podobných hodnot jako při kontrolním měření - 48 h po aplikaci éteru se tedy průduchy otevíraly podobně rychle a podobnou měrou jako při měření bez aplikace éteru (Obr. 26, zelené hodnoty). Rozdíly v naměřených hodnotách stomatální vodivosti éterem ošetřených rostlin oproti kontrolním a regenerovaným rostlinám byly statisticky významné (Obr. 26; čas 5, 15, 25, 35, 45 a 55 min). Dále vidíme, že výchozí hodnoty stomatální vodivosti u rostlin ošetřených éterem byly oproti kontrolním a regenerovaným rostlinám menší (Obr. 26, čas 0 min). U rostlin vystavených éteru došlo tedy při inkubaci ve tmě ve srovnání s ostatními variantami k většímu uzavření průduchů.

Vliv éteru na rychlost fotosyntézy tabáku je zobrazen na Obr. 27. U kontrolních a regenerovaných rostlin se průměrné hodnoty rychlosti fotosyntézy po saturaci pohybovaly kolem $6,5 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, u rostlin vystavených éteru kolem $4,7 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Obr. 27, čas 25-55 min). U rostlin vystavených éteru tedy došlo k částečnému snížení rychlosti fotosyntézy a po 48 h regenerace se rychlost fotosyntézy vrátila na úroveň kontrolních rostlin (Obr. 27, zelené hodnoty). Snížení hodnot rychlosti asimilace CO_2 po aplikaci éteru oproti kontrolním a regenerovaným rostlinám bylo statisticky významné (Obr. 27; čas 5, 15, 25, 35, 45 a 55 min).



Obr. 27 Rychlost asimilace CO_2 (A) listů tabáku před a po spuštění modrého světla ($265 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou). Měření kontrolní rostliny bez aplikace éteru (modré hodnoty), rostliny po 2 h inkubace v éteru (červené hodnoty) a rostliny 48 h po aplikaci éteru (zelené hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky: „kontrola“ a „2 h éter“ ($n=5$), „48 h regenerace“ ($n=3$). Statisticky významné rozdíly označeny hvězdičkami (mezi variantami „kontrola“ a „2 h éter“), kolečky (mezi variantami „2 h éter“ a „48 h regenerace“) a křížky (mezi variantami „kontrola“ a „48 h regenerace“) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; platí i pro ostatní kombinace). Statistická významnost rozdílů stanovena v časech 5, 15, 25, 35, 45 a 55 min. Před měřením zatměno 2 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Měření 4. pravé listy.

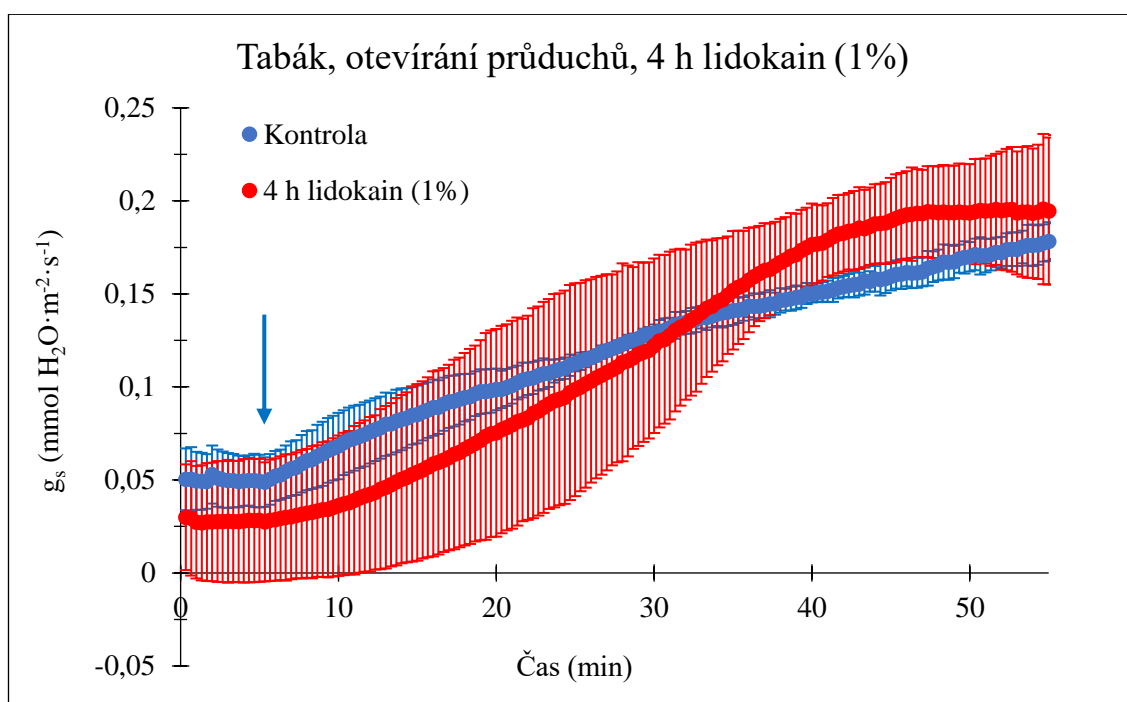
Stanovení koncentrace CO_2 v mezibuněčných prostorech ukázalo, že na světle byla tato koncentrace nejmenší u rostlin ošetřených éterem, statisticky významný rozdíl byl však zjištěn pouze okolo času měření 15 min (Obr. 28, červené hodnoty). Průměrně se hodnoty C_i na světle u éterem ošetřených rostlin pohybovaly okolo $200 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ a u kontrolních a regenerovaných rostlin okolo $280\text{-}330 \mu\text{mol}$ (Obr. 28, čas 5-55 min). Dále můžeme u rostlin vystavených éteru v čase před aplikací BL vidět statisticky významně vyšší koncentraci CO_2 (Obr. 28, červené hodnoty, čas 0-5 min).



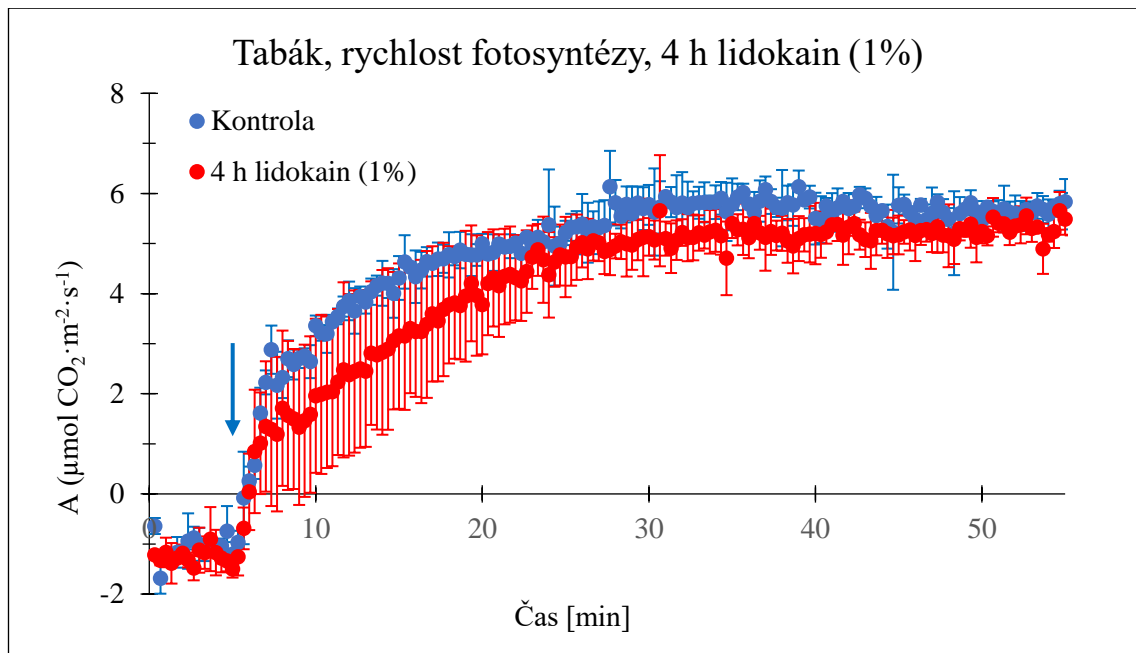
Obr. 28 Koncentrace CO_2 v mezibuněčných prostorech (C_i) listů tabáku před a po spuštění modrého světla ($265 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou). Měřeny kontrolní rostliny bez aplikace éteru (modré hodnoty), rostliny po 2 h inkubace v éteru (červené hodnoty) a rostliny 48 h po aplikaci éteru (zelené hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky: „kontrola“ a „2 h éter“ ($n=5$), „48 h regenerace“ ($n=3$). Statisticky významné rozdíly označeny hvězdičkami (mezi variantami „kontrola“ a „2 h éter“) a kolečky (mezi variantami „2 h éter“ a „48 h regenerace“) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; platí i pro ostatní kombinace). Statistická významnost rozdílů stanovena v časech 5, 15, 25, 35, 45 a 55 min. Před měřením zatemněno 2 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Měřeny 4. pravé listy.

4.2.1.2 Vliv lidokainu

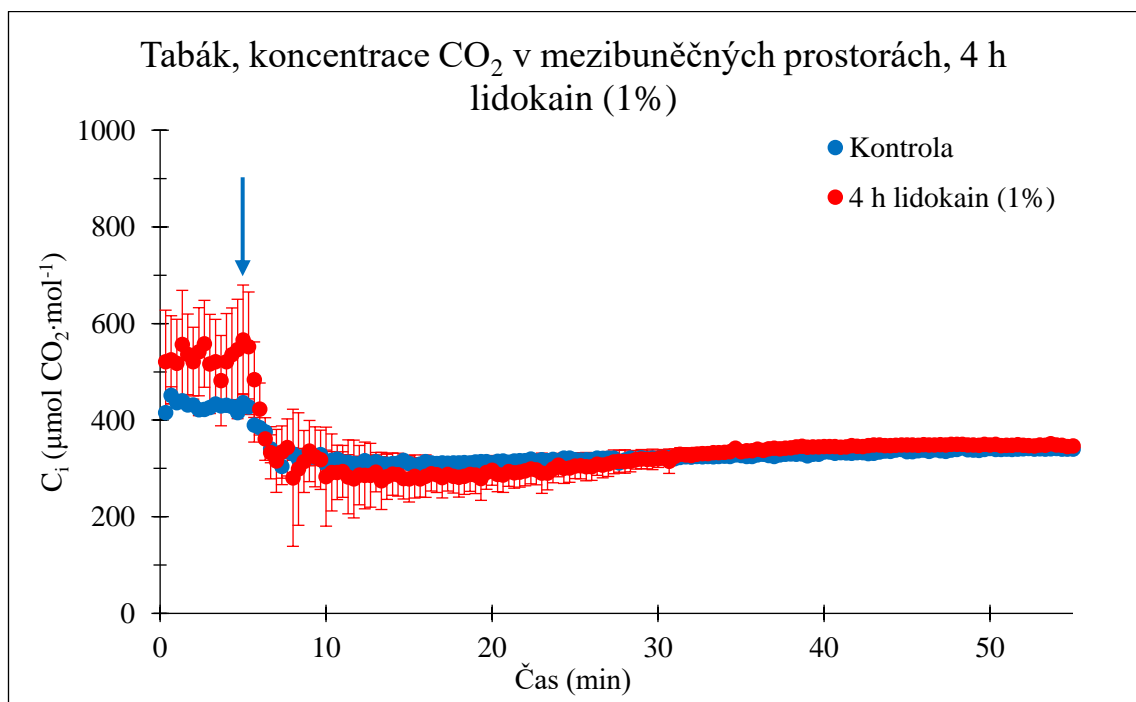
Po aplikaci 1% roztoku lidokainu na ustřižené listy tabáku (přes řapík) došlo oproti kontrole (deionizované voda) k částečnému zpomalení otevírání průduchů (Obr. 29, čas 5-30 min). Rychlost fotosyntézy byla u listů ošetřených lidokainem mírně snížena (Obr. 30, červené hodnoty). Podobně jako u rostlin ošetřených éterem (Obr. 28) byla u listů pod vlivem lidokainu zjištěna vyšší koncentrace C_i ve tmě (Obr. 31, červené hodnoty, čas 0-5 min). Popsané rozdíly mezi kontrolním měřením a měřením s listy, na které byl aplikován lidokain, však nebyly statisticky významné.



Obr. 29 Stomatální vodivost (g_s) listů tabáku před a po spuštění modrého světla ($265 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou). Lidokain aplikován na ustřižené listy ponořené řapíkem po dobu 4 h do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (červené hodnoty), jako kontrola použita deionizovaná voda (modré hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky: „kontrola“ ($n=3$), „4 h lidokain“ ($n=4$). Před měřením zatměno 2 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Měřeny 4. pravé listy.



Obr. 30 Rychlost asimilace CO₂ (A) listů tabáku před a po spuštění modrého světla ($265 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou). Lidokain aplikován na ustřížené listy ponořené řápkem po dobu 4 h do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (červené hodnoty), jako kontrola použita deionizovaná voda (modré hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky: „kontrola“ (n=3), „4 h lidokain“ (n=4). Před měřením zatměno 2 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Měření 4. pravé listy.

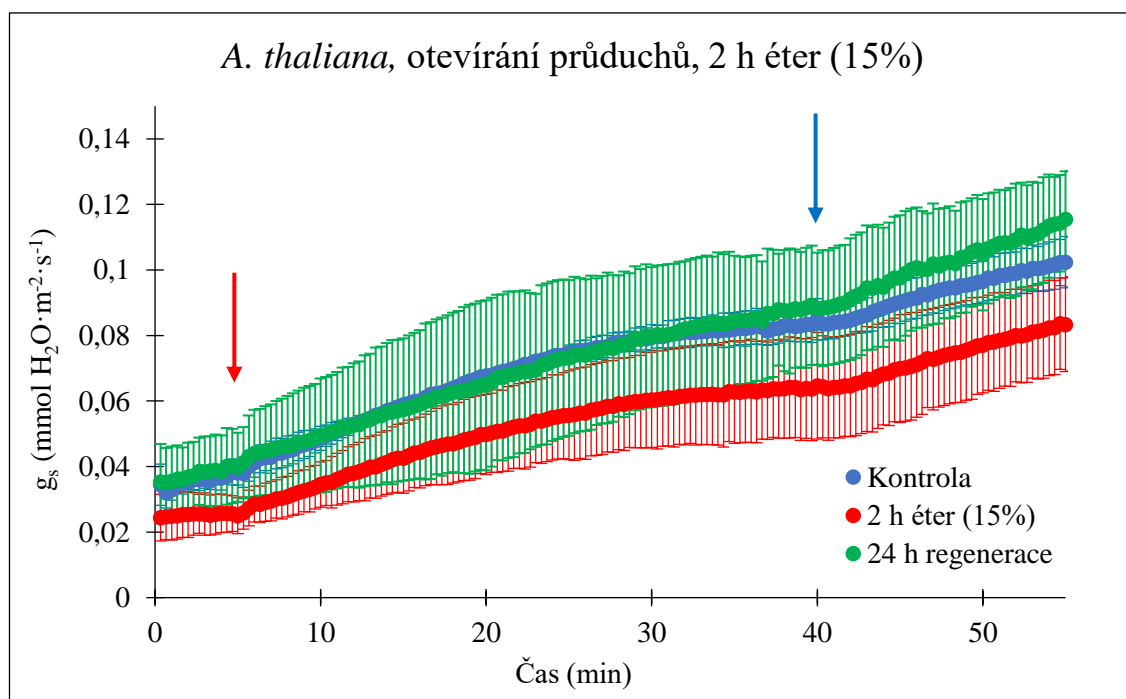


Obr. 31 Koncentrace CO₂ v mezibuněčných prostorech (C_i) listů tabáku před a po spuštění modrého světla ($265 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou). Lidokain aplikován na ustřížené listy ponořené řápkem po dobu 4 h do jeho 1% roztoku v deionizované vodě (červené hodnoty), jako kontrola použita deionizovaná voda (modré hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky: „kontrola“ (n=3), „4 h lidokain“ (n=4). Před měřením zatměno 2 h. Stáří rostlin 5 týdnů. Měření 4. pravé listy.

4.2.2 *A. thaliana*

Při gazometrickém stanovení otevírání průduchů na světle jsme u rostlin *A. thaliana* na základě poznatků z literatury (Shimazaki *et al.*, 2007) použili jiný světelný režim než v případě tabáku. V čase měření 5 min jsme pro spuštění otevírání průduchů aplikovali červené světlo ($600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a v čase 40 min jsme pro zvýšení otevření průduchů začali současně s červeným světlem aplikovat BL ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Při měření stomatální vodivosti listů *A. thaliana* jsme se potýkali s poměrně velkou variabilitou mezi rostlinami (Obr. 32). Oproti experimentu s tabákem (Obr. 26) se průduchy u *A. thaliana* otevíraly celkově méně. Také stimulace otevírání průduchů po aplikaci BL byla mnohem nižší, než jsme očekávali dle literatury. U rostlin inkubovaných v éteru (Obr. 32, červené hodnoty) se oproti kontrolním rostlinám (Obr. 32, modré hodnoty) průduchy jeví více uzavřené, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný. Měření na rostlinách ošetřených éterem jsme po 24 h po aplikaci opakovali (Obr. 32, zelené hodnoty). Interpretaci výsledků tohoto měření ztěžuje vysoká variabilita, ale dá se usuzovat na větší míru otevírání průduchů na světle oproti měření ihned po aplikaci éteru.

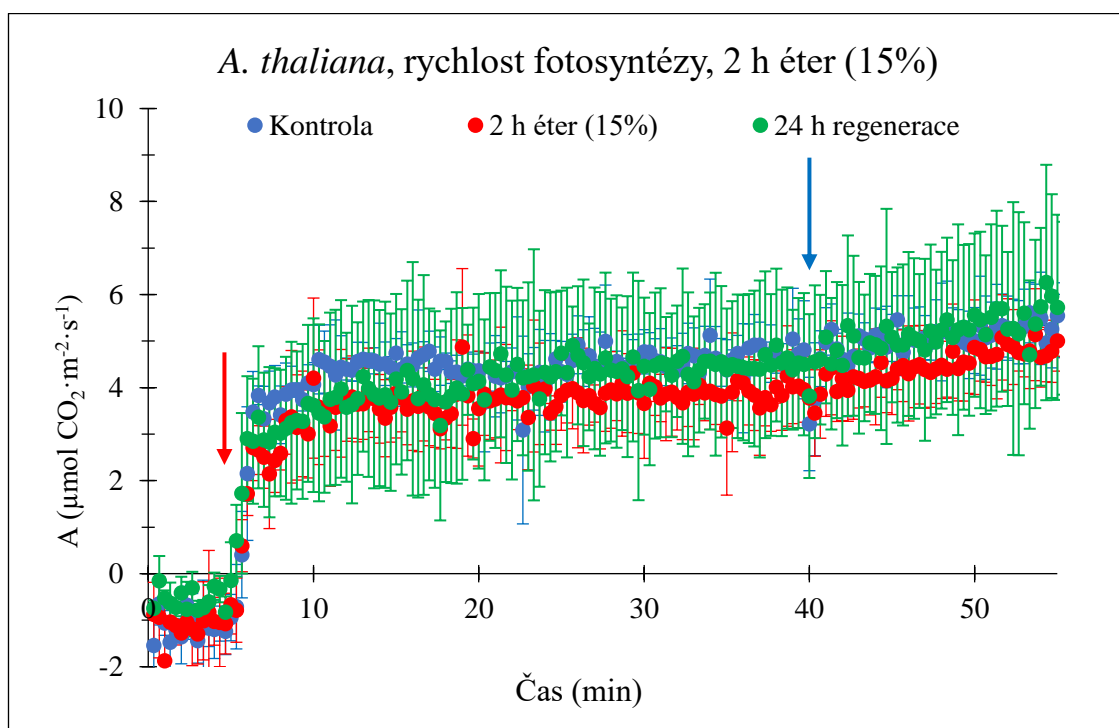


Obr. 32 Stomatální vodivost (g_s) listů *A. thaliana* před a po spuštění červeného ($600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; označeno červenou šipkou) a modrého světla ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou). Měřeny kontrolní rostliny bez aplikace éteru (modré hodnoty), rostliny po 2 h inkubace v éteru (červené hodnoty) a rostliny 24 h po aplikaci éteru (zelené hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n=3$). Před měřením zatemněno 2 h. Stáří rostlin 7 týdnů.

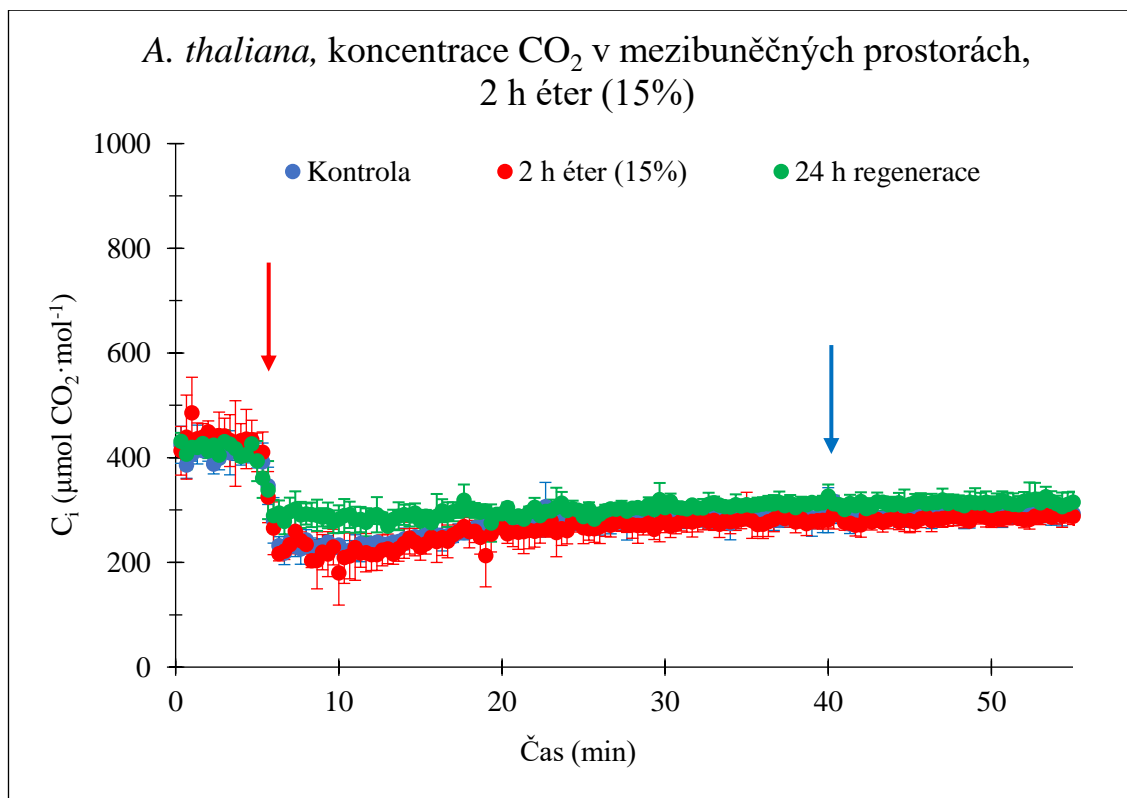
Podobně jako při měření s tabákem (Obr. 26) byly u *A. thaliana* průduchy rostlin inkubovaných v éteru již na začátku měření uzavřenější, i když v tomto případě nebyl efekt průkazný (Obr. 32, červené hodnoty, čas 0 min).

Po aplikaci éteru jsme oproti kontrolním rostlinám nezjistili statisticky významný rozdíl v rychlosti fotosyntézy (Obr. 33) ani v koncentraci CO_2 v mezibuněčných prostorách (Obr. 34). Po 24 h po aplikaci éteru byla mezibuněčná koncentrace CO_2 mírně vyšší než u kontrolních a éterem ošetřených rostlin, zejména v čase měření 5-20 min, nicméně tento rozdíl není příliš výrazný (Obr. 34, zelené hodnoty).

Výsledky gazometrického experimentu naznačují možný inhibiční vliv éteru na otevírání průduchů u *A. thaliana*, nicméně tento efekt nebyl na rozdíl od tabáku průkazný.



Obr. 33 Rychlost asimilace CO_2 (A) listů *A. thaliana* před a po spuštění červeného ($600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno červenou šipkou) a modrého ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; označeno modrou šipkou) světla. Měřeny kontrolní rostliny bez aplikace éteru (modré hodnoty), rostliny po 2 h inkubace v éteru (červené hodnoty) a rostliny 24 h po aplikaci éteru (zelené hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n=3$). Před měřením zatemněno 2 h. Stáří rostlin 7 týdnů.



Obr. 34 Koncentrace CO₂ v mezibuněčných prostorech (C_i) listů *A. thaliana* před a po spuštění červeného (600 µmol·m⁻²·s⁻¹; označeno červenou šipkou) a modrého (15 µmol·m⁻²·s⁻¹; označeno modrou šipkou) světla. Měřeny kontrolní rostliny bez aplikace éteru (modré hodnoty), rostliny po 2 h inkubace v éteru (červené hodnoty) a rostliny 24 h po aplikaci éteru (zelené hodnoty). Uvedeny průměry a směrodatné odchylky (n=3). Před měřením zatemněno 2 h. Stáří rostlin 7 týdnů.

5 DISKUSE

Anestetika mají nezastupitelnou roli při lékařských výkonech, kde se využívá jejich schopnosti navodit celkovou ztrátu vědomí nebo znecitlivění části těla. Efekt látek s anestetickými účinky je nejčastěji spojován s působením na živočichy, u kterých bylo zjištěno, že cílí na receptory neurotransmiterů, zejména receptory GABA a glutamátu (Brohan a Goudra, 2017; Yokawa *et al.*, 2019). Za příčinu ztráty vědomí při anestezii u člověka a živočichů se dále považuje působení anestetik na napětím řízené iontové kanály v neuronech (Rinaldi, 2014). U lokálních anestetik je ztráta vnímání bolesti spojena s blokadou vzniku a vedení nervových vzruchů (Strichartz a Ritchie, 1987). Působení anestetik na rostliny je méně probádané, prozatím byl popsán jejich vliv na fotosyntézu (Semin *et al.*, 1990; Šeršeň *et al.*, 1990; Grémiaux *et al.*, 2014), akumulaci chlorofylu, klíčení semen, vezikulární transport a produkci superoxidu (Yokawa *et al.*, 2018), aktinový cytoskelet (Baluška a Mancuso, 2019) a na určité typy pohybu rostlin (např. uzavírání listových pastí mucholapky podivné a sklápění listů citlivky stydlivé) ve spojení s inhibicí vedení akčního potenciálu (Yokawa *et al.*, 2018; Pavlovič *et al.*, 2020). Usuzuje se, že mechanismus působení anestetik u rostlin je podobně jako u živočichů spojen s jejich vlivem na membránové procesy, zejména na blokování transportu iontů a šíření akčního potenciálu. Při úvahách o vlivu anestetik na procesy v rostlinách je dále důležité brát v potaz jejich působení na aktinový cytoskelet, který je s membránami fyzicky i funkčně propojen (Baluška a Mancuso, 2019).

V diplomové práci jsme se zabývali vlivem anestetik na světlem indukovaný pohyb chloroplastů a otevírání průduchů, rostlinné procesy řízené fototropiny. V signálních drahách některých procesů řízených fototropiny se uplatňuje mj. přenos signálu pomocí membrán a iontových kanálů v nich obsažených, včetně napětím řízených Ca^{2+} kanálů (Stoelzle *et al.*, 2003; Harada a Shimazaki, 2007). Je např. známo, že zastavení růstu hypokotyly *A. thaliana* na světle je spojeno se zvýšením obsahu Ca^{2+} iontů po aktivaci phot1 světlem (Folta *et al.*, 2003). V případě signalizace otevírání průduchů je dokonce známa celá signální kaskáda, ve které vystupují membránové H^+ -ATPasy a K^+ kanály řízené napětím. Zda jsou i v signalizaci pohybu chloroplastů vyvolaného světlem zapojeny procesy využívající pro přenos signálu membránový potenciál nebo transport iontů přes membrány není objasněno. Sato *et al.* (2001) však zjistili, že pohyb chloroplastů *A. capillus-veneris* vyvolaný mechanickou stimulací byl inhibován blokadou Ca^{2+} kanálů plazmatické membrány. Z vyšších rostlin se ukázaly být Ca^{2+} ionty důležité

při pohybu chloroplastů vyvolaném světlem v tabáku virginském (Anielska-Mazur *et al.*, 2009). Oproti tomu např. Tsuboi a Wada (2010) zpochybnili zapojení Ca^{2+} iontů v signalizaci pohybu chloroplastů z důvodu příliš pomalé reakce pohybu chloroplastů *A. capillus-veneris* na světlo, která neodpovídala znalostem o rychlosti šíření signálů pomocí Ca^{2+} . O tom, zda jsou pro pohyb chloroplastů důležité procesy spojené s přenosem signálu membránami (které by mohly sloužit jako cíle působení anestetik) se tedy stále diskutuje. Výsledky naší práce naznačují, že by tak mohlo být pouze v případě akumulárního pohybu chloroplastů.

5.1 Vliv anestetik na pohyb chloroplastů

V první části experimentů zabývajících se vlivem anestetik na pohyby chloroplastů jsme pro aplikaci éteru využívali ZIP sáček, což se ale neosvědčilo. Pro výpočet množství éteru potřebného pro dosažení určité koncentrace jsme totiž použili maximální objem sáčku, nicméně objem vzduchu v sáčku byl kvůli obtížnosti udržení jeho plného tvaru při aplikaci mnohem menší. Nepravidelný tvar sáčku ve spojení s jeho poměrně malou velikostí mohl rovněž způsobit nerovnoměrné rozptýlení par éteru, což mohlo dále ovlivnit výslednou koncentraci éteru v blízkosti listu. Při aplikaci je tedy vhodnější použití větší nádoby s daným objemem, ve které se éter může rovnoměrněji rozptýlit. Některé druhy rostlin se navíc zdají být na éter velmi citlivé, což může v kombinaci s jeho nevhodnou aplikací způsobit jejich poškození. Po aplikaci éteru byly listy ječmene a celé rostliny lilku rajčete (Obr. 15) viditelně povadlé. O pohybu chloroplastů je známo, že může být ovlivněn působením určitých stresových faktorů, např. nedostatkem vody (Nauš *et al.*, 2016) nebo vysokými teplotami (Frolec *et al.*, 2010). Podrobnější informace o negativním efektu éteru na rostliny se nám v literatuře nepodařilo najít, při aplikaci éteru na listy ječmene a celé rostliny rajčete jsme však zaznamenali viditelné známky vadnutí. Inhibice pohybu chloroplastů zjištěná u těchto rostlin (Obr. 11-14) tak mohla být způsobena spíše toxickým efektem éteru než jeho anestetickým účinkem. Při aplikaci éteru na rostliny *A. thaliana* a tabáku jsme nepozorovali žádné známky poškození.

V experimentech s aplikací éteru v uzavřené plastové nádobě jsme zpočátku měřili pohyb chloroplastů na stejném listu jedné rostliny před a po aplikaci éteru. Zjistili jsme však, že částečná inhibice únikového pohybu chloroplastů, kterou jsme původně přisuzovali vlivu éteru, byla způsobena inkubací rostlin v plastové nádobě (Obr. 17), i když příčina tohoto efektu není jasná. V dalších experimentech jsme tedy raději

srovnávali pohyb chloroplastů u rostlin ošetřených éterem aplikovaném po dobu 2 h v plastové nádobě s kontrolními rostlinami uzavřenými po stejnou dobu v plastové nádobě bez éteru. V tomto provedení experimentu (kdy byl pohyb chloroplastů stanovován pomocí změn transmitance měřené radiometrem Spectrapen) jsme neprokázali vliv éteru na únikový ani akumulární pohyb chloroplastů v listech tabáku a *A. thaliana* (Obr. 18 a 22). U těchto rostlinných druhů bylo provedeno pozorování pozice chloroplastů při zatemnění a po únikovém pohybu i pomocí konfokálního mikroskopu, které potvrdilo, že éter neovlivňoval rozsah únikového pohybu (Obr. 19 a 23).

Při experimentu, kdy jsme pomocí chlorofylmetru SPAD-502 měřili samostatně akumulární pohyb chloroplastů navozený slabým BL v listech tabáku adaptovaných na tmu (obr. 25), jsme však po aplikaci éteru zaznamenali statisticky významně zmenšenou míru tohoto typu pohybu chloroplastů. Ze současných znalostí o fototropinech vyplývá, že specifická jejich různých funkcí může být regulována mj. i subcelulární lokalizací. Při akumulárním pohybu chloroplastů se uplatňují fototropiny asociované s plazmatickou membránou (Wada, 2013). Anestetika často cílí na procesy spojené s přenosem signálu membránami. Domníváme, že by éter mohl narušovat signalizaci fototropinů při akumulárním pohybu, nicméně pro potvrzení této domněnky by bylo potřeba provést více experimentů. V případě únikového pohybu chloroplastů, u kterého hraje hlavní roli zejména phot2 lokalizovaný na vnější obálce chloroplastů (Kong *et al.*, 2013b), by se dalo očekávat menší zapojení membránových procesů a tudíž i menší nebo žádný vliv anestetik. V souladu s touto hypotézou jsme neprokázali vliv éteru na únikový pohyb chloroplastů, pro její ověření však bude potřeba dalšího výzkumu.

U lidokainu byl pozorován výraznější inhibiční vliv na oba typy pohybu chloroplastů pouze u ustřižených listů *A. thaliana* při aplikaci po dobu 16 h (Obr. 21). Při aplikaci na listy *A. thaliana* po dobu 3 h byl pozorován vliv lidokainu na únikový pohyb, v tomto případě však bylo provedeno pouze jedno měření a efekt lidokainu nebyl příliš výrazný (Obr. 20). U ustřižených listů tabáku ponořených do 1% roztoku lidokainu po dobu 4 h jsme nezjistili vliv na pohyby chloroplastů (Obr. 24). Domníváme se, že částečná inhibice pohybu chloroplastů zjištěná při aplikaci lidokainu na list *A. thaliana* po dobu 16 h mohla být způsobena spíše toxicitou spojenou s příliš dlouhým vystavením listů jeho roztoku. Ustřižené listy byly po změření pohybu chloroplastů ponořeny řádkem do roztoku deionizované vody, po 3 dnech však zcela

uvadly. Oproti tomu kontrolní listy, které byly po celou dobu ponořeny řapíkem v deionizované vodě, vydržely týden. Po provedení experimentu s tabákem (Obr. 24), ve kterém byl lidokain aplikován po dobu 4 h, jsme listy rovněž ponořili do deionizované vody a tentokrát jsme nepozorovali známky uvadání ani u těch listů, které byly vystaveny lidokainu. U lidokainu a jiných lokálních anestetik je známo, že u člověka mohou vyvolat systémovou toxicitu, která je způsobena nesprávným dávkováním spojeným s následným přenosem anestetika krevním řečištěm (El-Boghdadly *et al.*, 2018). O toxickém vlivu na rostliny se nám nepodařilo vyhledat informace, na základě výše uvedeného se však domníváme, že částečná inhibice pohybu chloroplastů byla způsobena spíše toxickým než anestetickým účinkem lidokainu.

Předpokládáme, že vliv anestetik by mohl být výraznější v případě pohybu chloroplastů vyvolaného mechanickou stimulací. V signalizaci pohybu chloroplastů vyvolaného mechanickým stimulem v *A. capillus-veneris* a *P. patens* se totiž uplatňují Ca^{2+} ionty (Sato *et al.*, 2001). Jejich intracelulární koncentrace je regulována především pomocí vápníkových kanálů plazmatické membrány řízených napětím nebo mechanickým stimulem. V obou typech kanálů jejich funkce souvisí s membránovým potenciálem (White, 2000). Při inhibici vápníkových kanálů La^{3+} a Gd^{3+} ionty došlo k utlumení pohybu chloroplastů vyvolaného mechanickou stimulací, pohyb chloroplastů vyvolaný světlem však zůstal zachován (Sato *et al.*, 2001). Je tedy možné, že pokud by anestetika způsobovala inhibici vápníkových kanálů plazmatické membrány, měla by rovněž inhibovat pohyb chloroplastů vyvolaný mechanickou stimulací. Tomu nasvědčují i výsledky práce Chen *et al.* (2005), ve které je popsán inhibiční vliv isofluranu, derivátu éteru, na organizaci chloroplastů v zelené řase *A. acetabulum*. Chloroplasty *A. acetabulum* jsou mezi sebou spojeny flexibilními můstky, v důsledku čehož se spolu pohybují ve více či méně uspořádaných rovinách. Chen *et al.* (2005) zjistili, že po aplikaci 75% isofluranu došlo ke snížení dynamiky reorganizace chloroplastů, po vymytí se však jejich pohyby obnovily. I v případě pohybu chloroplastů *A. acetabulum* se uplatňuje signalizace pomocí Ca^{2+} iontů, která je zprostředkována membránovými Ca^{2+} kanály. Zvýšení vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} iontů způsobené otevřením Ca^{2+} kanálů isofluranem dle Chen *et al.* (2005) pravděpodobně způsobilo inhibici aktinového cytoskeletu a pohybů chloroplastů *A. acetabulum*.

5.2 Vliv anestetik na otevírání průduchů

Oproti pohybu chloroplastů je u otevírání průduchů vyvolaného BL známa celá signální kaskáda. Po percepci světla fototropiny dochází k aktivaci H⁺-ATPas a napětím řízených K⁺ kanálů plazmatické membrány svěřacích buněk. Otevírání průduchů je způsobeno příjmem vody svěřacími buňkami v důsledku akumulace K⁺ iontů (Kinoshita a Shimazaki, 1999; Takemiya *et al.*, 2013). Vzhledem k zapojení membránových H⁺-ATPas a K⁺ kanálů řízených napětím v signalizaci otevírání průduchů jsme tedy očekávali, že anestetika budou světlem vyvolané otevírání průduchů inhibovat. Skutečně jsme potvrdili inhibici otevírání průduchů tabáku aplikací éteru (Obr. 26, červené hodnoty). Éter byl aplikován po dobu 2 h uzavřením rostlin do plastové nádoby, kontrolní rostliny jsme před měřením inkubovali 2 h v plastové nádobě bez éteru. Po 48 h po aplikaci éteru bylo měření zopakováno (včetně 2h inkubace v plastové nádobě bez éteru) a průduchy se otevíraly podobnou měrou, jako při kontrolním měření (Obr. 26, zelené hodnoty). Inhibice otevírání průduchů tabáku éterem byla tedy reverzibilní. U *A. thaliana* jsme ale signifikantní inhibici otevírání průduchů po aplikaci éteru nenaměřili (Obr. 32), což však mohlo být způsobeno jiným světelným režimem při měření u *A. thaliana* oproti tabáku. U *A. thaliana* bylo nejprve v čase 5 min aplikováno červené světlo ($600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a v čase 40 min BL ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), oproti tabáku, kde jsme aplikovali pouze BL ($265 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) v čase 5 min. Roli mohlo hrát i vyšší stáří měřených rostlin *A. thaliana* (7 týdnů oproti 5 týdnů starým rostlinám tabáku). V případě lidokainu jsme po jeho 4h aplikaci na ustřížené listy tabáku vliv na otevírání průduchů nezjistili (Obr. 29).

Větší uzavřenost průduchů jsme po inkubaci rostlin v atmosféře éteru zaznamenali už na začátku měření (tj. u listů adaptovaných na tmou, před aplikací světla), přičemž u tabáku byl tento rozdíl výraznější než u *A. thaliana* (Obr. 26 a 32). Domníváme se, že větší uzavření průduchů ve tmě v listech pod vlivem éteru mohlo být způsobeno zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku, která v reakci na přítomnost éteru a anestetik obecně nastává (Yokawa *et al.*, 2018; Yokawa *et al.*, 2019). Je totiž známo, že reaktivní formy kyslíku stimulují uzavírání průduchů (Kwak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

U tabáku jsme po aplikaci éteru dále naměřili statisticky významně zmenšenou rychlost asimilace CO₂ (tedy rychlost fotosyntézy) (Obr. 27) a mírně sníženou koncentraci CO₂ v mezibuněčných prostorech (Obr. 28). Domníváme se, že zmenšená

rychlost fotosyntézy byla primárně způsobena větší uzavřeností průduchů rostlin vystavených éteru a s tím spojeným sníženým přísunem CO₂ k chloroplastům. Pokud by byla rychlost fotosyntézy nižší vlivem anestetického účinku éteru na fotosyntetické procesy v chloroplastech, pravděpodobně bychom nepozorovali nižší koncentraci CO₂ v mezibuněčných prostorách. Domníváme se tedy, že v našem případě éter neinhiboval fotosyntetické procesy v listech rostlin tabáku. V listech *A. thaliana* jsme nižší rychlost fotosyntézy po aplikaci éteru nenaměřili (Obr. 33). Naše výsledky jsou v rozporu s výsledky experimentu provedeného v roce 1878 Claudem Bernardem, který popsal inhibiční vliv éteru na fotosyntézu rdestu a řasy šroubatky (Grémiaux *et al.*, 2014). V případě experimentu z roku 1878 jsme však nedohledali, jaká koncentrace éteru byla použita. Dále je v literatuře popsána inhibice PS II kapalnými anestetiky včetně lidokainu v izolovaných chloroplastech špenátu (Šeršeň *et al.*, 1990) a hrachu (Semin *et al.*, 1990). V diplomové práci jsme však vliv lidokainu na rychlost fotosyntézy tabáku nepozorovali (Obr. 30). Je možné, že v případě působení kapalných anestetik na rostliny může mít výrazný vliv způsob aplikace. Při aplikaci na izolované chloroplasty (Semin *et al.*, 1990; Šeršeň *et al.*, 1990) se anestetikum poměrně snadno dostane k chloroplastům. Při našich experimentech jsme kapalná anestetika aplikovali ponořením řapíku listu do jejich 1% roztoku. Při tomto způsobu aplikace je obtížné určit, nakolik se anestetikum vstřebá do listu a zda se dostane do kontaktu s chloroplasty. Pro objasnění toho, jestli je fotosyntéza anestetiky ovlivněna či ne, bude tedy nutné provést další experimenty.

Dále jsme u rostlin tabáku ošetřených éterem před spuštěním BL (tj. po 2h adaptaci na tmu) naměřili výrazně vyšší koncentraci CO₂ v mezibuněčných prostorách (Obr. 28, čas 0-5 min). Tato zvýšená koncentrace CO₂ mohla být způsobena jeho hromaděním způsobeným větším uzavřením průduchů u éterem ošetřených rostlin tabáku (Obr. 26) a po aplikaci BL rychle klesla. V případě *A. thaliana* jsme vyšší koncentraci CO₂ v mezibuněčných prostorách před spuštěním světla nenaměřili (Obr. 34), což by odpovídalo tomu, že u *A. thaliana* nebyly průduchy po aplikaci éteru oproti kontrolním rostlinám výrazně uzavřenější.

Výsledky diplomové práce nastínily možný inhibiční vliv éteru na akumulární pohyb chloroplastů, pro potvrzení tohoto vlivu však bude třeba provést další experimenty. Ovlivnění únikového pohybu chloroplastů anestetiky jsme nezjistili. Dále bude zajímavé studovat vliv anestetik na pohyb chloroplastů u rostlin, ve kterých dochází

k jeho vyvolání mechanickou stimulací, popř. červeným světlem (zejm. *P. patens* a *A. capillus-veneris*). Studium vlivu anestetik na pohyb chloroplastů by mohlo mimo jiné přispět k objasnění mechanismu tohoto pohybu.

V dalších experimentech bychom chtěli ověřit vliv anestetik na světlem indukované otevírání průduchů u listů *A. thaliana* při použití různých světelných režimů včetně režimu, který jsme aplikovali na rostliny tabáku. Dále bychom chtěli ověřit vliv anestetik na další procesy řízené fototropiny, zejm. fototropismus.

6 ZÁVĚR

V diplomové práci jsme se zabývali vlivem anestetik éteru a lidokainu na pohyb chloroplastů a otevírání průduchů vyvolané světlem. Vliv anestetik na pohyb chloroplastů jsme zjišťovali u ječmene, lilku rajčete, tabáku a *A. thaliana*, jejich vliv na otevírání průduchů byl stanovován u tabáku a *A. thaliana*. Ječmen a lilek rajče se ukázaly být na éter citlivé a po jeho 2h aplikaci docházelo u těchto rostlin k poškození. U ječmene mohl být negativní vliv éteru způsoben i nevhodnou aplikací v plastovém ZIP sáčku (u ostatních experimentů jsme éter aplikovali uzavřením rostlin do plastové nádoby s 15% koncentrací jeho par). Při aplikaci 15% éteru na tabák a *A. thaliana* po dobu 2 h jsme známky poškození nepozorovali. U lidokainu jsme negativní vliv na vitalitu pozorovali při aplikaci řapíkem na ustřižené listy *A. thaliana* po dobu 16 h. Při aplikaci na ustřižené listy tabáku po dobu 4 h jsme z hlediska vitality nepozorovali rozdíl oproti kontrolním listům ponořeným řapíky do deionizované vody. Při výzkumu vlivu anestetik (v našem případě éteru a lidokainu) je tedy důležité zvolit vhodnou metodu aplikace a koncentrace, aby nedocházelo k poškození rostlin. U éteru se jeví vhodnější použití větších nádob s přesně definovaným objemem.

Po aplikaci éteru jsme naměřili částečnou inhibici akumulčního pohybu chloroplastů vyvolaného slabým BL u listů tabáku. Vliv éteru na únikový pohyb jsme u měřených rostlin neprokázali. Domníváme se, že éter mohl ovlivnit signalizaci fototropinů při akumulčním pohybu chloroplastů, která je místně iniciována u plazmatické membrány (Wada, 2013). Je totiž známo, že anestetika často cílí na procesy spojené s přenosem signálu membránami inhibicí jejich akčních potenciálů. V případě lidokainu jsme neprokázali jeho vliv na únikový ani akumulční pohyb chloroplastů. Dále jsme v listech tabáku po aplikaci éteru pozorovali výrazně zmenšenou míru otevírání průduchů a rychlost fotosyntézy. Domníváme se, že éter mohl ovlivnit aktivaci H^+ -ATPas a K^+ kanálů plazmatické membrány svěřacích buněk průduchů důležitých pro jejich otevírání vyvolané světlem. Inhibici rychlosti fotosyntézy přisuzujeme většímu uzavření průduchů a následnému omezenému přísunu CO_2 k chloroplastům buněk mezofylu listů tabáku. Po aplikaci éteru na rostliny *A. thaliana* jsme výrazné omezení otevírání průduchů a rychlosti fotosyntézy nepozorovali, což však přisuzujeme nevhodným světelným podmínkám a většímu stáří rostlin *A. thaliana* oproti experimentu s tabákem.

7 LITERATURA

- Aggarwal C., Banaś A. K., Kasprowicz-Maluśki A., Borghetti C., Łabuz J., Dobrucki J. a Gabryś H. (2014): Blue-light-activated phototropin2 trafficking from the cytoplasm to Golgi/post-Golgi vesicles. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3263-3276.
- Aggarwal C., Łabuz J. a Gabryś H. (2013): Phosphoinositides play differential roles in regulating phototropin1- and phototropin2-mediated chloroplast movements in *Arabidopsis*. *PLoS One* **8**, e55393.
- Aguilera I. M. a Vaughan R. S. (2000): Calcium and the anaesthetist. *Anaesthesia* **55**, 779-790.
- Agurla S., Gahir S., Munemasa S., Murata Y. a Raghavendra A. S. (2018): Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1081**, 215-232.
- Anielska-Mazur A., Bernaś T. a Gabryś H. (2009): *In vivo* reorganization of the actin cytoskeleton in leaves of *Nicotiana tabacum* L. transformed with plastin-GFP: correlation with light-activated chloroplast responses. *BMC Plant Biology* **9**, 1-14.
- Assmann S. M. a Shimazaki K. (1999): The multisensory guard cell: Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* **119**, 809-815.
- Baluška F. a Mancuso S. (2019): Actin cytoskeleton and action potentials: Forgotten connections. In: *The Cytoskeleton*. (Sahi V. P. a Baluška F. eds.), Springer, New York, USA, 63-83.
- Baluška F., Yokawa K., Mancuso S. a Baverstock K. (2016): Understanding of anesthesia – Why consciousness is essential for life and not based on genes. *Communicative & Integrative Biology* **9**, 1942-0889.
- Bandeiras C., Serro A. P., Luzyanin K., Fernandes A. a Saramago B. (2013): Anesthetics interacting with lipid rafts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **48**, 153-165.
- Boex-Fontvieille E., Jossier M., Davanture M., Zivy M., Hodges M. a Tcherkez G. (2014): Differential protein phosphorylation regulates chloroplast movement in response to strong light and darkness in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter* **32**, 987-1001.
- Bogre L., Okresz L., Henriques R. a Anthony R. G. (2003): Growth signaling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. *Trends in Plant Science* **8**, 424-431.
- Briggs W. R., Beck C. F., Cashmore A. R., Christie J. M., Hughes J., Jarillo J. A., Kagawa T., Kanegae H., Liscum E., Nagatani A., Okada K., Salomon M., Rudiger W., Sakai T., Takano M., Wada M. a Watson J. C. (2001): The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**, 993-997.
- Brohan J. a Goudra B. G. (2017): The role of GABA receptor agonists in anesthesia and sedation. *CNS Drugs* **31**, 845-856.
- Burton R. R. (1988): G-induced loss of consciousness: definition, history, current status. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* **59**, 2-5.
- Coté G. G. (1995): Signal transduction in leaf movement. *Plant Physiology* **109**, 729-734.
- De Luccia T. P. de B. (2012): *Mimosa pudica*, *Dionaea muscipula* and anesthetics. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1163-1167.
- De Riso A., Jenson D. L. a Barry B. A. (2006): Calcium exchange and structural changes during the photosynthetic oxygen evolving cycle. *Biophysical Journal* **91**, 1999-2008.
- Denomme N., Hull J. M. a Mashour G. A. (2019): Role of voltage-gated sodium channels in the mechanism of ether-induced unconsciousness. *Pharmacological Reviews* **71**, 450-466.
- Diehl R. R. (2005): Vasovagal syncope and Darwinian fitness. *Clinical Autonomic Research* **15**, 126-129.
- El-Boghdady K., Pawa A. a Chin K. J. (2018): Local anesthetic systemic toxicity: current perspectives. *Local and Regional Anesthesia* **11**, 35-44.
- Fischer R. A. (1968): Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells. *Science* **160**, 784-85.
- Folta K. M., Lieg E. J., Durham T. a Spalding E. P. (2003): Primary inhibition of hypocotyl growth and phototropism depend differently on phototropin-mediated increases in cytoplasmic calcium induced by blue light. *Plant Physiology* **133**, 1464-1470.

- Franks N. P. a Lieb W. R. (1984): Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* **310**, 599-601.
- Franks N. P. a Lieb W. R. (1994): Molecular and cellular mechanisms of general anesthesia. *Nature* **367**, 607-614.
- Frolec J., Řebíček J., Lazár D. a Nauš J. (2010): Impact of two different types of heat stress on chloroplast movement and fluorescence signal of tobacco leaves. *Plant Cell Reports* **29**, 705-714.
- Fujino M. (1967): Role of ATP and ATPase in stomatal movements. *Science bulletin of the Faculty of Liberal Arts and Education; Nagasaki University* **18**, 1-47.
- Garcia P. S., Kolesky S. E. a Jenkins A. (2010): General anesthetic actions on GABA_A receptors. *Current Neuropharmacology* **8**, 2-9.
- Garcia-Sierra F. a Frixione E. (1993): Lidocaine, a local anesthetic, reversibly inhibits cytoplasmic streaming in Vallisneria mesophyll cells. *Protoplasma* **175**, 153-60.
- Goh C. H., Kinoshita T., Oku T. a Shimazaki K. (1996): Inhibition of blue light dependent H⁺ pumping by abscisic acid in *Vicia* guard-cell protoplasts. *Plant Physiology* **111**, 433-440.
- Grémiaux A., Yokawa K., Mancuso S. a Baluška F. (2014): Plant anesthesia supports similarities between animals and plants: Claude Bernard's forgotten studies. *Plant Signalling & Behavior* **9**:e27886.
- Harada A. a Shimazaki K. (2007): Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 102-111.
- Higa T., Hasegawa S., Hayasaki Y., Kodama Y. a Wada M. (2017): Temperature-dependent signal transmission in chloroplast accumulation response. *Journal of Plant Research* **130**, 779-789.
- Huang S., Hong S. a Schutter E. D. (2015): Non-linear leak currents affect mammalian neuron physiology. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**:432.
- Chen W. L., Wijk R. V. a Xing D. (2005): Effects of isoflurane on measurements of delayed luminescence in *Acetabularia acetabulum*. *Luminescence* **20**, 16-19.
- Christie J. M., Salomon M., Nozue K., Wada M. a Briggs W. R. (1999): LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8779-8783.
- Christie J. M., Yang H., Richter G. L., Sullivan S., Thomson C. E., Lin J., Titapiwatanakun B., Ennis M., Kaiserli E., Lee O. R., Adamec J., Peer W. A. a Murphy A. S. (2011): phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS Biology* **9**, e1001076.
- Christie J. M. (2008): Blue light sensing in plants - All you need is a little LOV. Division of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow. [www.photobiology.info](http://photobiology.info): <http://photobiology.info/Christie.html> (23. 4. 2020).
- Jaedicke K., Lichtenthäler A. L., Meyberg R., Zeidler M. a Hughes J. (2012): A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 12231-12236.
- Jarillo J. A., Gabryś H., Capel J., Alonso J. M., Ecker J. R. a Cashmore A. R. (2001): Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**, 952-954.
- Jones M. A. a Christie J. M. (2008): Phototropin receptor kinase activation by blue light. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 44-46.
- Kadota A., Yamada N., Suetsugu N., Hirose M., Saito C., Shoda K., Ichikawa S., Kagawa T., Nakano A. a Wada M. (2009): Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13106-13111.
- Kagawa T., Sakai T., Suetsugu N., Oikawa K., Ishiguro S., Kato T., Tabata S., Okada K. a Wada M. (2001): *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**, 2138-2141.

- Kagawa T. a Wada M. (2004): Velocity of chloroplast avoidance movement is fluence rate dependent. *Photochemical and Photobiological Sciences* **3**, 592-595.
- Kanzawa N., Hoshino Y., Chiba M., Hoshino D., Kobayashi H., Kamasawa N., Kishi Y., Osumi M., Sameshima M. a Tsuchiya T. (2006): Change in the actin cytoskeleton during seismonastic movement of *Mimosa pudica*. *Plant Cell Physiology* **47**, 531-539.
- Kataoka H. (2015): Gustav Senn (1875–1945): The pioneer of chloroplast movement research. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**, 4-13.
- Kawai H., Kanegae T., Christensen S., Kiyosue T., Sato Y., Imaizumi T., Kadota A. a Wada M. (2003): Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**, 287-290.
- Kelz M. B. a Mashour G. A. (2019): The biology of general anesthesia from *Paramecium* to primate. *Current Biology* **29**, 1199-1210.
- Kiefer R. T., Ploppa A., Krueger W. A., Plank M., Nohé B., Haerberle H. A., Unertl K. a Dieterich H. J. (2003): Local anesthetics impair human granulocyte phagocytosis activity, oxidative burst, and CD11b expression in response to *Staphylococcus aureus*. *Anesthesiology* **98**, 842-848.
- Kimura M. a Kagawa T. (2009): Blue light-induced chloroplast avoidance and phototropic responses exhibit distinct dose dependency of PHOTOTROPIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Photochemistry and Photobiology* **85**, 1260-1264.
- Kinoshita T. a Shimazaki K. (1999): Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO Journal* **18**, 5548-58.
- Kinoshita T., Matsumoto M., Nakayama K. I., Doi M. a Shimazaki K. (2008): Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5626-5631.
- Klein R. R. a Koeppel D. E. (1985): Ion transport processes in corn mitochondria: I. Effect of the local anesthetic dibucaine. *Plant Physiology* **77**, 909–911.
- Kong S. G. a Wada M. (2016): Molecular basis of chloroplast photorelocation movement. *Journal of Plant Research* **129**, 159-166.
- Kong S. G., Arai Y., Suetsugu N., Yanagida T. a Wada M. (2013a): Rapid severing and motility of chloroplast-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 572-590.
- Kong S. G., Suetsugu N., Kikuchi S., Nakai M., Nagatani A. a Wada M. (2013b): Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiology* **54**, 80-92.
- Krasowski M. D. (2003): Contradicting a unitary theory of general anesthetic action: a history of three compounds from 1901 to 2001. *Bulletin of Anesthesia History* **21**, 1-24.
- Kwak J. M., Mori I. C., Pei Z. M., Leonhardt N. a Torres M. A. (2003): NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **22**, 2623-2633.
- La Monaca E. a Fodale V. (2012): Effects of anesthetics on mitochondrial signaling and function. *Current Drug Safety* **7**, 126-139.
- Leake C. D. (1971): Claude Bernard and anesthesia. *Anesthesiology* **35**, 112-113.
- Li F. W., Rothfels C. J., Melkonian M., Villarreal J. C., Stevenson D. W., Graham S. W., Wong G. K., Mathews S. a Pryer K. M. (2015): The origin and evolution of phototropins. *Frontiers in Plant Science* **6**:637.
- Luesse D. R., Stacy L., DeBlasio S. L. a Hangarter R. P. (2010): Integration of phot1, phot2, and PhyB signalling in light-induced chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4387–4397.
- Matsuoka D. a Tokutomi S. (2005): Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13337-13342.
- Meyer K. H. (1937): Contributions to the theory of narcosis. *Transactions of the Faraday Society* **33**, 1062-1064.
- Miller K. W. (1985): The nature of the site of general anesthesia. *International Review of Neurobiology* **27**, 1-61.

- Moran N. (2007): Osmoregulation of leaf motor cells. *FEBS Letters* **581**, 2337-2347.
- Morrow I. C. a Parton R. G. (2005): Flotillins and the PHB domain protein family: rafts, worms and anaesthetics. *Traffic* **6**, 725-740.
- Mott K. A., Sibbersen E. D. a Shope J. C. (2008): The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant, Cell & Environment* **31**, 1299-306.
- Nakao H., Ogi K., Yokono S., Ono J. a Miyatake A. (1998): The effect of volatile anesthetics on light-induced phosphorylation in spinach chloroplasts. *Toxicology Letters* **100-101**, 135-138.
- Nauš J., Rolencová M. a Hlaváčková V. (2008): Is chloroplast movement in tobacco plants influenced systematically after local illumination or burning stress? *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1292-1299.
- Nauš J., Šmecko S. a Špundová M. (2016): Chloroplast avoidance movement as a sensitive indicator of relative water content during leaf desiccation in the dark. *Photosynthesis Research* **129**, 217-225.
- Olsen R. W. a Li G. D. (2011): GABA_A receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Canadian Journal of Anesthesia* **58**, 206-215.
- Opanasenko V., Agafonov A. a Demidova R. (2002): Effects of heterocyclic and tertiary permeant amines on the electron transfer in thylakoid membranes. *Photosynthesis Research* **72**, 243-253.
- Pavlovič A. a Mithöfer A. (2019): Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany* **70**, 3379-3389.
- Pavlovič A., Libiaková M., Bokor B., Jakšová J., Petřík I., Novák O. a Baluška F. (2020): Anaesthesia with diethyl ether impairs jasmonate signalling in the carnivorous plant Venus flytrap (*Dionaea muscipula*). *Annals of Botany* **125**, 173-183.
- Prabhakar M. (2004): Structure, delimitation, nomenclature and classification of stomata. *Acta Botanica Sinica* **46**, 241-251.
- Preuten T., Blackwood L., Christie J. M. a Fankhauser C. (2015): Lipid anchoring of Arabidopsis phototropin 1 to assess the functional significance of receptor internalization: should I stay or should I go? *New Phytologist* **206**, 1038-1050.
- Račanský V., Béderová F. a Balgavý P. (1984): Decrease of gel liquid crystal transition temperature in dipalmitoylphosphatidylcholine model membrane in the presence of local anesthetics. *Studia Biophysica* **103**, 231-241.
- Rinaldi A. (2014): Reawakening anaesthesia research. *EMBO Reports* **15**, 1113-1118.
- Rose da Silva M. F. L. (2014): Syncope: epidemiology, etiology, and prognosis. *Frontiers in Physiology* **5**, 471.
- Sack F. D. (1987): The development and structure of stomata. In: *Stomatal function*. (Zeiger E., Farquhar G. D. a Cowan I. R eds.), Stanford University Press, Stanford, California, 59-90.
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T. E., Christie J. M., Briggs W. R., Wada M. a Okada K. (2001): *Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6969-6974.
- Sakamoto K. a Briggs W. R. (2002): Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**, 1723-1735.
- Salomon M., Knieb E., von Zeppelin T. a Rudiger W. (2003): Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* **42**, 4217-25.
- Sato Y., Kadota A. a Wada M. (1999): Mechanically induced avoidance response of chloroplasts in fern protonemal cells. *Plant Physiology* **12**, 37-44.
- Sato Y., Wada M. a Kadota A. (2001): External Ca²⁺ is essential for chloroplast movement induced by mechanical stimulation but not by light stimulation. *Plant Physiology* **127**, 497-504.
- Sato Y., Wada M. a Kadota A. (2003): Accumulation response of chloroplasts induced by mechanical stimulation in bryophyte. *Planta* **216**, 772-777.
- Savara O. (2018): *Světlem indukovaný pohyb chloroplastů u fotomorfogenních mutantů rajčete*. Bakalářská práce, UPOL Olomouc, Česká republika.

- Segal A. W. (2016): NADPH oxidases as electrochemical generators to produce ion fluxes and turgor in fungi, plants and humans. *Open Biology* **6**:160028.
- Semin B. K., Ivanov I. I. a Rubin A. B. (1990): Tetracaine inhibition of electron transport in pea chloroplasts is coupled to calcium displacement by the local anesthetic. *General Physiology and Biophysics* **9**, 65-70.
- Semin B. K., Tschudinovskich M. N. a Ivanov I. I. (1989): Local anesthetics-induced inhibition of chloroplast electron transport. *General Physiology and Biophysics* **8**, 233-244.
- Senn G. (1908): Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Shimazaki K., Doi M., Assmann S. M. a Kinoshita T. (2007): Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 219-247.
- Slater S. J., Cox K. J. A., Lombardi J. V., Ho C., Kelly M. B., Rubin E. a Stubbs C. D. (1993): Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* **364**, 82-84.
- Sonner J. M. (2008): A hypothesis on the origin and evolution of the response to inhaled anesthetics. *Anesthesia & Analgesia* **107**, 849-854.
- Sonner J. M. a Cantor R. S. (2013): Molecular mechanisms of drug action: an emerging view. *Annual Review of Biophysics* **42**, 143-67.
- Stoelzle S., Kagawa T., Wada M., Hedrich R. a Dietrich P. (2003): Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 1456-1461.
- Strichartz G. R. a Ritchie J. M. (1987): The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. In: *Local Anesthetics*. (Strichartz G. R. ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, 21-52.
- Suetsugu N. a Wada M. (2007): Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biological Chemistry* **388**, 927-935.
- Suetsugu N. a Wada M. (2016): Evolution of the cp-Actin-based motility system of chloroplasts in green plants. *Frontiers in Plant Science* **7**, 561.
- Suetsugu N., Takami T., Ebisu Y., Watanabe H., Iiboshi C., Doi M. a Shimazaki K. (2014): Guard cell chloroplasts are essential for blue light-dependent stomatal opening in *Arabidopsis*. *PLoS One* **9**:e108374.
- Šeršeň F., Balgavý P. a Devínsky F. (1990): Electron spin resonance study of chloroplast photosynthetic activity in the presence of amphiphilic amines. *General Physiology and Biophysics* **9**, 625-633.
- Takemiya A., Inoue S., Doi M., Kinoshita T. a Shimazaki K. (2005): Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* **17**, 1120-1127.
- Takemiya A., Sugiyama N., Fujimoto H., Tsutsumi T., Yamauchi S., Hiyama A., Tada Y., Christie J. M. a Shimazaki K. I. (2013): Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nature Communications* **4**:2094.
- Taylor B. L. a Zhulin I. B. (1999): PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 479-506.
- Tlalka M. a Fricker M. (1999): The role of calcium in blue-light-dependent chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Plant Journal* **20**, 461-473.
- Tsuboi H. a Wada M. (2010): The speed of intracellular signal transfer for chloroplast movement. *Plant Signalling and Behaviour* **5**, 433-435.
- Tsuboi H. a Wada M. (2011): Chloroplasts can move in any direction to avoid strong light. *Journal of Plant Research* **124**, 201-210.
- Tsuboi H. a Wada M. (2013): Chloroplasts continuously monitor photoreceptor signals during accumulation movement. *Journal of Plant Research* **126**, 557-566.
- Tsuboi H., Yamashita H. a Wada M. (2009): Chloroplasts do not have a polarity for light-induced accumulation movement. *Journal of Plant Research* **122**, 131-140.
- Tsuchiya H. (2017): Anesthetic agents of plant origin: A review of phytochemicals with anesthetic activity. *Molecules* **22**: 1369.
- Wada M. (2013): Chloroplast movement. *Plant Science* **210**, 177-182.

- Wada M. a Kong S. G. (2018): Actin-mediated movement of chloroplasts. *Journal of Cell Science* **131**, 210310.
- Wada M. a Kong S. G. (2019): Chloroplast actin filaments involved in chloroplast photorelocation movements. In: *The Cytoskeleton*. (Sahi V. P. a Baluška F. eds.), Springer, New York, USA, 37-48.
- Weiland M., Mancuso S. a Baluška F. (2016): Signalling via glutamate and GLRs in *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* **43**, 1-25.
- White P. J. (2000): Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 171-189.
- Yamada N., Suetsugu N., Wada M. a Kadota A. (2011): Phototropin-dependent biased relocalization of cp-actin filaments can be induced even when chloroplast movement is inhibited. *Plant Signalling and Behaviour* **6**, 1651-1653.
- Yao H., Xu Q. a Yuan M. (2008): Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. *Plant Signalling and Behavior* **3**, 954-960.
- Yokawa K., Kagenishi T. a Baluška F. (2019): Anesthetics, anesthesia, and plants. *Trends in Plant Science* **24**, 12-14.
- Yokawa K., Kagenishi T., Pavlovič A., Gall S., Weiland M., Mancuso S. a Baluška F. (2018): Anaesthetics stop diverse plant organ movements, affect endocytic vesicle recycling and ROS homeostasis, and block action potentials in Venus flytraps. *Annals of Botany* **122**, 747-756.
- Zeiger E. (1983): The biology of stomatal guard cells. *Annual Review of Plant Physiology* **34**, 441-475.
- Zhang X., Wang H., Takemiya A., Song C. P., Kinoshita T. a Shimazaki K. (2004): Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cell protoplasts. *Plant Physiology* **136**, 4150-4158.
- Žárský V. (2015): Signal transduction: GABA receptor found in plants. *Nature Plants* **1**:15115.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA	abscisic acid (abscisová kyselina)
ABCB19	ATP binding cassette, subfamily B19; protein
AGC	cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase G and phospholipid-dependent protein kinase C; skupina protein kinas
BL	blue light (modré světlo)
BLUS1	BLUE LIGHT SIGNALING 1; protein
DL	delayed luminescence (zpožděná fluorescence)
EGTA	ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid; chelatační činidlo
ESR	electron spin resonance (elektronová paramagnetická spektroskopie)
LCF	leaf chamber fluorometer (listová komůrka s fluorometrem)
OEC	oxygen evolving complex (komplex vyvíjející kyslík)
PAS	Per-Arnt-Sim; doména proteinů
PS I	photosystem I (fotosystém I)
PS II	photosystem II (fotosystém II)