

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Vliv salinitního stresu na pohyb
chloroplastů vyvolaný modrým světlem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Beata Budíková**
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **RNDr. Martina Špundová, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Beata Budíková
Název práce	Vliv salinitního stresu na pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Bakalářská práce se zabývá studiem vlivu salinitního stresu na pohyb chloroplastů. Vlivem stresových faktorů může u rostlin docházet k nepříznivým změnám.</p> <p>V teoretické části jsou shrnuty poznatky o pohybu chloroplastů, který rostlinám umožňuje reagovat na změny světelných podmínek.</p> <p>V praktické části bakalářské práce byly studovány změny pohybu chloroplastů pod vlivem salinitního stresu lilku rajčete (<i>Solanum lycopersicum</i> L.). Pohyb chloroplastů byl sledován pomocí změn kolimované transmitance listů.</p> <p>Získané výsledky se lišily, v některých případech došlo ke změně (inhibici) pohybu chloroplastů, ve většině však tyto změny nebyly signifikantní.</p>
Klíčová slova	Lilek rajče, salinitní stres, pohyb chloroplastů, transmitance
Počet stran	37
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Beata Budíková
Title of thesis	Effect of salinity stress on chloroplast movement induced by blue light
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>The bachelor thesis deals with the effect of salinity stress on chloroplast movement. Due to stress factors, adverse changes in plants, such as inhibition of germination and growth or slowing down of metabolism, may occur.</p> <p>The theoretical part summarizes the knowledge of chloroplast movement which allows plants to react to changes in light conditions.</p> <p>In the practical part of the thesis, changes in chloroplast movement under salinity stress were studied in tomato plants (<i>Solanum lycopersicum</i> L.). Chloroplast movement was determined by changes in collimated leaf transmittance.</p> <p>The obtained results differed, in some cases there occurred a change (inhibition) in chloroplast movement, in most cases, however, these changes were not significant.</p>
Keywords	Tomato, salinity stress, chloroplast movement, transmittance
Number of pages	37
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Beata Budíková

Poděkování

Děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Martině Špundové, Ph.D., za odborný dohled při práci a realizaci experimentů, za užitečné rady, které mi poskytla, za pomoc při sepisování bakalářské práce a za dohled nad pěstovanými rostlinami ve fytokomoře. Dále děkuji prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D., za pomoc při realizaci experimentů a konzultace.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD A CÍLE	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Současný stav problematiky	9
2.2 Obecný princip pohybu chloroplastů.....	9
2.3 Mechanismus pohybu chloroplastů.....	10
2.3.1 Fototropiny	10
2.3.2 Cp-aktinová vlákna.....	11
2.4 Vliv stresových faktorů na pohyb chloroplastů	12
2.4.1 Vysokoteplotní stres	12
2.4.2 Stres zasycháním.....	13
2.4.3 Salinitní stres.....	13
2.4.4 Biotický stres	14
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
3.1 Rostlinný materiál	15
3.2 Navození salinitního stresu.....	15
3.3 Měření pohybu chloroplastů.....	17
3.4 Stanovení relativního obsahu chlorofylu	19
3.5 Stanovení parametru F_v/F_M	19
3.6 Statistické zpracování dat.....	20
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	21
5 ZÁVĚR.....	32
6 LITERATURA.....	33

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

F_v/F_M	maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II
MS médium	bazální médium dle Murashige a Skoog
PHOT1	fototropin 1
PHOT2	fototropin 2
PSII	fotosystém II
T_c	kolimovaná transmittance

1 ÚVOD A CÍLE

Zásadním předpokladem pro život zelených fotoautotrofních organismů je schopnost optimalizovat množství světla pro fotosyntézu. Z širšího hlediska má pak tato schopnost nepostradatelný význam pro téměř všechny živé organismy, jelikož využívají chemickou energii vzniklou přeměnou energie světelné právě při tomto biochemickém procesu.

Jedním z mechanismů, kterými rostliny reagují na změny světelných podmínek a regulují tak přísun světelné energie využívané ve fotosyntéze, je světlem vyvolaný pohyb chloroplastů. Ten umožňuje optimalizovat fotosyntézu a také chránit chloroplasty před přebytečným světlem. Obecně jsou rozlišovány dva typy pohybu chloroplastů. Prvním typem je únikový pohyb, který je reakcí na působení světla o vysoké intenzitě. Chloroplasty se vyhýbají silně osvětleným místům a přesouvají se ke stěnám buněk rovnoběžným se směrem světla. Druhým typem pohybu chloroplastů je akumulární pohyb, který je naopak reakcí na působení světla o nízké intenzitě. Při tomto pohybu se chloroplasty přesouvají k osvětleným buněčným stěnám kolmým ke směru světla.

Salinita neboli zasolení patří k abiotickým stresovým faktorům rostlin. Tento jev představuje v současné době globální problém pro zemědělství, jelikož způsobuje inhibici a zhoršení růstu a vývoje plodin. Je známo, že inhibuje klíčení semen a růst rostlin, zpomaluje metabolické procesy či zavírání průduchů nebo urychluje senescenci.

Studium změn pohybu chloroplastů při působení stresových faktorů je stále v začátcích. Vliv salinity na pohyb chloroplastů nebyl doposud zkoumán. Vzhledem k výše uvedenému významu pohybu chloroplastů by jeho změny mohly ovlivňovat schopnost rostlin vypořádat se s působením stresových faktorů.

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše týkající se problematiky pohybu chloroplastů vyvolaného světlem a jeho změn při působení stresových faktorů. V experimentální části pak bylo cílem zvládnout metodiku navození salinitního stresu, měření pohybu chloroplastů vyvolaného modrým světlem u kontrolních rostlin a u rostlin stresovaných salinitou pomocí měření změn optické propustnosti listu, porovnání výsledků měření a zhodnocení vlivu salinitního stresu na pohyb chloroplastů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Současný stav problematiky

V průběhu evoluce došlo u rostlin k vyvinutí mechanismů, pomocí kterých jsou rostliny schopny přizpůsobit se změnám světelných podmínek, k nimž dochází jak v průběhu jednoho dne, tak i postupně během celého roku. Mezi tyto mechanismy patří například fototropismus, fotonastie listů či fotorelokační pohyby chloroplastů. Ty obsahují primární fotosyntetický aparát rostlin a jejich pozice uvnitř buněk závisí na směru, vlnové délce a intenzitě dopadajícího světla (Gabryš, 2004).

Změny pohybu chloroplastů na základě působení stresových faktorů nejsou zatím dostatečně prozkoumány.

2.2 Obecný princip pohybu chloroplastů

Pohyb chloroplastů je jednou z reakcí rostliny na změnu světelných podmínek na subcelulární úrovni. Díky těmto pohybům dochází také ke zefektivnění fotosyntézy. Nalezneme jej u všech vyšších a některých nižších rostlin (Kong a Wada, 2014).

Obecně jsou rozlišovány dva základní druhy pohybu chloroplastů.

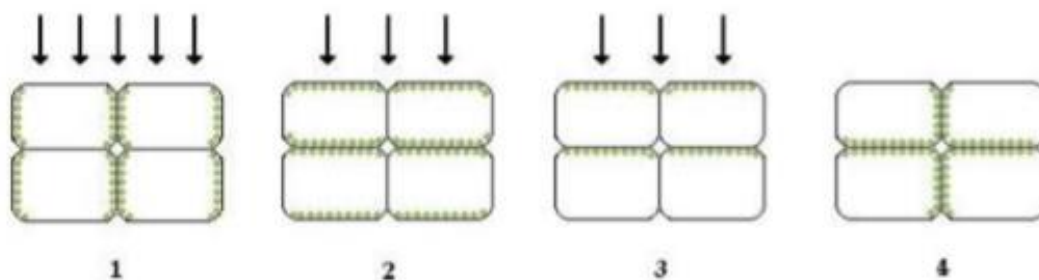
a) Únikový pohyb („avoidance response“ – vyhnutí se)

Jedná se o reakci rostliny na světlo o vysoké intenzitě, které by mohlo poškodit chloroplasty, na něž dopadá. Chloroplasty se tedy vyhýbají silně osvětleným místům. Přesouvají se ke stěnám buněk rovnoběžným se směrem světla a zabraňují tímto způsobem poškození fotosyntetického aparátu. Tato pozice se nazývá parastrofe (Obr. 1) (Haupt a Scheurlein, 1990; Kagawa a Wada, 2002; Kong a Wada, 2014).

b) Akumulační pohyb („accumulation response“ – akumulace)

Jsou-li rostliny ozářeny světlem o nízké intenzitě, chloroplasty se přesouvají k osvětleným stěnám buněk kolmým ke směru dopadajícího světla. Pokud se chloroplasty přesunou k oběma stěnám buněk, jedná se o pozici diastrofe, pokud pouze k předním stěnám buněk, jedná se o pozici epistrofe (Obr. 1). Dochází tím k pokrytí co největší absorpční plochy a maximalizaci rychlosti fotosyntézy (Haupt a Scheurlein, 1990; Kagawa a Wada, 2002; Kong a Wada, 2014; Wada 2016).

Ve tmě se pak chloroplasty zpravidla shromažďují na sousedících stěnách buněk do pozice apostrofe (Obr. 1) (Wada, 2016).



Obr 1. Formy uspořádání chloroplastů v buňkách v reakci na různé intenzity osvětlení buněk. 1) parastrofe, 2) diastrofe, 3) epistrofe, 4) apostrofe. Počet šipek značí intenzitu osvětlení (5 šipek – silné světlo, 3 šipky – slabé světlo, žádná šipka – tma). (Převzato z Řebíček, 2009).

2.3 Mechanismus pohybu chloroplastů

V reakci na změny světelných podmínek okolního prostředí došlo u vyšších rostlin k vyvinutí proteinů citlivých na světlo – tzv. fotoreceptorů. Mezi ně patří fytochromy, které reagují na červené světlo (Mathews, 2006), dále fototropiny a kryptochromy, které reagují na modré světlo a světlo blízké ultrafialové složky světelného spektra (Banerjee a Batschauer, 2005). Právě fototropiny s absorpčním rozmezím 320 – 500 nm jsou u vyšších rostlin zodpovědné za fotorelokační pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem (Kong *et al.*, 2012; Kong a Wada, 2014). Odpověď rostlin po zaznamenání signálu receptory a přenosu signálními dráhami je pohyb chloroplastů zprostředkovaný aktinovým cytoskeletem a jeho tzv. cp-aktinovými vlákny (chloroplast-actin filaments) (Suetsugu *et al.*, 2016).

Přestože je pohyb chloroplastů nejefektivněji vyvolán modrou složkou světelného spektra, u některých nižších rostlin vyvolává pohyb chloroplastů složka červená (Kong a Wada, 2014). Bylo také zjištěno, že při současném působení modrého a červeného světla se zvyšuje odpověď rostliny na modré světlo (Kagawa a Wada, 2000).

2.3.1 Fototropiny

Fototropiny patří mezi specifické rostlinné proteiny nacházející se ve většině rostlin od nejjednodušších jednobuněčných řas až po vyšší rostliny. Jedná se o fotoreceptorové molekuly schopné detekovat dopadající světelné záření.

Kromě pohybu chloroplastů se fototropiny podílejí také na řízení fototropismu, otevírání a zavírání průduchů, rozšíření listů a inhibici hypokotylů na modrém světle (Briggs a Christie, 2002; Christie, 2007; Aihara *et al.*, 2008).

U vyšších rostlin jsou známy dva druhy fototropinů – fototropin 1 (PHOT1) a fototropin 2 (PHOT2). Většina těchto fototropinů vyvolávajících pohyb chloroplastů se nachází podél vnější plazmatické membrány buněk, za určitých okolností se však mohou přemístit jinam. Po ozáření modrým světlem se PHOT1 uvolňuje z plazmatické membrány do cytoplazmy (Sakamoto a Briggs, 2002), zatímco PHOT2, nacházející se

jak podél vnější plazmatické membrány, tak podél obálky chloroplastů, se zčásti připojuje ke Golgiho aparátu (Kong *et al.*, 2006). Tato přemístění jsou významná zejména pro kinázovou aktivitu fototropinů (Kong a Wada, 2014).

Při regulaci akumulčního pohybu chloroplastů se oba druhy fototropinů překrývají ve svých funkcích. PHOT1 je však citlivější a dokáže reagovat na širší oblast (intenzit dopadajícího modrého světla. Regulace pomocí PHOT2 tedy v tomto případě nehraje příliš podstatnou roli (Sakai *et al.*, 2001; Kong a Wada, 2014). Naopak regulace únikového pohybu chloroplastů je zprostředkována výhradně pomocí PHOT2, který převážně řídí reakce na modré světlo o vysoké intenzitě (Sakai *et al.*, 2001).

2.3.2 Cp-aktinová vlákna

Pohyb chloroplastů v buňce je zprostředkováván pomocí aktinového cytoskeletu podobně, jako je tomu u mitochondrií, jádra a dalších buněčných organel. V pohybu chloroplastů hrají nejvýznamnější roli právě cp-aktinová vlákna, která byla objevena teprve poměrně nedávno. Od běžných aktinových vláken se liší svojí velikostí, tvarem a funkcí. Slouží k regulaci všech aspektů pohybu chloroplastů, včetně rychlosti a směru pohybu a také k ukotvení chloroplastů k plazmatické membráně v určité pozici (Kadota *et al.*, 2009, Kong *et al.*, 2013, Kong a Wada, 2014).

Světelné záření dopadající na chloroplasty vyvolává hromadění cp-aktinových vláken v určitých místech vnější membrány chloroplastů. V důsledku tohoto přeuspořádání je vyvolán cílený pohyb chloroplastů (Kadota *et al.*, 2009; Kong a Wada, 2014).

Cp-aktinová vlákna se buď tvoří, nebo naopak rozpadají v závislosti na intenzitě dopadajícího modrého světla a tím umožňují přesun chloroplastů podél plazmatické membrány požadovaným směrem. Při působení modrého světla o vysoké intenzitě dochází v daném místě k poměrně rychlé depolymerizaci, tedy rozpadu cp-aktinových vláken, čímž dochází k přesunu chloroplastů ze silně ozářených míst buňky a naopak jejich seskupení v místech neozářených. Tímto přeuspořádáním cp-aktinových vláken je vyvolán únikový pohyb chloroplastů, který odpovídá směru nahromadění cp-aktinových vláken, tedy směru od silného modrého světla (Kong *et al.*, 2013, Kong a Wada, 2014).

Naopak působení modrého světla o nízké intenzitě je podnětem pro akumulční pohyb chloroplastů. Při něm dochází k mírnému hromadění cp-aktinových vláken po stranách chloroplastů a jejich přesunu kolmo k dopadajícímu světlu (Kong *et al.*, 2013).

2.4 Vliv stresových faktorů na pohyb chloroplastů

2.4.1 Vysokoteplotní stres

Optimální teplota je jedním z nejvýznamnějších faktorů životního prostředí, u rostlin má významný vliv na jejich správný růst a vývoj. Příliš vysoká teplota však může být příkladem stresového faktoru rostlin a při nesprávném fungování pohybu chloroplastů může způsobit poškození fotosyntetického aparátu.

Závislost pohybu chloroplastů vyvolaného světlem na teplotě sledovali například Brugnoli & Björkman (1992). Za použití 30-ti minutové inkubace při dané teplotě bylo prokázáno, že pohyb chloroplastů vyvolaný světlem v listech rostlin rodu *Oxalis* byl silně závislý na teplotě. Způsob dosažení vysokých teplot však nebyl popsán. Rychlost pohybu chloroplastů se v porovnání s běžnou pokojovou teplotou zvyšovala pro teploty do 30 °C, při dalším zvyšování teploty nad tuto hranici však rychlost pohybu chloroplastů prudce klesala až do dosažení 40 °C.

Další zkoumání vlivu vysoké teploty na pohyb chloroplastů vyvolaný světlem prováděli Řebíček (2009) a Frolec *et al.*, 2010. V obou případech měření probíhalo na segmentech listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*), k měření byly použity dva různé teplotní režimy – skokový a lineární. Při použití skokového teplotního režimu byly vzorky po dobu 5 minut inkubovány v tepelné vodní lázni při teplotě 25 °C, poté po dobu 5 minut při teplotě T_m (25, 30, 35, 40, 42 nebo 45 °C), a pak po dobu 5 minut ochlazovány opět na teplotu 25 °C. Při použití lineárního teplotního režimu byly vzorky postupně zahřívány rychlostí 2 °C za minutu, od teploty 25 °C po teplotu T_m (25, 30, 35, 40, 42 nebo 45 °C), poté byly vzorky stejným způsobem postupně ochlazovány opět na teplotu 25 °C.

Výsledky byly v obou případech srovnatelné. Bylo zjištěno, že vliv vysoké teploty na pohyb chloroplastů závisel také na použitém teplotním režimu. K zastavení pohybu chloroplastů docházelo okolo teploty 45 °C.

Řebíček (2009) dále uvádí, že při použití lineárního teplotního režimu docházelo k zastavení pohybu chloroplastů až okolo teploty 50 °C, lze tedy usuzovat, že tento teplotní režim je k pohybu chloroplastů šetrnější než teplotní režim skokový.

Mechanismus inhibice pohybu chloroplastů v důsledku působení vysokých teplot však zatím není příliš prozkoumán a objasněn. Předpokládá se však, že by mohl souviset s vlivem vysokých teplot na cytoskelet buněk, protože jednu z klíčových rolí v pohybu chloroplastů hraje aktin (Kadota *et al.*, 2009; Kong a Wada, 2011, 2014).

Studiem reakcí cytoskeletu na vysokou teplotu se zabývali Müller *et al.* (2007). Zjistili, že u zkoumaných rostlin *Arabidopsis thaliana* došlo působením vysokých teplot k téměř úplnému vymizení aktinových vláken ve všech epidermálních buňkách. K jejich

rozpadu a vymizení docházelo při době inkubace 7 – 25 minut a teplotách 40 – 42 °C. Lze tedy předpokládat, že by inhibice pohybu chloroplastů působením vysokých teplot mohla být zapříčiněna právě rozpadem a vymizením aktinových vláken.

2.4.2 Stres zasycháním

Podobným abiotickým stresovým faktorem, který negativně ovlivňuje mnoho fyziologických procesů v rostlinách, je zasychání, k němuž dochází v důsledku nedostatku vody.

Zasychání rostlin zkoumali Nauš *et al.* (2016). Pro svou studii použili listy tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) a ječmene (*Hordeum vulgare* L. cv. Akcent). Zjistili, že pokles vody způsobil inhibici únikového pohybu chloroplastů, zatímco funkce fotosyntézy nebyla zasycháním téměř ovlivněna.

Přesný mechanismus inhibice světlem vyvolaného pohybu chloroplastů v důsledku zasychání zůstává zatím neobjasněn. Sniegowska-Swierk *et al.* (2015) zjistili, že v listech ječmene dochází vlivem zasychání k přeuspořádáním aktinového cytoskeletu. Podobně jako v případě inhibice světlem vyvolaného pohybu chloroplastů vlivem vysokých teplot se však předpokládá, že by tedy i zde mohla být souvislost s aktinovým cytoskeletem buněk, který se na pohybu chloroplastů významně podílí (Kadota *et al.*, 2009; Kong a Wada, 2011, 2014).

2.4.3 Salinitní stres

Zvýšená salinita půd představuje v dnešní době jeden z nejzávažnějších stresových faktorů rostlin, protože má negativní vliv na produktivitu pěstovaných plodin v postižených oblastech, a tím i dopad na celosvětové hospodářství.

Reakce rostlin na salinitní stres můžeme rozdělit do dvou fází. V první fázi dochází k omezení růstu nezávislému na iontech. Tato fáze nastává během několika minut a jejím konečným důsledkem je především uzavření průduchů, aby se zabránilo ztrátám vody.

Druhá fáze pak trvá déle, několik dnů až týdnů, a dochází při ní k hromadění cytotoxických iontů. To zpomaluje metabolické procesy, způsobuje předčasnou senescenci a může vést až k buněčné smrti.

Existuje několik mechanismů, které zajišťují toleranci vůči tomuto typu stresu. Patří sem například osmotická tolerance nebo iontová tolerance.

Osmotická tolerance nastupuje poměrně rychle a zahrnuje uzavírání průduchů, aby se zabránilo ztrátám vody (Maischak *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2014).

Pronikání soli z půdy do kořenového systému rostlin vede dále ke spuštění několika signálních kaskád, které se podílejí na iontové toleranci rostlin (Maathuis *et al.*, 2014).

Nadměrné zasolení je taktéž spojováno se vznikem oxidativního stresu zapříčiněným zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS), který vede k poškození buněčného dělení (Isayenkov, 2012).

Dalším z významných procesů, který by mohl být zvýšenou salinitou ovlivňován, je světlem vyvolaný pohyb chloroplastů. Tento jev však zatím nebyl podrobněji studován.

2.4.4 Biotický stres

Rostliny mohou být vystaveny nejenom stresovým faktorům abiotickým, ale též biotickým. Biotický stres způsobují živé organismy, zejména patogenní bakterie, viry a houby, kdy následkem jejich činnosti dochází k přímému zbavení živin u hostitele. To vede ke snížené vitalitě rostliny a v nejzazších případech ke smrti hostitelské rostliny.

Vlivem biotického stresu na pohyb chloroplastů se okrajově zabýval Řebíček (2009). Měření bylo prováděno na listech slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) a byl sledován časový průběh vlivu plísně slunečnicové (*Plasmopara halstedii*) na světlem vyvolaný pohyb chloroplastů, který byl na témže listu měřen 18., 21., 24. a 27. den stáří rostlin. Bylo zjištěno, že vliv plísně slunečnicové se u inokulovaných rostlin oproti rostlinám kontrolním projevil vyšší minimální a maximální hodnotou T_C a také větším rozsahem T_C mezi minimální a maximální hodnotou.

Působením biotických stresových faktorů na světlem vyvolaný pohyb chloroplastů by bylo dobré se dále více zabývat.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Rostlinný materiál

K experimentům v praktické části práce byly použity rostliny lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Jednalo se o dva kultivary. Prvním byl kultivar Rutgers, který byl použit pro většinu experimentů, druhým byl kultivar Moneymaker, který byl použit pro poslední experiment.

3.2 Navození salinitního stresu

Semena rostlin byla nejprve vysévána na agarové kultivační MS médium (Murashige a Skoog, 1962), které obsahuje základní makroprvky a mikroprvky, MS médium (8,6 g; Duchefa Biochemie, cat. n. M0221.0050), MES pufr (Morpholinoethane sulfonic acid; 390,4 mg; Serva, cat. n. 29834.04) a sacharózu (20,0 g, Lachner, cat. n. 40135-APO-G1000-1). Za použití pH metru byla přidáním 1M hydroxidu draselného hodnota pH roztoku upravena na 6,1. Ke ztužení média byl použit agar (2,8 g; Duchefa Biochemie, cat. n. P1001.1000) a médium bylo sterilizováno v parním autoklávu. Autoklávováním také došlo ke snížení pH na hodnotu 5,7, která je vyhovující pro kultivaci rostlin.

Před vysetím byla semena nejprve sterilizována pomocí 2,8% chlornanu sodného (0,6 l Sava + 0,4 l destilované vody) (Savo, Bochemie a. s., Česká republika). Ke sterilizaci byla použita 50ml plastová zkumavka Falcon. Doba sterilizace byla 20 až 30 minut, poté byla semena 5x až 6x promyta sterilní destilovanou vodou. Pro výsev semen a následnou kultivaci rostlin byly použity uzavíratelné plastové krabičky o rozměrech asi 7x15 cm, do nichž bylo nalito 60 ml výše uvedeného média, na které byla po ztuhnutí vyseta semena.

Sterilizace a vysetí probíhaly v laminárním boxu (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific) zajišťujícím sterilní podmínky.

Po třech týdnech byl na rostliny aplikován salinitní stres přidáním roztoku chloridu sodného do čistého média, na které byly rostliny přesazeny. Vše probíhalo ve sterilních podmínkách. Požadované koncentrace a použité množství zásobního roztoku chloridu sodného jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Množství zásobního 5M roztoku NaCl přidaného do 240 ml média dle požadované koncentrace

Požadovaná koncentrace NaCl [mM]	Množství zásobního 5M NaCl [ml]
50	2,4
100	4,8

V pozdějších experimentech byla semena rostlin vyseta do perlitu a k zálivce byl použit Knopův živný roztok. Pro přípravu 10 l zásobního Knopova roztoku byl 10-ti litrový kanystr asi ze $\frac{3}{4}$ napuštěn destilovanou vodou, pomocí odměrného válce bylo přidáno vždy 100 ml zásobního roztoku síranu hořečnatého (14,3 g/l), chloridu draselného (7,1 g/l), dusičnanu vápenatého (57,2 g/l), dusičnanu draselného (14,3 g/l) a hydrogenfosforečnanu draselného (14,3 g/l). Poté bylo přidáno 10 kapek chloridu železitého z lahvičky s kapátkem. Kanystr byl následně destilovanou vodou doplněn na objem 10 l a obsah byl protřepán.

Po třech týdnech byl na rostliny aplikován salinitní stres zálivkou roztokem chloridu sodného o požadované koncentraci. Zálivka byla připravena rozpuštěním chloridu sodného (5,844 g/l; Lachner, cat. n. 30093-AP0), a sice buď v destilované vodě, nebo v Knopově živném roztoku. Použité koncentrace a množství rozpouštěného chloridu sodného jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Množství NaCl přidaného do 1 l destilované vody nebo Knopova roztoku dle požadované koncentrace

Požadovaná koncentrace NaCl [mM]	Množství NaCl [g]
100	5,844
200	11,688

Kultivace všech rostlin pěstovaných na médiu i v perlitu probíhala ve fytochomóře (Snijder Scientific, Nizozemí) při teplotě 21 °C a relativní vlhkosti vzduchu 60 %. Pro pěstování všech rostlin byla použita dlouhá fotoperioda (16 h světlo/8 h tma), intenzita světla byla $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

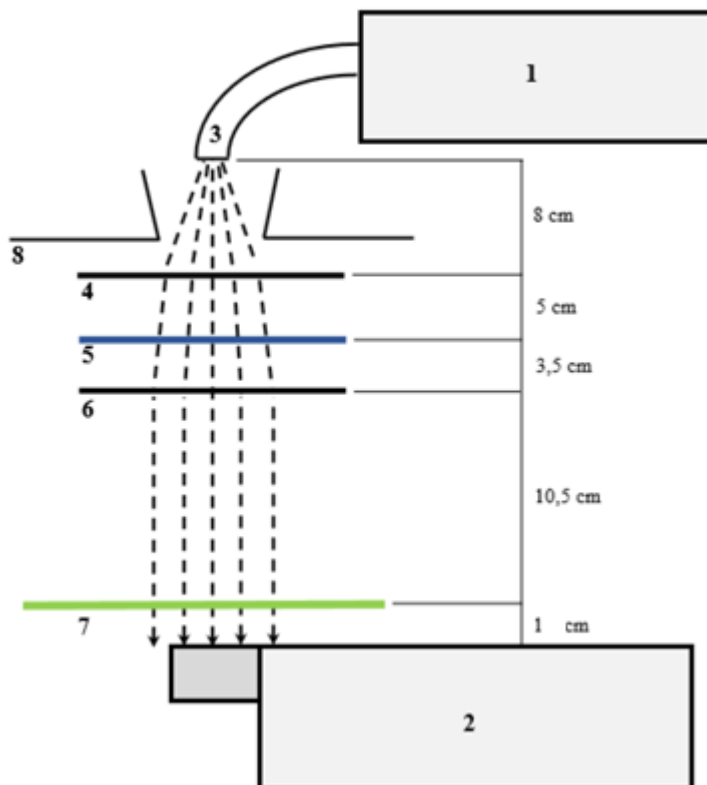
Způsob kultivace, koncentrace chloridu sodného, datum setí, aplikace stresu a měření rostlin jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Kultivační podmínky příslušných kultivarů. Uveden kultivar, způsob kultivace, příslušná koncentrace NaCl [mM], datum setí, datum aplikace stresu nebo přesazení a datum měření.

Kultivar	Způsob kultivace	Koncentrace NaCl [mM]	Zasetí	Aplikace stresu/přesazení	Měření
Rutgers	MS médium	50	15.10.2018	26.10.2018	29.10.2018
		50, 100	9.11.2018	30.11.2018	3.12.2018
		100, 200 (v dH ₂ O)	23.11.2018	14.12.2018	17.12.2018
			23.11.2018	14.12.2018	28.12.2018
Rutgers	perlit	100, 200 (v Knopově roztoku)	28.12.2018	18.1.2019	21.1.2019
			28.12.2018	18.1.2019	1.2.2019
Moneymaker	perlit	100, 200 (v Knopově roztoku)	28.1.2019	18.2.2019	21.2.2019
			28.1.2019	18.2.2019	5.3.2019

3.3 Měření pohybu chloroplastů

Pohyb chloroplastů byl sledován pomocí měření změn v kolimované transmitanci neboli optické propustnosti listu. Transmitance vyjadřuje množství světla, které projde měřeným vzorkem, v tomto případě listy rostlin. Pomocí působení modrého světla na předem zatemněné listy rostlin byly vyvolány změny v transmitanci odrážející pohyb chloroplastů. Modré světlo s maximem v oblasti kolem 460 nm bylo generováno zdrojem bílého studeného světla KL – 2500 (Schott Glass, Mainz, Německo) v kombinaci s modrým filtrem BG 12 (Schott Glass, Weisbaden, Německo) (Obr. 2).



Obr. 2. Schéma zařízení použitého k měření změn kolimované transmittance (optické propustnosti) listu s vyznačenými vzdálenostmi mezi jednotlivými komponentami (cm). Popis komponent: 1) zdroj bílého studeného světla KL – 2500, 2) Spectrapen SP – 100, 3) světlovod, 4) kolimátor I, 5) modrý filtr BG 12, 6) kolimátor II, 7) měřený vzorek – list, 8) stínítko. (Převzato z Savara, 2018, upraveno).

Působením silného modrého světla (o intenzitě $25 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, později $270 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) na listy byl vyvolán únikový pohyb chloroplastů. Působením slabého modrého světla (o intenzitě $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) na listy byl naopak vyvolán akumulční pohyb chloroplastů.

Zvyšování kolimované transmittance při osvětlování silným modrým světlem je způsobeno únikovým pohybem chloroplastů, kdy se chloroplasty pohybují z osvětlených částí buněčných stěn k neosvětleným, a tím dochází ke zvyšování optické propustnosti listu. Naopak slabé modré světlo vyvolává akumulaci chloroplastů blíže osvětleným částem buněčných stěn, a to má za následek snížení optické propustnosti listu.

Změny v kolimované transmittanci vyvolané modrým světlem byly měřeny pomocí spektrálního radiometru Spectrapen SP – 100 (PSI, Drásov, Česká republika). Intenzita měřicího světla byla $270 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Díky umístění detekčního čidla radiometru v dané vzdálenosti 1 cm pod listem je možné detekovat zejména kolimované paprsky, které procházejí listem, čímž se zvyšuje citlivost měřicí metody.

Před měřením byly rostliny zatemněny po dobu 30 min, aby se chloroplasty dostaly do přibližně stejné výchozí polohy. Poté bylo na list působeno silným nebo slabým modrým světlem, které vyvolávalo pohyb chloroplastů, a probíhalo měření spektra procházejícího světla s vloženým listem (hodnota I). Dále bylo změřeno spektrum měřicího světla dopadajícího na list (hodnota I_0), toto měření probíhalo bez vloženého listu. Z podílu hodnot I/I_0 bylo získáno spektrum kolimované transmitance.

Ze získaného spektra kolimované transmitance byla vybrána hodnota při 436 nm, protože při této vlnové délce transmitance citlivě reaguje na pohyb chloroplastů. Získané hodnoty byly nanormovány na výchozí hodnotu kolimované transmitance před působením světla.

Z každé varianty byly měřeny 3 až 4 listy. Měření bylo prováděno na prvních listech (počítáno od báze rostliny), v případě jejich poškození na druhých listech. Listy byly od rostlin oddělené, řez byl obalen buničinou, která byla průběžně vlhčena, aby se zabránilo zasychání listů v průběhu měření.

Měření jednoho listu probíhalo po dobu 40 až 60 minut v 5-ti minutových intervalech.

3.4 Stanovení relativního obsahu chlorofylu

V listech použitých k měření pohybu chloroplastů byl v přibližně stejné části stanovován relativní obsah chlorofylu pomocí chlorofylmetru SPAD – 502 (Konica Minolta, Japonsko).

Hodnota relativního obsahu chlorofylu byla změřena pětkrát, vypočítaný průměr z těchto pěti naměřených hodnot byl brán jako reprezentativní výsledek pro daný list.

3.5 Stanovení parametru F_v/F_m

V měřených listech byl dále stanovován parametr F_v/F_m , představuje maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II (PSII). U kontrolních nestresovaných rostlin by se měla jeho hodnota pohybovat kolem 0,8.

Parametr F_v/F_m byl měřen použitím fluorimetru PEA (Hansatech, King's Lynn, UK). Použitá intenzita světla pro měření byla 50 % maximální intenzity světla, tedy $1200 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Doba měření byla 2 sekundy. Pro měření byla použita listová svorka firmy Hansatech, bylo měřeno ve stejné části listu jako při měření relativního obsahu chlorofylu.

3.6 Statistické zpracování dat

Statistické zpracování získaných dat bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel. Statistická významnost rozdílů mezi jednotlivými variantami byla zjišťována provedením nepárového t-testu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části práce bylo zjišťováno, zda u rostlin lilku rajčete vystavených salinitnímu stresu dojde k ovlivnění pohybu chloroplastů vyvolaného modrým světlem.

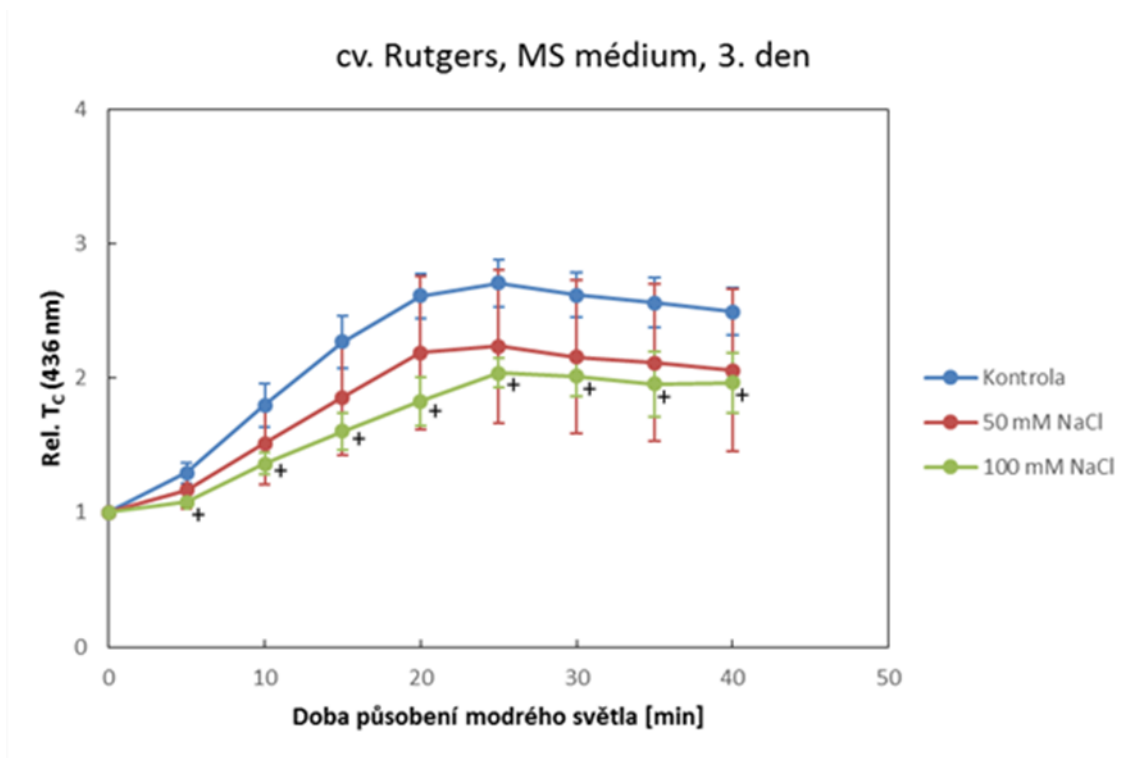
Pohyb chloroplastů byl sledován pomocí měření změn v kolimované transmitanci za použití spektrálního radiometru Spectrapen SP – 100 (PSI, Drásov, Česká republika) při působení modrého světla.

Dále bylo také prováděno stanovení relativního obsahu chlorofylu v listech použitím chlorofylmetru SPAD – 502 (Konica Minolta, Japonsko) a stanovení parametru F_V/F_M , který vypovídá o funkci fotochemie PSII, použitím fluorimetru PEA (Hansatech, King's Lynn, UK). Měření těchto dvou údajů doplňovalo měření pohybu chloroplastů a sloužilo ke zhodnocení fyziologického stavu rostlin.

V prvním testovacím experimentu byly rostliny pěstovány ve sterilních podmínkách na MS médiu, ke kterému se přidával roztok chloridu sodného. Na základě výsledků studia vlivu salinitního stresu na klíčení semen lilku rajčete byla vybrána koncentrace chloridu sodného 50 mM (Fellner a Shawney, 2001).

Semena byla za sterilních podmínek vyseta na MS médium. Po třech týdnech byly rostliny přesazeny na čerstvé médium. Přidáním roztoku chloridu sodného o požadované koncentraci 50 mM do média byl navozen stres zasolením. Měření bylo prováděno 3. den po aplikaci chloridu sodného jak na rostlinách kontrolních, tak na rostlinách ovlivněných roztokem chloridu sodného. Z naměřených výsledků nebyl vliv této koncentrace na pohyb chloroplastů patrný. Relativní obsah chlorofylu a parametr F_V/F_M stresovaných rostlin se od kontrolních také téměř nelišil. Koncentrace 50 mM byla tedy pravděpodobně pro vyvolání změny v pohybu chloroplastů příliš nízká. Údaje z tohoto měření nebyly graficky zpracovány.

V dalším experimentu byl tedy roztok chloridu sodného použit v koncentraci 50 mM a 100 mM. Semena byla opět nejprve za sterilních podmínek vysazena na médium, po třech týdnech pak byly rostliny přesazeny na čerstvé médium a byl přidán chlorid sodný v požadovaných koncentracích. Měření probíhalo 3. den po aplikaci chloridu sodného.



Obr. 3: Závislost relativní transmittance na době působení modrého světla (0 až 20 min – silné světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 až 40 min – slabé světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u kontrolních rostlin lilku rajčete a rostlin pod vlivem salinitního stresu. Uvedeny průměry a směrodatné odchytky ($n = 3$). + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM v příslušné době působení modrého světla. Měřeno 3. 12. 2018.

Tab. 4: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu v relativních jednotkách SPAD a hodnoty parametru F_V/F_M . Uvedeny průměry a směrodatné odchytky ($n = 3$). + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM. Měřeno 3. 12. 2018.

	Relativní obsah chlorofylu [SPAD]	F_V/F_M
Kontrola	26±1	0,753±0,022
50 mM NaCl	27±3	0,692±0,062
100 mM NaCl	31±3 (+)	0,709±0,069

Z naměřených výsledků je zřejmé, že došlo k mírné inhibici pohybu chloroplastů v jeho rozsahu i rychlosti, a to u obou použitých koncentrací chloridu sodného (Obr. 3). Rostliny také pomaleji reagovaly na změnu intenzity světla, po přepnutí se stále projevoval únikový pohyb chloroplastů a k akumulárnímu pohybu téměř nedocházelo. Všeobecně však rostliny pěstované na médiu ve sterilních podmínkách nepříznivě reagovaly na otevření nádoby, ve které byly pěstovány. Při otevření a poklesu vzdušné vlhkosti rostliny i oddělené měřené listy rychle usychaly. Přestože byly listy během

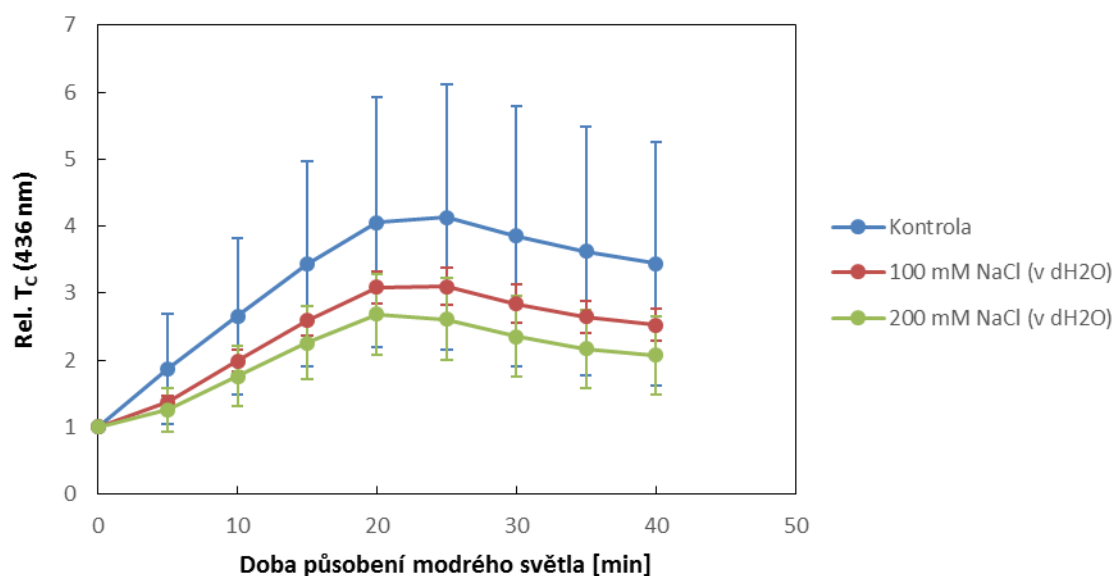
měření pravidelně vlhčeny, docházelo během něj k jejich zasychání, což s největší pravděpodobností vedlo k inhibici pohybu chloroplastů (Nauš *et al.*, 2016). Protože docházelo k zasychání jak rostlin kontrolních, tak rostlin stresovaných salinitou, je možné, že zasychání převládlo nad efektem salinity nebo jej doplňovalo.

Dále si u rostlin stresovaných salinitou můžeme všimnout nárůstu relativního obsahu chlorofylu (Tab. 4). Tento jev byl pozorován u listů salinitou stresovaných slunečnic ročních (*Helianthus annuus* L.) (Heidari *et al.*, 2014). Příčina nárůstu obsahu chlorofylu však nebyla objasněna.

Parametr F_V/F_M s vyšší koncentrací chloridu sodného klesal, rozdíly však nebyly statisticky významné (Tab. 4). Salinitní stres primárně neovlivnil funkci PSII. Tento výsledek do jisté míry odpovídá výsledkům práce Nauše *et al.* (2016), kde byla u zasychajících listů zjištěna inhibice pohybu chloroplastů, i když funkce PSII byla nezměněna.

Z důvodu značného zasychání rostlin v průběhu měření byl dále upraven způsob jejich pěstování a přešlo se z pěstování ve sterilních podmínkách na médiu k pěstování v perlitu v podmínkách nesterilních. Také byla opět navýšena koncentrace chloridu sodného, a to na 100 mM a 200 mM. Aplikace salinity pak byla opět prováděna po třech týdnech od vysetí použitím zálivky roztoku chloridu sodného. Kontrolní rostliny byly zalévány Knopovým roztokem. Měření bylo prováděno 3. a 14. den po aplikaci zálivky za účelem ověření, zda k projevům účinku chloridu sodného nedochází až po delší době.

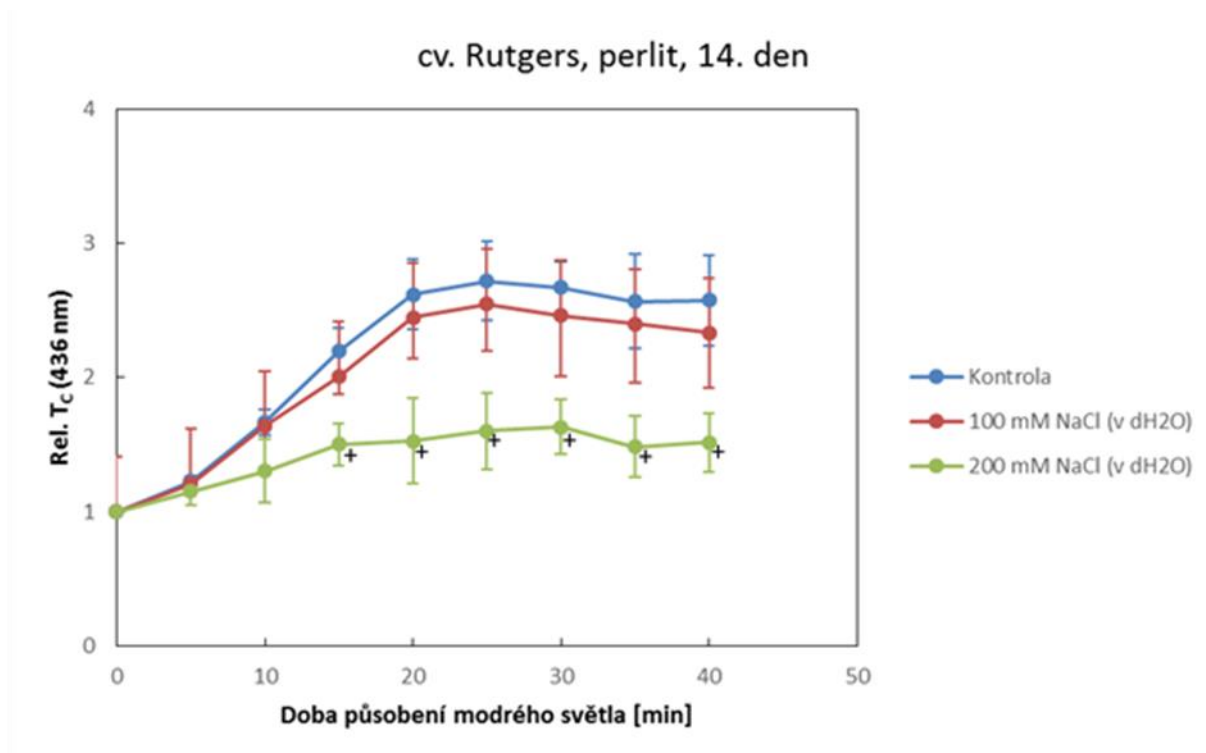
cv. Rutgers, perlit, 3. den



Obr. 4: Závislost relativní transmittance na době působení modrého světla (0 až 20 min – silné světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 až 40 min – slabé světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u kontrolních rostlin lilku rajčete a rostlin pod vlivem salinitního stresu. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Měřeno 17. 12. 2018.

Tab. 5: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu v relativních jednotkách SPAD a hodnoty parametru F_V/F_M . Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). * označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM, + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 200 mM. Měřeno 17. 12. 2018.

	Relativní obsah chlorofylu [SPAD]	F_V/F_M
Kontrola	31 ± 1	$0,773 \pm 0,010$
100 mM NaCl (v dH ₂ O)	33 ± 4 (*)	$0,796 \pm 0,017$
200 mM NaCl (v dH ₂ O)	35 ± 1 (+)	$0,781 \pm 0,016$



Obr. 5: Závislost relativní transmittance na době působení modrého světla (0 až 20 min – silné světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 až 40 min – slabé světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u kontrolních rostlin lilku rajčete a rostlin pod vlivem salinitního stresu. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM v příslušné době působení modrého světla. Měřeno 28. 12. 2018.

Tab. 6: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu v relativních jednotkách SPAD a hodnoty parametru F_V/F_M . Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). * označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM, + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 200 mM. Měřeno 28. 12. 2018.

	Relativní obsah chlorofylu [SPAD]	F_V/F_M
Kontrola	36±1	0,777±0,020
100 mM NaCl (v dH ₂ O)	41±2 (*)	0,778±0,005
200 mM NaCl (v dH ₂ O)	49±1 (+)	0,783±0,033

Z naměřených výsledků je zřejmé, že po 3 dnech od aplikace salinitního stresu došlo k inhibici pohybu chloroplastů v jeho rozsahu i rychlosti u obou použitých koncentrací chloridu sodného, nicméně rozdíly nebyly oproti kontrole statisticky významné (Obr. 4). Po 14 dnech došlo u koncentrace chloridu sodného 200 mM k téměř úplné inhibici pohybu chloroplastů, koncentrace 100 mM se však přiblížila kontrole (Obr. 5). Inhibice pohybu chloroplastů u koncentrace 200 mM mohla být

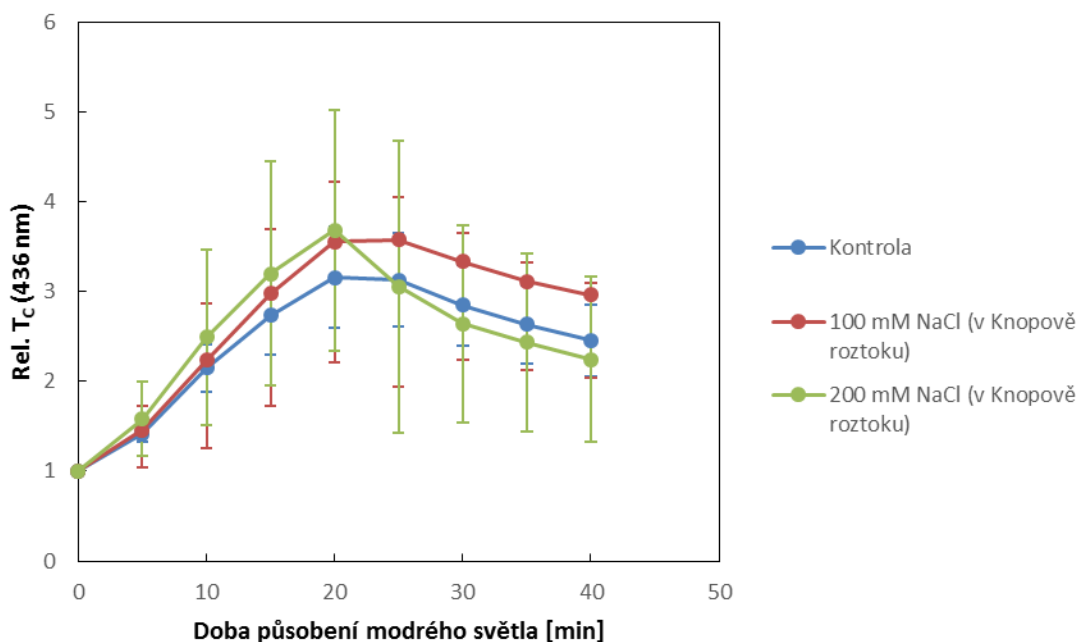
způsobena nedostatkem živin kvůli zalévání destilovanou vodou spolu s přítomností většího množství sodných kationtů a chloridových aniontů, a tedy větší nerovnováhou ve výživě rostlin. V případech, kdy k pohybu docházelo, byl únikový pohyb výraznější než pohyb akumulární.

Po 3 i 14 dnech došlo opět u obou koncentrací chloridu sodného k významnému nárůstu obsahu plošného chlorofylu, což odpovídalo vizuálnímu hodnocení rostlin, při kterém byly rostliny stresované salinitou zelenější (Tab. 5, Tab. 6).

Parametr F_V/F_M se oproti kontrole významně nelišil u ani jedné koncentrace chloridu sodného, jak po 3, tak po 14 dnech (Tab. 5, Tab. 6).

V dalším experimentu byl roztok chloridu sodného již připravován ne do destilované vody, nýbrž do Knopova roztoku, kterým byly zalévány kontrolní rostliny.

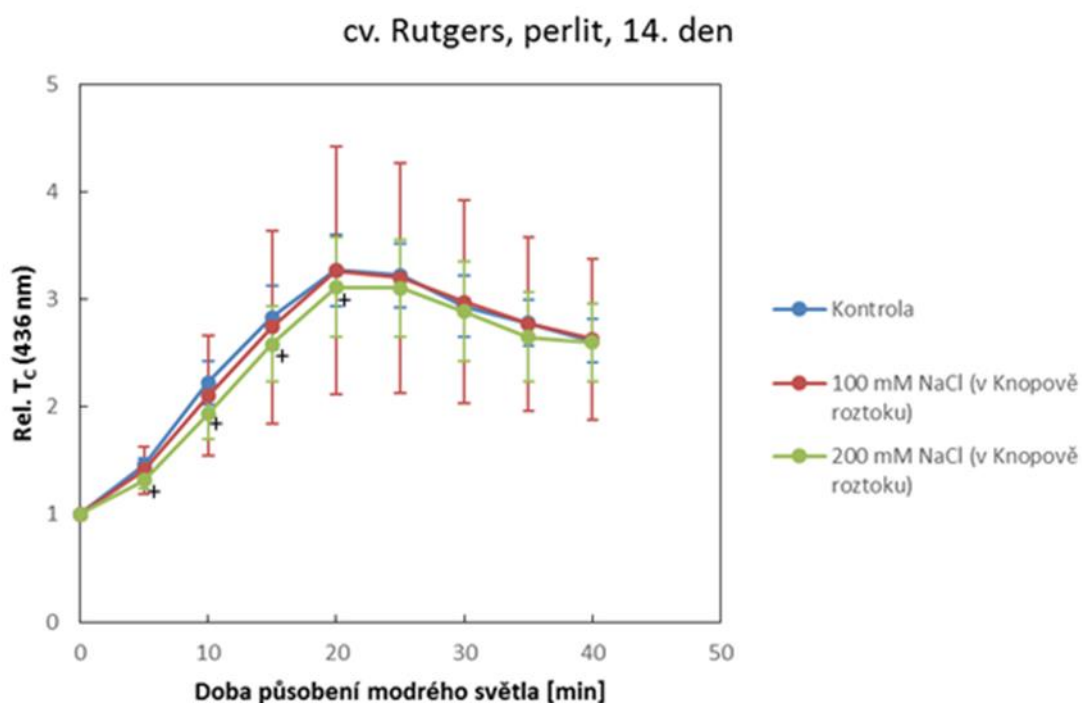
cv. Rutgers, perlit, 3. den



Obr. 6: Závislost relativní transmittance na době působení modrého světla (0 až 20 min – silné světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 až 40 min – slabé světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u kontrolních rostlin lilku rajčete a rostlin pod vlivem salinitního stresu. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Měřeno 21. 1. 2019.

Tab. 7: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu v relativních jednotkách SPAD a hodnoty parametru F_v/F_m . Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). * označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM, + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 200 mM. Měřeno 21. 1. 2019.

	Relativní obsah chlorofylu [SPAD]	F_v/F_m
Kontrola	27±4	0,782±0,010
100 mM NaCl (v Knopově roztoku)	33±3 (*)	0,792±0,007
200 mM NaCl (v Knopově roztoku)	31±3 (+)	0,789±0,023



Obr. 7: Závislost relativní transmittance na době působení modrého světla (0 až 20 min – silné světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 až 40 min – slabé světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u kontrolních rostlin lilku rajčete a rostlin pod vlivem salinitního stresu. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Měřeno 1. 2. 2019.

Tab. 8: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu v relativních jednotkách SPAD a hodnoty parametru F_V/F_M . Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). * označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM, + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 200 mM. Měřeno 1. 2. 2019.

	Relativní obsah chlorofylu [SPAD]	F_V/F_M
Kontrola	32±1	0,784±0,018
100 mM NaCl (v Knopově roztoku)	35±2 (*)	0,785±0,021
200 mM NaCl (v Knopově roztoku)	40±1 (+)	0,777±0,023

Výsledky z tohoto měření ukazují, že po 3 dnech od aplikace salinity byly naměřené hodnoty pro kontrolní rostliny horší než pro rostliny stresované (Obr. 6). Pohyb chloroplastů byl však stále srovnatelný, a to v rozsahu i rychlosti pohybu. Po 14 dnech od aplikace stresu byly výsledky pro všechny varianty srovnatelné (Obr. 7).

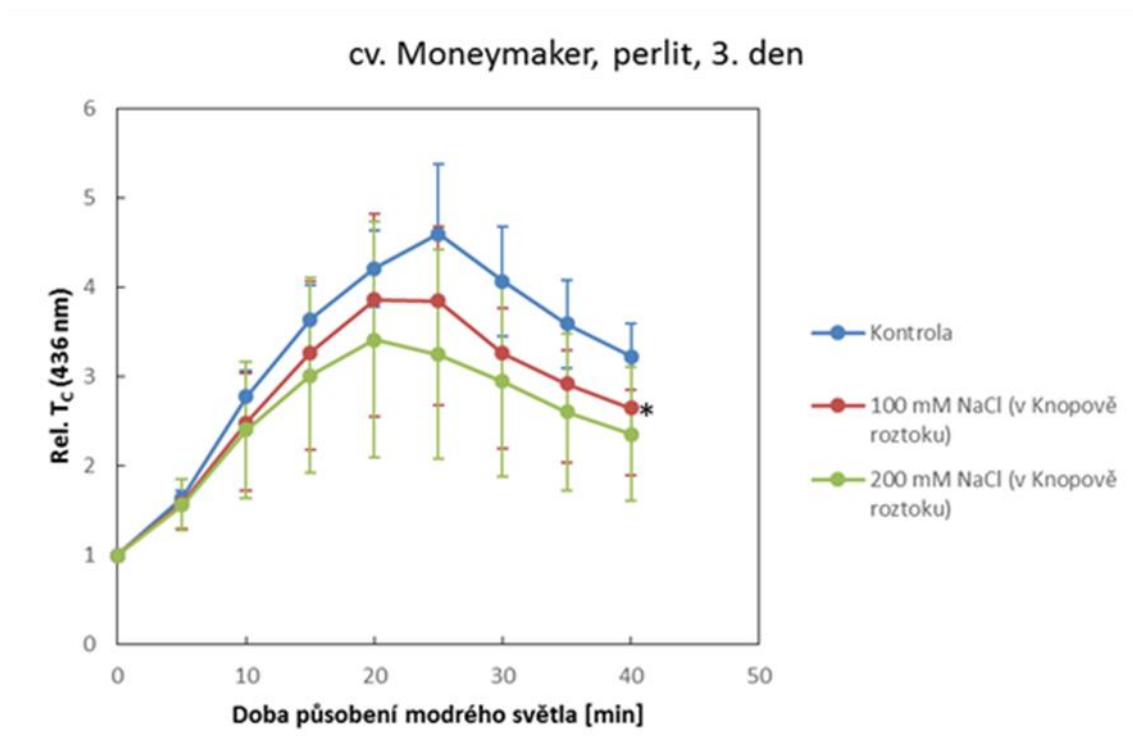
V rychlosti a rozsahu pohybu chloroplastů nedošlo u stresovaných rostlin oproti rostlinám kontrolním k téměř žádným změnám.

U obou koncentrací chloridu sodného došlo opět k významnému nárůstu obsahu plošného chlorofylu po 3 i 14 dnech (Tab. 7, Tab. 8).

Parametr F_V/F_M se oproti kontrole významně nelišil u ani jedné koncentrace chloridu sodného, jak po 3, tak po 14 dnech (Tab. 7., Tab. 8).

Vzhledem k zhoršenému pohybu chloroplastů lze však předpokládat, že stav kontrolních rostlin byl z nezjištěného důvodu zhoršený.

K poslednímu experimentu byl kvůli zhoršené kontrole v předchozím měření použit kultivar Moneymaker.

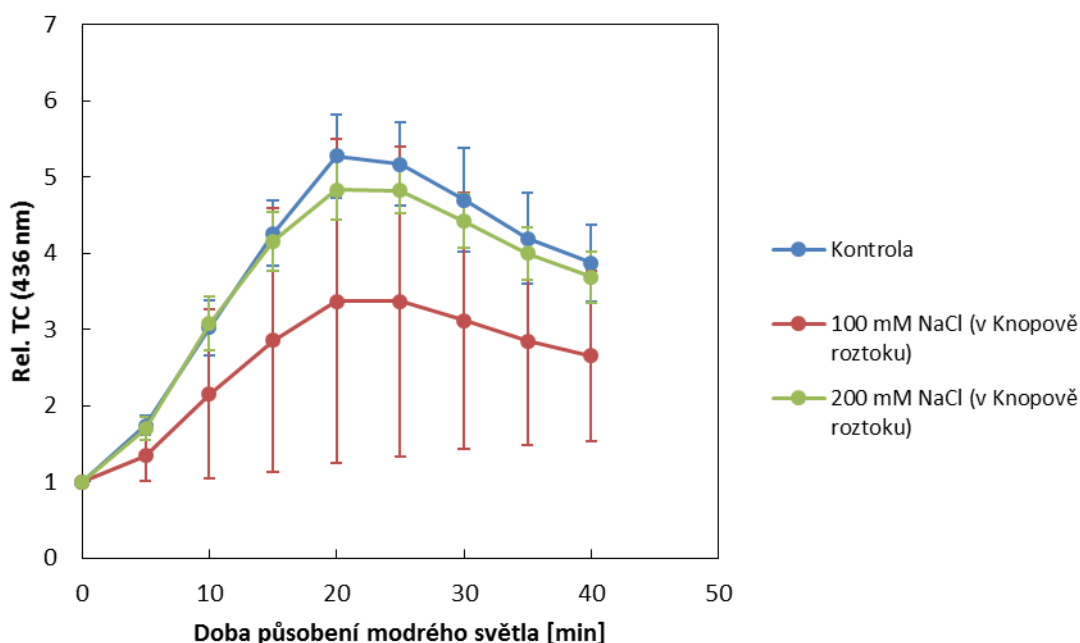


Obr. 8: Závislost relativní transmittance na době působení modrého světla (0 až 20 min – silné světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 až 40 min – slabé světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u kontrolních rostlin lilku rajčete a rostlin pod vlivem salinitního stresu. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). * označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM v příslušné době působení modrého světla. Měřeno 21. 2. 2019.

Tab. 9: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu v relativních jednotkách SPAD a hodnoty parametru F_v/F_m . Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). * označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM, + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 200 mM. Měřeno 21. 2. 2019.

	Relativní obsah chlorofylu [SPAD]	F_v/F_m
Kontrola	33 ± 2	$0,785 \pm 0,022$
100 mM NaCl (v Knopově roztoku)	35 ± 1 (*)	$0,762 \pm 0,021$
200 mM NaCl (v Knopově roztoku)	38 ± 3 (+)	$0,772 \pm 0,013$

cv. Moneymaker, perlit, 15. den



Obr. 9: Závislost relativní transmittance na době působení modrého světla (0 až 20 min – silné světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 20 až 40 min – slabé světlo, $2 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) u kontrolních rostlin lilku rajčete a rostlin pod vlivem salinitního stresu. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Měřeno 5. 3. 2019.

Tab. 10: Hodnoty relativního obsahu chlorofylu v relativních jednotkách SPAD a hodnoty parametru F_v/F_m . Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). * označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 100 mM, + označuje statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi kontrolou a koncentrací NaCl 200 mM. Měřeno 5. 3. 2019.

	Relativní obsah chlorofylu [SPAD]	F_v/F_m
Kontrola	31±2	0,790±0,011
100 mM NaCl (v Knopově roztoku)	36±3 (*)	0,785±0,029
200 mM NaCl (v Knopově roztoku)	44±3 (+)	0,800±0,004

Z výsledků je patrné, že 3 dny od aplikace stresu došlo k mírné inhibici pohybu chloroplastů v jejich rozsahu u obou použitých koncentrací chloridu sodného (Obr. 8). Rychlost pohybu chloroplastů byla srovnatelná s rychlostí u kontrolních rostlin. Pouze rozdíl v době působení modrého světla 40 min byl u koncentrace chloridu sodného

oproti kontrole statisticky významný. Rychlosti i rozsahy akumulčního pohybu byly oproti předchozím měřením větší, a to u všech měřených variant rostlin.

Po 15 dnech se inhibice pohybu chloroplastů v jeho rozsahu i rychlosti projevila u koncentrace chloridu sodného 100 mM, koncentrace chloridu sodného 200 mM však byla v tomto případě srovnatelná s kontrolou (Obr. 9). Rychlosti i rozsahy akumulčního pohybu byly u všech měřených variant rostlin oproti předchozím měřením opět větší.

Opět byl pozorován také nárůst obsahu chlorofylu po 3 i po 15 dnech (Tab. 9, Tab. 10).

Parametr F_v/F_M byl u rostlin zalévaných roztokem chloridu sodného o koncentraci 100 mM oproti kontrolním rostlinám a rostlinám zalévaných roztokem chloridu sodného o koncentraci 200 mM nižší (Tab. 9, Tab. 10). Tento rozdíl nebyl statisticky významný, lze však předpokládat, že stav těchto rostlin byl z nezjištěného důvodu zhoršený.

Je nutno zmínit, že výsledky dosažené v rámci bakalářské práce jsou spíše předběžného charakteru a ve výzkumu vlivu salinitního stresu na pohyb chloroplastů bude nutné dále pokračovat.

V budoucnu by bylo dobré provést srovnání pohybu chloroplastů u kontrolních rostlin zalévaných destilovanou vodou a kontrolních rostlin zalévaných Knopovým roztokem, aby se ověřilo, zda složení Knopova roztoku neovlivňuje pohyb chloroplastů oproti destilované vodě a nepřevládá tak nad efektem salinity. Také by se opět dala navýšit koncentrace chloridu sodného a prodloužit nebo naopak zkrátit doba jeho působení.

Zvýšení obsahu plošného chlorofylu a tím zelenější listy rostlin v důsledku salinitního stresu dále naznačují, že mohlo dojít ke strukturním změnám chloroplastů. Tyto změny však nejsou doposud známy a bylo by potřeba dalšího zkoumání na molekulární úrovni.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jaký vliv může mít salinitní stres na pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem v rostlinách lilku rajčete (*Solanum Lycopersicum* L.). K experimentům byly použity dva kultivary, konkrétně kultivar Rutgers a kultivar Moneymaker. Pohyb chloroplastů byl určován pomocí měření změn v kolimované transmitanci neboli optické propustnosti listů. K vyvolání pohybu chloroplastů na předem zatemněných rostlinách bylo použito modré světlo, jehož vysoká intenzita vyvolává únikový pohyb chloroplastů a transmitance roste, zatímco při osvětlení modrým světlem o nízké intenzitě nastává akumulární pohyb chloroplastů a transmitance klesá.

Výsledky dosažené v rámci bakalářské práce se od sebe v jednotlivých případech značně lišily. V několika případech došlo k částečné inhibici pohybu chloroplastů. Signifikantní rozdíl byl pozorován u kultivaru Rutgers, který byl pěstován na médiu, po 3 dnech působení salinitního stresu o koncentraci chloridu sodného 100 mM (Obr. 3), dále u kultivaru Rutgers pěstovaném na perlitu po 14 dnech působení salinitního stresu o koncentraci chloridu sodného 200 mM připraveného v destilované vodě (Obr. 5) a v poslední řadě u kultivaru Moneymaker pěstovaném na perlitu po 3 dnech působení salinitního stresu o koncentraci chloridu sodného 100 mM připraveného v Knopově roztoku (Obr. 8).

Ve většině získaných výsledků však nebyly změny pohybu chloroplastů u rostlin stresovaných salinitou oproti rostlinám kontrolním statisticky významné.

Inhibice pohybu chloroplastů by mohla souviset se strukturními změnami chloroplastů. Tyto změny mohou způsobit nižší rychlost a rozsah jejich pohybu v buňkách listů.

Je nutné připomenout, že výzkum vlivu stresových faktorů na fotorelokační pohyb chloroplastů je stále ještě v začátcích. Bylo by dobré v tomto směru výzkumu pokračovat, protože změna v pohybu chloroplastů a jejich nesprávné fungování by mohly znamenat zhoršené přizpůsobování se nepříznivým podmínkám prostředí.

Pochopení tohoto procesu na molekulární úrovni by mohlo vést k vyvinutí rostlin s vylepšenými vlastnostmi využitelných v zemědělství.

6 LITERATURA

Aihara Y., Tabata R., Suzuki T., Shimazaki K., Nagatani A. (2008): Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *The Plant Journal* 56, 364-375.

Banerjee R., Batschauer A. (2005): Plant blue-light receptors. *Planta* 220, 498-502.

Briggs W. R., Christie J. M. (2002): Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 7, 204-210.

Brugnoli E., Björkman O. (1992): Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to Δ pH and zeaxanthin formation. *Photosynthesis Research* 32, 23-35.

Fellner M., Sawhney V. K. (2001): Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics* 102, 215-221.

Frolec J., Řebíček J., Lazár D., Nauš J. (2010): Impact of two different types of heat stress on chloroplast movement and fluorescence signal of tobacco leaves. *Plant Cell Reports* 29, 705-714.

Gabryš H. (2004): Blue light-induced orientation movements of chloroplasts in higher plants: Recent progress in the study of their mechanisms. *Acta Physiologiae Plantarum* 26, 476-478.

Haupt W., Scheuerlein R. (1990): Chloroplast movement. *Plant, Cell and Environment* 13, 595-614.

Heidari A., Bandehagh A., Toorchi M. (2014): Effects of NaCl Stress on Chlorophyll Content and Chlorophyll Fluorescence in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Lines. *YYU J AGR SCI* 24, 111-120.

Christie J. M. (2007): Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* 58, 21-45.

Isayenkov, S. V. (2012): Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytology and Genetics* 46, 302-318.

Ismail A. M., Heuer S., Thomson M. J., Wissuwa M. (2007): Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. *Plant Molecular Biology* 65, 547-570.

Kadota A., Yamada N., Suetsugu N., Hirose M., Saito C., Shoda K., Ichikawa S., Kagawa T., Nakano A., Wada M. (2009): Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13106-13111.

Kagawa T., Wada M. (2000): Blue light-induced chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant and Cell Physiology* 41, 84-93.

Kagawa T., Wada M. (2002): Blue light-induced chloroplast relocation. *Plant and Cell Physiology* 43, 367-371.

Kong S. G., Arai Y., Suetsugu N., Yanagida T., Wada M. (2013): Rapid severing and motility of chloroplast-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 572-590.

Kong S. G., Suetsugu N., Kikuchi S., Nakai M., Nagatani A., Wada M. (2012): Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant and Cell Physiology* 54, 80-92.

Kong S. G., Suzuki T., Tamura K., Mochizuki N., Hara-Nishimura I., Nagatani A. (2006): Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *The Plant Journal* 45, 994-1005.

Kong S. G., Wada M. (2011): New insights into dynamic actin-based chloroplast photorelocation movement. *Molecular Plant* 4, 771–781.

Kong S. G., Wada M. (2014): Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837, 522-530.

Maathius F. J. M. (2013): Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany* 65, 849-858.

Maischak H., Zimmermann M. R., Felle H. H., Boland W., Mithöfer A. (2010): Alamethicin-induced electrical long distance signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 5, 988-990.

Mathews, S. (2006): Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Molecular Ecology* 15, 3483-3503.

Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2007): Cell-type-specific disruption and recovery of the cytoskeleton in *Arabidopsis thaliana* epidermal root cells upon heat shock stress. *Protoplasma* 230, 231-242.

Munns R., Passioura J. B. (1984): Hydraulic Resistance of Plants. III. Effects of NaCl in Barley and Lupin. *Australian Journal of Plant Physiology* 11, 351-359.

Munns R., Termaat A. (1986): Whole-Plant Responses to Salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13, 143-160.

Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.

Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

Nauš J., Šmecko S., Špundová M. (2016): Chloroplast avoidance movement as a sensitive indicator of relative water content during leaf desiccation in the dark. *Photosynthesis Research* 129, 217-225.

Rajendran K., Tester M., Roy S. J. (2009): Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell and Environment* 32, 237-249.

Roy S. J., Negrao S., Tester M. (2014): Salt resistant crop plants. *Current opinion in Biotechnology* 26, 115-124.

Řebíček J. (2009): Studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem globálního abiotického a biotického stresu. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.

Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T. E., Christie J. M., Briggs W. R., Wada M., 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., Briggs W. R. (2002): Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *The Plant Cell* 14, 1723-1735.

Savara O. (2018): Světlem indukovaný pohyb chloroplastů u fotomorfogenních mutantů rajčete. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.

Śniegowska-Świerk K., Dubas E., Rapacz M. (2015): Drought-induced changes in the actin cytoskeleton of barely (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum* 37, 1-13.

Suetsugu N., Higa T., Gotoh E., Wada M. (2016): Light-Induced Movements of Chloroplasts and Nuclei Are Regulated in Both Cp-Actin-Filament-Dependent and -Independent Manners in Arabidopsis thaliana. *PLOS ONE* 11, 1-17.

Wada M. (2016): Chloroplast and nuclear photorelocation movements. *Proceedings of the Japan Academy* 92, 387-411.