**Praktikum experimentálních metod fyziologie rostlin (KBF/PEMFR)**

**Měření pohybu chloroplastů**

**A. ZADÁNÍ**

1. Seznamte se s měřicími přístroji a návody k nim: „home-made“ aparatura na měření kolimované transmitance listu, integrální radiometr LI-250A (firma LI-COR), spektrální radiometr SpectraPen (firma PSI), chlorofylmetr SPAD (Konica Minolta), zdroj studeného světla KL-2500.
2. Seznamte se s principem měření pohybu chloroplastů pomocí kolimované transmitance a nastavte vhodné parametry.
3. Na listech vybraného rostlinného druhu změřte únikový pohyb chloroplastů vyvolaný „silným“ modrým světlem a akumulační pohyb vyvolaný „slabým“ modrým světlem. Ověřte, že červené světlo o stejné intenzitě pohyb nevyvolává.
4. Vystavte list stresu vysokou teplotou (inkubace listu ve vodní lázni o teplotě 40 oC) a ověřte, že tento stres omezí pohyb chloroplastů.
5. Posuďte vliv pozice chloroplastů na hodnotu „relativního obsahu chlorofylu“ měřenou chlorofylmetrem SPAD.

**B. SEZNAM POMŮCEK**

Aparatura na měření kolimované transmitance listu, integrální radiometr LI-250A (firma LI-COR), spektrální radiometr SpectraPen (firma PSI), chlorofylmetr SPAD (Konica Minolta), zdroj studeného světla KL-2500, červený a modrý filtr, vodní lázeň, teploměr, lihový fix, buničina, stopky, LED panel, modrá fólie

Materiál: rostliny tabáku, Arabidopsis nebo ječmene.

**C. TEORIE**

Aktivní pohyb chloroplastů v buňkách mezofylu slouží listu k poměrně rychlé (desítky minut) optimalizaci využití dopadajícího světla pro fotosyntézu nebo k ochraně před příliš silným světlem. Pohyb je indukovaný světlem a jeho charakter závisí na spektru (vlnové délce), intenzitě a geometrickém charakteru (směru) světla. Rozlišujeme dva základní typy pohybu chloroplastů – tzv. akumulační pohyb (vyvolaný slabým světlem) a únikový pohyb („avodidance“) na silném světle.

**Závislost na spektru dopadajícího světla**

U většiny vyšších rostlin je světlem-indukovaný pohyb chloroplastů vyvolaný pouze modrým světlem, na červené světlo nereaguje. U některých jednodušších typů rostlin, např. zelené řasy *Mougeotia scalaris,* mechu *Physcomitrella patens* (čepenka odstálá)*,* kapradiny *Adiantum capillus-veneris* (netík Venušin vlas) a dalších druhů kapradin je pohyb chloroplastů vyvolán jak modrým, tak i červeným světlem (Kagawa a Wada 2002).

**Fotoreceptory**

Viditelné světlo v rostlinách pohlcují nejen fotosyntetické pigmenty v chloroplastech (chlorofyly a karotenoidy), ale i antokyany (ochranné pigmenty) a rostlinné fotoreceptory. Mezi základní fotoreceptory rostlin patří fytochromy (absorbují zejména v červené oblasti spektra), kryptochromy a fototropiny (obojí absorbují v modré oblasti). Rostlinné fotoreceptory můžeme charakterizovat jako chromoproteiny, tedy proteiny s navázanou skupinou zodpovědnou za absorpci světla.

Pohyby chloroplastů jsou u vyšších rostlin indukovány modrým světlem prostřednictvím fototropinů. Kromě pohybu chloroplastů fototropiny regulují i jiné procesy řízené modrým světlem, např. otevírání průduchů a fototropismus. Byly identifikovány dva druhy fototropinů (PHOT1 a PHOT2). Za absorpci modrého světla v molekulách fototropinů zodpovídají tzv. LOV domény (**L**ight, **O**xygen nad **V**oltage) s absorpčním centrem typu FMN (flavin-mononukleotid). Ve fototropinu je také kinázová doména, která souvisí s přenosem (transdukcí) signálu a katalyzuje fosforylaci aminokyselin serinu a threoninu (Ser/Thr protein kináza).

PHOT1 je aktivován převážně slabým modrým světlem, PHOT2 naopak silným modrým světlem. Na řízení akumulačního pohybu chloroplastů se podílejí oba fototropiny, únikový pohyb na silném světle řídí jen PHOT2. Oba fototropiny jsou umístěny převážně v plazmatické membráně. PHOT2 je umístěn také na vnější membráně chloroplastů.

U většiny vyšších rostlin je za pohyb chloroplastů v buňce zodpovědný dynamický aktinový cytoskelet. U nižších rostlin je prokázána i účast tubulinu. Chloroplasty se buď pohybují podél aktinových vláken, nebo jsou jimi taženy. Tvorba fibrilárního aktinu (F – aktinu) je ovlivněna směrem dopadajícího světla. V signální cestě hrají roli ionty vápníku (Ca2+) a pravděpodobně fosfoinositolová cesta.

**Závislost na ozářenosti**

Při vysoké intenzitě dopadajícího světla se chloroplasty shlukují a rozmisťují tak, aby jich bylo co nejméně vystaveno přímému světlu, většinou ke stěnám buněk rovnoběžným s dopadajícím zářením. Tento pohyb je označován jako únikový (avoidance response) nebo jako HFR reakce (**H**igh – **F**luence – **R**ate;reakce na světlo o vysoké intenzitě) (Kagawa a Wada 2002). Výsledná pozice chloroplastů na silném světle se označuje jako parastrofe, příp. jako boční pozice („side position“). Podle převládajícího názoru se tímto způsobem chloroplasty vyhýbají poškození fotosyntetického aparátu (např. Haupt a Scheurlein 1990).

Při nízké ozářenosti se chloroplasty pohybují směrem k dopadajícímu světlu, shromažďují se u nejvíce ozářených buněčných stěn (v tzv. čelní pozici). Tento pohyb se nazývá akumulační (accumulation response), příp. jako LFR reakce (**L**ow – **F**luence – **R**ate; reakce na světlo o nízké intenzitě). Dochází k největší světelné absorpci v čelní vrstvě chloroplastů a tím k možnosti dosáhnout maximální rychlosti fotosyntézy (Gabrys 2004). Může nastat buď diastrofické (chloroplasty se přemístí k oběma stěnám buňky, které jsou kolmé ke směru dopadající světla) nebo epistrofické uspořádání chloroplastů (chloroplasty jsou na předních stěnách buněk kolmých ke směru dopadajícího světla) (Obr. 1).

Ve tmě se chloroplasty shromažďují prioritně u stěn, které jsou společné sousedním mezofylovým buňkám (apostrofe). Poměr počtu chloroplastů rozmístěných podél kolmých a rovnoběžných stěn závisí na světelných podmínkách, ve kterých rostlina vyrůstala. Ve tmě jsou chloroplasty v buňkách rostlin rostoucích za slabého světla v čelní pozici (diastrofe), zatímco u rostlin rostoucích za silného světla zůstává většina chloroplastů v pozici parastrofe.

*****Obr. 1. Uspořádání chloroplastů v buňkách v reakci na různé ozářenosti.*

*1 - parastrofe, 2 - diastrofe, 3 - epistrofe, 4 - apostrofe. Počet šipek znázorňuje relativní ozářenost (viz Řebíček 2009)*

**Souvislost změny konfigurace chloroplastů v buňkách a spektra propustnosti listu**

Pochopit tuto souvislost nám může pomoci Obr. 2. V horní části obrázku je model dvou extrémních uspořádání chloroplastů (vlevo čelní pozice a vpravo boční pozice) a jim odpovídající spektra propustnosti (dolní část obrázku). Světlo dopadá kolmo na plochu listu a propustnost se měří také v tomto směru (tzv. kolimovaná propustnost). Z obrázku je zřejmé, že oproti čelní pozici, v boční pozici chloroplastů prochází část paprsků mimo chloroplasty. To zvyšuje pozadí spektra a celkovou propustnost ve viditelné oblasti. V modré oblasti spektra jsou relativní změny propustnosti největší. V praxi postupný nárůst propustnosti u např. 436 nm znamená postupný přesun chloroplastů z čelní pozice do pozice boční.



 *Obr. 2. Souvislost uspořádání chloroplastů v buňkách a spektra propustnosti.*

**Metoda kolimované transmitance**

Při měření difúzní transmitance je při kolmém dopadu kolimovaného záření shora na list detekováno veškeré záření procházející listem do poloprostoru pod listem. K měření se používá tzv. integrační koule (např. LI-1800-12). Vnitřek kulové dutiny je pokryt dokonale difúzně odrážejícím bílým povrchem (Obr. 3 - vlevo).



* *Obr. 3. Porovnání principů difúzní a kolimované transmitance.*

Při měření kolimované transmitance se nepoužívá integrační koule a detekuje se (např. pomocí spektrálního radiometru) jen část záření procházejícího listem ve směru kolmo dopadajícího kolimovaného záření (Obr. 3 - vpravo). Detekovány jsou tedy především paprsky procházející přímo nebo vycházející ve směru dopadajícího záření. Metoda kolimované transmitance je mnohem citlivější a operativnější než měření difúzní transmitance, snáze se manipuluje se vzorkem i dopadajícím světlem. Při použití metody kolimované transmitance je výsledek a charakter křivek závislý na geometrických parametrech uspořádání (zde: průměr osvětlovacího svazku D, průměr detekčního světlovodu d, vzdálenost světlovodu od listu z).

**Pohybové křivky**

Ukázka pohybové křivky, tj. závislosti kolimované transmitance (propustnosti) na čase při modrém osvitu listu, je na Obr. 4. Při působení silného modrého světla dochází k nárůstu kolimované propustnosti Tc zpočátku rychle a později dochází k saturaci pohybu (asi po 30 min). Po vypnutí silného světla dochází ke zpětnému pohybu chloroplastů. Zpětný pohyb lze urychlit osvitem slabým modrým světlem. Kolimovaná propustnost zase klesá, nyní poněkud pomaleji než při únikovém pohybu. Na křivkách lze vyhodnotit např. relativní změnu Tc, maximální směrnici křivky (S) apod.



*Obr. 4. Ukázka pohybové křivky v režimu kolimované transmitance Tc(436), list rostliny Arabidopsis. Modré světlo (380 µmol m-2 s-1 PAR) vyvolalo únikový pohyb chloroplastů (Tc narůstá), po přepnutí na nízkou intenzitu světla (5 µmol m-2 s-1 PAR) se chloroplasty akumulačním pohybem vracely zpět (Tc klesá).*

**Vliv stresu na pohyb chloroplastů**

Působení stresových faktorů (např. vysokých teplot nebo nedostatku vody) může negativně ovlivnit dynamiku a parametry pohybu chloroplastů. Na Obr. 5 je uveden příklad vlivu inkubace listu při vyšších teplotách na pohybovou křivku chloroplastů v listu tabáku.



*Obr. 5. Ukázka vlivu vysokoteplotního stresu (inkubace listu po dobu 5 minut při uvedené teplotě) na pohybovou křivku chloroplastů v listu tabáku (Frolec et al. 2010).*

**

*Obr. 6. Schéma aparatury na měření kolimované transmitance listu a pohybu chloroplastů.*

**D. POSTUP**

Na začátku praktika zatemněte několik rostlin vybraného rostlinného druhu (vložením do uzavřené skříňky v laboratoři).

I. Srovnání údaje chlorofylmetru SPAD při měření na listech s různou pozicí chloroplastů

1. V ploše listu zatemněné rostliny 10x změřte „relativní obsah chlorofylu“ chlorofylmetrem SPAD.
2. List (rostlinu) osvětlete „silným“ modrým světlem po dobu 20 min (LED panel + modrá fólie, přibližně 500 µmol m-2 s-1 PAR).
3. Zopakujte měření chlorofylmetrem SPAD v osvětlovaném listu (opět 10x).
4. Po dalších 20 min, kdy bude rostlina umístěna v laboratoři na slabém světle (příp. ve tmě) znovu chlorofylmetrem 10x změřte „relativní obsah chlorofylu“ na původním listu.

II. Měření změn kolimované transmitance při působení „silného“ a „slabého“ modrého světla pomocí „home-made“ aparatury (Obr. 6)

1. Zapněte zdroj bílého světla (Schott KL 2500), nastavte příslušné clonky a do optické osy aparatury vložte modrý filtr (BG12). Pomocí přepínačů na KL 2500 a s použitím integrálního radiometru LI-250A nastavte intenzitu modrého světla na přibližně 5 µmol m‑2 s-1 PAR („slabé“ modré světlo) v místě budoucího umístění listu a poznamenejte si polohu přepínačů na KL 2500. Poté stejným způsobem nastavte intenzitu modrého světla na 50 µmol m-2 s-1 PAR („silné“ modré světlo).
2. Umístěte spektrální radiometr SpectraPen LM-500 tak, aby vertikální poloha sklíčka čidla v optické ose osvětlení byla 20 - 30 mm pod předpokládanou pozicí listu (= pozice papírové masky) a v tomto umístění ho řádně zafixujte.
3. Vyřaďte modrý filtr a SpectraPenem změřte spektrum bílého světla nejvyšší intenzity (poloha přepínačů na KL 2500 – 6E). Jedná se o spektrum ozářenosti bílého světla I0 bílé(λ).
4. Zařaďte modrý filtr a SpectraPenem změřte spektrum modrého světla nejvyšší intenzity (6E). Jedná se o spektrum ozářenosti procházející modrým filtrem (I0 modré(λ)), kterou budete následně používat při měření spekter ozářenosti pod listem.
5. Zacloňte místo, kam budete umísťovat list. Ze zatemněné rostliny oddělte list, řapík zabalte do navlhčené buničiny a list vložte adaxiální stranou nahoru do papírové masky v měřicí aparatuře.
6. Odcloňte list a změřte spektrum modrého světla (poloha přepínačů na KL 2500 stále 6E) procházející listem. Jedná se o spektrum ozářenosti procházející modrým filtrem a následně listem při výchozí pozici chloroplastů - Imodré(λ)t=0min. Ihned po změření spektra snižte intenzitu modrého světla na 50 µmol m-2 s-1 PAR a spusťte stopky.
7. Osvětlujte list modrým světlem 50 µmol m-2 s-1 PAR po dobu cca 20 minut.
8. Každé 3 minuty změřte spektrum modrého světla procházející listem (Imodré(λ)t=3min, Imodré(λ)t=6min,….). Pozor! – při měření spekter vždy přepnout světlo na 6E! a zase zpět.
9. Po 7. změření spektra procházejícího listem (Imodré(λ)t=21min) snižte intenzitu modrého světla na přibližně 5 µmol m-2 s-1 („slabé“ modré světlo – vyvolání akumulačního pohybu chloroplastů) a třikrát změřte spektrum (Imodré(λ)t=24min, Imodré(λ)t=27min), Imodré(λ)t=30min) stejným způsobem jako v předchozím bodě.

III. Měření změn kolimované transmitance při působení „silného“ modrého světla na listu stresovaném vysokou teplotou

1. Inkubujte další list ve vodní lázni o teplotě 40 °C po dobu 5 min.
2. Zopakujte postup uvedený v bodech II. 3 – II. 8

IV. Měření změn kolimované transmitance při působení „silného“ červeného světla

1. Zopakujte měření změn kolimované transmitance při působení „silného“ světla s červeným filtrem místo filtru modrého (bod II. 5 – II. 8).
2. Ozářenost červeného světla nastavte na stejnou hodnotu jako v případě „silného“ modrého světla (tj. přibližně na 50 µmol m-2 s-1 PAR; poloha přepínačů na KL 2500 bude jiná!)

Ve spolupráci s vedoucím praktika stáhněte data ze spektrálního radiometru SpectraPen.

V. Zpracování dat z měření I - IV

1. Vypočítejte průměry a směrodatné odchylky hodnot SPAD získaných ve jednotlivých měřeních bodu I.
2. Srovnejte hodnoty SPAD naměřené na listu za různých světelných podmínek a interpretujte, co odrážejí zjištěné rozdíly.
3. Z dat naměřených v bodech II – IV vypočítejte a zobrazte:
	1. spektrum ozářenosti bílého světla (I0 bílé(λ))
	2. spektra propustnosti modrého a červeného filtru TBF(λ) a TRF(λ)
		* TBF(λ) = I0 modré(λ)/I0 bílé(λ)
		* TRF(λ) = I0 červené(λ)/I0 bílé(λ)
	3. spektra kolimované transmitance listu v rozsahu 400 – 500 nm. (Dílčí spektra ozářenosti procházející listem změřená během osvitu silným nebo slabým světlem se podělí příslušným spektrem ozářenosti dopadajícím na list):
* T(λ) = I modré(λ)/I0 modré(λ) během osvětlení „silným“ a „slabým“ modrým světlem
* T(λ) = I červené(λ)/I0 červené(λ) během osvětlení „silným“ červeným světlem
1. Do grafu vyneste hodnoty kolimované transmitance listu při 436 nm (T436nm) v závislosti na čase osvitu modrým (resp. červeným) světlem.
2. Diskutujte zjištěné změny kolimované transmitance listu v souvislosti s pohybem chloroplastů (vliv „silného“ a „slabého“ modrého světla, vliv „silného“ červeného světla, vliv vysoké teploty na pohyb chloroplastů vyvolaný „silným“ modrým světlem).

**E. LITERATURA**

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

Haupt W., Scheurlein R. (1990) Chloroplast movement. *Plant Cell Environ* 13, 595-614

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

Nauš J., Prokopová J., Řebíček J., Špundová M. (2010) SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynth Res* 105, 265-271

**Nauš J., Rolencová M., Hlaváčková V. (2008)** Is chloroplast movement in tobacco plants influenced systemically after local illumination or burning stress? J Integr Plant Biol 50, 1292-1299

Řebíček J. (2009) Studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem globálního abiotického a biotického stresu. Diplomová práce PřF UP, Olomouc.

Wada M. (2013) Chloroplast movement. *Plant Sci* 210, 177-182