

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 04 Biologie

2013/2014

## Měření křivek chlorofylové fluorescenční indukce v závislosti na fylogenetické příbuznosti rostlin

## Measurements of chlorophyll fluorescence induction curves in relation to the phylogenetic relationship of plants

**Autoři:** Miroslav Peřina  
Tereza Virglová

**Škola:** Gymnázium Jakuba Škody, Přerov,  
Komenského 29, 750 11

**Kraj:** Olomoucký

**Konzultant:** Mgr. Andrej Pavlovič, Ph.D.  
Přírodovědecká fakulta,  
Centrum regionu Haná, Oddělení biofyziky  
Univerzita Palackého, Olomouc

**Přerov 2014**



## **Prohlášení**

*Prohlašujeme, že jsme svou práci SOČ vypracovali samostatně a použili jsme pouze podklady uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.*

*Prohlašujeme, že tištěná verze a elektronická verze práce SOČ jsou shodné.*

*Nemáme závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorských a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.*

*V Přerově dne 2. 5. 2014*

*podpisy:*

## **Poděkování**

*Zde bychom rádi poděkovali především panu Mgr. Andreji Pavlovičovi, Ph.D., který naši práci vedl a po celou dobu nám byl nápomocen. Děkujeme mu za jeho čas, ochotu a za nekonečnou trpělivost při zodpovídání našich otázek. Díky jeho nápadům, které nás navedly na správnou cestu, byla naše práce jednodušší a rychlejší.*

*Poděkování patří také panu Mgr. Marku Kűchlerovi, který bezchybně zvládl veškerou organizaci, a co se SOČ týče, zodpověděl nám všechny dotazy ohledně formální úpravy práce.*

*Dále děkujeme PŘF Univerzity Palackého Olomouc a CR Haná za poskytnutí potřebných prostor a vybavení.*

*Nedílnou součástí je poděkování Výstavišti Flora Olomouc, za zpřístupnění sbírkových skleníků a souhlas s odběrem rostlinných vzorků v jeho areálu.*

## ANOTACE

Tato práce se zabývá měřením křivek chlorofylové fluorescenční indukce. Cílem práce bylo pomocí PEA-fluorometru a DUAL-PAM-100 spektrometru provést měření křivek různých rostlinných vzorků skrz celý fylogenetický systém. Následně byla provedena analýza a byla hledána souvislost mezi tvarem křivky, (popř. výskytem aditivních kroků) a postavením vzorku ve fylogenetickém systému.

Výsledkem práce je souhrn křivek fluorescenční indukce a přenosové kinetiky  $I_{820}$ , u nichž je v rámci každé vyšší fylogenetické skupiny zřetelně pozorovatelný posun. Nižší fylogenetické skupiny rostlin, konkrétně lišejníky, mechorosty, plavuně, kapradiny a nahosemenné se vyznačují přítomností specifické vlny, ohraničené aditivními kroky H a G. Klesající část této vlny dobře koreluje s křivkou přenosové kinetiky  $I_{820}$  a je spojena s rychlou reoxidací fotosystému I. U vyšších rostlin, tedy všech krytosemenných nebyla zmíněná vlna s aditivními kroky pozorována. Tento fakt souvisí i s tvarem křivky přenosové kinetiky  $I_{820}$  u krytosemenných rostlin, která nevykazuje žádnou reoxidační fázi. Tato fakta mohou vést k závěru, že kinetika přenosu elektronů v blízkosti fotosystému I se u různých fylogenetických skupin liší.

Všechna měření probíhala v prostorách skleníků Výstaviště Flora Olomouc a v CR Haná, Oddělení biofyziky.

Klíčová slova: chlorofylová fluorescenční indukce; přenosová kinetika v 820 nm; fylogenetický systém; OJIP přechod; H a G krok; K krok

## ANNOTATION

This paper deals with the measurement of chlorophyll fluorescence induction curves. The aim of the study was to measure the curves in different plant samples through the entire phylogenetic system with PEA-fluorometer and DUAL-PAM-100 spectrometer. Subsequently, an analysis was done and a correlation between the shape of the curve (or the occurrence of additive steps) and the position of the sample in the phylogenetic system was investigated.

The result is a summary of the fluorescence induction curves and  $I_{820}$  transmittance kinetics curves. There is a clearly observable shift within each higher phylogenetic group. Lower phylogenetic groups of plants, particularly lichens, bryophytes, lycopodiophytes, ferns and gymnosperms are characterized by the presence of specific dip bounded by additive steps H and G. The decreasing part of the wave correlates well with the transmittance kinetics curve and is associated with rapid reoxidation of photosystem I. In the case of higher plants, the pronounced dip mentioned above was not observed. This fact is related to the shape of the transmittance kinetics  $I_{820}$  which in angiosperms, where no fast reoxidation part was observed. These facts may lead to a conclusion that the kinetic of electron transport through photosystem I differs among different phylogenetic groups.

All measurements were made in the premises of greenhouses Flora Olomouc Exhibition centre and CR Haná, Department of Biophysics.

Keywords: chlorophyll fluorescence induction; transmittance kinetics at 820 nm; phylogenetic system; OJIP transient; H and G step; K step

## OBSAH

Úvod .....	6
<b>I. Teoretická část</b> .....	7
1. Chlorofylová fluorescence, základy .....	7
2. Typy chlorofylové fluorescence .....	9
3. Chlorofylová fluorescenční indukce.....	10
3.1 Polyfázové zvýšení fluorescence <i>chlorofylu a</i> (FLR): O-J-I-P přechody .....	10
3.2 Instrumentální systémy.....	10
4. Jednotlivé části (kroky) .....	12
5. Vysvětlení podstaty jednotlivých kroků .....	13
5.1 Fotochemická fáze.....	13
5.1.1 Akumulace redukováných $Q_A$ , zatímco $Q_B$ jsou redukovány.....	13
5.1.2 Donorová (dárcovská) strana PSII.....	13
5.1.3 Elektrické napětí mezi tylakoidními membránami.....	13
5.1.4 Vliv ostatních procesů .....	14
5.2 Termální fáze.....	15
5.2.1 Akumulace redukováných $Q_B$ vedle redukováných $Q_A$ .....	15
5.2.2 Donorová strana PSII.....	15
5.2.3 Útlum fluorescence oxidovaným poolem PQ.....	15
5.2.4 Komponent $Q_2$ , cytochrom $b_{559}$ .....	16
5.2.5 Další procesy vysvětlující termální fázi .....	16
5.2.6 Elektronové transportní reakce po PSII.....	17
5.2.7 Fluorescence vycházející z PSI .....	18
5.2.8 Elektrické napětí mezi tylakoidními membránami.....	18
5.2.9 Světelný gradient v rámci vzorku .....	19
5.3 Aditivní kroky v FLR .....	20
5.3.1 K krok .....	20
5.3.2 H a G krok .....	20
5.3.3 Důvody klesající fáze vlny v FI.....	21
5.3.4 Důvody vzrůstající fáze vlny v FI .....	22
6. Metodika.....	23
6.1 Rostlinný materiál .....	23
6.2 Příslušenství.....	24
6.3 Chemikálie.....	28
6.4 Seřazení podle fylogenetického systému.....	28
<b>II. Výsledky</b> .....	29
1. Křivky fluorescenční indukce v závislosti na fylogenetické příbuznosti vzorku.....	29
2. Simultánní měření křivek fluorescenční indukce a přenosové kinetiky $I_{820}$ .....	46
3. Simultánní měření křivek fluorescenční indukce a přenosové kinetiky $I_{820}$ u vzorků ošetřených DCMU .....	51
<b>Závěr a diskuze</b> .....	52
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	54
<b>Reference</b> .....	56

## Úvod

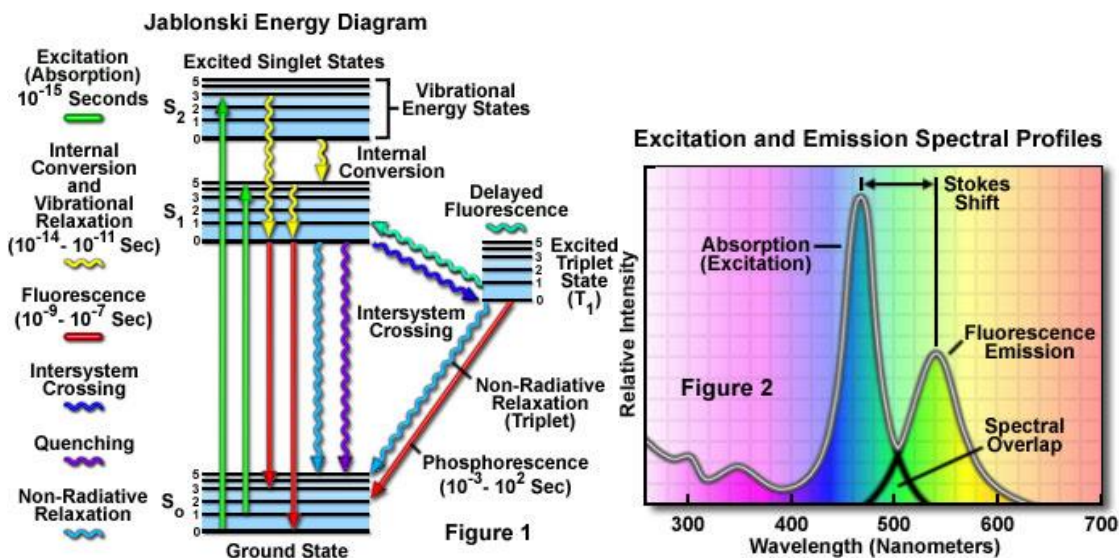
Fluorescence *chlorofylu a*, což je nejdůležitější fotosynteticky aktivní pigment, je vedle fotosyntézy a úbytku tepla třetím konkurenčním procesem jeho deexcitace. I přesto, že v listech zdravých rostlin je za optimálních podmínek pouze 3-5% energie emitováno fluorescencí, je tento proces jednou z nejlepších neinvazivních metod, která nám poskytuje podrobné informace o stavu fotosyntetického systému. Jednou z fluorescenčních metod je tzv. fluorescenční indukce (FI), tedy závislost fluorescence na čase během rychlého osvětlení vzorku, který byl předtím adaptovaný na tmu. Základy fluorescenční indukce položili již ve 30. letech Kautský a Hirsch.

Cílem této práce bylo měření křivek fluorescenční indukce na rozdílných rostlinných druzích, v rámci celého fylogenetického systému. Vedle měření křivek fluorescenční indukce byly také měřeny křivky přenosové kinetiky  $I_{820}$ , které zobrazují redoxní stav komponentů fotosystému I, především P700. Následně byly v laboratoři z křivek vyhodnocovány jejich standardní parametry a byla pak hledána závislost mezi systémovým zařazením vzorku a tvarem křivek fluorescenčních indukcí. Největší pozornost byla věnována tzv. dipu, neboli vlně, tvořené aditivními kroky H a G, na kterou upozornil Ilík et al. (2006) a byla hledána souvislost mezi výskytem této vlny a pozicí vzorku ve fylogenetickém systému. Při analýze křivek souběžného měření FI a  $I_{820}$  byl analyzován tvar křivky  $I_{820}$  v čase, případné vlny s H a G kroky v FI.

# I. Teoretická část

## 1. Chlorofylová fluorescence, základy

Určité molekuly (v našem případě chlorofyl) jsou schopné absorbovat světelnou energii, kterou emitují po určité časové prodlevě (trvání) jako energetické záření. Při pokojové teplotě molekuly setrvávají na základní energetické hladině nebo na nízkém energetickém singletovém (chem. vazba obsahující jen jeden elektron) stavu ( $S_0$ ) nebo na nejnižší vibrační hladině (Noomnarm a Clegg, 2009). Při absorpci fotonu se molekula excituje z  $S_0$  na první elektronicky excitovaný singletový stav  $S_1$  okolo  $10^{-15}$  s (obr. 1). Tyto molekuly mohou být také transferovány na vyšší energetické hladiny  $S_2$  až  $S_n$ . Excitované molekuly se poté deexcitují na  $S_1$  hladinu přes vibrační uvolnění mezi  $10^{-12}$  s. Molekula nakonec uvolňuje zbytkovou energii a přechází do  $S_0$  hladiny přes emisi fotonu, zvanou emisi fluorescence. Zde platí, že energie emitovaného fotonu se musí rovnat energii změně energetickou hladinou. Světelná energie je absorbována chlorofylem, karotenoidy a jinými pigmenty přítomnými ve fotosyntetických světlo-sběrných komplexních molekulách uložených v tylakoidních membránách zelených rostlin [24], [25], [6].

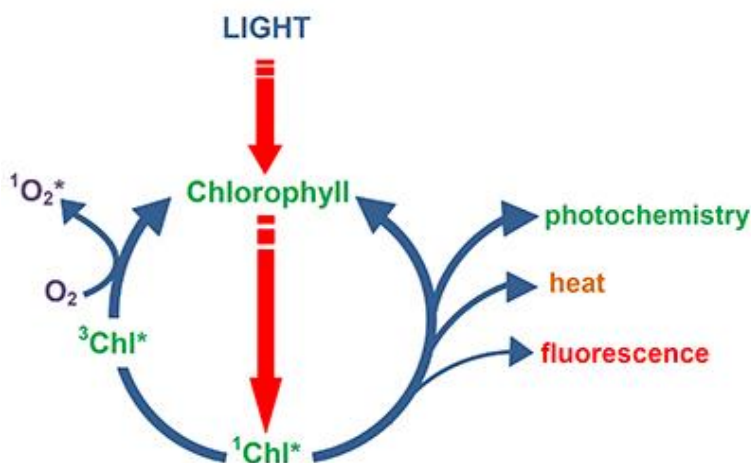


**Obr. 1:** Vlevo Jablonského diagram s energetickými hladinami, šipkami naznačeny energetické pochody mezi jednotlivými hladinami. Vpravo spektrální profily excitace chlorofylu a následná fluorescenční emise, vyznačené vlnové délky v nanometrech.[A]



Absorpce fotonu červeného světla u chlorofylu vyvolá přechod na jeho nejnižší (první) singletovou excitovanou hladinu, pro kterou existují tři vnitřní cesty deexcitace: a) fluorescence, při které se molekula vrátí do základního stavu; b) vnitřní konverze, při které je energie molekuly konvertována na vibrační energii; c) mezi-systémové křížení, při kterém je singletový stav převeden na tripletový (**obr. 1**). Pokud jsou přítomny i další molekuly společně s chlorofylem, mohou vedle vnitřních cest útlumu existovat i cesty vnější.

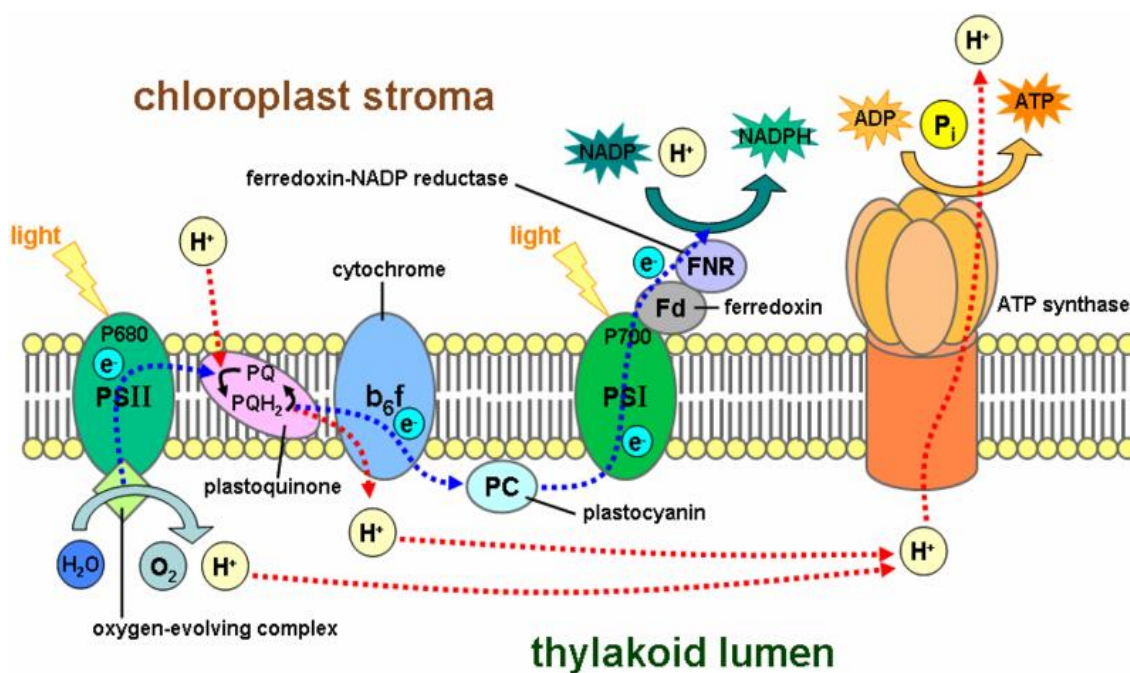
Světelná energie absorbovaná chlorofylem může být využita třemi způsoby: a) aby nastartovala fotosyntézu (fotochemie); b) může být rozptýlena ve formě tepla; c) může být znovu emitována jako fluorescence. Mezi těmito třemi procesy probíhá kompetice, při zvýšení účinnosti jednoho procesu se sníží výnos ostatních dvou (**obr. 2**). Díky tomu nám stanovení výnosu fluorescence chlorofylu poskytne informace o změnách v účinnosti fotochemie a odvodu tepla <sup>[1]</sup>.



**Obr. 2:** Schéma excitace chlorofylu světlem, jeho singletový a tripletový stav. Šipkami naznačeny pochody mezi chlorofylem, kyslíkem a možnými cestami deexcitace. **[B]**

Fotosyntéza rostlin za přístupu kyslíku zahrnuje dvě světelné reakce působící na reakční centra dvou fotosystémů: PSII (fotosystém 2) a PSI (fotosystém 1), což jsou vedle cytochromu  $b_6f$  a ATP syntázy další dva klíčové proteinové komplexy v tylakoidní membráně (**obr. 3**). Světelná energie je absorbována světlosběrným komplexem pigmentů (LHA), které rozvádějí energii do obou fotosystémů, které ji využívají pro oxidaci vody na kyslík, redukci  $\text{NADP}^+$ , a produkci ATP.

Většina chlorofylové fluorescence vzniká z anténních komplexů PSII a projevuje se jako emise fluorescence v 685 nm <sup>[6]</sup>. Absorpce fotonu anténními molekulami je velmi rychlý proces, probíhající v řádech femtosekund, vedoucí k formaci excitovaného chlorofylu (Chl\*). Hlavní funkcí antény LHA je převést excitační energii do fotosyntetických center což vede k fotochemii, část absorbované energie je však rozptýlena ve formě tepla nebo emitována jako fluorescence (**obr. 2**). Primární nábojová separace probíhá v reakčních centrech PSI a PSII, obsahujících P700, resp. P680. Fotochemie trvá v řádu pikosekund, další reakce závisí na přítomnosti světla <sup>[20]</sup>.



**Obr. 3:** Schéma vnitřní stavby tylakoidní membrány s vyznačenými fotosystémy, ostatními složkami a probíhajícími procesy. [C]

## 2. Typy chlorofylové fluorescence

Chlorofylová fluorescence je univerzální metoda pro získání informací při studiu fotosyntézy, biofyziky, biochemie a fyziologie zelených rostlin. Analýza chlorofylové fluorescence je citlivá, neinvazivní a relativně jednoduchá. Měření fluorescence, která se běžně používají, jsou: a) fluorescence při pokojové teplotě; b) nízkoteplotní fluorescence v tekutém dusíku; c) fluorescenční teplotní křivka; d) variabilní fluorescence, lišící se ve způsobu nasycení fotochemie, především: i) fluorescenční indukce nebo analýza účinnosti rostlin (PEA); ii) pulzní amplitudová modulace (PAM) <sup>[1]</sup>.

### 3. Chlorofylová fluorescenční indukce

Chlorofylová fluorescenční indukce (FI) jsou charakteristické změny v intenzitě fluorescence *Chl a*, při osvětlení fotosyntetických materiálů po jejich adaptaci na tmu. FI se také může nazývat fluorescenční přechod, nebo Kautského efekt, pojmenovaný podle Hanse Kautského (1891-1966). Pro vyšší rostliny a většinu řas platí, že křivka fluorescenční indukce *Chl a* měřená při stálé iluminaci má rychlou (v řádu sekundy) narůstající fázi a pomalou (v řádu minut) klesající fázi. Dále, světlem exponované preparáty vykazují změny ve fluorescenci, při změně vlnové délky a intenzity světla. Poté co je světlo vypnuto a preparátu je poskytnuta dostatečně dlouhá temná časová perioda (15-30 minut až hodina), původní fluorescenční indukční křivky jsou při totožném osvětlení znovu pozorovatelné <sup>[20]</sup>.

#### 3.1 Polyfázové zvýšení fluorescence *chlorofylu a* (FLR): O-J-I-P přechody

Chlorofylová fluorescenční indukce měřená u fotosyntetizujícího preparátu během prvních sekund intenzivní světelné excitace (stovky až tisíce  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  FAR) následuje temnotně-světelný přechod a je pro ni charakteristický O-J-I-P přechod <sup>[7]</sup>.

#### 3.2 Instrumentální systémy

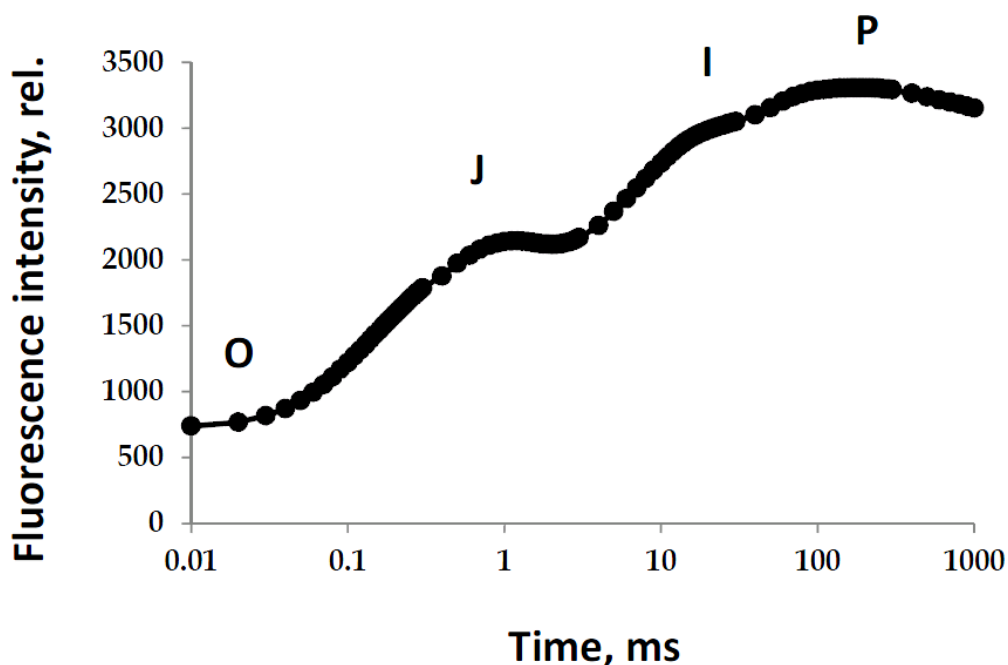
V experimentální soustavě musí být dodrženy tři podmínky, aby bylo možné změřit a rozlišit polyfázové FLR: i) vysoká (saturující) intenzita excitačního světla ( $\sim 1000-10000 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  FAR)-zaručena vysoce intenzivními světelnými zdroji (xenonové a halogenové lampy, světlo emitující diody, lasery); ii) rychlý nástup osvětlení vzorku - zajištěn použitím dostatečně rychlé clony (závěrky) nebo soustavy bez ní; iii) rychlé časové rozlišení detekovaného fluorescenčního signálu - zajištěné pomocí dostatečně rychlého konvertoru (převaděče). Nejpoužívanějšími typy fluorometrů pro měření FLR jsou PAM a PEA fluorometry. Nicméně tyto dva typy fluorometrů se liší přístupem k detekci fluorescenčního signálu.

U PEA fluorometru je nepřetržité osvětlení použito k indukci fotosyntetického elektronového transportu (jako tzv. aktinické světlo), ale slouží také ke zhodnocení „stavu“ vzorku přes jeho fluorescenční signál (jako tzv. měrné světlo). U PAM 101-103 fluorometru jsou pulzně modulované měrné světlo a nepřetržité aktinické světlo odděleny.

Proto jsou fotosyntetický elektronový transport a uzavření reakčního centra fotosystému II (RCII) indukovány nepřetržitým osvětlením, ale „stav“ vzorku je zkoumán přes krátké (1  $\mu$ s) měrné světelné záblesky, oddělené 10 milisekundovými intervaly od sebe, v průběhu FLR měření. Měřením fluorescenčního signálu při každém individuálním měrném záblesku, tak jako pár mikrosekund poté a následným odečtením těchto dvou signálů, je fluorescence excitovaná aktinickým světlem eliminována. Z tohoto důvodu, pokud je intenzita měrného světla konstantní, PAM fluorometry měří fluorescenční výtěžek, a to bez ohledu na fluorescenční intenzitu excitovanou aktinickou iluminací. Fluorescenční výnosy se mohou lišit i pětinasobkem (mezi všemi RCII buď otevřenými, nebo uzavřenými), zatímco fluorescenční intenzita není limitována, jelikož je přímo úměrná intenzitě excitačního světla. Různé přístupy detekce při použití PAM nebo PEA fluorometru se odrážejí především v zjišťování  $F_0$ , tedy minimální fluorescence <sup>[10]</sup>.

#### 4. Jednotlivé části (kroky)

Všechny kroky FLR se jasně ukazují, pouze pokud je použita logaritmická prezentace časové osy. V následujícím textu je výraz „krok“ synonymem pro vlnu nebo vrchol, který se vizuálně objevuje v určitém okamžiku FLR. Přejít neboli fáze je v následujícím textu synonymem pro část FLR která začíná v určitém bodě (kroku) a v následujícím končí. J (I1) krok se obvykle objevuje při 2-3 ms a I (I2) krok při 30-50 ms. Počáteční O krok zastupuje hladinu minimální fluorescence  $F_0$  tak jako P krok zastupuje hladinu maximální fluorescence  $F_M$ , které je většinou dosaženo při 200-500 ms. Pojmenování kroků J a I je podloženo prací Strassera a Govindjee (<sup>[22]</sup>). Tyto kroky byly již dříve označeny, avšak jako I1 a I2, Schreiberem a jeho kolektivem. Strasser et al. (1995) poté dokázal ekvivalenci J a I1; I a I2 kroků. Vzhledem k tomu, že počáteční O-J přechod odráží primární fotochemické reakce, byl pojmenován jako fotochemická fáze FLR <sup>[23]</sup>, jejímž charakteristickým rysem je silná závislost počátečního sklonu a relativní výšky na intenzitě excitačního světla. Naopak následný J-I-P přechod nemůže být urychlen zvýšením intenzity excitačního světla a protože je závislý na teplotě měření (v rámci fyziologického rozmezí) byl pojmenován jako termální fáze <sup>[10]</sup>.



**Obr. 4** Obvyklý průběh křivky FLR. Na ose x je zobrazena logaritmická prezentace času, na ose y fluorescenční intenzita. Vyznačeny jsou kroky O, J, I, P. [D]

## 5. Vysvětlení podstaty jednotlivých kroků

### 5.1 Fotochemická fáze

#### 5.1.1 Akumulace redukováných $Q_A$ , zatímco $Q_B$ jsou redukovány

Fotochemická fáze (O-J přechod) koresponduje s odbouráním inhibitoru, zhášече  $Q_A$ , což je první chinonový akceptor fotoreakce II při fotosyntéze. Strasser a Govindjee (1992) vytvořili pracovní hypotézu, považující krok J za světlem řízenou akumulaci  $Q_A^-$  zároveň s oxidovaným  $Q_B$ , tedy druhým chinonovým akceptorem elektronu v PSII, poté  $J \approx Q_A^- Q_B$ . Hlavní experimentální důkaz, že O-J přechod odpovídá akumulaci pouze redukováných  $Q_A$  vychází z měření s DCMU (3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimethylurea), což je inhibitor elektronového transportu mezi molekulami  $Q_A$  a PQ z PQ poolu. DCMU inhibuje tuto reakci vazbou na vazební místo  $Q_B$  v PSII. Pokud je vzorek ošetřen DCMU, FLR měřené při vysoké intenzitě excitačního světla je charakteristické prudkým fluorescenčním nárůstem, dosažením maximální sytosti přibližně v pozici kroku J, naměřeného u neošetřeného vzorku. [23], [9]. Teoretické simulace FLR při aplikaci i bez aplikace DCMU také potvrdily tvrzení, že v pozici J kroku dochází především k akumulaci redukováných  $Q_A$  [19], [10].

#### 5.1.2 Donorová (dárcovská) strana PSII

Použitím různých prostředků, (Tris, vysoká teplota,  $NH_2OH$ , pH) které inhibují donorovou stranu PSII, se ukázalo, že fotochemická fáze je touto donorovou stranou částečně řízena. Stejných závěrů bylo dosaženo i na základě měření FLR při nízké intenzitě excitačního světla nebo zábleskové fluorescenční indukce. Vliv donorové strany PSII na fotochemickou fázi FLR, který zjistili Hsu (1993) a Lavergne a Leci (1993) je považován za prvotní předpoklad rozdílného zhášení fluorescence při různých redoxních stavech (S-stavy, viz sekci 1) OEC (komplexu vyvíjející kyslík) a vztahuje se tedy k donorové straně zhášení fluorescence a ne k rychlostem přechodů S-stavů jako takovým [10].

#### 5.1.3 Elektrické napětí mezi tylakoidními membránami

Souběžným měřením FLR a změnami v absorbanci při 515 nm ( $A_{515}$ , zobrazující elektrické napětí mezi tylakoidními membránami, tzv. elektrochromický posun) bylo zjištěno, že maximum  $A_{515}$  se nachází přibližně na pozici J kroku [18]. Poté bylo navrženo, že elektrické napětí upřednostňuje vytvoření tripletového excitovaného stavu P680, tedy ( $^3P680^*$ ), které jako takové může vést k nižší emisi fluorescence, avšak energie  $^3P680^*$  může být dále zhášena i v RCII nebo LHA.

Tyto procesy mohou vést k útlumu fluorescence na pozici J kroku. Dau et al. (1991) zjistili, že fluorescenční signál se zvyšuje přímo úměrně se zvýšením elektrického napětí mezi tylakoidními membránami a následná analýza dat ukázala, že elektrické napětí mezi tylakoidními membránami je zodpovědné za 7% fotochemické fáze FLR<sup>[10]</sup>.

#### 5.1.4 Vliv ostatních procesů

Schreiber (2002, 2004) navrhl hypotetický mechanismus zodpovědný za zhášení fluorescence při J kroku. Navrhl, že v PSII s  $Q_A^-$  může probíhat elektronový transport přes inaktivní větev PSII, tj. že elektron může být přenesen z P680 na Pheo2 (Pheo lokalizovaný v proteinu D2 PSII), následovaný elektronovým transportem na  $Q_B$  nebo  $Q_B^-$ . Zmíněný proces je vzhledem k vysokým výnosům zpětné nesvětelné rekombinace považován za velmi neefektivní. Navrhovaný elektronový transport jako takový by způsoboval útlum fluorescence v kroku J a tím vysvětloval nižší fluorescenci v kroku J než v kroku P při FLR. Zmíněný elektronový transport byl nazván  $Q_B$ -zhášecí mechanismus<sup>[16], [17]</sup>.

Golstev a kolektiv použili fosforoskop a teoretické simulace zpožděné fluorescence (DF) a FLR, aby prozkoumali účinky rekombinace mezi elektronovými akceptory a donory v PSII. Tato rekombinace vede k DF, zjištěné v rozmezí 350  $\mu$ s – 5,5 ms. Autoři zjistili, že čas, kdy se objevuje první vrchol (I1) při DF, koresponduje s časem maximální hladiny FLR mezi O-I fází měřené při nízké intenzitě excitačního světla. Původ I1 při DF pramení z rekombinace  $Q_A^-$  s  $Y_Z^+$ , kdy  $Q_B$  je jednotlivě redukován a čas trvání  $Y_Z^+ Q_A^- Q_B^-$  je určen rychlostí elektronového transportu od  $Q_A^-$  k  $Q_B^-$ <sup>[4], [3], [5]</sup>.

Lazár (2003) za použití teoretických simulací všech modelů FLR zjistil, že fotochemická fáze FLR je mimo jiné ovlivněna nefotochemickým zhášením fluorescence přes  $P680^+$  a oxidovaným poolem PQ, zároveň s nábojovou rekombinací mezi  $P680^+$  a  $Q_A^-$  a také počátečním stavem OEC nebo rychlostí elektronového transportu z  $Y_Z$  k  $P680^+$ . Teoretické výpočty a simulace FLR ukázaly, že přenos excitační energie mezi PSII systémy také ovlivňuje fotochemickou fázi FLR<sup>[8]</sup>.

## 5.2 Termální fáze

### 5.2.1 Akumulace redukováných $Q_B$ vedle redukováných $Q_A$

Podle návrhu Delosme (1967) termální fáze (J-I-P přechod) koresponduje s odstraněním zhášeče, v tomto případě PQ, a to buď vázaný na PSII jako  $Q_B$  nebo volný v tylakoidních membránách. V závislosti na tomto návrhu Strasser a Govindjee (1992) navrhli pracovní hypotézu, tedy že I a P kroky odráží světlem řízenou akumulaci  $Q_B^-$  a  $Q_B^{2-}$ , vedle akumulace  $Q_A^-$ . Poté krok I odpovídá stavu  $Q_A^- Q_B^-$  a krok P stavu  $Q_A^- Q_B^{2-}$ . Přestože akumulace jednotlivých oxidovaných forem PSII při krocích I a P ve FLR byly potvrzeny pouze teoretickými simulacemi <sup>[19], [8]</sup>, jejich přiřazení ke krokům I a P se zdá být rozumné, protože i při použití různých typů simulací bylo dosaženo stejných výsledků.

### 5.2.2 Donorová strana PSII

Inhibice donorové strany PSII potlačuje termální fázi FLR. Částečná inhibice OEC (způsobená vyčerpáním komponentů donorové strany PSII nebo vysokou teplotou) vede ke korelaci (vzájemnému vztahu) mezi rychlostní konstantou J-P přechodu FLR a stabilním stavem rychlosti vývinu kyslíku. Vliv inhibice OEC na termální fázi FLR byl zjištěn i teoretickými simulacemi FLR. O participaci donorové strany PSII v J-I fázi FLR diskutoval i Vredenberg et al. (2005) na základě teoretické analýzy three-state trapping modelu (TSTM) <sup>[10]</sup>.

### 5.2.3 Útlum fluorescence oxidovaným poolem PQ

Protože inhibice OEC vede k nedostatku elektronů pro redukci PQ poolu, který i nadále zůstává oxidovaný, způsobuje zhášení fluorescence. Toto zhášení fluorescence oxidovaným poolem PQ pravděpodobně vede k potlačení termální fáze FLR. Také použitím zábleskové fluorescenční indukce bylo zjištěno, že termální fáze odráží odstranění zhášení fluorescence oxidovaným poolem PQ <sup>[13]</sup>. Měření  $F_M$  indukovaným jednotlivými záblesky nebo nepřetržitým osvětlením u vzorků ošetřených DCMU a exogenními PQ bylo zjištěno, že zhášení fluorescence oxidovaným PQ poolem je zodpovědné pouze za 25% termální fáze FLR <sup>[10]</sup>.



#### 5.2.4 Komponent Q<sub>2</sub>, cytochrom b<sub>559</sub>

Samson a Bruce (1996) navrhli, že termální fáze by mohla odrážet redukci komponentu pojmenovaného Q<sub>2</sub>. Označení Q<sub>2</sub> bylo dříve použito pro předpokládaný elektronový akceptor, který měl být součástí alternativního elektronového přenosu nízké kvantové účinnosti.

Lavergne a Rappaport (1998) navrhli, že jejich naměřená data by mohla vysvětlovat nábojovou rekombinaci mezi P680<sup>+</sup> a Q<sub>A</sub>. Lazár (2003) ovšem zjistil, že předpoklad nábojové rekombinace by neměl téměř žádný vliv na simulovanou tepelnou fázi FLR. Lazár et al. (2005) experimentálně dokázal, že zvýšení množství původně redukováného cytochromu cyt<sub>b559</sub> v tylakoidních membránách ošetřených DCMU způsobilo i zvýšení F<sub>M</sub> hladiny <sup>[2]</sup>. Tyto výsledky byly podpořeny i teoretickými simulacemi, kdy cyt b<sub>559</sub> byl považován za akceptor elektronů od Pheo<sup>-</sup> a donor elektronů do P680<sup>+</sup>. Se souhlasem výše zmíněné teorie Q<sub>2</sub>, i cyt b<sub>559</sub> může být identifikován jako tento komponent. Redukovaný Pheo z práce Lazára et al. (2005) může být Pheo lokalizovaný v proteinu D1 v PSII, ale také Pheo<sub>2</sub>, který je částí inaktivní větve elektronového transportu, a vzhledem ke struktuře PSII je také blíže k cyt b<sub>559</sub> než Pheo. Navíc Schreiber a Neubauer (1987) navrhli, že pokud zhášení fluorescence přes P680<sup>+</sup> způsobuje zhášení fluorescenčního signálu při J kroku, redukce P680<sup>+</sup> alternativním elektronovým donorem např. cyt b<sub>559</sub>, nebo karotenoidem by mohla zvýšit fluorescenci v průběhu termální fáze FLR <sup>[8]</sup>.

#### 5.2.5 Další procesy vysvětlující termální fázi FLR

Na základě měření fluorescenčního útlumu po aplikaci jednoho či více světelných záblesků ve spojení s experimentálními modelovými údaji Vasiljev a Bruce (1998) navrhli, že termální fáze FLR je způsobena odstraněním zhášecích prvků v LHA PSII. Moise a Moya (2004) dospěli ke stejným výsledkům za použití modulačních i fázových fluorometrů, a zjistili, že v průběhu termální fáze se může vyskytovat variabilní nebo přechodné zhášení fluorescence.

Schreiber a Krieger (1996) předpokládali, že fluorescenční signál FLR se skládá jak z rychlé fluorescence, tak i z fluorescence zpožděné (DF), první vzniklé přímo z excitovaných stavů, druhé vzniklé nepřímo po formaci excitovaných stavů, přes světelnou nábojovou rekombinaci mezi P680<sup>+</sup> a Pheo<sup>-</sup> <sup>[10]</sup>.

Schreiber a Krieger (1996) navrhli, že postupným odstraněním nesvětelného úbytku po nábojové separaci vzniká v PSII stav  $P680^+ \text{Pheo}^- \text{Q}_A^-$ , ze kterého poté vyplývá zvýšení výtěžku DF, což vede ke zvýšení fluorescenčního signálu při termální fázi FLR. Golstev a spolupracovníci zjistili, že čas, při kterém se objevuje druhý vrchol DF (označený jako I2) koresponduje s časem maximální hladiny FLR v I-P přechodu měřeným při nízké intenzitě excitačního světla [4], [5]. Původ I2 v DF vězí pravděpodobně v rekombinaci  $\text{Q}_A^-$  s  $\text{Y}_Z^+$  zatímco je  $\text{Q}_B$  dvojnásobně redukován [27].

### 5.2.6 Elektronové transportní reakce po PSII

Pokud je FLR měřeno u zelené řasy *Chlorella* při nízké intenzitě excitačního světla, obvykle se po I kroku vyskytuje specifická vlna [11]. Bylo navrženo, že výskyt této vlny souvisí s funkcí PSI. Avšak použitím teoretických modelů FLR měřených při nízké intenzitě excitačního světla Baake a Strasser (1990) ukázali, že zahrnutím elektronových transportních reakcí po PQ poolu (cyt  $b_6/f$  komplex, plastocyanin (PC), PSI) do modelu nedochází k zobrazení vizuální podobnosti okolo vlny v křivkách měřených experimentálně. Nové informace o elektronovém transportním proudu po PQ poolu byly získány až při souběžném měření FLR a přenosové kinetiky v 820 nm ( $I_{820}$ ), což mělo zohlednit změny v redoxním stavu PC a P700. Schreiber et al. (1989) a Strasser et al (2001) dokázali, že  $I_{820}$  má maximum přesně v pozici I kroku v O-J-I-P FLR měřeném s listy. K 820-nm přechodovému signálu mohou teoreticky přispívat pouze PSI a jeho příbuzné složky, PC a P700. Na základě měření s DBMIB a metylviologenem i měřeními postupné oxidace PC a P700 při dlouhém červeném osvětlení s analýzou re-redukční kinetiky Schansker et al. (2005) zjistil, že k přechodovému signálu  $I_{820}$  přispívají pouze PC a P700. Dále také zjistil, že rychlá re-redukční fáze odpovídá rekombinaci mezi  $\text{P700}^+$  a akceptorovou stranou PSI [15]. Přechodné omezení akceptorové strany PSI vedoucí k blokaci elektronů, dočasně vytvořené v elektronovém transportním proudu je poté zodpovědné za I-P přechod ve FLR [11], [7]. Je pravděpodobné, že limitace na straně PSI může být v počátku způsobena neaktivní ferredoxin-NADP-reduktázou (FNR) a následně neaktivním Calvin-Bensonovým cyklem [14].

### 5.2.7 Fluorescence vycházející z PSI

Itoh a Sugiura (2004) prodiskutovali vliv PSI reakcí na OJIP přechody FLR pozorováním přímé fluorescence. Schreiber et al. (1989) při zajištění příhodných podmínek (nasyčené světelné pulzy určené vlnové délkou, vzorky ošetřené metylviologenem) zjistili, že transportní elektronový proud se redukuje asi při 50 ms, což je čas, kdy se objevuje ve FLR I krok. Vzhledem k tomuto tvrzení, bylo navrženo, že I-P přechod zobrazuje redukci P700 a akceptorové strany PSI zapříčiněnou limitací akceptorové strany PSI<sup>[17]</sup>. S přihlédnutím k výše zmíněným výsledkům bylo navrženo, že I-P přechod FLR může odrážet zvýšení fluorescenčního signálu přicházejícího z PSI. Byrdin et al. (2000) také zjistil, že trimerní PSI zároveň s dříve redukovánými PSI askorbátem, vykazují při pokojové teplotě FLR s variabilní fluorescencí  $F_V$  rovné asi  $12 \pm 5\%$  z  $F_M$ <sup>[10]</sup>.

### 5.2.8 Elektrické napětí mezi tylakoidními membránami

Když je FLR měřeno u membrán PSII, ve srovnání s intaktními (neporušenými) vzorky, se v FLR nevyskytuje I krok. Membrány PSII totiž tvoří uzavřená seskupení, která by umožňovala formaci elektrického napětí mezi tylakoidními membránami<sup>[26], [8]</sup>. Vzhledem ke dřívějším teoriím o čase výskytu I kroku a formaci vrcholu indukovaného elektrického napětí vedly Pospíšila a Dau (2002) k návrhu, že I krok odráží světlem indukované změny v elektrickém napětí mezi tylakoidními membránami. Avšak výskyt I kroku ve FLR a maxima ve světlem indukovaném elektrickém napětí v čase, tak jako ho shrnuli Pospíšil a Dau (2002) se liší od výsledků, ke kterým dospěli Schreiber a Neubauer (1990). Ti zjistili, že světlem indukované elektrické napětí mezi tylakoidními membránami má maximum v J kroku, a ne v kroku I. Navíc navrhli, že zvýšení fluorescenčního signálu během termální fáze FLR odráží snižování fluorescenčního zhášení řízené relaxací membránového napětí, kde se fluorescenční zhášení vyskytuje mechanismem popsaným v sekci 5.1.3. Navíc k tomuto mechanismu se přidávají další, tzv. vnitřní a vnější mechanismus, které v sobě zahrnují změny v rychlostních konstantách kroků v elektronových transportech. Pokud se tedy vyskytuje světlem indukované elektrické pole, rychlostní konstanty všech kroků elektronových transportů se změní, a určitým způsobem přispějí ke změnám v emisi fluorescence<sup>[10]</sup>.

Bulychev a Vredenberg (2001) zjistili že elektrogenní reakce generované v PSI, souběžně s odbouráním fotochemické aktivity PSII, ovlivňují PSII. Proto Vredenberg a Bulychev (2002) navrhli tzv. fotoelektrochemickou kontrolu fluorescenčního výtěžku. Pokud je odbourána fotochemická aktivita PSII při I kroku (za předpokladu redukce všech akceptorů elektronu v PSII), následný I-P přechod, vzhledem ke změnám ve fluorescenčním výtěžku, vychází z elektrických reakcí mezi tylakoidními membránami [26], [10].

### **5.2.9 Světelný gradient v rámci vzorku**

Každý vzorek použitý pro měření FLR reprezentuje vrstvy pigmentů, což vedle jiných optických efektů způsobuje světelný přírůstek vytvořený podél světelné dráhy. Přírůstek se poté odráží v excitaci sub-vrstev vzorku, jako světlo o různé intenzitě. Celkový fluorescenční signál je poté součtem signálů přicházejících ze sub-vrstev. Za tohoto předpokladu Hsu a Leu (2003) navrhli, že I krok v FLR pochází z abaxiální strany vzorku (když je osvětlován z adaxiální strany). Vzhledem k tomu, že fotochemická fáze FLR je velmi citlivá na intenzitu excitačního světla, I krok by v celkové FLR měl odrážet fotochemickou fázi FLR vycházející z abaxiální strany vzorku. Franck et al. (2005) na základě experimentálního měření i simulací došel k závěru, že s ubíhajícím časem od počáteční excitace pochází měření fluorescenční signál ze stále hlubších vrstev. I když účinek světelného přírůstku v rámci vzorku na celkovou FLR byl dokázán experimentálně i teoretickými simulacemi, nebylo dokázáno, že by byl odpovědný za výskyt I kroku ve FLR [10].

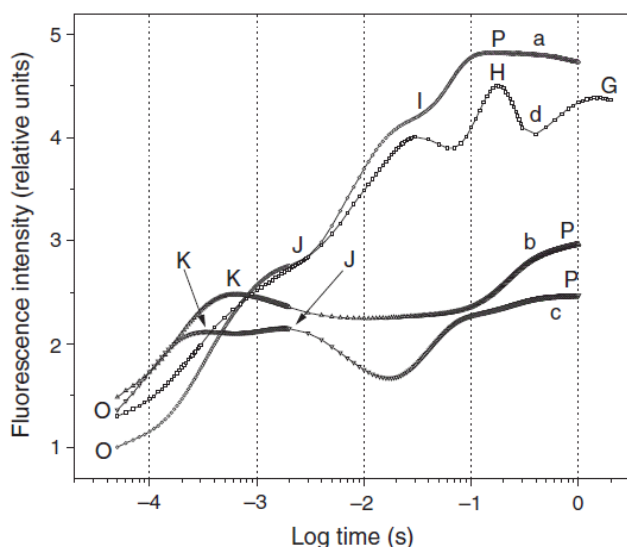
## 5.3 Aditivní kroky v FLR

### 5.3.1 K krok

Pokud je vzorek vystavený vyšší teplotě, objevuje se asi v 300-400  $\mu$ s nový krok ve FLR, pojmenovaný K <sup>[10]</sup>. Strasser a jeho spolupracovníci navrhli, že výskyt K kroku odráží inhibici OEC, pravděpodobně spojenou s inhibicí akceptorové strany PSII. Obecněji, Strasser (1997) navrhl, že K krok se objevuje, když rychlost elektronového proudu od P680 k akceptorové straně PSII překročí rychlost elektronového proudu od donorové strany PSII k P680. Protože K krok odráží akumulaci redukováných  $Q_A$  <sup>[21]</sup>, i O-K přechod lze považovat za fotochemickou fázi FLR. Avšak klasický O-J přechod se neposouvá do kratšího času (O-K), protože za určitých podmínek můžeme vidět zároveň J i K krok ve FLR, což ukazuje, že K a J krok odráží dva různé jevy. Proto je výskyt zdroje K kroku předpokládán i u nestresovaných vzorků, ale z důvodů dynamiky se neobjevuje jako „pravý“ krok ve FLR <sup>[21]</sup>.

### 5.3.2 H a G krok

O-J-I-P přechody nejsou při standartních podmínkách typickou vlastností všech fotosyntetických organismů. Bylo zjištěno, že P krok (měřený při vysoké intenzitě excitačního světla se umístí mezi další dva kroky ve FLR u dírkonožců (foraminifer), zooxantel, lišejníků a lišejníků s lichenizovanými řasami <sup>[7]</sup>. V rámci pokračování v předchozím O-K-J-I pojmenování, byly tyto dva kroky pojmenovány H a G krok. Mezi těmito dvěma body H, G se ve křivkách FI tvoří tzv. dip, neboli vlna, jejíž vrcholy jsou právě zmíněné body. Ilík et al. (2006) na základě souběžného měření FLR a  $I_{820}$  různých vzorků, s ošetřením různými chemikáliemi formuloval možné procesy způsobující a ovlivňující tuto vlnu. Zároveň bylo také zjištěno, že zmíněná vlna v FI, která byla sledována u řasy *Trebouxia* se v podobných časech vyskytuje také u dírkonožců, kteří obsahují jiné druhy symbiotických fotosyntetických řas. Tento fakt by mohl ukazovat, že symbiotické řasy, ve srovnání s ne-symbiotickými a vyššími rostlinami regulují svůj elektronový proud skrz PSI při temnotně-světelném přechodu jinou cestou. V této sféře je však zapotřebí provést detailnější výzkum <sup>[10]</sup>.



**Obr. 5** Křivky FLR měřené s temnostně adaptovanými rostlinnými vzorky. Křivka a – list hrachu bez ošetření; křivka b- list ošetřen vodou o teplotě 47°C po dobu 5 minut; křivka c- list brambory ošetřen vodou o teplotě 44°C po dobu 13 minut; křivka d- lišejník *Umbilicaria hirsuta*. Data: Lazár (2003), Ilík et al. (2006). Jsou vyznačeny kroky O, K, J, I, H, G a P. [E]

### 5.3.3 Důvody klesající fáze vlny v FI

Klesající část vlny ve FI u lišejníků vlastních řasu *Trebouxia* jako fotobiont, tak jako u řasy *Trebouxia* samotné, se vyskytuje po P kroku v 0,2 – 0,4 s. Tato odráží odstranění limitů akceptorové strany PSI, tedy rychlou re-oxidaci PSI. Odliv elektronů od PSI může být vysvětlen rychlou, světlem indukovanou aktivací FNR, např. pro izolované chloroplasty začíná formace NADPH<sup>-</sup> asi kolem 0,5 s až do několika sekund. Aktivace FNR probíhá v průběhu konformační změny enzymu, iniciované světlem-indukovanou alkalizací stromatu, je tedy přímo závislá na pH. Proto se předpokládá, že optimální pH pro FNR řasy *Trebouxia* je posunuto k nižším hodnotám, což dovoluje rychlejší aktivaci. Dalším důvodem rychlé reoxidace PSI může být Mehlerova-peroxidázni reakce nebo cyklický elektronový proud okolo PSI, vedoucí k přechodné reoxidaci redukováného PQ poolu (a Q<sub>A</sub><sup>-</sup>) [7], [10].

### 5.3.4 Důvody vzrůstající fáze vlny v FI

Vzrůstající fáze vlny v FI u *Trebouxia*- lišejníků a řasy *Trebouxia* samotné se objevuje v 0,4 - 2s. Vzrůstající fáze není následována změnou v redoxním stavu P700 a PC, proto tento fluorescenční nárůst neodráží blokaci elektronů na hladině PSI, tak jako je tomu I-P přechodu FLR. Jelikož byl vyloučen vliv CEF a změny pH, došel Ilík et al. (2006) k závěru, že vzrůstající část vlny je způsobena re-redukcí PQ poolu (a  $Q_A$ ). Tato redukce, jak je již zmíněno výše, není spojena s cyklickým elektronovým proudem okolo PSI, ale pravděpodobně je způsobena neschopností cyt  $b_6/f$  komplexu rapidně re-oxidovat PQ pool [10], [7].

## 6 Metodika

### 6.1 Rostlinný materiál

Vzhledem k tomu, že shromažďování dat probíhalo v intervalu od listopadu roku 2013 až do února 2014, tedy v zimním období, většina měření byla provedena ve sbírkových sklenících Výstaviště Flora Olomouc. Tamní sbírky čítají velké množství přesně determinovaných zástupců různých fylogenetických skupin, což bylo podmínkou pro sběr dat k této práci. Měření FI u jehličnanů *Taxus baccata*, *Chamaecyparis sp.*, *Pinus sylvestris* a *Picea abies* byla provedena ve venkovním areálu Výstaviště Flora Olomouc. Vzorke rostlinných druhů, které ve sklenících nebyly k dispozici, tedy lišejníky a mechorosty byly nasbírány přímo v přírodě, v kilometrovém okolí města Tovačov, Olomoucký kraj. Druhy *Xantoria polycarpa*, *Xantoria parietina*, *Lecanora muralis*, *Parmelia saxatilis* byly nasbírány na žulovitých útvech v lese, severovýchodně od Tovačova, směrem na Olomouc. Zástupce *Peltigera apthosa* se zástupci rodu *Hypogymnia* byly nasbírány na borkách stromů v lužním lese, na břehu řeky Moravy. Všechny mechorosty byly nalezeny tamtéž, na půdě lužního lesa. Všechny rostliny rostoucí ve sklenících měly před i v průběhu měření konstantní podmínky, s teplotou 18-25 °C s dostatkem světla a vlhkosti. Vzorke lišejníků a mechorostů byly nasbírány čtyři dny před měřením a byly uschovány v místnosti s dostatkem rozptýleného slunečního světla, na zvlhčovaném podkladu. Druhy *Nicotiana tabacum*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum* a *Pinus sylvestris* byly vypěstovány přímo v růstových komorách s optimálním přísunem světla a vláhy, při konstantní teplotě, v CR Haná.



## 6.2 Příslušenství

### a) Měření chlorofylové FI

#### HANDY PEA



**Obr. 6** Pohled na horní část přístroje s displejem a ovládacími tlačítky, napravo odstupuje kabel s detekční částí. Pod přístrojem jsou umístěné 2 klipy. [F]

Výrobce: Hansatech Instruments Ltd., Velká Británie

Rozměry: 270×160×220 mm

Váha: 1.5 kg

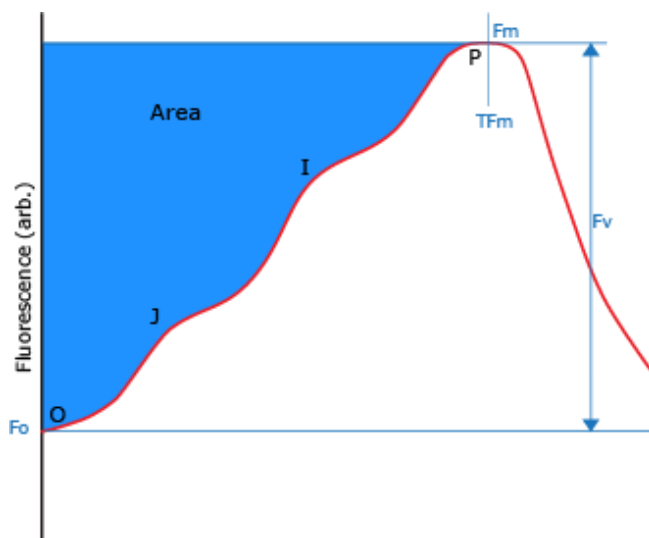
Detektor: PIN fotodioda a rychlý detekční obvod chráněný I. R. grafickým filtrem

Iluminace: Zaostřený paprsek ultra-jasných červených LED diod s amplitudou v 650 nm; spektrální poloměr 22 nm. Maximální intenzita na povrchu listu  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , volitelná v krocích po 1% v rozmezí 0-100%.

HANDY PEA (Plant efficiency analyzer - analyzátor efektivity rostlin) chlorofylový fluorometr je pokročilý přístroj, splňující všechny podmínky pro přesné měření FI. Skládá se z kompaktní řídicí jednotky, zajišťující vysokou časovou rezoluci a dále z detektoru, tedy snímací jednotky. Snímací jednotka se skládá z několika LED diod, které jsou přes čočky zaměřeny na povrch listu.

Součástí tohoto přístroje jsou i tzv. klipy. Klip má dvě části, ta spodní je vystlána měkkou částí a zabraňuje poškození struktury vzorku, naopak vrchní část má tvar kruhu a uprostřed ní se nachází otvor o 4 mm v průměru ( $12,6 \text{ mm}^2$ ), s možností zakrytí posuvným plíškem. Tyto části jsou spojeny pružinovou svorkou, která umožňuje pevné, ale šetrné uzavření vzorku a po vysunutí plíšku přes otvor může docházet k temnostní adaptaci. Tělo klipu je vyrobeno z bílého plastu, který mírní účinky nahromadění tepla na listu a horní, kruhová část je vyrobena z černého plastu, k zamezení možnosti ovlivnění měření okolní intenzitou světla.

HANDY PEA vyhodnocuje všechny důležité parametry FI, potřebné k získání finální křivky a to  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V$  a  $F_V/F_M$ .



**Obr. 7** Vzor finální křivky FI, s vyznačenými hlavními parametry  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V$ . Na ose x logaritmičká časová prezentace, na ose y intenzita fluorescence. Dále vyznačeny také kroky O, J, I, P. [G]

### Vlastní měření

Prvním krokem k měření FI je nasazení klipu na vzorek, což zajistí temnostní adaptaci, která trvá asi 15-20 minut. Během temnostní adaptace jsou všechna reakční centra plně oxidována a jsou k dispozici pro fotochemii, zatímco jakýkoliv výtěžek fluorescence je utlumen. Po uplynutí potřebné doby jsou vzorky přeneseny k přístroji, klip je položen na vnější část snímacího aparátu. Poté je vysunut krycí plíšek a adaptovaný vzorek je připraven k měření. Po předchozím navolení délky a intenzity osvětlení už stačí zmáčknout tlačítko Enter a měření je započato.

Pro všechna měření našich vzorků bylo zvoleno konstantní nastavení, a to 20 sekund dlouhé osvětlení, s intenzitou světla  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  FAR (fotosynteticky aktivní záření). Podmínky byly zvoleny tak, aby se na výsledné křivce mohly objevit všechny kroky a zároveň, aby nedošlo k přesvětlení. Po uložení byla data přenesena z přístroje do počítače, kde se z nich pomocí příslušného programu vytvořily jednotlivé křivky.

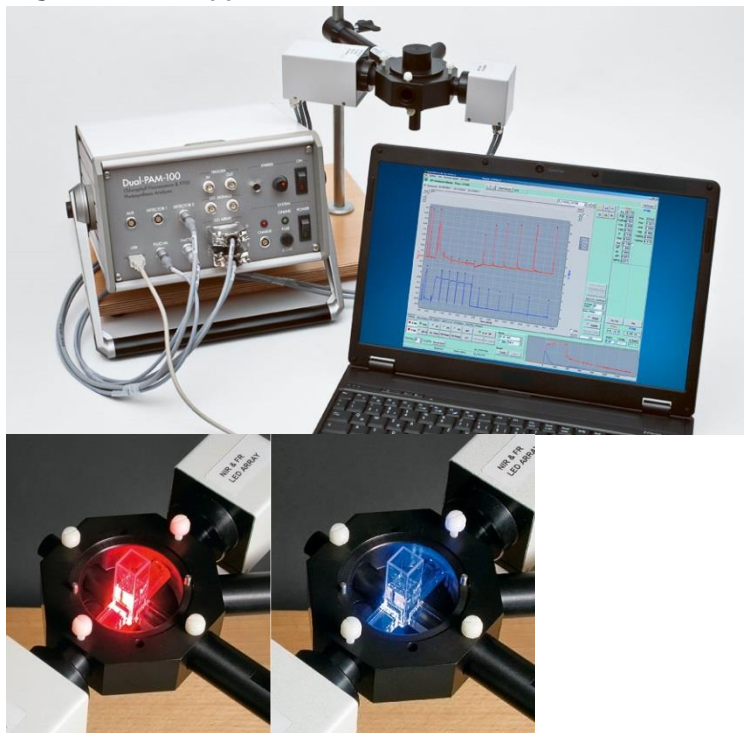
Celkem bylo provedeno na 300 měření, u 91 rostlinných druhů. U každého druhu byla kvůli variabilitě biologického materiálu provedena tři měření, aby se následně mohla eliminovat možná chybná měření. Snahou bylo zahrnout druhy z různých taxonů skrz celý fylogenetický systém, od nejnižších až po nejvyšší rostliny.

Říše	Houby	Rostliny								
Podříše		Vyšší rostliny	Vyšší rostliny	Cévnaté rostliny						
Oddělení	Ascomycota	Jádrovky	Mechy	Plavuně	Kapradiny	Cykasorosty	Nahosemenné	Krytosemenné		
Třída	Pezizomycotina						Jehličnany	Nižší dvouděložné	Jednoděložné	Vyšší dvouděložné
Počet zástupců	9	1	5	1	8	4	5	3	25	30

**Tab. 1** Počet analyzovaných vzorků v různých fylogenetických skupinách

## b) Měření přenosové kinetiky $I_{820}$

### DUAL-PAM 100



**Obr. 8** V horní části centrální jednotka napojená na počítač, v pozadí měřící hlavice. V dolní části detailní pohled na měřící hlavice, demonstrace červeného a modrého světla. [H]

Výrobce: Walz, Německo

Měřicí systém DUAL-PAM 100 v sobě kombinuje paralelní záznam signálů z fotosystému I a II s vynikajícími opto-elektronickými vlastnostmi. Má vlastnosti jak PAM chlorofylového fluorometru, tak i absorpčního spektrometru s duální vlnovou délkou.

Součásti:

- a) Centrální jednotka s výkonným mikroprocesorem a datovým úložištěm s rozměry 31 cm x 16 cm x 33,5 cm a hmotností 4,5 kg.
- b) Měřicí hlavice s P700 NIR emitorem DUAL-E: červená LED dioda, s měrným světlem o duální vlnové délce a silně-červená LED lampa zajišťující kontinuální aktinické osvětlení o vlnové délce 720 nm, s nasycenými záblesky. Rozměry 10.5 cm x 5.5 cm x 7 cm.
- c) Měřicí hlavice s detektorem, DUAL-DB, s měrným světlem emitovaným fluorescenčním emitorem 460 nm, a aktinickým, kontinuálním světlem z modré LED diody. Detekci signálu zajišťuje PIN fotodioda, se speciálním pulzním předzesilovačem pro měření P700. Rozměry 15 cm x 5,5 cm x 7 cm.

### **Vlastní měření**

Prvním krokem k měření přechodové kinetiky  $I_{820}$  je tak jako u měření chlorofylové FI temnostní adaptace vzorku. V našem případě probíhalo celé měření v temné komoře, temnostní adaptace bylo tedy dosaženo uzavřením vzorků do prostoru bez přístupu světla a následná manipulace se vzorky probíhala při nízko-intenzivním zeleném osvětlení, které nijak neovlivňuje získané výsledky. Po asi 20 minutové temnostní adaptaci se již vybrané vzorky upevnily mezi snímací a emitující hlavici. Na počítači se použitím speciálního programu nastavily potřebné parametry a po vyvážení hladiny osvětlení bylo měření přes počítač započato.

V našem případě bylo nastaveno měření na 6 sekund, jelikož pro vykreslení křivky přechodové kinetiky v pozici H a G kroku delší dobu nepotřebujeme.

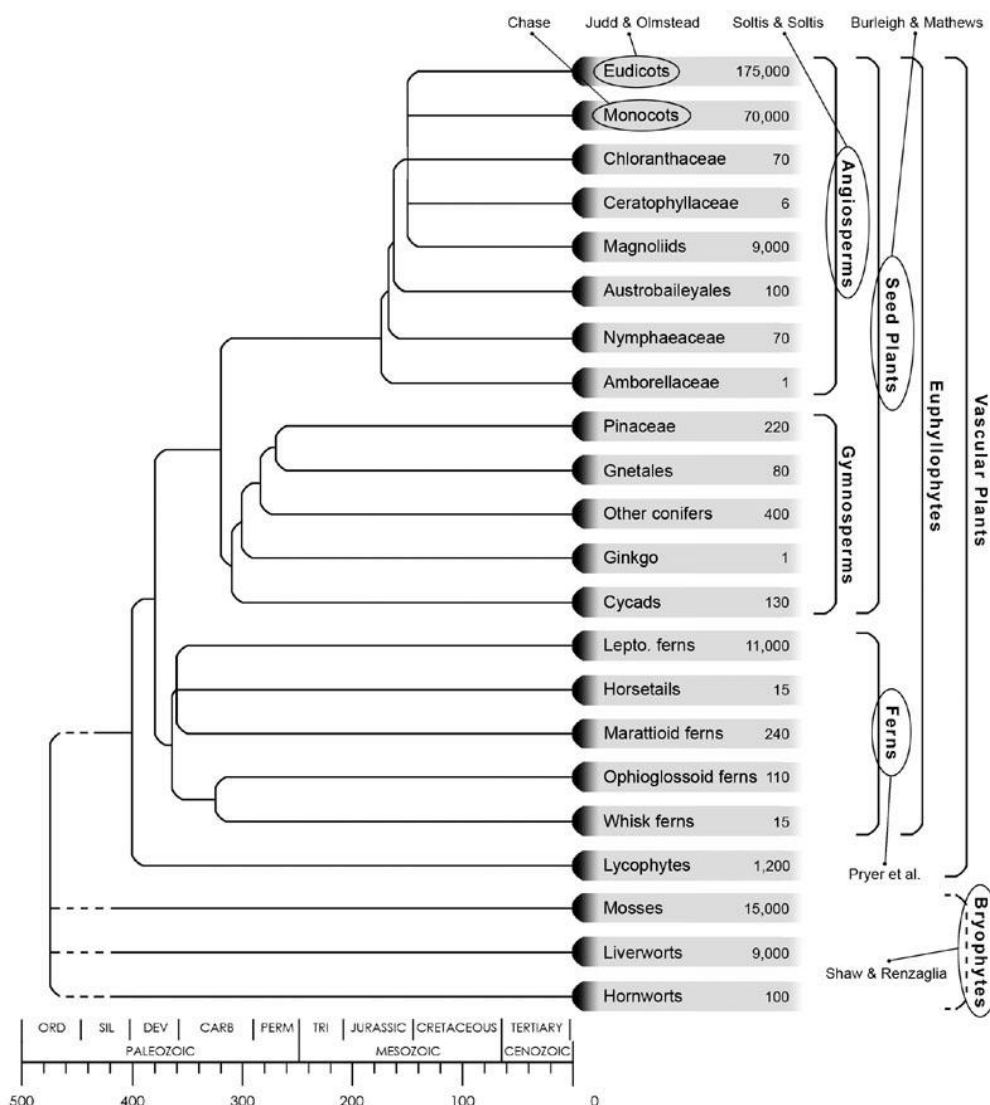
Celkem bylo provedeno 45 měření u 19 rostlinných druhů. U každého druhu byla provedena dvě měření. Snahou bylo vytipovat zástupce ze všech taxonů, u kterých již proběhlo měření chlorofylové FI, aby bylo možné sledovat trend ve změnách křivky  $I_{820}$ .

### 6.3 Chemikálie

Všechna měření fluorescenční indukce byla provedena na neošetřených vzorcích, pouze při souběžném měření FI a  $I_{820}$  byla provedena měření s DCMU u druhů *Pinus sylvestris* a *Hordeum vulgare*. Konkrétně byl použit 50  $\mu\text{M}$  roztok DCMU v 1% ethanolu.

### 6.4 Seřazení podle fylogenetického systému

Po shromáždění všech dat a odpovídajících křivek na počítači, byly tyto údaje seřazeny podle fylogenetického systému. Seřazování probíhalo vzestupně, od nejjednodušších (nejstarších) až po nejsložitější (nejmladší) zástupce, aby bylo možné sledovat předpokládané změny ve křivkách, výskyt aditivních kroků ve FI a změny tvaru křivky  $I_{820}$ .



**Obr. 9** Fylogenetický systém rostlin podle Taize a Zeigera, z knihy Plant Physiology. [1]

## II. Výsledky

### 1. Křivky fluorescenční indukce v závislosti na fylogenetické příbuznosti vzorku

Jelikož bylo nashromážděno velké množství dat, měření bylo cílené a byly zajištěny konstantní podmínky, jsou výsledky této práce směřodatné a mohou být základem pro další zkoumání tohoto typu.

Pro lepší přehlednost a porozumění jsou získané výsledky zpracovány ve formě tabulek, které jsou segmentovány vzestupně podle fylogenetického systému. U každé fylogenetické skupiny jsou poté přiloženy vzorové obrázky křivek a v závěru tohoto pododdílu jsou také vytvořena srovnání grafů, ve kterých je jasně viditelný posun.

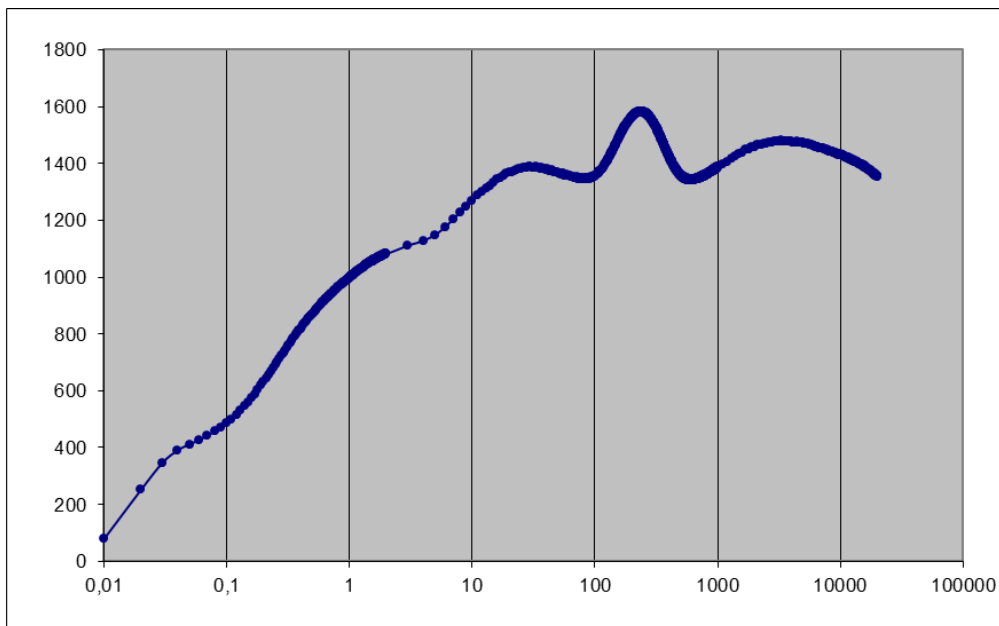
#### Lišejníky

U všech zástupců lišejníků, tedy říše Houby, oddělení *Ascomycota*, třída *Pezizomycotina*, řád: *Lecanorales* jsou zřetelně viditelné H a G kroky ohraničující již dříve zmiňovaný dip. U této fylogenetické skupiny je dip výrazně vykreslený.

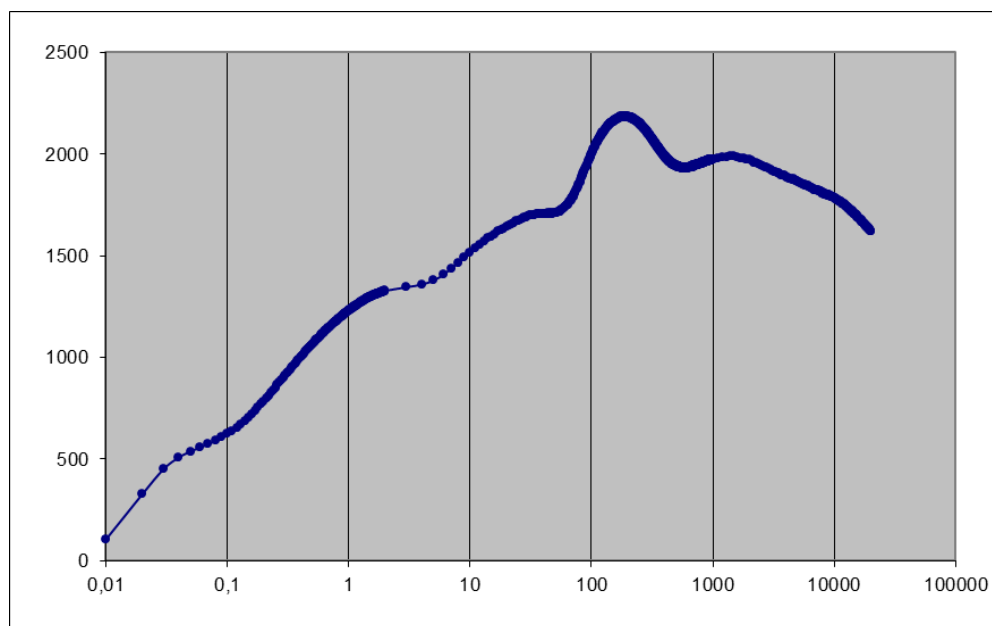
U lišejníků se H a G krok vyskytl u 9 z 9 případů, tedy u 100%. Odchylka se vyskytla u 0 z 9 případů, tedy 0%.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Houby	Ascomycota	Pezizomycotina	<i>Peltigera aphthosa</i>	ano	0,771	/
			<i>Xanthoria polycarpa</i>	ano	0,742	/
			<i>Xanthoria parietina</i>	ano	0,771	/
			<i>Lecanora conizaeoides</i>	ano	0,734	/
			<i>Lecanora muralis</i>	ano	0,81	/
			<i>Hypogymnia tubulosa</i>	ano	0,739	/
			<i>Hypogymnia farinacea</i>	ano	0,761	/
			<i>Hypogymnia physodes</i>	ano	0,793	/
			<i>Parmelia saxatilis</i>	ano	0,793	/

**Tab. 2** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka u zástupců lišejníků.



**Obr. 10** Křivka fluorescenční indukce druhu *Xanthoria polycarpa*.



**Obr. 11** Křivka fluorescenční indukce druhu *Parmelia saxatilis*.

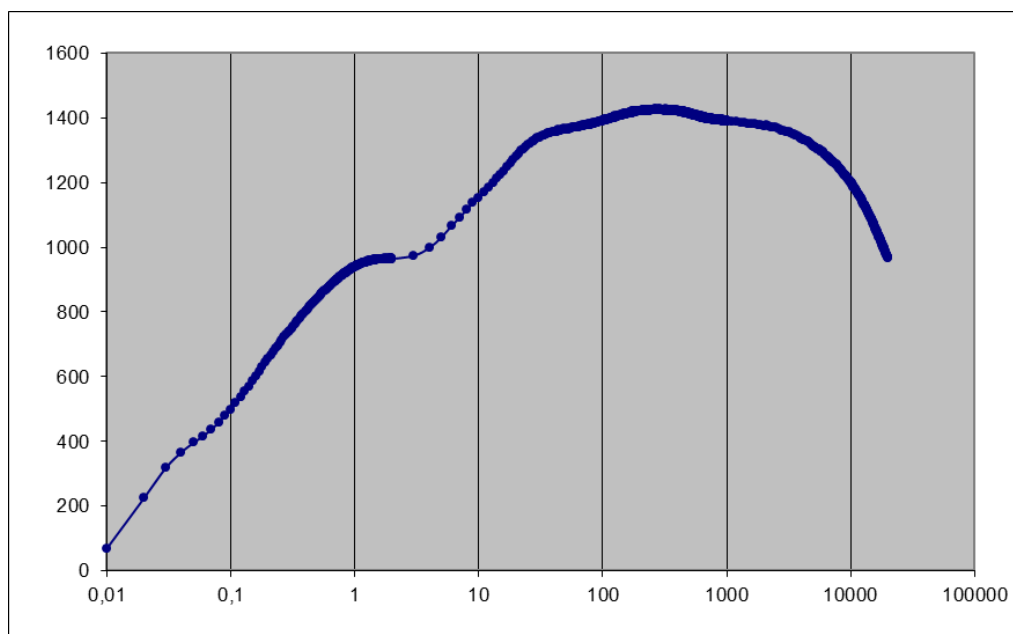
## Játrovky

U zástupců játrovek, tedy říše Rostliny, podříše Vyšší rostliny, oddělení játrovky jsou H a G kroky sice ne příliš vykreslené, ale zřetelně viditelné.

V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 1 z 1 případu, tedy u 100%. Odchylka se vyskytla u 0 z 1 případu, tedy 0%.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Játrovky		<i>Marchantia polymorpha</i>	ano	0,788	/

**Tab. 3** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka u zástupce játrovek.



**Obr. 12** Křivka fluorescenční indukce druhu *Marchantia polymorpha*.



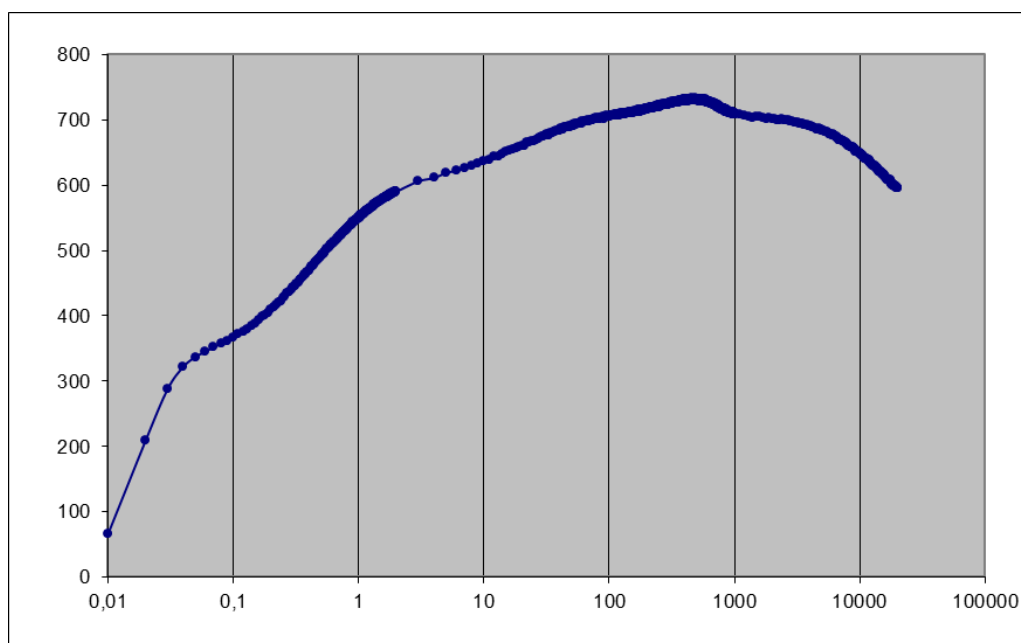
## Mechy

U zástupců mechů, tedy podříše Vyšší rostliny, oddělení mechy, jsou H a G kroky zřetelně vykreslené a vytvářejí mezi sebou nápadnou vlnu.

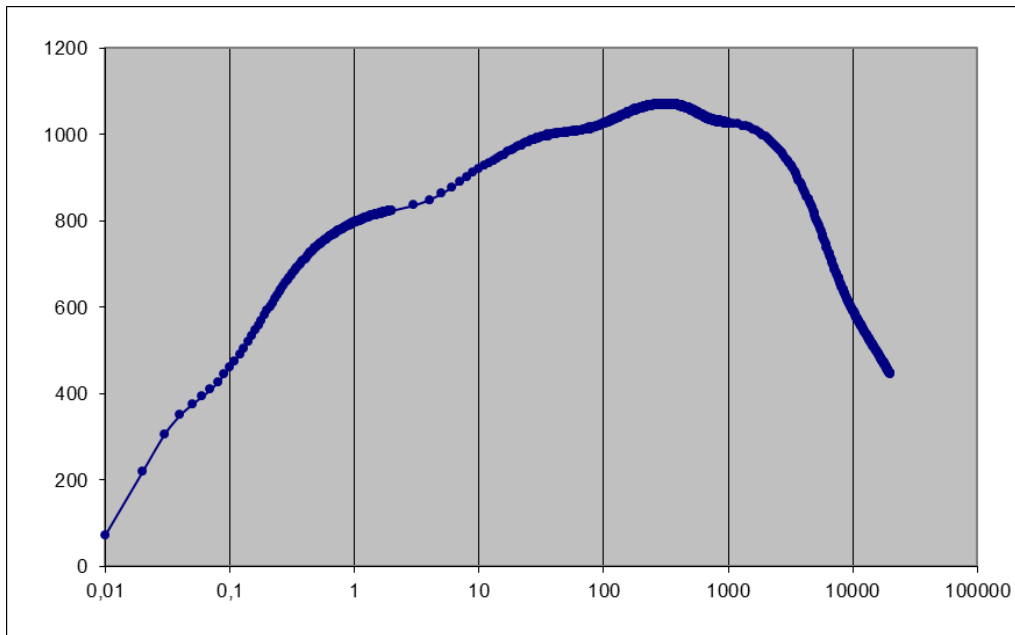
V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 5 z 5 případů, tedy u 100 %. Odchylka se vyskytla u 0 z 5 případů, tedy 0%.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Mechy		<i>Polytrichum commune</i>	ano	0,719	/
			<i>Dicranum scoparium</i>	ano	0,793	/
			<i>Leucobryum glaucum</i>	ano	0,784	/
			<i>Mnium hornum</i>	ano	0,742	/
			<i>Hypnum cupressiforme</i>	ano	0,715	/

**Tab. 4** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka měření u zástupců mechů.



**Obr. 13** Křivka fluorescenční indukce druhu *Mnium hornum*.



**Obr. 14** Křivka fluorescenční indukce druhu *Hypnum cupressiforme*.

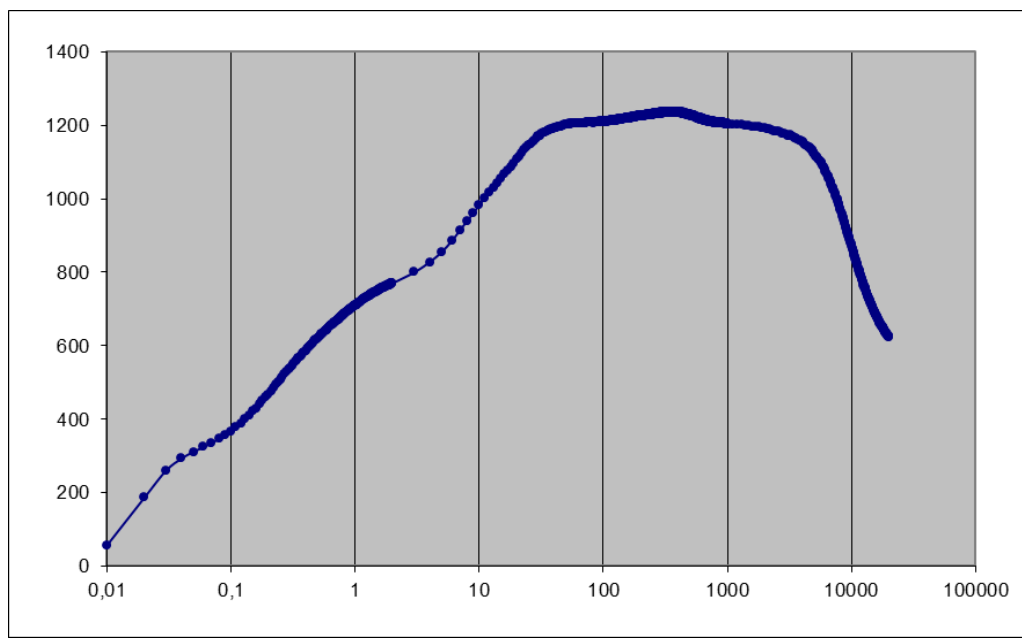
## Plavuně

U zástupců plavuní, tedy podříše Cévnaté rostliny, oddělení plavuně, jsou H a G kroky viditelné a vytvářejí ne příliš nápadnou vlnu.

V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 1 z 1 případů, tedy u 100%. Odchylka se vyskytla u 0 z 1 případu, tedy u 0%.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Plavuně		<i>Selaginella kraussiana</i>	ano	0,791	/

**Tab. 5** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka měření u zástupce plavuní.



**Obr. 15** Křivka fluorescenční indukce druhu *Selaginella kraussiana*.

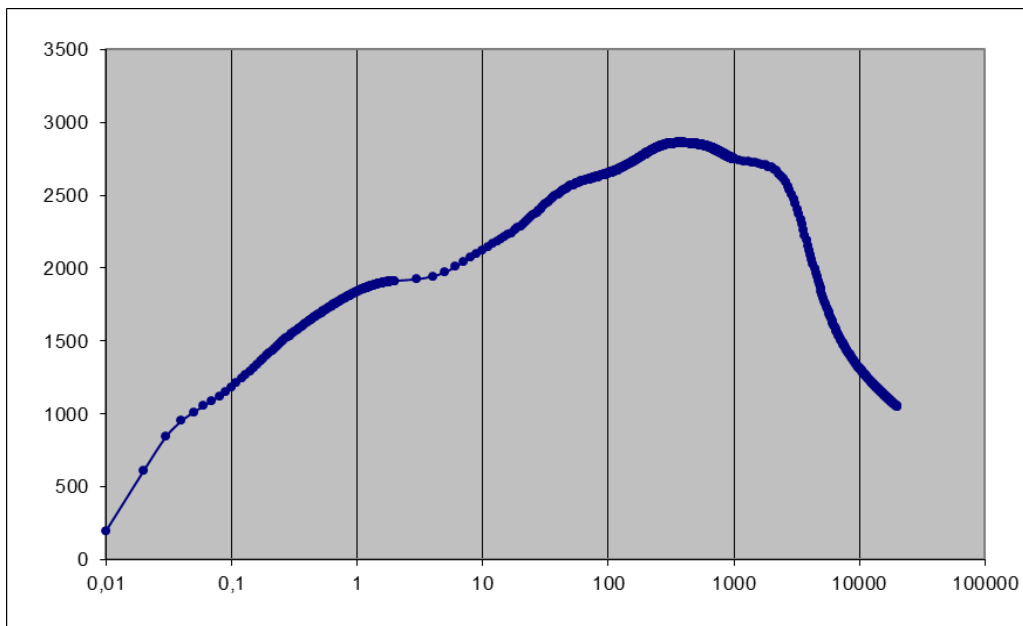
## Kapradiny

U zástupců kapradin, tedy podříše Cévnaté rostliny, oddělení kapradiny, jsou H a G kroky výrazně vykreslené, tak jako vlna, kterou ohraničují.

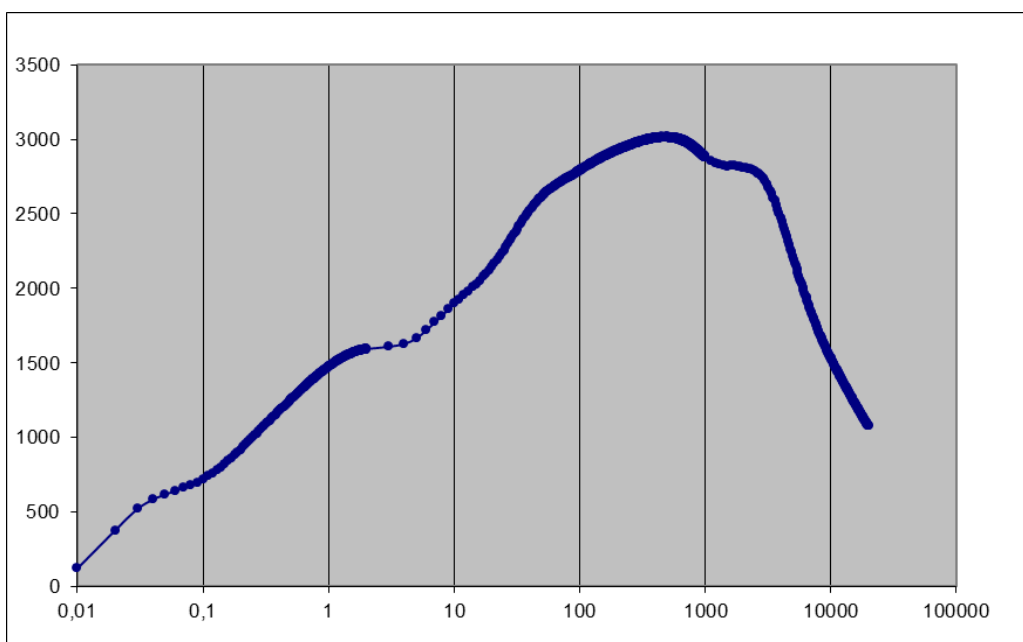
V této fylogenetické skupině se se H a G krok vyskytl u 7 z 8 případů, tedy u 87,5%. Odchylka se vyskytla u 1 z 8 případů, tedy 12,5% a mohla být způsobena environmentálními vlivy.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Kapradiny		<i>Cyathea cooperi</i>	ano	0,849	/
			<i>Arachnoides adiantiformis</i>	ano	0,828	/
			<i>Pteris cretica</i>	ano	0,701	/
			<i>Pellaea rotundifolia</i>	ano	0,814	/
			<i>Adiantum sp.</i>	ano	0,825	/
			<i>Asplenium nidus</i>	ano	0,852	/
			<i>Platyserium sp.</i>	ano	0,87	/
			<i>Homalocladium platycladum</i>	/	0,821	ano

**Tab. 6** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka měření u zástupců kapradin.



**Obr. 16** Křivka fluorescenční indukce druhu *Pteris cretica*.



**Obr. 17** Křivka fluorescenční indukce zástupce rodu *Adiantum*.

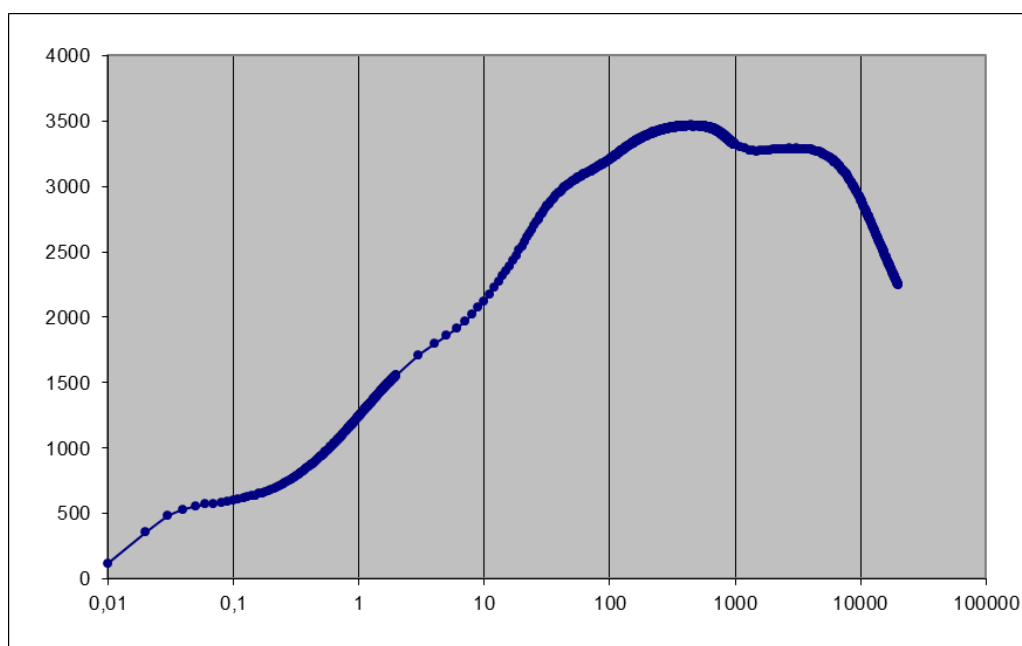
## Cykasy

U zástupců cykasů, tedy podříše Cévnaté rostliny, nadoddělení Semenné rostliny, oddělení cykasorosty, jsou H a G kroky velmi výrazně vykreslené, vlna kterou ohraničují je taktéž velmi výrazná.

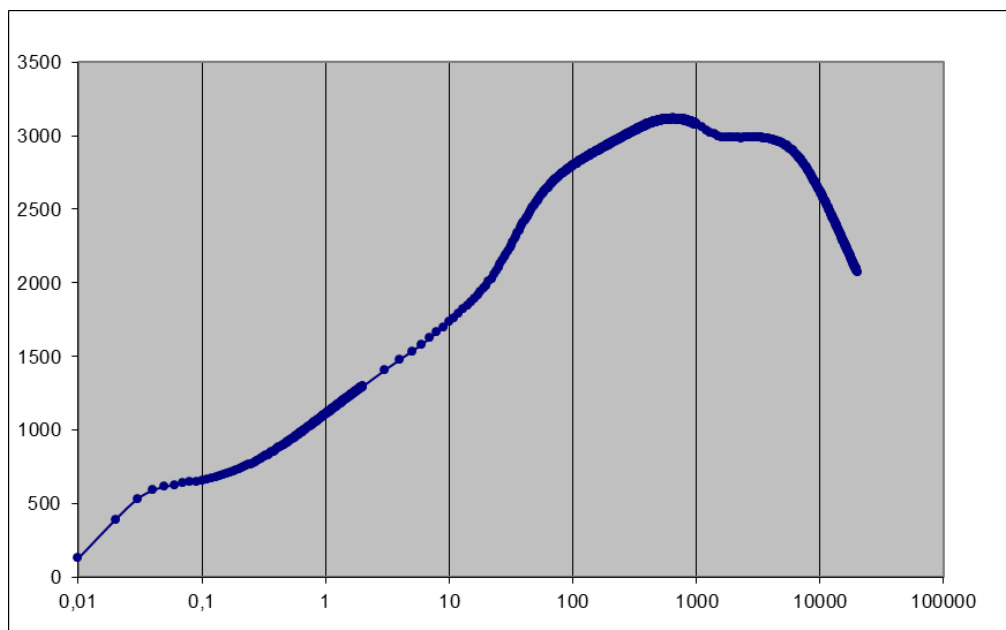
V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 4 ze 4 případů, tedy u 100%. Odchylka se vyskytla u 0 ze 4 případů, tedy u 0%.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Cykasorosty		<i>Cycas circinalis</i>	ano	0,796	/
			<i>Cycas revoluta</i>	ano	0,85	/
			<i>Dioon edule</i>	ano	0,824	/
			<i>Ceratozamia mexicana</i>	ano	0,814	/

**Tab. 7** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka měření u zástupců cykasů.



**Obr. 18** Křivka fluorescenční indukce druhu *Cycas revoluta*.



**Obr. 19** Křivka fluorescenční indukce druhu *Ceratozamia mexicana*.

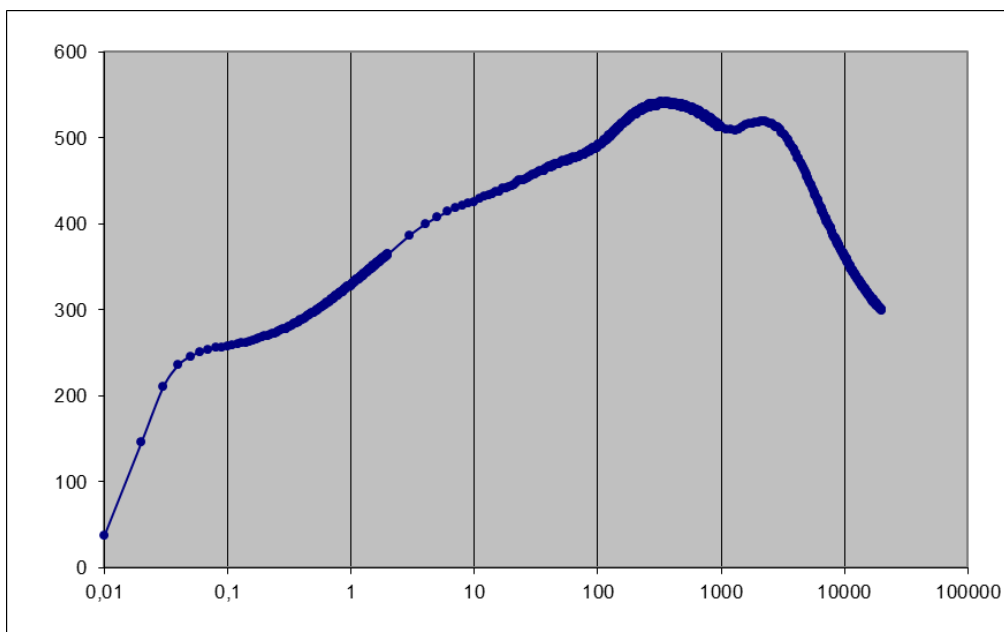
## Jehličnany

U zástupců jehličnanů, tedy nadoddělení Semenné rostliny, oddělení Nahosemenné rostliny, třída jehličnany, jsou H a G kroky velmi výrazné, zřetelně viditelná je i vlna, kterou ohraničují.

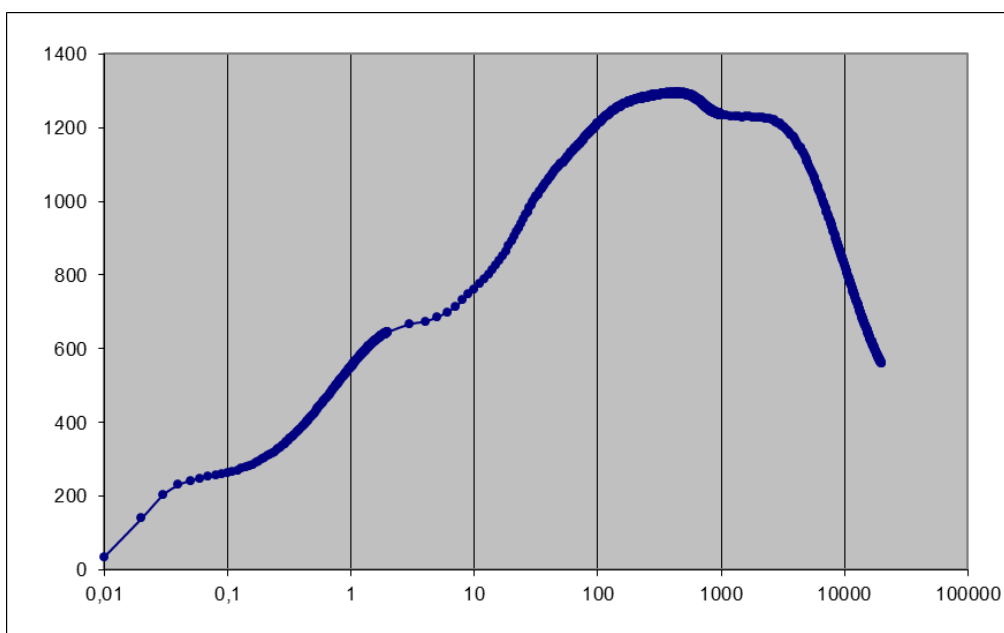
V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 5 z 5 případů, tedy u 100%. Odchylka se vyskytla u 0 z 5, tedy u 0 %.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina FV/FM	Odchylka měření
Rostliny	Nahosemenné	Jehličnany	<i>Taxus baccata</i>	ano	0,71	/
			<i>Chamaecyparis sp.</i>	ano	0,712	/
			<i>Araucaria heterophylla</i>	ano	0,83	/
			<i>Pinus sylvestris</i>	ano	0,842	/
			<i>Picea abies</i>	ano	0,836	/

**Tab. 8** Výskyt H a G kroku, Průměrná hladina FV/FM a odchylka měření u zástupců jehličnanů.



**Obr. 20** Křivka fluorescenční indukce druhu *Taxus baccata*.



**Obr. 21** Křivka fluorescenční indukce druhu *Picea abies*.

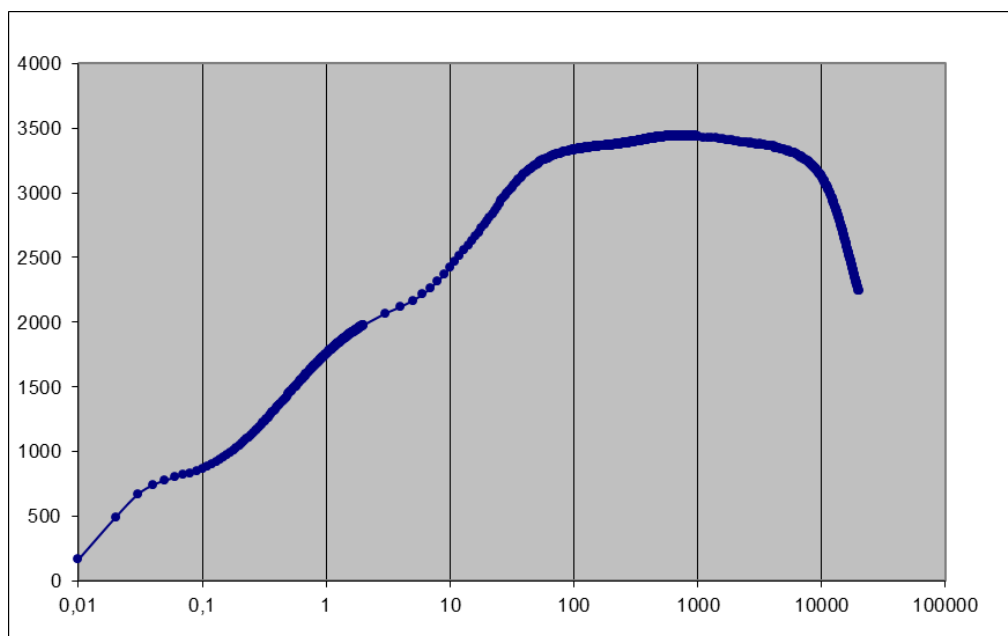
## Nižší dvouděložné

U zástupců oddělení Krytosemenné, třídy Nižší dvouděložné, se již aditivní kroky H a G nevyskytují a jejich křivka vykazuje pro vyšší rostliny charakteristický O-J-I-P přechod.

V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 0 ze 3 případů, tedy 0%. Odchylka se vyskytla u 0 ze 3 případů, tedy u 0%.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Krytosemenné	Nižší dvouděložné	<i>Nymphaea sp.</i>	/	0,849	/
			<i>Piper magnificum</i>	/	0,791	/
			<i>Laurus nobilis</i>	/	0,837	/

**Tab. 9** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka měření u zástupců třídy nižší dvouděložné.



**Obr. 22** Křivka fluorescenční indukce druhu *Piper magnificum*.



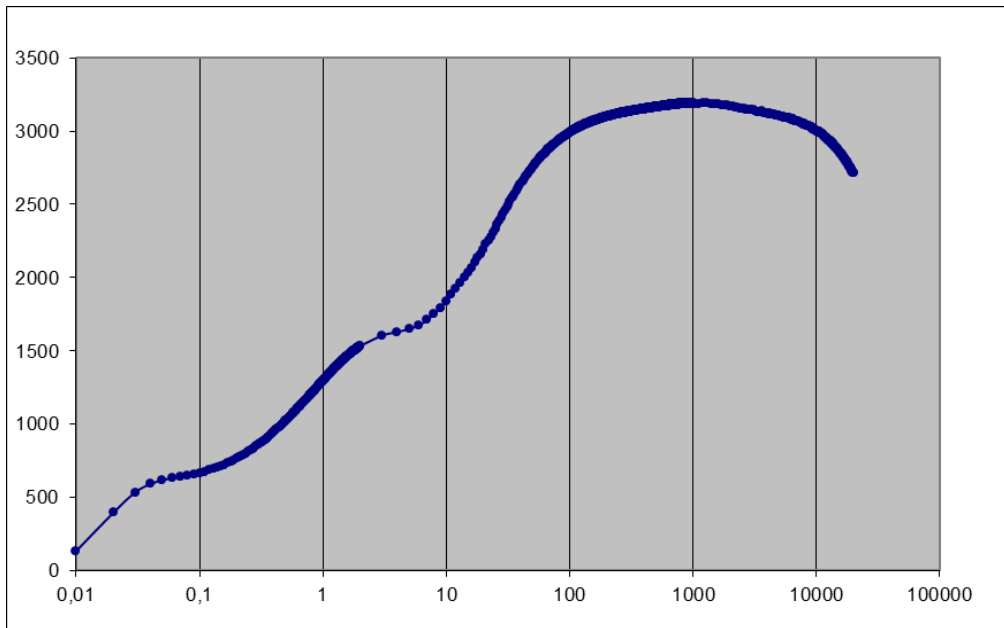
## Jednoděložné

U zástupců oddělení Krytosemenné, třídy Jednoděložné, se aditivní kroky H a G nevyskytují a jejich křivka vykazuje charakteristický O-J-I-P přechod.

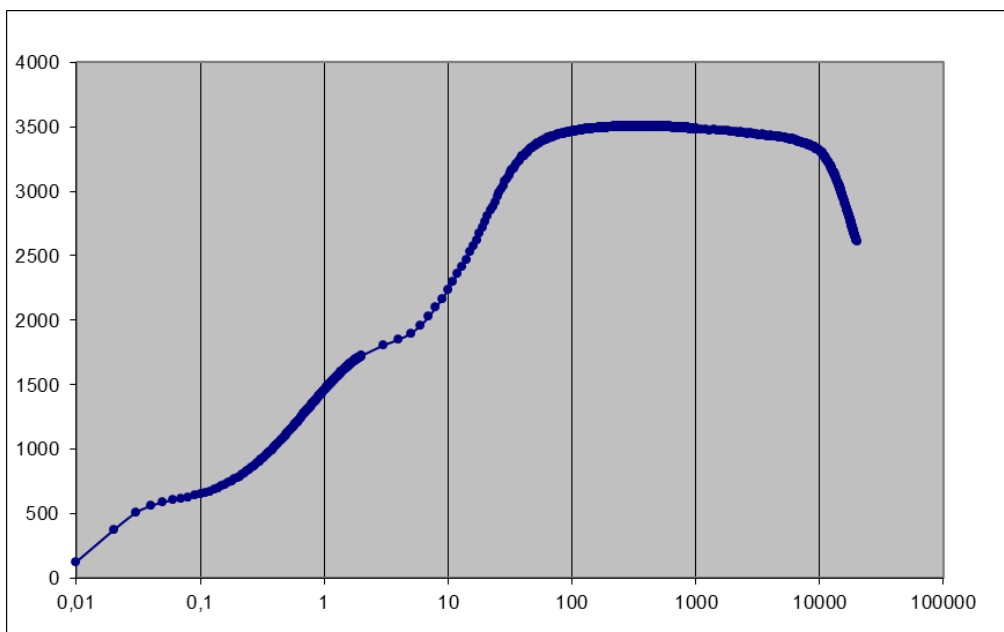
V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 0 z 25 případů, tedy u 0%. Odchylka se vyskytla u 3 z 25 případů, tedy u 12%. Odchylka mohla být způsobena environmentálními vlivy, popř. stresem.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Krytosemenné	Jednoděložné	<i>Monstera deliciosa</i>	/	0,81	ano
			<i>Spathiphyllum floribundum</i>	/	0,808	/
			<i>Zantedeschia aethiopica</i>	/	0,768	/
			<i>Anthurium coriaceum</i>	/	0,819	/
			<i>Clivia miniata</i>	/	0,77	/
			<i>Furcraea selloa</i>	/	0,842	/
			<i>Aspidistra elatior</i>	/	0,814	/
			<i>Yucca guatemalensis</i>	/	0,847	/
			<i>Chlorophytum comosum</i>	/	0,791	ano
			<i>Cordyline terminalis</i>	/	0,838	/
			<i>Agave americana</i>	/	0,843	ano
			<i>Phoenix canariensis</i>	/	0,824	/
			<i>Chamaedorea microspadix</i>	/	0,778	/
			<i>Vanilla planifolia</i>	/	0,808	/
			<i>Musa sp.</i>	/	0,839	/
			<i>Strelitzia reginae</i>	/	0,825	/
			<i>Hedychium gardnerianum</i>	/	0,817	/
			<i>Maranta leuconeura</i>	/	0,812	/
			<i>Brocchinia sp.</i>	/	0,786	/
			<i>Bromelia sp.</i>	/	0,765	/
			<i>Tillandsia usneoides</i>	/	0,788	/
			<i>Cyperus alternifolius</i>	/	0,848	/
			<i>Cyperus papyrus</i>	/	0,783	/
			<i>Arundo donax</i>	/	0,835	/
			<i>Hordeum vulgare</i>	/	0,824	/

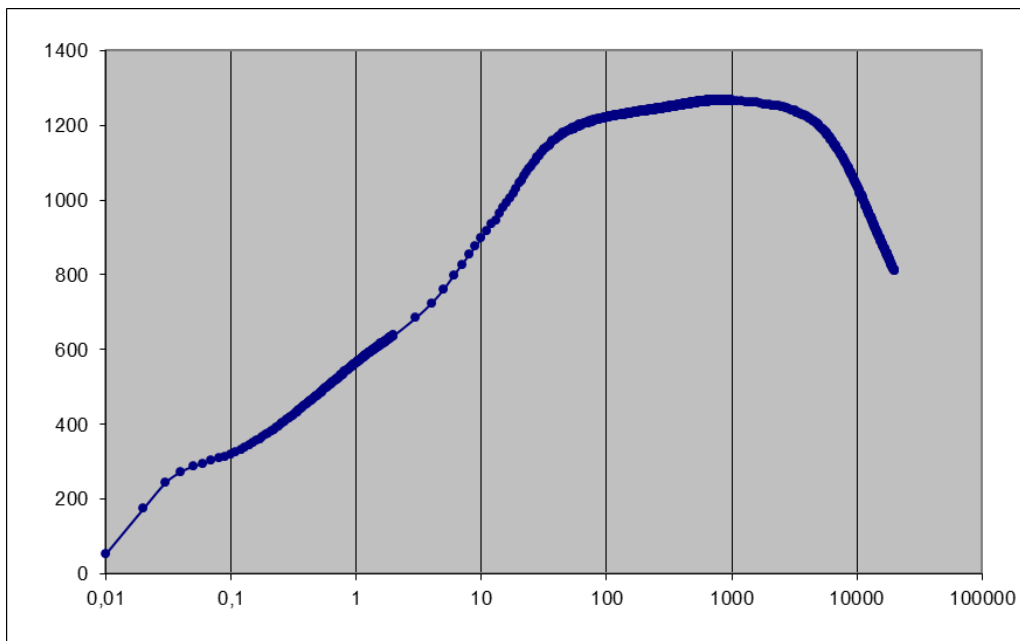
**Tab. 10** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka měření u zástupců třídy Jednoděložné.



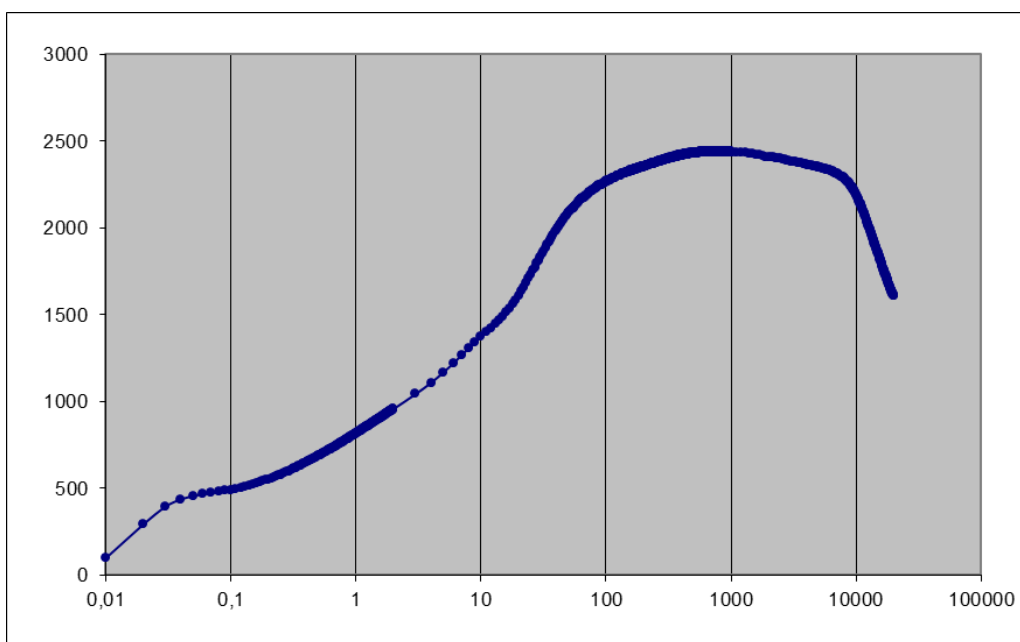
**Obr. 23** Křivka fluorescenční indukce druhu *Anthurium coriaceum*.



**Obr. 24** Křivka fluorescenční indukce druhu *Yucca guatemalensis*.



**Obr. 25** Křivka fluorescenční indukce druhu *Tillandsia usneoides*.



**Obr. 26** Křivka fluorescenční indukce druhu *Strelitzia reginae*.

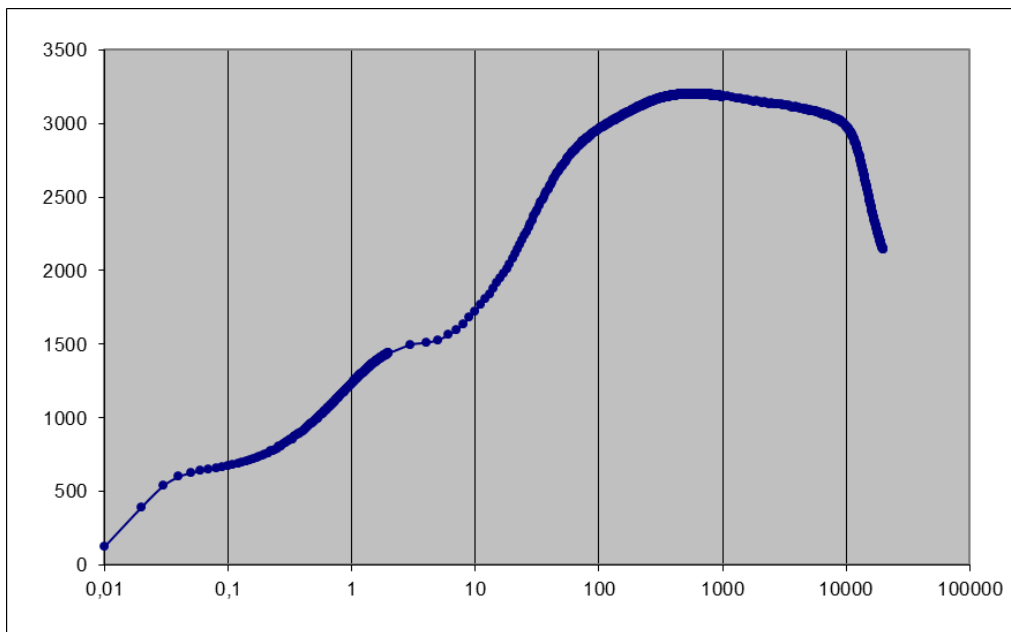
## Dvouděložné

U zástupců oddělení Krytosemenné, třídy Dvouděložné se H a G kroky nevyskytují a křivka vykazuje charakteristický O-J-I-P přechod.

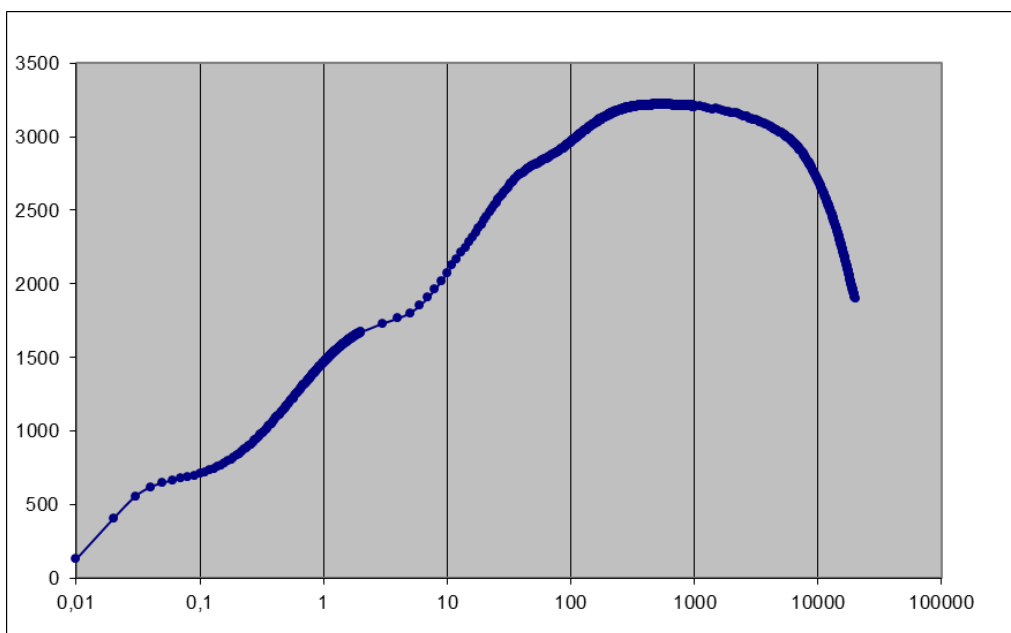
V této fylogenetické skupině se H a G krok vyskytl u 0 z 30 případů, tedy u 0%. Odchylka se vyskytla u 3 z 30 případů, tedy u 10%.

Říše	Oddělení	Třída	Latinský název	Výskyt H a G kroku	Průměrná hladina $F_V/F_M$	Odchylka měření
Rostliny	Krytosemenné	Vyšší dvouděložné	<i>Crassula sp.</i>	/	0,823	/
			<i>Eucalyptus sp.</i>	/	0,81	/
			<i>Ficus laevis</i>	/	0,803	/
			<i>Ficus elastica</i>	/	0,756	/
			<i>Ceratonia siliqua</i>	/	0,834	/
			<i>Acacia stenophylla</i>	/	0,844	/
			<i>Pisum sativum</i>	/	0,842	/
			<i>Citrus discuria</i>	/	0,83	/
			<i>Citrus madurensis</i>	/	0,698	ano
			<i>Citrus sinensis</i>	/	0,804	/
			<i>Viola hederacea</i>	/	0,827	/
			<i>Begonia sp.</i>	/	0,843	/
			<i>Carica papaya</i>	/	0,818	/
			<i>Brachychiton populneus</i>	/	0,841	/
			<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	/	0,827	ano
			<i>Tetrastigma voinierianum</i>	/	0,82	/
			<i>Nepenthes alata</i>	/	0,836	/
			<i>Iresine herbstii</i>	/	0,831	/
			<i>Bougainvillea buttiana</i>	/	0,84	/
			<i>Sarracenia leucophylla</i>	/	0,846	/
			<i>Brunfelsia pauciflora</i>	/	0,835	/
			<i>Lycianthes rantonnei</i>	/	0,853	/
			<i>Nicotiana tabacum</i>	/	0,842	/
			<i>Streptocarpus kewensis</i>	/	0,809	/
			<i>Clerodendrum thomsoniae</i>	/	0,801	/
			<i>Rosmarinus officinalis</i>	/	0,814	/
			<i>Coffea arabica</i>	/	0,809	ano
			<i>Hedera helix</i>	/	0,81	/
			<i>Schefflera arboricola</i>	/	0,819	/
			<i>Euryops pectinatus</i>	/	0,853	/

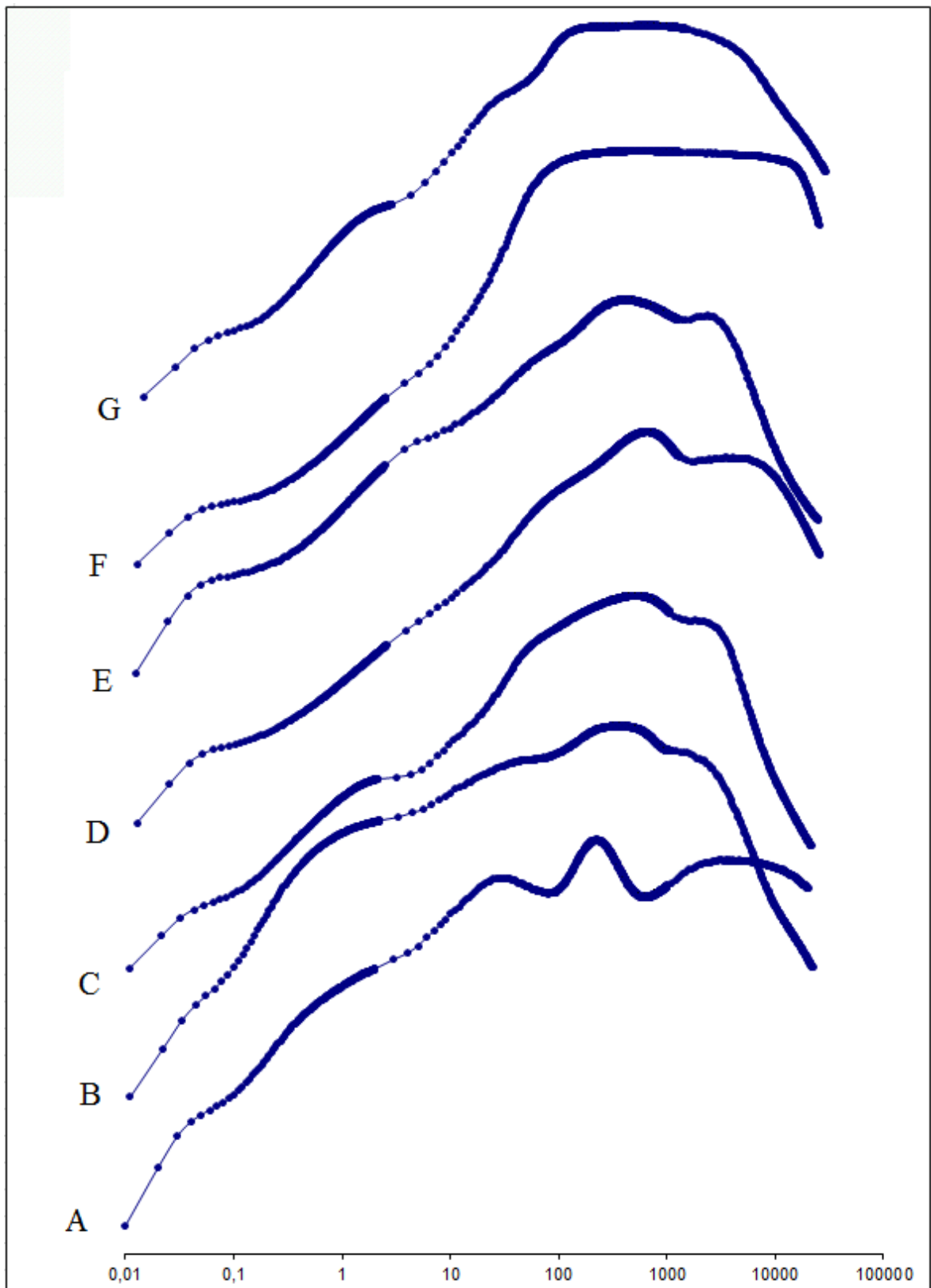
**Tab. 11** Výskyt H a G kroku, průměrná hladina  $F_V/F_M$  a odchylka u zástupců třídy Dvouděložné.



**Obr. 27** Křivka fluorescenční indukce druhu *Nepenthes alata*



**Obr. 28** Křivka fluorescenční indukce druhu *Hedera helix*



**Obr. 29** Srovnání křivek hlavních analyzovaných taxonů. A- *Xanthoria polycarpa*, zástupce lišejníků; B- *Hypnum cupressiforme*, zástupce mechů; C- *Adiantum sp.*, zástupce kapradin; D- *Cycas circinalis*, zástupce cykasorostů; E- *Taxus baccata*, zástupce jehličnanů; F- *Yucca guatemalensis*, zástupce jednoděložných; G- *Pisum sativum*, zástupce dvouděložných.

Z výše uvedených grafů a tabulek je jasně viditelné, že aditivní kroky H a G se vyskytují u všech nižších rostlin, od lišejníků až po jehličnany. Výskyt těchto kroků je spjatý především se strukturou PSI, FNR a PQ poolu.

## 2. Simultánní měření křivek fluorescenční indukce a přenosové kinetiky $I_{820}$

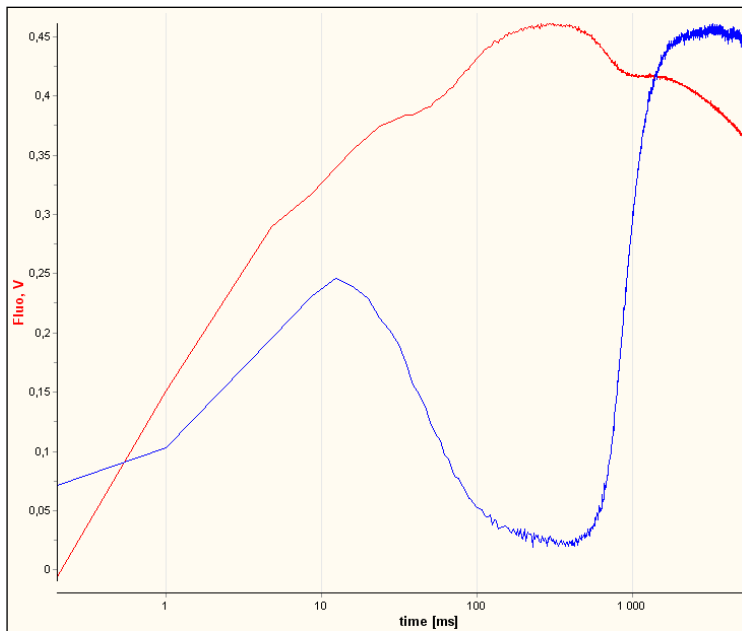
Pomocí souběžného měření fluorescenční indukce a přenosové kinetiky  $I_{820}$  jsme byli schopni nalézt závislost mezi již dříve zmíněným dipem, tedy vlnou ohraničenou aditivními kroky H a G v křivce FI a oxidačně-redukčními procesy, probíhajícími za PSI. Křivka přenosové kinetiky zobrazuje redoxní stavy komponentů P700 a PC.

U všech křivek  $I_{820}$  odráží počáteční nárůst oxidaci PC a P700 způsobenou aktivitou PSI, následný pokles poté odráží jejich redukci pomocí elektronů transportovaných z PSII. V souhlasu s hypotézami vysvětlující vznik aditivních kroků H a G a vlny mezi nimi (viz sekci 5.3) vykazují křivky  $I_{820}$  reoxidaci ve stejném čase, jako se u křivek FI vyskytuje klesající část vlny mezi H a G krokem.

Výsledky jsou tak jako v minulé sekci zpracovány do tabulky a souhrnu grafů.

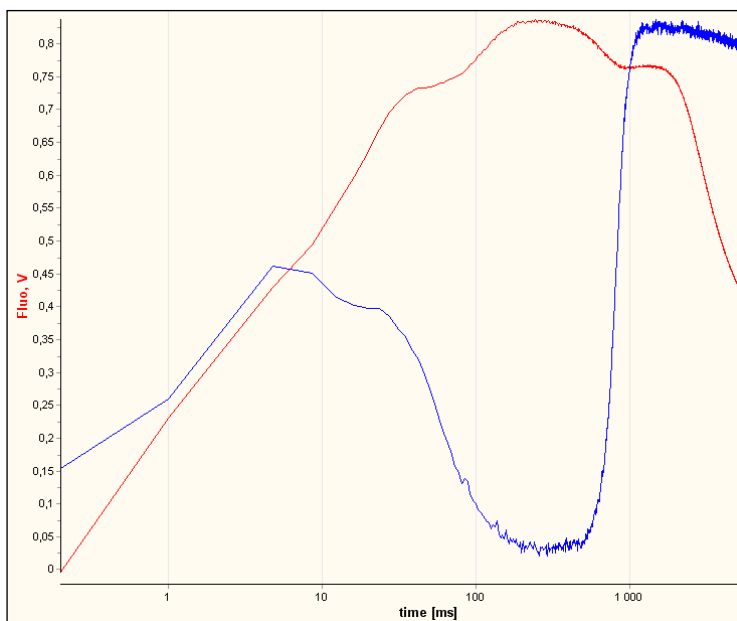
Latinský název	Taxonomická skupina	Výskyt H a G kroku	Výskyt rychlé reoxidace v $I_{820}$
<i>Hypogymnia physodes</i>	Lišejníky	ano	ano
<i>Polytrichum commune</i>	Mechy	ano	ano
<i>Hypnum cupressiforme</i>		ano	ano
<i>Leucobryum glaucum</i>		ano	ano
<i>Selaginella kraussiana</i>	Plavuně	ano	ano
<i>Cyathea cooperi</i>	Kapradiny	ano	ano
<i>Arachnoides adiantiformis</i>		ano	ano
<i>Pteris cretica</i>		ano	ano
<i>Adiantum sp.</i>		ano	ano
<i>Asplenium nidus</i>		ano	ano
<i>Cycas revoluta</i>	Cykasy	ano	ano
<i>Dioon edule</i>		ano	ano
<i>Ceratozamia mexicana</i>		ano	ano
<i>Taxus baccata</i>	Jehličnany	ano	ano
<i>Araucarya heterophylla</i>		ano	ano
<i>Pinus sylvestris</i>		ano	ano
<i>Hordeum vulgare</i>	Jednoděložné	/	/
<i>Pisum sativum</i>	Dvouděložné	/	/
<i>Nicotiana tabacum</i>		/	/

**Tab. 12** Výskyt H a G kroku zároveň s výskytem reoxidační fáze v  $I_{820}$  u vzestupně seřazených zástupců hlavních analyzovaných taxonomických skupin.



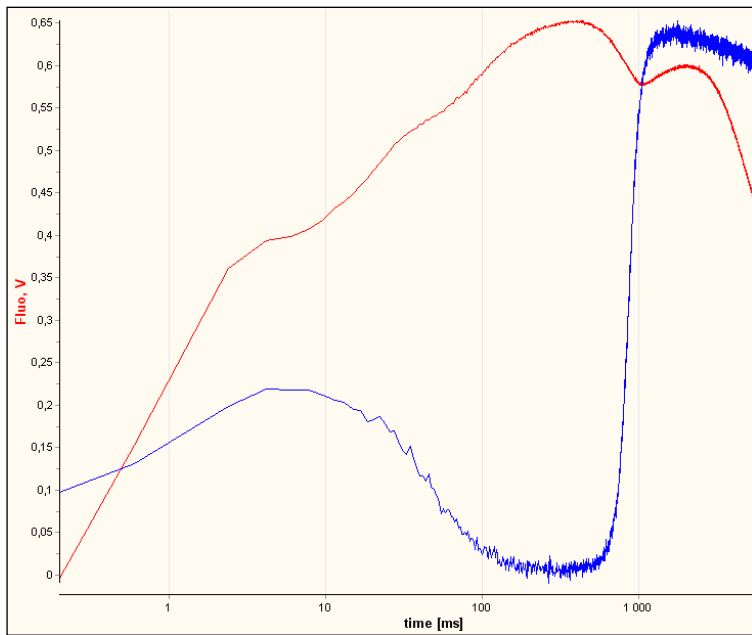
**Obr. 30** Duální křivka FI i  $I_{820}$  druhu *Leucobryum glaucum*, zástupce mechů. Křivka FI červená, stupnice vlevo, křivka  $I_{820}$  modrá, stupnice vpravo.

Jak můžeme vidět na **obr. 30**, křivka  $I_{820}$  od začátku až po asi 15 ms vzrůstá (oxidace P700 a PC), poté dochází ke zlomu a křivka klesá (redukce), až okolo 500 ms dosahuje spodní amplitudy, a následný vzrůst, tedy reoxidace P700 a PC je doprovázen poklesem v křivce FI (klesající část charakteristického dipu), avšak v čase kdy probíhá vzrůstající část dipu nedochází k žádným změnám v křivce  $I_{820}$ .

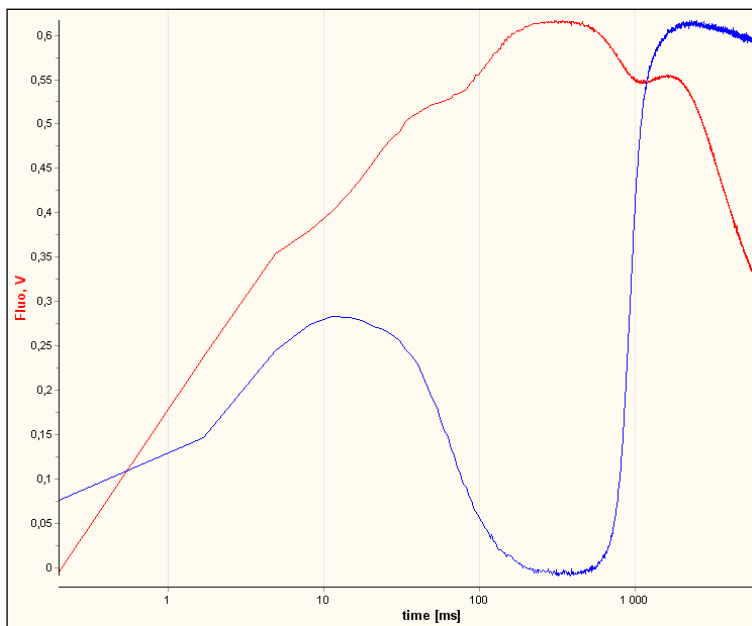


**Obr. 31** Duální křivka FI (červeně) i  $I_{820}$  (modře) druhu *Pteris cretica*.

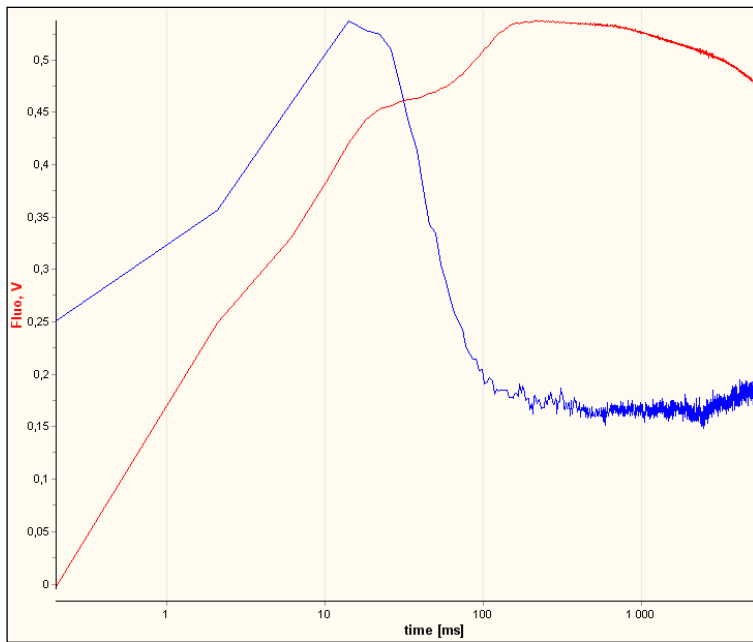




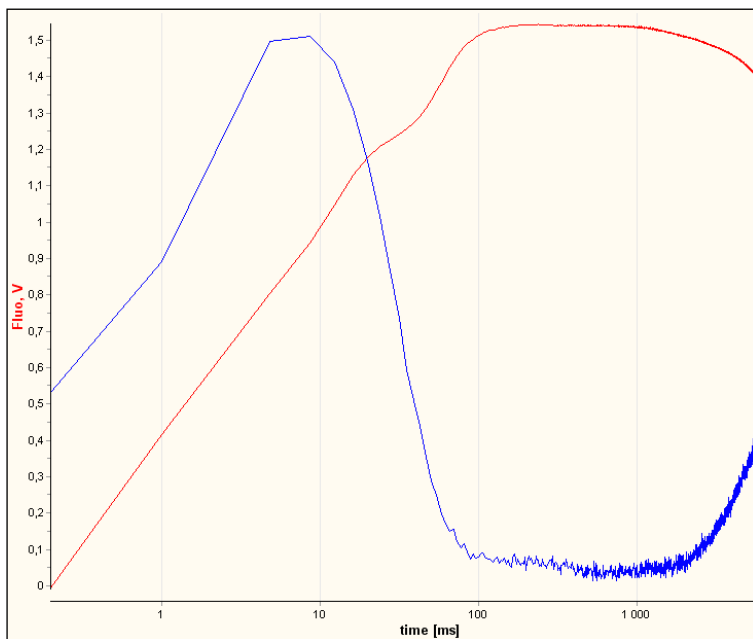
**Obr. 32** Duální křivka FI (červeně) i  $I_{820}$  (modře) druhu *Cycas revoluta*.



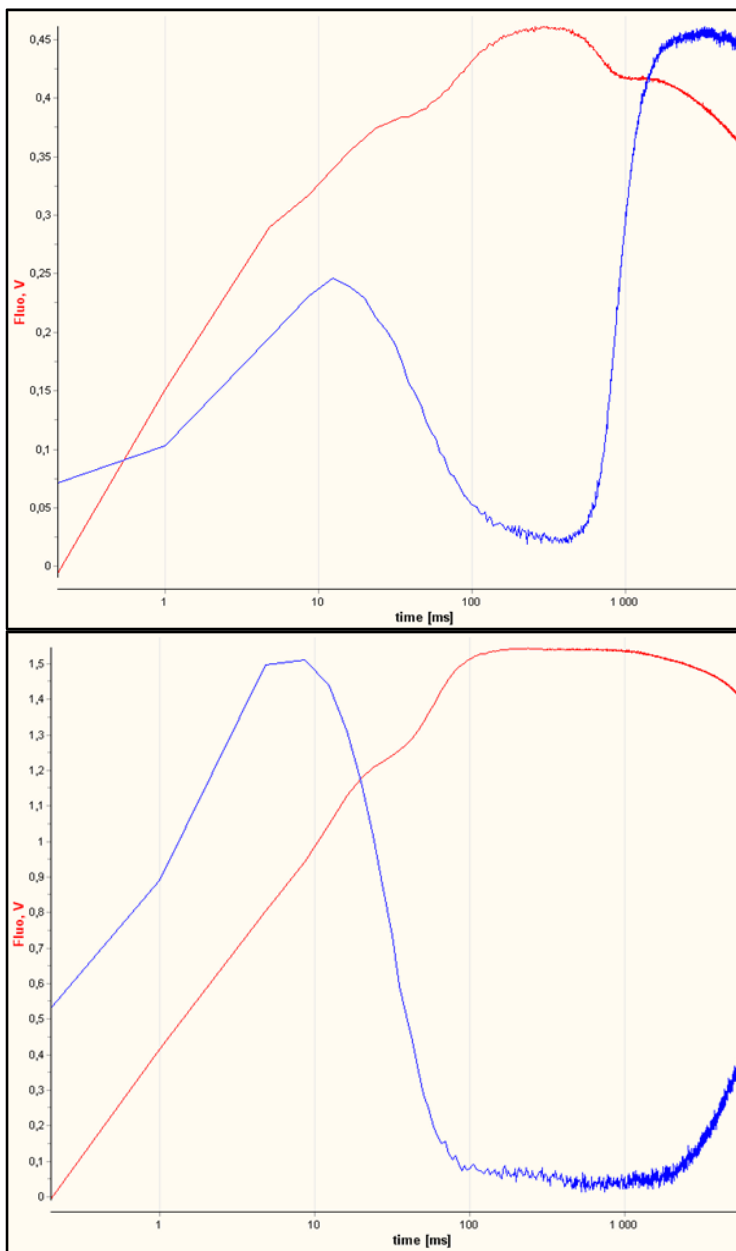
**Obr. 33** Duální křivka FI (červeně) i  $I_{820}$  (modře) druhu *Taxus baccata*.



**Obr. 34** Duální křivka FI (červeně) i  $I_{820}$  (modře) druhu *Hordeum vulgare*. První část křivky  $I_{820}$  – vzrůst vypadá podobně jako u nižších rostlin, ale následuje pouze pokles, tedy redukce. Křivka  $I_{820}$  nevykazuje žádnou výraznější rychlou reoxidační část.



**Obr. 35** Duální křivka FI (červeně) i  $I_{820}$  (modře) druhu *Pisum sativum*. Taktéž nevykazuje rychlou reoxidační část.

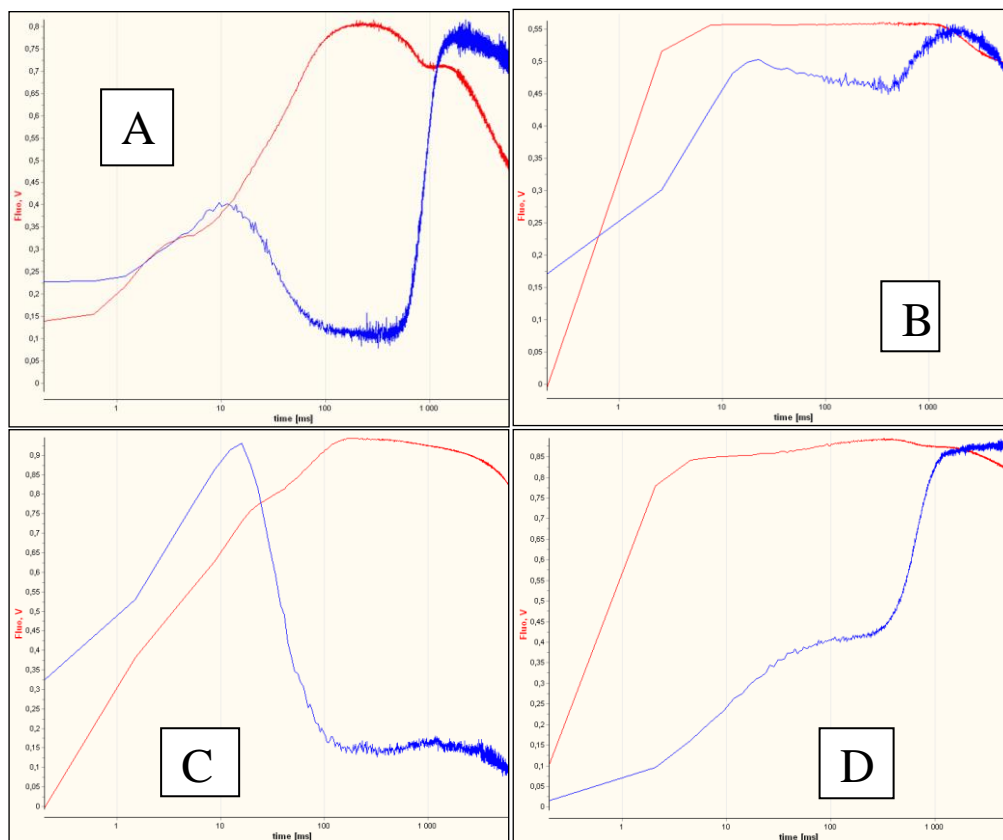


**Obr. 36** Srovnání duálních křivek druhu *Leucobryum glaucum*, zástupce mechů (nahore) a druhu *Pisum sativum*, zástupce vyšších dvouděložných rostlin.

Pokud srovnáme duální křivky nižších a vyšších rostlin, viz **obr. 36**, můžeme vidět, že asi do 100 ms, mají sice rozdílnou intenzitu, ale podobný tvar. Je zde však na první pohled vidět, že u křivky  $I_{820}$  mechu dochází od asi 500 ms k rapidní reoxidaci, což vede k poklesu intenzity fluorescence, zatímco u dvouděložné rostliny zůstává P700 redukován a intenzita fluorescence se v podstatě nemění. Tyto křivky ukazují, že u nižších rostlin trvá blokáce elektronů způsobená přechodovým zablokováním akceptorové strany PSI mnohem kratší čas, než je tomu u rostlin vyšších.

### 3. Simultánní měření křivek fluorescenční indukce a přenosové kinetiky $I_{820}$ u vzorků ošetřených DCMU

U druhů *Hordeum vulgare* a *Pinus sylvestris* byla duální měření provedena po předchozím ošetření roztokem DCMU, který byl do rostlinného vzorku infiltrován za sníženého tlaku.



**Obr. 37** Srovnání duálních křivek druhů *Pinus sylvestris* (A, B) a *Hordeum vulgare* (C, D) ošetřených deionizovanou vodou a DCMU. Křivky A a C byly měřeny u vzorků, do kterých byla infiltrována voda a mají totožný průběh jako ty měřené dříve. Naopak křivky B a D byly měřeny u vzorků s infiltrovaným DCMU.

Pokud srovnáme naměřené duální křivky **obr. 37**, vidíme, že infiltrace vody do vzorku nemá na tvar a průběh křivek téměř žádný vliv. Jak už bylo zmíněno dříve, DCMU je inhibitor elektronového transportu mezi molekulami  $Q_A$  a PQ z PQ poolu. Jak můžeme vidět z křivek B a D na **obr. 37** při ošetření DCMU dochází k prudkému fluorescenčnímu nárůstu (červená křivka FI) a k maximálnímu nasycení fluorescence přibližně v pozici J kroku. Tím že DCMU blokuje jakoukoliv redukci, dochází k částečnému potlačení dipu i aditivních kroků H a G v části B. Na křivkách  $I_{820}$  v části B a D tak proto můžeme vidět především oxidaci, nebo jen nepatrnou redukční část s poklesem. Absence redukční fáze je způsobena je způsobena absencí elektronů z PSII, které v normálním stavu redukují PSI.

## Závěr a diskuze

V této práci byl sledován výskyt charakteristické vlny a aditivních kroků H a G v křivce fluorescenční indukce. Touto problematikou se u lišejníků vlastnících řasu *Trebouxia* jako svůj fotobiont zabývali detailně Ilík et al. (2006). Díky téměř minimálním odchylkám tato práce dokonale potvrzuje, že specifická vlna se vyskytuje převážně u nižších rostlin, konkrétně lišejníků, mechorostů, plavuní, kapradin a jehličnanů. Po jehličnanech přichází zlom, jelikož u nižších dvouděložných rostlin již vlna nebyla zaznamenána. Bohužel, vzhledem k podmínkám měření, nebylo možné detailně vystopovat, u kterých zástupců se vlna částečně objevuje a u kterých ne, jelikož rostlinný materiál byl značně omezen.

Podle dřívějších výzkumů byla specifická vlna v podobných časech dokázána u lišejníků, dírkonožců a některých stresovaných vyšších rostlin <sup>[7]</sup>. Avšak naše práce, jako cílená analýza fylogenetického systému ukázala, že aditivní kroky H a G i specifická vlna se objevují u daleko většího počtu nižších rostlinných druhů a proto stojí za další, detailnější výzkum.

Simultánním měřením křivek fluorescenční indukce i přenosové kinetiky v 820-nm a měřením při ošetření DCMU bylo dokázáno, že výskyt vlny závisí především na kinetice transportu elektronů fotosystémem I, která se v průřezu fylogenetického systému různí, a dále také závisí na rychlosti redoxních dějů v PQ poolu a rozdílné aktivaci FNR. Při sledování první, klesající části zmiňované specifické vlny, jsme došli ke stejnému závěru jako Ilík et al. (2006), tedy že tato část je způsobena rapidní reoxidací fotosystému I elektrony produkovanými ve fotosystému II. Tato reoxidace je aktivována pravděpodobně rychlou aktivací FNR. FNR je ve tmě inaktivní enzym, který je rapidně aktivovaný světlem. U vyšších rostlin je odtok elektronů od PSI pomalý, graduální proces. Dochází tedy k tomu, že elektronový transportní řetězec je stále redukován a nemůže být rapidně zoxidován předešlým elektronovým transportem, tak jako je tomu u vývojově nižších rostlinných skupin. Dalším faktem je, že vzrůstající část specifické vlny do kroku G nekoreluje s křivkou  $I_{820}$ , tedy ani s redoxními stavy P700 a PC. Proto tedy tato vzrůstající část neodráží blokaci elektronů na hladině PSI, tak jako je tomu při I-P nárůstu ve FLR (viz sekci 5.2). Jelikož Ilík et al. (2006) ve své práci vyloučili vliv CEF a změnu pH lumenu na specifickou vlnu, je opravdu možné, že jejich domněnka vzniku této vlny nerovnováhou mezi PSII a PSI vyvolanou rychlou aktivací akceptorové strany PSI může být pravdivá. S největší pravděpodobností se však zde jedná o reredukci PQ poolu.

Velice důležitým faktorem při měření byla také výše hladiny  $F_V/F_M$ . Její velikost až tak nesouvisí s fylogenetickým postavením vzorku, i když se u některých taxonů může různit, ale přímo závisí na environmentálních faktorech prostředí, např. dostatku živin, vody, světla atd. Pokud se u vzorku hladina  $F_V/F_M$  rapidně sníží, znamená to, že rostlina je silně stresovaná a fotochemické procesy jsou utlumeny. Např. W. W Adams III et al. (2002) zjistili, že u jehličnanů dochází k sezónním změnám v kapacitě fotosyntetického elektronového transportu a tím i ke změnám v  $F_V/F_M$  v závislosti na ročním období.

Obecně se dá říci, že měřením fluorescenční indukce a např. hladiny  $F_V/F_M$ , jako jednoho z jejích parametrů, můžeme získat detailní informace o struktuře rostlinného fotosyntetického systému, o celkové fyziologii rostliny a jejím momentálním stavu. Informace získané analýzou naměřených dat, mohou být použity v mnohých, nově se rozvíjejících oborech. Například hladina  $F_V/F_M$  může být základem pro precizní zemědělství, kdy na základě měření fluorescenčního výtěžku při různých environmentálních faktorech potlačíme jakékoliv vnější negativní účinky, čímž zvýšíme výnos rostliny. V budoucnu budou moci být informace o reakcích rostliny na vnější faktory podkladem pro genové inženýrství a pěstování odolnějších, popř. výnosnějších mutantů. V rámci nastíněných výsledů by se teoreticky měření křivek fluorescenční indukce mohlo používat k systematickému rozřazování rostlin do jednotlivých taxonů, což by vzhledem k minimálním rozdílům určitých křivek bylo velice nepřesné. Systematického třídění pomocí rozdílné fluorescenční intenzity by mohlo být využito v již zmíněném precizním zemědělství, kdy bylo při plošném měření teoreticky možné rozlišit pěstovanou rostlinu a plevel.

Měření fluorescenční indukce chlorofylu může být taktéž zařazeno jako doplňková kapitola učiva středních škol, především botaniky a fyziologie rostlin, při probírání fotosyntézy a světelných dějů nebo i ve fyzice, v rámci optiky a světla.

## Seznam použitých zkratk

A <sub>515</sub>	Absorpční signál měřený v 515 nm
ATP	Adenosintrifosfát
cyt	Cytochrom
DBMIB	2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl- <i>p</i> -benzochinon
DCMU	3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea; Diuron
DF	Zpožděná fluorescence ( <i>Delayed fluorescence</i> )
F <sub>0</sub>	Minimální fluorescence Chl <i>a</i>
FAR	Fotosynteticky aktivní záření
FI	Fluorescenční indukce (FLR i fluorescenční pokles)
FLR	Nárůst fluorescence Chl <i>a</i>
F <sub>M</sub>	Maximální fluorescence Chl <i>a</i>
F <sub>V</sub>	Variabilní fluorescence (= F <sub>M</sub> -F <sub>0</sub> )
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	Maximální kvantový výtěžek fotochemie v PSII
Chl	Chlorofyl
Chl*	Excitovaný stav chlorofylu
I <sub>820</sub>	Signál přechodové kinetiky měřený v 820 nm
LHA	Chlorofyl obsahující světlo-sběrnou anténu
MV	Methylviologen
NADP	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NH <sub>2</sub> OH	Hydroxylamin
O, K, J (=I1), I (=I2), H, G, P	Jednotlivé kroky ve FLR
OEC	Komplex vyvíjející kyslík ( <i>Oxygen-envolving complex</i> )
P680	Primární elektronový donor v PSII
<sup>3</sup> P680*	Tripletový excitovaný stav P680
P700	Primární elektronový donor v PSI
PAM	Pulsní amplitudová modulace
PC	Plastocyanin
PEA	Analyzátor rostlinné výkonosti ( <i>Plant efficiency analyz.</i> )
Pheo	Primární el. akceptor v PSII, pheofytin, v D1 proteinu

Pheo2	Pheofytin lokalizovaný v D2 proteinu
PQ	Plastochinon
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosytém II
Q <sub>2</sub>	Komponent v PSII
Q <sub>A</sub>	První chinonový el. akceptor v PSII
Q <sub>B</sub>	Druhý chinonový el. akceptor v PSII
RCII	Reakční centrum PSII
Sn (n= 0, 1, 2, 3)	S-stavy excitace
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSTM	Three-state trapping model
Y <sub>Z</sub>	Tyrosin 161 D1 proteinu



## Reference

## Literatura

- [1] Amarendra Narayan Misra, Meena Misra and Ranjeet Singh (2012). Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology, in: Biophysics, Dr. Prof. Dr. A.N. Misra (Ed.), ISBN: 978-953-51-0376-9, InTech, str. 171-178 Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biophysics/chlorophyll-fluorescence-in-plant-biology>
- [2] Bruce D, Samson G, Carpenter C (1997) The origins of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. Direct quenching by P680<sup>+</sup> in photosystem II enriched membranes at low pH. *Biochemistry* 36, str. 749–755. doi: 10.1021/bi962216c
- [3] Goltsev V, Chernev P, Zaharieva I, Lambrev P, Strasser RJ (2005) Kinetics of delayed chlorophyll *a* fluorescence registered in milliseconds time range. *Photosynthesis Research* 84, str. 209–215. doi: 10.1007/s11120-004-6432-2
- [4] Goltsev V, Yordanov I (1997) Mathematical model of prompt and delayed chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica* 33, str. 571–586.
- [5] Goltsev V, Zaharieva I, Lambrev P, Yordanov I, Strasser R (2003) Simultaneous analysis of prompt and delayed chlorophyll *a* fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation. *Journal of Theoretical Biology* 225, str. 171–183. doi: 10.1016/S0022-5193(03)00236-4
- [6] Govindjee (2004). Chlorophyll *a* fluorescence: a bit of basics and history, in: G.C.Papageorgiou, Govindjee (Eds.), Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, str. 1–41
- [7] Ilík, P.; Schansker, G.; Kotabova, E.; Vaczi, P.; Strasser, R.J. & Bartak, M. (2006). A dip in the chlorophyll fluorescence induction at 0.2–2 s in *Trebouxia*-possesing lichens reflects a fast reoxidation of photosystem I. A comparison with higher plants, *Biochim Biophys Acta*, 1757, str. 12–19
- [8] Lazár D. (2003) Chlorophyll *a* fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology* 220, str. 469–503. doi: 10.1006/jtbi.2003.3140
- [9] Lazár D., Tomek P, Ilík P, Nauš J (2001) Determination of the antenna heterogeneity of photosystem II by direct simultaneous fitting of several fluorescence rise curves measured with DCMU at different light intensities. *Photosynthesis Research* 68, str. 247–257. doi: 10.1023/A:1012973402023
- [10] Lazár, D., The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light, *Funct. Plant Biol.* 33 (2006) str. 9–30.
- [11] Munday JC Jr, Govindjee (1969) Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* *in vivo*. III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophysical Journal* 9, str. 1–21.

- [12] Noomnarm, U. & Clegg, R. (2009). Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations, *Photosynthesis Research*, 101, str. 181-194
- [13] Samson G, Bruce D (1996) Origins of the low yield of chlorophyll *a* fluorescence induced by single turnover flash in spinach thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1276**, str. 147-153
- [14] Schansker G, Srivastava A, Govindjee, Strasser RJ (2003) Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Functional Plant Biology* **30**, str. 785-796.
- [15] Schansker G, Toth SZ, Strasser RJ (2005) Methylviologen and dibromorhymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta* **1706**, str. 250-261.
- [16] Schreiber U (2002) Assessment of maximal fluorescence yield: donor-side dependent quenching and QB-quenching. In 'Plant spectrofluorometry: applications and basic research'. (Eds O van Kooten, JFH Snel) str. 23-47. (Rozenberg Publishers: Amsterdam)
- [17] Schreiber U (2004) Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In 'Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis'. (Eds GCPapageorgiou, Govindjee) str. 279-319. (Springer: Dordrecht)
- [18] Schreiber U., Neubauer C. (1990) O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* **25**, str. 279-293. doi: 10.1007/BF00033169
- [19] Stirbet A, Strasser RJ (1995) Numerical simulation of the *in vivo* fluorescence in plants. In 'First international symposium on mathematical modelling and simulation in agriculture and bioindustries. Vol. 1. str. I.B.2 1-6. (Free University of Brussels: Brussels)
- [20] Stirbet A., Govindjee, On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* (2011), str. 1-5, 10-14, doi:10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010
- [21] Strasser BJ (1997) Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynthesis Research* **52**, str. 147-155. doi: 10.1023/A:1005896029778
- [22] Strasser RJ, Govindjee (1991) The *F*<sub>0</sub> and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae. In: Regulation of chloroplast biogenesis. (Ed. JH Argyroudi-Akoyunoglou) str. 423-426. (Plenum Press: New York)
- [23] Strasser RJ, Strasser BJ (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In Photosynthesis: from light to biosphere. Vol. V. (Ed. P Mathis) str. 977-980. (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht)
- [24] Strasser, R.J.; Srivastava, A. & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, in: M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (Eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, Taylor and Francis, London, UK, str. 445-460, 475-480
- [25] Strasser, R.J.; Tsimilli-Michael, M. & Srivastava, A. (2004). Analysis of the chlorophyll fluorescence transient, in: G.C. Papageorgiou, Govindjee (Eds.), Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, str. 321-362
- [26] Vredenberg WJ (2004) System analysis and photoelectrochemical control of chlorophyll fluorescence in terms of trapping models of photosystem II: a challenging view. In Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis. (Eds GC Papageorgiou, Govindjee) str. 133-172. (Springer: Dordrecht)

- [27] Zaharieva I, Goltsev V (2003) Advances on photosystem II investigation by measurement of delayed chlorophyll fluorescence by a phosphorescopic method. *Photochemistry and Photobiology* **77**, str. 292-298. doi: 10.1562/0031-8655(2003)077<0292:AOPHIB >2.0.CO;2
- 

## Obrazové přílohy

- [A] **Obr. 1**  
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/imagesfluorescenceintrofigure1.jpg>  
<http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/images/excitationemissionfigure2.jpg>  
(Převzato dne 25. 1. 2014, poslední revize 1. 3. 2014)
- [B] **Obr. 2**  
[http://www.flex-photosyn.ca/Photos/Photosynthesis\\_Process\\_\(400x266\).jpg](http://www.flex-photosyn.ca/Photos/Photosynthesis_Process_(400x266).jpg)  
(Převzato dne 28. 1. 2014, poslední revize 1. 3. 2014)
- [C] **Obr. 3**  
[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/18/Thylakoid\\_membrane.png/800px-Thylakoid\\_membrane.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/18/Thylakoid_membrane.png/800px-Thylakoid_membrane.png)  
(Převzato dne 20. 12. 2013, poslední revize 1. 3. 2014)
- [D] **Obr. 4**  
Amarendra Narayan Misra, Meena Misra and Ranjeet Singh (2012). Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology, in: Biophysics, Dr. Prof. Dr. A.N. Misra (Ed.), ISBN: 978-953-51-0376-9, InTech, str. 177, Dostupné z:  
<http://www.intechopen.com/books/biophysics/chlorophyll-fluorescence-in-plant-biology>  
(Převzato dne 28. 1. 2014, poslední revize 1. 3. 2014)
- [E] **Obr. 5**  
Lazár, D., The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light, *Funct. Plant Biol.* 33 (2006) str. 20
- [F] **Obr. 6**  
<http://hansatech-instruments.com/products/introduction-to-chlorophyll-fluorescence/continuous-excitation-chlorophyll-fluorescence/handy-pea/>  
(Převzato 15. 2. 2014, poslední revize 1. 3. 2014)
- [G] **Obr. 7**  
<http://www.hansatech-instruments.com/wp-content/uploads/2013/07/parameters-measured.png>  
(Převzato 15. 2. 2014, poslední revize 1. 3. 2014)
- [H] **Obr. 8**  
[http://www.walz.com/products/chl\\_p700/dual-pam-100/introduction.html](http://www.walz.com/products/chl_p700/dual-pam-100/introduction.html)  
(Převzato 18. 2. 2014, poslední revize 1. 3. 2014)
- [I] **Obr. 9**  
<http://5e.plantphys.net/image.php?id=543>  
(Převzato 20. 2. 2014, poslední revize 1. 3. 2014)

**Obr. 10 – 37** vlastní.