



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Zhášení fluorescence chlorofylu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jan Soukop
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Barbora Arnoštová
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jan Soukop
Název práce	Zhášení fluorescence chlorofylu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Barbora Arnoštová
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

V rámci teoretické části bakalářské práce bude popsána fluorescence, přístroje a způsob jejich využití k měření fluorescence, fluorescence chlorofylu a její praktické využití. Dále budou popsány chemické látky způsobující zhášení fluorescence chlorofylu a DCMU, látka, která zvyšuje hodnoty fluorescence chlorofylu. V praktické části bude provedeno měření propustnosti a odrazivosti listů rostlin tabáku virginského *Nicotiana Tabacum* při tlakové infiltraci vybranými látkami (DCMU, DCBQ DMBQ, Lawson, TMB) o různých koncentracích a následné vyhodnocení poklesu či zvýšení oproti hodnotám propustnosti a odrazivosti nativního vzorku. Získaná data odrazivosti a propustnosti budou použita pro simulace absorpčního a rozptylového koeficientu, které budou vyhodnoceny v grafech.

Klíčová slova	zhášeče, chinony, DCMU, fluorescence, chlorofyl,
Počet stran	51
Počet příloh	-
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jan Soukop
Title of thesis	Quenching of chlorophyll fluorescence
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Barbora Arnoštová
The year of presentation	2018
Abstract	

The theoretical part of this bachelor thesis is focused on the knowledge of fluorescence, instruments designed for measuring fluorescence, chlorophyll fluorescence and its practical usage. Secondly, the theoretical part is focused on substances that cause chlorophyll fluorescence quenching. In the opposite, this thesis focuses on DCMU, which causes increase in chlorophyll fluorescence. The experimental part deals with measuring reflectance and transmittance of *Nicotiana Tabacum* leaves, which were infiltrated with selected substances (DCMU, DCBQ, DMBQ, Lawsone, TMB) with various concentrations. Values of reflectance and transmittance will be used for simulations of absorption and scattering coefficients, which will be evaluated in graphs.

Keywords	quenching, quinones, DCMU, chlorophyll fluorescence, fluorescence
Number of pages	51
Number of appendices	-
Language	Czech (English)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením Mgr. Barbory Arnoštové, pouze za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval Mgr. Barboře Arnoštové za cenné rady, profesionální přístup a odborné vedení bakalářské práce.

Seznam zkratek

A	Absorpce
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
DCBQ	2,6-dichloro-1,4-benzochinon
DCMU	3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea
DMBQ	2,5-dimethyl-p-benzochinon
Chl a	Chlorofyl a
MCPT	Monte Carlo photon Transport
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PQ	Plastochinon
Q _A	Chinon A
Q _B	Chinon B
R	Odrazivost
ROS	Reaktivní formy kyslíku
T	Propustnost
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UV	ultrafialové záření

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část	10
2.1. Spektra odrazivosti a propustnosti	10
2.1.1. Odrazivost	10
2.1.2. Transmittance.....	10
2.1.3. Absorpce	11
2.1.4. Lambert-Beerův zákon	11
2.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu	11
2.3. Fluorescence.....	12
2.5. DCMU.....	15
2.6. Zhášení fluorescence	16
2.6.1. Zhášeče fluorescence	16
2.6.2. 2,6-dichloro-1,4-benzochinon.....	16
2.6.3. 2-hydroxy-1,4-naftachinon	17
2.6.4. 2,5-Dimethyl-p-benzochinon.....	19
2.6.5. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidín	19
3. Experimentální část.....	20
3.1. Místo pokusu.....	20
3.2. Biologický materiál.....	20
3.3. Použité chemikálie	20
3.4. Příprava koncentrační řady ethanolu.....	20
3.5. Měření	21
3.5.1. Měření odrazivosti a propustnosti	21
3.5.2. Infiltrace listu	22
3.5.3. Způsob a postup při měření difuzní odrazivosti a propustnosti.....	22
3.6. Simulace absorpčního a rozptylového koeficientu	23
3.7. Vyhodnocení dat	24
4. Výsledky a diskuze	24
4.1. Spektra odrazivosti a propustnosti	24
4.1.1. Difuzní odrazivost a propustnost DCMU	24
4.1.2. Difuzní odrazivost a propustnost DMBQ	27
4.1.3. Difuzní odrazivost a odrazivost TMB.....	29
4.1.4. Difuzní odrazivost a propustnost DCBQ	31
4.1.5. Spektra odrazivosti a propustnosti Lawsonu.....	33
4.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu.....	35

4.2.1.	Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu koncentrační řady ethanolu.....	35
4.2.2.	Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu DCMU	37
4.2.3.	Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu zhášečů	39
5.	Závěr	43
6.	Seznam použité literatury	44

1. Úvod

Fluorescence chlorofylu je jev, způsobený emisí energie v podobě záření ve viditelné oblasti spektra. Analýzou záření emitovaného z listu lze zjistit fyziologický stav rostliny, její vývojové stadium, či stav fotosystému II, který je často prvním indikátorem stresu působícím na studovanou rostlinu.

Fluorescence chlorofylu se mění v závislosti na působení různých stresových faktorů, například nadměrné ozáření, vysoká teplota, působení toxických látek a podobně. Tím rostlina poskytuje informace o zvládnání stresu. Pro tuto práci byly vybrány chemické látky, o kterých je známo, že ovlivňují fluorescenci chlorofylu, a to, DCBQ, DMBQ, Lawson, TMB a DCMU.

Cílem této práce je měření difuzní odrazivosti a propustnosti a jejich změn při infiltraci listů tabáku virginského *Nicotiana tabacum*, zahášeči ze skupiny chinonů, DCBQ (2,6-dichloro-1,4-benzochinon), lawsonem (2-hydroxy-1,4-naftochinon), DMBQ (2,5-dimethyl-p-benzochinon), TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), a pesticidem DCMU (3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) o různých koncentracích. V rámci bakalářské práce dále bude zkoumán vliv látek na fluorescenci chlorofylu a spektra absorpčního a rozptylového koeficientu pomocí metody Monte Carlo photon transport. Metoda patří mezi transportní modely, pomocí kterých je sledován pohyb částic, např. fotonu, v určitém prostředí. Model MCPT využívá generování sekvencí náhodných cest sledovaných částic, které by mohly co nejlépe napodobit reálné jevy.

2. Teoretická část

2.1. Spektra odrazivosti a propustnosti

Interakcí elektromagnetického záření s povrchem rostlinného materiálu dochází k několika fyzikálním procesům. Mezi ně patří odrazivost, propustnost, absorpce a rozptyl záření. Tyto jevy závisí na vlnové délce, úhlu dopadajícího záření a na vlastnostech zkoumaného biologického vzorku. (Šmejkal a Trejbalová 2010)

2.1.1. Odrazivost

Reflektance (odrazivost) je veličina určena poměrem odraženého světelného záření od vzorku vůči záření dopadajícímu. Stejně jako absorpance a propustnost, odrazivost je veličina bezrozměrná a je počítána podle rovnice (1)

$$R = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

kde I je intenzita odraženého světelného záření a I_0 je světelné záření dopadající na zkoumaný vzorek. Míra reflektance se zvyšuje se snižováním úhlu dopadu záření na povrch vzorku (Braslavsky, 2006).

2.1.2. Transmittance

Transmittance (propustnost) je veličina, která popisuje množství světelného záření o určené vlnové délce, které prošlo zkoumaným vzorkem a je definována rovnicí (2),

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

kde T je propustnost, I intenzita světla, které prostoupilo vzorkem, a I_0 je intenzita světla ze zdroje.

V praxi se transmittance měří relativně vůči referenčnímu vzorku (blanku). V prvním kroku se měří intenzita blanku. Poté se měří při stejných podmínkách měří intenzita zkoumané látky. Při měření transmittance tímto způsobem lze zanedbat nespecifické ztráty intenzity světla. Intenzita blanku je v rovnici (2) vždy rovna 100 % a propustnost vzorku se zkoumanou látkou je vždy nižší jak 100 % (Volka a kol. 2006). V praxi je propustnost společně s odrazivostí používána při dálkovém snímání dat k neinvazivnímu zjištění stavu vegetace (Hovi a kol., 2017).

2.1.3. Absorpce

Absorpce (pohltivost) je definována na základě transmitance jako její záporný dekadický logaritmus (3).

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T \quad (3)$$

Je to schopnost látky pohltit proud fotonů, kde dochází k přechodům valenčních elektronů mezi dvěma energetickými úrovněmi. Takovou energii může excitovaná látka buď uvolnit formou emise záření či disipaci na tepelnou energii. Míra absorpce je vyjadřována extinkčním koeficientem, jenž je veličinou nutnou pro výpočet Lambert-Beerova zákona (Gottwaldová 2017; Šmejkal a Trejbalová 2010).

2.1.4. Lambert-Beerův zákon

„Lambert-Beerův zákon matematicky vyjadřuje závislost absorpce záření na vlastnostech materiálu, přes který tok elektromagnetického vlnění prochází. Zákon, vyjádřený jako (4),

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda b c \quad (4)$$

kde A_λ je absorpce materiálu při dané vlnové délce, ε_λ extinkční koeficient látky při dané vlnové délce λ ($1 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), b je tloušťka absorpční vrstvy (cm) a c je molární koncentrace absorbující látky (mol l^{-1}), patří k základním vztahům ve spektroskopii“ (Volka a kol., 2006).

K tomuto vyjádření empiricky došel Pierre Bouguer roku 1729, nezávisle na něm pak Johann Heinrich Lambert v roce 1760 a August Beer v roce 1852 (Wilkinson a kol. 1997). Tento zákon je však platný pouze pro velmi zředěné vzorky. U listů rostlin ho uplatnit nelze. Této problematice se detailně věnuje publikace Baránková B. a kol. 2016.

2.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu

K výpočtu absorpčního a rozptylového koeficientu existuje celá řada modelů. Pro praktickou část této bakalářské práce byl zvolen model Monte Carlo photon transport (MCPT). Tato metoda byla zvolena z toho důvodu, že podle našeho mínění nejlépe popisuje chování paprsku v listu rostliny.

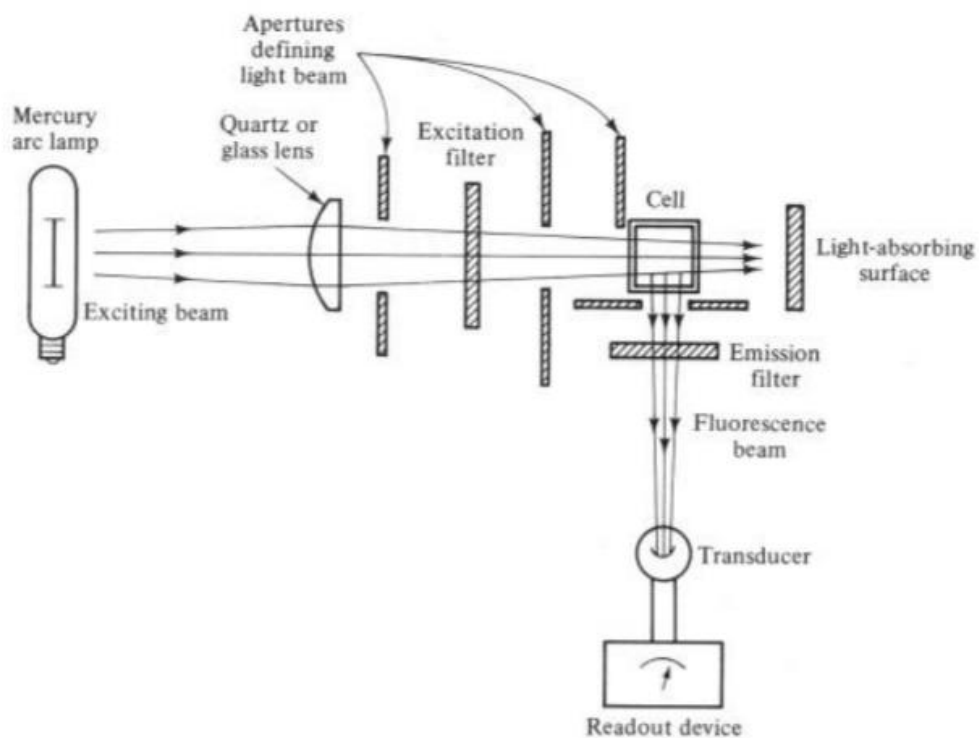
2.2.1. Monte Carlo photon transport model (MCPT)

Model MCPT byl poprvé představen v čtyřicátých letech dvacátého století, jako prostředek určený pro simulaci fyzikálních dějů. Metoda byla pojmenována Stanislawem Ulamem a Johnem von Neumannem, vědci, kteří studovali chování neutronů v Los Alamos. MCPT statisticky přistupuje ke studiu diferenciálních nebo integro-diferenciálních rovnic v přírodních vědách (Metropolis N. a S.Ulam 1949). Metoda je nejčastěji využívána ve statistické termodynamice a v atomové fyzice. MCPT je metodou, která se začala využívat pro simulaci optických vlastností pro různé typy materiálů ve druhé polovině minulého století (Allen a kol., 1973). Nejrozšířenější použití MCPT je v biomedicínských aplikacích, kdy se používá pro diagnostické i terapeutické účely laserů a jiných optických zdrojů. Pomocí MCPT lze například simulovat difúzní odrazivost optických vlastností tkání pro porovnání zdravé a rakovinou napadené tkáně (Wang a kol., 1995). V poslední době se tato metoda také začala používat pro studium rostlinných vzorků.

2.3. Fluorescence

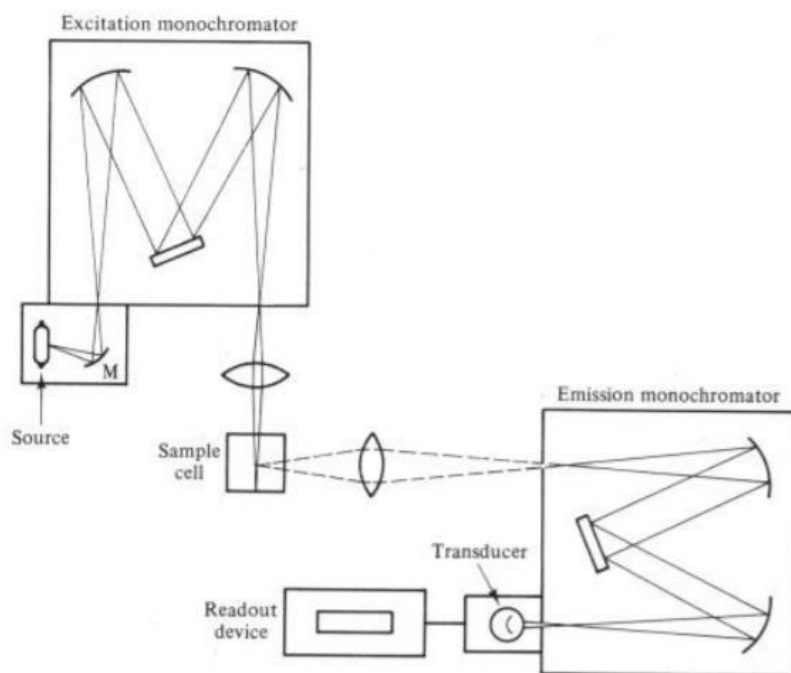
Fluorescence je jev, kdy chemická látka pohltí elektromagnetické záření o určité vlnové délce, následně část nashromážděné energie uvolní do okolí v podobě emisního záření, které má zpravidla delší vlnovou délku oproti záření excitačnímu. Látka schopna fluorescence je schopna vstoupit do excitovaného stavu, následně se bezprostředně po excitaci, což je doba, kratší, než 10^{-8} vteřin, navrácí do svého základního stavu za uvolnění fotonu. (ThermoFischer, 2018).

Při měření fluorescence se využívají zejména tyto dva typy zařízení, a to filtrační fluorometry a spektrofluorometry. Filtrační fluorometr se skládá z excitačního zdroje světla (lampy, výbojky, lasery aj.), polarizačních filtrů, cely pro vzorek a z detektoru. Fluorescence je tak měřena pomocí emitovaného záření dopadajícího na detektor přes filtr. Filtrační fluorometr je vhodný pro kvantitativní měření.



Obr. 1: Schéma filtračního fluorometru (Převzato z knihy *Spectrochemical Analysis*, J. D. Ingle a S. R. Crouch 1988)

Spektrofluorometry využívají místo polarizačních filtrů monochromátory, pomocí kterých je eliminováno záření o nežádoucích vlnových délkách. Monochromátor se skládá z optické mřížky či hranolu, jehož pomocí lze světlo rozložit do spektra o jednotlivých vlnových délkách. Štěrbínou, která má obvykle nastavitelnou šířku, lze pak vybrat požadovaný interval vlnových délek. Spektrofluorometry jsou obvykle poskládány tak, aby se hodnota fluorescenčního záření emitovaného ze vzorku měřila kolmo ke směru záření excitačního. (Turner Designs, 2018)



Obr. 2: Schéma spektrofluorometru (převzato z knihy *Spectrochemical Analysis*, J. D. Ingle a S. R. Crouch 1988)

Oproti běžným fluorometrům jsou spektrofluorometry podstatně dražší, ale mají výhodu v tom, že jsou schopné měřit v libovolných vlnových délkách (Turner Designs, 2018).

2.4. Fluorescence chlorofylu

Chlorofyl a (Chl a) je klíčová fotosynteticky aktivní molekula, která se nachází ve všech fotosyntetizujících organismech a je chromoforem reakčních center. Fluorescence chloroplastu je jev způsobený zejména molekulou chlorofylu a, který byl vystaven excitaci světlem viditelného spektra nebo UV zářením. Asi 90 % fluorescence chloroplastů emituje tato molekula z fotosystému II. Fluorescence chlorofylu a spotřebovává průměrně 2-5 % z celkové získané energie.

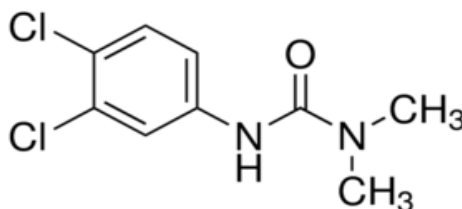
Světlo, jakožto zdroj energie, je v rostlině zachycováno anténními pigmenty na thylakoidní membráně, kde dochází k excitaci molekul Chl a. Energie z excitované molekuly Chl a* je pak pomocí systému přenašečů odváděna buď na fotochemické procesy, přeměnu na teplo (tzv. disipace), nebo fluorescenci chlorofylu (Pavlová, 2006).

Většina energie získané dopadem záření je využita fotochemickými procesy, přenosem protonů a elektronů z vody na NADP^+ (za vzniku NADPH) a fosforylace ADP na ATP, látky, které jsou nutné k fixaci vzdušného oxidu uhličitého do molekuly sacharosu pomocí enzymů Calvinova cyklu (Roháček a kol. 2006).

Metoda měření fluorescence chlorofylu se v uplynulých letech stala nástrojem zejména při studiu ekofyziologie rostlin. Zvýšením nebo snížením naměřených hodnot fluorescence chlorofylu lze zjistit fyziologický stav rostliny, funkci fotosyntézy, či úroveň fyzického či chemického stresu, jemuž jsou studované rostliny vystavovány. Zároveň lze pomocí této techniky studovat děje probíhající na thylakoidních membránách ve fotosystémech I a II, jako jsou například mechanismy ovlivňující elektronový transport (Maxwell a Johnson, 2000).

2.5. DCMU

DCMU (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea), známá pod obchodním názvem diuron, je organická, dusíkatá, krystalická pevná látka o molekulové hmotnosti 233.09 g/mol. Tato látka byla poprvé syntetizována roku 1954 německou agrochemickou a farmaceutickou společností Bayer. DCMU patří do skupiny fenylnmočovinných pesticidů. Diuron je špatně rozpustný ve vodě, ale v organických rozpouštědlech ho však lze rozpustit snadno (Pubchem, 2018).



Obr. 3: Strukturální vzorec DCMU (Pubchem, 2018)

Z ekologického hlediska je tato látka nebezpečná pro vodní prostředí, protože letální dávka pro vodní organismy je velmi nízká. Naopak pro ptáky a savce, včetně člověka, je akutní toxicita nízká. U člověka může při kontaktu s DCMU dojít k podráždění kůže a očí, nebo horních dýchacích cest. U zvířat byl však při testech zaregistrován úbytek červených krvinek, teratogenní účinek (vliv na vývoj plodu a možnost jeho poškození), či výskyt rakoviny. Je tedy považován za karcinogenní i pro člověka, proto je v členských zemích EU využíván velice zřídka, a to po velmi malých dávkách (Rieder a kol., 2003).

DCMU je chemická látka, v praxi užívána jako neselektivní pesticid. Ve výzkumu je obecně využívána jako nástroj při studování elektronového transportu, fluorescence, či přenosu energie v chloroplastech. Hlavním důvodem, proč se v praxi využívá jako herbicid, je inhibice transportu elektronů. DCMU je inhibitor necyklického přenosu elektronů z chinonu A (Q_A) na chinon B (Q_B), čímž znemožňuje přenos elektronů z Q_A^- dál (Lazár a Pospíšil, 1999). DCMU soutěží s, pro rostlinu přirozeným, plastochinonem (PQ) o vazné místo na proteinu D1, v takzvané Q_B kapse, což zapříčiňuje neschopnost přenosu elektronů z Q_A na PQ. Jakmile DCMU zamezí PQ navázat se do Q_B kapsy, dojde k tomu, že Q_A začne přenášet elektrony zpět na chlorofylový pár P680, tím zamezuje spotřebě dodané světelné energie a fluorescence chlorofylu se zvýší – efektivita fotosyntézy se snižuje a záření se re-emituje zpět do okolí.

2.6. Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je soubor procesů v thylakoidní membráně, které způsobují snižování hodnoty fluorescence chlorofylu. Tento jev se dělí na zhášení fotochemické a nefotochemické. Do fotochemického zhášení jsou řazeny procesy reoxidace chinonů, nefotochemické zhášení je spjato s regulací pH gradientem přes thylakoidní membránu vznikajícím transportem elektronů a fotoinhibice (Benešová, 2014).

Zhášení fluorescence lze také definovat jako bimolekulární mechanismus, ve kterém dochází k přenosu energie z jedné molekuly na druhou. Zpravidla jde o transport elektronů, či přenos náboje. Reakce molekul může být dvojího typu, dynamická a statická. Při dynamickém zhášení dochází ke srážce fluoroforu v excitovaném stavu s molekulou zhášedla. Tím dojde k přechodu fluoroforu do základního stavu, aniž by vyzářil foton. Při statickém zhášení dochází ke tvorbě komplexu fluoroforu a zhášeče, který není schopen fluorescence. (Srholtcová, 2010)

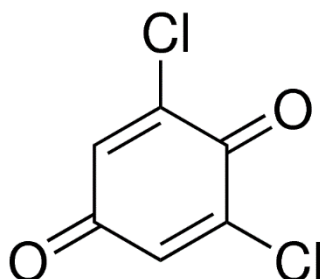
2.6.1. Zhášeče fluorescence

Zhášeče fluorescence jsou molekuly látek, které jsou schopny převést excitovanou molekulu fluoroforu do jejího základního stavu, aniž by došlo k vyzáření fotonu do okolí. (Kubala, 2017)

2.6.2. 2,6-dichloro-1,4-benzochinon

DCBQ (2,6-dichloro-1,4-benzochinon) je chemická látka o molekulové hmotnosti 176.98 g/mol, patří do skupiny halobenzochinonů. Tato látka se nachází v pitné vodě, jako vedlejší

produkt při její dezinfekci. Nejvyšší koncentrace látky je až 23 ng/l. V nedávných experimentech bylo zjištěno, že je DCBQ schopné produkovat reaktivní formy kyslíku (ROS) a tím způsobovat oxidativní poškození bílkovin a DNA v lidských nádorových T24 jaterních buňkách (Sigma-Aldrich 2018). V experimentech na hádátku obecném *Caenorhabditis elegans* byla zjištěna toxicita halobenzochinonů, jejich kancerogenní a teratogenní účinky (Zuo a kol., 2017).

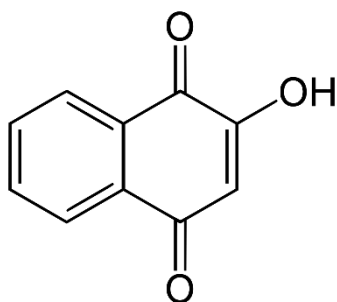


Obr. 4: Strukturální vzorec DCBQ (Pubchem 2018)

DCBQ působí ve fotosynteticky aktivních částech rostlin jako ekvivalent plastochinonu. V několika experimentech bylo dokázáno, že přidáním malého množství halogenizovaných chinonů lze docílit obnovení schopnosti transportu elektronů v Q_B centrech fotosystému II (Ort a kol. 1996). Část center fotosystému II není schopna přenosu elektronů z primárního akceptoru Q_A na sekundární Q_B .

2.6.3. 2-hydroxy-1,4-naftachinon

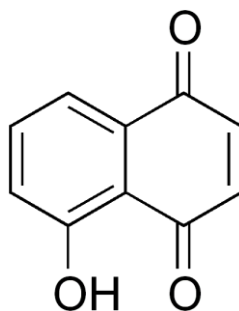
Lawson (2-hydroxy-1,4-naftochinon), pojmenovaný po rostlině *Lawsonia inermis*, jinak nazývaný Henna, je pevná chemická látka o molekulové hmotnosti 174.15 g/ mol. Lawson je za standardních podmínek ve žlutého prášku nebo ve formě krystalků, špatně rozpustných ve vodě a patří do skupiny naftochinonů. V přírodě je izolován z keře henovníku bílého (*Lawsonia inermis*), který se přirozeně vyskytuje v zemích tropického a subtropického pásu, nebo z tokozelky vodního hyacinthu (*Eichhornia crassipes*), vyskytující se na povrchu tropických a subtropických vodních ploch. Díky dobré chemické reaktivitě s keratinem se již od po tisíce let je lawson, jako součást barviva henna, využíván k barvení vlasů a kůže (Pubchem 2018).



Obr. 5: Strukturální vzorec lawsonu (Pubchem, 2018)

Při zkoumání vlivu henny byly nedávno zjištěny další efekty, jako jsou fungicidní, antimalarické, či baktericidní účinky. Proto se její využití rozšířilo i do dalších průmyslových odvětví, zejména v průmyslu farmaceutickém nebo chemickém. Se vzrůstající manipulací s touto chemickou látkou by mohlo dojít k znečištění životního prostředí, kde největší riziko hrozí vodním organismům. Lidem a ostatním suchozemským živočichům může henna způsobit podráždění očí a pokožky (Chen, 2017).

Lawson je předmětem výzkumu v biologii rostlin, zejména kvůli chemické látce zvané Juglon, která má strukturu podobnou s lawsonem. Juglon patří také mezi naftochinony a při experimentech na buňkách tabáku BY-2 vykazovala schopnost vytvářet reaktivní formy kyslíku (ROS) (Babula a kol. 2009). V jiném experimentu s juglonem byla na semenáčku hlávkového salátu pozorována zvýšená produkce peroxidu vodíku (Babula a kol. 2014). Podle jiných studií tyto látky ze skupiny naftochinonů prokázaly schopnosti inhibice makromolekulární oxidace a snížení oxidativního stresu (Chobot a Hadacek, 2009).

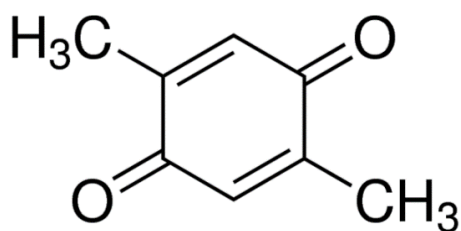


Obr. 6: Strukturální vzorec juglonu (Pubchem, 2018)

Reaktivní formy kyslíku, jako je například superoxidový anion O_2^- , singletový kyslík nebo peroxid vodíku H_2O_2 , jsou při vlivu oxidativního stresu produkovány nekontrolovaně a mohou tak organismu způsobit vážné škody, může tak dojít například k poškození DNA aktivací endonukleázy (Hagar a kol. 1996).

2.6.4. 2,5-Dimethyl-p-benzochinon

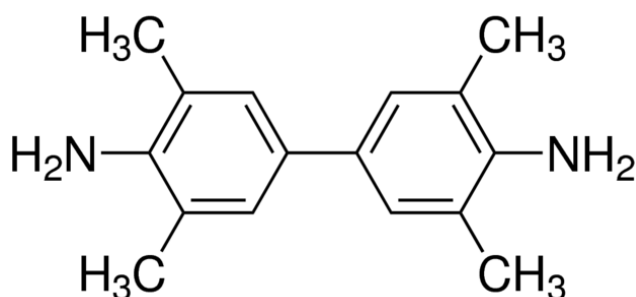
2,5-Dimethyl-1,4-benzochinon, známý pod názvem Floron nebo pod zkratkou DMBQ, je chemická látka ve formě žlutého až hnědého krystalického prášku o molekulové hmotnosti 136,15 g/mol. V přírodě je látka významnou složkou obranného sekretu velesekáče pečlivého (*Acanthopachylus aculeatus*) (Thomas Eisner a kol., 2004). Tato chemikálie je dobře rozpustná v organických rozpouštědlech, jako je například toluen nebo ethanol. V roce 2002 byly testovány inhibiční účinky DMBQ vůči urease. V roce 1996 byl DMBQ testován jako inhibitor Ca^{2+} ATPasy sarkoplazmatických membránových vezikul (Zaborska a kol., 2002; Floreani a kol., 1996).



Obr. 8: Strukturální vzorec DMBQ (Pubchem, 2018)

2.6.5. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, nejčastěji označován zkratkou TMB, je chemická látka o molekulové hmotnosti 240,35 g/mol. Vyskytuje se ve formě bílého až světle žlutého krystalického prášku. TMB je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, např. v ethanolu.



Obr. 9: Strukturální vzorec TMB (Pubchem, 2018)

TMB bývá v praxi využíván jako substrát pro peroxidasu při imunochemických metodách ELISA. Koncový produkt TMB s peroxidasou má světle modrou barvu a spektroskopicky je měřen při 370 nm nebo 620-650 nm. (Sigma-Aldrich, 2018)

3. Experimentální část

3.1. Místo pokusu

Všechny pokusy v rámci této bakalářské práce byly uskutečněny v areálu přírodovědecké fakulty univerzity Palackého v Olomouci.

K provedení experimentu byla nutná laboratoř vybavená měřícím zařízením LI-COR LI-1800 s příslušenstvím a osobním počítačem, zeleným osvětlením (kvůli práci se zelenými částmi rostlin) a vakuovou pumpou, která je nutná pro šokovou infiltraci listu. Z tohoto důvodu byl proces pokusu rozdělen do dvou laboratoří, do jedné s aparaturou pro měření propustnosti a odrazivosti pomocí radiospektrofotometru LI-COR LI-1800, do druhé pak pro šokovou infiltraci listu tabáku jednotlivými zhášeči.

3.2. Biologický materiál

Samotný pokus byl prováděn na listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L cv. Samsun) ve stáří 4 - 6 měsíců. Rostliny tabáku byly vysazeny 14. ledna 2018 a přesazovány 1. června 2018.

3.3. Použité chemikálie

Deionizovaná voda	-
Ethanol	Lach-Ner (Česká Republika)
2,5-dimethyl,1,4-benzochinon	Fluka (Německo)
3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin	Fluka (Německo)
3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea	Sigma-Aldrich (Německo)
2,6-dichloro-1,4-benzochinon	Sigma-Aldrich (Německo)
2-hydroxy-1,4-naftochinon	Lancaster (USA)

3.4. Příprava koncentrační řady ethanolu

Do 50 ml plastových zkumavek se šroubovacím víčkem byl napipetován ethanol o koncentraci 96 %, který byl doplněn vodou na příslušnou koncentraci 1 %, 2 %, 50 %.

3.4.1. Příprava roztoků zhášeců

V první řadě byl připraven zásobní roztok daného zhášeče o koncentraci 20 mM. Bylo naváženo příslušné množství dané látky, která byla následně rozpuštěna v 96% ethanolu. Zásobní roztok byl zředěn tak, aby koncentrace zhášeče byla 200 uM a ethanolu 1 %.

3.4.2. Příprava roztoku DCMU

Roztok 200 uMol DCMU byl připraven tak, že bylo naváženo 4,6 mg DCMU, toto množství bylo opatrně přesypáno do 100 ml plastové zkumavky se šroubovacím víkem. K navážce bylo přidáno 1,025 ml 96 % ethanolu a roztok byl doplněn do 100 ml deionizovanou vodou.

3.5. Měření

3.5.1. Měření odrazivosti a propustnosti

Pro studium spektrálních změn odrazivosti (R) a propustnosti (T) v kolimovaném světle byl využit spektrometr LI-1800 (LI-COR, Lincoln, USA) s integrační koulí 1800-12 a křemenným světlovodem (Storz, Tuttlingen, Německo) o průměru 3,5 mm.

Kolimované záření o definované vlnové délce dopadalo nejčastěji kolmo (nebo téměř kolmo) k povrchu vzorku, buď ze strany vnitřku integrační koule při měření R_λ , či z vnější strany skrze vzorek do integrační koule při měření propustnosti T_λ . Vzhledem k difuznímu povrchu vzorku se záření odráží do celého poloprostoru nad vzorkem a mnohonásobně se difuzně odráží od stěn koule, čímž se vytvoří určité homogenní prostorové rozložení záření. Na všech částech vnitřního povrchu integrační koule tak dopadá záření o stejné ozářenosti. V kolmém směru k normále vzorku je na ose procházející středem koule výstup pro detektor, který snímá difuzní záření.

Měření není absolutní, ale signál od vzorku se porovnává se signálem ze signálu standardu, kterým je destička pokryta ideálním difuzně odrážejícím povrchem. Je-li signál od vzorku $S_v(\lambda)$ a signál od standardu $S_s(\lambda)$, je pak $R_D(\lambda)$ vypočítáno jako (5).

$$R_D(\lambda) = \frac{S_v(\lambda)}{S_s(\lambda)} \quad (5)$$

Při měření $T_D(\lambda)$ je srovnávacím signálem opět $S_s(\lambda)$, tj., je-li signál po průchodu vzorkem $S_{Tv}(\lambda)$ je :

$$T_D(\lambda) = \frac{S_{Tv}(\lambda)}{S_s(\lambda)} \quad (6)$$

3.5.2. Infiltrace listu

Infiltrace samotného listu byla provedena infiltrační aparaturou složenou z Erlen Mayerové tlustostěnné baňky vystlané buničinou a uzavřené gumovou zátkou. Tlustostěnná Erlen Mayerova baňka byla tlakovou hadicí připojena k rotační vývěvě (typ RV 1,5/11, LP, Praha, ČR). Rotační vývěva měla dva ventily, vypouštěcí a napouštěcí.

Segment listu, který byl infiltrován, byl ponořen do zkumavky s roztokem testované látky tak, aby byl po celou dobu infiltrace ponořen pod hladinou, a aby nedocházelo k jeho pohybu ve zkumavce. Takto ponořený list mohl být rovnoměrně infiltrován. Zkumavka se segmentem byla vložena do Erlen Mayerovy baňky, která byla následně uzavřena gumovou zátkou.

Infiltrace segmentu listu byla prováděna tlakovým šokem. Vzorek byl vystaven podtlaku a následnému normálnímu tlaku několikrát za sebou po dobu 20-25 minut. Podtlak byl kontrolován pomocí manometru. Maximální podtlak, kterému byl vzorek vystavován, byl 0,9 Atmosfér. Průběh infiltrace byl pozorován vizuálně. Dobře infiltrovaný segment listu byl téměř průsvitný, protože interceluláry listu byly zaplněny danými roztoky.

3.5.3. Způsob a postup při měření difuzní odrazivosti a propustnosti

Samotné měření probíhalo v laboratoři vybavené spektrometrem LI-1800 a chlorofylmetru SPAD 502.

Ve vzrostlém listu tabáku bylo změřeno množství chlorofylu v různých místech pomocí chlorofylmetru SPAD 502. Měření proběhlo pětkrát na levé straně listu a pětkrát na straně pravé. Hodnoty levé a pravé strany byly zprůměrovány. List se změřenou koncentrací chlorofylu byl umístěn do šablony a připevněn k aparatuře tak, aby do kulového integrátoru směřovala adaxiální strana listu. Použití šablony zajišťuje, že je vždy měřeno stejné místo na listu. Křemenný světlovod byl připevněn k integrační kouli do polohy pro měření standardu. Pomocí osobního počítače bylo v programu pro ovládání spektrometru LI-1800 nastaveno rozmezí vlnových délek na interval 380-800 nm a název výstupního souboru. Poté bylo zahájeno měření. Ihned po zahájení měření v byl zapnut zdroj energie pro křemenný světlovod. Po ukončení měření byl zdroj vypnut. Pro měření difuzní odrazivosti bylo nutné připevnit světlovod k integrační kouli do polohy pro měření reflektance, tedy tak, aby proud záření směřoval na povrch adaxiální strany listu.

V programu pro spektrometr LI-1800 bylo nastaveno následné dělení získaných hodnot hodnotami standardu. Pro měření odrazivosti byl nastaven stejný interval vlnového záření 380-800 nm a název výstupního souboru, potom následovalo zahájení měření. Při startu byl

zapnut zdroj světlovodu, po ukončení byl opět vypnut. Zdroj světla byl připevněn za vzorek do portu určeného pro měření difuzní propustnosti tak, aby proud záření směřoval přes list do integrační koule. Poté byly nastaveny stejné hodnoty intervalu vlnových délek a název výstupního souboru. Při startu měření byl zapnut světlovod. Jakmile bylo měření ukončeno, světlovod byl vypnut.

List tabáku byl otočen tak, aby do kulového integrátoru směřovala abaxiální strana listu. Pro měření hodnot odrazivosti a propustnosti abaxiální strany listu byl opakován stejný postup, jako u měření hodnot adaxiální strany listu.

Po změření hodnot odrazivosti a propustnosti byl list nastříhán na několik segmentů, které následně byly infiltrovány chemickými roztoky o různých koncentracích. Po ukončení infiltrace byl fragment listu zabalen do alobalové fólie, aby nedošlo ke kontaktu vzorku se světlem. Postup měření hodnot horní i spodní strany listu zůstává téměř stejný, vynechává se měření koncentrace chlorofylu a postup musí být proveden za minimálního osvětlení.

3.6. Simulace absorpčního a rozptylového koeficientu

Naměřená spektra difuzní odrazivosti a propustnosti byla upravena v programu Microsoft Excel tak, aby v prvním sloupci byla vlnová délka, ve druhém sloupci odrazivost a ve třetím propustnost. Takto upravený soubor byl vložen do databáze upraveného programu MCPT (Sušila P. a Nauš J. 2007). Program MCPT byl vytvořen v programovacím jazyce C++ s využitím programátorské aplikace Microsoft Visual C++ Studio 2005 pro běžné PC s procesorem Intel® Celeron® s frekvencí 2,8 Ghz. Ovládací část programu byla vytvořena v programu MATLAB (USA).

Spektra byla simulována na počítači s procesorem Intel® Core i5 s frekvencí (2,3 GHz). V ovládacím panelu programu byl nastaven krok vykreslování spektra 2 nm, simulovaný rozsah byl 400-800 nm (byla použita funkce programu Drows, vynechá daný počet získaných dat, kdy jsou data zatížena šumem a zlepší tak fit), tloušťka listu byla zvolena 0,235 mm (Avery G.S. 1932) a index lomu 1,5 (Jacquemod a Barrett 1990). Každá strana listu byla simulována zvlášť. Jelikož jsou získaná spektra zatížena šumem, byla simulace každé strany listu provedena pětkrát, tak aby byl získán ideální poměr signál šum.

3.7. Vyhodnocení dat

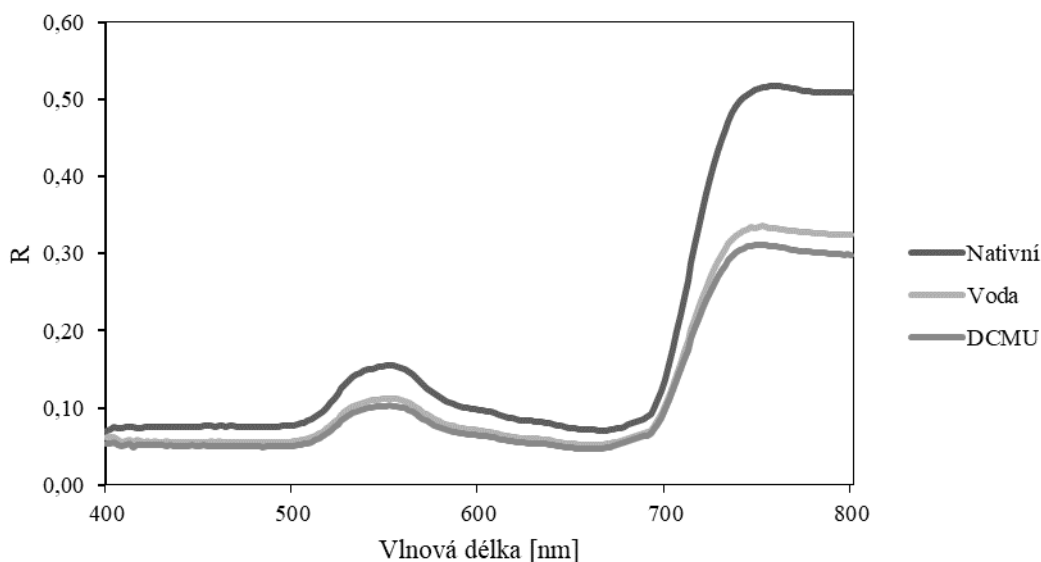
Výsledné hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel ve formě grafů tak, aby bylo možné porovnat pokles či zvýšení odrazivosti a propustnosti, dále byly spočítány hodnoty absorpce listu. Získaná data odrazivosti a propustnosti byla použita pro simulaci absorpčního a rozptylového koeficientu. Simulovaná data byla poté také vyhodnocena v programu Microsoft Excel.

4. Výsledky a diskuze

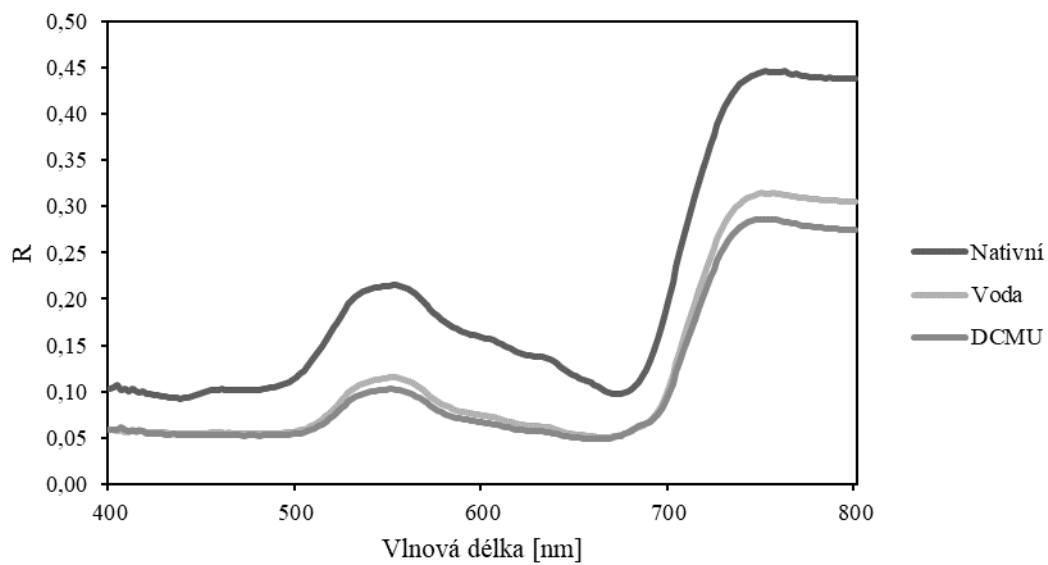
4.1. Spektra odrazivosti a propustnosti

V následující podkapitole jsou k dispozici data spekter odrazivosti a propustnosti, která byla zpracována do formy grafů. Hodnoty odrazivosti a propustnosti listu infiltrovaného danou látkou jsou porovnány vůči hodnotám spekter listu nativního a infiltrovaného vodou nebo 1% ethanolem, aby byl vidět jejich nárůst či naopak pokles. Změny odrazivosti a propustnosti jsou nejlépe pozorovatelné v intervalech vlnových délkách 500-600 nm a 700-800 nm.

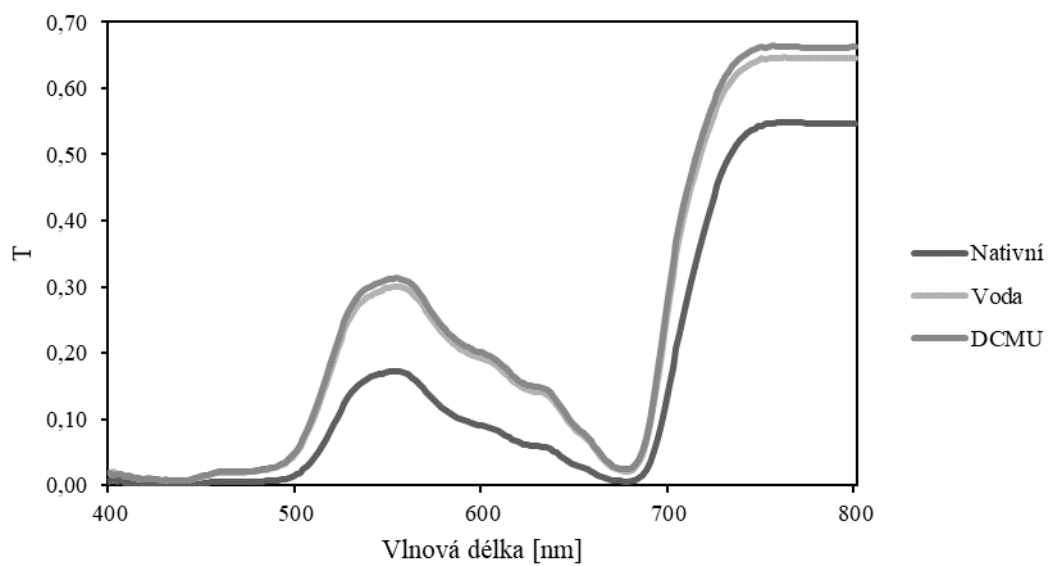
4.1.1. Difuzní odrazivost a propustnost DCMU



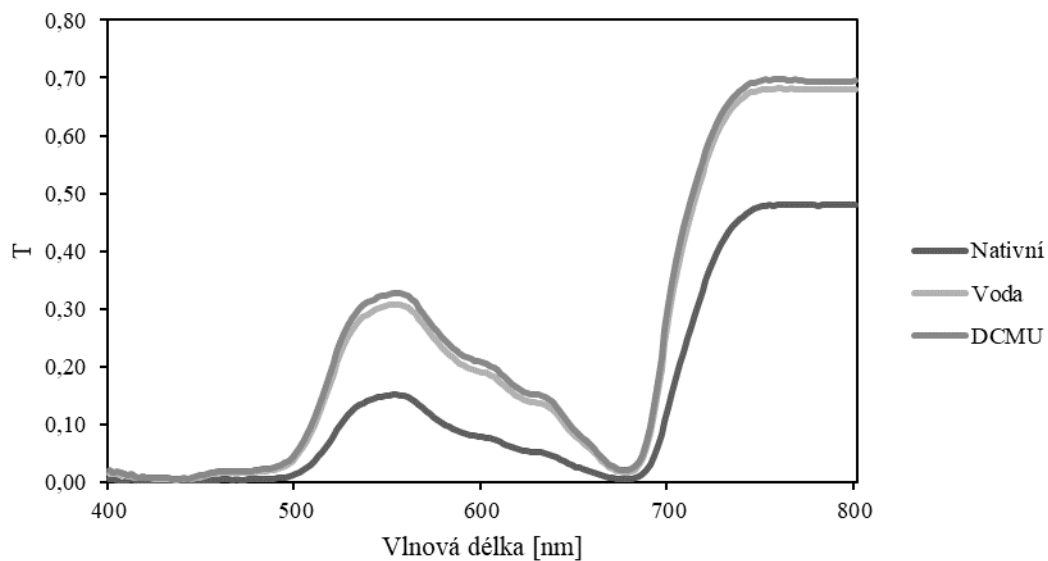
Graf 1: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 µM DCMU.



Graf 2: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM DCMU.



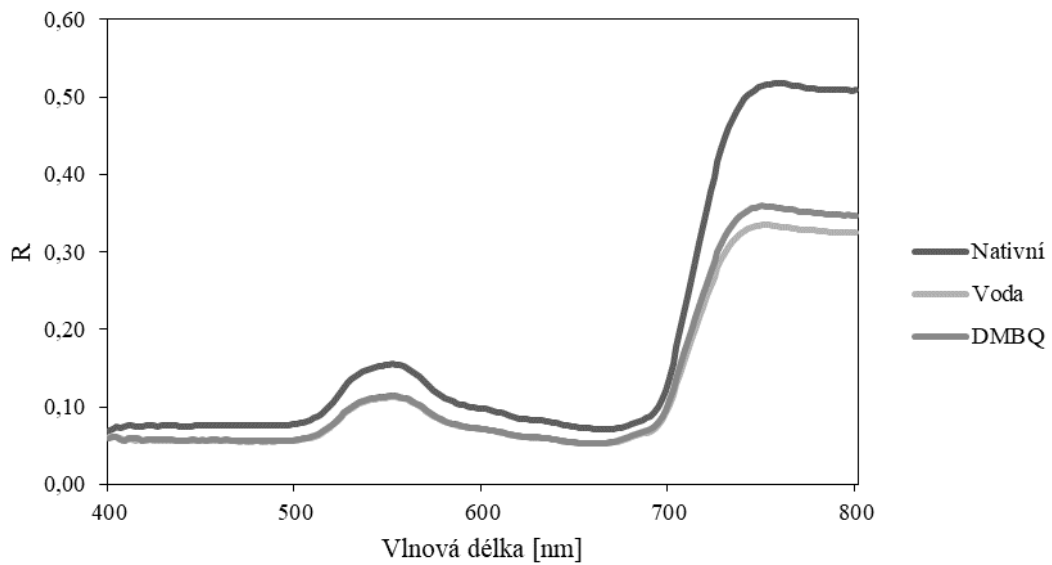
Graf 3: Hodnoty propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM DCMU.



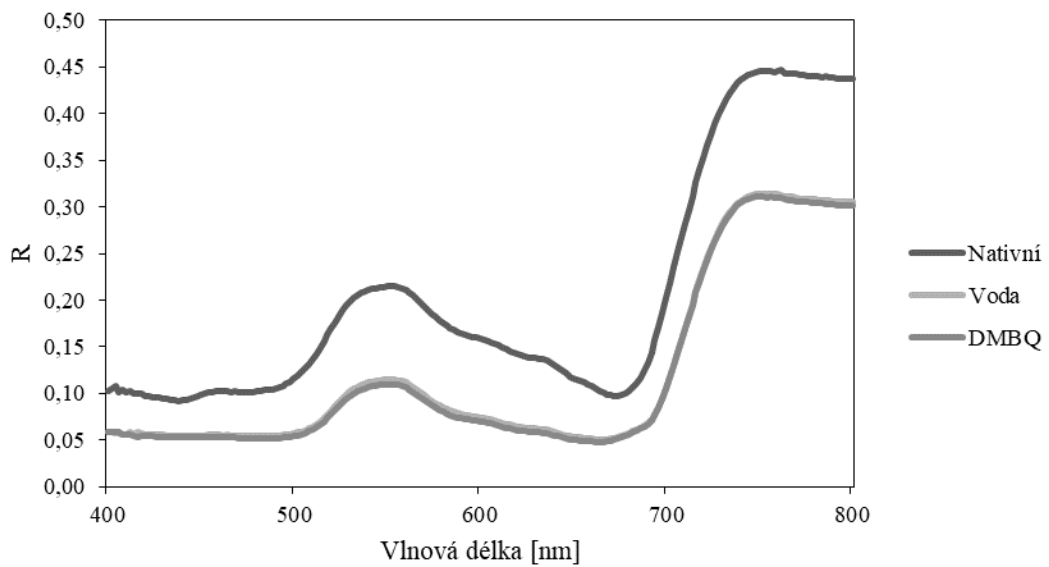
Graf 4: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM DCMU.

Z uvedených grafů bylo pozorováno snížení odrazivosti, a naopak zvýšení propustnosti infiltrovaného vzorku oproti nativnímu. Důvodem je fakt, že mezibuněčný prostor listu je zaplněn deionizovanou vodou, či roztokem DCMU. Mezi daty získanými měření vzorku infiltrovaného vodou a vzorku s DCMU je pouze nepatrný rozdíl, z čehož vyplývá, že na poklesu odrazivosti a zvýšení propustnosti má vliv hlavně voda.

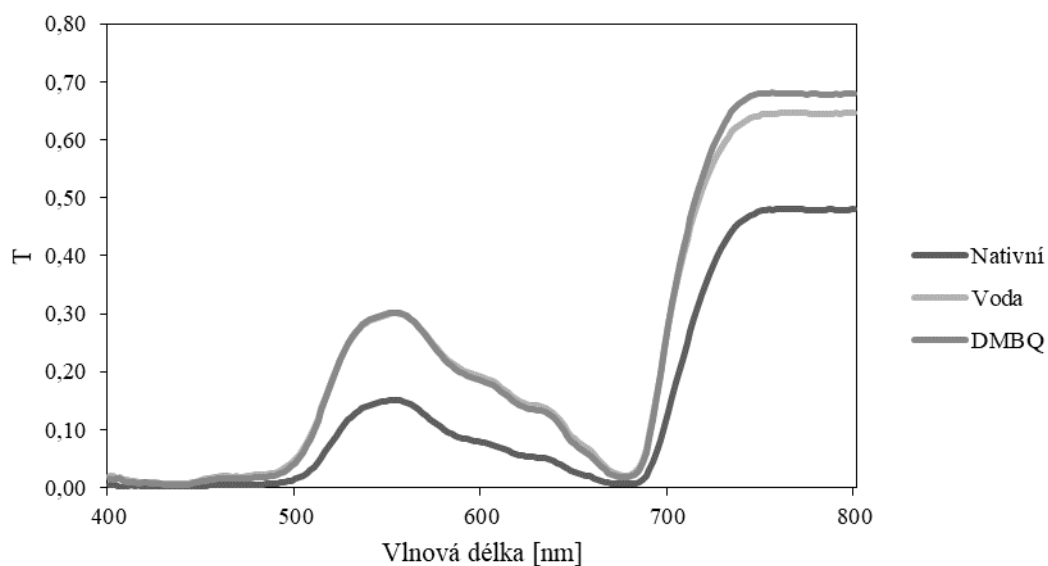
4.1.2. Difuzní odrazivost a propustnost DMBQ



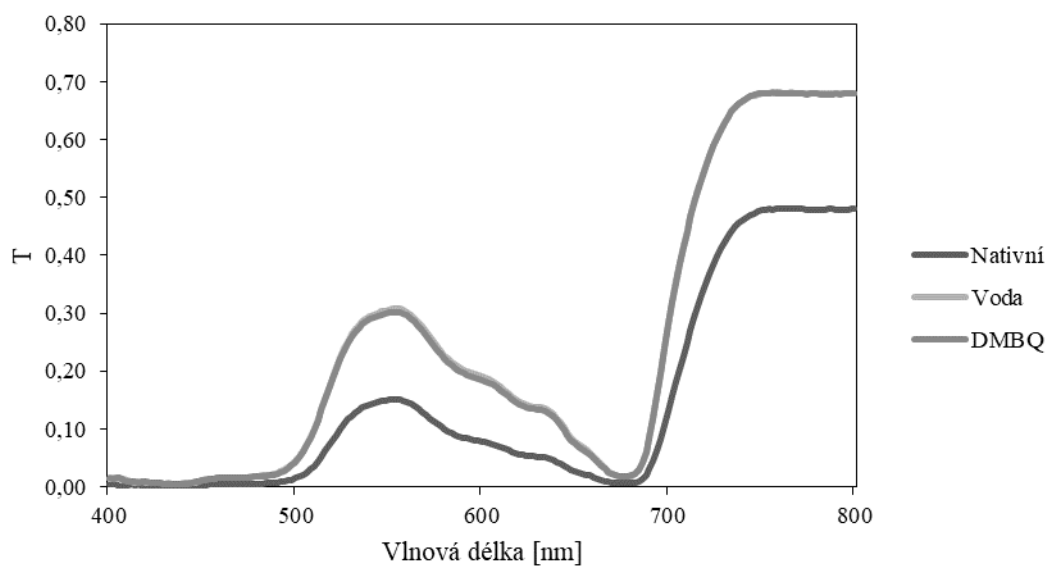
Graf 5: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM DMBQ.



Graf 6: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM DMBQ.



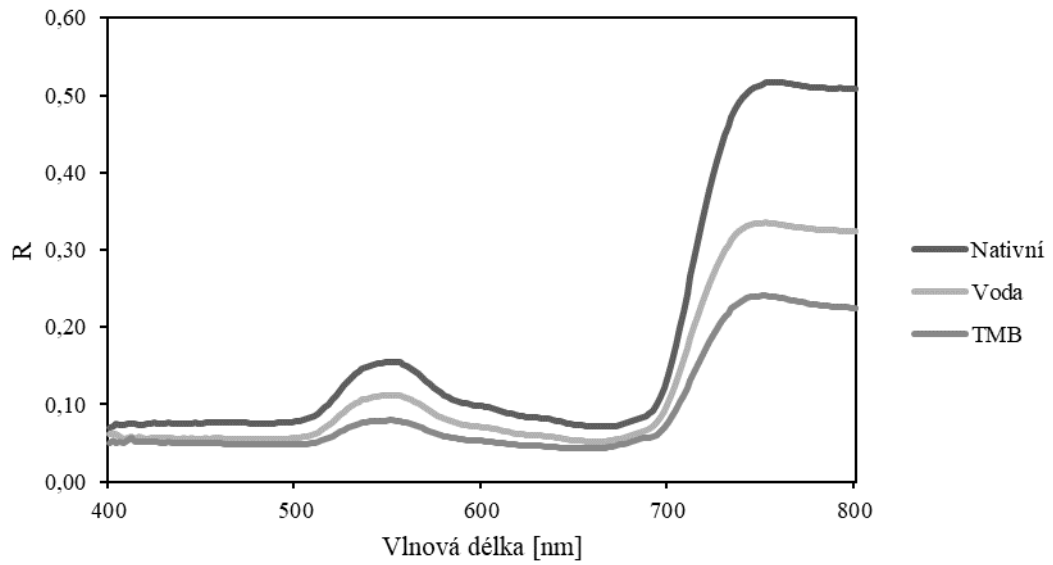
Graf 7: Spektra propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM DMBQ.



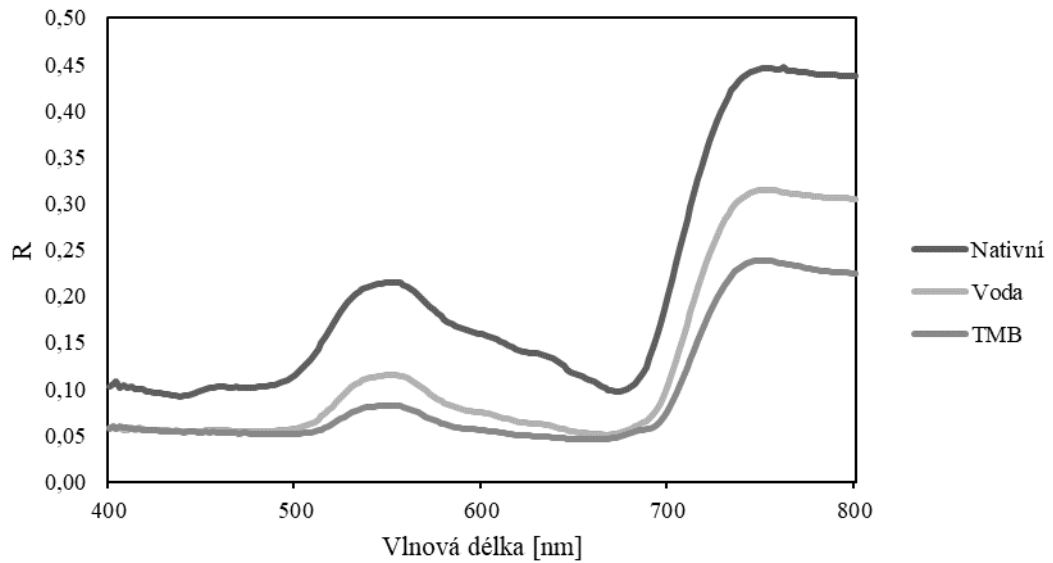
Graf 8: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM DMBQ.

Z uvedených grafů bylo pozorováno snížení odrazivosti a zvýšení propustnosti infiltrovaného vzorku oproti nativnímu. Vzorek infiltrovaný DMBQ se nijak výrazně nelišil od vzorku infiltrovaného deionizovanou vodou.

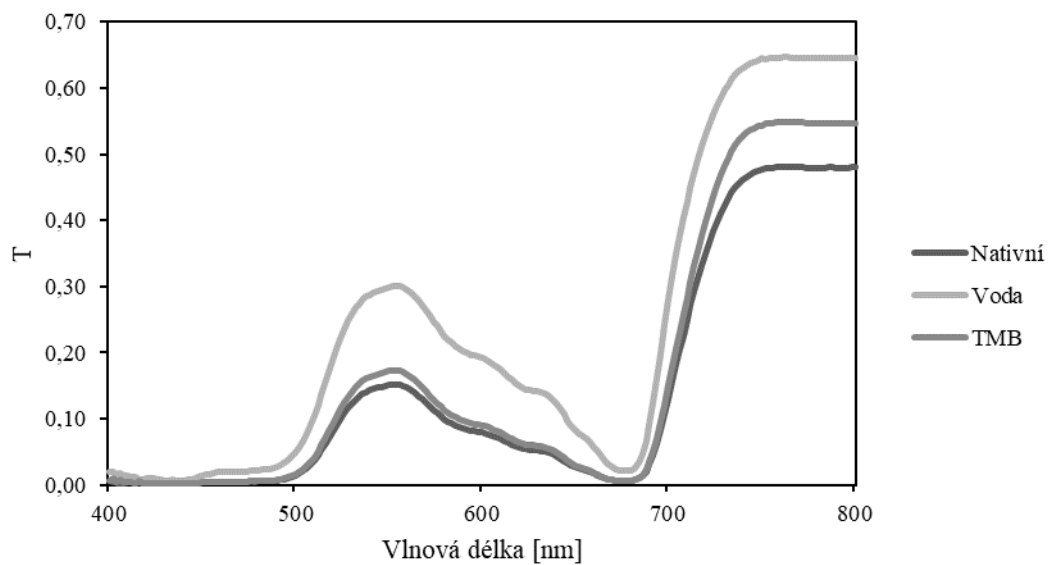
4.1.3. Difuzní odrazivost a odrazivost TMB



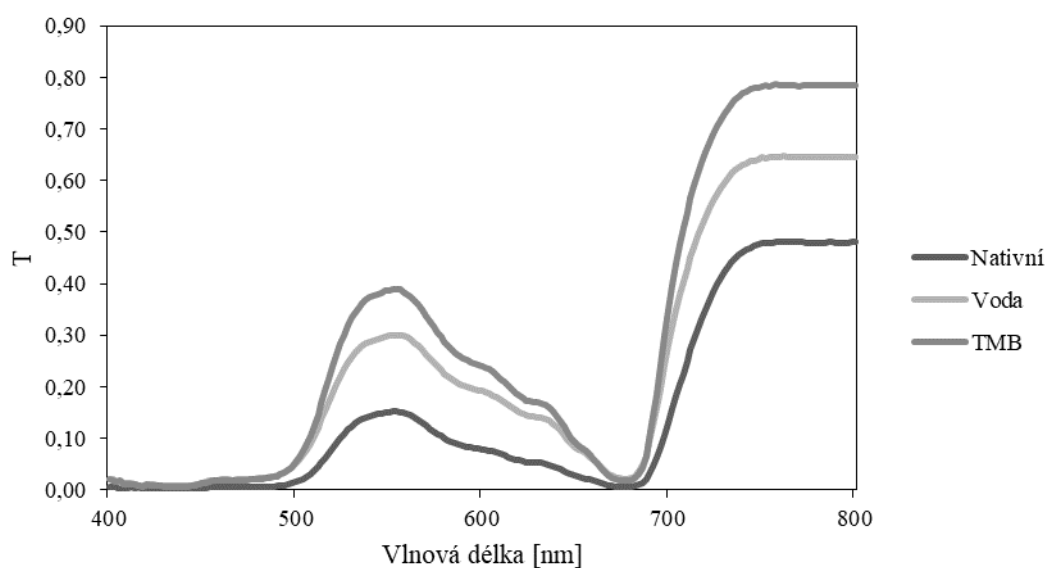
Graf 9: Hodnoty odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM TMB.



Graf 10: Hodnoty odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM TMB.



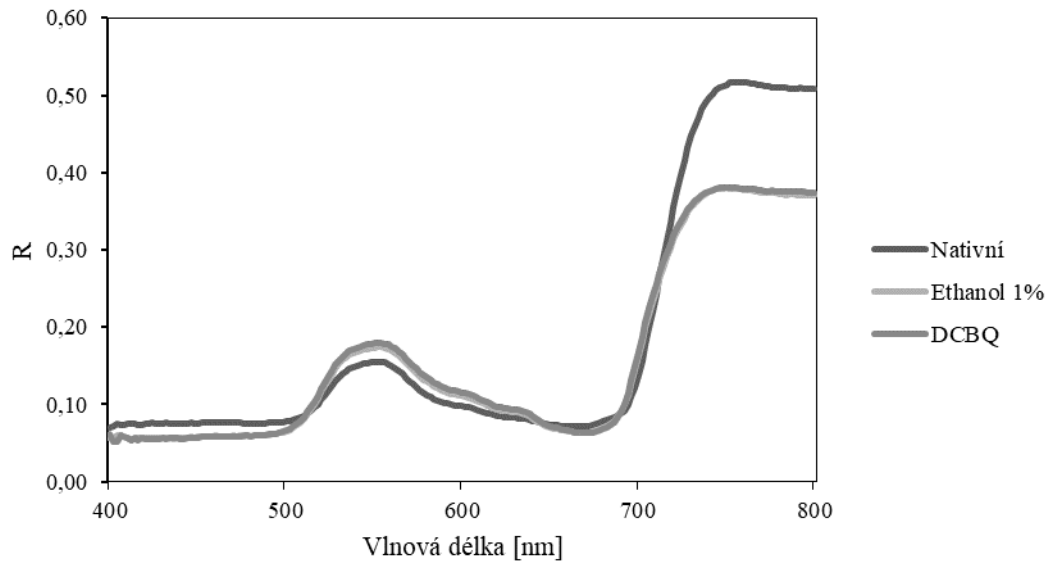
Graf 11: Hodnoty propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM TMB.



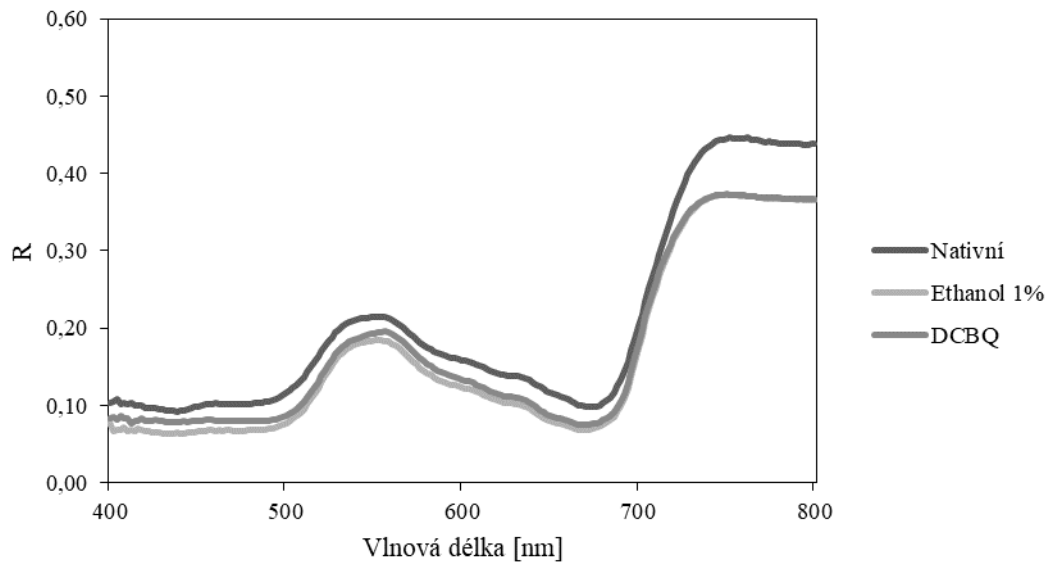
Graf 12: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM TMB.

Na grafech byly pozorovány, oproti DCMU a DMBQ, rozdílné hodnoty reflektance a transmittance při infiltraci TMB a infiltraci vodou. Roztok TMB způsobil markantnější snížení odrazivosti a zvýšení propustnosti, než vzorek infiltrovaný deionizovanou vodou.

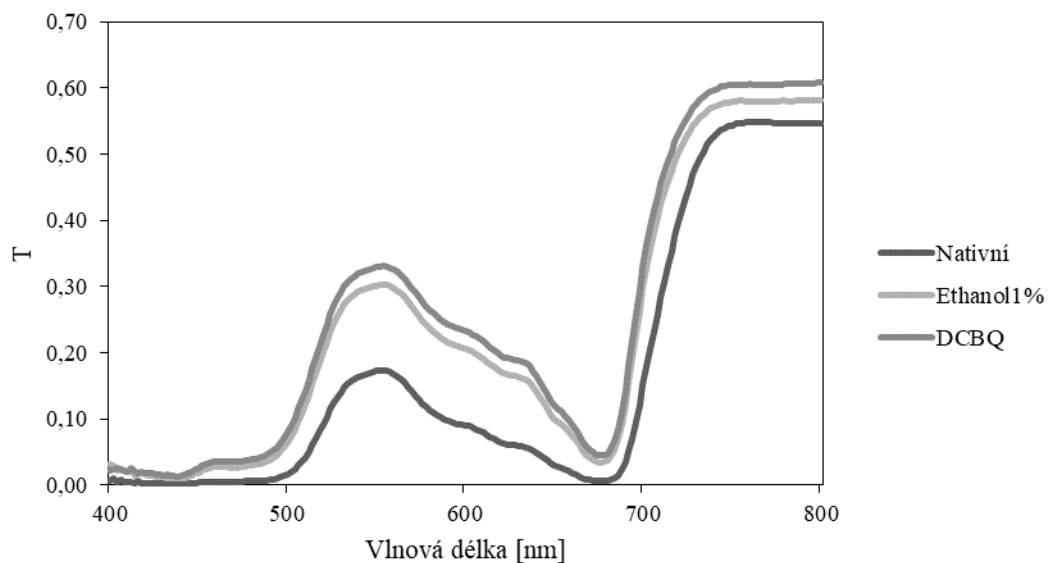
4.1.4. Difuzní odrazivost a propustnost DCBQ



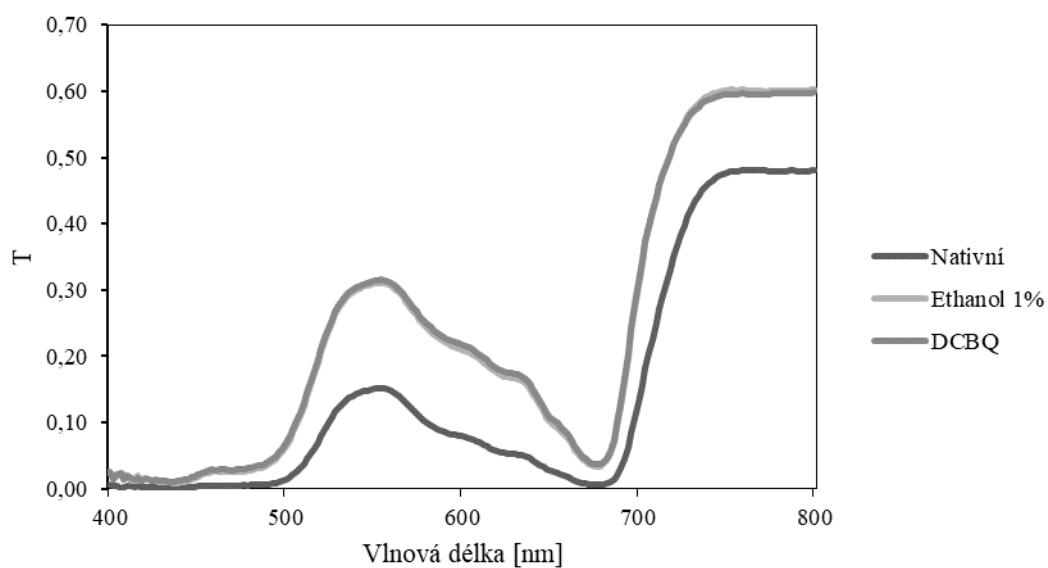
Graf 13: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200 μM DCBQ.



Graf 14: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200 μM DCBQ.



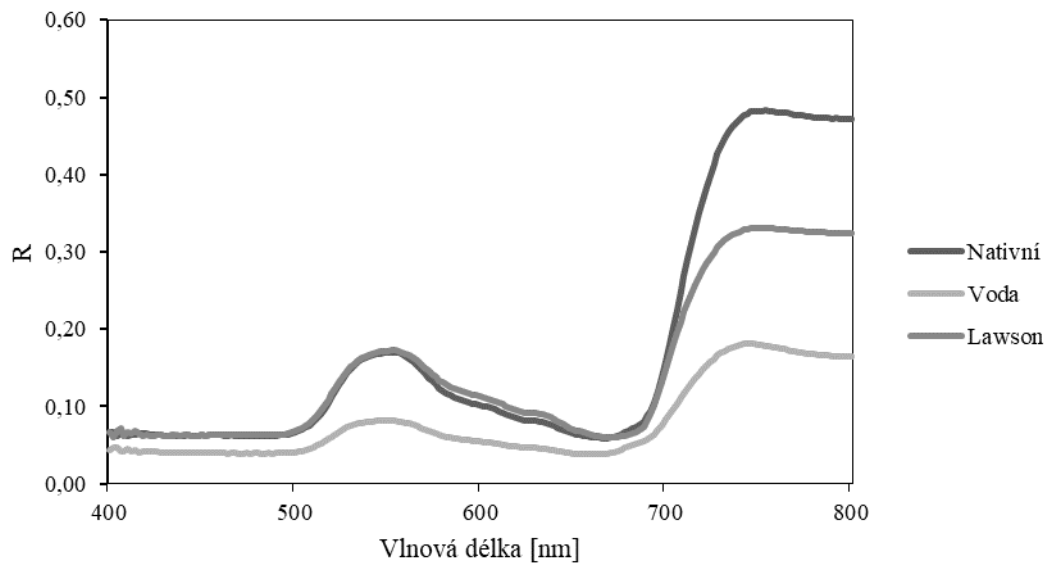
Graf 15: Spektra propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200 μM DCBQ.



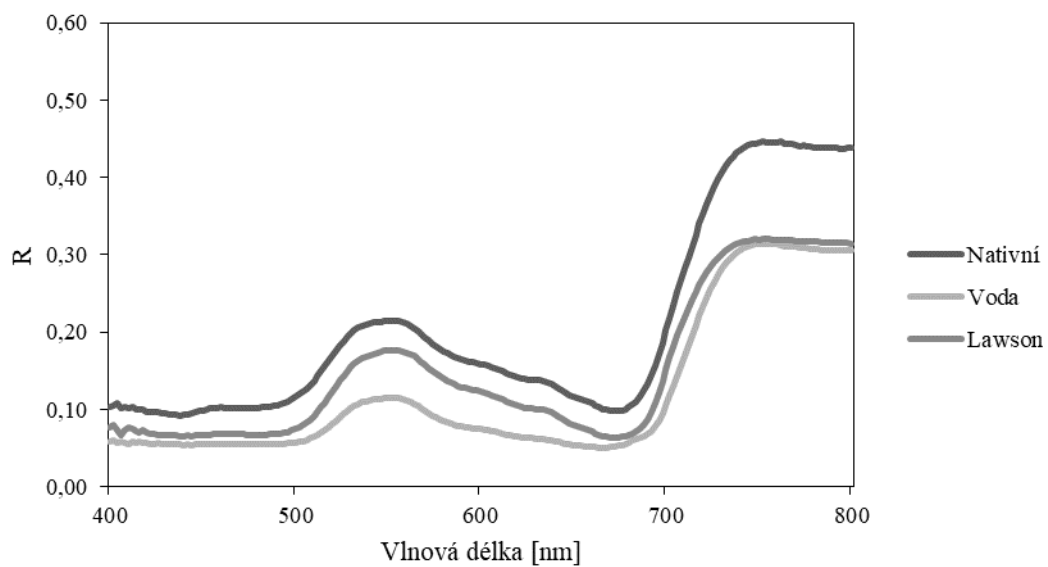
Graf 16: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200 μM DCBQ.

Infiltrací vzorku listu 1% ethanolem i 200 μM DCBQ došlo k očekávaným změnám naměřených hodnot, tedy snížení odrazivosti a zvýšení propustnosti. Na grafu 13 bylo pozorováno zvýšení odrazivosti v intervalu vlnových délek 500 nm – 650 nm.

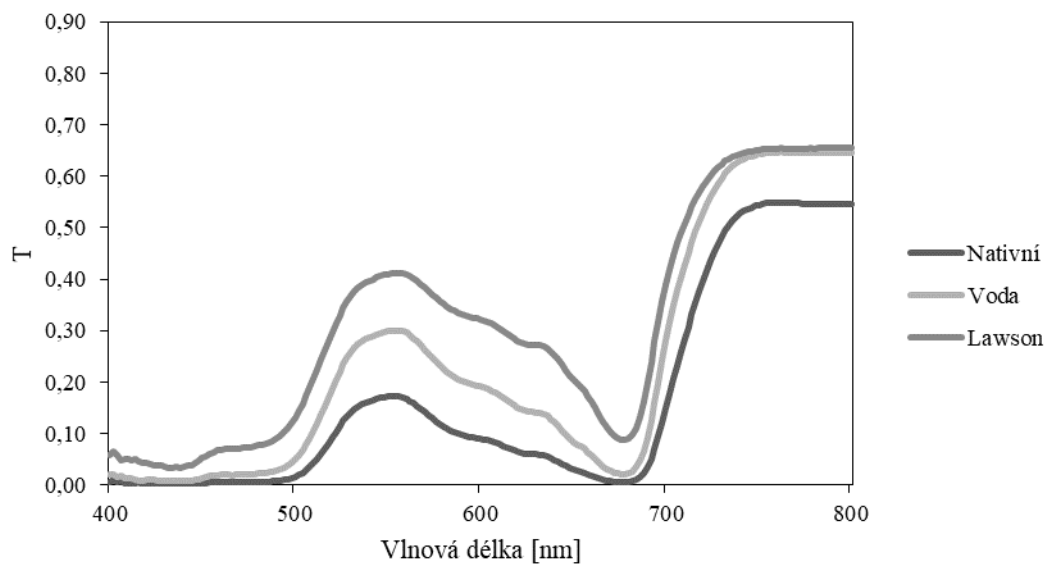
4.1.5. Spektra odrazivosti a propustnosti Lawsonu



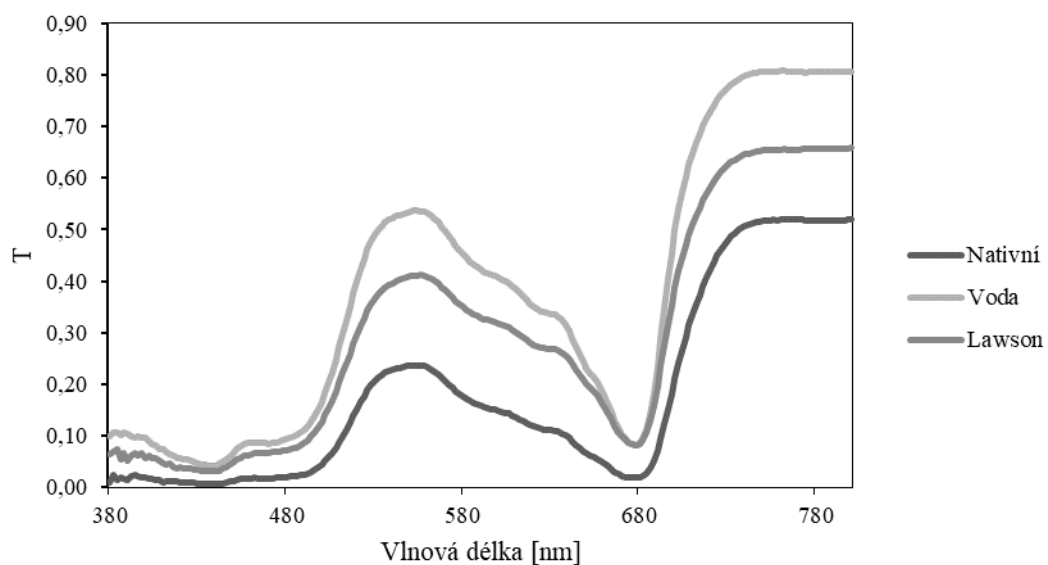
Graf 17: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM lawsonem.



Graf 18: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM lawsonem.



Graf 19: Spektra propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM lawsonem.



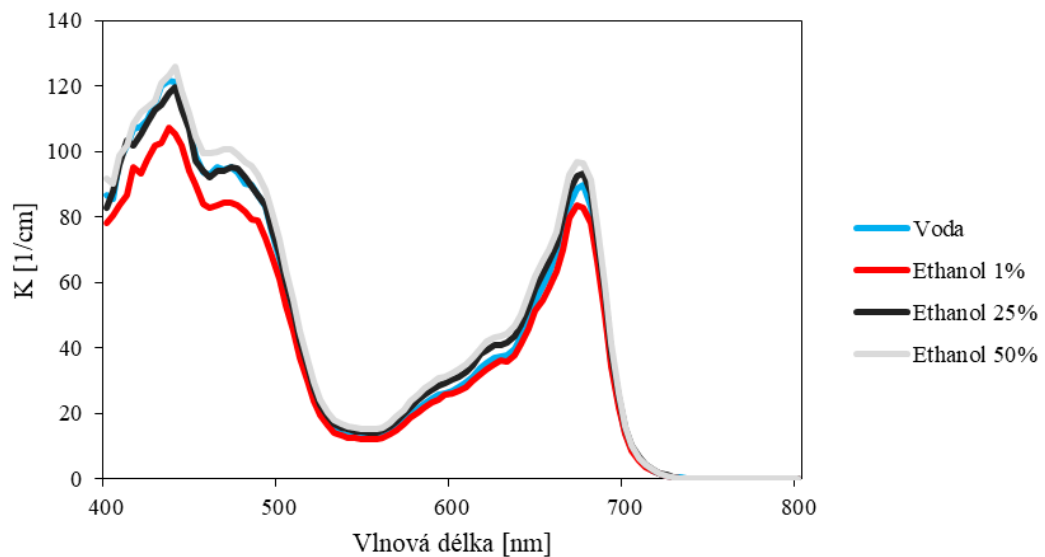
Graf 20: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200 μM lawsonem.

Z grafů lze vypožorovat, že roztok lawsonu má nižší vliv na změny odrazivosti a propustnosti, než deionizovaná voda.

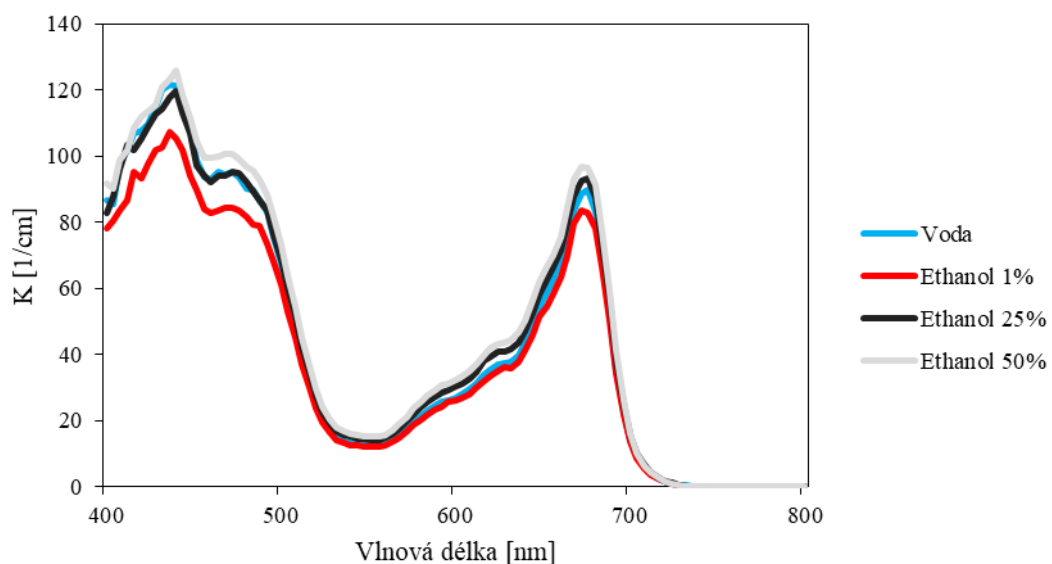
4.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu

Následující podkapitola je zaměřena na hodnoty získané simulacemi spekter absorpčního a rozptylového koeficientu. Pomocí zvyšujících se hodnot absorpčního koeficientu na peaku při 680 nm a naopak snižujících se hodnot rozptylového koeficientu na stejném místě lze zjistit, že daná látka zvyšuje nebo snižuje hodnotu fluorescence.

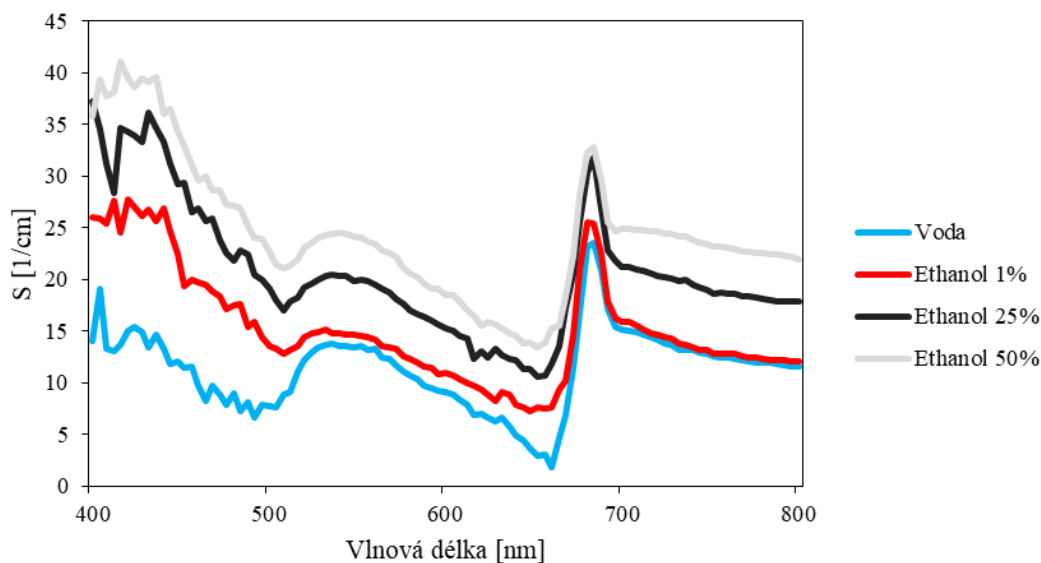
4.2.1. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu koncentrační řady ethanolu



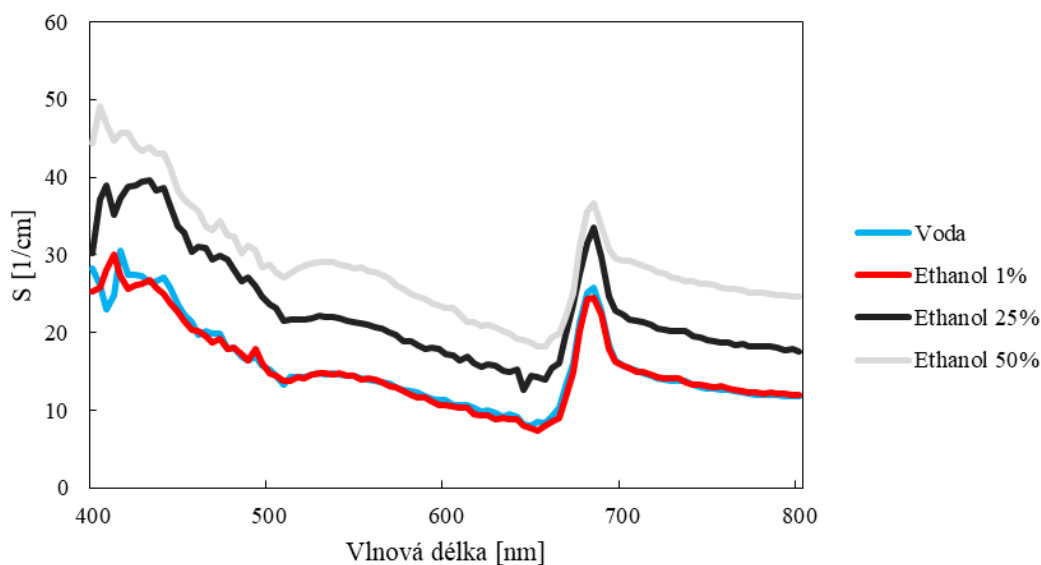
Graf 21: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného roztoky koncentrační řady ethanolu.



Graf 22: Spektra absorpčního koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného roztoky koncentrační řady ethanolu.



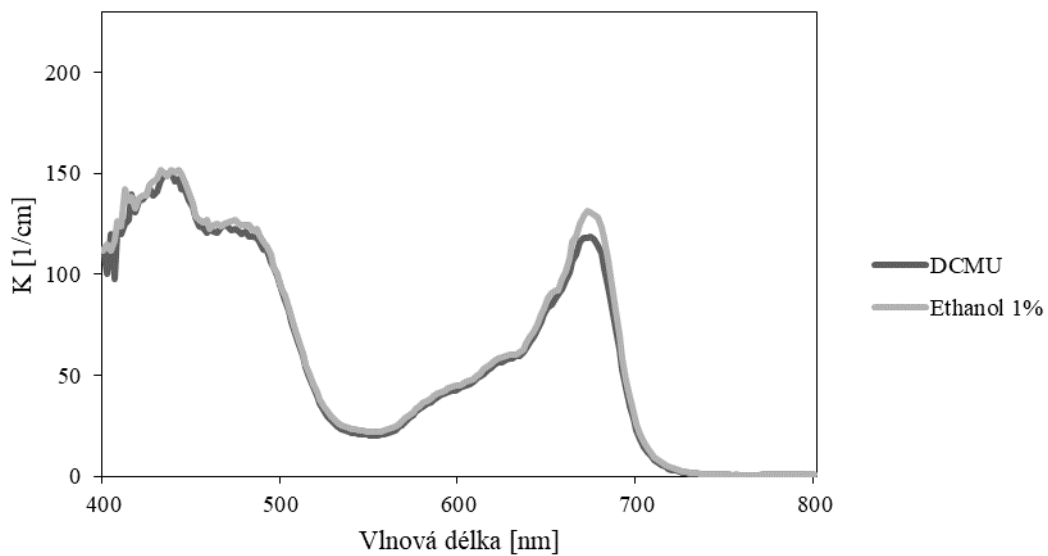
Graf 23: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného roztoky koncentrační řady ethanolu.



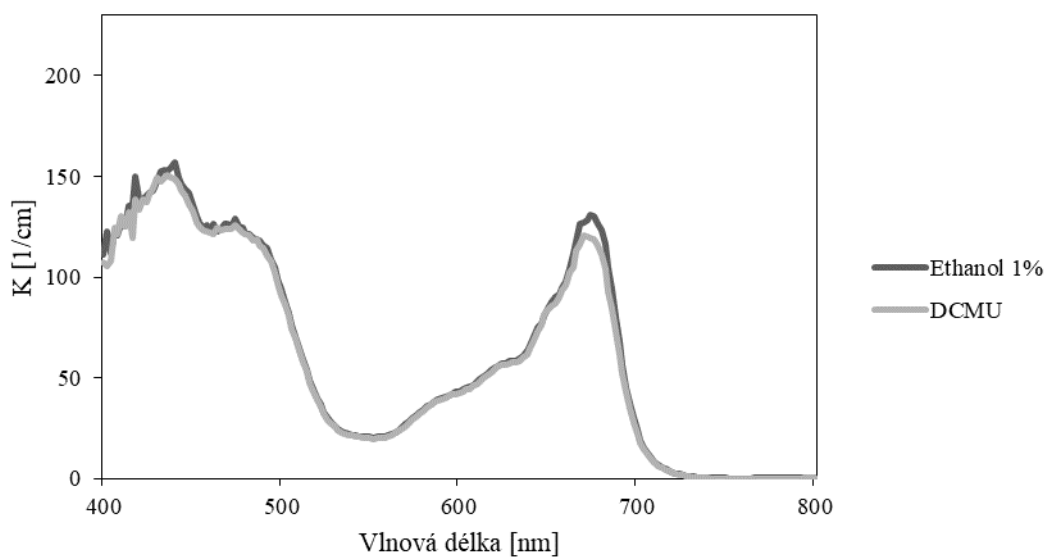
Graf 24: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného roztoky koncentrační řady ethanolu.

Simulace hodnot absorpčního a rozptylového koeficientu nevyšly podle našich předpokladů, kdy se se zvyšující koncentrací ethanolu měla snižovat hodnota fluorescence, která je viditelná na peaku při 680 nm. Zhášení fluorescence mělo proběhnout z toho důvodu, že barviva obsažena v chloroplastu se měla vymýt. Pravděpodobně však došlo k poškození organel, a tak se hodnota fluorescence s vyšší koncentrací ethanolu zvýšila.

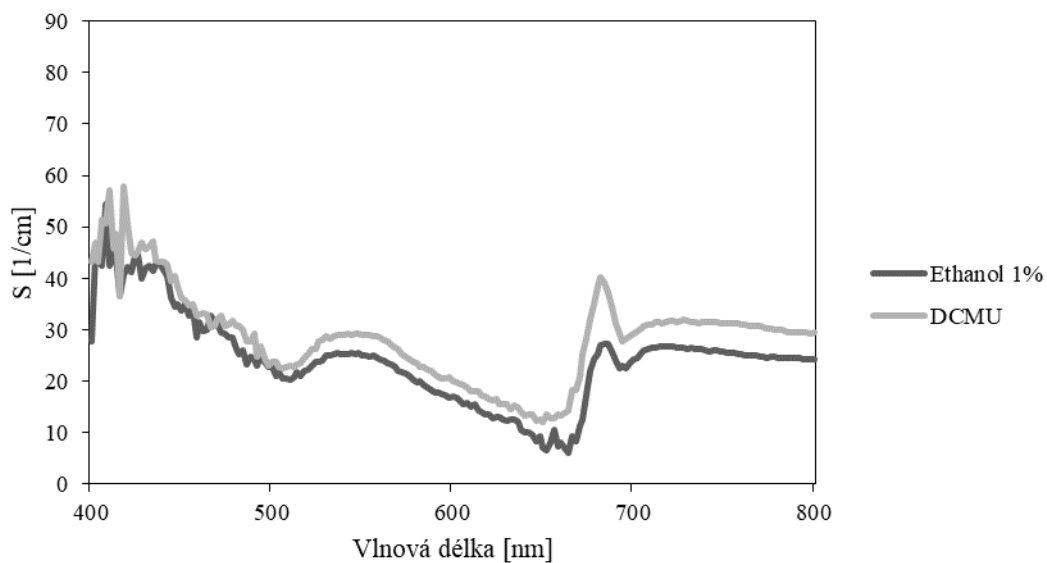
4.2.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu DCMU



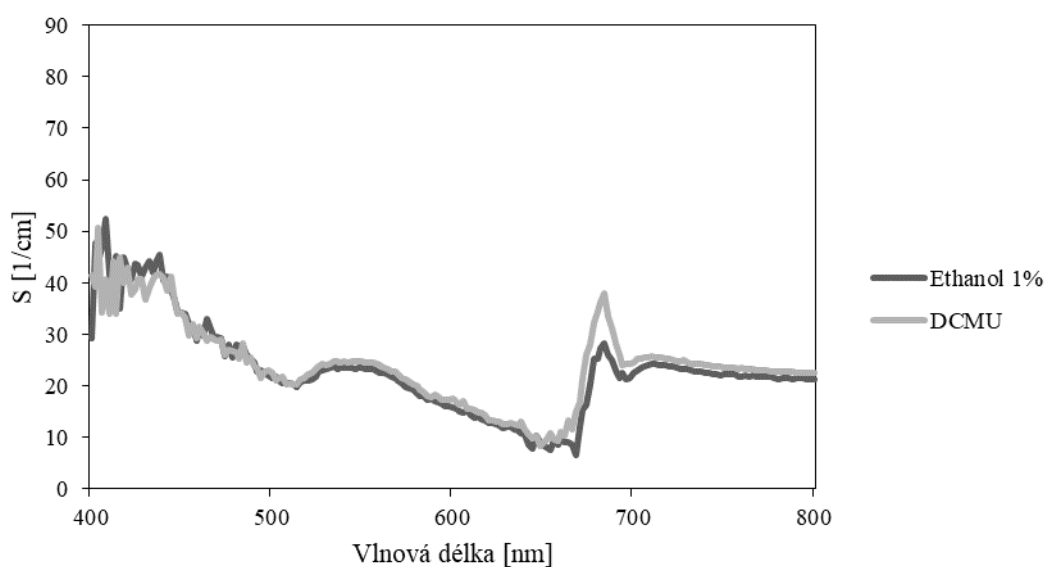
Graf 25: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200 μM DCMU.



Graf 26: Spektra absorpčního koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200 μM DCMU.



Graf 27: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200 μM DCMU.

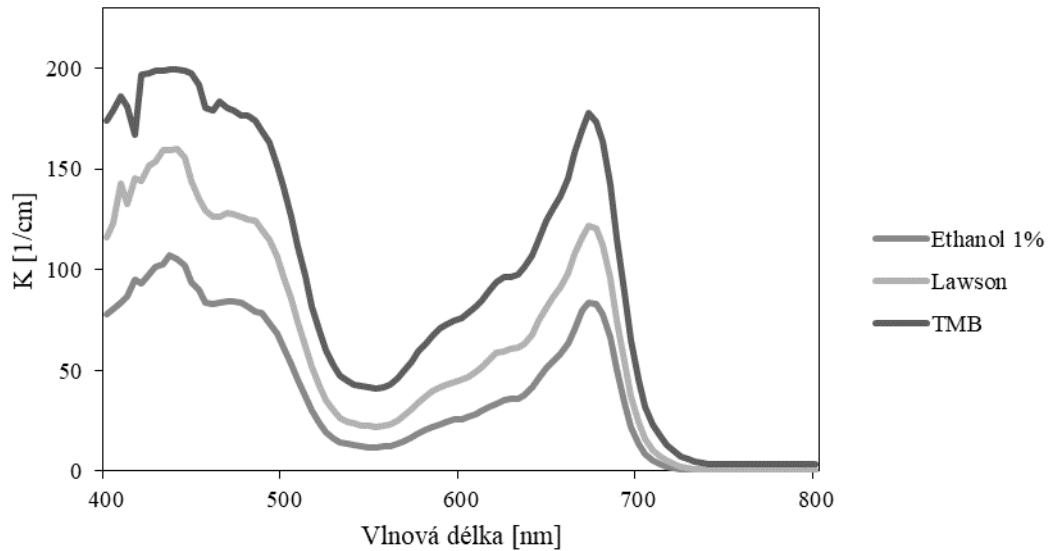


Graf 28: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200 μM DCMU.

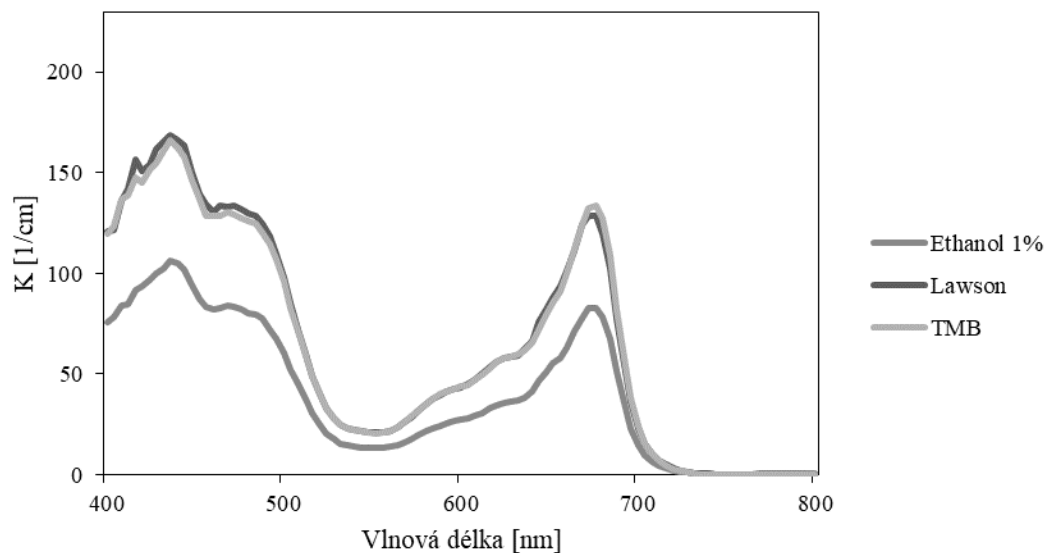
Infiltrací listu tabáku 200 μM DCMU byly částečně potvrzeny předpokládané výsledky. Simulace spektra absorpčního koeficientu vyšla dle našich předpokladů, kdy došlo ke snížení hodnoty maxima při 680 nm. Hodnoty rozptylového koeficientu byly oproti 1% ethanolu na peaku při 680 nm byly zvýšeny. Domníváme se, že mohlo dojít ke zhášení

fluorescence, protože koncentrace DCMU byla vyšší, než se používá u suspenzí chloroplastů.

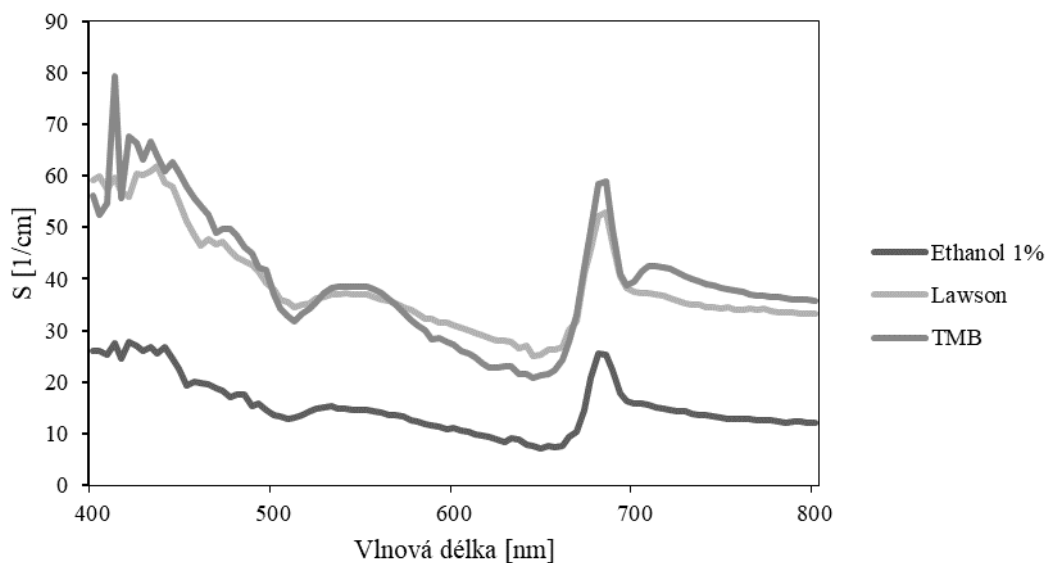
4.2.3. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu zhášečů



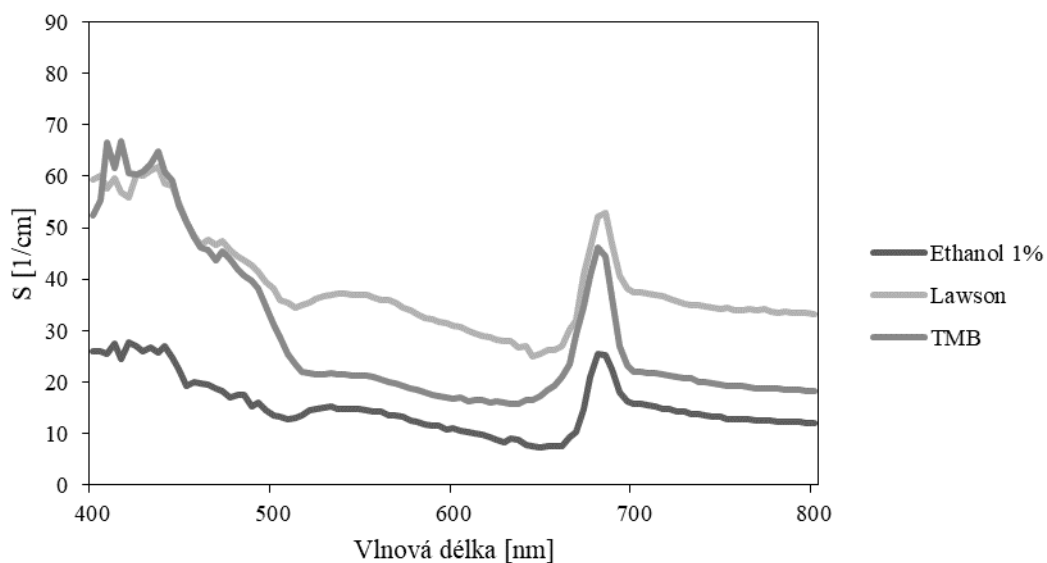
Graf 29: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200 µM lawsonem a 200 µM TMB.



Graf 30: Spektra absorpčního koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem 200 µM lawsonem a 200 µM TMB.



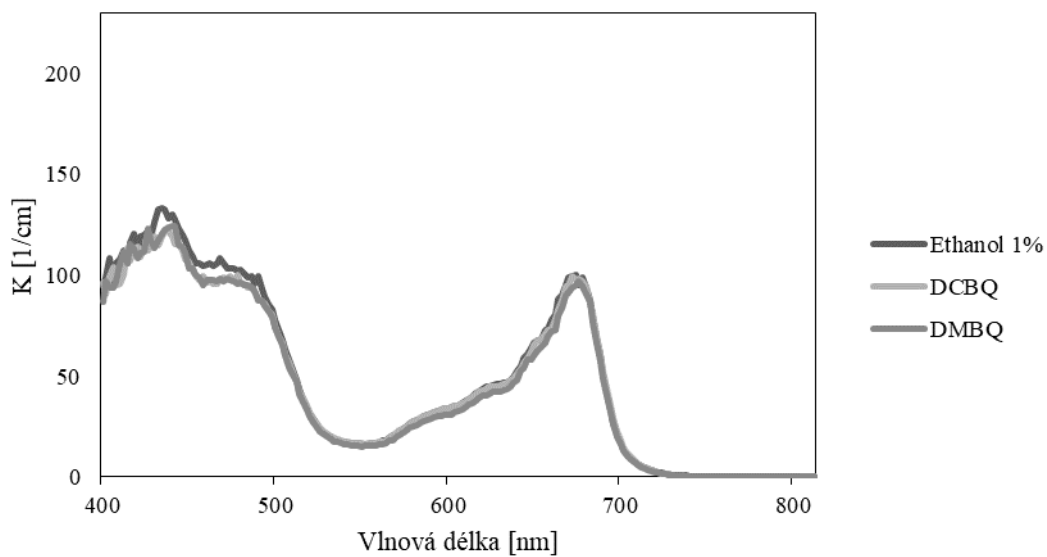
Graf 31: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200 μ M lawsonem a 200 μ M TMB.



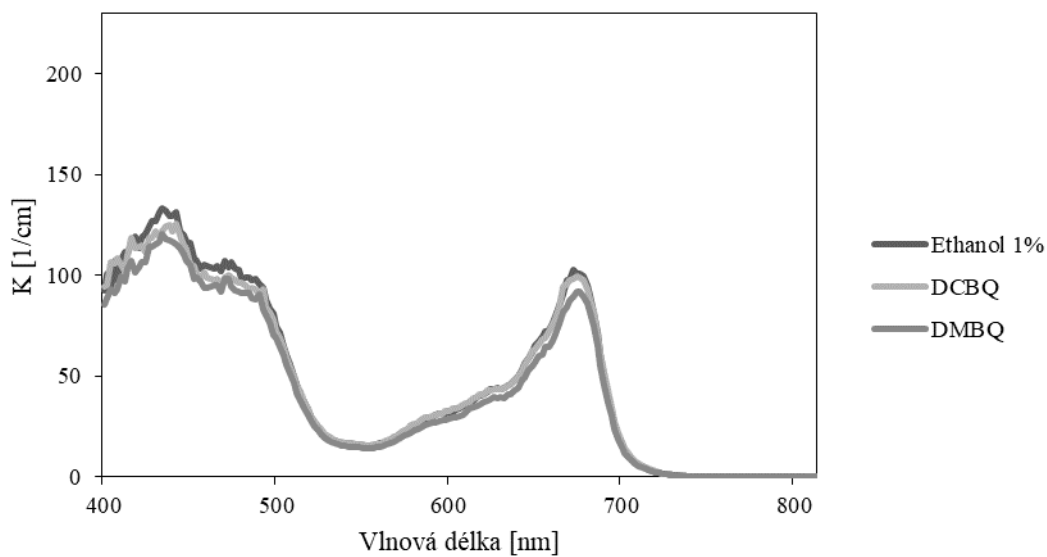
Graf 32: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200 μ M lawsonem a 200 μ M TMB.

Z grafů 29 a 30 lze jednoznačně určit, že absorpční koeficient vzorku při infiltraci lawsonem i TMB se zvýšil. Na grafu 29, který zobrazuje data adaxiální strany listu, je rozdíl markantnější, než na grafu 30. Na grafech 31 a 32, které zobrazují hodnoty rozptylového koeficientu, lze pozorovat zvýšení hodnot. Zvýšení hodnot bylo pravděpodobně způsobeno z důvodu velmi nízké koncentrace zhášeče, došlo tak jen k částečnému zhášení. Dále mohlo

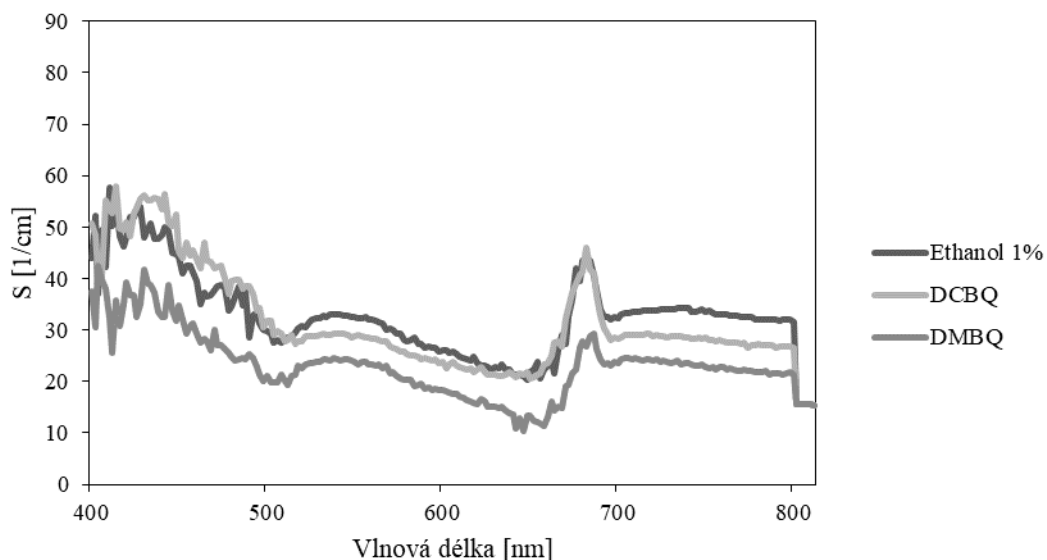
dojít k reakci zhášeče s vnitřním prostředím listu. Domníváme se se tedy, že v tomto případě jsou spektra absorpčního koeficientu jsou citlivější k projevům fluorescence.



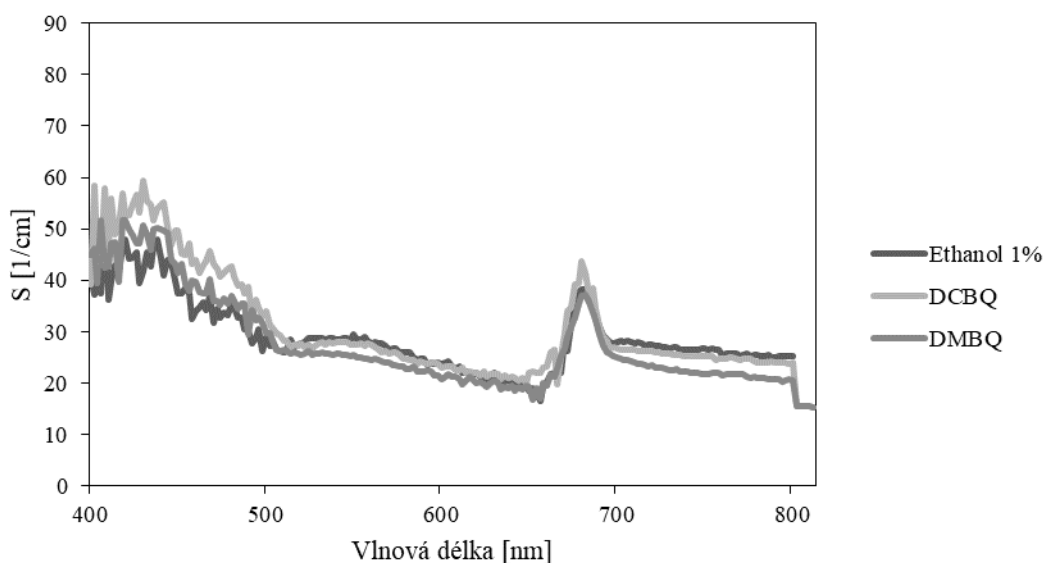
Graf 33: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200 μM DCBQ a 200 μM DMBQ.



Graf 34: Spektra absorpčního koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200 μM DCBQ a 200 μM DMBQ.



Graf 35: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200 μM DCBQ a 200 μM DMBQ.



Graf 36: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200 μM DCBQ a 200 μM DMBQ.

U těchto dvou zhášeců je projev fluorescence u absorpčního koeficientu pro obě strany listu a také u rozptylového koeficientu pro abaxiální stranu listu nepatrný. Mírný pokles fluorescence u peaku při 680 nm je u adaxiální strany listu. Námí zvolená koncentrace zhášeců DCBQ a DMBQ byla pravděpodobně příliš nízká, proto byl projev zhášení fluorescence nepatrný. V tomto případě měla být pravděpodobně koncentrace zhášeců vyšší, než námí zvolených 200 μM .

Z našich měření má největší vliv na zhášení fluorescence zhášeč TMB. Malý vliv na fluorescenci mají zhášeče DCBQ a DMBQ.

5. Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem se zabýval problematikou zhášení fluorescence chlorofylu látkami příbuznými plastochinonu, který je účastněn při elektronovém transportu ve fotosystému II. Další zkoumanou chemickou látkou byl mitotický jed DCMU. Teoretická část byla věnována způsobu měření fluorescence, jejímu zhášení a chemickým látkám, které by byly vybrány pro experiment. Dále byla popsána spektra difuzní odrazivosti a propustnosti.

Praktická část byla zaměřena na způsob a postup při měření spekter reflektance a transmitance. Dále byla porovnána data získaná z měření nativního listu, listu infiltrovaného deionizovanou vodou či 1% ethanolem a listem infiltrovaným danými zhášeči, či DCMU. Podařilo se mi změřit a zjistit pokles či nárůst difuzní odrazivosti a propustnosti infiltrovaných vzorků oproti vzorkům nativním.

Pomocí dat získaných z měření reflektance a transmitance bylo umožněno použít metodu MCPT, pomocí které byly vyměřeny absorpční a rozptylové koeficienty vzorků infiltrovaných zvolenými chemickými látkami.

V rámci této práce byly jako zhášeče fluorescence chlorofylu zvoleny látky DCMU, TMB, Lawson, DCBQ a DMBQ. Vyhodnocením dat získaných pomocí simulací bylo zjištěno, že vybrané látky mají vliv na fluorescenci chlorofylu. Při tomto experimentu měl největší vliv na fluorescenci chlorofylu zhášeč TMB. Ostatní zhášeče projevily v dané koncentraci nepatrný efekt. Simulacemi absorpčního a rozptylového koeficientu vzorku infiltrovaného DCMU nebyly potvrzeny předpoklady o zvyšování fluorescence. Z grafů absorpčního i rozptylového koeficientu bylo pozorováno snížení fluorescence chlorofylu. Je možné, že koncentrace látky pro zvýšení fluorescence chlorofylu v intaktním listu byla příliš vysoká.

6. Seznam použité literatury

Literatura

ALRIC, Jean, Jérôme LAVERGNE a Fabrice RAPPAPORT. Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* (I) aerobic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2010, **1797**(1), 44-51 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.07.009. ISSN 00052728. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272809002321>

BABULA, Petr, Veronika VAVERKOVA, Zuzana POBORILOVA, Ludmila BALLOVA, Michal MASARIK a Ivo PROVAZNIK. Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. 2014, **84**, 78-86 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.08.027. ISSN 09819428. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814002770>

BARÁNKOVÁ, Barbora, Dušan LAZÁR and Jan NAUŠ, 2016. Analysis of the effect of chloroplast arrangement on optical properties of green tobacco leaves. *Remote Sensing of Environment*[online]. vol. 174, pp. 181–196 [cit-2018-07-18]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.rse.2015.12.011](https://doi.org/10.1016/j.rse.2015.12.011)

BABULA, Petr, Vojtěch ADAM, Ladislav HAVEL a René KIZEK. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones – their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis* [online]. 2009, **5**(1), 47-68 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.2174/157341209787314936. ISSN 15734129. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4129&volume=5&issue=1&spage=47>

BENEŠOVÁ, M., 2014. Odlišná reakce inbredních a hybridních genotypů kukuřice na sucho: analýza listového proteomu a fotosyntetických procesů. Disertační práce. Přírodovědecká fakulta UK. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/63165>

BRASLAVSKY, S. E. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*[online]. 2007, **79**(3), 293-465 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1351/pac200779030293. ISSN 1365-3075.

Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2007.79.issue-3/pac200779030293/pac200779030293.xml>

BUREŠ, Radovan. Spektrofotometrická měření směsných roztoků tiskových barev [online]. . Pardubice, 2011 [cit. 2018-07-18]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/z7w769>

BUSCHMANN, Claus a Karl GRUMBACH. *Physiologie der Photosynthese*. Berlin: Springer-Verlag, 1983. [cit. 2018-07-18]. ISBN 9783540151456

DELPHIN, Estelle, Jean-Claude DUVAL, Anne-Lise ETIENNE a Diana KIRILOVSKY. ΔpH-Dependent Photosystem II Fluorescence Quenching Induced by Saturating, Multiturnover Pulses in Red Algae. *Plant Physiology* [online]. 1998, **118**(1), 103-113 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1104/pp.118.1.103. ISSN 0032-0889.

Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.118.1.103>

EISNER, T. Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *Journal of Experimental Biology* [online]. 2004, **207**(8), 1313-1321 [cit. 2018-07-18].

DOI: 10.1242/jeb.00849. ISSN 0022-0949.

Dostupné z: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.00849>

FLOREANI, M., A. FORLIN, S. BELLIN a F. CARPENEDO. Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump as a target for benzoquinones. *General Pharmacology: The Vascular System* [online]. 1996, **27**(5), 873-878 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1016/0306-3623(95)02130-2. ISSN 03063623.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306362395021302>

GRENE, Ruth. Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *The Arabidopsis Book* [online]. 2002, **1**, e0036- [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1199/tab.0036.1. ISSN 1543-8120. Dostupné z: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0036.1>

HARRIS, DA. Functions of Quinones in Energy-conserving Systems. *Biochemical Education* [online]. 1985, **13**(1), 42- [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1016/0307-4412(85)90150-5. ISSN 03074412.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0307441285901505>

HLÍZOVÁ, Eliška. Využití fluorescence chlorofylu ke sledování fyziologického stavu vegetace. Bakalářská práce. Praha: Univerzita Karlova v Praze. [online]. Praha, 2008 [cit. 2018-07-18]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/bakalar/prace/hlizova.pdf>

HOVI, Aarne, Petri FORSSTRÖM, Matti MÖTTUS a Miina RAUTIAINEN, 2017. Evaluation of Accuracy and Practical Applicability of Methods for Measuring Leaf Reflectance and Transmittance Spectra. *Remote Sensing* [online]. 24., vol. 10, no. 2, p. 25. Dostupné z: doi:10.3390/rs10010025

CHMELINOVÁ, Barbora. Modelování vlivu elektrických polí vytvářených přenašeči elektronů ve fotosystému II na chlorofylovou fluorescenční indukci [online]. Olomouc, 2014 [cit. 2018-07-18]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/iqbexc/>; Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Dušan Lazár, Ph.D.

CHOBOT, V. a F. HADACEK. Milieu-Dependent Pro- and Antioxidant Activity of Juglone May Explain Linear and Nonlinear Effects on Seedling Development. *Journal of Chemical Ecology* [online]. 2009, **35**(3), 383-390 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1007/s10886-009-9609-5. ISSN 0098-0331. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-009-9609-5>

INGLE, James D. a Stanley R. CROUCH. *Spectrochemical analysis*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, c1988. ISBN 978-0138268763.

JONES, ROBERT W., MARY A. SELAK a JOHN WHITMARSH. Electrogenic reactions of the chloroplast cytochrome b/f complex. *Biochemical Society Transactions* [online]. 1984, **12**(5), 879-880 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1042/bst0120879. ISSN 0300-5127. Dostupné z: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/bst0120879>

KIRCHHOFF, Helmut, Sebastian HORSTMANN a Engelbert WEIS. Control of the photosynthetic electron transport by PQ diffusion microdomains in thylakoids of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2000, **1459**(1), 148-168 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1016/S0005-2728(00)00143-2. ISSN 00052728. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272800001432>

KURTYKA, Renata, Wojciech POKORA, Zbigniew TUKAJ a Waldemar KAR CZ. Effects of juglone and lawsone on oxidative stress in maize coleoptile cells treated with IAA. *AoB Plants* [online]. 2016, **8**, plw073- [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1093/aobpla/plw073. ISSN 2041-2851. Dostupné z: <https://academic.oup.com/aobpla/article-lookup/doi/10.1093/aobpla/plw073>

LING, Qihua, Weihua HUANG a Paul JARVIS. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* [online]. 2011, **107**(2), 209-214 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1007/s11120-010-9606-0. ISSN 0166-8595. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11120-010-9606-0>

MAREK, Michal V., Otmar URBAN a Irena MARKOVÁ. *Fyziologie rostlin pro lesní inženýry*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008. ISBN 978-80-7375-228-6.

MCNAUGHT, Alan D. a Andrew WILKINSON. *Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations*. 2nd ed. Malden, MA, USA: Blackwell Science, 1997. ISBN 0-86542-684-8.

PRESTON, Eric M. a GULLETT, Thomas L. *The Bioenvironmental impact of a coal-fired powerplant: fourth interim report*, Colstrip, Montana, December, 1978. Paris : A. Fayard, 1979. 866-893 [cit. 2018-07-18]

RIDLEY, S. M. Interaction of Chloroplasts with Inhibitors: Induction of Chlorosis by Diuron During Prolonged Illumination in Vitro. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. 1977, **59**(4), 724-732 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1104/pp.59.4.724. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.59.4.724>

ROHÁČEK, Karel, Julie SOUKUPOVÁ a Miloš BARTÁK. Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In *Plant Cell Compartments - Selected Topics*. Kerala - India: Research Signpost, 2008. s. 41-104, 64 s. B. Schoefs (ed.), 1st edition. ISBN 978-81-308-0104-9.

SOKOLIK, Irina N. The Beer-Bouguer-Lambert law. Concepts of extinction (scattering plus absorption) and emission. Schwarzschild's equation. [online prezentace]. [cit 2018-07-18].

Dostupné z: http://irina.eas.gatech.edu/EAS8803_Fall2009/

SRHOLCOVÁ, B. Zhášení fluorescence ve studiu agregačního chování koloidů [online]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=25536

VELTHUYS, B.R. Electron-dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Letters* [online]. 1981, **126**(2), 277-281 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1016/0014-5793(81)80260-8. ISSN 00145793.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2881%2980260-8>

VOLKA, Karel, Marcela TKADLECOVÁ a Kamil ZÁRUBA. Příklady z analytické chemie pro bakaláře. 74-75. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-610-9.

YANG, Li, Tianming CAI, Dahu DING, Tianjin CAI, Canlan JIANG, Hua LI, Qian YANG a Liwei CHEN. Biodegradation of 2-hydroxyl-1,4 naphthoquinone (lawsone) by *Pseudomonas taiwanensis* LH-3 isolated from activated sludge. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), - [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1038/s41598-017-06338-1. ISSN 2045-2322.

Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-06338-1>

ZABORSKA, Wiesława, Mirosława KOT a Kinga SUPERATA. Inhibition of Jack Bean U rease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the Inhibition Mechanism. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry [online]. 2008, **17**(4), 247-253 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1080/1475636021000011670. ISSN 1475-6366.
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1475636021000011670>

ZUO, Yu-Ting, Yu HU, Wei-Wei LU, Jing-Jing CAO, Fan WANG, Xue HAN, Wen-Qing LU a Ai-Lin LIU. Toxicity of 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone and five regulated drinking water disinfection by-products for the *Caenorhabditis elegans* nematode. Journal of Hazardous Materials[online]. 2017, **321**, 456-463 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.09.038. ISSN 03043894.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389416308603>

Internetové zdroje

2,5-Dibromo-6-isopropyl-3-methyl-1,4-benzoquinone | CAS 29096-93-3 | SCBT - Santa Cruz Biotechnology. [online]. Copyright © 2007 [cit. 2018-07-18].
Dostupné z: <https://www.scbt.com/scbt/product/2-5-dibromo-6-isopropyl-3-methyl-1-4-benzoquinone-29096-93-3>

2,5-Dimethyl-1,4-benzoquinone 39579. Sigma-Aldrich[online]. [cit 2018-07-18].
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/39579?lang=en&ion=CZ>

2,6-Dichloro-1,4-benzoquinone [online]. [cit. 2018-07-18].
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/431982?lang=en&ion=CZ>

2,6-Dichloro-1,4-benzoquinone 431982. Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2018-07-18].
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/431982?lang=en&ion=CZ>

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine. A3840. AppliChem [online]. [cit. 2018-07-18].
Dostupné z: https://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a3840_de.pdf

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine T2885. Sigma-Aldrich[online]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t2885?lang=en&ion=CZ&gclid=CjwKCAjwyrvaBRACEiwAcyuzRK7QzF64boOqEsZIYVm4tOp36zojrYwQ5z4VzhxHGRQQmxsdhiravhoCL3kQAvD_BwE

Diuron. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database [online]. [cit 2018-07-18].

Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diuron#section=Top>

GOTTWALDOVÁ, Jana. Optické metody [online prezentace] [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/4082378/>

Katedra biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci. Zhášení fluorescence [online prezentace]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: <http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/OSP1-12Web.pdf>

Lawson. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database[online]. [cit 2018-07-18].

Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lawson#section=Top>

Přírodovědecká fakulta, Masarykova [online]. Copyright © [cit. 18.07.2018].

Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/fluorometrie.pdf>

Reflection, Transmission, and Absorption[online]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: <https://light-measurement.com/reflection-absorption/>

Sigma-Aldrich,

Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services. | Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ALDRICH/271993?lang=en&ion=CZ>

Spectrophotometry: Transmittance and Absorbance | cell biology olm. Density-Gradient Centrifugation | cell biology olm[online]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: <http://cellbiologyolm.stevegallik.org/node/7>

TREJBALOVÁ, Ivona, ŠMEJKAL, Petr. Spektroskopické vlastnosti látek [online prezentace]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/navody2007/5prezentacespektroskopie.pdf>

Turner Designs, An Introduction to Fluorescence Measurements [online]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: <https://www.turnerdesigns.com/t2/doc/appnotes/998-0050.pdf>

Zobrazování účinků herbicidu na fotosyntézu mapováním chlorofylové fluorescence listů v yšších rostlin [online]. [cit. 2018-07-18].

Dostupné z: http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/KEBR220_U08-Herbicid-2012.pdf