

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



Fluorescence chlorofylu u vybraných druhů rodu

Capsicum

Bakalářská práce

Autor práce: Barbora Janíčková

Obor studia: Zahradnictví

Vedoucí práce: Ing. Helena Hniličková, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Fluorescence chlorofylu u vybraných rodů druhu Capsicum" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Heleně Hniličkové, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Fluorescence chlorofylu u vybraných druhů rodu *Capsicum*

Souhrn

Cílem této práce je u vybraných druhů rodu *Capsicum* vyhodnotit parametry fluorescence chlorofylů u světelně a temnotně adaptovaného listu. Hodnocenými druhy bude *Capsicum annum* 'Jalapeño', *C. frutescens* 'Twilight' a *C. chinense* 'Habanero Red'. U pokusů, které byly založeny ve sklenících v areálu ČZU byly pomocí fluorometru ADC:OSI 1 FL měřeny fluorescenční parametry v režimu světelně adaptovaného listu a temnotně adaptovaného listu. Jednotlivá měření byla zaznamenána a po zprůměrování byly hodnoty zaneseny do grafů.

Největší rozdíly v parametrech fluorescence v temnotně adaptovaném stavu byly zaznamenány u parametru F₀, což znamená základní fluorescenci neboli minimální výtěžek fluorescence chlorofylu změřený na zatemněných vzorcích. Konkrétně u druhu *Capsicum annum* 'Jalapeño' byla hodnota F₀ 239,53 a naopak u druhu *Capsicum chinense* 'Habanero Red' byla tato hodnota 214,8. U parametru F_m neboli hodnoty maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu vykazovala největší hodnotu *Capsicum chinense* 'Habanero Red' (1038,4) a nejnižší naopak *Capsicum annum* 'Jalapeño' s hodnotou 852,57. Největší rozdíl u parametru F_v, jinak také variabilní fluorescence byl opět u těchto dvou odrůd. Naopak u parametru F_v/F_m, který znamená maximální kvantový výtěžek se hodnoty pohybovaly od 0,67 do 0,79. Nejvyšší hodnotu 0,79 má *Capsicum chinense* 'Habanero Red'. Nejnižší hodnotu vykazuje *Capsicum frutescens* 'Twilight'.

Hodnoty parametrů ve světelně adaptovaném stavu se u těchto tří odrůd opět lišily. Například u maximálního možného výtěžku fluorescence (parametr Yield) byla vyhodnocena nejvyšší hodnota u *Capsicum annum* 'Jalapeño' a *Capsicum frutescens* 'Twilight' 0,72. U *Capsicum chinense* 'Habanero Red' byla pak naměřena hodnota 0,7.

Ve výsledcích se ukázalo, že i při stejných podmínkách každý druh rodu *Capsicum* vykazoval jiné hodnoty F₀, F_m, F_v i F_v/F_m v temnotně adaptovaných vzorcích a stejně tak byly rozdíly i v parametrech F_s, F_{ms}, F_{vs} a Yield ve světelném stavu.

Klíčová slova: *Capsicum*, maximální kvantový výtěžek, světelně a temnotně adaptovaný list, fluorescencechlorofylů

Chlorophyll fluorescence of selected species of the genus *Capsicum*

Summary

The aim of this work is to evaluate fluorescence parameters of chlorophylls in light and darkly adapted leaves in selected species of the genus *Capsicum*. The species to be assessed will be *Capsicum annum* 'Jalapeño', *C. frutescens* 'Twilight' and *C. chinense* 'Habanero Red'.

In experiments that were based in greenhouses in the premises of the Czech University of Agriculture, fluorescence parameters were measured using the fluorometer ADC: OSI 1 FL fluorescence parameters in the light-adapted leaf and the darkly adapted leaf. The individual measurements were recorded and after the averaging the values were plotted.

The greatest differences in fluorescence parameters in the darkly adapted state were recorded for parameter F_0 , which means basic fluorescence or minimal yield of chlorophyll fluorescence measured on darkened samples.

Specifically for *Capsicum annum* 'Jalapeño', the value of F_0 was 239.53, and for *Capsicum chinense* 'Habanero Red' it was 214.8.

For F_m , the maximum fluorescence value in the darkly adjusted state showed the highest value of *Capsicum chinense* 'Habanero Red' (1038.4) and the lowest *Capsicum annum* 'Jalapeño' with a value of 852.57. The biggest difference for the F_v parameter, otherwise the variable fluorescence was again with these two varieties. Conversely, for the parameter F_v / F_m , which means maximum quantum yield, the values ranged from 0.67 to 0.79. The highest value of 0.79 is *Capsicum chinense* 'Habanero Red'. The lowest value is *Capsicum frutescens* 'Twilight'.

The values of the parameters in the light-adapted state varied again for these three varieties. For example, for the maximum possible yield of fluorescence (Yield parameter), the highest value for *Capsicum annum* 'Jalapeño' and *Capsicum frutescens* 'Twilight' 0.72 was evaluated. *Capsicum chinense* 'Habanero Red' was then measured at 0.7.

The results showed that even under the same conditions, each species of the genus *Capsicum* exhibited different values of F_0 , F_m , F_v and F_v / F_m in the darkly adapted samples, and also the differences in the parameters F_s , F_{ms} , F_{vs} and Yield in the light state.

Keywords: *Capsicum*, maximum quantum yield, light and darkly adapted leaf, fluorescence of chlorophylls

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Rod Capsicum.....	3
3.1.1	Botanická charakteristika.....	3
3.1.2	Druhy paprik	4
3.2	Fotosyntéza.....	6
3.2.1	Fotosyntéza obecně.....	6
3.2.2	Fotosystémy PSI a PSII	8
3.3	Fluorescence chlorofylů.....	9
3.3.1	Pojem fluorescence	9
3.3.2	Historie výzkumu fluorescence chlorofylů	12
3.3.3	Metody měření fluorescence.....	13
4	Metodika	15
4.1	Popis odrůd	15
4.2	Založení pokusu.....	15
4.3	Metodika měření.....	16
5	Výsledky	19
6	Diskuze	24
6.1	Fluorescence chlorofylů.....	24
7	Závěr	26
8	Seznam literatury.....	27

1 Úvod

V dnešní době jsou rostliny čím dál více vystavovány stresovým faktorům, ať už díky klimatickému zvyšování teplot, nedostatku vody či živin, tak kvůli ubývajícím plochám pro pěstování plodin což způsobuje, že jsou na ně kladeny vyšší nároky.

Fluorescence chlorofylu patří k významným metodám, která nám dokáže poskytnout důležité informace o fotosyntetických procesech v rostlinách. Od doby, kdy byl poprvé popsán vztah mezi fotosyntetickou aktivitou a fluorescencí chlorofylu došlo k výraznému technickému pokroku, a tudíž i k rozšíření používání této metody. Dnes máme k dispozici přesné fluorimetry, díky kterým je možné měřit fluorescenci chlorofylu kromě v laboratorních podmínkách i v podmínkách terénních. Fluorescence chlorofylu je proměnlivá v důsledku působení různých stresových faktorů, jako je například chlad, vysoká teplota, nadměrné ozáření, nedostatek vody či živin a zároveň nám může poskytnout informace o tom, jak je rostlina schopná tento stres tolerovat. Tato metoda je uplatňována hlavně ve fyziologii rostlin, ale je možné ji také využít v rostlinolékařství pro detekci zaplevelení plodin nebo také k odhalení výživových nedostatků. Tato metoda má velké pozitivum v tom, že lze detekovat poškození na rostlinách dříve, než jsou projevy viditelné pouhým okem. Na základě fluorescence chlorofylů je možné stanovit intenzitu fotosyntézy. Fotosyntéza patří mezi jednu ze základních charakteristik zdravotního stavu rostliny.

Metoda měření fluorescence chlorofylu má díky tomu, že je snadno měřitelná, velký potenciál stát se velice využívanou metodou pro zajištění optimálních podmínek zemědělským plodinám, detekovat rostliny napadené patogenem či selekci odrůd, které budou odolné vůči stresu.

V této práci jsou vyhodnocovány parametry fluorescence chlorofylu u odrůd paprik, jak v temnotně adaptovaném stavu, tak ve světelně adaptovaném stavu.

2 Cíl práce

Fluorescence chlorofylu je technikou určující fyziologický stav rostlin. S jejím využitím lze tedy detekovat působení různých stresových faktorů na rostliny, jako je vysoká či nízká teplota, mechanická poškození, nedostatek či nadbytek vláhy a světla a využít těchto informací k zajištění optimálních podmínek pro vegetaci. Cílem této práce je změření fluorescence chlorofylů u vybraných druhů rodu *Capsicum* (těmito druhy jsou *Capsicum annum* 'Jalapeño', *Capsicum chinense* 'Habanero Red' a *Capsicum frutescens* 'Twilight') při daných podmínkách a zjistit rozdíly v hodnotách fluorescence a možnosti využití této metody.

3 Literární přehled

3.1 Rod *Capsicum*

3.1.1 Botanická charakteristika

Paprika (*Capsicum*) je rod zahrnující asi 10 druhů jednoletých bylin a keřů (Cheers, 2003). Pochází z tropické Ameriky, a to pravděpodobně z Kolumbie, i když roste v mnoha oblastech Střední i Jižní Ameriky. V rámci celého světa se obecně pěstuje v teplých oblastech jižní Evropy, ve Střední Americe, Indii a Východní Asii (Valíček, 2005). Například v Mexiku je největší rozmanitost papriček, což představuje i část národní tradice a kulturní identity (González-Zamora et al., 2013). V České republice se pěstují jen omezeně, a to pouze v teplých oblastech (Baranec a kol., 2001).

Mnoho různých druhů z rodu *Capsicum* jsou široce pěstovány pro své plody, které se buď konzumují v čerstvém stavu, vařené, dále ve formě koření, jako omáčka nebo mohou být zpracovány jako čistý kapsaicin (Peter, 2001).

Paprika je v našich podmínkách jednoletý druh, má jednoduché listy, květy jsou bílé a plody tvoří vysychavou bobuli. Květ je oboupohlavný, rostlina je převážně samosprašná, ale u cizokrajných odrůd se však vyskytuje i cizosprašnost (Kóňa, Barátová, Kóňová, 2013). Zralé plody se dále mohou rozemlít a používat jako koření. (Baranec a kol., 2001). Některé odrůdy s drobnými plody se pěstují jako okrasné, kvůli svým živě zbarveným plodům. Bohužel některé tyto odrůdy se dají zaměnit s podobnými zástupci čeledi lilkovitých (Solanaceae), jejich plody jsou ovšem jedovaté (Cheers, 2003).

Rod *Capsicum* řadíme do čeledi lilkovitých a v rámci tohoto rodu je obecně uznáváno 5 zdomácnělých druhů: *Capsicum annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* a *C. pubescens*.

Jak už bylo uvedeno výše, tak v našich podmínkách je paprika jednoletou rostlinou, ale v tropických oblastech či při rychlení se dá pěstovat jako víceletá (Valšíková a kol., 1987). Paprika patří mezi rostliny dvouděložné s epigeickým klíčením (Valšíková a kol., 1987). Kořenová soustava je svazkovitá, hlavní kořen je krátký a hodně rozvětvený. Jednotlivé kořeny mohou dorůst až do hloubky 1,2 m. Kořenová soustava má slabší sací sílu, ale velice rychle dokáže regenerovat. Je mělce kořenicí, z čehož vyplývá, že je velice náročná na pravidelnou závlahu (Kóňa, Barátová, Kóňová, 2013). Lodyha u papriček je vzpřímená a řídce větvená (Hejný, Slavík, 1997). U tropických druhů a víceletých rostlin je pak lodyha spíše

dřevnatá, ale i jednoleté rostliny pěstované u nás vytvoří po nějakém čase dřevnatou lodyhu. Za vhodných podmínek dosahuje lodyha až 85 cm. Výšku lodyhy ovlivňují vlastnosti půdy, množství srážek a další vegetační faktory. Odrůdy paprik můžeme podle vzrůstu dělit do nízkotrsých forem (30-40 cm), středně vysokých (45-60 cm) a vysokých forem, které mohou dosahovat až do výšky 100 cm.

Paprika je teplomilná rostlina, proto by průměrná roční teplota v oblastech vhodných pro pěstování měla být více než 9°C. Minimální teplota vhodná pro pěstování je 14 °C, optimální teplota přes den cca 24 °C a v noci asi 17°C. Naopak ale při teplotách nad 30 °C nebo pod 17 °C se růst rostliny zastaví (Petříková, 2006).

Jsou světlomilné a nedostatek světla způsobuje opadávání květů či květních pupat a zpomalení vývoje rostliny (Petříková, 2006). Vybíráme proto stanoviště s nejdelší možnou sluneční expozicí. Doba slunečního svitu se totiž pozitivně odráží na chuti plodů a bezproblémovém dozrávání, a zároveň je pak rostlina odolnější vůči chorobám a škůdcům.

Optimální půda pro pěstování papriky je lehká, záhřevná půda s dostatkem humusu. Půdní typ je ideální černozem, hnědozem nebo spraš. Důležitá je provzdušněnost půdy, čehož se docílí kultivací (Petříková, 2006). Optimální pH půdy pro kořeninovou papriku je 5 – 7,5. Teplota půdy by měla být v rozmezí 20-30 °C.

3.1.2 Druhy paprik

Capsicum annuum – paprika roční

Je to jediný druh, který má největší variabilitu plodů z celého rodu, a to od velkých sladkých, téměř kulatých paprik, přes plody špičaté (tzv. kapie) až po ty úplně nejmenší a nejpálivější chilli papriky.

Ve své domovině je paprika roční víceletým druhem. Mohou tvořit keříkové jednoleté rostliny, ale i dlouhověké keře (Cheers, 2003). Listy jsou vejčité, řapíkaté a zaostřelé. Hlavním znakem tohoto druhu jsou většinou jednotlivé květy, které mají nazpět zahnuté stopky (Cheers, 2003). Jinak jsou květy pětičetné a mohou mít bílou, žlutou nebo fialovou barvu. Lodyha je přímá, silně větvcí a může dosahovat výšky 0,3 – 1,2 m.



Obr. č. 1- *Capsicum annuum* 'Jalapeño' (www.foodforests.eu)

Capsicum frutescens-paprika křovitá

Tento druh se objevuje buď jako krátkověká trvalka, nebo naopak jako dlouhověké keře, které se mohou dorůstat výšky až 2,5 m a postupem času zcela zdřevnatí (Cheers, 2003).

Pochází z tropické Ameriky a pěstuje se všude v tropech, ale hlavně v Indii (Valíček, 2005).

Od předešlého druhu se liší dvěma i více květy v úžlabí listů, jejichž stopky jsou zahnuté pouze na vrcholku. Dále oproti paprice roční má také menší listy. Plody jsou rozmanité a většinou záleží na odrůdě. Zpravidla ale bývají plody malé a pálivé. Jejich využití jako chilli papriček je hlavně na nakládání nebo do chilli omáček. Hybridní papriky Tabasco, které pochází ze stejnojmenného města v jižním Mexiku, daly jméno i velmi ostré omáčce (Cheers, 2003).



Obr. č. 2- *Capsicum frutescens* 'Twilight' (www.seminka-chilli.cz)

Capsicum chinense – paprika čínská

Druh vysoký 40–80 cm, který je rozšířený zejména v severní části Jižní Ameriky. Svým habitem připomíná papriku křovitou. Má velice palčivé plody. Koření z těchto paprik je považováno za nejpálivější druh koření vůbec.



Obr. č. 3- *Capsicum chinense* 'Habanero Red' (www.seminka-chilli.cz)

Capsicum pubescens – paprika pýřitá

Tento druh je znám jako vytrvalá bylina nebo popínavý keř, který dosahuje výšky 2-3 m. Pochází z oblasti And a je pěstována zejména v Ekvádoru, Kolumbii, Bolívii a Peru.

Capsicum baccatum

Pochází z Jižní Ameriky, je to vytrvalá bylina, která dosahuje výšky 1-2 m. Jako koření se poslední dva druhy používají zejména v čerstvém stavu (Valíček, 2005).

3.2 Fotosyntéza

3.2.1 Fotosyntéza obecně

Fotosyntéza je klíčovým jevem, který výrazně přispívá k růstu a vývoji rostlin, i když je samozřejmě růst rostlin řízen mnoha fyziologickými, biochemickými a molekulárními procesy. Fotosyntéza probíhá ve všech zelených rostlinách, které se vyskytují jak v oceánech,

tak na zemi nebo ve fotosyntetických bakteriích (Ashraf and Harris, 2013). Rostliny představují otevřené systémy, ve kterých dochází k trvalé výměně hmoty (CO₂, O₂, H₂O, minerálních živin), energie a informací z okolí (Soukupová, Roháček, 2003). Převážná část rostlin patří mezi autotrofní organismy, u kterých je zdrojem energie záření (fotoautotrofie) nebo některé anorganické látky. Fotoautotrofní rostliny získávají vlastní energii fixací energie záření v procesech fotosyntézy. Tímto způsobem dojde k tomu, že se zpřístupní energie nejen pro metabolismus rostlin, ale doslova pro všechny organismy na celém světě (Procházka, 1988). V procesech fotosyntézy rostliny pohlcují energii ze slunečního záření a přeměňují ji na energii chemickou. Fotosyntéza je vlastně velký soubor reakcí, při nichž je přijatá sluneční energie využita k syntéze energeticky bohatých chemických sloučenin, za spoluúčasti oxidu uhličitého a vody (Soukupová, Roháček, 2003). Zahrnuje fotochemické procesy, jež probíhají za přítomnosti světla, enzymatické procesy, které světlo nevyžadují a procesy difúze, které zajišťují výměnu oxidu uhličitého a kyslíku mezi chloroplasty a vnějším vzduchem (Larcher, 1988). Během primární (světelné) fáze fotosyntézy vzniknou organické látky, jako jsou cukry, tuky a kyslík.

Fotosyntézu, jako proces, lze vyjádřit sumární rovnicí:

$6 \text{CO}_2 + 12 \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{h\nu} \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$, kde $h\nu$ znamená kvantum zářivé energie.

Z této rovnice lze vyčíst, že fotosyntetické procesy v rostlinách mohou zůstat aktivní pouze při dostatečně dlouhé době ozáření a stálému příjmu molekul vody a oxidu uhličitého (Roháček, 2011).

Fotosyntéza se dělí na dvě fáze: světelnou (fotofyzikální) a temnotní (chemosyntetickou). Světelná fáze probíhá na thylakoidní membráně, kde dojde k zachycení sluneční energie, která se přemění na energii chemickou. V temnotní fázi je fixován atmosférický oxid uhličitý a uhlík, který je zabudován do sacharidů v Calvin – Bensonově cyklu (Soukupová a Roháček, 2005).

Fotosyntéza probíhá v chloroplastech, které jsou nejmenší strukturní i funkční jednotkou, která je i po izolaci schopná absorbovat záření, fixovat oxid uhličitý a zabudovávat uhlík do sacharidů. Chloroplasty jsou složeny z dvojité povrchové membrány, vnitřní amorfní medium, které se nazývá stroma, jež obsahuje enzymy potřebné k fixaci CO₂, a membránových útvarů, tzv. thylakoidů. Thylakoidy jsou rozprostřené systémy vnitřní membrány vypadající jako zploštělé měchýřky (Soukupová a Roháček, 2005).

Chlorofyl je základní látkou, která dokáže zachycovat přicházející fotony. Tato látka se nazývá fotoreceptor. Chlorofyl má zelenou barvu, a to z důvodu, že intenzivně pohlcuje

viditelné záření v oblastech vlnových délek okolo 430 nm (modrá oblast spektra) a 663 nm (červená oblast), zatímco záření ze zelené oblasti propouští. Zelená oblast spektra se pohybuje okolo 500 nm. Jsou dva základní typy chlorofylů: chlorofyl a a chlorofyl b.

Sluneční záření je vlnění, jež se skládá z částic zvaných fotony. Toto vlnění lze charakterizovat vlnovou délkou. Viditelná oblast elektromagnetického záření je v intervalu od 400 do 700 nm, tzv. fotosynteticky aktivní radiace – FAR (Roháček, 2011). Fotosynteticky aktivní radiace tvoří z celkového záření asi 39-48 %, z toho listy přemění jen asi 1-5 % na chemickou energii (Hnilička a Středa, 2016).

Když fotony dopadnou na list a jsou pohlceny molekulami listových barviv, které jsou nahromaděné na thylakoidních membránách, dochází k rozštěpení molekuly vody. Tím se do vzduchu uvolní kyslík. Uvnitř thylakoidů se hromadí protony (H⁺) a elektrony jsou přeneseny až na tzv. redukční ekvivalent NADPH. Nahromaděné protony jsou poté využity na syntézu ATP (Nátr, 2007).

Z toho vyplývá, že energie, která je pohlcena chloroplasty, je využita na biochemicky využitelnou energii (ATP, NADPH), na tepelnou energii, která je vyzářena do okolí nebo je vyzářena zpátky do okolí v podobě fluorescence (Klem, 2006).

3.2.2 Fotosystémy PSI a PSII

Fotosystémy PSI a PSII vznikají spojením anténních (světlosběrných) komplexů s reakčními centry (RC) a přenašečovými molekulami (Soukupová a Roháček, 2005). Právě ve fotosystémech, které jsou přítomné uvnitř chloroplastů (konkrétně v thylakoidních membránách), probíhá fotosyntéza.

Fotosystémy potřebují neustálý přísun světelné energie, kterou jim zajišťují právě světlosběrné komplexy, které světlo absorbují a přijatou energii jim předávají ke zpracování. Absorpční složkou světlosběrných komplexů jsou chlorofyly a a b, betakaroten a xantofyly. Chlorofyl a je absorpční složkou v RC fotosystému I i II (Murchie and Lawson, 2013). Oba dva systémy obsahují doplňkové pigmenty (karotenoidy a u řas fykobiliny) (Larcher, 1988).

PSI i PSII se skládají z reakčního centra, které je tvořeno molekulou dimeru chlorofylu *a* a z vnitřních a vnějších (mobilních) světlosběrných antén, jež obsahují velké množství molekul chlorofylu *a* a *b*. Poměr chlorofylu *a* ku chlorofylu *b* je ve vnějších anténách cca 3:1.

PSI se skládá z řady pigmentů, které mají přesné strukturní uspořádání. Převládá zde chlorofyl *a* (poměr *a*:*b* je asi 6:1). Reakčním centrem je zde chlorofyl-*a*-bílkovinný komplex s maximem absorpce při 700 nm (Larcher, 1988).

PSII má větší podíl chlorofylu *b* (poměr *a*:*b* je až 2:1) a chlorofyl-*a*-bílkovinný komplex s maximem absorpce při 680 nm (Larcher, 1988). PSII přeměňuje energii slunečního záření (tzv. fotony) v energii chemickou. Tuto energii rostlina následně využívá ke svému životu (Hnilička a Středa, 2016).

Oba fotosystémy jsou navzájem propojeny celou řadou elektronových přenašečů a navzájem úzce spolupracují (Roháček, 2011).

Ultrastruktura chloroplastů a obsah barviv v chloroplastech jsou přizpůsobeny světelnému režimu. Listy, které jsou diferencované při vysokém ozáření obsahují více chloroplastů v buňkách mezofylu, ale thylakoidy obsažené v chloroplastech jsou méně hustě složeny než u stinných listů. Poměr chlorofylu *a* ku *b* je u slunných listů výrazně posunut ve prospěch chlorofylu *a* a podíl jednotek PSI je vysoký.

Po absorpci světelného kvanta uvolňuje fotosystém I elektrony, které jsou využívány pro redukci NADP⁺. Elektrony, které jsou potřebné pro zpětnou redukci chlorofylu se získávají fotolýzou vody či jiného vhodného dárce elektronů, jako například H₂S u fotoautotrofních bakterií. Při fotolýze vody je uvolňován kyslík, který vstupuje do procesu fotosyntetické výměny plynů. PSII přečerpává hydroliticky získané elektrony na vyšší energetickou hladinu a dodává je PSI. Při tomto necyklickém transportu elektronů se tvoří ATP.

3.3 Fluorescence chlorofylů

3.3.1 Pojem fluorescence

Emisi záření, ke kterému dojde při přechodu excitované molekuly do základního stavu se označuje jako luminiscence. Excitace může být vyvolána absorpcí záření, která vede právě k fluorescenci. Rostliny jsou během svého života vystaveny velkému množství biotických či abiotických stresů, které většinou modifikují její fluorescenční vlastnosti. Metodou měření fluorescence chlorofylu je možné zjistit informace o poklesu aktivity fotosyntetického aparátu listu za působení stresových podmínek, a proto bývá čím dál častěji využíváno právě k detekci stresu (Lichtenthaler, 1996). Dlouhodobé působení stresu se na rostlině může projevit poklesem obsahu chlorofylu v listech. Působení mírných stresů se může rostlina přizpůsobit a na fluorescenci chlorofylu se tudíž nemusí projevit, to je třeba

brát při odhalování stresových faktorů brát v potaz (Papageorgiou a Govindjee, 2004). Při optimálních podmínkách je výrazně větší část energie využita pro fotosyntézu než-li ve stresových podmínkách (Krause and Weis, 1991).

Ve fotosynteticky aktivních buněčných strukturách, v chloroplastech, jsou molekuly chlorofylu spolu s karotenoidy vázány do proteinových komplexů, které jsou označovány jako fotosystém (PSI a PSII), které jsou součástí thylakoidní membrány. V tomto systému je fotosynteticky aktivní záření přeměňováno primárně na biochemicky využitelnou energii. Tato energie je potřebná k syntéze jednoduchých cukrů. Menší část absorbovaného záření se přeměňuje v teplo, které je poté vydáno do okolí. Malá část absorbované energie (2-3 %) je za normálních okolností znovu vydávána do okolního prostředí jako fluorescenční záření. Při stresových podmínkách je využívání fotochemické energie buď zpomaleno, nebo zastaveno. Následně dochází k vyvolání řady ochranných mechanismů, které pak vedou ke zpětnému uvolňování energie ve formě tepla a fluorescence. Poté může nastat situace, kdy dochází ke zvyšování podílu ztrát ve formě fluorescence chlorofylu. (Klem, 2006)

Fluorescence chlorofylu je proto tedy nedestruktivní a sensitivní metoda, která nám poskytuje důležité informace o fotosyntetických procesech v rostlinách. Její hodnoty jsou odlišné v buňkách poraněných, neporušených, mladých, starých atd. (Mouget, Tremblin, 2002). Výhodou je, že je také snadno měřitelná a představuje velký potenciál pro diagnostiku biotických a abiotických stresů nebo také pro využití jako nástroje ve šlechtitelském procesu (Klem, 2006). Metoda zaměřená na měření fluorescence chlorofylů patří mezi moderní biofyzikální techniky pro získávání kvalitativních a kvantitativních informací o účinnosti fotochemických i nefotochemických procesů uvnitř chloroplastu. (Gogoláková and Štrba, 2011a). Je uplatňována hlavně v rostlinné morfologii a fyziologii, ale lze tuto metodu využít i v rostlinolékařství například k detekci zaplevelení širokořádkových plodin či v meziřádcích hustě setých plodin patogenem, ale také k odhalení výživového nedostatku. Velké pozitivum je v tom, že díky této metodě lze odhalit poškození na rostlinách ještě než se objeví viditelné projevy (Gogoláková and Štrba, 2011a).

Za pomoci této metody je možné sledovat změny fotosyntézy od mikroskopické úrovně chloroplastů v jednobuněčných řasách až po celá rostlinná společenstva. Z toho vyplývá, že metodu měření fluorescence lze aplikovat na všechny fotosynteticky aktivní organismy, tudíž zelené rostliny, řasy a sinice. Hlavním pigmentem, který v rostlinách fluoreskuje je chlorofyl (Prášil, 2003).

Na základě fluorescence chlorofylu může být stanovena intenzita fotosyntézy, která je řazena mezi jednu ze základních charakteristik zdravotního stavu rostliny. Stanovuje se

pomocí fluorescenčního poměru variabilního k maximální fluorescenci (F_v/F_m) (Sochor a kol., 2011). Tento poměr označujeme jako maximální kvantový výtěžek fluorescence (Gálusová et al., 2013). Fotosyntéza využívá pouze část energie, která je zachycena molekulami chlorofylů v listech a zbylá část pohlcené energie je buď vyzářena do okolí v podobě tepla, nebo ji opět vyzáří zpět ve formě světla. Tyto tři procesy neexistují odděleně, ale spíše si navzájem konkurují (Hnilička a Středa, 2016).

To znamená, že nám výtěžek emisí fluorescence chlorofylů může nabídnout důležité informace o kvantové účinnosti fotochemie a rozptylu tepla, což je důležité hlavně pro rostlinnou fotosyntézu a konečnou produktivitu, jelikož fotochemie slouží k zajištění energie a snížení výkonu pro asimilaci CO_2 (Murchie and Lawson, 2013). Fluorescence, je tím menší, čím více energie je využito pro separaci elektrického náboje v reakčních centrech obou fotosystémů (Procházka). V případě, kdy je list schopný využít energii pro fotosyntézu, může na ní být využito až 80 % energie, která je zachycená fotosystémem II, pouze 1 % je vyzářeno jako fluorescence chlorofylu a zbytek je přeměněn na teplo. V případě druhém, kde není momentálně další využití přijaté energie ve fotosyntéze, se zvýší množství energie vyzářené jako fluorescence až na 5 % či přeměněné na teplo až na 95 %. Platí tedy, že mezi účinností fluorescence a fotosyntézy existuje nepřímá úměra (Prášil, 2003).

Lze detekovat fluorescenci dvojího typu v pletivech zelených rostlin-modro-zelenou a červenou. Modro-zelená fluorescence má maxima v oblasti 440 – 450 nm (modrá fluorescence) a 520 – 530 nm (zelená fluorescence). Za modro-zelenou fluorescenci mohou hlavně deriváty kyseliny skořicové a ferulové, různé fenolické látky a další sekundární metabolity, které jsou ve vakuolách a buněčných stěnách rostlin. Intenzita modro-zelené fluorescence listů není ovlivněna výkonem fotosyntézy a liší se mezi různými druhy rostlin, ale i mezi jednotlivými rostlinami. Výrazný rozdíl byl kupříkladu pozorován mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami. Jednoděložné rostliny mají vyšší míru modro-zelené fluorescence, a to právě kvůli vyššímu zastoupení ferulových kyselin (Gogoláková and Štrba, 2011a).

Fluorescence chlorofylů je charakterizována dvěma maximy v oblasti červeného záření. První maximum je ve vlnových délkách 670–690 nm (krátkovlnné červené záření) a druhé maximum ve vlnových délkách 730–740 nm (dlouhovlnné červené záření). Fluorescence chlorofylů je emitována chlorofylem a, který pohlcuje záření v modré a červené oblasti slunečního spektra a nachází se v chloroplastech mezofylových buněk (Gogoláková and Štrba, 2011a). Při pokojové teplotě je fluorescence chlorofylů emitována hlavně z fotosystému II. Maximum vyzářované energie je při vlnových délkách 685 a 735 nm. To ale

platí jen pokud je fluorescence vybuzena modrým světlem, kdy obě uvedená maxima mají srovnatelnou intenzitu. Při vybuzení fluorescence červeným světlem je její maximum při kratší vlnové délce (685 nm) silně potlačeno. Fotosystém I. vykazuje významnou fluorescenci pouze při nízkých teplotách (Procházka).

3.3.2 Historie výzkumu fluorescence chlorofylů

Fluorescence chlorofylů byla poprvé popsána německým rostlinným fyziologem H. Kautskym ve 30. letech 20. století. Změny ve výtěžku nebo produkci fluorescence chlorofylu byly poprvé pozorovány kolem roku 1960 díky pracem Kautského a jeho spolupracovníkům (Kautsky a Hirsch, 1934). Kautsky nejprve ponechal list ve tmě a poté ho vystavil silnému světlu. Když se list přenesl na světlo tak fluorescence zprvu velice rychle vzrostla a poté opět poklesla (Prášil, 2003). Toto rychlé zvýšení výnosu chlorofylové fluorescence bylo později vysvětleno jako důsledek elektronového akceptoru při cestě fotosyntézou, odcházející z PS II, zejména pak plastochinony, QA. Jakmile fotosystém II pohltí světlo a QA přijme elektron, není potom schopen přijmout další, dokud neprojde první až k dalšímu přenašeči (QB). Během této doby je reakční centrum neaktivní, což vede k celkovému snížení ve výkonnosti fotochemie a odpovídajícímu zvýšení ve výtěžnosti fluorescence (Maxwell, Johnson, 2000). Asi po jedné sekundě, kdy byl list osvětlen, následoval mnohonásobně pomalejší pokles fluorescenčního výtěžku, který pak může trvat i několik minut (Prášil, 2003). Tento jev nazýváme fluorescenční zhášení a probíhá na dvou úrovních. Jako první dojde ke zvýšení rychlosti elektronů, které jsou přenášeny z PS II. To je dosaženo díky světlo-indukované aktivaci enzymů spojených s metabolismem uhlíku a otevření stomat. Toto zhášení je označováno jako fotochemické zhášení. Fotochemické zhášení je tudíž přímo úměrné účinnosti fotosyntézy a zároveň nepřímo úměrné změně fluorescenčního výtěžku (Prášil, 2003). Pozdější proces, tzv. nefotochemické zhášení, je charakterizováno zvýšenou výkonností, s níž je energie převáděna na teplo (Johnson 1990). Fluorescenční výtěžek se mění nezávisle na momentální účinnosti fotosyntézy, jelikož dochází ke změně vyzáření tepelné energie zpátky do okolí. Tím pádem můžeme říci, že z měření fluorescence můžeme získat informace jak o vlastním fotosyntetickém procesu, tak i o celé řadě ochranných a regulačních procesů, které fotosyntézu přímo ovlivňují (Prášil, 2003). Na konci 20. století se měření indukované fluorescence chlorofylu stalo velice úspěšnou technikou určenou pro získávání kvantitativních i kvalitativních informací o účinnosti fotochemických i nefotochemických procesů uvnitř chloroplastů. K tomu přispělo především

rychlé rozšíření komerčních fluorimetrů, což jsou přístroje, které pracují na principu pulzní amplitudové modulace (PAM) fluorescenčního signálu. PAM-fluorimetrie je metoda, která je úspěšně využívána ve fotosyntetickém výzkumu (Schreiber, 1986).

3.3.3 Metody měření fluorescence

Asi nejčastějším způsobem využití metody fluorescence chlorofylů je sledování reakce na ozáření rostlin adaptovaných na tmu. Měření probíhá na malých vzdálenostech (jen asi 1-100 mm), a jak bylo zmiňováno výše, jsou k tomu používány fluorimetry, které pracují na principu pulzní amplitudové modulace (PAM). V listech, které jsou adaptované na tmu jsou při ozáření všechna reakční centra PSII otevřená, tudíž lze zaznamenat minimální výtěžek fluorescence chlorofylů (F_0), přičemž je tato hodnota konstantní a neměnná na fotosyntetické aktivitě. Po ozáření vzorku krátkým saturačním zábleskem následně dochází k redukci většiny elektronových akceptorů v PSII, tudíž jsou reakční centra v tomto fotosystému uzavřená, a to se projeví prudkým vzrůstem fluorescence chlorofylů. Takový vzrůst trvá asi 100-200 milisekund a označujeme ho jako maximální fluorescence (F_m). Rozdíl mezi maximální a minimální fluorescencí se označuje jako maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylů v temnotně adaptovaném stavu (F_v). Dále po zapnutí aktinického záření dochází opět k redukci reakčních center a fluorescence prudce vzroste během jedné sekundy a následuje aktivace fotochemických procesů, které trvají 3-5 sekund, kdy energie excitovaných elektronů je ukládána do vysoce energetických vazeb. V rozmezí 15-20 minut klesne fluorescence na úroveň, která se už nadále nemění a označujeme ji jako fluorescenci v ustáleném stavu (F_s) (Gogoláková and Štrba, 2011a).

Díky fluorimetrům pracujících na principu pulzní amplitudové modulace můžeme přesně měřit fluorescenci chlorofylu, a to i v polních podmínkách. Existují dva typy fluorimetrů, a to tzv. nezobrazovací a zobrazovací fluorimetry. Nezobrazovací fluorimetry integrují fluorescenční signál z celého měřeného vzorku a výstupem měření je jedna fluorescenční křivka pro daný vzorek. Těmito fluorimetry je možno měřit velmi rychlé procesy na fotosyntetické membráně. Naopak zobrazovacími fluorimetry není možné měřit rychlé procesy na fotosyntetické membráně, ale mají jednu velkou výhodu a tou je možnost měřit změny fluorescenční emise chlorofylu v ploše a tím odhalit prostorovou heterogenitu zkoumaného vzorku, a to na mikroskopické i makroskopické úrovni.

Použitím zobrazovací fluometrie jde například zachytit působení stresového faktoru dříve, než jsou vidět pouhým okem.

Fluorescence chlorofylu je snadno měřitelná, a tudíž představuje potenciál pro diagnostiku biotických a abiotických stresů a pro využití jako screeningové nástroje ve šlechtitelském procesu. Příkladem biotického stresu může být vliv vodního stresu na změny fluorescenční indukce v důsledku přirozeného zasychání listů. Jako příklad abiotického stresu si můžeme uvést působení herbicidu, který blokuje fotosyntetický transport elektronů v QB kapse PSII. Proto je v oblasti, která je zasažená herbicidem fluorescence vysoká, zatímco nezasazená část nevykazuje žádné změny ve fluorescenční indukci a tím ani poškození fotosyntetického aparátu.

Moderní fluorimetry zachycují více informací než jen absolutní hodnotu fluorescence. Umožňují nám také získat informace o aktivitě fotosyntetického aparátu a o relativní aktivitě ochranných mechanismů. Ve výzkumu fotosyntézy je fluorescence chlorofylu velmi cenný nástroj pro studium biofyzikální stránky fotosyntetických procesů.

Fluorescence nám také může poskytnout informace o fyziologickém stavu rostliny prostřednictvím procesů, které navazují na světelnou fázi fotosyntézy. Jedná se hlavně o aktivitu enzymů, které se podílejí na fixaci uhlíku a otevírání průduchů.

Využití fluorescence se používá také pro porovnání odrůdových rozdílů a selekci genotypů, nebo i při detekci plevelných druhů v porostu plodiny (Klem, 2006).

Výhody měření tedy plynou spíše z toho, co chceme danými měřeními objasnit, než z jednoduchosti a rychlosti měření. Pokud tedy máme jasnou představu o tom, co má být ověřeno, jsou metody sledování fluorescence velice přesné, a tudíž i vhodné (Hnilička a Středa, 2016).

Za nevýhodu této metody lze vnímat, že relativní velikost fluorescence chlorofylů závisí také na tloušťce měřeného vzorku a koncentraci chlorofylu, což se vysvětluje jako důsledek existence gradientu excitačního světla vzorku. Na to je nutné nezapomínat, jelikož gradient ovlivňuje i velikost parametrů počítaných z těchto signálů (Hnilička a Středa, 2016)

4 Metodika

4.1 Popis odrůd

Capsicum annum 'Jalapeño'

Tato odrůda patří k jedněm z nejoblíbenějších a také nejznámějším odrůdám papriček na celém světě. Pochází z města Xalapav Mexicu a vyznačuje se bohatou sklizní a svou nenáročností na pěstování. Dorůstá se výšky až 80 cm. Plody jsou zelené, 5 – 10 cm dlouhé a je možné je sklízet až do konce léta. Patří mezi papričky mírně až středně pálivé (cca 2 500-10 000 SHU). Tato odrůda papriček se většinou nakládá nebo udí, jelikož má silnou slupku, což je důvod toho, že se obtížněji suší. Šťáva z těchto papriček lze využívat jako lék na kardiovaskulární potíže (Maguireová, 2015).

Capsicum chinense 'Habanero Red'

Tato odrůda pochází z Mexica, z poloostrova Yucatán. Tato odrůda roste velice pomalu, tudíž je potřeba cca 200 dní pro vytvoření zralých plodů. Plody jsou červené, robustní, ve tvaru lampionu a jsou velké asi 8 cm. Výška rostliny je cca 70 cm a může být i stejně široká. Tato odrůda je vhodná do salátů v syrovém stavu nebo se používá do salsy. Hodnota pálivosti je asi 80 000-300 000 SHU. Tato odrůda je vhodná k sušení a zamrazování. Není vhodná k vaření, jelikož tím ztrácí svou chuť (Maguireová, 2015).

Capsicum frutescens 'Twilight'

Tato odrůda opět pochází z Mexica. Je to asi 50 cm vysoký kompaktní keř, který kvete bíle. Tyto papričky jsou nenáročné na pěstování ovšem nejlépe se jim daří na slunném místě, což zajistí vyšší výnos. Plod je asi 6 cm dlouhý. Při dozrávání jsou pozorovatelná působivá zbarvení od zelené přes fialovou, žlutou, oranžovou a dozrává do červené. Má kuželovité plody s vitální, hladkou a lesklou stěnou. Pálivost této odrůdy je asi 50 000 SHU.

4.2 Založení pokusu

Ve výukových sklenicích FAPPZ v areálu ČZU byly na jaře 2016 založeny pokusy zaměřené na sledování fluorescence chlorofylu. Byly vysety semena paprik tří odrůd. Těmito odrůdami byly *Capsicum annum* 'Jalapeño', *Capsicum chinense* 'Habanero Red' a *Capsicum frutescens* 'Twilight'. Každá z těchto odrůd byla vyseta po dvou kusech. Semena se vysévala

do nádob o rozměrech 10 x 10 cm, do zahradnického substrátu určeného pro výsev a množení. Rostliny byly pravidelně zalévány do doby, než byly dostatečně vyvinuté pro měření.



Obr. č. 4.: Vypěstované druhy paprik (zleva *Capsicum chinense*'Habanero Red', *Capsicum frutescens*'Twilight', *Capsicum annum*'Jalapeño').

4.3 Metodika měření

Pomocí fluorescenčního analyzátoru ADC :OSI 1FL byla měřena fluorescence chlorofylů u již zmíněných odrůd paprik. Na jeden konkrétní list každé rostliny u každé odrůdy byla připnuta klipsna, která zabránila přístupu světla asi na 10 minut. Po uplynutí této doby byl na to místo na listu, kde byl zamezen přístup světla, použit fluorimetr pro měření F_0 (základní fluorescence), F_m (maximální fluorescence) a F_v (variabilní fluorescence).

Měřené hodnoty jsou:

F0	minimální výtěžek fluorescence chlorofylu změřený na zatemněných vzorcích
Fm	maximální výtěžek fluorescence chlorofylu změřený na zatemněných vzorcích
Fv	maximální variabilní výtěžek fluorescence chlorofylu změřený na zatemněném vzorku stanovený z rozdílu $F_m - F_0$
Fv/Fm	poměr variabilní/maximální fluorescence chlorofylu
Fs	ustálená hodnota výtěžku fluorescence chlorofylu měřená na světlo aklimovaném vzorku
Fms	maximální fluorescence chlorofylu vyvolaná saturačním pulsem při zapnutém aktinickém záření
Fvs	variabilní fluorescence na světlo aklimovaného vzorku stanovená z rozdílu $F_{ms} - F_s$
Yield	maximální možný výtěžek fluorescence



Obr. č. 5.- Měření fluorescence chlorofylu



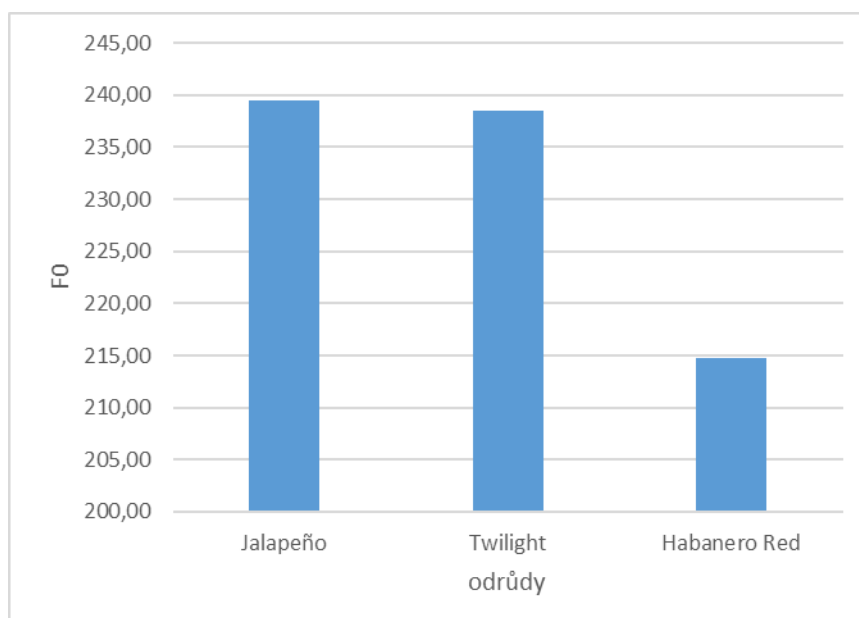
Obr. č. 6. – Papriky a přenosný fluorimetr ADC :OSI 1FL

5 Výsledky

Následující obrázky znázorňují rozdíly mezi paprikami *Capsicum annum* 'Jalapeño', *Capsicum chinense* 'Habanero Red' a *Capsicum frutescens* 'Twilight'. V temnotně adaptovaném stavu se hodnotí rozdíly v základní fluorescenci, maximální fluorescenci, variabilní fluorescenci a maximálním kvantovém výtěžku fluorescence. U světelné fáze se pak řeší rozdíly v ustálené úrovni výtěžku fluorescence, maximální fluorescenci chlorofylu vyvolanou saturačním pulsem při zapnutém aktinickém záření, variabilní fluorescenci na světlo aklimovaného vzorku a maximálním možným výtěžku fluorescence.

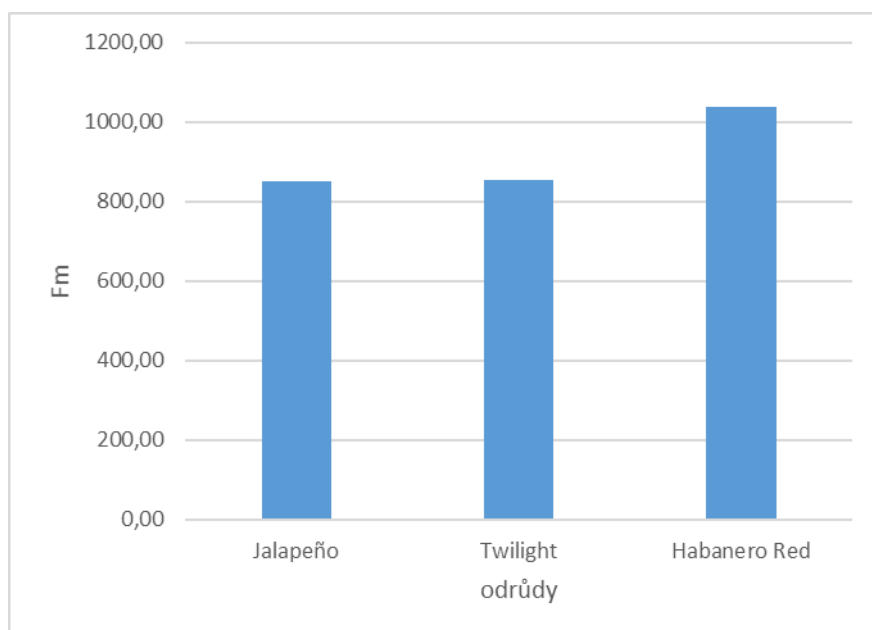
Fluorescence v temnotně adaptovaném stavu:

Graf č.7. zobrazuje rozdíl v základní fluorescenci u paprik *Capsicum annum* 'Jalapeño', *Capsicum chinense* 'Habanero Red' a *Capsicum frutescens* 'Twilight'. Naměřené hodnoty se pohybovaly od 214,8 do 239,53. Nejvyšší naměřená hodnota byla 239,53 a to u *Capsicum annum* 'Jalapeño'. Nejnižší hodnota pak byla naměřena u *Capsicum chinense* 'Habanero Red' s hodnotou 214,8.



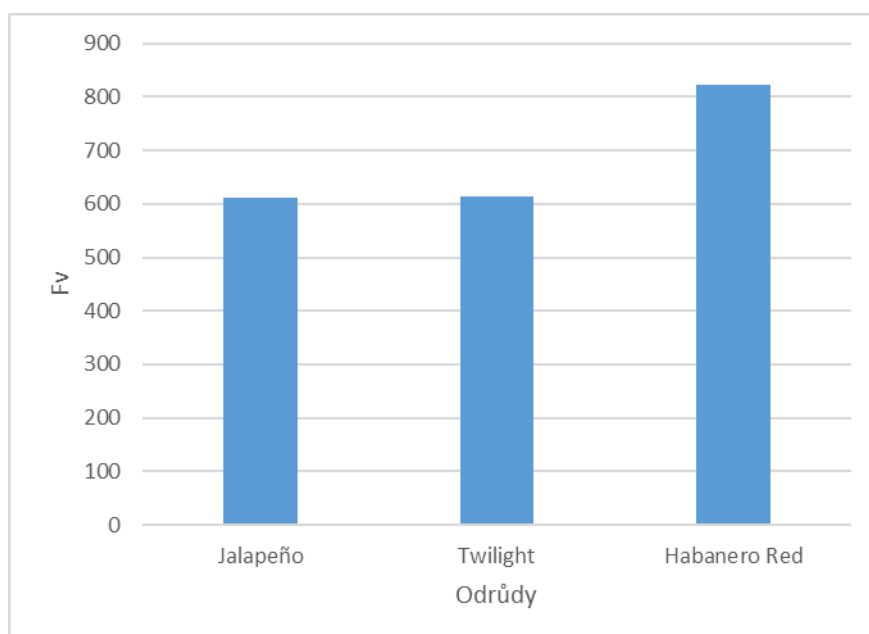
Obr. č. 7. základní fluorescence u sledovaných druhů paprik

Graf č.8. ukazuje hodnotu maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu. Hodnoty se pohybovaly od 852,27 do 1038,4. Nejvyšší hodnota byla naměřena u *Capsicum chinense* 'Habanero Red' a to 1038,4. Nejnižší hodnota je 852,27 u *Capsicum annum* 'Jalapeño'.



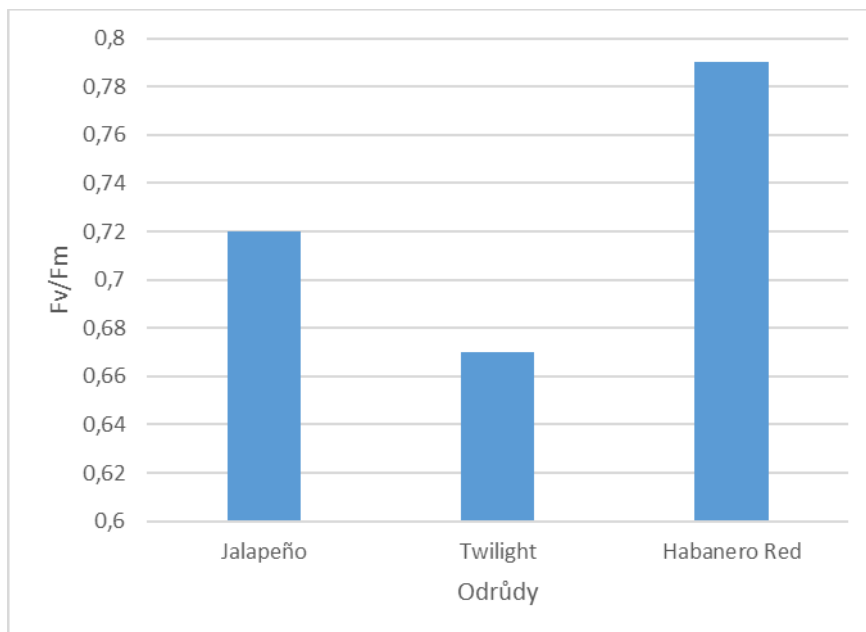
Obr. č. 8. Maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu u sledovaných druhů paprik

Graf č.9. znázorňuje variabilní fluorescenci, jejíž hodnoty se pohybují od 612,73 do 823,26. Nejnižší hodnota byla naměřena u *Capsicum annum* 'Jalapeño' (612,73) a nejvyšší hodnota 823,26 byla naměřena u *Capsicum chinense* 'Habanero Red'.



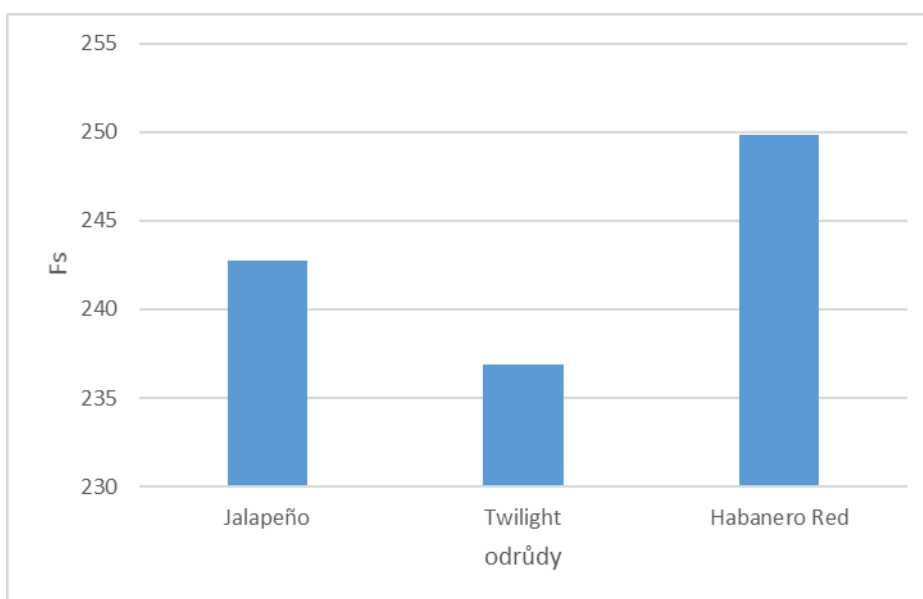
Obr.č. 9. Variabilní fluorescence u sledovaných druhů paprik

Graf č.10. znázorňuje maximální kvantový výtěžek těchto tří odrůd. Hodnoty se pohybovaly od 0,67 do 0,79. Nejvyšší hodnotu 0,79 má *Capsicum chinense* 'Habanero Red'. Naopak nejnižší hodnotu vykazuje *Capsicum frutescens* 'Twilight'.



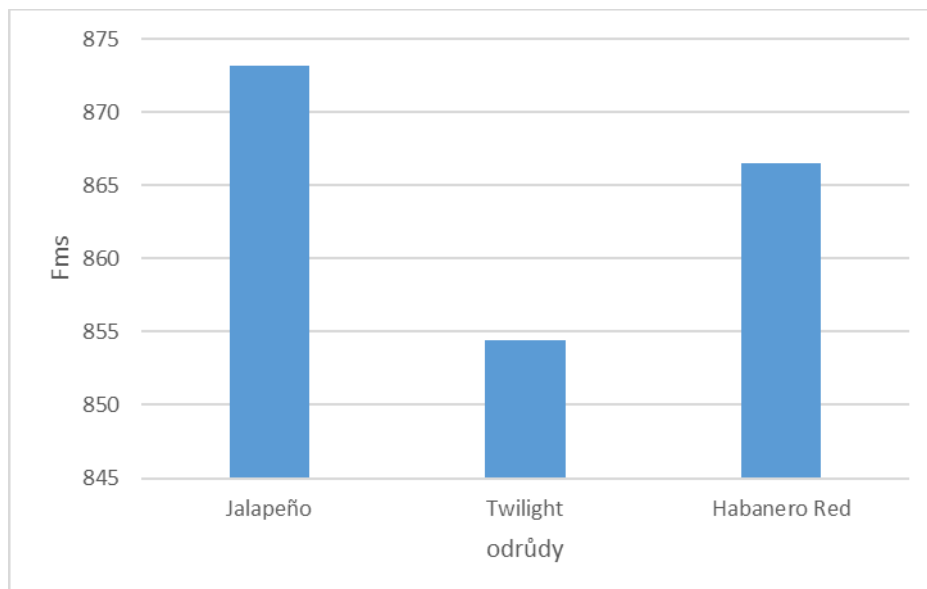
Obr.č. 10. Poměr Fv/Fm- maximální kvantový výtěžek sledovaných druhů paprik
Fluorescence ve světelném stavu:

Graf č.11. znázorňuje, při jakých hodnotách došlo k ustálení úrovně výtěžku fluorescence. Nejnižší naměřená hodnota se objevuje u *Capsicum frutescens* 'Twilight' a to 236,88. Nejvyšší naměřená hodnota je 249,86 u *Capsicum chinense* 'Habanero Red'.



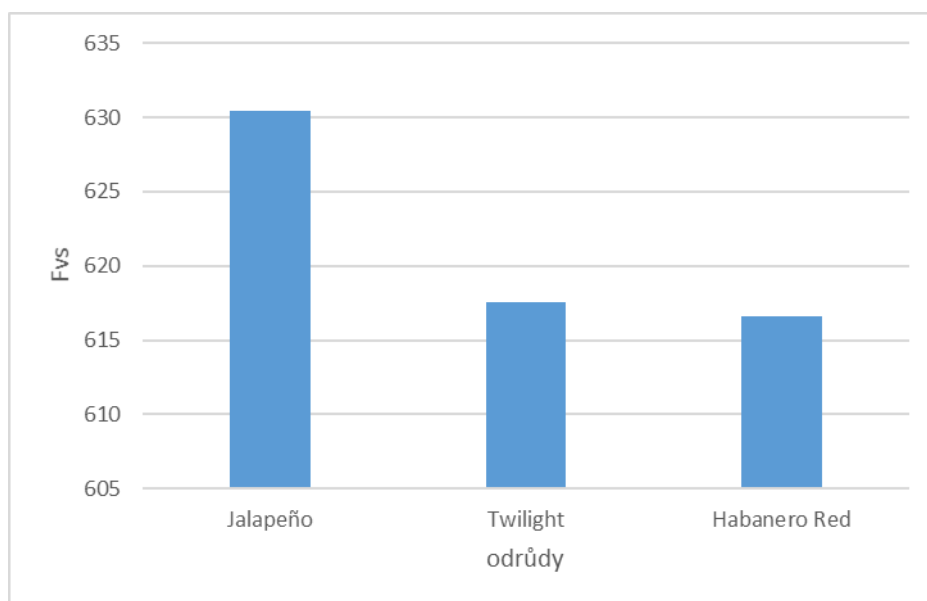
Obr. č. 11. Ustálené hodnoty úrovně výtěžku fluorescence u sledovaných odrůd

Graf č.12. znázorňuje maximální fluorescence chlorofylu vyvolanou saturačním pulsem při zapnutém aktinickém záření. Nejnižší naměřenou hodnotou je 854,44 u *Capsicum frutescens* 'Twilight' a nejvyšší pak u *Capsicum annum* 'Jalapeño' s hodnotou 873,14.



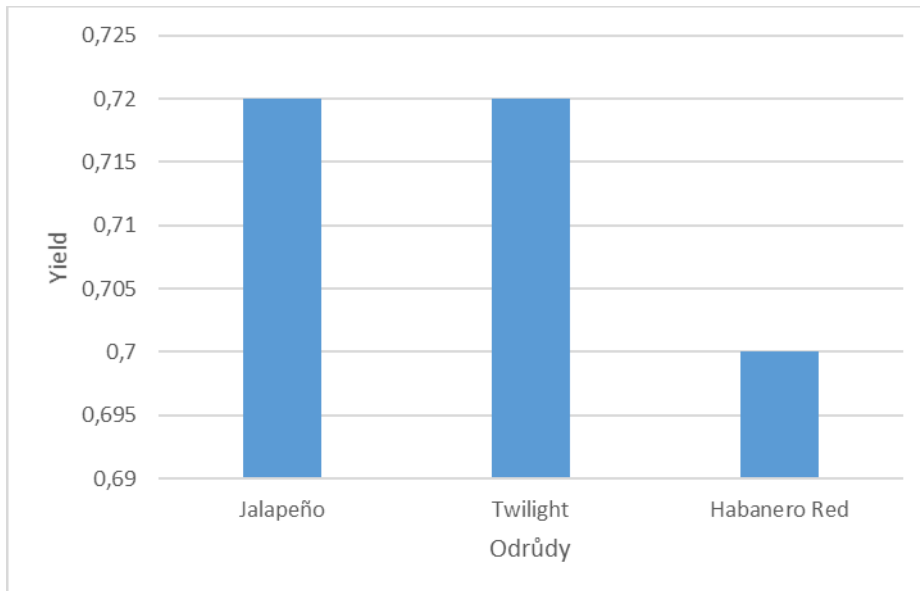
Obr. č. 12. Maximální fluorescence chlorofylu vyvolaná saturačním pulsem při zapnutém aktinickém záření u sledovaných druhů paprik

Graf č. 13. ukazuje hodnotu variabilní fluorescence na světlo aklimovaného vzorku. Hodnoty se pohybovaly od 616,64 do 630,43. Nejvyšší hodnota, tedy 630,43, byla naměřena u *Capsicum annum* 'Jalapeño'. Naopak nejnižší hodnotu (616,64) vykazuje *Capsicum chinense* 'Habanero Red'.



Obr. č. 13. Variabilní fluorescence na světlo aklimovaném vzorku sledovaných odrůd

Graf č. 14. ukazuje maximální možný výtěžek fluorescence. Hodnoty se pohybují od 0,7 do 0,72. U *Capsicum annum* 'Jalapeño' a *Capsicum frutescens* 'Twilight' byl naměřen maximální možný výtěžek fluorescence 0,72. U *Capsicum chinense* 'Habanero Red' byla pak naměřena hodnota 0,7.



Obr. č. 14. Maximální možný výtěžek fluorescence chlorofylů u vybraných druhů

6 Diskuze

6.1 Fluorescence chlorofylů

Chlorofylová fluorescenční analýza umožňuje neinvazivní, téměř okamžité měření klíčových aspektů fotosyntézy, jako je zachycení světla a transport elektronů (Campbell et al. 1998). Často se používá k určení kvantové výtěžnosti PSII a k určení rozsahu fotoinhibice (Wang et al., 2007). Poměr F_v/F_m je spolehlivým indikátorem fotoinhibice a strukturální poškození reakčního centra PSII (Starman a Lombardini 2006, Wang et al., 2007). Snížení hodnoty F_v také ukázalo poškození aktivity PSII (Bertamini et al., 2006).

Všechny parametry mohou být použity k charakterizaci procesů toku energie přes PS II a jsou jasné biofyzikální a fyziologické významy. Parametry se typicky používají při hodnocení PS II, reakce na stres nebo pro detailní studium vzájemných vztahů mezi jednotlivými fotochemickými procesy v PS II a elektronovými nosiči v thylakoidní membráně chloroplastů.

Parametr F_v/F_m se u tří odrůd paprik pohybovaly od 0,67 do 0,79. Mezi odrůdami *Capsicum frutescens* 'Twilight' a *Capsicum chinense* 'Habanero Red' je tedy rozdíl v maximálním kvantovém výtěžku asi 16 %. Maxwell a Johnson (2000) uvedli, že hodnoty fluorescence chlorofylu mezi 0,79 – 0,84 jsou u většiny rostlin optimální. Můžeme tedy říct, že *Capsicum frutescens* 'Twilight' s hodnotou 0,67 do optimální oblasti nepatří a ze tří zkoumaných odrůd má nejnižší maximální kvantový výtěžek. Pokud je fotosyntetický aparát rostlin nebo celá rostlina vystavena působení nějakého stresu, dochází k negativnímu ovlivnění funkce PS II, a to se projeví ve snížení hodnoty F_v/F_m . Může to být zapříčiněno například, nízkými teplotami, které mohly narušit chlorofyly v chloroplastech (Kratsch a Wise, 2000). Pokles parametru F_v/F_m indikuje narušení funkčnosti fotosyntetického aparátu, ale bez měření dalších parametrů z něj nelze odvodit, zda příčinou poklesu je fotoinhibice nebo jiný mechanismus (Lichtenthaler et al., 2005). Poměr F_v/F_m poskytuje přesný odhad fotosyntetické aktivity (Papageorgiou and Govindjee, 2004). Je pozorovatelný velký kvantitativní vztah s asimilací oxidu uhličitého, a tudíž i s růstem rostliny (Edwards a Baker, 1993). Z toho vyplývá, že je to velice důležitý parametr fyziologického stavu fotosyntetického aparátu.

Parametr F_s se ukázal jako citlivý indikátor při sledování vodního stresu (Flexas et al. 2002) či stresu působením tepla a sucha (Dobrowski et al. 2005). Studie ukázaly změny

hodnot F_s v průběhu celého roku u stálezelených dřevin, došli k závěrům, že hodnota parametru F_s se v průběhu vegetační sezóny příliš nemění. K poklesu hodnot F_s dochází až při poklesu teplot pod 0 °C (Soukupová et al.). U paprik se hodnoty F_s pohybovaly v rozmezí 236,88 až 249,86. Z toho vyplývá, že u *Capsicum frutescens* 'Twilight' došlo k ustálení úrovně výtěžku fluorescence už při hodnotě 236,88, zatímco u *Capsicum chinense* 'Habanero Red' až při hodnotě 249,86.

Maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu byla u *Capsicum annum* 'Jalapeño' 852,27 a maximální fluorescence chlorofylu vyvolaná saturačním pulsem při zapnutém aktinickém záření u té samé odrůdy byla v hodnotě 873,14. U *Capsicum frutescens* 'Twilight' byla maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu 853,0 a maximální fluorescence chlorofylu vyvolaná saturačním pulsem při zapnutém aktinickém záření 854,44, což nesouhlasí s výsledky Demmig-Adams and Adams 1996; Genty et al. 1990; Gilmore and Yamamoto 1993; Horton and Ruban, 1993; Rees et al, 1990, jelikož zjistili, že u rostlin na světle jsou hodnoty fluorescence vyšší než u rostlin v temnotně adaptovaném stavu. U *Capsicum chinense* 'Habanero Red' byl naopak rozdíl mezi F_m a F_{ms} daleko vyšší, F_m u této odrůdy vykazovalo hodnotu 1038,4 a F_{ms} 866,5.

V literatuře je zmiňován vliv teploty na fluorescenci chlorofylu, měření při teplotách nižších, než je 20 °C mohou vést k umělému nadhodnocení variabilní fluorescence – F_v (Huner et al. 1992). Zvláště stresové teploty vedou k podstatným změnám fluorescence.

Podle Lichtenthaler et al., 1988 je rychlý růst a pomalý pokles světlem indukované fluorescence chlorofylu pozorovatelný jen za optimálních podmínek, jelikož ve stresových podmínkách má rostlina fotosyntetickou aktivitu narušenu, intenzita fluorescence zůstane vysoká a pokles hodnot z F_m na F_s je pomalejší nebo chybí úplně. Z toho vyplývá, že hodnocené odrůdy paprik nebyly ve stresových podmínkách, neboť například u *Capsicum chinense* 'Habanero Red' byla hodnota maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu (F_m) 1038,4 a při poklesu na F_s měla tato odrůda hodnotu 249,86. *Capsicum annum* 'Jalapeño' vykazovala hodnotu maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu 852,27 a k ustálení úrovně výtěžku fluorescence došlo při hodnotě 242,71.

7 Závěr

U pokusu, který byl proveden na určitých odrůdách paprik a jejich kultivarech, byly pomocí fluorimetru změřeny parametry fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaného listu a světelně adaptovaného listu.

- U prvního druhu *Capsicum chinense* 'Habanero Red' byly naměřeny nejvyšší hodnoty u parametrů fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu. Těmito parametry byly F_m , F_v , F_v/F_m . Poslední parametr byl F_0 , kde největší hodnoty dosáhl druh papriky *Capsicum annuum* 'Jalapeño'
- U parametrů ve světelně adaptovaném stavu měl většinou nejvyšší hodnoty druh *Capsicum annuum* 'Jalapeño'. Byly to parametry F_{vs} , F_{ms} a Yield, přičemž u parametru Yield dosáhl druh *Capsicum frutescens* 'Twilight' stejných hodnot jako *Capsicum annuum* 'Jalapeño'
- Z naměřených výsledků vyplývá, že u *Capsicum annuum* 'Jalapeño' a *Capsicum chinense* 'Habanero Red' byly rozdíly v hodnotách největší. Oproti tomu *Capsicum frutescens* 'Twilight' téměř vždy vykazovala prostřední hodnotu mezi zbylými dvěma odrůdami.
- Ve výsledcích se ukázalo, že i při stejných podmínkách ve kterých rostliny byly, každý druh rodu *Capsicum* vykazoval jiné hodnoty F_0 , F_m , F_v i F_v/F_m v temnotně adaptovaných vzorcích a stejně tak byly rozdíly i v parametrech F_s , F_{ms} , F_{vs} a Yield ve světelném stavu.

8 Seznam literatury

Ashraf, M., Harris, P. J. C. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*. 51 (2). 163-190.

Demmig B, Björkman O (1987) Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher-plants. *Planta* 171: 171-184

Dobrowski S.Z., Pushnik J.C., Zarco-Tejada P.J., Ustin S.L.: Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. *Remote Sensing of Environment* 97, pp. 403–414, 2005.

Edwards GE, Baker NR (1993) Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis. *Photosynthesis Research* 37: 89-102

Flexas J., Escalona J.M., Evain S., Gulías J., Moya I., Osmond Ch.B., Medrano H.: Steady-state chlorophyll fluorescence (Fs) measurements as a tool to follow variations of net CO₂ assimilation and stomatal conductance during water-stress in C₃ plants. *Physiologia Plantarum* 114, pp. 231–240, 2002.

Gálusová, T., Piršelová, B., Kuna, R., Boleček, P. 2013. Vplyv arzénu a kadmia na fluorescenciu chlorofylu v listoch *Glycine max* (L.) Merr. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin ..: (sborník příspěvků). 2013. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. s. 126-129. ISBN: 978-80-213-2357-5

Gogoláková, A., Štrba, P. 2011a. Identifikácia stresu rastlín napadnutých škodcami pomocou fluorescencie chlorofylu. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin ..: (sborník příspěvků). 2011. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. p. 68-71. ISBN: 978-807427-068-0.

González-Zamora, A., Sierra-Campos, E., Luna-Ortega, J. G., Pérez Moralez, R., Ortiz, J.C.R., García-Hernández, J.L. 2013. Characterization of Different Capsicum Varieties by Evaluation of Their Capsaicinoids Content by High Performance Liquid Chromatography, Determination of Pungency and Effect of High Temperature. *Molecules*. 18. 13471-13486.

Hnilička, F., Středa, T. (ed.). 2016. Rostliny v podmínkách stresu - abiotické stresory. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 233 s. ISBN: 978-80-213-2680-4.

Cheers, G. 2003. Botanika. Slovart. 1020 s. ISBN: 978-80-7209-936-8.

Kautsky, H., Hirsch, A. (1934): Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation I. Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen, In *Biochem. Z.* 274, , s. 423–434

Klem, K. 2006. Využití fluorescence chlorofylu v rostlinolékařství. *Rostlinolékař*. 2006 (17). 23-25.

Kóňa, Ján, Silvia Barátová a Elka Kóňová. Koreninové a aromatické rastliny. Vyd. 1. Nitra: Nitra, 2013. ISBN 978-80-552-1042-1

Larcher, W. 1988. Fyziologická ekologie rostlin. Academia. Praha. 361 s.

Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Knapp M.: How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer, *Photosynthetica* 43, pp. 379–393, 2005.

Maguirevá, K. [Z anglického org. přel. Klára Ježková], 2015. Někdo to rád pálivé. Slovar. Praha. 144 s. ISBN: 978-80-7529-101-1.

Maxwell K., Johnson G.N.: Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, pp. 659–668, 2000.

Mouget, J.L., Tremblin, G.: Chlorophyll fluorescence in vivo. *Aquatic Botany*, 2002, s. 219-231

Murchie, E. H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of experimental botany*. 64 (13). 3983-3998

Nátr, L. 2007. Fotosyntéza v chloroplastech listů révy vinné: nepostřehnutelný vznik hroznů. *Vinařský obzor*. 2007 (10). 478-481

Papageorgiou GC, Govindjee (2004) 'Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. *Advances in photosynthesis and respiration*. Vol. 19' (Springer: Dordrecht, Netherlands)

Peter, K (ed.). *Handbook of herbs and spices*. Oxford: Woodhead, 2001-. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition, 319 s. ISBN 08493-1217-5

Petříková, K. 2006. *Zelenina: pěstování, ekonomika, prodej*. Profi Press. Praha. Bod (Dokořán). 240 s. ISBN: 80-867-2620-7.

Petříková, K., Malý, I. 1998. *Základy pěstování plodové zeleniny*. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. Praha. 44 s. ISBN: 80-7105-165-9

Prášil, O. 2003. Fluorescence chlorofylu jako metoda studia fotosyntézy a diagnostiky porostu. *Živa*. 2003 (6). 249-252

Procházka, S. 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia. Praha. 484 s. ISBN: 80-200-0586-2

Sochor, J., Salaš, P., Pláteníková, M., Adam, V., Kizek, R. 2011. Stanovení obsahu chlorofylu a intenzity fluorescence chlorofylu rostlin v polních podmínkách. In: *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin ..: (sborník příspěvků)*. 2011. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. S. 269-272. ISBN: 978-80-213-2160-1.

Soukupová J., Csefalvay L., Urban O., Košvancová M., Marek M., Rascher U., Nedbal L.: Annual variation of the steady-state chlorophyll fluorescence emission of evergreen plants in temperate zone. *Functional Plant Biology* 35, pp. 1-14., 2008

Soukupová, J., Roháček, K. 2003. Fluorescence, fotosyntéza a stres: Jak to spolu souvisí?. *Ústav fyzikální biologie JU, AVČR*, 14 s.

Valíček, P. 2005. *Koření a jeho léčivé účinky*. Start. Benešov. 135 s. ISBN: 80-86231-34-8

Valšíková a kol., Magdaléna. Papriky, rajčiaky a baklažány. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1987, 155 s.

Schreiber, U.; Schliva, U.; Bilger, W1. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis research*, 1986, 10.1-2: 51-62.

Bertamini, M., et al. Low-night temperature increased the photoinhibition of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) leaves. *Environmental and experimental botany*, 2006, 57.1-2: 25-31.

Starman, T.; Lombardini, L.. Growth, gas exchange, and chlorophyll fluorescence of four ornamental herbaceous perennials during water deficit conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2006, 131.4: 469-475.

Kratsch, H. A.; Wise, Robert R. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell & Environment*, 2000, 23.4: 337-350.

Genty, B., et al. The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves. *Photosynthesis Research*, 1990, 25.3: 249-257.

Rees, D.; Noctor, G. D.; Horton, P. The effect of high-energy-state excitation quenching on maximum and dark level chlorophyll fluorescence yield. *Photosynthesis research*, 1990, 25.3: 199-211.

Noctor, G.; Ruban, A. V.; Hotron, P, Modulation of ΔpH -dependent nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1993, 1183.2: 339-344.

Gilmore, A. M.; Yamamoto, H. Y. Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynthesis Research*, 1993, 35.1: 67-78.

Internetové zdroje:

Roháček, K. Indukce fluorescence chlorofylu in vivo v průběhu primární fotosyntézy u vyšších rostlin [online]. Biologické centrum AV ČR, v.v.i. –Ústav molekulární biologie rostlin. 22. března 2011, Dostupné z <<http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescence-chlorofylu.pdf>>.