

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE  
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ  
KATEDRA EKOLOGIE

LIŠÍ SE ROSTLINNÉ DRUHY MOKŘADNÍHO  
SPOLEČENSTVA MÍROU TOLERANCE VŮČI  
VODNÍMU STRESU?

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Ing. Jan Douda, Ph.D.

Bakalant: Jaroslava Plíhalová

2014

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením Ing. Jana Doudy, Ph.D. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 14. 4. 2014

Jaroslava Plíhalová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych chtěla poděkovat mému vedoucímu, Ing. Janu Doudovi, Ph.D za ochotu a odborné připomínky při psaní této bakalářské práce. Další poděkování patří také doc. Mgr. Marku Vachovi a Bc. Josefu Hulíkovi za pomoc při laboratorním výzkumu.

Zároveň bych poděkovala své rodině a přátelům za podporu a zázemí, které mi poskytli při mém studiu.

## **ABSTRAKT**

Cílem této bakalářské práce je, zda se liší rostlinné druhy mokřadního společenstva mírou tolerance vůči vodnímu stresu. Práce je rozdělena na dvě části. První část je teoretická a popisuje vliv vysušení a vliv zamokření stanoviště a reakce rostlin na působení stresových faktorů.

Druhá část této práce je experiment uskutečněný v roce 2012, kde jsem stimulovala suchý a vlhký vodní režim v experimentálních nádobách na 240 vzorcích mokřadních rostlin. Následně jsem tyto vzorky v laboratoři ČZU podrobila výzkumu na měření obsahu chlorofylu pomocí metody DMSO (dimethyl sulfoxid) a sledovala, jak rostliny reagují na zamokření a jak na vysušení stanoviště.

Odpovědi analyzovaných parametrů se z velké části neliší mezi druhy a rozdíl je jen v hladině vody, což naznačuje, že mokřadní rostliny jsou plastické a mají schopnost přizpůsobit se vodnímu stresu. Krátkodobý stres zvládají a nestrádají, možné rozdíly by mohly nastat až při dlouhodobém stresu (cca 1 rok).

**Klíčová slova:** DMSO, chlorofyl, stres, vysušení, zamokření

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis is if different types of wetland plant communities are different in degree of tolerance to water stress. The work is divided into two parts. The first part is theoretical and describes the effect of drying and waterlogging affect habitats and plant response to the action of stress factors.

The second part of this work is the experiment carried out in 2012, where we stimulated the dry and moist water regime in the experimental containers to 240 samples of wetland plants. Then we have the following samples in the laboratory CZU – Czech University of Life Sciences Prague undergo research on the measurement of chlorophyll content using the DMSO (dimethyl sulfoxide), watching how plants respond to waterlogging and how to dry habitats.

Responses of analyzed parameters are largely different between species and the only difference is in water level, suggesting that wetland plants are plastic and have ability to adapt to water stress. Short-term they handle stress and aren't suffering, possible differences could occur only after prolonged stress (about 1 year).

## **OBSAH**

ÚVOD .....	9
1. CÍLE PRÁCE .....	10
2. STRES .....	10
2.1 Vliv vysušení stanoviště .....	11
2.2 Vliv zaplavení stanoviště .....	14
3. FOTOSYNTÉZA .....	18
3.1 Chloroplasty .....	19
3.2 Chlorofyl .....	20
3.3 Fluorescence .....	22
3.4 Fluorescence chlorofylu .....	22
3.5 Světlo .....	23
4. METODY MĚŘENÍ FLUORESCENCE CHLOROFYLU .....	25
4.1 Metoda DMSO .....	27
5. MATERIÁL A METODIKA .....	28
6. VÝSLEDKY .....	29
7. DISKUZE .....	34
8. ZÁVĚR .....	36
POUŽITÁ LITERATURA .....	37

## SEZNAM ZKRATEK

ABA – kyselina abscisová

ATP – adenosintrifosfát důležitý nukleotid, je zásadní pro funkci všech známých buněk.

Car – karotenoidy

CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý

DMSO – dimethyl sulfoxid – metoda na měření obsahu chlorofylu

E<sub>hv</sub> – množství energie

F<sub>M</sub> – maximální výběžek fluorescence

F<sub>0</sub> – minimální výběžek fluorescence

Chl – chlorofyl

Chl *a*, *b* – chlorofyl *a* a chlorofyl *b*

M<sub>F</sub> – podíl počtu vyzářených fotonů

M<sub>A</sub> – podíl všech absorbovaných kvant

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát slouží převážně v biosyntetických drahách (syntéza mastných kyselin, syntéza steroidních látek, syntéza glukózy v temnostní fázi fotosyntézy).

PA – (pascal) jednotka tlaku

PSI – fotosystém I

PSII – fotosystém II

RC – reakční centrum

S<sub>0</sub> – základní singentní stav molekuly chlorofylu

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> – singentní stav 1 a 2 molekuly chlorofylu

Φ<sub>F</sub> – kvantový výběžek fluorescence

Φ<sub>II</sub> – kvantový výběžek elektronového transportu fotosystému II

Q<sub>A</sub> – primární plastochinonový akceptor

WSC – vodu štěpící komplex

Λ – (lambda) vlnová délka

Ψ – (psí) označení jednotek tlaku

Ψ<sub>π</sub> – osmotický potenciál

Ψ<sub>p</sub> – turgorový potenciál

## ÚVOD

V minulých letech mělo velký dopad na krajinu velkoplošné odvodňování, ke kterému nejdříve docházelo v rámci protipovodňových opatření, později rozšířením plochy zemědělské půdy. Vodní toky byli regulovány, koryta toků byla napřimována a prohlubována. Tím zanikaly přirozené meandry a slepá ramena (Šťastný, 2011). Tyto změny měly negativní vliv nejen na mokřadní společenstva, ale na celý ekosystém. Rostliny se s nepříznivými podmínkami prostředí musí neustále vyrovnávat a bránit se jim. Díky evoluci se rostliny na nejrůznější podmínky přizpůsobily. Extrémní podmínky nutí rostliny aktivovat ochranné reakce a přizpůsobit se prostředí, ve kterém žijí (Bohnert et Jansen, 1996). Tento jev se nazývá rostlinný stres. V současné době je stres zkoumán různě, ať už od velkých celků, jako jsou ekosystémy, tak po biologické regulace rostliny na úrovni molekulární (Bláha a kol. 2003). Studiemi stresu u rostlin se zabývala po mnoha desetiletí řada vědců, na základě jejichž poznatků a studií jsou dnes vyvíjeny metody a přístroje, které slouží k hlubšímu a přesnějšímu určování stresových reakcí rostlin. Tento výzkum a vývoj slouží k využití převážně v zemědělství, lesním a půdním hospodářství a to od zúrodňování a zalesňování oblastí s extrémním působením stresu až po genetickou modifikaci zemědělských a hospodářských plodin.

Bakalářská práce věnuje pozornost tomu, jak se rostliny vypořádávají s nedostatkem a naopak s nadbytkem vody. Při nedostatku vody dochází k zavírání průduchů (Maxwell et Johnson, 2000) a snižuje se růst a fotosyntéza (Boyer, 1982). Při nadbytku vody dochází k nedostatečnému zásobení rostliny kyslíkem (Yamauchi a kol. 2014), tím se zastavuje růst kořenů a nadzemní části rostliny (Pavlová, 2005).

Existuje mnoho způsobů, jak zjistit stres u rostlin a jedním z nich je měření obsahu chlorofylu. Na toto měření bylo vyvinuto několik metod a já vybrala metodu DMSO (dimethyl sulfoxid) dle Hiscox & Israelstam (1979). Jedná se o metodu, která je rychlá, velmi jednoduchá a účinná.

Tato práce se zabývá abiotických stresem, který vzniká působením stresových podmínek, což byl v mém případě vodní stres. Měření fluorescence chlorofylu mi pomáhá odpovědět na otázku, jaká je intenzita a doba trvání nepříznivých podmínek a jak se s ní rostliny vyrovnávají. Je měřitelná v různých oblastech spektra, ale většina metod používá měření fluorescence chlorofylu ve vlnové délce 690 nm.



## 1. CÍLE PRÁCE

Základním cílem bakalářské práce je odpovědět na otázku, zda se liší druhy mokřadního společenstva mírou tolerance vůči vodnímu stresu a ukázat možnosti použití fluorescence chlorofylu v rostlinné fyziologii.

V lokalitě Hutě u Bechyně v jižních Čechách jsem provedla experiment na čtyřech koexistujících druzích mokřadních rostlin, při kterém byl stimulován suchý a vlhký vodní režim. Následně jsem odebrala dvě stě čtyřicet vzorků rostlinného materiálu a provedla jsem experiment dle metody DMSO (dimethyl sulfoxid) dle Hiscox & Israelstam (1979).

Porovnáním odebraných vzorků mokřadních rostlin metodou DMSO, jsem stanovila obsah chlorofylu, čímž mohu odpovědět na otázku, zda jsou rostliny vystaveny vodnímu stresu či nikoliv.

## 2. STRES

Stres je nepříznivý stav rostliny, která reaguje na působení zátěžových, tj. stresových faktorů neboli stresorů. Vyvolává aktivaci obranných mechanismů. Stresory můžeme obecně rozlišit na abiotické a biotické. Abiotické stresory mají povahu fyzikální nebo chemickou a můžeme sem zařadit příliš vysokou nebo příliš nízkou ozáření, extrémní teploty (vysoké i nízké), nedostatek vody i zaplavení stanoviště vodou vedoucí k nedostatku kyslíku, nedostatek esenciálních minerálních prvků v půdě, nadbytek iontů v půdním roztoku (zasolení půd), vysoké nebo nízké pH půdního roztoku, přítomnost toxických látek (těžké kovy, organické látky) a mechanické působení pohybů vzduchu – vítr (Benešová a kol. 2011); (Bláha a kol. 2003); (Bohnert et Jansen, 1996); (Davey a kol. 2002); (Pareek a kol. 2010); (Pavlová, 2005). Biotické stresory mají povahu biologickou. Zařadíme sem zejména působení patogenů (viry, mikroby, houby), vnitro a mezidruhovou konkurenci, alelopatii, parazitismus a poškození rostlin způsobené živočichy (Pavlová, 2005); (Bláha, 2011). Negativní vnější vlivy působí na celou rostlinu, tj. na kořeny, nadzemní část rostliny a na semena, která klíčí (Bláha a kol. 2003). Při kolísání faktorů vnějšího prostředí jsou rostlinné druhy přizpůsobeny k vykonávání všech důležitých životních funkcí. Rostlina se může se stresem vyrovnat a dosáhnout tak rovnovážného stavu (Pavlová, 2005); (Votrubová et Soukup, 1999). Pokud vliv stresu nezvládne, může dojít až k jejímu uhynutí.

Rozeznáváme skupinu reakcí, které začnou působit pod vlivem stresorů. Tyto stresové reakce se dělí na fázi poplachovou, fázi restituční, fázi rezistenční a fázi vyčerpání (Bláha a kol. 2003); (Procházka a kol. 1998). Poplachová fáze začne

působit po účinku stresu a při jejím působení jsou narušeny buněčné struktury a životní funkce rostliny. V restituční fázi aktivuje rostlina obranné mechanismy, které jí umožňují v těchto podmínkách dále setrvávat. Za pomoci těchto obranných mechanismů začne být rostlina odolnější vůči působícímu stresu, který toleruje a přežívá. Tuto fázi nazýváme rezistenční. Při fázi vyčerpání působí stres dlouhodobě a intenzivně. U rostliny může dojít k jejímu úhynu (Bláha a kol. 2003); (Pavlová, 2005); (Lichtenthaler, 1996). Rostliny na stres reagují nespecifickými vratnými nebo nevratnými reakcemi. Při vratných reakcích organismus odolává účinkům vnějších faktorů a při nevratných reakcích je organismus nevratně poškozený (Čermák, 2013).

## 2.1 Vliv vysušení stanoviště

Všechny biologické procesy probíhají za účasti vody a proto je voda pro život rostlin nezbytná (Kincl, 1978). Dostatečné množství vody v těle rostlin tvoří kostru (mechanickou oporu) buněčné stěny a tím nabývá potřebné pevnosti rostlinného pletiva (Šetlík a kol. 2004). Voda slouží jako rozpouštědlo látek, je složkou struktury makromolekul a celé buňky. Slouží jako důležitý faktor tepelného režimu rostlin a poskytuje jim důležité prvky – vodík a kyslík. Je tedy v tomto smyslu stavebním materiálem rostliny (Kincl, 1978).

Voda může být pro rostlinu nedostupná z několika důvodů. Rozeznáváme sucho půdní, které je charakterizované nedostatkem fyziologicky dostupné vody v půdě a sucho atmosférické. To je více nebezpečné, protože se objeví v krátké době a rostliny se mu nestačí včas přizpůsobit (Kincl a kol. 1977). Vodní deficit může nastat také z důvodu vysoké teploty a proudění vzduchu (Hirt et Shinozaki, 2004), který se projevuje hlavně v poledních hodinách za suchých a horkých dní (Kincl, 1978). Tam má příčinu ve vysoké transpiraci, která není kompenzována adekvátním příjmem vody kořeny z půdy (Pavlová, 2005). Minimální transpirace se vyrovnává hlavně přes noc (Kincl, 1978).

Při nedostatku vody je chemický signál přenášen mezi kořenem a nadzemní částí rostliny kyselinou absicovou (ABA); (Duan a kol. 2007). Ta je tvořena v kořenech a transportována do stonků a listů, kde společně s ABA produkovanou přímo listy (Hejnák a kol. 2005) indikuje zavírání průduchů (Maxwell et Johnson, 2000). Působením vodního stresu se snižuje především růst a fotosyntéza (Boyer, 1982). Při déle trvajícím vodním deficitu dochází k řadě změn. Buňky při nedostatku vody ukončí předčasně prodlužovací fázi a nakonec zcela zastaví růst rostliny. Uzavřou se průduchy a tím klesne příjem oxidu uhličitého a sníží se intenzita fotosyntézy. To

znamená, že rostlina spotřebuje více organických látek z těla, než jich dokáže vytvořit. Intenzita fotosyntézy klesá zpravidla pomalu (Pavlová, 2005), asimiláty se začnou hromadit (Krajník, 1962) a to ještě více brzdí další fotosyntézu (Pavlová, 2005). Oxid uhličitý a voda se mění na množství organických látek v rostlinné buňce (škrob, bílkoviny, tuky a jiné organické látky); (Kincl a kol. 2006). Začnou se uzavírat průduchy (Krajník, 1962), znemožní přístup CO<sub>2</sub> (oxid uhličitý) do fotosyntetických pletiv a tím se nemůže vytvářet glukóza. Teplota rostliny se při uzavírání průduchů zvyšuje až o 60° C vzhledem k teplotě vzduchu.

Rostliny vyvinuly různé strategie a mechanismy, které zvyšují jejich schopnost vodu získat, v pletivech ji udržet a její nedostatek přežít. Tyto strategie a mechanismy slouží k tomu, aby tomuto nedostatku vody předešly nebo tento nedostatek překonaly. Mohou ho překonat tím, že si vytvoří efektivnější kořenový systém nebo sníží rychlost transpirace. Některé xerofyty (např. vinná réva, palmy a keře v oázách) si tvoří extrémně dlouhé kořeny (některé až 30 m), které dávají rostlině schopnost dosáhnout úrovně spodních vod. Další rostliny (např. kaktusy) si tvoří mělký, ale rozsáhlý kořenový systém, aby mohly vodu získávat při krátkých obdobích srážek nebo z rosy velké plochy.

Během vývoje se rostliny na sucho adaptovaly a uplatňují novou strategii – sníží výdej vody a zvyšují její příjem. Při nedostatku vody od počátku vegetace v suchu se tvoří listy s menší plochou čepele (Pavlová, 2005), silnější kutikulou, menším počtem průduchů a hlouběji pronikajícím kořenovým systémem. Kořeny zabezpečují stálý příjem vody do nadzemní části rostliny. Při dlouhodobém nedostatku vody od počátku vegetace dochází k omezení tvorby kořenového systému. Nejprve kořeny začnou růst a pronikat do větších hloubek, avšak na úkor tvorby postranních kořenů a kořenového vlášení. Pokud stres i nadále nepřestává působit, dojde k omezení kořenového systému, přestane se vytvářet kořenové vlášení a nakonec se růst zastaví úplně a kořen uhynie (Bláha a kol. 2003). Pokud je rostlina vystavena nedostatkem vody až v dospělosti a listy mají konečnou velikost, tak může vodní deficit způsobit stárnutí a opad listů (Pavlová, 2005). Postupně začnou usychat a žloutnout spodní listy, protože obsahují více vody než listy horní. Čím výše jsou horními listy postaveny na rostlině, tím mají menší hodnotu vodního potenciálu. Vodní potenciál charakterizuje pohyb vody v rostlině a výměně vody mezi rostlinou a nejbližším okolím (atmosféře, půdě); (Šetlík a kol. 2004). Vyjadřuje se v jednotkách tlaku, tj. v Pa (pascal) a značí se řeckým písmenem  $\Psi$  (psi); (Šetlík a kol. 2004). Udává o kolik je aktivita vody v buňce nižší než aktivita čisté vody (Kubát, 1998); (proto jsou hodnoty vodního potenciálu záporná čísla); (Kincl a kol.

1977) tj. volná energie nutná pro transport vody z jednoho místa na druhé (Kubát, 1998). Nejvyšší vodní potenciál má čistá voda (0 Pa), voda v roztoku a voda vázaná fyzikálně nebo chemicky, dosáhne zápornou hodnotu vodního potenciálu (Romanovský a kol. 1985). Snížení vodního potenciálu má několik složek (Kubát, 1998), které působí aditivně, tj. ovlivňují vodní potenciál nezávisle a paralelně, kladně nebo záporně (Pavlová, 2005). Největší význam má osmotický potenciál (Kubát, 1998), který se značí  $\Psi_{\pi}$  (rozpuštěná látka); (Kindl a kol. 1977) a má zápornou hodnotu osmotického tlaku (Larcher, 1988). Velikost tohoto tlaku závisí na koncentraci (Pavlová, 2005), lépe řečeno na množství osmoticky aktivních částic v buněčné šťávě a na teplotě. Čím více částic působí, tím je osmotický tlak silnější (tlak působí na stěnu vakuoly a na buněčnou stěnu zevnitř), a tím má osmotický potenciál nižší hodnotu (Kubát, 1998). Turgorový (tlakový) potenciál naopak představuje tlak buněčné stěny zevnějšku na protoplast a ten vodní potenciál zvyšuje (Slavíková, 1986). Turgorový potenciál se značí  $\Psi_p$  (tlak); (Kindl a kol. 1977) a má kladnou hodnotu osmotického tlaku (Larcher, 1988). Skládá se z tlaku buněčné stěny – turgoru, tlaku okolních buněk a hydrostatického tlaku (Kubát, 1998). Vztah jednotlivých složek můžeme zapsat:

$$\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p$$

Ψ	=	Ψ <sub>π</sub>	+	Ψ <sub>p</sub>
vodní potenciál		osmotický potenciál		tlakový potenciál
(hodnota nulová)		(hodnota záporná)		(hodnota kladná)

Aktivita čisté vody se pokládá za nulovou, proto je hodnota vodního potenciálu v buňce záporná. Voda je transportována z místa vyššího vodního potenciálu na místo nižšího vodního potenciálu. V rostlině se vodní potenciál snižuje (je více záporný) vazbou vody a to především vazbou vody látkami v ní rozpuštěnými nebo vazbou vodních molekul různými silami. Nejvýznamnější složkou je osmotický potenciál. Snížením vodního potenciálu a zvýšenému příjmu a zadržováním vody vede k procesu, kterému říkáme osmotické přizpůsobení. Buňky zvýšeným počtem osmoticky aktivních částic reagují na nedostatek vody (Pavlová, 2005). Tlak v buňce naopak vodní potenciál zvyšuje (Slavíková, 1986), tedy tlak, kterým napjaté stěny působí na buněčný obsah. Jedná se o turgorový tlak (Šetlík a kol. 2004). Buňka plně nasycená vodou je taková buňka, která se příjmem vody do vakuoly roztáhne, až se vyrovná osmotický tlak (Kubát, 1998). Pokud se voda již v pokročilé fázi vodního stresu z nějakého důvodu doplní, všechny buněčné funkce se postupně vrátí do normálního stavu. Při déle trvajícím nedostatku vody může silnou dehydratací dojít k odumření orgánů nebo celé rostliny (Procházka a kol. 1994).

## 2.2 Vliv zaplavení stanoviště

Voda je pro život rostliny nezbytná, ale při jejím nadbytku v půdě trpí kořenový systém nedostatkem kyslíku (Pavlová, 2005). Rostliny mohou kyslík přijímat z půdy nebo z atmosféry. Z půdy přijímají kyslík kořeny, který je obsažen v celém půdním profilu (Bláha a kol. 2003). Při zaplavení půdy je výměna plynů mezi půdou a atmosférou omezena. Kyslík se v zaplavených půdách nachází pouze v tenké vrstvičce pod povrchem (Čížková, 2006). V půdě je obsah kyslíku nižší přibližně 10 000 krát než v atmosféře (Amstrong, 1997). Prostředí se tedy dle obsahu kyslíku ustavuje na normoxické, hypoxické nebo anoxické. V normoxickém prostředí probíhá normální buněčné dýchání a kořeny jsou plně zásobeny kyslíkem. Buňky získávají naprostou většinu ATP oxidativní fosforyzací (Pavlová, 2005). V hypoxickém prostředí je buněčné dýchání omezeno, protože rostlina je nedostatečně zásobena kyslíkem (Yamauchi a kol. 2014). Buňky získávají z glykolýzy větší množství ATP než v prostředí normoxickém (Pavlová, 2005). Anoxické prostředí znamená naprostý nedostatek kyslíku. Dochází k němu nejčastěji tím, že kyslík je z půdních kapilár vytěsněn vodou (Rosypal, 1987). Pokud anoxie probíhá jen v krátkém (několikadenním) období mohou ho tolerantní rostliny přežít. Rostliny citlivé k záplavám obvykle více než 24 hodin toto prostředí nepřežijí. Při nedostatku kyslíku se zastavuje růst kořenů (Pavlová, 2005) a to v rostlině způsobí energetickou krizi v podobě nedostatku ATP (Teakle a kol. 2007). Buňky meristémů se nedělí a ustává jejich zvětšování. Buňky sníží nejen příjem anorganických látek, ale i vody. Snížením funkční aktivity buněk kořenů ustává růst nadzemní části rostlin a rostlina vadne (Pavlová, 2005). Dalším důsledkem z nedostatku kyslíku je hromadění produktů fermentačních reakcí (etanol, laktát); (Tylová, 2010). Pokud se etanol a laktát vyskytuje ve vyšších koncentracích, může to být pro rostliny toxické (Marscher, 1995).

Snížený obsah kyslíku v rostlině vytváří metabolické nebo anatomické adaptace (Larcher, 1988). Při metabolických adaptacích se rostliny musí vyrovnat s nedostatkem kyslíku v půdě anaerobními fermentačními procesy (Čížková et Šantrůčková, 2006). Adaptace metabolismu umožňují samy o sobě rostlině přežít bez kyslíku, ale pouze na určitou omezenou dobu, tj. několik hodin až několik měsíců (Drew, 1997). Anatomické adaptace umožňují trvalé přežití a intenzivní růst díky rozsáhlým mezibuněčným prostorům v pletivech v podzemních i nadzemních orgánech. Tomuto typu pletiva říkáme aerenchym (z řec. aér = vzduch); (Kincl a kol. 2006) a slouží k vnitřnímu provětrávání. Kyslík se dostane z atmosféry do podzemních orgánů, kde je již vyčerpán (Tylová, 2010). Aerenchym obsahuje velké

dutiny vyplněné vzduchem, kterými kyslík snáze difunduje z listů do stonků a kořenů (Jackson et Armstrong, 1999). Vzduch do rostliny vstupuje pomocí průduchů nebo lenticelami, je veden hromadným tokem a systémem interceluár ke kořenovému systému (Visser, 2003). Interceluláry se vyskytují téměř ve všech rostlinných pletivech a mají rozsáhlou soustavu mezibuněčných prostor (Kincl a kol. 2006). Nejvíce vyvinutý aerenchym mají mokřadní rostliny, kterým umožňuje kolonizovat zaplavené lokality (Tylová et Soukup, 2010). Další adaptací je ochrana proti pronikání toxických redukováných sloučenin, která proniká ze zaplavené půdy do nitra kořene (Jackson et Armstrong, 1999). Současně také redukuje ztrátu kyslíku z kořene do rhizosféry, kterou představuje exodermis. Exodermis je vrstva buněk pod pokožkou kořene (Tylová et Soukup, 2010). U zaplavených rostlin mohou vznikat adventivní kořeny, které se tvoří na stonkových částech mělce pod hladinou, kde je vyšší obsah rozpuštěného kyslíku. Na některých orgánech se mohou vyskytovat lenticely neboli čočky, které usnadňují vstup kyslíku do rostliny. Tvoří se v epidermis a subepidermálních vrstvách buněk nezaplavených částí tj. na kmenech, větvích v některých případech i na kořenech a plodech (Kincl a kol. 2006). Jiné rostliny, mohou vytvářet pneumatofory, které vyrůstají nad povrch hladiny, kde přijímají kyslík a zajišťují ho rostlině. Některé druhy rostlin přežívají období zaplavení ve stavu určité metabolické strnulosti a tím snižují svou aktivitu na polovinu. Jiné druhy rostlin, např. rýže při zaplavení zvyšuje aktivitu glykolytických procesů a tím vyrovnává růst nadzemní části (Pavlová, 2005).

V mé práci jsem se zaměřila na čtyři druhy rostlin, ostřici vyvýšenou (*Carex elata*, All.), ostřici prodlouženou (*Carex elongata*, L.), metlici trsnatou (*Deschampsia cespitosa*, L.) a třtinu šedavou (*Calamagrostis canescens*, W.). Zjišťovala jsem, jak se chovají při vysušení a jak při zaplavení stanoviště. Nejdříve si jednotlivé druhy stručně popíšeme.

Ostřice (*Carex*, Mill.) je velký rod čeledě šáchorovitých (*Cyperaceae*, Juss.) zahrnující přes 1500 druhů vytrvalých bylin trávovitého vzhledu. Obvykle tvoří trsy různé velikosti nebo jsou výběžkaté. Vyskytují se po celém světě, avšak největší zastoupení druhů je v chladnějších oblastech mírného pásma severní polokoule včetně arktických a subarktických oblastí. Převážná většina ostřic roste na zamokřených až močálových místech. Některé druhy se vyskytují i ve stepních biotopech (Kubát a kol. 1998).

Ostřice vyvýšená (*Carex elata*, All.); (obrázek č. 1) je vytrvalý druh, vyskytující se v Evropě a severní Africe na vlhkých místech. Dominuje vegetaci mezotrofních stojatých vod (Chytrý, 2011), jako jsou slatiny, močály a břehy rybníků (Dostál,

1989). Rostlina vytváří trsy zvané též bulvy, které tvoří z odumřelých pochev (Hrouda, 2010a). Při silnějším přeplavení povrchu půdy vytváří nápadné, až 50 cm široké a 20 – 50 cm vysoké trsy (Chytrý, 2011). Nápadné jsou hlavně při nižší hladině vody, kdy dolní bulvy jsou obnaženy a jejich část je již odumřelá (Hrouda, 2010b).



Obr. č. 1: Ostřice vyvýšená (*Carex elata*, All.): převzato z vlastního zdroje.

Ostřice prodloužená (*Carex elongata*, L.); (obrázek č. 2) je hustě trsnatá a sytě zelená (Dostál, 1989). Nejčastěji ji nalezneme v podobě trsů, které vyčnívají nad hladinu bažinných olšin, kde se voda vyskytuje po většinu roku (Douda, 2008). Vyskytuje se v mokrých, výživných, zásaditých a písčitohlinitých substrátech (Jírová, 2007).





Obr. č. 2: Ostřice prodloužená (*Carex elongata*, L.): převzato z vlastního zdroje.

Metlice trsnatá (*Deschampsia cespitosa*, L.); (obrázek č. 3) je vytrvalá tráva s hustými pevnými trsy stonků, vysokými 60 – 90 cm a širokými 60 cm (Kubát, 2003), sytě zelená (Dostál, 1989). Nejčastěji se vyskytuje v kyselých substrátech a oligotrofních stanovištích, která jsou sezónně vysychavá a mají mělkou vrstvu rašeliny. Je také vázána na chladné oblasti (Chytrý, 2011) a rozšířena na vlhkých loukách, na březích vod i ve světlých okrajích lesů po celé Evropě, severních oblastech Asie i Ameriky (Opatrná et Součková, 2003).



Obr. č. 3: Metlice trsnatá (*Deschampsia cespitosa*, L.): převzato z vlastního zdroje.





Třtina šedavá (*Calamagrostis canescens*, W.); (obrázek č. 4) je rostlina řídce trsnatá, světle nebo šedě zelená (Dostál, 1989), vysoká 60 – 120 cm. Vyskytuje se na minerálních i rašelinných půdách v komplexech rákosin kolem rybníků, vlhkých luk nebo rašelinišť (Chytrý, 2011). Při vyšších stavech vody, prorůstá stanoviště a hladina vody dosahuje k povrchu půdy a někdy i krátkodobě i 10 – 20 cm nad něj. V mokřadech, které jsou postiženy poklesem podzemní vody má tendenci se rychle šířit (Chytrý, 2011).

Obr. č. 4: Třtina šedavá (*Calamagrostis canescens*, W.): převzato z vlastního zdroje.

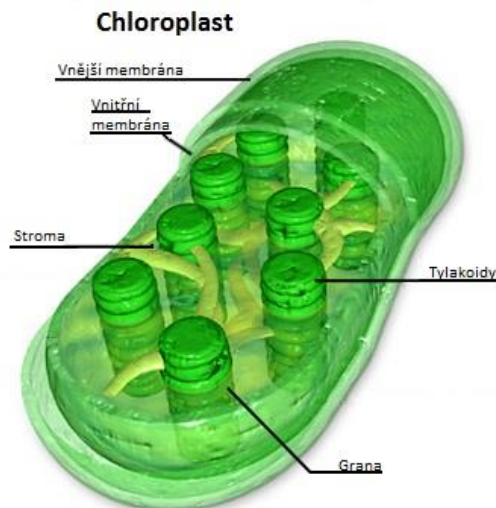
### 3. FOTOSYNTÉZA

Vznik fotosyntézy je jedním z nejdůležitějších mezníků ve vývoji života na Zemi (Kincl a kol. 2006). Je to biochemický proces, při kterém rostliny absorbují energii slunečního záření a přeměňují ji na energii chemickou (Soukupová et Roháček, 2003). Tuto energii pak využívají ke stavbě a údržbě svého těla (Krajník, 1962). Probíhá v zelených částech rostliny a to především v buňkách listového mezofylu, ve funkčně specializovaných plastidech zvaných chloroplasty (obrázek č. 5). Tento složitý proces probíhá v chloroplastech zelených rostlin a několika dalších organismech v podobě dvou fází. Jedná se o fázi světelnou neboli primární (přeměna energií) a fázi temnotní neboli sekundární (přeměna látek); (Pavlová, 2005). Světelná fáze je bezprostředně závislá na světle a probíhá v tylakoidních membránách chloroplastů (Kincl a kol. 2006). Zahrnuje oxido-redukční reakce, při kterých nastává fotolýza vody, vytváří se pH-gradient a vzniká ATP a NADPH (Roháček, 2011a). Je realizována dvěma pigmentovými systémy – fotosystémem I (PS I) a fotosystémem II (PS II); (Kincl et Faust, 1977). Fotosystém I absorbuje převážně světlo v červené oblasti do 700 nm (obrázek č. 8) a doprovází chlorofyly. Fotosystém II obsahuje kromě chlorofylů i pigment 685 a absorbuje v oblasti kratších vlnových délek (Kincl, 1977). Temnotní fáze není na světle bezprostředně závislá a probíhá mimo tylakoidy ve stromatu chloroplastů (obrázek č. 5); (Kincl a kol. 2006). Tato fáze zahrnuje enzymatické reakce, při níž se na úkor chemické energie produktů světelné fáze (NADPH, ATP) a za spoluúčasti  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$

syntetizují důležité organické látky (sacharidy, tuky, bílkoviny apod.). Ovšem účinnost jejich syntézy v chloroplastech je závislá na intenzivním přísunu ATP a NADPH (na účinnosti světelných reakcí); (Roháček, 2011b). Všechny stresové vlivy snižují rychlost fotosyntézy a zároveň tím zvyšují velikost fluorescence (Procházka a kol. 1998). K průběhu fotosyntézy je zcela nezbytná voda, její nedostatek se projeví uzavíráním průduchů. To znemožňuje přísun  $\text{CO}_2$  do fotosyntetizujících pletiv (Kincl a kol. 2006).

### 3.1 Chloroplasty

Chloroplasty (obrázek č. 5) jsou zelené, fotosynteticky aktivní plastidy, které se vyskytují v zelených částech rostliny. Hlavním fotosyntetickým barvivem je chlorofyl (chlorofyl *a*, *b*, *c*); (Richardson a kol. 2002). Ten je obsažen ve všech zelených rostlinách a to vždy v kombinaci s některým ze zbývajících typů (viz kapitola chlorofyl); (Kincl, 2006). Chloroplasty jsou zpravidla diskovitého tvaru o průměru 5 – 10  $\mu\text{m}$  a v jednoduché mezofylové buňce může být 40 – 50 chloroplastů (vypadají jak štočky mincí); (Procházka a kol. 1998). Mohou se v buňce pohybovat a zaujímat co nejvhodnější polohu k využití sluneční energie (Kincl, 2006). Chloroplasty se skládají z dvojité povrchové membrány, do které jsou vnořeny pigment-bílkovinné komplexy. Ty tvoří dvě základní fotosyntetické jednotky a to fotosystém II a fotosystém I. Tyto fotosystémy se skládají z reakčního centra (RC), tvořeného molekulou dimeru chlorofylu *a* (Chl *a*), a z vnitřních a vnějších světlo-sběrných antén, které obsahují velké množství molekul Chl *a* a *b* (Roháček, 2011a). V tzv. vnějších anténách je poměr chlorofylu *a* k chlorofylu *b* přibližně 3:1 (Netto a kol. 2005). Do reakčního centra přechází energie fotonů absorbovaných celým světlo-sběrným komplexem ve formě toku excitonů (vázané nábojové stavy). Fotosystém I má ve svém RC pigment s maximem absorpce kolem 700 nm (P700) a skoro nefluoreskuje (Roháček, 2011a). Odtud pochází i název pigmentu, který provází chlorofyly (Lercher, 1988). Fotosystém II obsahuje analogický pigment v oblasti kratších vlnových délek (obrázek č. 8) a to 680 nm (P680); (Kincl, 1977), který výrazně fluoreskuje. Oba tyto fotosystémy jsou mezi sebou propojeny řadou elektronových přenašečů a ty spolu navzájem úzce kooperují (Roháček, 2011a). Na vnitřní membráně se vytvářejí plošné váčky označované jako tylakoidy (obrázek č. 5). Ty jsou vzájemně spojeny a tvoří tzv. grana (obrázek č. 5). V tylakoidech jsou umístěna fotosyntetická barviva, která umožňují zachycení a přeměnu sluneční energie na energii chemických vazeb. Vnitřek chloroplastu vyplňuje základní hmota zvaná stroma (obrázek č. 5); (Kincl, 2006), která obsahuje enzymy uplatňující se při fixaci  $\text{CO}_2$  (Roháček, 2011a).

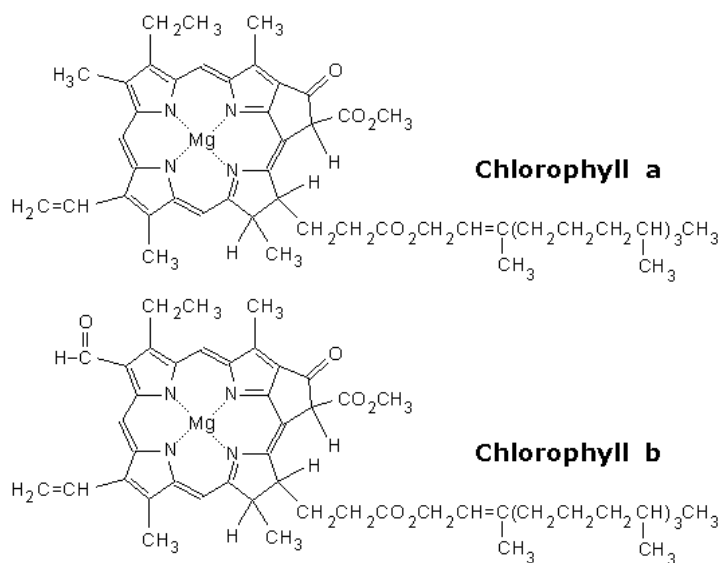


Obr. č. 5: Chloroplast – vnější membrána, vnitřní membrána, stroma, grana, tylakoidy. Zdroj: (Kozlová, 2010).

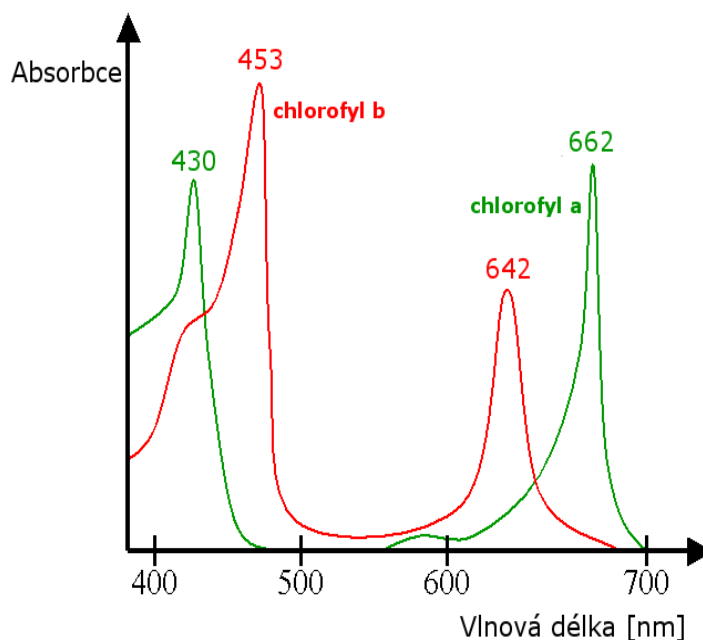
### 3.2 Chlorofyl

V průběhu fotosyntézy absorbuje chlorofyl energii světelného záření a používá ji k syntéze sacharidů z oxidu uhličitého (Kincl a kol. 2006). Chlorofyl je přítomen v mnoha organismech včetně řas a některých druhů bakterií. Je zastoupen v nejhojnější formě ve fotosyntetických organismech a převážná část dává rostlinám jejich zelenou barvu. Patří k fotosyntetickým pigmentům současně s karotenoidy (Car); (Yang a kol. 2012) a fykobilinami. Chlorofyl má v dopadajícím bílém světle barvu zelenou, protože intenzivně absorbuje viditelné záření v oblastech vlnových délek okolo 430 nm (modrá oblast spektra) a 663 nm (červená oblast); (obrázek č. 7) ze zelené oblasti (cca 500 nm) záření propouští (Roháček, 2011a). Mezi dva hlavní typy patří chlorofyl *a* a chlorofyl *b* (obrázek č. 6), vyskytující se u všech autotrofních rostlin s výjimkou některých bakterií (Procházka a kol. 1994). Rozdíl mezi chlorofylem *a* a chlorofylem *b* je ve struktuře postranního řetězce a je tvořen pouze rozdílnými skupinami na 3. atomu uhlíku (Procházka a kol. 1998). Chlorofyl *a* (obrázek č. 6) obsahuje methylovou skupinu ( $-\text{CH}_3$ ); (Roháček, 2011b) a je nejdůležitější fotosynteticky aktivní pigment (Richardson a kol. 2002), který má klíčovou funkci při fotosyntéze (Romanovský a kol. 1985). Je nejdůležitějším barvivem, které zachycuje energii slunečního záření (Krieger-Liszkay, 2004); (Blackburn, 2006) a absorbuje hlavně v modré a červené části spektra (Kincl a kol. 2006). Chlorofyl *b* (obrázek č. 6) obsahuje skupinu karbonylovou ( $-\text{CHO}$ ); (Roháček, 2011b) a vzniká oxidací chlorofylu *a* (Pavlová, 2005). Karotenoidy (Car) mají pigmenty žluté, oranžové nebo červené barvy (Procházka a kol. 1994), jež zachycují

světelná kvanta v oblasti spektra (obrázek č. 8). Tam chlorofyl neabsorbuje a excitační energie je využita přenesením na chlorofyl *a* (Roháček, 2011a). K fotosyntéze slouží z karotenoidů  $\beta$ -karoten (Yang a kol. 2012) a xantofyly (lutein, neoxantin, violaxantin aj.) (Pavlová, 2005). Karotenoidy zároveň odstraňují radikálové formy kyslíku, které vznikají v průběhu fotosyntézy. Působí, tak destruktivně na RC a i na další lipoproteiny v tylakoidní membráně (Roháček, 2011a). Zároveň chrání fotosyntetický aparát před poškozením (foto-oxidací); (Procházka a kol. 1998). Fykobiliny se vyskytují v červených a modrozelených řasách (Procházka a kol. 1994) a skládají se z vlastního chromoforu fykobilinu a bílkoviny (Procházka a kol. 1998). Mezi fykobiliny patří fykoerythin a fykocyán (Procházka a kol. 1994). Ve fotosyntéze je nezbytný pro vlastní přeměnu chlorofyl *a*, protože ostatní pigmenty (karotenoidy a fykobiliny) mají jen funkci pomocnou (Procházka a kol. 1994). Množství chlorofylu v listech se může vyjádřit koncentrací (tj. mikrogramů Chl  $\text{g}^{-1}$  tkáně) nebo obsahem (tj. mikrogramů Chl  $\text{cm}^{-2}$  tkáně). Preference jednoho či druhého závisí na cílech výzkumníků (Netto, 2005).



Obr. č. 6: Chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Chlorofyl *a* obsahuje metylovou skupinu (CH<sub>3</sub>) a chlorofyl *b* skupinu karbonylovou (CHO). Zdroj: (Food - info 2013). Upraveno.



Obr. č. 7: Absorpční spektrum chlorofylu *a* a chlorofylu *b*. Zdroj: (Wikipedie, 2013). Upraveno.

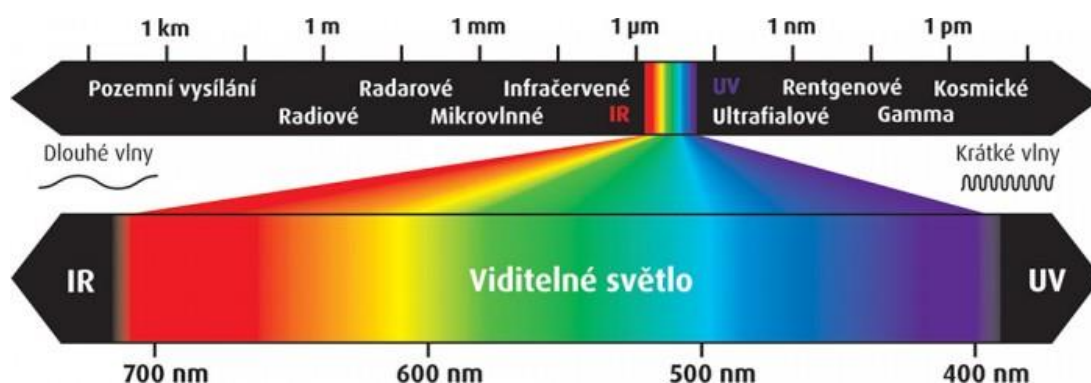
### 3.3 Fluorescence

Fluorescence je jedním z druhů luminiscence, ke které dochází při emisi záření při přechodu excitované molekuly do základního stavu ( $S_0$ ); (Floromatics software, 2013). Pokud je excitace vyvolána absorpcí kvanta záření, toto emitované záření se nazývá fluorescence (Maxwell et Johnson, 2000). Emitované záření má větší vlnovou délku než 650 nm a nižší energii než záření excitační (Roháček, 2011a).

### 3.4 Fluorescence chlorofylu

Je jedním z de-excitačních procesů po absorpci světelné energie světlo-sběrným signálem (Oxborough, 2004). Má původ ve fotosyntetických pigmentech zelených rostlin, ve kterém se vyskytuje mnoho foto-fyzikálních procesů. Tyto procesy probíhají v tylakoidních membránách uvnitř chloroplastů během přeměny energie slunečního záření na biochemicky dále využitelnou formu. V anténních pigmentech fotosystému I (PSI) a fotosystému II (PSII) je energie kvanta světelného záření absorbována a přenesena do reakčních center PSI a PSII ve formě toku excitonů (Richardson a kol. 2002). Oblast PSII je nejcitlivější částí fotosyntetického aparátu (Prášil, 2003). K popsání a měření procesu emise fluorescence se používá termín kvantový výběžek fluorescence ( $\Phi_F$ ); (Roháček, 2011b) a z velké části závisí na schopnosti PSII realizovat stabilní rozdělení náboje mezi primárním donorem (P680) a plastochinonovou molekulou ( $Q_A$ ); (Maxwell et Johnson, 2000). Záleží na tom, zda je  $Q_A$  oxidována nebo redukována. Pokud je  $Q_A$  oxidována, reakční centrum

PSII může využít zachycenou světelnou energii anténním systémem na rozdělení náboje a v tomto případě je účinnost fotochemie maximální. Zbylá část excitační energie spotřebovaná na fluorescenci je malá, takže hovoříme o minimálním výběžku fluorescence ( $F_0$ ). Když je ale  $Q_A$  redukována, reakční centrum PSII nemůže uskutečnit stabilní rozdělení náboje a v této situaci se účinnost fotochemie blíží nule. Část excitační energie, která je využita na fluorescenci, je tím pádem vysoká, a tudíž je výběžek fluorescence maximální ( $F_M$ ). Kvantový výběžek se vypočítá ze vzorce  $\Phi_F = (F_M - F_0)/F_M$  a zjednodušeně nám říká, jaký je zdravotní stav rostliny. Pokud se jeho hodnota pohybuje okolo 0,8, jedná se o zdravou rostlinu, snížením hodnoty pod 0,7 znamená výrazné zhoršení jejího stavu. Kvantový výběžek fluorescence je definován, jako podíl počtu vyzářených fotonů ( $n_F$ ) k počtu všech absorbovaných kvant ( $n_A$ ); (Soukupová et Roháček, 2003). Nejzářivější emise dosahují látky s největším kvantovým výběžkem blíží se číslu jedna (Lakowicz, 2010).



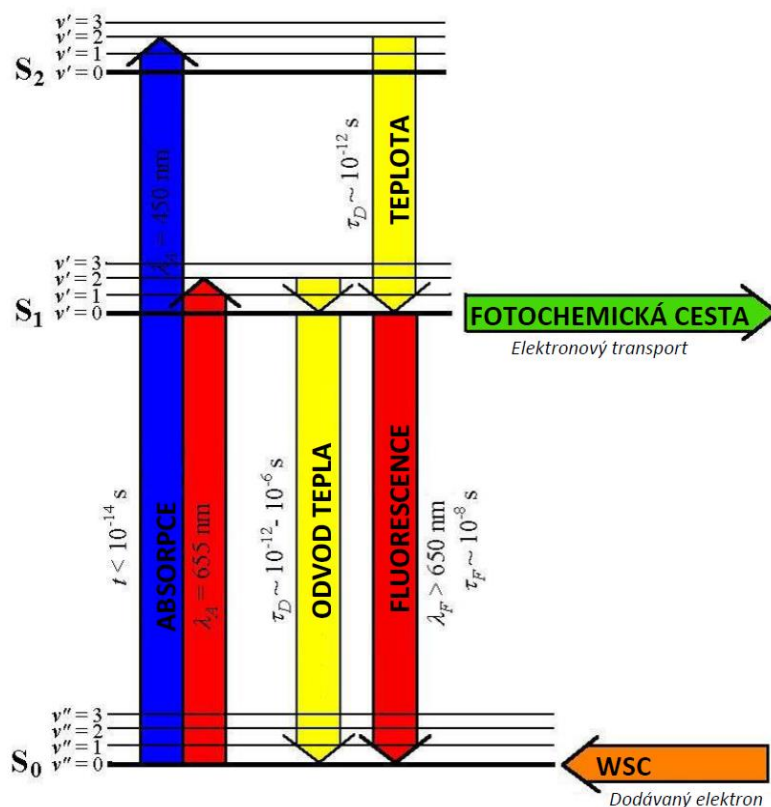
Obr. č. 8: Elektromagnetické vlnění v rozsahu od 380 nm do 780 nm od nejkratší vlnové délky v barvě fialové až po nejdelší vlnovou délku v barvě červené. Od viditelného světla vpravo vidíme ultrafialové záření (UV), směrem do kratších vlnových délek, a směrem vpravo infračervené záření (IR), směrem do delších vlnových délek. Viditelné světlo je v intervalu od 400 nm do 700 nm. Modrá oblast spektra je okolo 430 nm, červená oblast je okolo 663 nm a zelená oblast je okolo 500 nm. Zdroj: (Megaflex, 2013). Upraveno.

### 3.5 Světlo

Světlo znamená viditelnou oblast elektromagnetického záření (Roháček, 2011a), je to tok fotonů a ty jsou nositelem energie (Romanovský a kol. 1985) o vlnové délce ( $\lambda$  – lambda) v intervalu od 400 do 700 nm (Roháček, 2011a); (obrázek č. 8). Foton představuje nejmenší částičku (kvantum) světla a jeho energie je dána vlnovou délkou příslušného elektromagnetického záření. Čím je vlnová délka kratší, tím je energie fotonu větší a naopak (Šulc, 2002). Každý pohlcený foton, který nese dostatečné množství energie ( $E_{hv}$ ) může způsobit jednoduchý foto-fyzikální děj. Primární fotochemické reakce pohání energie fotonů, která zahájí fotosyntetickou



přeměnu zářivé energie na biochemicky využitelnou formu a vede k oddělení náboje v radiačních centrech (RC) fosystému II a fotosystému I. Také může být rozptýlena nefotochemickou cestou, jinak řečeno přeměnou na teplo a fluorescenci. K tomuto pochopení nám poslouží následující obrázek (Roháček, 2011a).



Obr. č. 9: Zjednodušené tří hladinové schéma využití excitační energie v molekule chlorofylu reakčního centra PSII.  $S_0$  základní singletní stav,  $S_1$  a  $S_2$  excitované singletní stavy. Horizontální čáry ukazují vibrační stavy uvedených energetických hladin pro různá vibrační čísla ( $v''$  – základní stav,  $v'$  – excitované stavy), vertikální šipky ukazují různé kvantové procesy: šipky nahoru – modrá a červená – absorpce kvanta záření s určitou vlnovou délkou  $\lambda_A$ , šipky dolu – žlutá – odvod tepla, červená – fluorescenci. Horizontální zelená šipka znázorňuje fotochemickou cestu a oranžová šipka nábojovou neutralizaci iontu  $\text{Chl}^+$  elektrony dodávanými komplexem štěpícím vodu. Zdroj: (Roháček 2011c). Upraveno.

Toto schéma nám ukazuje tři singletní stavy a to základní singletní stav ( $S_0$ ) a dva singletní stavy ( $S_1$ ,  $S_2$ ) molekuly chlorofylu. Horizontální čáry nám ukazují vibrační stavy uvedených energetických hladin pro různá vibrační čísla ( $v''$  je pro základní stav,  $v'$  je pro excitované stavy); (Roháček, 2011a). Excitovaný stav je takový stav, kdy je jeho energie vyšší než v základním stavu (Šulc, 2002). Vertikální šipky ukazují následující kvantové procesy: modrá šipka – absorpce kvanta záření s určitou vlnovou délkou  $\lambda_A$ , která způsobí přechod elektronu ze základního do excitovaného stavu v čase kratším než  $10^{-14}$ s, odvod tepla – rozptýlení excitační

energie nezářivou vnitřní konverzí na teplo, fluorescence – zářivá de-excitace vzbuzeného stavu vyzářením fotonu s vlnovou délkou  $\lambda_F$  větší než 650 nm (Roháček, 2011a). De-excitace je stav s nižší energií než v základním stavu (Šulc, 2002). Parametr  $\pi$  (pí) znamená přibližnou dobu života elektronu v jednotlivých kvantových stavech. Horizontální šipky nám ukazují tzv. fotochemickou cestu, tj. rozdělení náboje v reakčním centru fotosystému II jako počátek transportu elektronů a nábojovou neutralizaci iontu chlorofylu<sup>+</sup> elektrony dodávanými komplexem štěpícím vodu (WSC); (Roháček et Barták, 1999).

V reakčním centru můžeme chlorofyl popsat jako oxido-redukční systém, ten se oxiduje tím, že předá elektron na molekulu akceptoru a poté se vrátí do základního stavu (stav s nejnižší energií), kde přijme elektron od primárního donoru. Absorpcí světla se získá potřebné množství energie, která je potřebná pro přechod elektronu mezi základním a excitovaným stavem. Je-li absorbován foton z modré oblasti viditelného spektra ( $\lambda = 450$  nm), elektron přechází do excitovaného stavu  $S_2$ . Pokud, ale dojde k absorpci fotonu z červené oblasti ( $\lambda = 650$  nm), která je energeticky chudší, elektron může přejít jen do stavu  $S_1$ . V excitovaném stavu  $S_1$  je doba života elektronu asi tisíckrát delší ( $\pi = 10^{-9} - 10^{-8}$  s) než ve stavu  $S_2$  (Roháček, 2011b). V této době musí být elektron buď přenesen na sousední molekulu v elektronově transportním řetězci (u rostlin feofytin), anebo se vrátí do základního excitovaného stavu zářivým procesem (fluorescence), nebo nezářivým procesem (teplotní disipace); (Procházka a kol. 1994).

#### **4. METODY MĚŘENÍ FLUORESCENCE CHLOROFYLU**

V současné době existuje několik metod pro stanovení chlorofylu (Makeen a kol. 2007). Fluorescence chlorofylu je cestou, jak zkoumat fotosyntetické procesy v rostlinách, řasách i sinicích. Metody měření fluorescence chlorofylu se staly jednou z nejmodernějších a široce používaných technik a našly uplatnění ve fyziologickém a ekologickém výzkumu (Špulák et Martinová, 2006), ale také v monitorování prostředí a v dalších oborech (Fišar, 2003). Tyto metody jsou rychlé, spolehlivé, nedestruktivní, kvantitativní a můžeme je srovnat s jinými metodami hodnotící kvalitu fotosyntetických procesů (Mohammed a kol. 1995). Mohou se jimi detailně studovat i děje probíhající v tylakoidních membránách uvnitř chloroplastů (Schreiber a kol. 1986). Jsou využívány k zajištění abiotických stresů, jako jsou vysoká a nízká teplota, nedostatek vody, zamokření stanoviště, nedostatek esenciálních minerálních prvků v půdě atd. (Maxwell et Johnson, 2000). Dále i včas detekovat biotický stres na úrovni buněk, rostlin i celého porostu (Soukupová et Roháček, 2003). Sledování fluorescence chlorofylu nám může zároveň pomoci



odhadnout intenzitu a dobu trvání nepříznivých podmínek (Papageorgiou, 2004). Zároveň ji můžeme detekovat i z družic z výšky několika set kilometrů nad zemí (Prášil, 2003).

Na základě těchto metod se používají přístroje, které slouží k hlubšímu a přesnějšímu určování stresových reakcí u rostlin. Jako první popsali v roce 1931 Kautský H. a Hirsch A. vztah mezi fotosyntetickou aktivitou a fluorescencí chlorofylu (Floromatics software, 2013). Jednou z překážek měření fluorescence chlorofylu byla v minulých letech její vysoká cena a přesnost přístrojů. Dnes jsou k dispozici přístroje, se kterými můžeme měřit jak v laboratoři, tak v polních podmínkách. Tyto přístroje nám poskytují jednoduché, rychlé a přesné měření a lze s nimi zkoumat jednotlivé buňky, listy, celé rostliny ale také celé prostory (Maxwell et Johnson, 2000).

Jedná se především o metodu fluorometrickou, gazometrickou a spektrofotometrickou. Všechny metody jsou v podstatě založeny na stanovení fotosyntetické aktivity rostlin (Procházka a kol. 1998).

Metody fluorometrické slouží k monitorování fotochemické účinnosti rostlin. Tyto metody jsou rychlé, neinvazní a zároveň velmi citlivé a používají se v základním výzkumu fotosyntézy (Soukupová et Roháček, 2003). Lze je také použít při detekci mutantních rostlin, a včasné detekci abiotického a biotického stresu (Oxborough, 2004). Nejvíce se pro toto měření využívají přístroje, které pracují na principu pulzní amplitudové modulace (PAM) fluorescenčního signálu (Schreiber a kol. 1986). Existují dva typy fluorometrů a to nezobrazovací a zobrazovací. Nezobrazovací fluorometry integrují fluorescenční signál z celého měřeného vzorku (list, suspenze řas nebo sinic). Výsledkem měření je jediná fluorescenční indukční křivka nebo soubor fluorescenčních parametrů pro daný vzorek. Dále s nimi můžeme měřit velmi rychlé procesy na fotosyntetické membráně. Zobrazovacími fluorometry nelze měřit rychlé procesy na fotosyntetické membráně, ale jejich velkou výhodou je možnost měřit změny fluorescenční emise chlorofylu v ploše (Soukupová et Roháček, 2003). Tím se dá odhalit prostorová heterogenita zkoumaného vzorku a to jak na mikroskopické ( $\mu\text{m}$ ) tak makroskopické ( $\mu\text{m}$ ) úrovni (m až desítky m); (Oxborough, 2004). Můžeme také testovat snímání fluorescence vegetace z letadel a satelitů. Tím, že použijeme zobrazovací fluorometrii, můžeme zjistit působení stresového faktoru dřívě, než jsou patrná poškození pouhým okem (Soukupová et Roháček, 2003).

Gazometrické metody se užívají ke stanovení fotosyntetické aktivity rostlin (Procházka a kol. 1998). Použití těchto metod s použitím moderních přístrojů je rychlé, nedestruktivní umožňují měření celkové bilance uhlíku v rostlině. Principem je absorpce oxidu uhličitého a vodní páry v infračervené oblasti za pomoci infračerveného analyzátoru (Hall a kol. 1993). V současné době je k měření samozřejmě použito výpočetní techniky, která sama automaticky vyhodnocuje a vypočítává parametry. Těmito parametry jsou: rychlost fotosyntézy, rychlost transpirace, koncentrace CO<sub>2</sub> atd. Tato metodika umožňuje mnohačetná denní měření v jakýchkoliv podmínkách (Procházka a kol. 1998).

Spektrofotometrie je kvantitativní metoda, která se nejčastěji stanovuje obsahem fotosyntetických pigmentů, tj. měřením absorbance směsi pigmentů při různých vlnových délkách, většinou volených tak, aby odpovídaly absorpčním maximům jednotlivých složek. Použití této metody pro směsi pigmentů je ovšem omezeno na pigmenty, které se spektrálně liší. Nemůžeme např. určit obsahy jednotlivých složek ve směsi chlorofylu a jeho defytylované formy – chlorofylidu, nebo obsahy jednotlivých karotenoidů v jejich směsi. Běžně se tato metoda používá pro stanovení obsahu Chl *a*, Chl *b* a celkového Car (Richardson a kol. 2002). Pigmenty se extrahují z rostlinných materiálů organickými rozpouštědly, jako je aceton (Netto a kol. 2005), dimethyl sulfoxid (DMSO); (Hiscox & Israelstam, 1979), methanol, dimethyl formamid (DMF); (Netto a kol. 2005). Toto měření však má nevýhodu v tom, že vyžaduje zničení měřených listů (Sims et Gamon, 2002) a také s nimi musíme v průběhu experimentu pracovat co nejrychleji, aby nedocházelo k pigmentovým ztrátám. Ztráty by vedly k vysoké variabilitě ve výsledcích (Netto a kol. 2005). Tyto techniky jsou časově náročné a drahé a z hlediska vegetace krajiny nepraktické. Principem měření je interakce mezi stanovovaným analytem a monochromatickým zářením. Část záření je absorbována stanovovanou látkou a zbývající záření je detekováno detektorem. Množství absorbovaného záření je přímo úměrné množství analyzované látky (Sims et Gamon, 2002). Všechny zmíněné metody jsou popsány a jsou uvedeny jejich výhody a nevýhody. Já se budu zabývat hlavně metodou DMSO.

#### **4.1 Metoda DMSO**

Pro extrakci chlorofylu v rostlinných materiálech se používají organická rozpouštědla. Může to být aceton (Netto a kol. 2005), dimethyl sulfoxid (DMSO); (Hiscox & Israelstam, 1979), methanol, dimethyl formamid (DMF). V průběhu

extrakce a ředění může dojít k pigmentovým ztrátám a to vede k vysoké variabilitě ve výsledcích (Netto a kol. 2005).

Z těchto extraktů jsem použila DMSO, toto rozpouštědlo má oproti jiným dvě hlavní výhody. První výhodou je, že tento způsob je rychlejší, protože u ostatních se musí provádět ještě broušení a odstředění a to tato metoda nevyžaduje (Chang a kol. 1998). Druhou výhodou je, že extrakty chlorofylu jsou v DMSO stabilnější a nelámou se tak, jako v acetonu (Richardson a kol. 2002). Tato metoda má ale i své nevýhody. DMSO je nebezpečná látka a proto se před manipulací s ní musí používat nitrilové rukavice, laboratorní plášť a bezpečnostní brýle. Všechny práce s touto látkou se musí vykonávat pod digestoří, protože DMSO je dráždivý při vdechování. Je to zároveň hořlavá látka a proto by neměla být používána v blízkosti jakéhokoliv zdroje vznícení a musí být uložena od oxidačních činidel (Makeen a kol. 2007).

## **5. MATERIÁL A METODIKA**

Koncem června 2012 jsem v Hutích u Bechyně v jižních Čechách sesbírala vzorky čtyř koexistujících druhů mokřadních olšin *Carex elongata*, L., *Carex elata*, All., *Deschampsia cespitosa*, L. a *Calamagrostis canestens*, W. V době experimentu jsem stimulovala suchý a vlhký vodní režim v experimentálních nádobách. Nasbírala jsem dvě stě čtyřicet vzorků listového materiálu, který jsem uložila do igelitových sáčků. Tento materiál byl odvezen do laboratoře ČZU v Kostelci nad Černými Lesy, kde byl pokus uskutečněn dle metodiky na měření obsahu chlorofylu pomocí DMSO (dimethyl sulfoxid) – Hiscox & Israelstanem (1979).

Metoda DMSO je velmi jednoduchá a účinná a zde je její postup: z dvě stě čtyřiceti rostlin jsem odebrala listový materiál o velikosti 1,5 x 1,5 cm listu. K extrakci jsem předebrala 0,02 g listového materiálu v 7 ml DMSO (dimethyl sulfoxid). Skleněné centrifugační zkumavky byly inkubovány při 65 °C v peci po dobu 30 minut. Po 30 minutách jsem vzorky vyndala z pece a do každé zkumavky jsem doplnila Pasterovou pipetou do objemu 10 ml DMSO. Ve zkumavkách jsem odpipetovala 3 ml extraktu do jednorázových polystyrénových kyvet a každá kyveta se vzorkem byla důkladně promíchána. Spektrofotometrickou analýzu jsem provedla na přístroji Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Německo), který jsem nechala zahřát na 20 až 30 minut před použitím. Přístroj jsem kalibrovala na nulovou absorbanci pomocí prázdného čistého DMSO. Spektrální šířka pásma je 10 nm. Obsah chlorofylu jsem měřila při absorpcích 645 a 663 nm. Doba mezi extrakcí a spektrofotometrickým měřením by neměla být delší než 20 minut, aby nedošlo ke ztrátě chlorofylových pigmentů.

Naměřená data jsem zpracovala v programu Microsoft Excel a následně statisticky zpracovala v softwarovém programu R a vynesla do grafů.

Pro výpočet množství chlorofylu existuje celá řada různých rovnic. Rovnice Arnon (1949) pro výpočet chlorofylu vytěženého v 90 % acetonu je v podstatě totožná s extrahovaným chlorofylem v DMSO dle Hiscoxa & Israelstam (1979). Rovnice je následující:

$$\text{Ch } a \text{ (g l}^{-1}\text{)} = 0,0127 A_{663} - 0,00269 A_{645}$$

$$\text{Ch } b \text{ (g l}^{-1}\text{)} = 0,0229 A_{645} - 0,00468 A_{663}$$

$$\text{Celkový Ch (g l}^{-1}\text{)} = 0,0202 A_{645} + 0,00802 A_{663}$$

Koncentrace chlorofylového extraktu, kterou vypočítáme z těchto rovnic, se převedou na obsah leaf Chl (mg Ch cm<sup>-2</sup> listové plochy); (Richardson a kol. 2002).

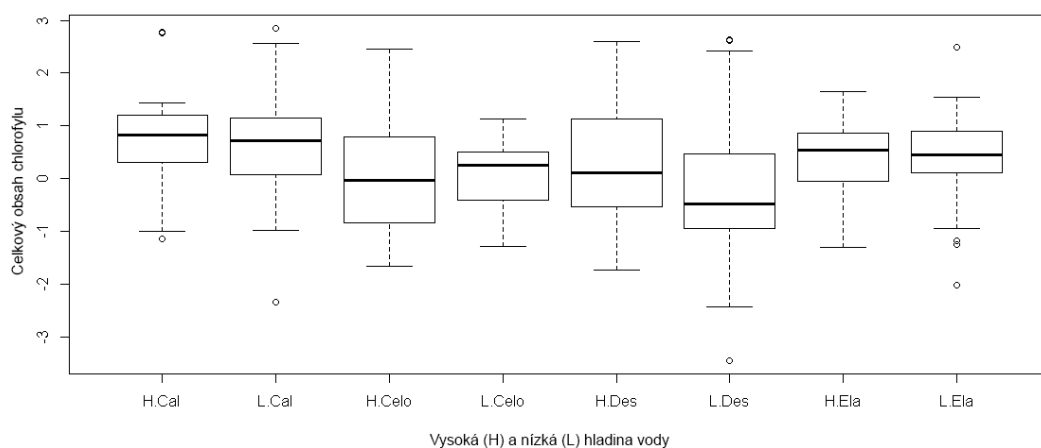
## 6. VÝSLEDKY

Z každého extrahovaného vzorku byl spektrofotometrem Spekol 11 naměřen obsah chlorofylového pigmentu a naměřené hodnoty celkového chlorofylu u *Calamagrostis canestens*, W., *Carex elongata* L., *Deschamsia cespitosa*, L. a *Carex elata*, All. při vlhkém a suchém režimu. Hodnoty byly zaznamenány a zpracovány v programu Microsoft Excel a dále zpracovány v softwarovém programu R (tab. č. 1). Tímto způsobem bylo provedeno měření pro každý vzorek při absorpci 645 a 663 nm.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
hladina	1	0,38	0,3796	0,355	0,552
Residuals	238	254,6	1,0697		

Tab. č. 1: Obsahy chlorofylu na vysoké (H) a nízké (L) hladině vody u *Calamagrostis canestens*, W. (Cal), *Carex elongata* L. (Celo), *Deschamsia cespitosa*, L. (Des), *Carex elata*, All. (Ela).

Tyto naměřené hodnoty celkového chlorofylu v průměru ukazují hodnotu 0,38 a rozdíly mezi jednotlivými druhy vychází na vysoké (H) a nízké (L) hladině vody. Dá se říci, že z velké části druhy na vodní stres nereagují (obr. č. 10).



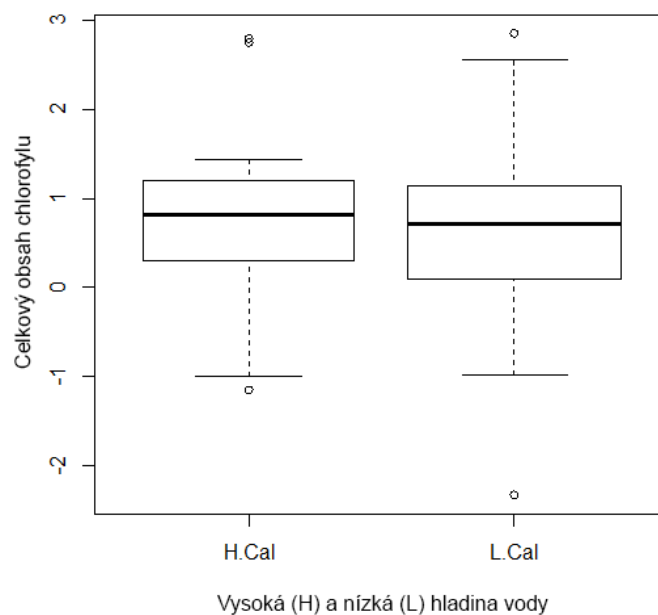
Obr. č. 10: Analýza výsledků pro *Calamagrostis canescens*, W. (Cal), *Carex elongata* L. (Celo), *Deschamsia cespitosa*, L. (Des), *Carex elata*, All. (Ela). Na ose y je vynesena celkový obsah chlorofylu a na ose x vysoká (H) a nízká (L) hladina vody.

Dále jsem provedla zpracování v softwarovém programu R pro každou mokřadní rostlinu zvlášť. Výsledek nám ukazuje tabulka č. 2 pro *Calamagrostis canescens*, W., kde rozdíl mezi nízkou (L) a vysokou (H) hladinou vody v celkovém obsahu chlorofylu je 0,17.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
hladina	1	0,17	0,1697	0,192	0,663
Residuals	58	51,15	0,8819		

Tab. č. 2: Obsah celkového chlorofylu na vysoké (H) a nízké (L) hladině vody u třtiny šedavé *Calamagrostis canescens*, W. (Cal).

Z grafu na obrázku č. 11 je patrné, že statisticky významné rozdíly mezi vysokou (H) a nízkou (L) hladinou vody v celkovém obsahu chlorofylu není výrazný.



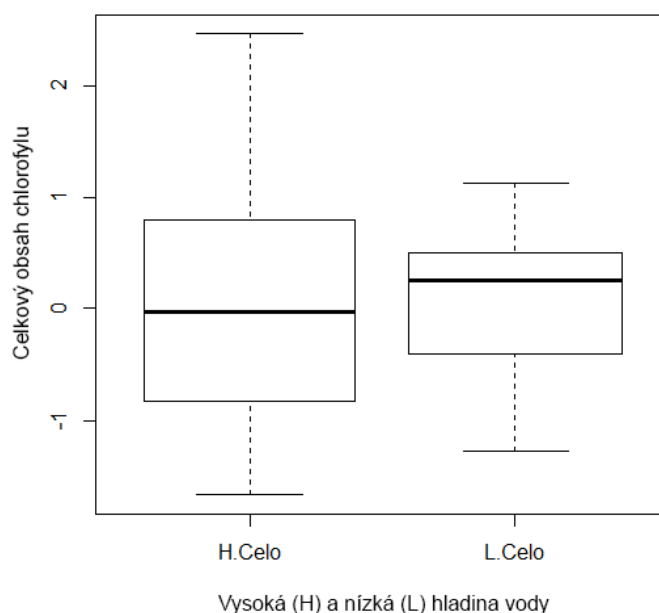
Obr. č. 11: Analýza výsledků pro *Calamagrostis canescens*, W. (Cal), kde na ose y je vynesena celkový obsah chlorofylu a na ose x vysoká (H) a nízká (L) hladina vody.

V tabulce č. 3 pro *Carex elongata*, L. (Celo) je rozdíl mezi vysokou (H) a nízkou (L) hladinou vody pro celkový obsah chlorofylu 0,31.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
hladina	1	0,31	0,3109	0,428	0,515
Residuals	58	42,1	0,7258		

Tab. č. 3: Obsah celkového chlorofylu na vysoké (H) a nízké (L) hladině vody pro *Carex elongata*, L. (Celo).

Stejně jako u *Calamagrostis canescens*, W. (Cal) je z grafu na obrázku č. 12 zřejmé, že mezi vysokou (H) a nízkou (L) hladinou vody v obsahu celkového chlorofylu výrazný rozdíl není.



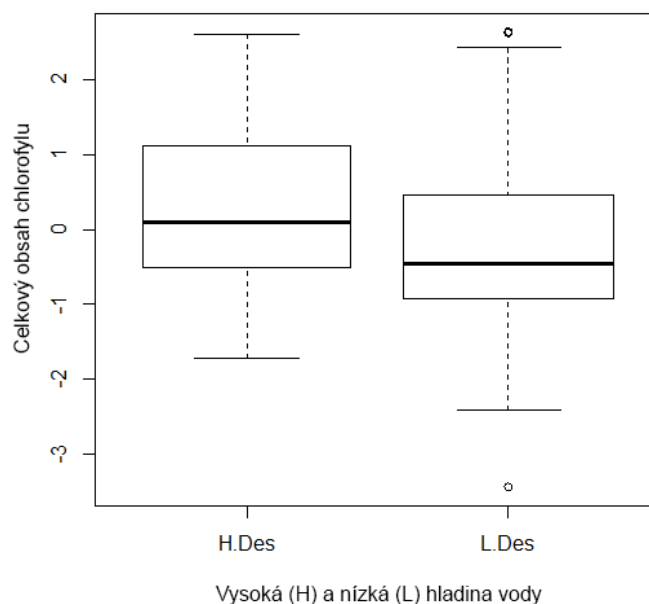
Obr. č. 12: Graf pro analýzu výsledků pro *Carex elongata*, L. (Celo), kde na ose y je vyneseno celkový obsah chlorofylu a na ose x vysoká (H) a nízká (L) hladina vody.

Ze všech stanovených výsledků vyplývá, že nejnižší obsah chlorofylu má *Deschampsia cespitosa*, L. (Des) a z naměřeného obsahu chlorofylu při vysoké (H) a nízké (L) hladině vody vykazuje v rostlinném extraktu v DMSO hodnotu 2,21 (tab. č. 4).

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
hladina	1	2,21	2,208	1,31	0,257
Residuals	58	97,75	1,685		

Tab. č. 4: Obsah celkového chlorofylu na vysoké (H) a nízké (L) hladině vody pro *Deschampsia cespitosa*, L. (Des).

Z grafu na obrázku č. 13 je tento rozdíl mezi vysokou (H) a nízkou (L) hladinou vody vidět nejvýrazněji a zdá se, že je nejmíň na vodní stres náchylná.



Obr. č. 13: Graf pro analýzu výsledků pro *Deschamsia cespitosa*, L. (Des), kde na ose y je vynesena celkový obsah chlorofylu a na ose x vysoká (H) a nízká (L) hladina vody.

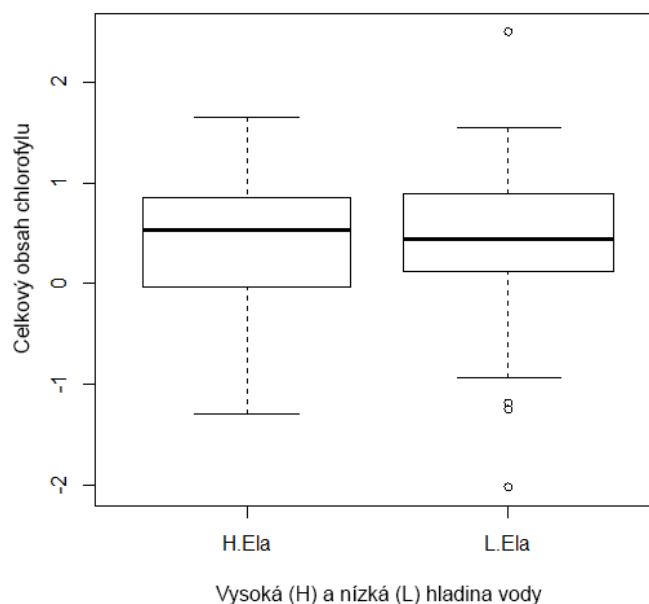
Nejmenší rozdíl ze všech vybraných mokřadních rostlin na celkový obsah chlorofylu má *Carex elata*, All., což naznačuje tabulka č. 5 a uvádí hodnotu 0,01.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
hladina	1	0,01	0,0117	0,016	0,901
Residuals	58	43,33	0,7471		

Tab. č. 5: Obsah celkového chlorofylu na vysoké (H) a nízké (L) hladině vody pro *Carex elata*, All. (Ela).

Je to patrné i na přiloženém grafu na obrázku č. 14, kde hladina vysoké (H) a nízké (L) hladiny vody vykazuje nepatrný rozdíl a proto se *Carex elata*, All. (Ela) zdá být vlhkomilnější než ostatní pozorované mokřadní rostliny.





Obr. č. 14: Graf pro analýzu výsledků pro *Carex elata*, All. (Ela), kde na ose y je vyneseno celkový obsah chlorofylu a na ose x vysoká (H) a nízká (L) hladina vody.

## 7. DISKUZE

Cílem práce bylo zjistit, zda se liší rostlinné druhy mokřadního společenstva mírou tolerance vůči vodnímu stresu. Stres byl navozen stimulací suchého a vlhkého vodního režimu v experimentálních nádobách u dvě stě čtyřiceti rostlin. Hodnoty na měření obsahu chlorofylu byly získány analýzou pomocí DMSO (dimethyl sulfoxid) podle Hiscox & Israelstanem (1979) dle spektrofotometrického měření na přístroji Spekol 11 při vlnových délkách 645 a 663 nm, kterou dále doporučuje Barnes a kol. (1992) a Monje et Bugbee (1992). Rozpouštědlo DMSO (dimethyl sulfoxid) bylo použito k experimentu z několika důvodů. Jedním z těchto důvodů je, že v případě použití jiných rozpouštědel se musí ještě provádět broušení a odstředění, které uvádí Chang a kol. (1998), což by v našem případě vyžadovalo celou řadu časově náročných procesních kroků. Nevyhnutelně by to mohlo vést k experimentální chybě. Druhou výhodou, kterou uvádí Richardson a kol. (2002) je, že extrakty chlorofylu jsou v DMSO stabilnější a nelámu se tak, jako v acetonu. Dalším důvodem, který uvádí Netto a kol. (2005) je použití organických rozpouštědel, protože v průběhu extrakce a ředění chlorofylu v rostlinných materiálech by mohlo dojít k pigmentovým ztrátám. Tyto ztráty by mohly vést k vysoké variabilitě ve výsledcích.

Musím zároveň podotknout, že látka DMSO má i své nevýhody. Makeen a kol. (2007) upozorňuje, že při manipulaci s touto látkou se musí používat ochranné pomůcky (nitrilové rukavice, laboratorní plášť a bezpečnostní brýle). Zároveň je tato látka dráždivá při vdechování a proto by se s ní mělo manipulovat pod digestoří.

Z mého experimentu u všech testovaných extraktů je patrné, že obsah chlorofylu při vysoké (H) a nízké (L) hladině vody z velké části potvrdil vzájemnost mezi druhy. Podle vyhodnocených výsledků se jedná o hodnotu 0,38 obsahu celkového chlorofylu, což je zřejmé dle tabulky č. 1 a z grafického porovnání hodnot na obrázku č. 10. Makeen a kol. (2007) ve své studii měřil celkový obsah chlorofylu a podle jeho výsledků je patrné, že jejich hodnoty jsou 2,41. Nicméně mé výsledky ukazují obsah celkového chlorofylu nižší. Z toho vyplývá, že trávy mají nižší obsah chlorofylu, než fazole, které použil Makeen a kol. (2008) ve své studii. Nicméně Gamon a Surfus (1999) také prokázali, že celkový obsah chlorofylu se výrazně liší u jehličnanů a bylin a naznačují, že tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdíly v morfologii a struktuře listů.

Dalo by se říci, že z velké části druhy na vodní stres nereagují a zdají se být plastické. Jen u *Deschampsia cespitosa*, L. (Des) je na grafu na obrázku č. 13 vidět, že rozdíl mezi vysokou (H) a nízkou (L) hladinou vody vykazuje v rostlinném extraktu v DMSO hodnotu 2,21, což je výraznější než u ostatních druhů. Při nízké hladině vody má nejmenší obsah chlorofylu a zdá se, že jí vyhovuje sušší stanoviště, proto není na vodní stres tolik náchylná. Na grafu na obrázku č. 10, kde můžeme pozorovat všechny druhy rostlin má *Carex elata*, All. obsah chlorofylu nejvyšší. Také je patrné, že mezi vysokou (H) a nízkou (L) hladinou vody má rozdíl v obsahu chlorofylu nejmenší, což naznačuje hodnota 0,01 celkového chlorofylu. *Carex elata*, All. se zdá být vlhkomilnější než ostatní pozorované mokřadní rostliny.

Z výše popsaných výsledků jsem došla k závěru, že metoda DMSO (dimethyl sulfoxid) podle Hiscox & Israelstanem (1979) funguje velice dobře, ale s rostlinným materiálem se musí pracovat rychle, aby nedocházelo ke ztrátě pigmentů. Jiné metody mají sice lepší rozlišovací schopnost, ale tyto metody jsou obvykle náročnější.

Na základě výsledků se dá usoudit, že hodnoty celkového obsahu chlorofylu při vysoké (H) a nízké (L) hladině vody jsou nižší než u ostatních porovnávaných studií. V předběžných studiích (Hiscox & Israelstanem, 1979); (Barnes a kol. 1992); (Monje et Bugbee, 1992) bylo zjištěno, že extrakce při 65 °C, byla dokončena během 15 až 20 minut. Tato skutečnost by mohla souviset s tím, že naše laboratorní měření jsem

z počátku v tak krátké době nezvládala, jak jsem předpokládala a tím mohou být mé hodnoty nepatrně zkreslené. Ačkoli metoda DMSO funguje velice dobře, měli bychom eliminovat možnost chyb a v dalším výzkumu pokračovat.

## 8. ZÁVĚR

Informace získané při psaní této bakalářské práce poskytují přehled o vodním stresu u rostlin, a jak se s tímto stresem rostliny vyrovnávají. Práce byla založena na experimentu, který byl uskutečněn v roce 2012. Materiál byl použit ze čtyř mokřadních rostlin (*Calamagrostis canestens*, W., *Carex elongata* L., *Deschampsia cespitosa*, L., *Carex elata*, All.) u nichž byl zjišťován obsah celkového chlorofylu při navození suchého a mokrého režimu za použití extrakční techniky (DMSO). Bylo zjištěno, že obsah chlorofylu se liší mezi druhy a navíc se zdá, že *Deschampsia cespitosa*, L. se také liší mezi suchým a vlhkým režimem. Nejvyšší obsah chlorofylu byl zjištěn u *Carex elata*, All., která se zdá být vlhkomilnější než ostatní pozorované mokřadní rostliny. Také se dá říct, že tato mokřadní rostlina vykazuje nepatrný rozdíl mezi vysokou (L) a nízkou (H) hladinou vody.

Metoda fluorescenčních pigmentů se jeví, jako mocný nástroj, který má stále větší uplatnění v mnoha oborech.

Výsledky této práce budou přínosem k dalšímu výzkumu vodního stresu u rostlin a mohly by tak otevřít možnost k vytváření nových systémů odolných vůči působení extrémního sucha nebo zaplavení, kterým jsou v současné době rostliny vystavovány.

## POUŽITÁ LITERATURA

- AMSTRONG W., 1979: Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research* 7: 225 – 332.
- BARNES J. D., BALAGUER L., MANRIGUE E., ELVIRA S., DAVISON A. W., 1992: A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32: 85 – 100.
- BENEŠOVÁ K., MIKULÍKOVÁ R., BĚLÁKOVÁ S., SVOBODA Z., PSOTA V., 2011: Identifikace látek vznikajících při interakci patogen – obilka a jejich vliv na kvalitu sladu. *Kvasný průmysl* 57: 2 - 7.
- BLACKBURN G. A., 2006: Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *Journal of Experimental Botany* 58: 855 – 867.
- BLÁHA L., BOCKOVÁ R., HNILIČKA F., HNILIČKOVÁ H., HOLUBEC V., MOLLEROVÁ J., ŠTOLCOVÁ J., ZIEGLEROVÁ J., 2003: Rostlina a stres. VÚRV, Praha.
- BOHNET H. J., JENSEN R. G., 1996: Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14: 89 – 97.
- BOYER J. S., 1982: Plant Productivity and Environment. *Science* 218: 443 – 448.
- ČERMÁK P., 2013: Stres a vitalita stromu, online: [https://akela.mendelu.cz/~xcepl/inobio/inovace/Ochrana\\_lesa\\_a\\_drevinne\\_vegetace/ODV-1\\_stres\\_vitalita.pdf](https://akela.mendelu.cz/~xcepl/inobio/inovace/Ochrana_lesa_a_drevinne_vegetace/ODV-1_stres_vitalita.pdf), cit. 20. 6. 2013.
- ČÍŽKOVÁ H. et ŠANTŮČKOVÁ H., 2006: Procesy spojené s eutrofizací mokřadů. *Živa* 5: 201 – 204.
- DAVEY M. W., MONTAGU M. V., INZÉ D., SANMMARTIN M., KANELIS A., SMIRNOFF N., BENZIE I. J. J., STRAIN J. J., FAVELL D., FLETCHER J., 2002: Plant L – ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Food and Agriculture* 80: 825 – 860.
- DOSTÁL J., 1989: *Nová Květena ČSSR 2*. Academia Praha, ISBN 80-200-0095-X.
- DOUDA J., 2008: Formalized classification of the vegetation of alder carr and floodplain forests in the Czech Republic. *Preslia* 80: 199 - 224.

- DREW M. C., 1997: Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation under Hypoxia and Anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 223 – 250.
- DUAN B., YANG Y., LU Y., KORPELAINEN H., BERNINGER F., CHUNYANG L., 2007: Interactions between water deficit, ABA, and provenances in *Picea asperata*. *Journal of Experimental Botany* 58: 3025 – 3036.
- FIŠAR Z., 2003: Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. *Psychiatrická klinika* 1. lékařská fakulta UK, Praha 2.
- FLOROMATICS SOFTWARE, 2013: Kaucký effect, online: [http://www.fluoromatics.com/kautsky\\_effect.php](http://www.fluoromatics.com/kautsky_effect.php), cit. 15. 8. 2013.
- FOOD – INFO, 2013: Chlorophyll, online: <http://www.food-info.net/nl/colour/chlorophyll.htm>, cit. 31. 7. 2013.
- GAMON J. A., et SURFUS J. S., 1999: Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143: 105 – 117.
- CHANG S. T., WANG S. Y., WU J. H., 1998: Rapid extraction of epidermis chlorophyll of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) culm using ultrasonics. *Japan Wood Research Society* 44: 78 – 80.
- HALL D. O., SCURLOCK J. M. O., BOLHAR-NORDENKAMPF H. R., LEEGOOT R. C., LONG S. P., 1993: *Photosynthesis and production in a changing Environment: a field and laboratory manual*. Springer Science + Business Media Dordrecht.
- HEJNÁK V., 2005: *Fyziologie rostlin*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- HIRT H., SHINOZAKI K., 2004: *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer – Verlag Berlin Heidelberg.
- HISCOX J. D., ISRAELSTAM G. F., 1979: A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without meceration. *Canadian Journal of Botany* 57: 1332 – 1334.
- HROUDA L., 2010a: Trávy a jejich příbuzní napříč biotopy, V. Ostřice: synonymum chladu a vlhka. *Živa* 5: 212 – 215.
- HROUDA L., 2010b: Trávy a jejich příbuzní napříč biotopy, VI. Ostřice jinde: na suchu, v lese i na horách. *Živa* 6: 261 – 264.
- CHYTRÝ M., 2011: *Vegetace České republiky 3 – Vodní a mokřadní vegetace*. Academia Praha.

- JACKSON MB et ARMSTRONG W., 1999: Formation of Aerenchyma and the Processes of Plant Ventilation in Relation to Soil Flooding and Submergence. *Plant Biology* 1: 274 – 287.
- JÍROVÁ A., 2007: *Carex elongata* L. – ostřice prodloužená/ostrica predlžená, Botany, online: <http://botany.cz/cs/carex-elongata/>, cit. 22. 5. 2013.
- KINCL L., KINCL M., JARKLOVÁ J., 2006: *Biologie rostlin*. Nakladatelství Fortuna.
- KINCL M., 1978: *Základy fyziologie rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, n. p. Praha.
- KINCL M. et FAUST L., 1977: *Základy fyziologie rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, n. p., v Praze.
- KOZLOVÁ Z., 2010: *Biologie eukaryotické buňky a její orgány*. Příroda nejen očima, online: <http://prirodanejenocima.blogger.cz/Prirodni-vedy/Biologie-eukaryoticke-bunky-a-jeji-organy>, cit. 20. 6. 2013.
- KRAJNÍK B., 1962: *Obecná biologie – díl II*. Státní zdravotnické nakladatelství, n. p., Praha 1.
- KRIEGER – LISZKAY, 2004: Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56: 337 – 346.
- KUBÁT K., KALINA T., KOVÁČ J., KUBÁTOVÁ D., PRACH K., URBAN Z., 1998: *Botanika*. Scientia, spol. s.r.o., pedagogické nakladatelství Praha.
- KUBÁT K., 2003: *Klíč ke květeně České republiky*. Akademie věd České republiky.
- LAKOWICZ J. R., 2010: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, USA.
- LERCHER W., 1988: *Fyziologická ekologie rostlin*. Academia, nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- LICHTENTHALER H. K., 1996: Vegetation Stress: an Inroduction to the Stress Concept in plants. *Journal of Plant Physiology* 148: 4 – 14.
- MAKEEN K., BABU G. S., LAVANYA G. R., ABRAHAM G. 2007: Studies of Chlorophyll Content by Different Methods in Black Gram (*Vigna mungo* L.). *International Journal of Agricultural Research* 2: 651 – 654.
- MARSCHNER H., 1995: *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London: Second edition. p. 626 – 641.
- MAXWELL K., JOHNSON G., N., 2000: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 345: 659 – 668.

- MEGAFLEX, 2013: Zelené a UV lasery, online: <http://www.mega-blog.cz/lasery/zelene-a-uv-lasery/>, cit. 26. 8. 2013.
- MOHAMMED G. H., BINDER W. D., GILLIES S. L., 1995: Chlorophyll fluorescence: A review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scandinavian Journal of Forest Research* 4: 383 – 410.
- MONJE O. A., BUGBEE B., 1992: Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *Hortsciense* 27: 69 – 71.
- NETTO A. T., COMPOSTRINI E., ALVES DE OLIVEIRA G., SMITH R., E., B., 2005: Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD – 502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae* 104: 199 – 209.
- NOVÁK J. et PELIKÁN J., 2011: Vliv abiotických stresorů na vlastnosti rostlin 2011. Výzkumný ústav rostlinné výroby v. v. i., Praha – Ruzyně.
- OPATRNÁ M. et SOUČKOVÁ M., 2003: Pěstujeme okrasné trávy. Brázda, s.r.o., Praha.
- OXBOROUGH K., 2004: Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* 55: 1195 – 1205.
- PAPAGEORGIOU G. C., 2004: Chlorophyll a fluorescence: A Signature of Photosynthesis. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht.
- PAREEK A., SOPORY S., BOHNERT H. J., GOVINDJEE, 2010: *Abiotic Stress Adaptation in Plants*. Springer Netherlands.
- PAVLOVÁ L., 2005: *Fyziologie rostlin*. Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum.
- PRÁŠIL O., 2003: Fluorescence chlorofylu jako metoda studia fotosyntézy a diagnostiky porostu. *Živa* 6: 249 – 252.
- PROCHÁZKA S. a kolektiv, 1994: *Morfologie a fyziologie rostlin*. Vysoká škola zemědělská v Brně.
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J., 1998: *Fyziologie rostlin*. Akademie věd České republiky.

- RICHARDSON A. D., DUGAN S. P., BERLYN G. P., 2002: An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist* 153: 185 – 194.
- ROHÁČEK K., 2011a: Fotofyzikální děje během fotosyntetické přeměny zářivé energie na biochemicky využitelnou formu. Ústav fyzikální biologie JU, AV ČR, 14 stran.
- ROHÁČEK K., 2011b: Indukce fluorescence chlorofylu in vivo v průběhu primární fotosyntézy u vyšších rostlin. České Budějovice. 10 stran.
- ROHÁČEK K., 2011c: Indukce fluorescence chlorofylu in vivo v průběhu primární fotosyntézy u vyšších rostlin. Biologické centrum AV ČR České Budějovice, online: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescence-chlorofylu.pdf>, cit. 19. 9. 2013.
- ROHÁČEK K. et BARTÁK M., 1999: Technique of the modulated chlorophyll fluorescence – basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339 – 363.
- ROMANOVSKÝ A., ČINČEROVÁ A., ČÍŽEK F., DVOŘÁK P., KAPRÁLEK F., KUBIŠTA V., NEDVÍDEK J., OPATRŇÝ Z., PAZOUREK J., PIKÁLEK P., SEIFERT J., SLAVÍKOVÁ Z., VÁŇA J., ZÁVADA V., 1985: *Obecná biologie*. Státní pedagogické nakladatelství, n. p., v Praze.
- ROSYPAL S., 1987: *Přehled biologie*. Státní pedagogické nakladatelství Praha.
- SALAŠ P., Studie fotosyntetické odezvy *Acer Campestre* pěstovaného na aridním stanovišti.
- SCHAUER T., 2007: *Svět rostlin*. Rebo Productions CZ, spol. s.r.o.
- SCHREIBER U., SCHLIWA U., BILGER W., 1986: Continuous Recording of Photochemical and Non – photochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching with a New Type of Modulation Fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51 – 62.
- SIMS D. A. et GAMON J. A., 2002: Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81: 337 – 354.
- SLAVÍKOVÁ J., 1986: *Ekologie rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství Praha.
- SOUKUPOVÁ J. et ROHÁČEK K., 2003: Fluorescence, fotosyntéza a stres: Jak to spolu souvisí. Ústav fyzikální biologie JU, AV ČR, 14 stran.



- ŠETLÍK I., SEIDLOVÁ F., ŠANTRŮČEK J., 2004: Fyziologie rostlin (online). Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (9. 3. 2013) <http://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html>
- ŠPULÁK O. et MARTINCOVÁ J., 2006: Hodnocení změn fluorescence chlorofylu smrku ztepilého na počátku jarní růstové aktivity. VÚLHM VS Opočno, 425 – 429.
- ŠŤASTNÝ V., 2011: Pozoruhodný Sedmihorský mokřad, Ochrana přírody 5: 7 – 9.
- TEAKLE NL., FLOWERS TJ., SKUTEČNÝ D., COLMER TD., 2007: Lotus tenius tolerates interactive effects of salinity and waterlogging by excluding Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> from the xylem. Journal of Experimental Botany 58: 2169 - 2180.
- TYLOVÁ E. et SOUKUP A., 2010: Sborník z konference katedry rostlinné výroby ČZU v Praze - Prosperující olejiny 2010. ČZU v Praze.
- VISSER E. J. W., VOESENEK L. A. C. J., VARTAPETIAN B. B., JACKSON NM. B., 2003: Flooding and Plant Growth. Annals of Botany 91: 107 – 109.
- VOTRUBOVÁ O., SOUKUP A., 1999: Proč mohou mokřadní rostliny žít v zaplavené půdě. Živa 1: 12 - 15.
- WIKIPEDIE, 2013: Chlorofyl, online: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorofyl>, cit. 31. 7. 2013.
- YAMAUCHI T., WATANABE K., FUKAZAWA A., MORI H., ABE F., KAWAGUCHI K., OYANAGI A., NAKAZONO M., 2014: Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen – deficient conditions. Journal of Experimental Botany 65: 261 - 273.
- YANG S., ZENG X., LI T., LIU M., ZHANG S., GAO S., WANG Y., PENG CH., LI L., YANG CH., 2012: AtACD1, and ABC1 – like kinase gene, is involved in chlorophyll degradation and the response to photooxidative stress in Arabidopsi. Journal of Experimental Botany 63: 3959 – 3973.