



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Zhášení fluorescence chlorofylu**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Jan Soukop</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Barbora Arnoštová</b>
Termín odevzdání práce:	1. 8. 2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jan Soukop
Název práce	Zhášení fluorescence chlorofylu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Barbora Arnoštová
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Analýza fluorescence chlorofylu je jedna z nejrozšířenějších technik pro studium vlivu stresorů na rostlinné, fotosynteticky aktivní organismy, zejména pro využití světelné energie k fotosyntéze a funkčnost elektronového transportního řetězce ve fotosyntéze. Cílem práce je detekce vlivu vybraných chemických látek na difuzní odrazivost a propustnost v listu tabáku virginského *Nicotiana Tabacum cv. Samsun*. Ze získaných dat jsou poté simulována spektra absorpčního a rozptylového koeficientu. Práce obsahuje teoretickou část, která se zabývá optickými vlastnostmi vzorků, fluorescencí, fluorescencí chlorofylu a způsoby měření fluorescence. Dále jsou v teoretické části informace o vybraných chemických látkách a jejich využití v praxi. Praktická část obsahuje popis metody využití pro měření difuzní odrazivosti a propustnosti pomocí spektrodiodometru LI-1800 s integrační koulí, přípravu roztoků vybraných chemických látek a popis infiltrace listu metodou šokové infiltrace. K vypočítání absorpčního a rozptylového koeficientu byla využita raytracingová metoda Monte Carlo photon transport. Výsledky ukazují, že roztoky vybraných chemických látek mají vliv na fluorescenci chlorofylu, některé však pouze nepatrný.

Klíčová slova	Chinony, DCMU, fluorescence chlorofylu, difuzní odrazivost, difuzní propustnost
Počet stran	48
Počet příloh	-
Jazyk	Český (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jan Soukop
Title of thesis	Quenching of chlorophyll fluorescence
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Barbora Arnoštová
The year of presentation	2019

### Abstract

Chlorophyll fluorescence analysis is one of most widely used techniques used for studying the influence of stressors on photosynthetically active organisms, especially for the usage of light energy on photosynthesis and the functionality of the electronic transport chain in photosynthesis. This work is focused on detecting the influence of selected chemicals on diffuse reflectance and transmittance in tobacco leaf *Nicotiana Tabacum cv. Samsun*. The spectra of absorption and scattering coefficients are simulated from the obtained data. This thesis contains a theoretical part which include optical properties of samples, fluorescence, chlorophyll fluorescence and methods of fluorescence measurements. Furthermore, in the theoretical part, there is information about selected chemical substances and their practical usage. The practical part contains a description of the method used for the measurement of diffuse reflectance and transmittance using spectroradiometer LI-1800 with the integrating sphere, selected chemicals solutions preparation and a description of the leaf infiltration using the shock infiltration method. The Monte Carlo photon transport is a raytracing method which was used for absorption and scattering coefficients calculation. The results show that solutions of chemicals we used have an effect on the chlorophyll fluorescence, however, some solutions have only insignificant effect.

Keywords	Quinones, DCMU, chlorophyll fluorescence, diffuse reflectance, diffuse transmittance,
Number of pages	48
Number of appendices	-
Language	Czech (English)

### **Prohlášení**

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

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

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

## Seznam zkratk

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

## Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část .....	10
2.1. Spektra odrazivosti a propustnosti .....	10
2.1.1. Reflektance .....	10
2.1.2. Transmittance.....	10
2.1.3. Absorpce .....	11
2.1.4. Lambert-Beerův zákon .....	11
2.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu .....	12
2.3. Fluorescence.....	13
3.1. 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea .....	15
3.2. Zhášení fluorescence .....	16
3.2.1. Zhášeče fluorescence .....	16
3.2.2. 2,6-dichloro-1,4-benzochinon.....	16
3.2.3. 2-hydroxy-1,4-naftachinon .....	17
3.2.4. 2,5-Dimethyl-p-benzochinon .....	18
3.2.5. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin .....	19
4. Experimentální část.....	20
4.1. Použité přístroje .....	20
4.2. Biologický materiál.....	20
4.3. Použité chemikálie .....	21
Pro experimenty byly použity chemikálie uvedené v tabulce č. 2.....	21
4.4. Příprava koncentrační řady ethanolu.....	21
4.5. Měření .....	22
4.5.1. Měření odrazivosti a propustnosti .....	22
4.5.2. Infiltrace listu .....	22
4.5.3. Způsob a postup při měření difuzní odrazivosti a propustnosti.....	23
4.6. Simulace absorpčního a rozptylového koeficientu .....	24
4.7. Vyhodnocení dat .....	24
4.8. Výsledky a diskuze .....	24
4.8.1. Spektra odrazivosti a propustnosti .....	24
4.8.2. Difuzní odrazivost a propustnost koncentrační řady ethanolu.....	25
4.8.3. Difuzní odrazivost a propustnost DCMU .....	26
4.8.4. Difuzní odrazivost a propustnost DMBQ .....	28

4.8.5.	Difuzní odrazivost a odrazivost TMB.....	30
4.8.6.	Difuzní odrazivost a propustnost DCBQ .....	32
4.8.7.	Spektra odrazivosti a propustnosti Lawsonu.....	34
4.9.	Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu.....	36
4.9.1.	Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu koncentrační řady ethanolu.....	36
4.9.2.	Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu DCMU .....	38
4.9.3.	Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu zhášeců .....	40
5.	Závěr .....	44
6.	Seznam použité literatury .....	45



## 1. Úvod

Fluorescence chlorofylu je proces zbavování se přebytečné energie formou vyzáření elektromagnetického záření. Analýzou emitovaných fotonů lze zjistit fyziologický stav rostliny, její vývojové stadium, či stav fotosystému II, který je často prvním indikátorem stresu působícím na studovanou rostlinu.

Fluorescence chlorofylu se mění v závislosti na působení různých stresových faktorů, například nadměrné ozáření, vysoká teplota, působení toxických látek a podobně. Tím rostlina poskytuje informace o zvládnání stresu. Pro tuto práci byly vybrány chemické látky, a to DCBQ, DMBQ, Lawson, TMB a DCMU. O těchto látkách, vyjma DCMU, je známo, že snižují fluorescenci chlorofylu obnovením transportu elektronů ve fotosystému II. O DCMU je naopak znám efekt opačný.

Cílem této práce je zjištění vlivu vybraných chemických látek na změny difuzní odrazivosti a propustnosti a z naměřených spekter difuzní odrazivosti a propustnosti bude proveden výpočet absorpčního a rozptylového koeficientu. Fluorescence chlorofylu se projevuje i ve spektrech odrazivosti a propustnosti, ale změny fluorescence chlorofylu jsou ve spektrech absorpčního a rozptylového koeficientu čitelnější. Pro výpočet koeficientů byla zvolena metoda Monte Carlo photon transport (MCPT), jelikož se domníváme, že tato metoda nejlépe popisuje chování paprsku v listu. Metoda MCPT patří mezi transportní modely, pomocí kterých je simulován pohyb částic, například fotonu, v určitém prostředí. Model MCPT využívá generování sekvencí náhodných drah sledovaných částic.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Spektra odrazivosti a propustnosti

Interakcí elektromagnetického záření s povrchem rostlinného materiálu dochází k několika fyzikálním procesům. Mezi ně patří zejména odrazivost, propustnost, absorpce a rozptyl záření. Tyto jevy závisí na vlnové délce, úhlu dopadajícího záření a na vlastnostech zkoumaného biologického vzorku (Braslavsky, 2006). Protože jsou biologické tkáně a pletiva komplexní a v nativním stavu nehomogenní, musí se brát v úvahu vlastnosti složek vzorku.

#### 2.1.1. Reflektance

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

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

kde  $R$  je reflektance,  $I$  je intenzita odraženého světelného záření a  $I_0$  je světelné záření dopadající na zkoumaný vzorek. Míra reflektance se zvyšuje se snižováním úhlu dopadu záření na povrch vzorku (Braslavsky, 2006). Spektra odrazivosti se například v hojně míře využívají v dálkovém mapování tzv. rysů spektrálního chování vegetace pomocí družicových snímků. Pomocí této metody lze využít několika spektrálních pásem. Za zmínku stojí odrazivost blízké infračervené části spektra (750-1350 nm), díky níž je možné určit rozložení buněk v listech, a tím lze identifikovat druhy rostlin, a odrazivost intervalu 1350-2500 nm, kterou lze mapovat množství vody ve vegetaci (Slaton a kol., 2001).

#### 2.1.2. Transmittance

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

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

kde  $T$  je propustnost,  $I$  intenzita světla, které prostoupilo vzorkem, a  $I_0$  je intenzita světla ze zdroje (Braslavsky, 2006).

V praxi se transmittance měří relativně vůči referenčnímu vzorku (blanku). V prvním kroku se měří intenzita blanku a následně se při stejných podmínkách měří intenzita zkoumané látky. Při vyhodnocování transmittance tímto způsobem lze zanedbat nespecifické

ztráty intenzity světla. Intenzita blanku je v rovnici (2) vždy rovna 100 % a propustnost vzorku se zkoumanou látkou je vždy nižší jak 100 % (Volka a kol. 2006). V praxi je propustnost společně s odrazivostí používána při dálkovém snímání dat k neinvazivnímu zjištění stavu vegetace (Hovi a kol., 2017). Propustnost lze využívat ke studiu pohybu chloroplastů metodou kolimované transmitance. Pohyb chloroplastů je důležitý k optimalizaci fotosyntézy, zejména pro přežití silné expozice světlu a efektivní funkci fotosyntézy při nedostatku světla (Wada, 2013).

### 2.1.3. Absorpce

Absorpce (pohltivost,  $A$ ) je obecně definována na základě transmitance jako její záporný dekadický logaritmus (3),

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

pro měření absorpce listu však ale využíváme rovnici (4), ve které jsou využita experimentální data. (Jacquemoud a Ustin, 2008).

$$A = 1 - R - T \quad (4)$$

Je to schopnost látky pohltit proud fotonů, kde dochází k přechodům valenčních elektronů mezi dvěma energetickými úrovněmi. Takovou energii může excitovaná látka buď uvolnit formou emise záření či disipaci na tepelnou energii. Míra absorpce je vyjadřována extinkčním koeficientem, jenž je veličinou nutnou pro výpočet Lambert-Beerova zákona (Braslavsky, 2006).

### 2.1.4. Lambert-Beerův zákon

Lambert-Beerův zákon je vyjádření závislosti absorpce záření na vlastnostech daného materiálu, přes který tok elektromagnetického záření prochází. Matematický zápis zákona zní (5),

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda bc \quad (5)$$

kde  $A_\lambda$  je absorpce materiálu při dané vlnové délce,  $\varepsilon_\lambda$  extinkční koeficient látky při dané vlnové délce  $\lambda$  ( $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ),  $b$  je tloušťka absorpční vrstvy (cm) a  $c$  je molární koncentrace absorbující látky ( $\text{mol l}^{-1}$ ) (Volka a kol., 2006). K tomuto vyjádření empiricky došel Pierre Bouguer roku 1729, nezávisle na něm pak Johann Heinrich Lambert v roce 1760 a August Beer v roce 1852 (McNaught a Wilkinson, 1997). Tento zákon je však platný pouze pro velmi zředěné vzorky. Pro nehomogenní vzorky, jako je například list tabáku, je vhodný

model Simple Explicitly Nonlinear Empirical model for Leaf Optical Properties (SENLE-LOP), který je odvozený od Lambert-Beerova zákona a byl publikován v článku Analysis of the effect of chloroplast arrangement on optical properties of green tobacco leaves (Baránková a kol., 2015), nebo model odvozený z Kubelka-Munkovy teorie (Kubelka a Munk, 1931). Předpokládá se, že vzorek je tvořen jednou vrstvou, jehož absorpční ( $k$ ) a rozptylová ( $s$ ) centra jsou homogenně distribuována a tloušťkou ( $d$ ) (Jacquemoud a Ustin, 2008).

## 2.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu

Chemické látky jsou schopny interagovat s elektromagnetickým zářením. Mezi optické charakteristiky zkoumaného vzorku patří absorpční a rozptylový koeficient, odvozený z difuzní odrazivosti a propustnosti. Absorpční koeficient ( $k$ ) udává množství absorbovaného záření a rozptylový koeficient ( $s$ ) udává, jaká část záření byla ve vzorku rozptýlena. (Wang a kol. 1995). Pomocí těchto koeficientů lze zjistit vlastnosti vzorků pevných látek, konkrétně pomocí absorpčního koeficientu lze zjistit složení zkoumaného materiálu, pomocí rozptylového koeficientu lze určit jeho strukturu (Birth a kol. 1978). Měření absorpčního a rozptylového koeficientu nachází uplatnění v mnoha odvětvích, zejména se však jedná o biomedicínské zobrazovací metody, jako je tomografie (Wang a kol. 1995).

K výpočtu absorpčního a rozptylového koeficientu existuje celá řada modelů. Pro praktickou část této bakalářské práce byl zvolen model Monte Carlo photon transport. Tato metoda patří mezi nejmodernější postupy při zkoumání rostlinných pletiv a živočišných tkání, a byla zvolena z toho důvodu, že podle našeho mínění nejlépe popisuje chování paprsku v listu rostliny.

### 2.2.1. Monte Carlo photon transport model

Model Monte Carlo photon transport (MCPT) byl poprvé představen v čtyřicátých letech dvacátého století jako prostředek určený pro simulaci fyzikálních dějů. Metoda byla pojmenována Stanislawem Ulamem a Johnem von Neumannem. Tito vědci studovali chování neutronů ve vědeckém centru v Los Alamos. Model stojí na algoritmu simulujícím náhodné pokusy s vysokým množstvím opakování. Tímto procesem je statisticky získána pravděpodobnost výsledku (Wang a kol., 1995).

MCPT statisticky přistupuje ke studiu diferenciálních nebo integrodiferenciálních rovnic v přírodních vědách (Metropolis a Ulam 1949). Metoda je nejčastěji využívána ve statistické termodynamice a v atomové fyzice. MCPT je metodou, která se začala využívat

pro simulaci optických vlastností pro různé typy materiálů ve druhé polovině minulého století (Allen a kol., 1973). Nejrozšířenější použití MCPT je v biomedicínských aplikacích, kdy se používá pro diagnostické i terapeutické účely laserů a jiných optických zdrojů. Pomocí MCPT lze například simulovat difúzní odrazivost optických vlastností tkání pro porovnání zdravé a rakovinou napadené tkáně (Wang a kol., 1995). V neposlední řadě se metoda také začala používat pro studium rostlinných vzorků.

V námi použitém MCPT modelu (Sušila a Nauš, 2007), při každé jednotlivé simulaci, do zkoumaného vzorku vstupuje paket fotonů, který interaguje s částicemi, ze kterých se vzorek skládá. Tím může dojít ke ztrátě energie fotonového paketu, rozptylu do okolí, či k produkci sekundární částice. Algoritmus pro simulaci pomocí metody MCPT se obecně skládá z několika kroků. Prvním je vložení parametrů pro emisi primární částice, tj. určení počáteční váhy, polohy a směru proudu fotonového paketu. V simulaci pak dochází k úbytku váhy, až k zániku fotonového paketu (Sušila a Nauš, 2007). Zkoumaný vzorek je v simulaci Monte Carlo uvažován jako jedna homogenní vrstva o tloušťce  $d$ , indexem lomu  $\eta$ , absorpčním ( $k$ ) a rozptylovým ( $s$ ) koeficientem a faktorem anizotropie  $g$ . Ve vzorku jsou homogenně rozložena interakční centra, se kterými fotony interagují, čímž dochází k absorpci či rozptylu fotonového paketu. Absorpční a rozptylový koeficient rozumíme jako počet interakčních center na jednotku dráhy. Pro  $k$  a  $s$  koeficienty se užívají jednotky ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Sušila a Nauš, 2007).

### 2.3. Fluorescence

Fluorescence je ve své podstatě elektronický jev, kdy chemická látka pohltí elektromagnetické záření o určité vlnové délce, zejména v intervalu vlnových délek 200–800 nm, následně část nashromážděné energie uvolní do okolí v podobě emisního záření, které má zpravidla delší vlnovou délku oproti záření excitačnímu. Látka schopna fluorescence je schopna vstoupit do excitovaného stavu, následně se bezprostředně po excitaci, v době kratší  $10^{-8}$  vteřin, navrací do svého základního stavu za uvolnění fotonu. (Williams a kol., 1964; Fišar, 2009).

Při měření fluorescence se využívají zejména tyto dva typy zařízení, a to filtrační fluorometry a spektrofluorometry. Filtrační fluorometr se skládá z excitačního zdroje světla (lampy, výbojky, lasery aj.), polarizačních filtrů, cely pro vzorek a z detektoru. Fluorescence je tak měřena pomocí emitovaného záření dopadajícího na detektor přes filtr. Filtrační fluorometr je vhodný pro kvantitativní měření (Lakowicz, 2006).

Spektrofluorometry využívají místo polarizačních filtrů monochromátory, pomocí kterých je eliminováno záření o nežádoucích vlnových délkách. Monochromátor se skládá

z optické mřížky či hranolu, jehož pomocí lze světlo rozložit do spektra o jednotlivých vlnových délkách. Štěrbínou, která má obvykle nastavitelnou šířku, lze pak vybrat požadovaný interval vlnových délek. Spektrofluorometry jsou obvykle poskládány tak, aby se hodnota fluorescenčního záření emitovaného ze vzorku měřila kolmo ke směru záření excitačního. Důvodem je minimalizování vlivu pozadí na měření. (Lakowicz, 2006).

#### **2.4. Fluorescence chlorofylu**

Chlorofyl a (Chl a) je klíčová fotosynteticky aktivní molekula, která se nachází ve všech fotosyntetizujících organismech a je chromoforem reakčních center. Fluorescence chloroplastu je jev způsobený zejména molekulou chlorofylu a, který byl vystaven excitaci světlem viditelného spektra nebo UV zářením. Asi 90 % fluorescence chloroplastů emituje tato molekula z fotosystému II. Fluorescence chlorofylu a spotřebovává průměrně 2-5 % z celkové získané energie (Maxwell a Johnson, 1999).

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

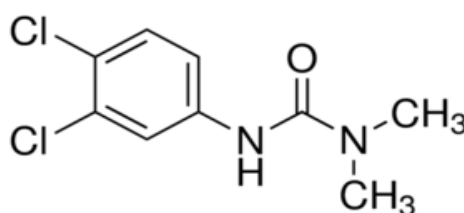
Většina energie získané dopadem záření je užitečně využita fotochemickými procesy, přenosem protonů a elektronů z vody na NADP<sup>+</sup> (za vzniku NADPH) a fosforylace ADP na ATP, látky, které jsou nutné k fixaci vzdušného oxidu uhličitého do molekuly sacharosu pomocí enzymů Calvinova cyklu (Roháček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

Metoda měření fluorescence chlorofylu se v uplynulých letech stala nástrojem zejména při studiu ekofyziologie rostlin. Zvýšením nebo snížením naměřených hodnot fluorescence chlorofylu lze zjistit fyziologický stav rostliny, funkci fotosyntézy, či úroveň fyzického či chemického stresu, jemuž jsou studované rostliny vystavovány. Zároveň lze pomocí této techniky studovat děje probíhající na thylakoidních membránách ve fotosystémech I a II, jako jsou například mechanismy ovlivňující elektronový transport (Maxwell a Johnson, 1999).

### 3. Látky ovlivňující fluorescenci

#### 3.1. 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea

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



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

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

DCMU je v praxi užíván jako neselektivní pesticid, ve výzkumu jej nalezneme jako nástroj pro studování elektronového transportu, fluorescence, či přenosu energie v chloroplastech. Hlavním důvodem, proč se v praxi využívá jako herbicid, je jeho schopnost inhibovat necyklický přenos elektronů z chinonu A ( $Q_A$ ) na chinon B ( $Q_B$ ), čímž znemožňuje transport elektronů z  $Q_A^-$  dál. DCMU soutěží s, pro rostlinu přirozeným, plastochinonem (PQ) o vazné místo na proteinu D1, v takzvané  $Q_B$  kapse, což zapříčiňuje neschopnost přenosu elektronů z  $Q_A$  na PQ. Jakmile DCMU zamezí PQ navázat se do  $Q_B$  kapsy, dojde k tomu, že  $Q_A$  začne přenášet elektrony zpět na chlorofylový pár P680, a tím zamezuje spotřebě dodané světelné energie, jejíž důsledkem se fluorescence chlorofylu zvýší (Lazár a

Pospíšil, 1999). Z výše uvedeného vyplývá, že se efektivita fotosyntézy snižuje a záření se re-emituje zpět do okolí.

### **3.2. Zhášení fluorescence**

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

Zhášení fluorescence lze také definovat jako bimolekulární mechanismus, ve kterém dochází k přenosu energie z jedné molekuly na druhou. Zpravidla jde o transport elektronů, či přenos náboje. Reakce molekul může být dvojího typu, dynamická a statická. Při dynamickém zhášení dochází ke srážce fluoroforu v excitovaném stavu s molekulou zhášeďla. Tím dojde k přechodu fluoroforu do základního stavu, aniž by vyzářil foton. Při statickém zhášení dochází ke tvorbě komplexu fluoroforu a zhášeče, který není schopen fluorescence. (Lakowicz, 2006)

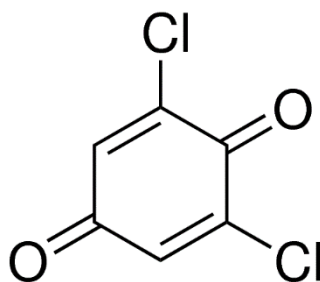
#### **3.2.1. Zhášeče fluorescence**

Zhášeče fluorescence jsou molekuly látek schopny převést excitovanou molekulu fluoroforu do jejího základního stavu, aniž by došlo k vyzáření fotonu do okolí. Takové substance jsou schopny využít excitační energii dál při fotochemických reakcích, čímž dochází k poklesu fluorescence (Hlízová, 2008).

#### **3.2.2. 2,6-dichloro-1,4-benzochinon**

DCBQ (2,6-dichloro-1,4-benzochinon) je chemická látka o molekulové hmotnosti 176.98 g/mol, patří do skupiny halobenzochinonů. Tato látka se nachází v pitné vodě, jako vedlejší produkt při její dezinfekci. Nejvyšší koncentrace látky je až 23 ng/l. V nedávných experimentech bylo zjištěno, že je DCBQ schopné produkovat reaktivní formy kyslíku (ROS) a tím způsobovat oxidativní poškození bílkovin a DNA v lidských nádorových T24 jaterních buňkách (Sigma-Aldrich 2018). V experimentech na háďátku obecném *Caenorhabditis elegans* byla zjištěna toxicita halobenzochinonů, jejich kancerogenní a teratogenní účinky (Zuo a kol., 2017).



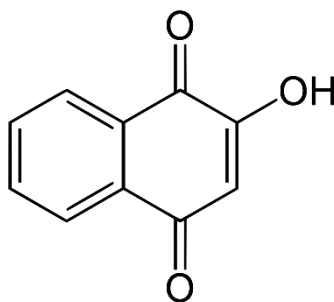


Obr. 1: Strukturální vzorec DCBQ (Reaxys, 2018)

DCBQ působí ve fotosynteticky aktivních částech rostlin jako ekvivalent plastoquinonu. V několika experimentech bylo dokázáno obnovení schopnosti transportu elektronů v  $Q_B$  centrech fotosystému II přidáním již malého množství halogenizovaných chinonů. Část center fotosystému II není schopna přenosu elektronů z primárního akceptoru  $Q_A$  na sekundární  $Q_B$  (Bukhov a kol, 2003).

### 3.2.3. 2-hydroxy-1,4-naftachinon

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

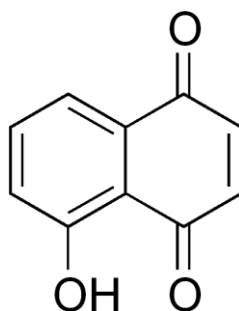


Obr. 2: Strukturální vzorec lawsonu (Reaxys, 2018)

Při zkoumání vlivu henny byly nedávno zjištěny další efekty, jako jsou fungicidní, antimalarické, či baktericidní účinky. Proto se její využití rozšířilo i do dalších průmyslových odvětví, zejména do farmaceutického nebo chemického. Se vzrůstající manipulací s touto chemickou látkou by mohlo dojít k znečištění životního prostředí, kde největší riziko

hrozí vodním organismům. Lidem a ostatním suchozemským živočichům může henna způsobit podráždění očí a pokožky (Yang a kol., 2017).

Lawson je předmětem výzkumu v biologii rostlin, zejména kvůli chemické látce, triviálně nazvané juglon, která také patří do skupiny naftochinonů a má strukturu podobnou s lawsonem. Při experimentech na buňkách tabáku BY-2 vykazovala schopnost vytvářet reaktivní formy kyslíku (ROS) (Babula a kol. 2009). V jiném experimentu s juglonem byla na semenáčku hlávkového salátu pozorována zvýšená produkce peroxidu vodíku (Babula a kol., 2014). V obou případech může díky produkci těchto látek docházet k nevratnému poškození organel. Podle jiných studií tyto látky ze skupiny naftochinonů prokázaly schopnosti inhibice makromolekulární oxidace a snížení oxidativního stresu (Chobot a Hadacek, 2009).

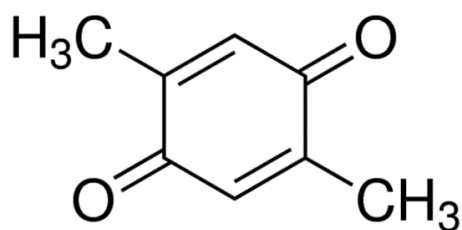


Obr. 3: Strukturální vzorec juglonu (Reaxys, 2018)

Reaktivní formy kyslíku, jako je například superoxidový anion  $O_2^-$ , singletový kyslík nebo peroxid vodíku  $H_2O_2$ , jsou při vlivu oxidativního stresu produkovány nekontrolovaně a mohou tak organismu způsobit vážné škody, například k poškození DNA aktivací endonukleázy (Richterová, 2008).

#### 3.2.4. 2,5-Dimethyl-p-benzochinon

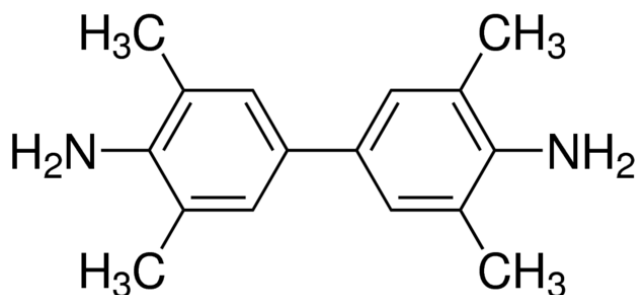
2,5-Dimethyl-p-benzochinon, známý pod názvem floron nebo pod zkratkou DMBQ, je benzochinon, nacházející se ve formě žlutého až hnědého krystalického prášku o molekulové hmotnosti 136,15 g/mol. V přírodě je látka významnou složkou obranného sekretu velesedláče pečlivého (*Acanthopachylus aculeatus*) (Eisner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



Obr. 5: Strukturní vzorec DMBQ (Reaxys, 2018)

### 3.2.5. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, nejčastěji označován zkratkou TMB, je chemická látka o molekulové hmotnosti 240,35 g/mol. Vyskytuje se ve formě bílého až světle žlutého krystalického prášku. TMB je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, např. v ethanolu (Applichem, 2018).



Obr. 6: Strukturní vzorec TMB (Reaxys, 2018)

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

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité přístroje

V rámci praktické části této bakalářské práce byly použity přístroje uvedeny v tabulce č. 1

Tabulka 1. Přístroje využité pro vykonání experimentu

Spektroradiometr LI-1800	LI-COR (Lincoln, Nebraska, USA)
Křemenný světlovod	Storz (Tuttlingen, Německo)
Rotační vývěva typu RV 1,5/11 LP	LAVAT (Praha, Česká Republika)
Chlorofylmetr SPAD 502	Konica Minolta (Japonsko)
Fytokomora SGC.170.PFX.J	Weiss-Gallenkamp (Velká Británie)

K provedení experimentu byla nutná laboratoř vybavená radiospektrofotometrem LI-COR LI-1800 s příslušenstvím a osobním počítačem, zeleným osvětlením (nutné kvůli práci se zelenými částmi rostlin) a vakuovou pumpou, která se používá pro šokovou infiltraci listu. Z tohoto důvodu byl proces pokusu rozdělen do dvou laboratoří, do jedné s přístroji pro měření propustnosti a odrazivosti pomocí radiospektrofotometru, do druhé pak s aparaturou pro šokovou infiltraci listu tabáku jednotlivými chemickými látkami (DCMU, zhášeče) popsanými v teoretické části.

### 4.2. Biologický materiál

Samotný pokus byl prováděn na listech tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L cv. Samsun) ve stáří 4 - 6 měsíců. Rostlina byla pěstována ve fotokomoře Weiss-Gallenkamp SGC.170.PFX.J (Loughborough, Velká Británie) v režimu 14 hodin světlo, s teplotou 25°C a relativní vlhkostí 60 %, a 10 hodin tma, s teplotou 18°C a relativní vlhkostí 55 %. Koncentrace fotosynteticky aktivní radiace byla nastavena na 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , Rostliny tabáku byly vysazeny 14. ledna 2018 a přesazovány 1. června 2018. K měření byly vybrány listy s přibližně stejnou hodnotou SPAD kolem 35.

### 4.3. Použité chemikálie

Pro experimenty byly použity chemikálie uvedené v tabulce č. 2.

Tabulka 2. Chemikálie využité při experimentu

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

### 4.4. Příprava koncentrační řady ethanolu

Do 50 ml plastových zkumavek se šroubovacím víčkem byl napipetován ethanol o koncentraci 96 %, který byl doplněn vodou, aby byly vytvořeny zásobní roztoky příslušnými koncentracemi 1 %, 2 %, 50 %. Výsledné roztoky byly použity pro měření vlivu ethanolu na fluorescenci chlorofylu.

#### 4.4.1. Příprava roztoků zhášečů

Příslušné množství daného zhášeče bylo naváženo na analytických vahách a rozpuštěno v 96% ethanolu, aby vznikl zásobní roztok 20 mM zhášeče v 96% ethanolu. Takto připravený zásobní roztok byl zředěn poté tak, aby finální koncentrace zhášeče byla 200  $\mu$ M v 1% ethanolu. Použití takto naředěného roztoku bylo nutné k zachování viability organel listu.

#### 4.4.2. Příprava roztoku DCMU

Roztok 200  $\mu$ M DCMU byl připraven navážením 4,6 mg DCMU a následným přesypáním do 100 ml plastové zkumavky se šroubovacím víčkem. K navážce bylo přidáno 1,025 ml 96% ethanolu. Roztok ethanolu a navážky byl následně doplněn do 100 ml deionizovanou vodou.

## 4.5. Měření

### 4.5.1. Měření odrazivosti a propustnosti

Pro studium spektrálních změn odrazivosti (R) a propustnosti (T) v kolimovaném světle byl využit spektrometr LI-1800 s integrační koulí 1800-12 (LI-COR, 1983) a křemenným světlovodem o průměru 3,5 mm (Storz, 2017)

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

Měření není absolutní, ale signál vzorku se porovnává se signálem standardu. V tomto případě je standardem destička pokrytá difuzně odrážejícím povrchem. Je-li signál vzorku  $S_v(\lambda)$  a signál standardu  $S_s(\lambda)$ , je pak  $R_D(\lambda)$  vypočítáno jako (5).

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

Při měření  $T_D(\lambda)$  je srovnávacím signálem opět  $S_s(\lambda)$ . Je-li signál po průchodu vzorkem  $S_v(\lambda)$ , pak je  $T_D(\lambda)$  (6). (Rolencová, 2006, LI-COR, 1985)

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

### 4.5.2. Infiltrace listu

Infiltrace samotného listu byla provedena infiltrační aparaturou složenou z Erlenmeyerovy tlustostěnné baňky vystlané buničinou a uzavřené gumovou zátkou. Tlustostěnná Erlenmeyerova baňka byla tlakovou hadicí připojena k rotační vývěvě s dvěma ventily, jedním vypouštěcím a jedním napouštěcím.

Segment listu byl ponořen do zkumavky s roztokem testované látky. Umístění listu ve zkumavce zabraňovalo jeho pohybu a ponoření pod hladinu roztoku umožnilo ideální podmínky pro infiltraci. Zkumavka se segmentem listu byla vložena do Erlenmeyerovy baňky, která byla následně uzavřena gumovou zátkou.

Vlastní infiltrace byla prováděna tlakovým šokem. Vzorek byl vystaven podtlaku až -0,9 MPa a následnému normálnímu atmosferickému tlaku. Cyklus střídání tlaku byl proveden několikrát za sebou po dobu 20-25 minut. Střídání tlaků bylo řízeno na základě kontroly hodnoty tlaku pomocí manometru. Průběh infiltrace byl hodnocen vizuálně. Dobře infiltrovaný segment listu byl téměř průsvitný, jelikož interceluláry listu byly zaplněny danými roztoky (Baránková a kol., 2015).

#### **4.5.3. Způsob a postup při měření difuzní odrazivosti a propustnosti**

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

Ve vzrostlém listu tabáku bylo změřeno množství chlorofylu v různých místech pomocí chlorofylmetru SPAD 502. Měření proběhlo pětkrát na levé straně listu a pětkrát na straně pravé a získané hodnoty levé a pravé strany byly zprůměrovány. Pro experiment byly vybrány listy s průměrnou hodnotou SPAD cca 35. List se změřenou koncentrací chlorofylu byl umístěn do šablony a připevněn k aparatuře tak, aby do kulového integrátoru směřovala adaxiální strana listu. Použití šablony zajišťuje měření vždy stejného místa na listu. Zdroj světla byl připevněn k integrační kouli do polohy pro měření standardu, tak, aby proud světla nedopadal na vzorek. Pomocí osobního počítače bylo v programu pro ovládání spektrometru LI-1800 nastaveno rozmezí vlnových délek na interval 380-800 nm, což odpovídá světelnému spektru viditelného lidským okem. Pro měření difuzní odrazivosti bylo nutné připevnit zdroj světla k integrační kouli do polohy pro měření reflektance, tedy tak, aby proud záření směřoval na povrch adaxiální strany listu.

V programu pro spektrometr LI-1800 bylo nastaveno následné dělení získaných hodnot hodnotami standardu. Pro měření odrazivosti byl nastaven stejný interval vlnového záření 380-800 nm, poté následovalo zahájení měření. Při startu byl zapnut zdroj světla, po ukončení byl opět vypnut. Zdroj světla byl připevněn za vzorek do portu určeného pro měření difuzní propustnosti tak, aby proud záření směřoval přes list do integrační koule. Poté byly nastaveny stejné hodnoty intervalu vlnových délek.

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

Po změření hodnot odrazivosti a propustnosti byl list nastříhán na několik segmentů, které byly následně infiltrovány chemickými roztoky o různých koncentracích. Po ukončení infiltrace byl fragment listu zabalen do alobalové fólie, aby nedošlo ke kontaktu vzorku se

světlem. Temné prostředí zabraňovalo degradaci fotosenzitivních látek, kterými byl list infiltrován. Postup měření hodnot horní i spodní strany listu zůstává téměř stejný, vynechává se měření koncentrace chlorofylu a postup musí být proveden za minimálního osvětlení.

#### **4.6. Simulace absorpčního a rozptylového koeficientu**

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

Spektra byla simulována na počítači s procesorem Intel® Core i5 s frekvencí (2,3 GHz). V ovládacím panelu programu byl nastaven krok vykreslování spektra 2 nm, simulovaný rozsah byl 400-800 nm (byla použita funkce programu Drows, vynechá daný počet získaných dat, kdy jsou data zatížena šumem a lepší tak fit), tloušťka listu byla zvolena 0,235 mm (Avery, 1933) a index lomu 1,5 (Jacquemoud a Barrett 1990). Každá strana listu byla simulována zvlášť. Jelikož jsou získaná spektra zatížena šumem, byla simulace každé strany listu provedena pětkrát, tak aby byl získán ideální poměr signál šum.

#### **4.7. Vyhodnocení dat**

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

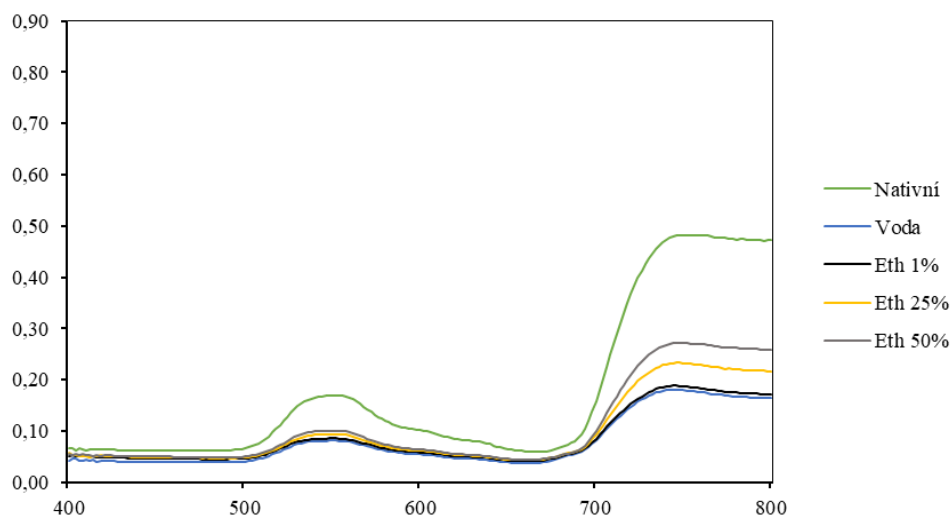
#### **4.8. Výsledky a diskuze**

##### **4.8.1. Spektra odrazivosti a propustnosti**

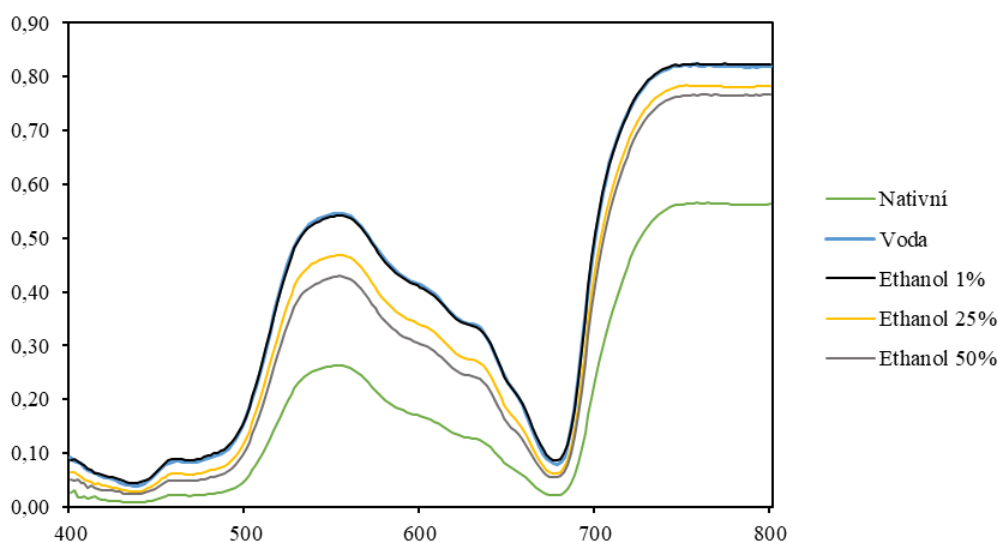
V následující podkapitole jsou k dispozici data spekter odrazivosti a propustnosti, která byla zpracována do formy grafů. Hodnoty odrazivosti a propustnosti listu infiltrovaného danou látkou jsou porovnány vůči hodnotám spekter listu nativního a 1% ethanolem, aby byl vidět jejich nárůst či naopak pokles.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



#### 4.8.2. Difuzní odrazivost a propustnost koncentrační řady ethanolu



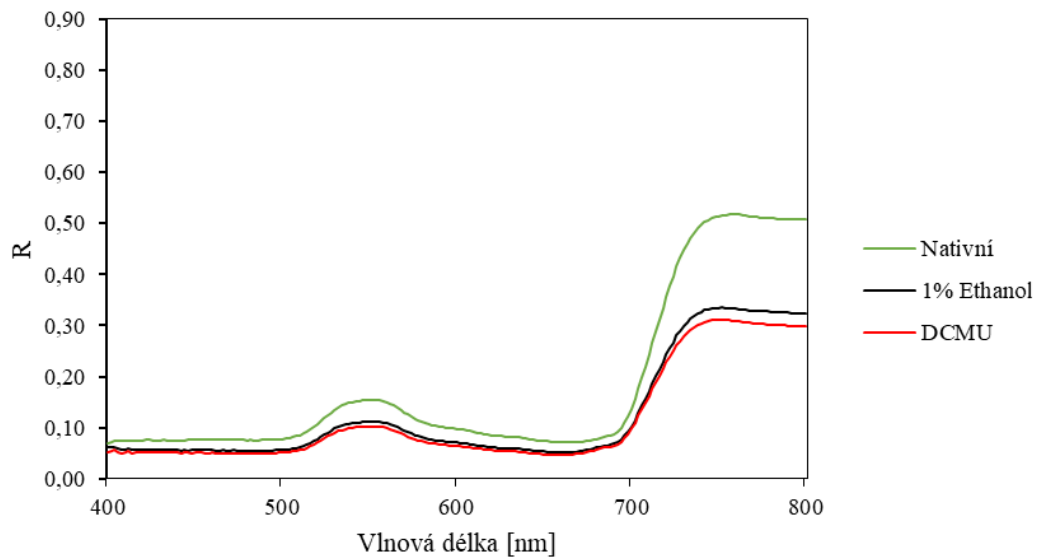
Graf 1: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a roztoky ethanolu různých koncentrací



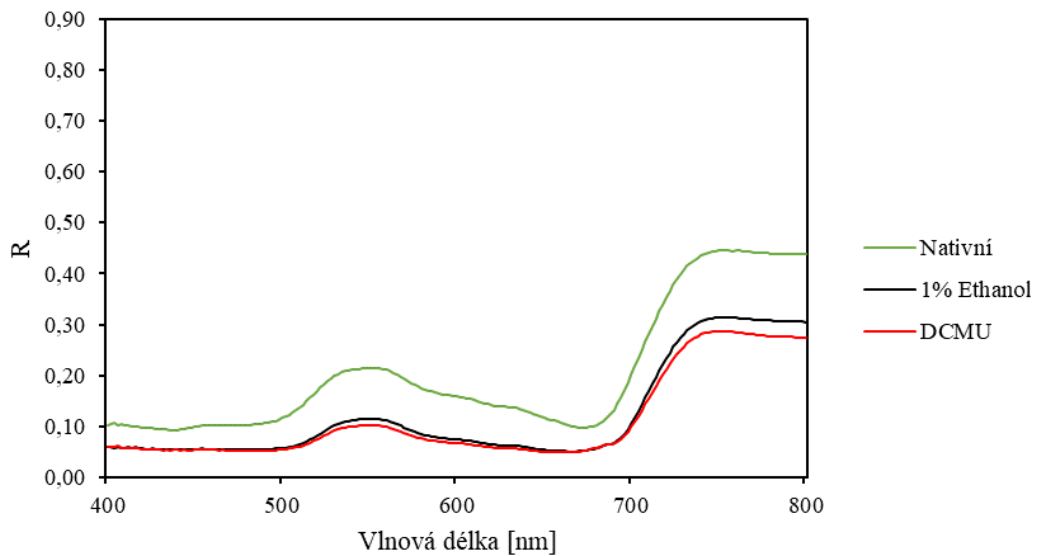
Graf 2: Spektra propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a roztoky ethanolu o různých koncentracích

V grafech 1 a 2 lze vidět rozdíly mezi spektry listů infiltrovaných roztoky ethanolu o různých koncentracích a listem v nativním stavu. Odrazivost se infiltrací vzorku snížila a propustnost naopak zvýšila. Se snižující se koncentrací ethanolu je vliv na spektrální vlastnosti vzorku vyšší, z čehož vyplývá, že vyšší vliv na difuzní odrazivost a propustnost má deionizovaná voda, než ethanol. Pro zachování viability organel byl pro měření vybraných chemických látek zvolen 1% roztok ethanolu. U vyšších koncentrací se předpokládá vymytí barviva z chloroplastů.

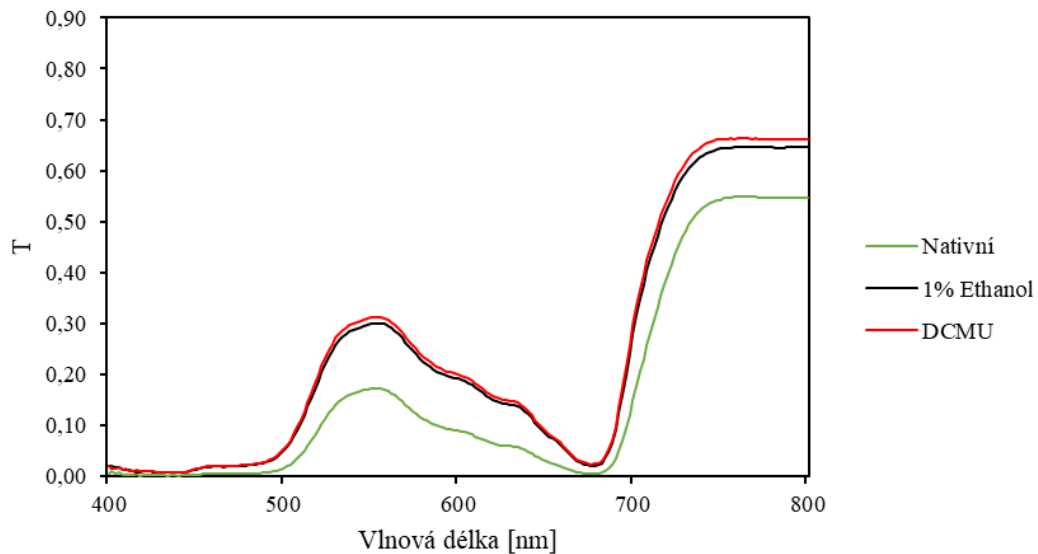
### 4.8.3. Difuzní odrazivost a propustnost DCMU



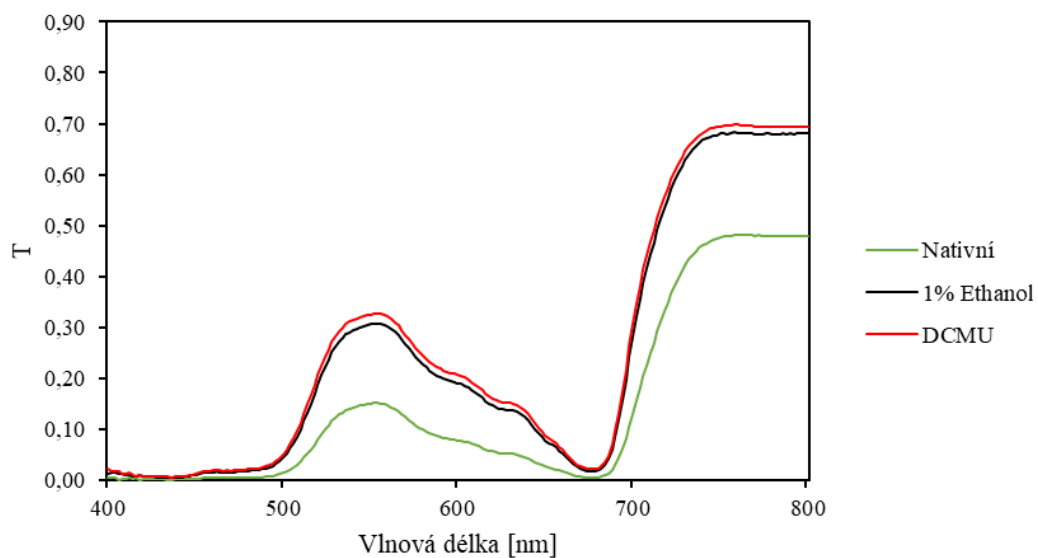
Graf 3: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCMU v 1% ethanolu.



Graf 4: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCMU v 1% ethanolu.



Graf 5: Hodnoty propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolom a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCMU v 1% ethanolu.

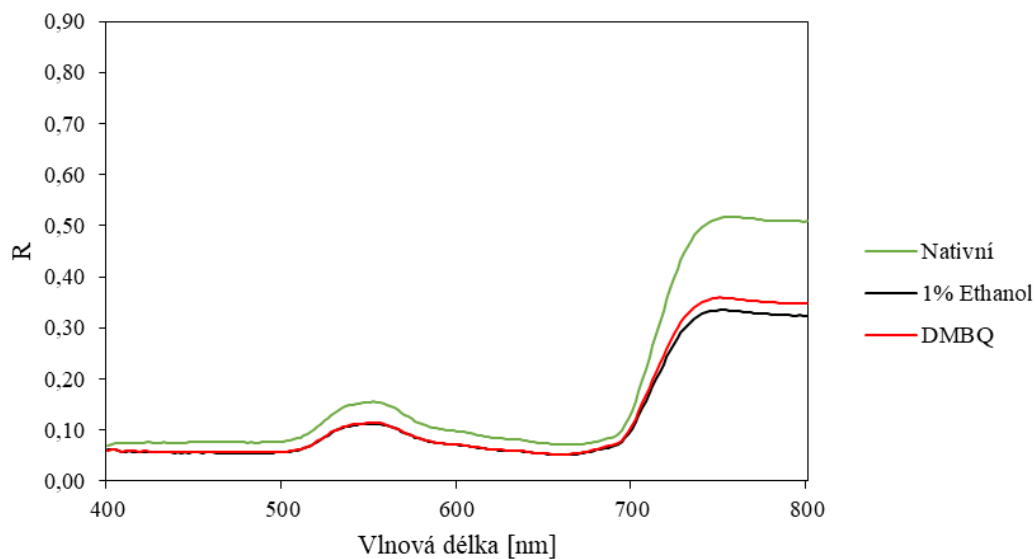


Graf 6: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolom a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCMU v 1% ethanolu.

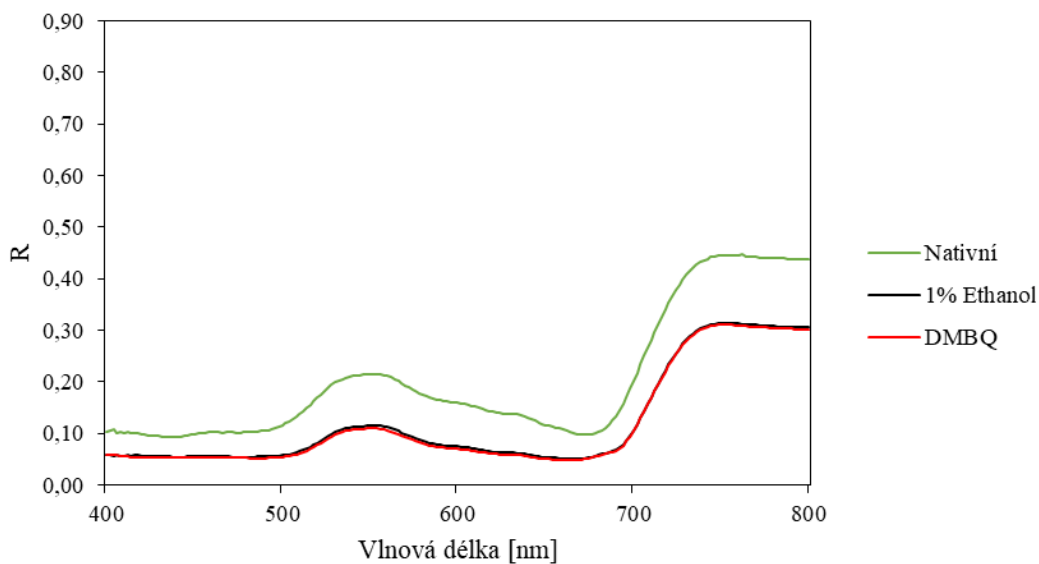
Z uvedených grafů bylo pozorováno snížení odrazivosti, a naopak zvýšení propustnosti infiltrovaného vzorku oproti nativnímu. Důvodem je fakt, že mezibuněčný prostor listu je zaplněn 1% roztokem ethanolu, či roztokem DCMU, čímž dochází ke změně indexu lomu. Mezi daty získanými měření vzorku infiltrovaného 1% ethanolu a vzorku s DCMU je

pouze nepatrný rozdíl, z čehož vyplývá, že na poklesu odrazivosti a zvýšení propustnosti má vliv rozdíl indexů lomů mezi vzduchem a roztokem ethanolu.

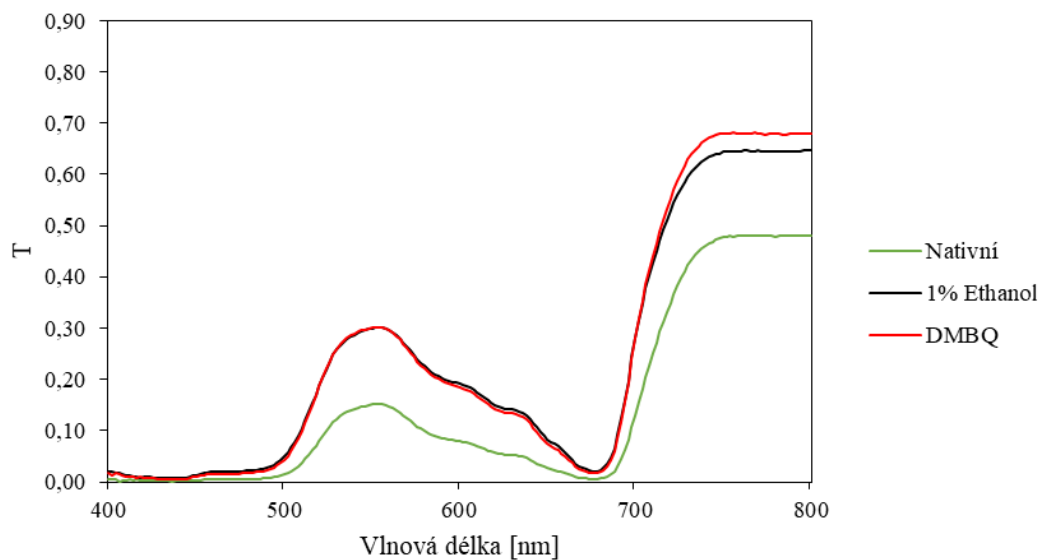
#### 4.8.4. Difuzní odrazivost a propustnost DMBQ



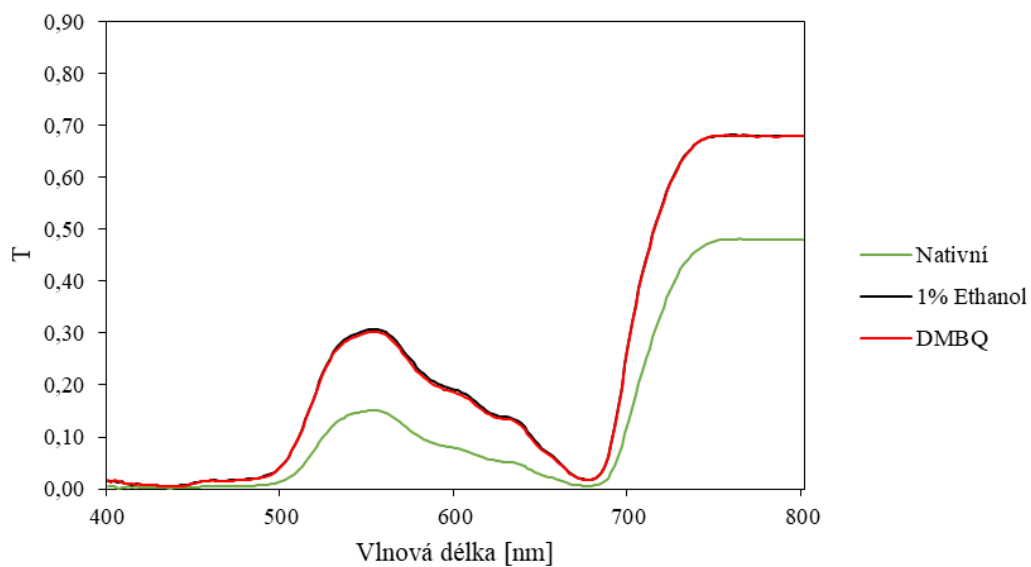
Graf 7: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DMBQ v 1% ethanolu.



Graf 8: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DMBQ v 1% ethanolu.



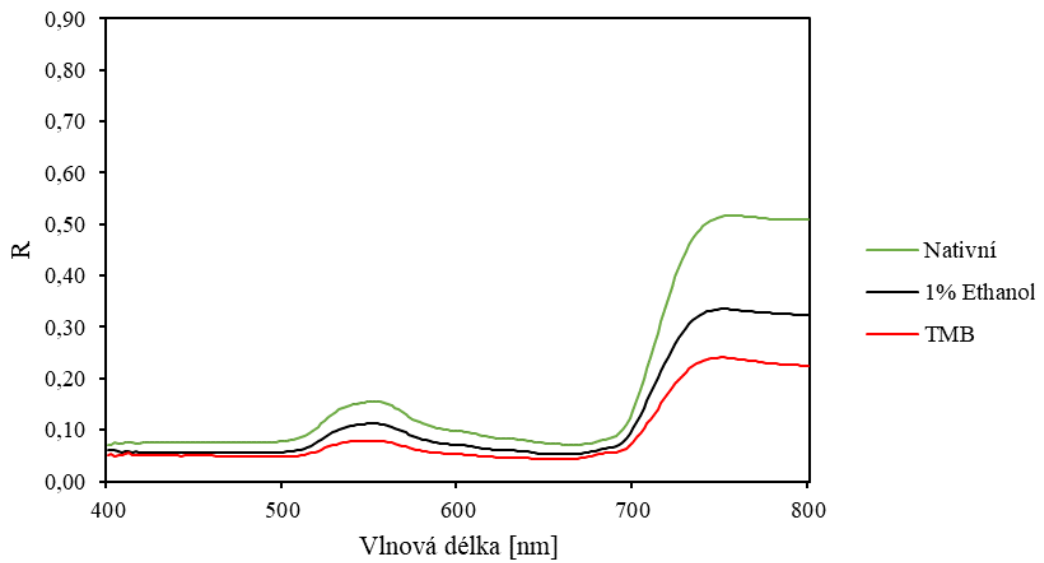
Graf 9: Spektra propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DMBQ v 1% ethanolu.



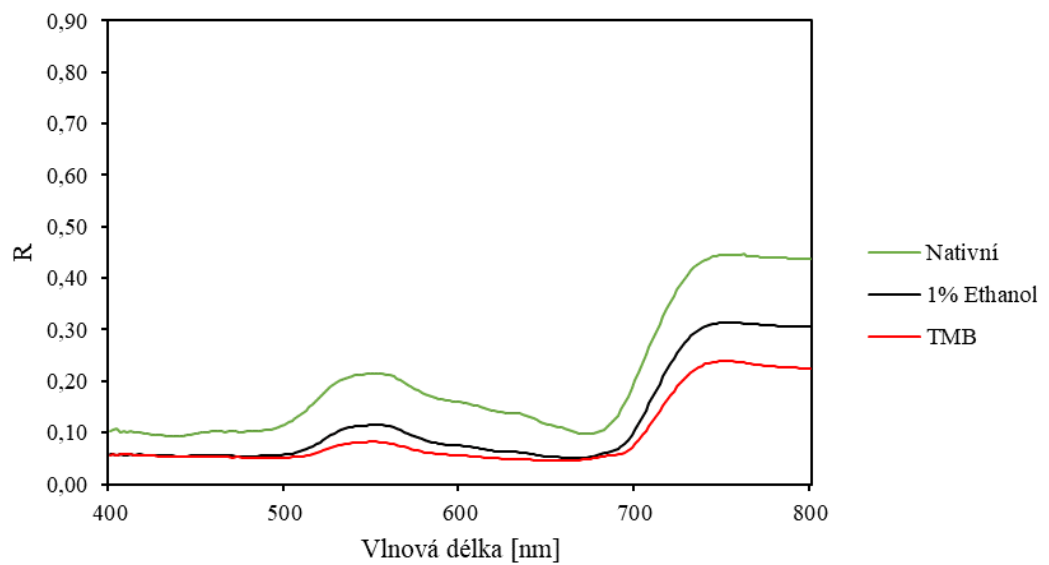
Graf 10: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DMBQ v 1% ethanolu.

Z uvedených grafů bylo pozorováno snížení odrazivosti a zvýšení propustnosti infiltrovaného vzorku oproti nativnímu. Vzorek infiltrovaný DMBQ se nijak výrazně nelišil od vzorku infiltrovaného 1% ethanolem.

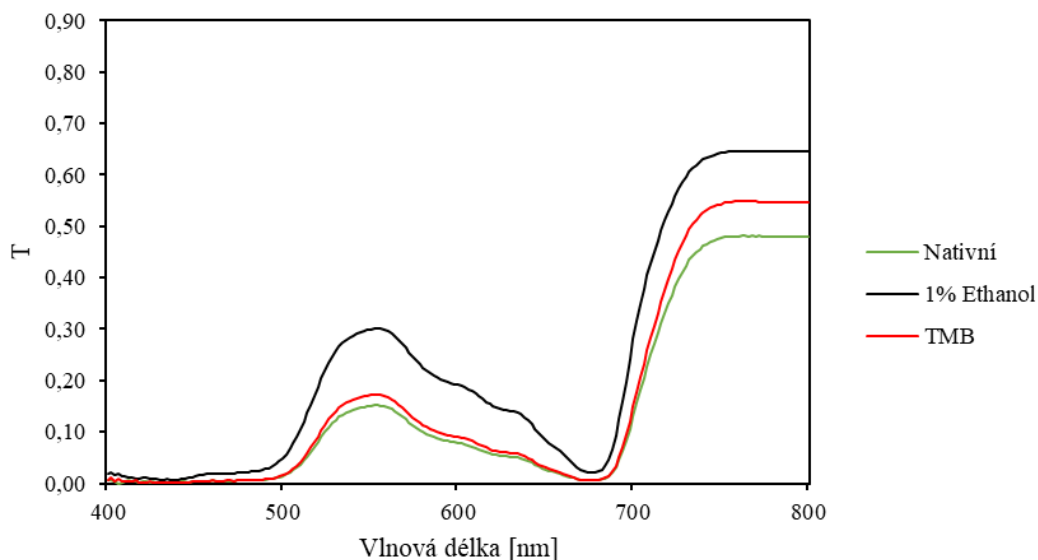
#### 4.8.5. Difuzní odrazivost a odrazivost TMB



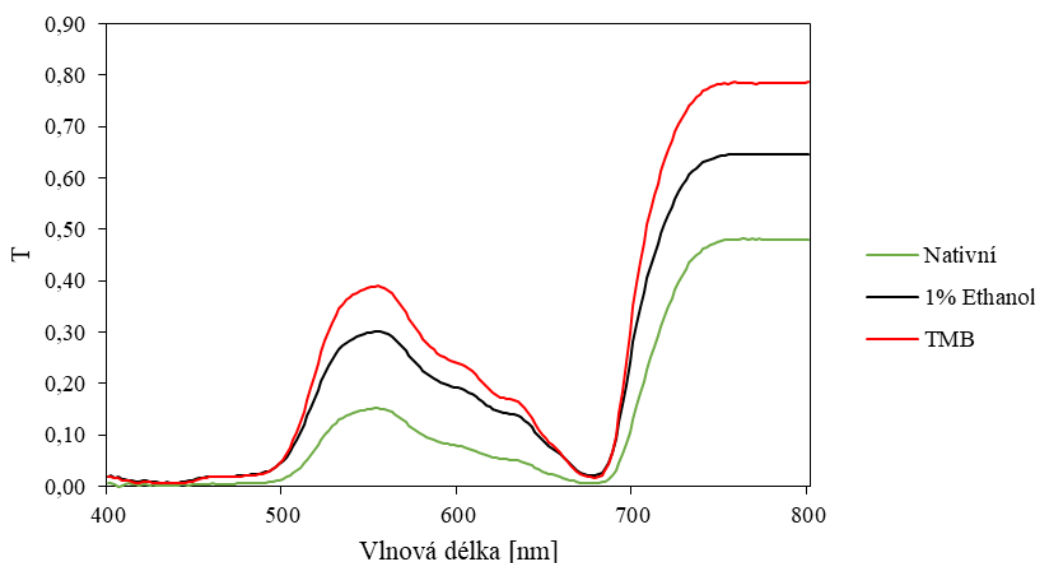
Graf 11: Hodnoty odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu$ M TMB v 1% ethanolu.



Graf 12: Hodnoty odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu$ M TMB v 1% ethanolu.



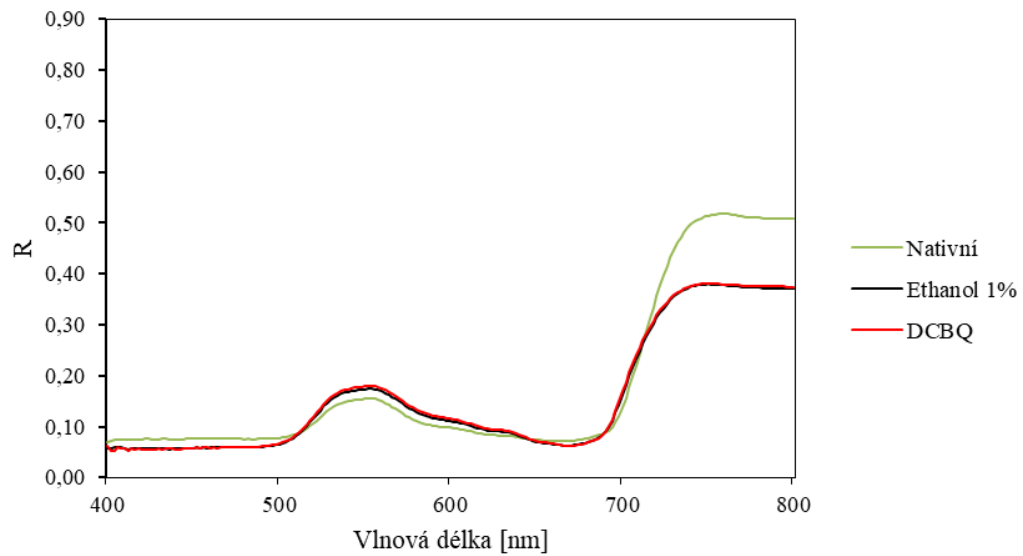
Graf 13: Hodnoty propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  TMB v 1% ethanolu.



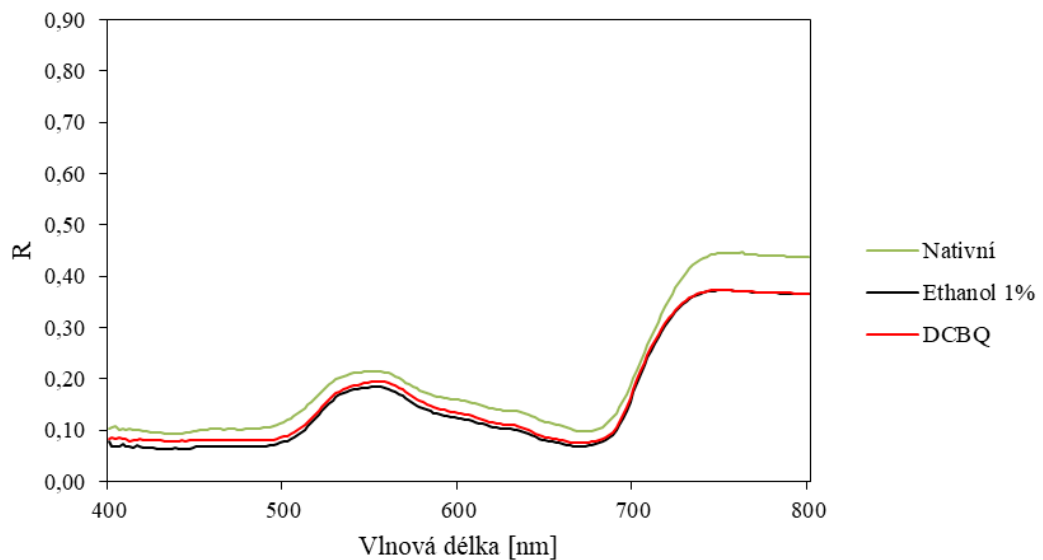
Graf 14: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  TMB v 1% ethanolu.

Na grafech byly pozorovány, oproti DCMU a DMBQ, rozdílné hodnoty reflektance a transmittance při infiltraci TMB a infiltraci ethanolem. Roztok TMB způsobil markantnější snížení odrazivosti a zvýšení propustnosti, než vzorek infiltrovaný 1% ethanolem.

#### 4.8.6. Difuzní odrazivost a propustnost DCBQ

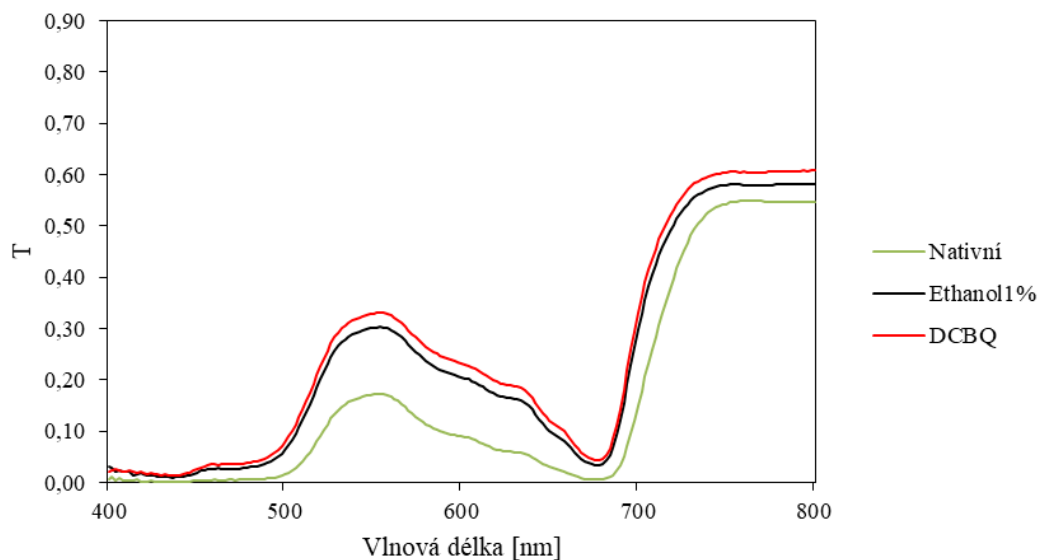


Graf 15: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCBQ v 1% ethanolu.

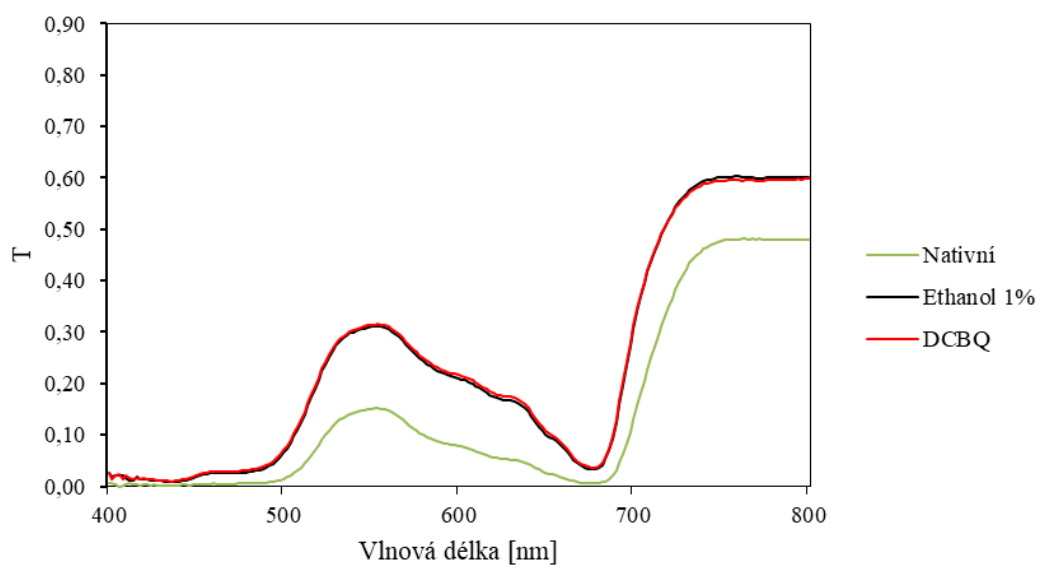


Graf 16: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCBQ v 1% ethanolu.





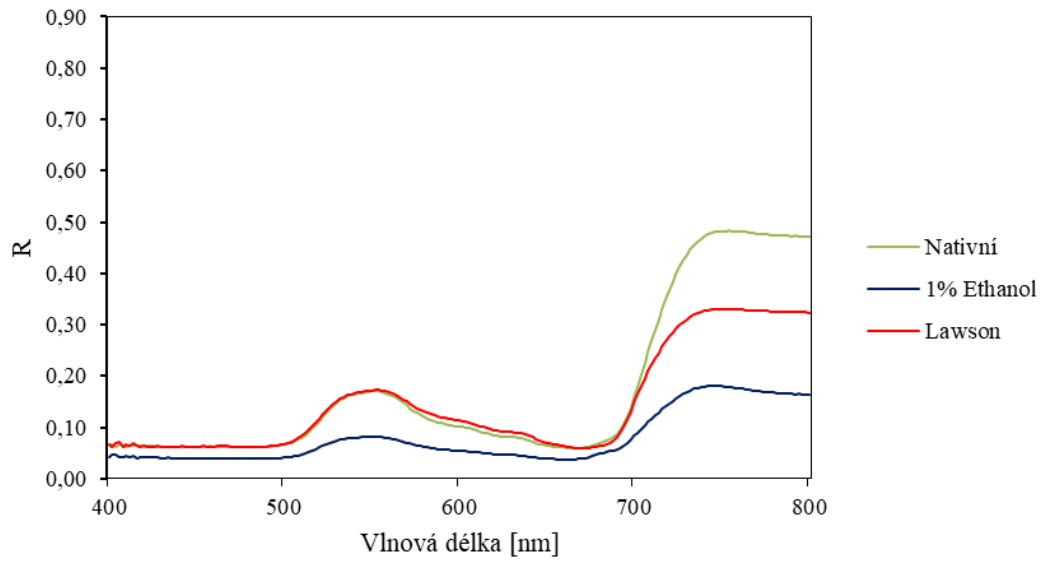
Graf 17: Spektra propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCBQ v 1% ethanolu.



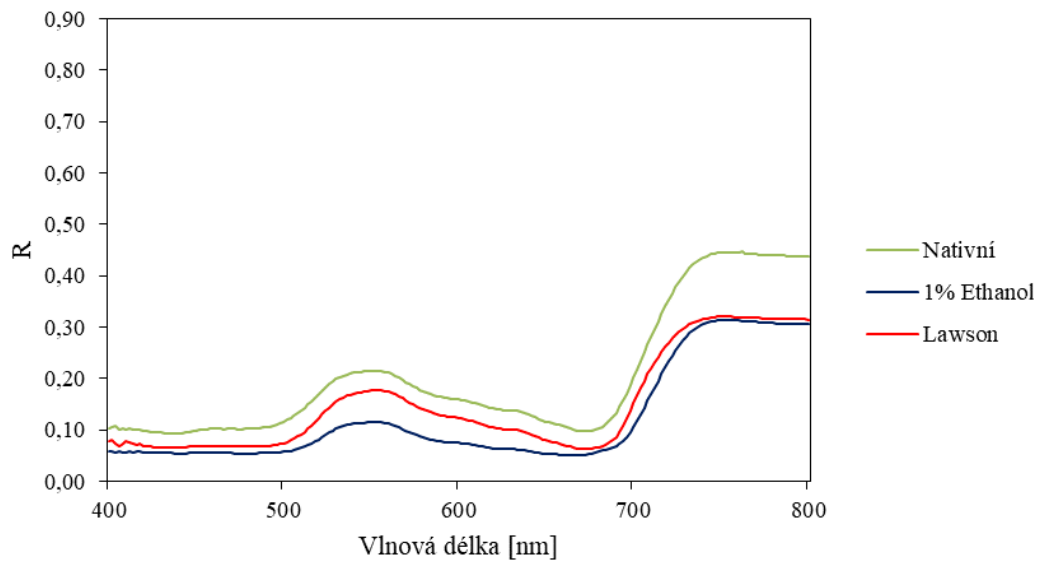
Graf 18: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  DCBQ v 1% ethanolu.

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

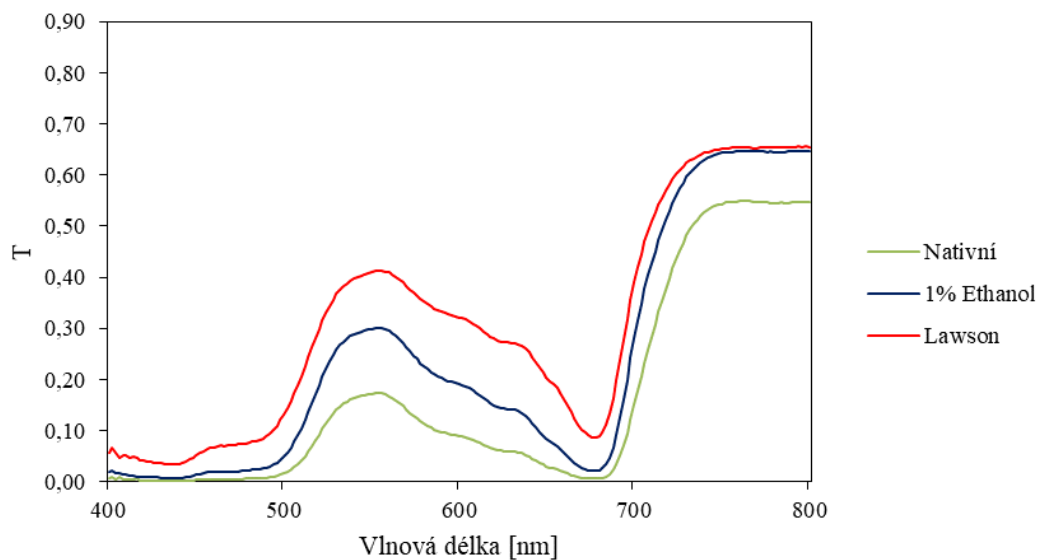
#### 4.8.7. Spektra odrazivosti a propustnosti Lawsonu



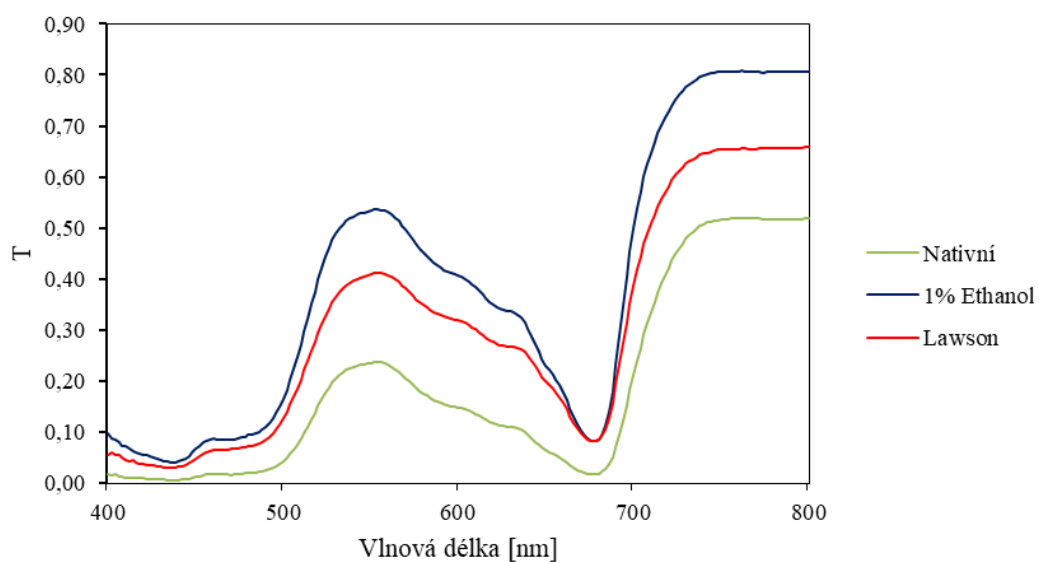
Graf 19: Spektra odrazivosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  lawsonem v 1% ethanolu.



Graf 20: Spektra odrazivosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  lawsonem v 1% ethanolu.



Graf 21: Spektra propustnosti adaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného 1% ethanolem a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  lawsonem v 1% ethanolu.



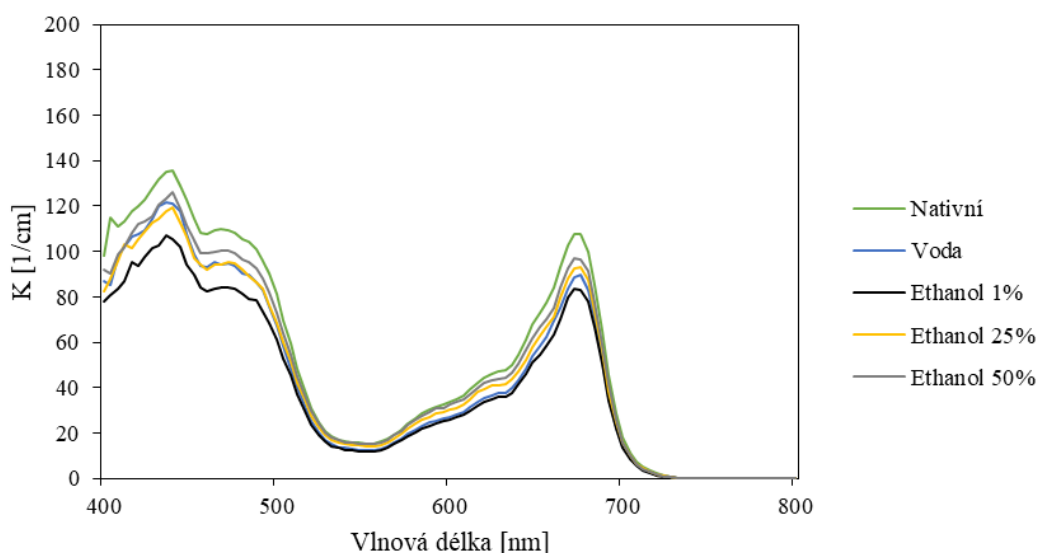
Graf 22: Spektra propustnosti abaxiální strany nativního listu, listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného 200  $\mu\text{M}$  lawsonem.

Z grafů lze vypožorovat, že roztok lawsonu má nižší vliv na změny odrazivosti a propustnosti, než 1% ethanol.

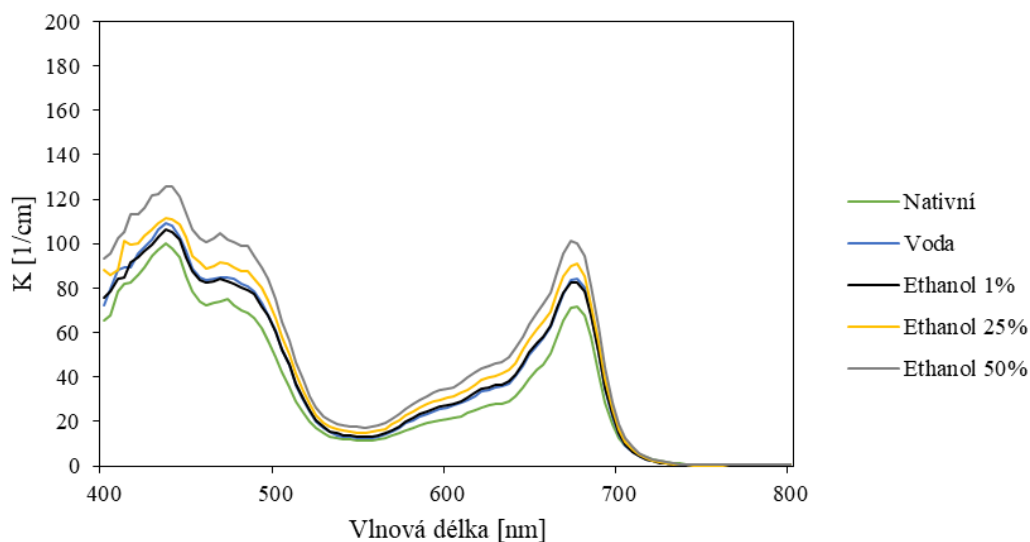
#### 4.9. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu

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

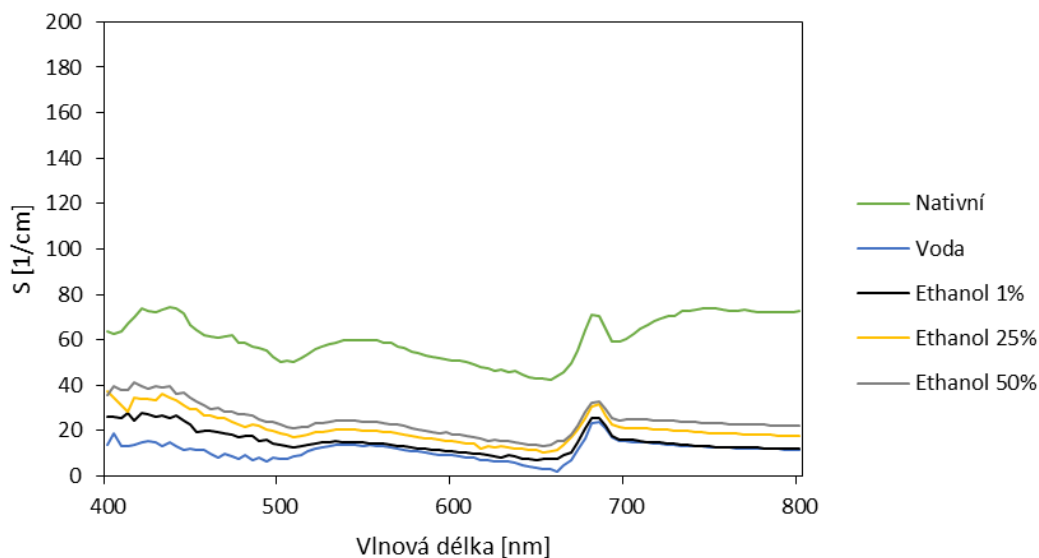
##### 4.9.1. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu koncentrační řady ethanolu



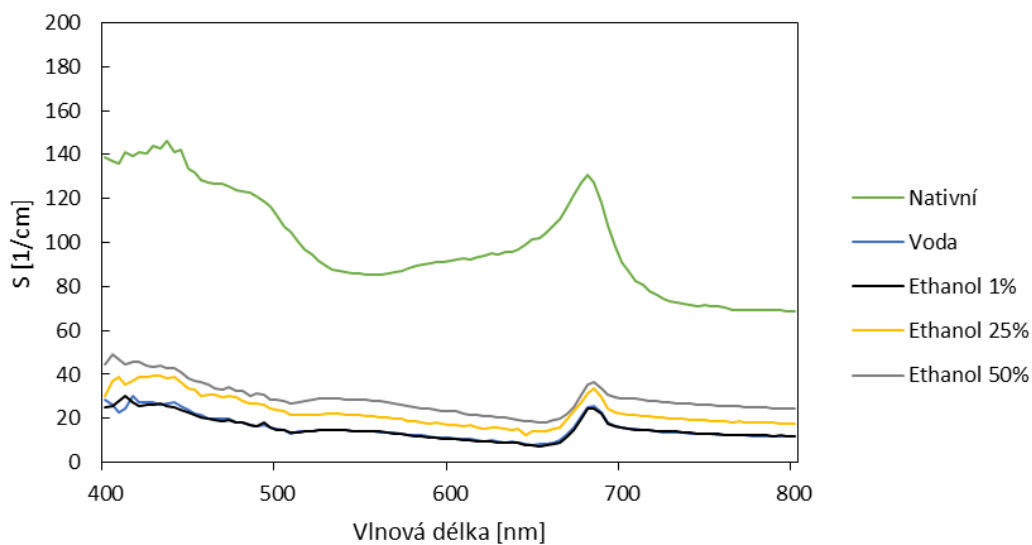
Graf 23: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného roztoky koncentrační řady ethanolu.



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



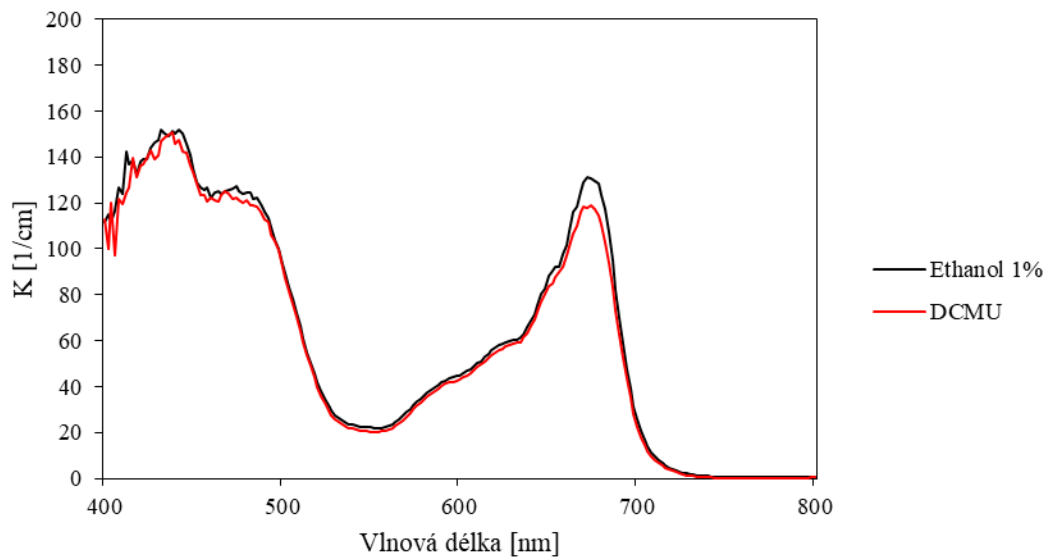
Graf 25: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného roztoky koncentrační řady ethanolu.



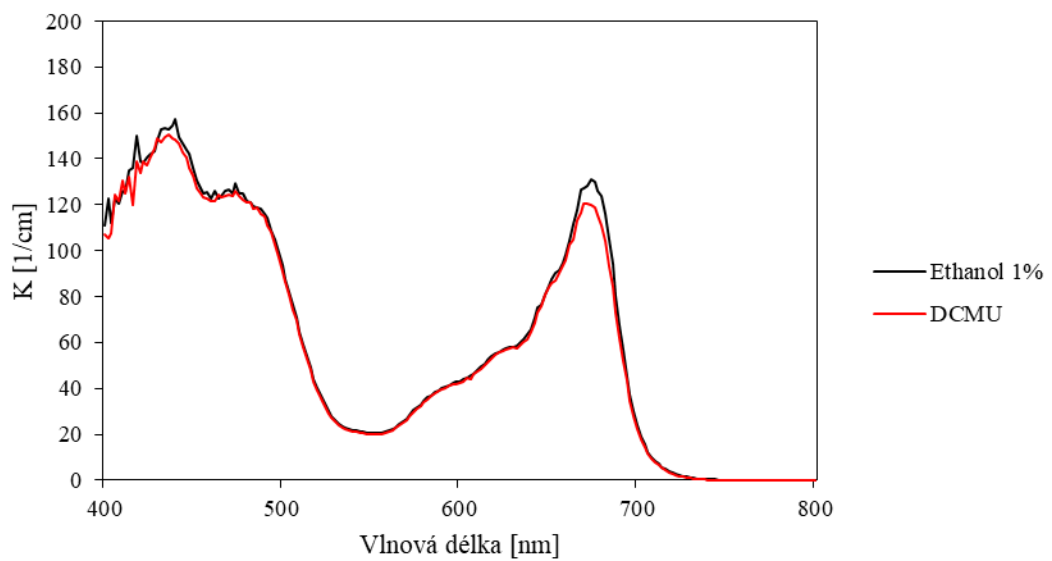
Graf 26: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného vodou a listu infiltrovaného roztoky koncentrační řady ethanolu.

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

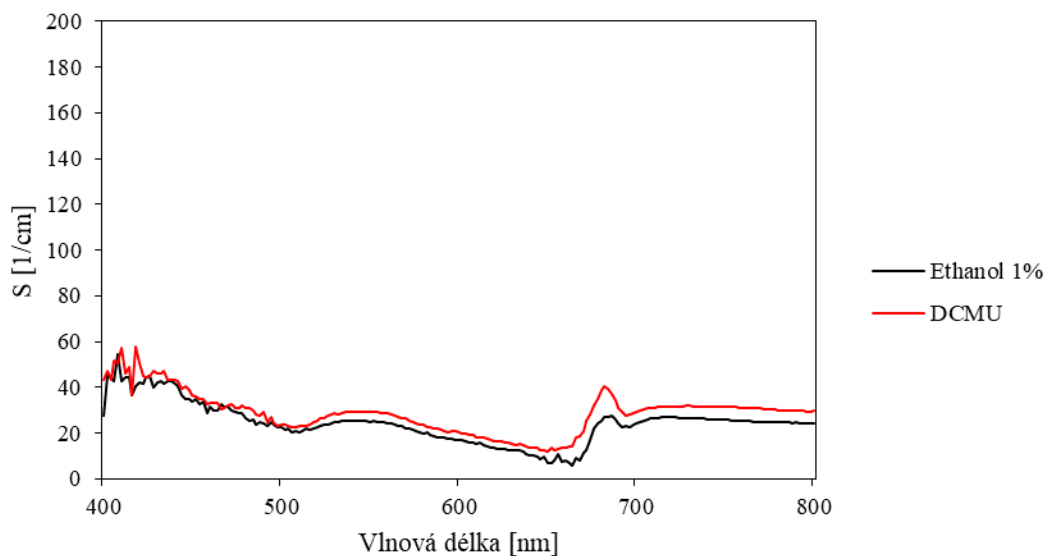
#### 4.9.2. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu DCMU



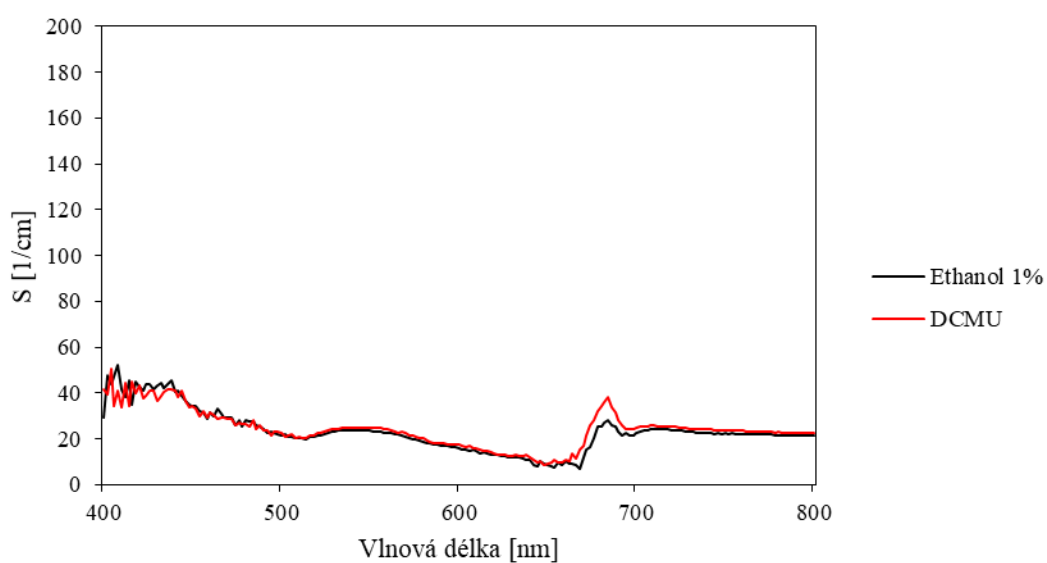
Graf 27: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200  $\mu\text{M}$  DCMU.



Graf 28: Spektra absorpčního koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200  $\mu\text{M}$  DCMU.



Graf 29: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200  $\mu\text{M}$  DCMU.

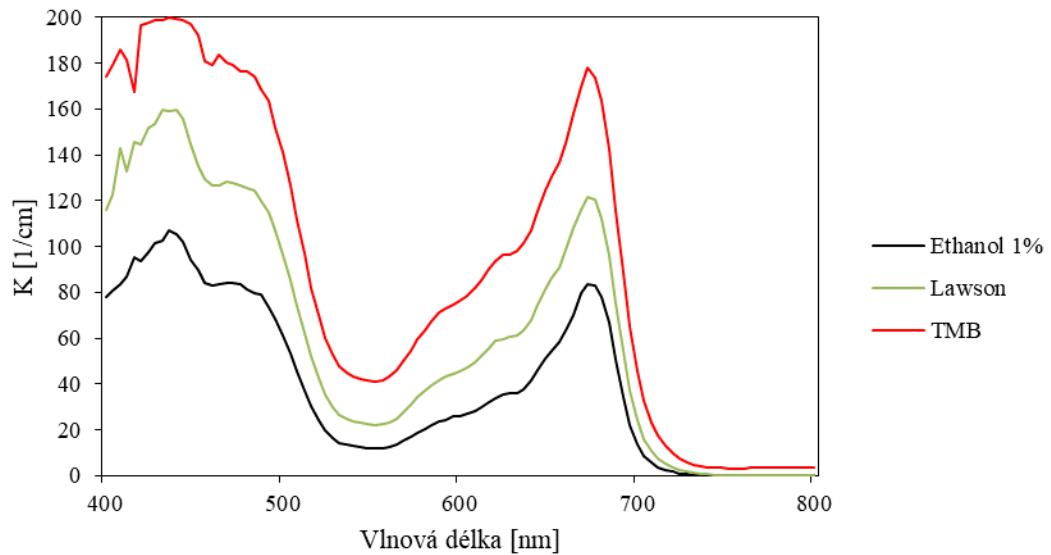


Graf 30: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem a 200  $\mu\text{M}$  DCMU.

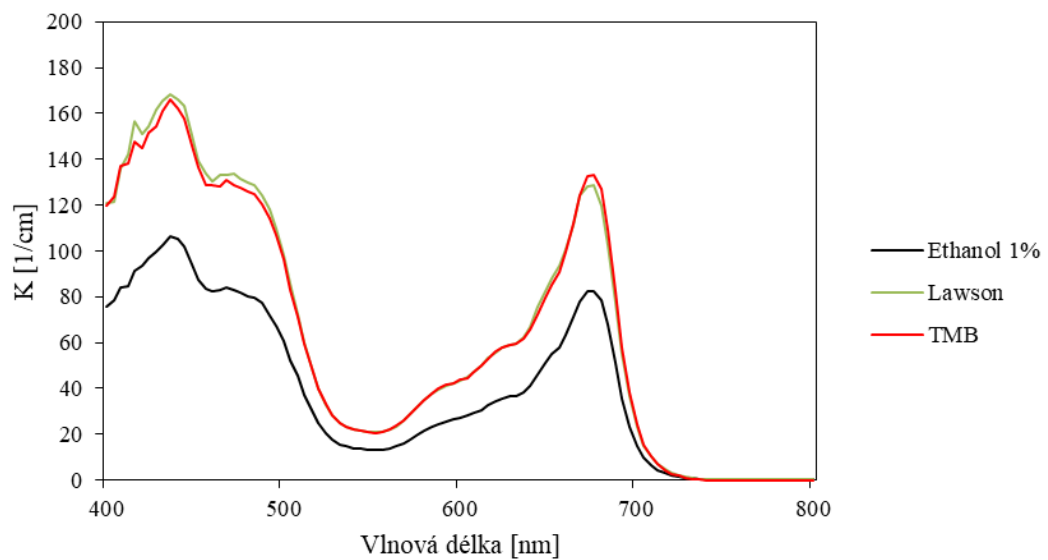
Infiltrací listu tabáku 200  $\mu\text{M}$  DCMU byly potvrzeny předpokládané výsledky. Simulace spektra absorpčního koeficientu vyšla dle našich předpokladů, kdy došlo ke snížení hodnoty maxima při 680 nm. Ve spektrech rozptylového koeficientu pro DCMU došlo ke zvýšení maxima peaku okolo 680 nm oproti 1% ethanolu, což signalizuje zablokování elektronového

transportu a tím zvýšení fluorescence. DCMU má vliv na fluorescence chlorofylu i při infiltrování listu jeho roztokem.

#### 4.9.3. Spektra absorpčního a rozptylového koeficientu zhášeců

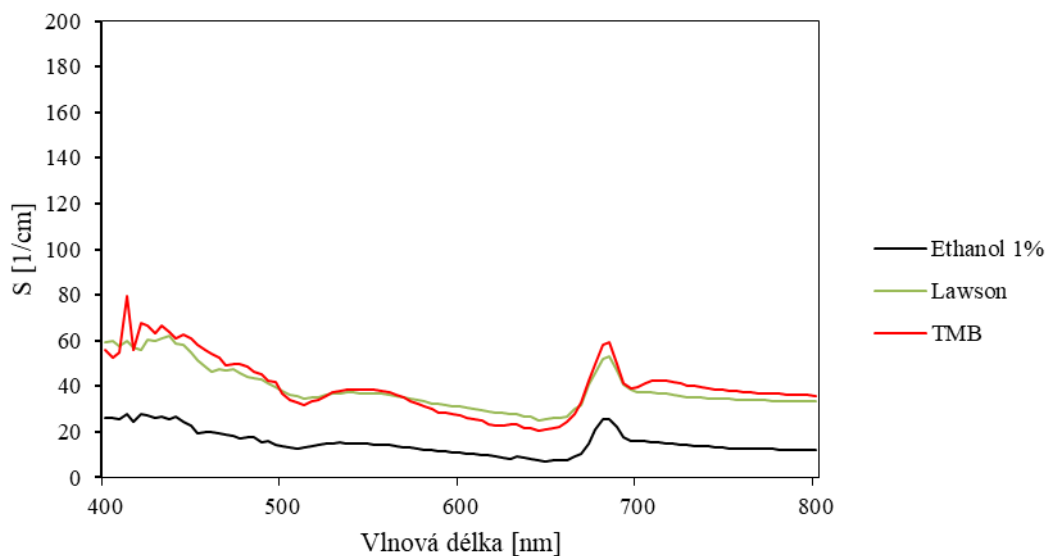


Graf 31: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200  $\mu$ M lawsonem a 200  $\mu$ M TMB.

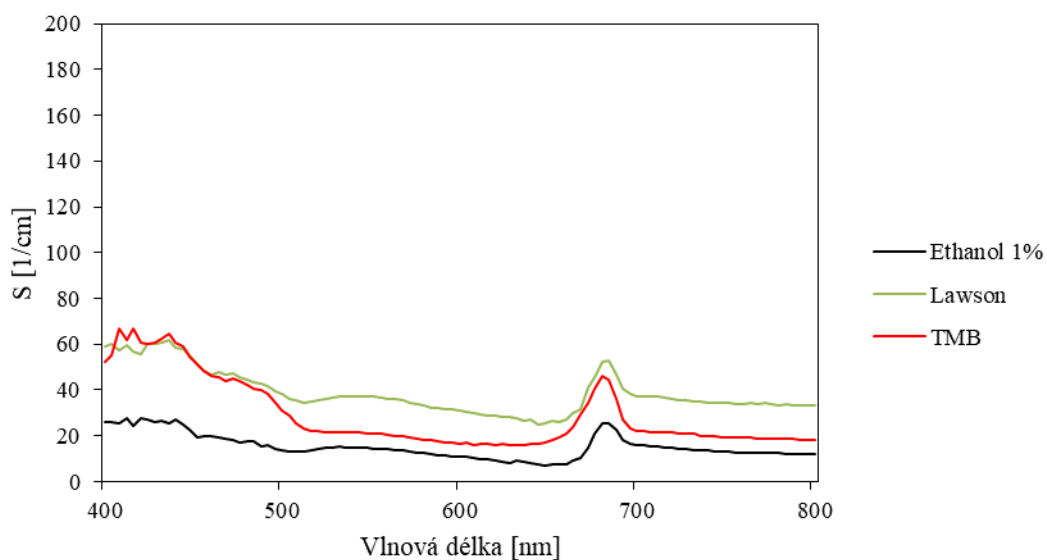


Graf 32: Spektra absorpčního koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem 200  $\mu$ M lawsonem a 200  $\mu$ M TMB.





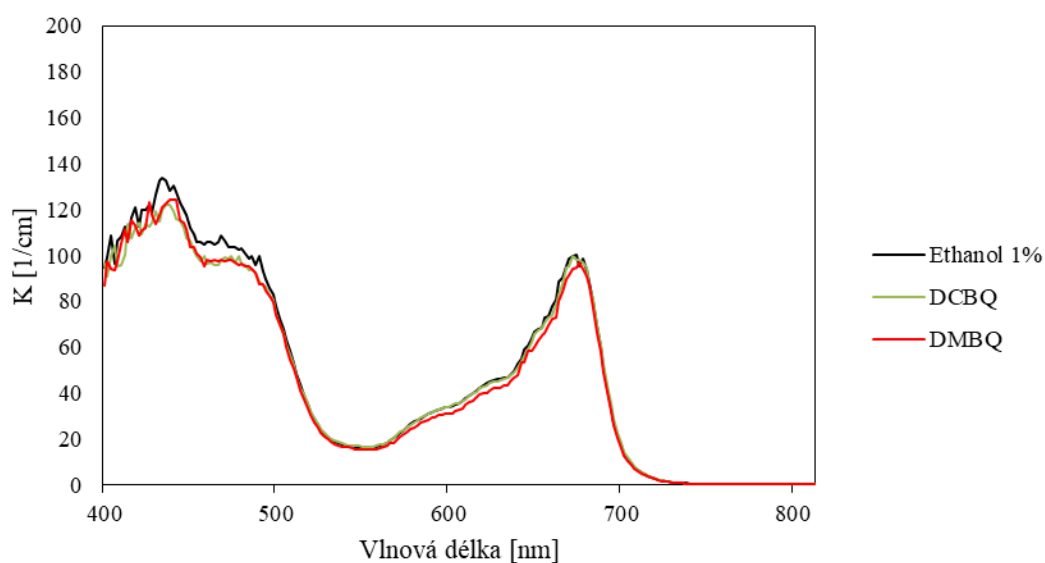
Graf 33: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200  $\mu\text{M}$  lawsonem a 200  $\mu\text{M}$  TMB.



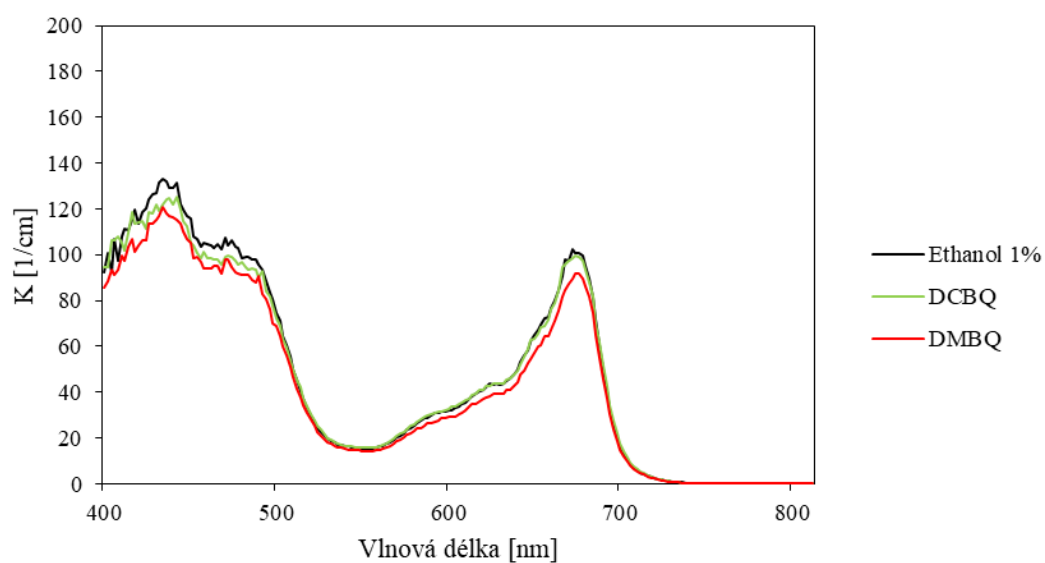
Graf 34: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200  $\mu\text{M}$  lawsonem a 200  $\mu\text{M}$  TMB.

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

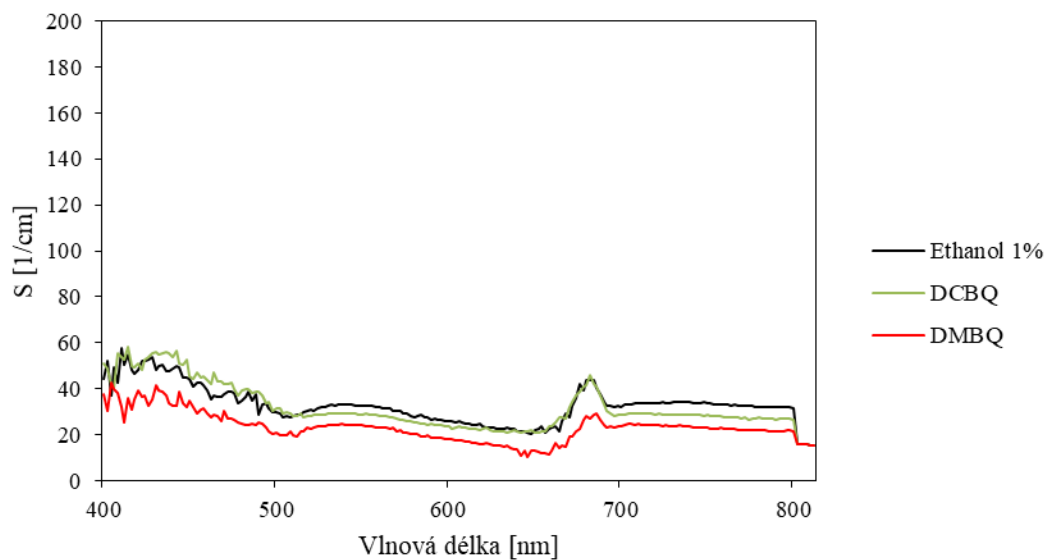
velmi nízké koncentrace zhášedce, došlo tak jen k částečnému zhášení. Dále mohlo dojít k reakci zhášedce s vnitřním prostředím listu. Domníváme se se tedy, že v tomto případě jsou spektra absorpčního koeficientu jsou citlivější k projevům fluorescence.



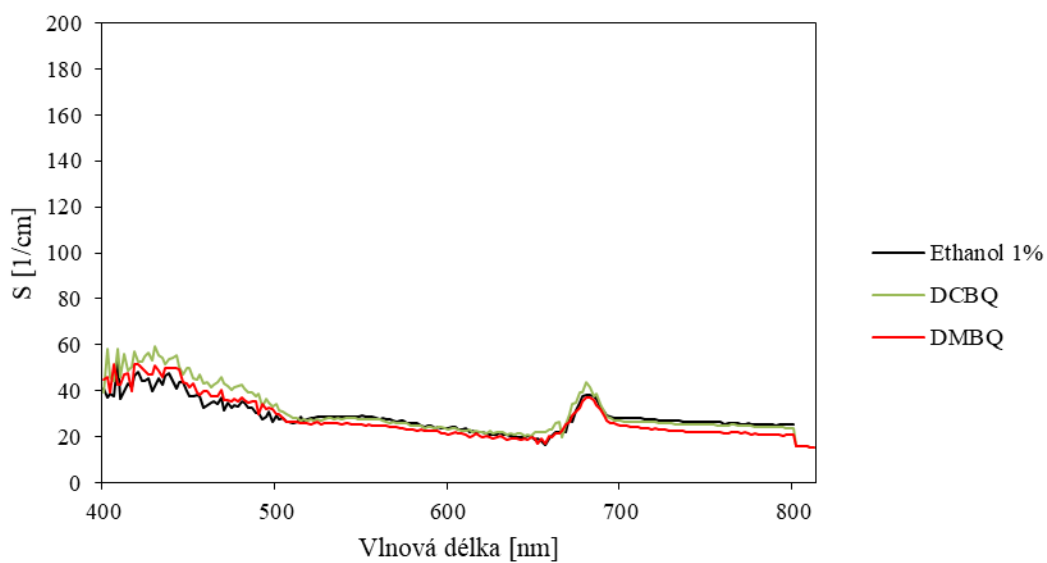
Graf 35: Spektra absorpčního koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200  $\mu\text{M}$  DCBQ a 200  $\mu\text{M}$  DMBQ.



Graf 36: Spektra absorpčního koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200  $\mu\text{M}$  DCBQ a 200  $\mu\text{M}$  DMBQ.



Graf 37: Spektra rozptylového koeficientu adaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200  $\mu\text{M}$  DCBQ a 200  $\mu\text{M}$  DMBQ.



Graf 38: Spektra rozptylového koeficientu abaxiální strany listu infiltrovaného 1% ethanolem, 200  $\mu\text{M}$  DCBQ a 200  $\mu\text{M}$  DMBQ.

U těchto dvou zhášeců je projev fluorescence u absorpčního koeficientu pro obě strany listu a také u rozptylového koeficientu pro abaxiální stranu listu nepatrný. Mírný pokles

fluorescence u peaku při 680 nm je u adaxiální strany listu. Námi zvolená koncentrace zhášeců DCBQ a DMBQ byla pravděpodobně příliš nízká, proto byl projev zhášení fluorescence nepatrný. V tomto případě měla být pravděpodobně koncentrace zhášeče vyšší, než námi zvolených 200  $\mu\text{M}$ .

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

## 5. Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem se zabýval problematikou zhášení fluorescence chlorofylu látkami příbuznými plastochinonu, který je účastněn při elektronovém transportu ve fotosystému II. Další zkoumanou chemickou látkou byl mitochondriální jed DCMU. V rámci experimentu byla změřena navíc koncentrační řada ethanolu, z toho důvodu, že vybrané chemické látky byly v ethanolu rozpouštěny.

Teoretická část byla věnována způsobu měření fluorescence, jejímu zhášení a chemickým látkám, které byly vybrány pro experiment. Dále byla popsána spektra difuzní odrazivosti a propustnosti.

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

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

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

byl proveden z časových důvodů pouze jednou, a proto k získaným výsledkům není doložena statistika.

## 6. Seznam použité literatury

### Literatura

Allen, William A., Harold W. Gausman a Arthur J. Richardson, 1973. Willstatter-Stoll theory of leaf reflectance evaluated by ray tracing, *Applied Optics*, 12(10):2448-2453.

Avery, George S., 1933. Structure and development of the tobacco leaf. *American Journal of Botany*, 20: 565-592.

Babula, Petr, Vojtěch Adam, Ladislav Havel a René Kizek, 2009. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones – their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis* [online]. 5(1), 47-68.

Babula, Petr, Veronika Vaverková, Zuzana Pobořilová, Ludmila Ballová, Michal Masařík a Ivo Provazník, 2014. Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. 84, 78-86.

Baránková, Barbora, Dušan Lazár a Jan Nauš, 2015. Analysis of the effect of chloroplast arrangement on optical properties of green tobacco leaves. *Remote Sensing of Environment*. 174. 181-196. 10.1016/j.rse.2015.12.011.

Benešová, Monika, 2014. Odlišná reakce inbredních a hybridních genotypů kukuřice na sucho: analýza listového proteomu a fotosyntetických procesů. Disertační práce. 173 s. Přírodovědecká fakulta UK.

Birth, Gerald S., Carl E. Davis and William E. Townsend, 1978. The Scatter Coefficient as Measure of Pork Quality. *Journal of Animal Science* 46:639-645.

Braslavsky, Silvia Elsa, 2006. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*[online]. 79(3), 293-465.

Bukhov, Nikolai G., Givondachary Sridharan, Elena A. Egorova a Robert Carpentier, 2003. Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: modulation of quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light-dark transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1604(2), pp. 115-123.

Eisner, Thomas, 2004. Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *Journal of Experimental Biology* [online]. 207(8), 1313-1321 .

Floreani, Maura., Angela Forlin, Stefano Bellin a Francesca Carpenedo, 1996. Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump as a target for benzoquinones. *General Pharmacology: The Vascular System* [online]. 27(5), 873-878.

Hlízová, Eliška, 2008. Využití fluorescence chlorofylu ke sledování fyziologického stavu

vegetace. Bakalářská práce. 34 s. Univerzita Karlova v Praze.

Hovi, Aarne, Petri Forsström, Matti Mõttus a Miina Rautiainen, 2017. Evaluation of Accuracy and Practical Applicability of Methods for Measuring Leaf Reflectance and Transmittance Spectra. *Remote Sensing* [online]. 24., vol. 10, no. 2, p. 25.

Chobot, Vladimír, Franz Hadacek, 2009. Milieu-Dependent Pro- and Antioxidant Activity of Juglone May Explain Linear and Nonlinear Effects on Seedling Development. *Journal of Chemical Ecology* [online]. 35(3), 383-390 .

Jacquemoud, Stephane a Frédéric Baret, 1990. PROSPECT: A model of leaf optical properties spectra. *Remote Sensing of Environment*[online]. 34(2), 75-91.

Kubelka, Paul a Franz Munch, 1931. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche, *Zeitschrift für Technische Physik*, 12:593-601.

Lakowicz, Joseph R., 2006. Mechanisms and Dynamics of Fluorescence Quenching. ISBN:978-0-387-31278-1

Lazár, Dušan a Pavel Pospíšil, 1999. Mathematical simulation of chlorophyll a fluorescence rise with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated barely leaves at room and high temperatures. *European Biophysics Journal*, 28(6), pp.468-477.

Maxwell, Kate a Giles N. Johnson, 1999. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 51, No. 345, pp. 659-668, April 2000.

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

Metropolis, Nicholas a Stan Ulam, 1949. The Monte Carlo Method. *Journal of the American Statistical Association*, vol. 44, no. 247, pp. 335-341.

Pavlová, Libuše, 2005. Fyziologie Rostlin. Praha: Karolinum. ISBN 8024609851.

Rieder, Mark, V. Kodeš, J. Halířová a D. Hypr, 2003. Výskyt a pohyb nebezpečných látek v hydrosféře ČR. Závěrečná zpráva projektu VaV/650/3/00, Praha: ČHMÚ, 141 s.

Richterová, Lenka, 2008. Reaktivní sloučeniny kyslíku. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně.

Roháček, Karel, Julie Soukupová a Miloš Barták, 2008.

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

Rolencová, Monika, 2006. Studium pohybu chloroplastů na intaktní rostlině. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

Slaton, Michèle R., E. Raymond Hunt a William K. Smith. Estimating near-infrared leaf reflectance from leaf structural characteristics. *American Journal of Botany* [online]. 2001, 88(2), 278-284

Sušila, Petr, Jan Nauš, 2007. A Monte Carlo study of the chlorophyll fluorescence emission and its effect on the leaf spectral reflectance and transmittance under various conditions. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 6(8), p.894

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

Wada, Masamitsu, 2013. Chloroplast movement. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. 210C. 177-182. 10.1016/j.plantsci.2013.05.016.

Wang, Lihong, Steven L. Jacques, Liqiong Zheng, 1995. MCML- Monte Carlo modeling of light transport in multilayered tissues. *Computer methods and programs in biomedicine* 47:131-146.

Williams, Richard Tecwyn a Bridges, James W., 1964. Fluorescence of solutions: A review. *Journal of clinical pathology*, 17(4), 371–394. doi:10.1136/jcp.17.4.371

Yang, Li, Tianming Cai, Dahu Ding, Tianjin Cai, Canlan Jiang, Hua Li, Qian Yang a Liwei Chen, 2017. Biodegradation of 2-hydroxyl-1,4 naphthoquinone (lawsone) by *Pseudomonas taiwanensis* LH-3 isolated from activated sludge. *Scientific Reports* [online], 7(1), - .

Zaborska, Wiesława, Mirosława Kot a Kinga Superata. Inhibition of Jack Bean Urease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the Inhibition Mechanism. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2008, 17(4), 247-253.

Zuo, Yu-Ting, Yu Hu, Wei-Wei Lu, Jing-Jing Cao, Fan Wang, Xue Han, Wen-Qing Lu a Ai-Lin Liu. Toxicity of 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone and five regulated drinking water disinfection by-products for the *Caenorhabditis elegans* nematode. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2017, 321, 456-463.

## Internetové zdroje

AppliChem. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine.

Dostupné z:

[https://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a3840\\_de.pdf](https://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a3840_de.pdf)

Fišar, Zdeněk, 2009. Principy fluorescenční spektroskopie [online].

<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>

Jacquemoud, Stephane, Susan L. USTIN, 2008. Modeling Leaf Optical Properties

Dostupné z:

[http://photobiology.info/Jacq\\_Ustin.html](http://photobiology.info/Jacq_Ustin.html)

LI-COR, 1985. Manuál k zařízení LI-1800-12.

Dostupné z:

<https://www.licor.com/documents/c0vkjb20o7r4lekvm21p>

Pubchem Compound Database, Diuron.

Dostupné z:

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

Reaxys. 2,5-dimethylbenzoquinone.

Dostupné z:

[https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H027\\_\\_227032781373040713/SDAyNz1TI0gwMjk9QyNIMDI4PVI=/list/1562682056519/1/desc/IDE.NUMREF///limit](https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H027__227032781373040713/SDAyNz1TI0gwMjk9QyNIMDI4PVI=/list/1562682056519/1/desc/IDE.NUMREF///limit)

Reaxys. 2,6-dichloro-p-benzoquinone.

Dostupné z:

[https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H001\\_\\_227032781373040713/SDAwMT1TI0gwMDI9QyNIMDA0PVI=/list/1562679131320/1/desc/IDE.NUMREF///](https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H001__227032781373040713/SDAwMT1TI0gwMDI9QyNIMDA0PVI=/list/1562679131320/1/desc/IDE.NUMREF///)

Reaxys. 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone.

Dostupné z:

[https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H037\\_\\_227032781373040713/SDAzNz1TI0gwMzg9Qy-NIMDM5PVI=/list/1562683137349/1/desc/IDE.NUMREF///limit](https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H037__227032781373040713/SDAzNz1TI0gwMzg9Qy-NIMDM5PVI=/list/1562683137349/1/desc/IDE.NUMREF///limit)

Reaxys. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

Dostupné z:

[https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H045\\_\\_227032781373040713/SDA0NT1TI0gwNDY9Qy-NIMDQ3PVI=/list/1562683349189/1/desc/IDE.NUMREF///limit](https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H045__227032781373040713/SDA0NT1TI0gwNDY9Qy-NIMDQ3PVI=/list/1562683349189/1/desc/IDE.NUMREF///limit)

Reaxys, Diuron

Dostupné z:

[https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/RX002\\_\\_4752216827226398830/UI-gwMDI9UyNIMDA2PUMjSDAwND1S/list/1562603085777/1/desc/IDE.NUMREF///](https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/RX002__4752216827226398830/UI-gwMDI9UyNIMDA2PUMjSDAwND1S/list/1562603085777/1/desc/IDE.NUMREF///)

Sigma-Aldrich. 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone.

Dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/431982?lang=en&ion=CZ>

Sigma-Aldrich. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine.

Dostupné z:

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t2885?lang=en&ion=CZ&gclid=CjwKCAjwyrvaBRA-CEiwAcyuzRK7QzF64boOqEsZIYVm4tOp36zojrYwQ5z4VzhxHGRQQmxsdhiravhoCL3kQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t2885?lang=en&ion=CZ&gclid=CjwKCAjwyrvaBRA-CEiwAcyuzRK7QzF64boOqEsZIYVm4tOp36zojrYwQ5z4VzhxHGRQQmxsdhiravhoCL3kQAvD_BwE)

Storz, 2017. Prezentace k světelným zdrojům vyrobeným společností Storz.

Dostupné z:

[https://www.karlstorz.com/cps/rde/xbcr/karlstorz\\_assets/ASSETS/2974490.pdf](https://www.karlstorz.com/cps/rde/xbcr/karlstorz_assets/ASSETS/2974490.pdf)