

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



**Fakulta lesnická
a dřevařská**

**Využití parametrů fluorescence chlorofylu pro
posuzování fyziologického
stavu lesních dřevin**

Bakalářská práce

Adriana Dobšíková

RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D.

2022/2023

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Adriana Dobšíková

Lesnictví
Ochrana a pěstování lesních ekosystémů

Název práce

Využití parametrů fluorescence chlorofylu pro posuzování fyziologického stavu lesních dřevin

Název anglicky

Utilisation of chlorophyll fluorescence parameters for physiological status assessment in forest trees

Cíle práce

Cílem práce bude vytvořit rešerši mapující současné poznatky ve využití diagnostických metod založených na fluorescenci chlorofylu pro určování fyziologického stavu a zejména různých stresů lesních dřevin a případnou predikci jejich následné odolnosti či růstových parametrů. Součástí práce bude také praktická část, kde autorka provede měření fluorescence chlorofylu a určí hodnoty indexů u rostlin vystavených stresovým podmínkám.

Metodika

Rešerše bude založena na shromáždění a zpracování recenzovaných vědeckých článků, které využívají různé parametry fluorescence chlorofylu k odhalování stresu u lesních dřevin.

V rámci praktické části bude probíhat opakované měření fluorescence u rostlin vystavených stresu a kontrolních rostlin beze stresu a porovnání citlivosti těchto ukazatelů.

Hlavní těžiště práce bude spočívat v rešerši části, praktická část bude převážně ilustrativní a zajistí praktickou zkušenost se zpracovávanou tematikou.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

Fluorescence chlorofylu, OJIP, stress, sucho, lesní dřeviny

Doporučené zdroje informací

Bantis, F., et al. "The OJIP test as a tool for forestry in times of climate change." *Photosynthetica* 58 (2019): 224-236.

Čepl, Jaroslav, et al. "Genetic variability and heritability of chlorophyll a fluorescence parameters in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.)." *Tree physiology* 36.7 (2016): 883-895.

Goltsev, V. N., et al. "Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus." *Russian Journal of plant physiology* 63.6 (2016): 869-893.

Pollastrini, M., et al. "Chlorophyll a fluorescence analysis in forests." *Annali di Botanica* 6 (2016): 23-37.

Stirbet, Alexandrina. "On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104.1-2 (2011): 236-257.

Předběžný termín obhajoby

2022/23 LS – FLD

Vedoucí práce

RNDr. Jaroslav Čepl, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 31. 8. 2022

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 31. 8. 2022

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 04. 04. 2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití parametrů fluorescence chlorofylu pro posuzování fyziologického stavu lesních dřevin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze, dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Jaroslavu Čeplovi, Ph.D. za pomoc, za jeho poskytnutý čas, ochotu, trpělivost a mimo jiné za drahocenné rady a věcné připomínky, které mi poskytoval v průběhu vypracování této bakalářské práce a také doc. Ing. Ivaně Tomáškové, Ph.D. za zapůjčení spektrometru FluorPen FP 110.

Využití parametrů fluorescence chlorofylu pro posuzování fyziologického stavu lesních dřevin

Abstrakt

Metoda měření fluorescence chlorofylu je rychlá, nedestruktivní, spolehlivá a jednoduchá a v posledních letech se stále více využívá k posuzování fyziologického stavu a sledování fotosyntetického výkonu u řas, rostlin i lesních dřevin. Měření fluorescence chlorofylu umožňuje poskytnout informace o změnách (především poklesu) aktivity fotosyntetického aparátu listu během vystavení rostliny stresovým podmínkám. Umožňuje nejen zjistit, jak lze fluorescenční parametry použít k hodnocení změn ve fotochemii fotosystému II (PSII), lineárního toku elektronů a asimilace CO₂ *in vivo*, ale nastiňuje teoretické základy pro použití konkrétních fluorescenčních parametrů. Rostlina totiž za optimálního stavu (tj. za nestresových podmínek) využívá výrazně větší množství absorbované energie pro fotosyntézu. Mezi nejdůležitější stresory patří: nedostatek světla, sucho, nízké či vysoké teploty, poškození herbicidy či nedostatek živin.

V rámci této práce byly analyzovány vypěstované ze semen rostliny olše lepkavé (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), pocházející z České republiky, které byly pěstovány od semínka v růstových komorách a zároveň některé z nich byly vystaveny stresovým podmínkám – suchu. Navíc byly testovány komerčně dostupné kolíčky pro měření fluorescence a porovnány s kolíčky, které byly zhotovené v laboratoři na 3D tiskárně. Výsledky měření po vytvoření OJIP křivek prokázaly, že obě listové svorky jsou použitelné, avšak mezi hodnotami fluorescence chlorofylu obou kolíčků jsou malé odlišnosti. Také byly provedeny výpočty z dat pomocí různých statistických metod. Následně výsledky byly interpretovány do grafů a tabulek.

Klíčová slova: fluorescence chlorofylu, OJIP, stres, sucho, lesní dřeviny

Utilisation of chlorophyll fluorescence parameters for physiological status assessment on forest trees

Summary

The chlorophyll fluorescence measurement method is fast, non-destructive, reliable and simple and has been increasingly used in recent years to assess the physiological status and monitor photosynthetic performance in algae, plants and forest trees. Chlorophyll fluorescence measurements can provide information on changes (especially decline) in the activity of the photosynthetic apparatus of the leaf during exposure of the plant to stress conditions. Not only does it allow us to determine how fluorescence parameters can be used to assess changes in photosystem II (PSII) photochemistry, linear electron flow and CO₂ assimilation in vivo, but it outlines the theoretical basis for the use of specific fluorescence parameters. This is because the plant uses significantly more absorbed energy for photosynthesis under optimal conditions (i.e. under non-stress conditions). The most important stressors are: lack of light, drought, low or high temperatures, herbicide damage or nutrient deficiency.

In this work, the plants grown from the seeds of the sticky alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), originating from the Czech Republic, were analysed, which were grown from seed in growth chambers and at the same time some of them were exposed to stress conditions – drought. In addition, commercially available pegs were tested for fluorescence measurements and compared with pegs that were made in the laboratory on a 3D printer. The results of the measurements after creating OJIP curves showed that both leaf clips were usable, but there were small differences between the chlorophyll fluorescence values of the two pins. Also, calculations were made from the data using various statistical methods. Subsequently, the results were interpreted into graphs and tables.

Keywords: chlorophyll fluorescence, OJIP, stress, drought, forest tree species

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíl práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Fotosyntéza	11
3.2	Fluorescence chlorofylu	12
3.2.1	Měření fluorescence chlorofylu.....	14
3.2.2	Metody měření fluorescence a OJIP křivka.....	16
3.2.3	Používané parametry měření fluorescenci chlorofylu.....	20
3.2.4	Stres u lesních dřevin.....	21
3.2.5	Reakce fotosystémů na stres podle jeho původu.....	24
4	Metodika	26
4.1	Rostliny použité při výzkumu	26
4.1.1	Použití měřicího přístroje FluorPen FP 110.....	26
4.1.2	Průběh vlastního měření.....	29
5	Výsledky	34
5.1	OJIP křivky	35
5.2	Indexy	37
6	Diskuze	41
7	Závěr	43
8	Literatura	45
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	50

1 Úvod

Vzhledem k všudypřítomné globální klimatické změně přichází i v lesních ekosystémech řada stresových faktorů, kdy predikce do budoucna není příznivá. Jedná se především o zvýšení tepelného stresu v rostlinách. Je proto nutné monitorovat stres rostlin a sledovat jejich reakce na zvyšující se teplotu a zjišťovat, jak se na tento stres dokáží adaptovat. K tomuto zjišťování nám může posloužit poměrně dobře měření fluorescence chlorofylu, které nám přináší data, z nichž lze vypožorovat, jak na stres dřeviny reagují (Hasanuzzaman et al. 2013).

Měření fluorescence chlorofylu má širokou škálu využití. Díky tomu lze zhodnotit zdravotní stav rostliny, je možné zjistit fungování fotosyntézy a identifikovat rostlinnou reakci na stres. Měření fluorescence je hojně používané kvůli své jednoduchosti, nedestruktivnosti pro rostlinu a uživatelské přístupnosti. Je to rychlý nástroj pro analýzu fotosyntetických reakcí závislých na světle, poskytovatel informací o fyziologickém stavu rostlin (Silva 2016).

Nejčastěji se metoda měření fluorescence používá spolu s osvětlením vzorku, který byl nejprve adaptovaný tmou, což docílí, že všechny chlorofyl bude při měření v základním stavu. Tímto měřením lze získat polyfázovou křivkou indukce fluorescence chlorofylu (O-J-I-P) (H. M. Kalaji et al. 2016). Právě ona kinetika slouží, jako účinný indikátor negativních dopadů změny klimatu a lidských činností (nízké a vysoké teploty, sucho, nedostatek živin, salinita a zastoupení těžkých kovů v půdě (Govindjee and Papageorgiou 2004).

V rámci práce byly vypěstovány sazenice olše lepkavé (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) z uznaného porostu v blízkosti Moravského Šternberka. Po naklíčení byla semena přesunuta do sadbovačů, a ty pak byly umístěny do růstových komor, kde jim byly vytvořeny ideální podmínky pro růst, kdy některé rostliny byly vystaveny vodnímu stresu. Na rostlinách bylo provedeno měření fluorescence chlorofylu pomocí FluorPenu FP 110. Naměřená data byla poté zpracována do formy grafů (kde byly vytvořeny OJIP křivky) a také byly použity statistické výpočty a program Statistica 14 od firmy TIBCO, kde byly vytvořeny další grafy a tabulky za pomoci získaných parametrů.

Dále byl vytvořen nový typ listové svorky, který je nezbytný pro měření za pomoci FluorPenu. Jednotlivé části listové svorky byly zkonstruovány a poté vytisknuty na 3D tiskárně. Po spojení všech jejich částí byly tyto nové kulaté listové svorky použity zároveň s originálními podlouhlými svorkami pro měření prostřednictvím FluorPenus.

2 Cíl práce

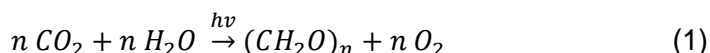
Cílem práce bude vytvořit rešerši z recenzovaných článků z mezinárodních časopisů, která mapuje současné poznatky ve využití diagnostických metod založených na fluorescenci chlorofylu pro určování fyziologického stavu a zejména různých stresů lesních dřevin a případnou predikce jejich následné odolnosti či růstových parametrů. V rámci této práce bude zahrnuta rešerše studií, které využívají různé parametry fluorescence chlorofylu k odhalování stresu lesních dřevin.

Součástí práce bude také praktická část, kde bude provedeno opakované měření fluorescence chlorofylu u rostlin vystavených stresu a kontrolních rostlin beze stresu a následné porovnání těchto ukazatelů. Budou určeny hodnoty indexů u rostlin vystavených stresovým podmínkám a porovnány s rostlinami beze stresu. Zároveň zde bude ověřena spolehlivost při měření s originálními listovými svorkami a listovými svorkami vytisknutými na 3D tiskárně a budou porovnány.

3 Literární řešerše

3.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je klíčovým dějem, který probíhá nejen v eukaryotních organismech, ale její schopnost mají také prokaryotní organismy (sinice, purpurové či zelené bakterie). V rámci tohoto děje dochází k přeměně energie získané ze světleného záření na energii chemickou, která je následně využita k asimilaci CO_2 . Fotosyntéza lze vyjádřit pomocí rovnice (1):



Ve které vystupuje hv jako kvantum energie ze světelného záření, za jehož přítomnosti a CO_2 a H_2O dochází ke vzniku organických látek $(CH_2O)_n$ a současného uvolnění molekulárního O_2 . Tato reakce probíhá v chloroplastech v membráně tylakoidů (Hohmann-Marriott, 2011).

Průběh fotosyntézy probíhá ve dvou fázích, a to ve světlené a v temnostní fázi. Ve světlené fázi (tzv. primární) jsou probíhající reakce závislé na světle a probíhají v tzv. fotosystémech v tylakoidech. Jedná se o transmembránové proteinové komplexy, na které jsou vázány přenašeče elektronů. V primární fázi fotosyntézy dochází k přeměně světelné energie (toku fotonů) na energii chemickou a to ve formě NADPH a ATP. Nejprve dochází k zachycení světla pomocí rostlinných pigmentů, tj. chlorofyl *a* a *b*.

Primární fáze se účastní celkem dva fotosystémy. Fotosystém I (PSI) je bohatší na rostlinné pigmenty než fotosystém II a převládá v něm chlorofyl *a* nad chlorofylem *b* asi v poměru 1:10. Pigmentem reakčního centra je chlorofyl *a*, jehož absorbanční maximum je okolo vlnové délky 700 nm (P700), ostatní pigmenty jsou pomocné a mají funkci světlosběrných komplexů (Grabolle, 2005). Chlorofyl P700 přejde pohlcením záření do excitovaného stavu a zároveň uvolní dva elektrony, ty jsou následně využity k redukci koenzymu NADP (2) a cyklické fosforylaci (3).

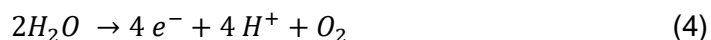


Koenzymy NADPH jsou následně využity k temnostní fázi.



Fotosystém II (PSII) obsahuje více pigmentů absorbujících světlo při kratších vlnových délkách a převládá zde chlorofyl *b* nad chlorofylem *a* - asi v poměru 2:1. Terminálním pigmentem je chlorofyl *a* s absorpčním maximem při 680 nm (P680). Tento pigment je jako jediný schopen přeměnit energii světelného záření na

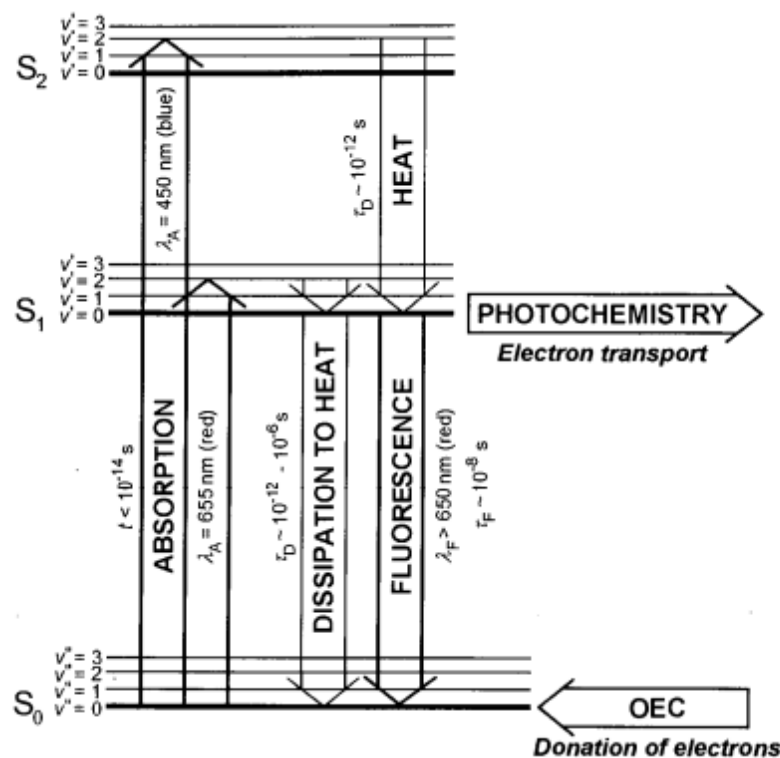
chemickou. Je schopen přenosu elektronů z vody (za současného vzniku molekulárního kyslíku a protonů) (4) na plastochinon a ten se redukuje na plastochinol.



Sekundární fáze fotosyntézy neboli temnostní fáze může probíhat i bez přístupu světelného záření. Je lokalizována ve stromatu, což je základní hmota chloroplastů, a dochází v ní k redukci oxidu uhličitého na sacharid D-glukosu za přítomnosti redukovaných koenzymů NADPH + H⁺ a ATP. Ty jsou získány z primární fáze fotosyntézy (Grabolle and Dau 2005).

3.2 Fluorescence chlorofylu

Fluorescence chlorofylu je jev, při němž dochází k absorpci energie dopadajícího záření molekulami chlorofylu a jeho následnou emisí záření o vyšší vlnové délce v oblasti viditelného světla (obr. 1) (Buschmann et al. 1994). Světelná energie, která je absorbovaná pomocí molekul chlorofylu v listech a po absorpci dochází k jedné ze tří možností spotřebování. Energie může být rozptýlena, jako teplo, může být využita prostřednictvím fotosyntézy a v poslední řadě může být vyzářena znovu jako světelná fluorescence chlorofylu čili v podobě záření s vlnovou délkou větší než 650 nm. Tyto tři možnosti využití přebytečné energie si navzájem konkurují, to znamená, že když se první využití zvýší, druhé a třetí využití se naopak sníží. Celkové množství fluorescence chlorofylu je velmi malé. Jsou to pouze 1 nebo 2 % celkového absorbovaného světla), za to její měření je poměrně snadné (Maxwell and Johnson 2000).



Obr. 1 Zjednodušené schéma využití excitační energie v chlorofylu rostliny, (Roháček and Barták 1999)

Jak už bylo řečeno, tyto procesy si navzájem konkurují, a přestože celkové množství fluorescence chlorofylu je velmi malé (Barber et al. 1989; Brody and Rabinowitch 1957; Latimer et al. 1956) (pouze až 5 % celkového absorbovaného světla) lze z něj vyvodit, jakou část záření rostlina využívá. Se změnami intenzity fluorescence se mění také účinnost fotochemických reakcí v tzv. primární fotosyntéze – zachycení fotonů, excitování molekul chlorofylu a uvolnění energeticky bohatých elektronů. Z těchto energeticky obohacených elektronů je energie předána a uložena do vazeb v molekulách ATP a NADPH₂. Pokud je účinnost fotosyntézy vysoká, je intenzita fluorescence nízká a naopak. Listy zdravých rostlin využijí kolem 80 % pro fotochemii, 15 % vyzáří v podobě tepla a 3–5 % je vyzářeno v podobě fluorescence (Walker and Walker 1987).

Fluorescenci můžeme měřit v různých spektrálních oblastech, avšak v případě fluorescence chlorofylu využíváme především fluorescenci při vlnové délce 690 nm. Spektrum fluorescence se liší od spektra absorbovaného světla, přičemž emisní maximum fluorescence má delší vlnovou délku než absorpce. Proto lze výtěžnost fluorescence kvantifikovat vystavením listu světlu o definované

vlnové délce a měřením množství světla opětovně emitovaného při delších vlnových délkách.

Fluorescence chlorofylu není stálý parametr, ale mění se v čase v závislosti na fotochemických reakcích a teplotních procesech. Využívá jako indikátor fotosyntetické přeměny u rostlin, řas a bakterií a bývá využíváno k detekci stresu za nepříznivých podmínek.

Procesy fotosyntézy jsou v rostlinách velice citlivé, ukazují na sezónní a vývojové změny a také reagují na stresy vyvolané prostředím. Pro měření těchto procesů používáme právě často pro rostlinu nedestruktivní a rychlou metodu, která dokáže poskytnout řadu indikátorů stavu rostliny, jakož je právě fluorescence chlorofylu (Mohammed et al. 1995).

3.2.1 Měření fluorescence chlorofylu

Pro analýzu rostlin je nezbytné použít metody adekvátního hodnocení určitých procesů, které probíhají v rostlině za různorodých podmínek a také v různém prostředí, které rostlinu v průběhu jejího života ovlivňují. Tyto reakce jsou poskytovateli důvěryhodných informací o stavu rostlin (Goltsev et al. 2016).

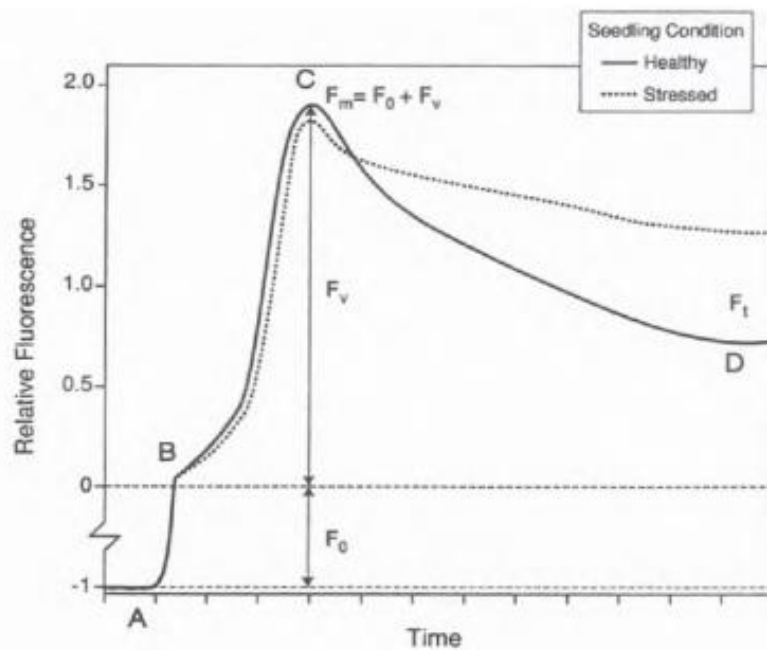
V současné době je fluorescence chlorofylu využívána jako nedestruktivní, rychlý a vysoce citlivý diagnostický nástroj ve výzkumu fotosyntézy, který se díky přenosným přístrojům dá uplatnit i v terénu. Nevýhodou je zejména nespecifita reakce, tzn., že reakce je stejná na různé typy stresových podnětů, což omezuje použití této metody pro dokázání působení specifického faktoru, zejména pokud faktorů spolupůsobí více. Využití metody měření fluorescence je hojně rozšířeno ve fyziologických a ekofyziologických studiích. Tato metoda může poskytnout nejen údaje o schopnosti rostlin tolerovat stresy prostředí, ale i o rozsahu v jakém poškozují fotosyntetický aparát. Jedním z významných stresorů je znečištění ovzduší, kdy je měření fluorescence využíváno pro zjištění účinků imisí (především ozonu) na asimilační aparát. Jako další stresor je vliv vysoké teploty, mráz či vliv vodního stresu (Maxwell and Johnson 2000).

Nejčastěji se metoda měření fluorescence chlorofylu využívá při sledování reakce na osvětlení listů. Listy jsou před osvětlením ponechány ve tmě po dobu minimálně 20 min, čímž se zajišťeno, že všechen chlorofyl je v základní stavu. Tento stav je charakteristický minimální hodnotou fluorescence (F_0). Po osvětlení

dochází k rychlému nárůstu (v řádu 100–200 ms) fluorescence fotosystému II (PSII, photosystem II), kdy dochází k rychlému zaplnění všech akceptorů a reakčních center fotosystému elektrony. V tomto stadiu dosahuje fluorescence k maximální hodnotě (F_M). Následně jsou aktivovány fotochemické procesy – většina absorbované energie je využita při přenosu elektronů a protonů z vody na nikotin-adenin-dinukleotidfosfát (NADP+) a při fosforylaci adenosindifosfátu (ADP) na adenosintrifosfát (ATP) (Govindjee and Papageorgiou 2004). Oba jsou nezbytné pro včlenění fixovaného atmosférického CO_2 do molekul sacharózy pomocí enzymů Calvin-Bensonova cyklu. Tímto je uvolňován prostor pro další příjem energie a postupně tak nastává ustálený stav příjmu a zpracování energie.

Tento jev nazýváme Kautského efekt a poprvé ho pozorovali Kautsky a Hirsch v roce 1932 (Kautsky and Hirsch 1931). Nárůst fluorescence je způsoben tím, že reakční centra PSII jsou v uzavřeném neboli chemicky redukovaném stavu. To se děje tehdy, když nejsou schopna přijímat další elektrony. Tento stav nastává, když akceptory elektronů PSII ještě nepředaly své elektrony následnému nosiči elektronů, a tak nejsou schopna přijmout další elektron. Uzavřená centra snižují celkovou fotochemickou účinnost a zvyšují tak úroveň fluorescence. Přejít ze tmy na světlo zvyšuje podíl uzavřených reakčních center PSII a úroveň fluorescence se na 1–2 s zvýší. Následně fluorescence během několika minut klesá, což je způsobeno: větším fotochemickým zhášením, při kterém jsou elektrony transportovány pryč z PSII nebo větším nefotochemickým zhášením, při kterém se více energie přemění na teplo (Stirbet and Govindjee 2011).

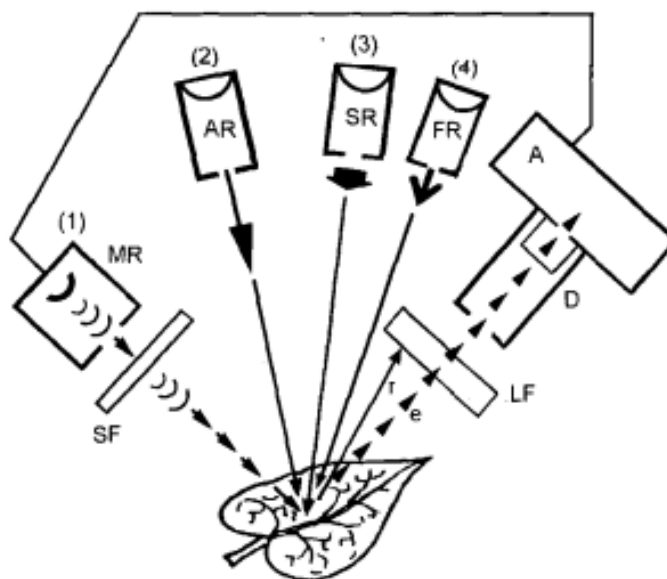
Grafické závislosti průběhu intenzity fluorescence po osvětlení listu adaptovaného na tmu na čas se označují jako fluorescenční indukční (Kautského) křivka (FIK). Mezi nejdůležitější diagnostický prvek FIK je poměr F_M/F_V , kde F_V je proměnlivá fluorescence vypočtená jako rozdíl mezi F_M a F_0 . Poměr F_M/F_V označujeme jako maximální kvantový výtěžek fluorescence a poskytuje odhad účinnosti procesu fotosyntézy. Kautského efekt je pozorovatelný pouze za optimálních podmínek, v případě vlivu stresu, kdy nastává narušení nebo úplná inhibice fotosyntetické kvantové konverze, je intenzita fluorescence vysoká a pokles hodnot z maximální fluorescence (F_M) na ustálený stav (F_S) je méně výrazný, pomalý nebo úplně chybí (obr. 2) (H. K. Lichtenthaler et al. 1998; Ritchie 2006).



Obr. 2 Indukční křivka fluorescence chlorofylu rostliny při optimálních podmínkách (plná čára) a při vystavení stresovým podmínkám (přerušovaná čára). (Ritchie 2006)

3.2.2 Metody měření fluorescence a OJIP křivka

Nejčastějším způsobem pro měření fluorescence chlorofylu je ozáření listů rostlin adaptovaných na tmu. K měření se používají fluorometry, které pracují na principu pulzní amplitudové modulace (PAM) (Schreiber et al. 1986) a doplněné o metodu saturačních pulzů umožňují získat důležité informace o fungování fotosyntetického aparátu rostlin. Měření probíhá tak, že vzorek je osvětlován několika krátkými pulsy a slabými pulsy měřicího světla, jenž vyvolává stejně krátké záblesky fluorescence (pulsní modulace). Vzorek se v průběhu měření navíc osvětluje aktinickým nebo saturačním světlem, které je schopno vyvolat změnu v intenzitě fluorescenčního signálu (amplitudová modulace). Fluorometr PAM (obr. 3) se obvykle skládá ze čtyř světelných zdrojů, které poskytují kvantitativně odlišné záření vyvolávající změny v redoxním stavu složek elektronového transportního řetězce (Pollastrini et al. 2016).



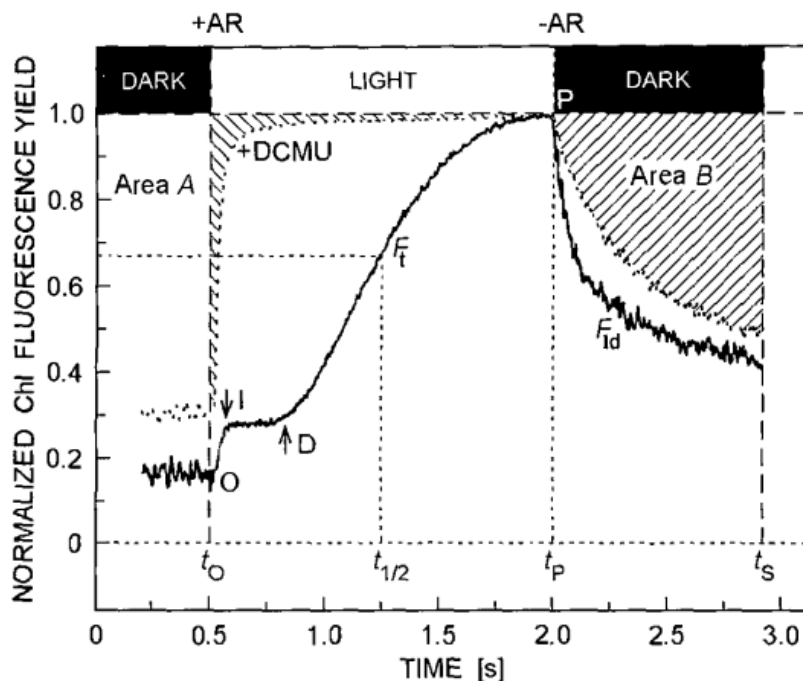
Obr.3 Schéma fluorometru PAM pro detekci fluorescence chlorofylu. Na obrázku je znázorněn zesilovač (A), zdroj aktinického záření (AR), zdroj dalekého červeného záření (FR), zdroj měřicího záření (MR), zdroj saturačních pulsů (SR), detektor (D), emise modulované fluorescence chlorofylu (e), r (odražené záření), filtr propouštějící záření o delší vlnové délce ($\lambda > 700 \text{ nm}$) (LF), filtr propouštějící záření o kratší vlnové délce ($\lambda < 670 \text{ nm}$), (Roháček and Bartak 1999).

Pro indukci fluorescence je využíváno excitační záření z LED diod, a to modré (455 nm) nebo červené (590–620 nm) záření, fluorescence chlorofylu je pak zaznamenávána při 680–690 nm. Druhým zdrojem světla je slabé aktinické záření (modré nebo červené, s vlnovou délkou do 620 nm), kterým často bývá LED nebo halogenová lampa. Třetím zdrojem světla je silnější saturační světlo (modré, červené nebo bílé, s vlnovou délkou do 620 nm), které se využívá jako zdroj krátkých pulsů s délkou trvání 0,3–1,2 s a zdrojem bývá nejčastěji halogenová lampa. Posledním zdrojem světla je daleké červené záření s vlnovou délkou 735 nm a používá se k podpoře aktivity PSI, což vede k rychlé reoxidaci. Fluorescenční odezva je pak zaznamenávána na citlivém detektoru, který je vybaven optickým filtrem pro selekci záblesků indukované fluorescence chlorofylu.

Výsledkem měření je křivka kinetiky fluorescence chlorofylu (obr. 4), ta má u zdravých vzorků v optimálním stavu typický tvar a lze z ní určit hodnotu základní fluorescence F_0 neboli minimální výtěžek fluorescence (souvislost s množstvím chlorofylu a funkčních fotosystémů ve vzorku, je konstantní hodnota), maximální hodnota fluorescence F_M (souvisí s množstvím funkčních fotosystémů) a další parametry, které jsou spjaty s procesy fotosyntézy a její primární fáze.

Na obr. 4 je znázorněna FIK listu fazolu, který byl nejdříve adaptován v temnotní fázi, osvětlen a následně navrácen do temnotně adaptovaného stavu.

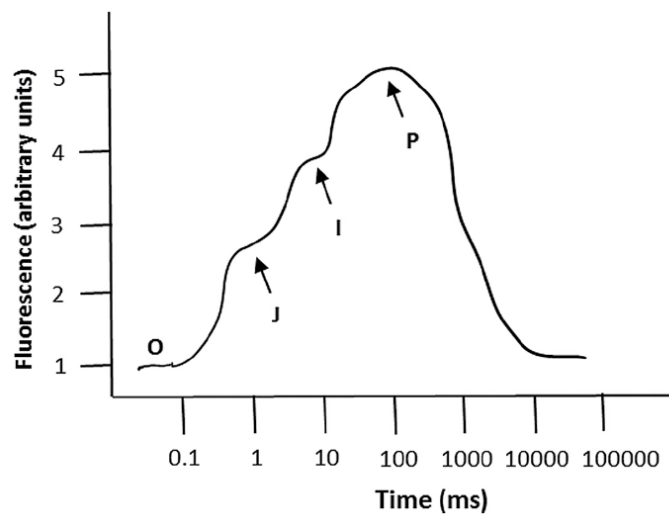
Mezi nejvíce využívaný parametr lze zařadit poměr F_v/F_M – jeho hodnota nabývá v rozsahu 0–0,823 a udává maximální kapacitu fotosystémů PS II, tzv. maximální kvantový výtěžek PSII.



Obr. 4 Fluorescenční indukční křivka (FIK) zaznamenaná fluorometrem PAM-2000 na listu fazolu *in vivo*. Se znázornění zapnutí a vypnutí (+MR/-MR) měřícího záření, zapnutí a vypnutí aktinického záření (+AR/-AR), spuštění saturačního pulzu (SP). Bylo použito normování FIK na maximum fluorescence chlorofylu (FM), (Roháček and Bartak 1999).

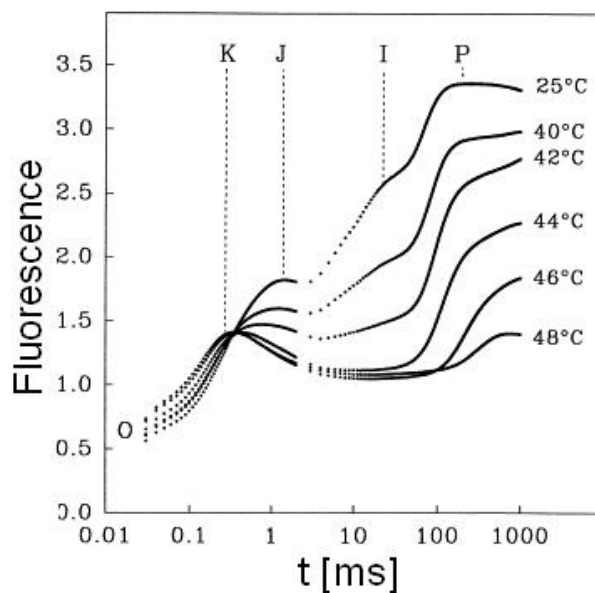
Při náhlém světelném ozáření fotosyntetického aparátu dochází k rychlému přechodu fluorescence chlorofylu z temnotně adaptovaného stavu. Tento přechod je rychlý v řádech několika málo sekund a je definován jako rychlá fáze fluorescenční indukce. Výsledná vzniklá křivka fluorescenční indukce má většinou OJIP průběh a její tvar závisí na stavu použitého vzorku a intenzitě záření. Křivku můžeme rozdělit do několika oblastí:

- O = počátek (origin), základní hladina fluorescence chlorofylu, F_0 ;
- J a I = rovnovážné stavy mezi dodání energie do PSII a tokem energie z PSII pomocí redoxní kaskády chinonů a dalších akceptorů, nastávají zhruba od 3–30 ms po ozáření vzorku aktinickým světlem;
- P = vrchol (peak), odpovídá maximální hodnotě fluorescence chlorofylu při ozáření FM, obvykle bývá dosažena při 200–500 ms.



Obr. 5 Rychlá fáze fluorescenční indukce (OJIP křivka), kdy vidíme na ose x znázorněn čas v milisekundách a na ose y znázorněnou fluorescenci. (Silva 2016).

Při vystavení rostliny teplotnímu stresu se vyskytuje nová vlna mezi vrcholy O a J označována jako K, ta se vyskytuje okolo 300 μ s (Guisse et al. 1995; Srivastava et al. 1997).



Obr. 6 Závislost výskytu vlny K na teplotě. Listy byly zahřívány při uvedených teplotách po dobu 5 min a před měřením byly znovu adaptovány při pokojové teplotě po dobu 10 s, kdy na ose x je znázorněn chlorofyl a intenzita fluorescenci a dále na ose y je znázorněn čas. (Srivastava et al. 1997).

Na základě O-J-I-P křivky byl v roce 1995 zaveden tzv. JIP-test (B. Strasser and Strasser 1995). Jedná se o test, který je schopen kvantitativně stanovit biofyzikální a fenomenologické parametry. Spolu s O-J-I-P křivkou fluorescence chlorofylu se používají k *in vivo* vyšetřování PSII v oblasti výzkumu životního prostředí se zaměřením zejména na stresové faktory (Appenroth et al. 2001; R. J. Strasser et al. 2007).

3.2.3 Používané parametry měření fluorescence chlorofylu

Nejčastějším využívaným parametrem pro odhalení stresoru u rostlin z dat, které byly získány z měření fluorescence chlorofylu je maximální kvantový výtěžek. Jedná se o poměr F_v/F_m , tedy podíl mezi F_v – variabilní fluorescenci a F_m – maximální fluorescencí. Výhody využití spočívají v rychlosti a poměrně jednoduchosti pro určení fyziologického stresu. Díky němu lze snadno určit případné snížení či poškození funkce reakčních center PSII. Pokud je rostlina zdravá a není nijak poškozená nebo ovlivněná v negativním slova smyslu, tento poměr dosahuje hodnot 0,83. Avšak pokud je rostlina a její reakční centrum nějakým způsobem poškozeno, dojde ke snížení hodnoty F_v/F_m (Maxwell and Johnson 2000).

Další parametrem, který je hojně využíván je kinetika indukce fluorescence chlorofylu – OJIP křivka. OJIP křivku lze získat pomocí osvětlení fotosyntetického vzorku, který byl předtím adaptován na tmu. Samotný průběh křivky je poskytovatelem mnohých informací o funkci a struktuře celého fotosyntetického aparátu. Celá metoda je založená zaznamenání přechodu fluorescence chlorofylu. Přechody neboli jednotlivé fáze lze rozdělit do částí, kdy v jednom bodě začínají a ve druhém následujícím bodě zase končí. Jedná se průběh O-J-I-P, kdy prvopočáteční bod O reprezentuje minimální fluorescenci F_0 , stejně tak P bod reprezentuje maximální fluorescenci F_m . J bod se zjeví při 2–3 ms. Bod I pak při 30-50 ms (H. M. Kalaji et al. 2016).

3.2.4 Stres u lesních dřevin

Mezi stres lesních dřevin je považován jakýkoli nepříznivý stav či nepříznivá látka, která blokuje metabolismus rostliny, ovlivňuje vývoj a její růst. Stres rostlin je vyvolán biotickými, abiotickými i antropogenními faktory. Poškození a stresové stavy je možné zjistit za pomoci klasických ekofyziologických metod. Mezi klasické ekofyziologické metody lze zařadit například měření rychlosti fotosyntézy, transpirace, průchodnosti průduchů, respirace a vodního potenciálu (Lichtenthaler 1996).

V poslední době byly zpopularizovány metody, které jsou neinvazivní k dané rostlině a snímají různé parametry chlorofylu. Mezi stresy rostlin lze zařadit vysokou intenzitu záření, vysoké a nízké teploty, pozdní a náhle mrazy, nedostatek či přebytek vody, nedostatek minerálních látek, kyselá pH půdy i vody, nadbytek dusíku, těžké kovy v půdě, činnost hmyzu, hub, bakteriálních či virových patogenů, různé pesticidy, fungicidy, herbicidy, další látky znečišťující ovzduší a mnoho dalších faktorů způsobujících za jistých okolností stres lesních dřevin. Obvykle na rostliny působí hned několik stresů najednou a jen málokdy působí jen jeden. Většinou se jedná o kombinace tepla, sucha a vysokého ozáření v letních měsících (Lichtenthaler and Rinderle 1988).

Lichtenthaler rozpracoval koncept stresu u rostlin a rozlišil mezi eustresem a distresem. Eustres je aktivační, stimulační stres a pozitivní prvek pro vývoj rostlin, zatímco distres je silný a "skutečný" stres (tj. stres v negativním smyslu), který způsobuje poškození. V obou případech je stres závislý na dávce (Lichtenthaler 1996).

Reakce na stres nemají lineární průběh a mírné podání stresového faktoru může působit jako stimulant fyziologických výkonů (Agathokleous et al. 2019).

Jak vysvětluje Lichtenthalerova studie, "mírný stres může aktivovat buněčný metabolismus, zvýšit fyziologickou aktivitu rostliny a nezpůsobuje žádné škodlivé účinky ani při dlouhém trvání. Takový mírný stimulační stres je pro rostlinu příznivý" (Lichtenthaler 1988).

Sucho

V posledních letech se nejčastěji setkáváme s výskytem sucha. Jeho příčiny jsou v nedostatku srážek často ve spojení s vysokou teplotou a výparem a projevují se primárně ve snižující se půdní vlhkosti. Při poklesu vodního potenciálu stromy snižují transpiraci zavíráním průduchů, ale ke snižování ztrát vody dochází na

povrchu stromu. Vodní stres může narušit toky vody v xylému, což vede ke kavitaci. Vzniklé embolie omezují schopnost vést vodu a tím omezují i růst (Tyree et al. 1994). Schopnost vyhnout se stresu ze sucha závisí na schopnosti stromu minimalizovat ztráty a zvýšit příjem vody (Chaves et al. 2003). Některé lesní dřeviny zvyšují příjem vody prostřednictvím hlubšího a rozsáhlejšího kořenového systému, zmenšují listovou plochu a stromatální vodivost. Aktivní akumulace rozpuštěných látek ve vakuolách (tj. osmotická úprava) je běžnou fyziologickou reakcí na sucho, zasolení a chladový stres.

Je pravděpodobné, že intenzita sucha a zvýšení četnosti suchých období nastává především kvůli změně klimatu. Za pomoci rekonstrukce vegetační aktivity normalizovaného rozdílový vegetačního indexu (NDVI), radiálního růstu měření stromových letokruhů a satelitních vegetačních indexů bylo zjištěno, jak různé dřeviny reagují na sucho. To se může projevit v redukci růstu v reakci na stresový faktor sucho, jak bylo pozorováno u středomořských druhů borovic, či zvýšenou mortalitou, která byla pozorována u dubu zimního (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl) a u borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.), které se vyskytovaly na suchých stanovištích (Gazol et al. 2020).

Zde se nezabývali monitorováním rostlin jako takových, ale zabývali se semenu a jejich toleranci k vysychání, která může být ovlivněna jejich skladováním. Jako slibný biochemický indikátor byla určena aminokyselina prolin, která by měla být určena pro sledování změn, ke kterým dochází během vývoje semen (Kijowska-Oberc et al. 2020).

Dalším stresovým faktorem pro lesní dřeviny je salinita půdy, nejčastěji způsobena nadbytkem chloridu sodného, ten způsobuje nejen iontovou nerovnováhu ale i hyperosmotický stres, který vede k dezorganizacím buněčných membrán a oxidačnímu poškození (Tester and Davenport 2003).

Salinita prostředí

Byla porovnáвана tolerance k salinitě v rámci osmi druhů dřevin, a to: javor babyka (*Acer campestre* L.), jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba* L.), dřezovec trojtrnný (*Gleditsia triacanthos* L.), platan javorolistý (*Platanus × acerifolia* (Aiton) Willd.), dub červený (*Quercus rubra* L.) a trnovník akát (*Robinia pseudoacacia* L.), které se vyznačují odolností vůči zasolení půdy ve městech. Naopak relativně citlivé jsou javor mléč (*Acer platanoides* L.) a lípa evropská (*Tilia × europaea* Hayne) (Dmuchowski et al. 2022). Mnoho studií prokazuje korelaci mezi indexem poškození listů a obsahem Cl^- a Na^+ v nich (Dmuchowski et al. 2012).

Vysoký obsah Cl^- a Na^+ byl poté taky zjištěn v listech jinanu dvoulaločného (Cl^- : 1,48 % a Na^+ : 1088 mg kg^{-1}), které nebyly nijak poškozeny (Gupta and Huang 2014). Tento druh byl také většinou autorů považován za tolerantní.

Mráz

Očekává se, že odumírání stromů v důsledku stresu nízkých teplot se v příštích desetiletích zrychlí v důsledky změny klimatu a již nyní dochází k odumírání lesních porostů v Severní Americe a Euroasii. Lesní stromy mírného pásma, aby přežily chladné zimní podmínky, obvykle zastavují růst a vyvíjejí mrazuvzdornost ještě před nástupem zimy. V reakci na nízké teploty se metabolismus přesouvá směrem k produkci zásobních látek, jako jsou vegetativní zásobní proteiny (Clausen and Apel 1991).

Jedním z hlavních kroků při získávání tolerance k mrazu je změna úrovně nasycení postranních řetězců mastných kyselin v membránových lipidech, aby se zachovala fluidita membrán. V rámci studie byly porovnávány semenáčky borovice halepské tolerantním a citlivým na chlad. Závěrem studie bylo zjištěno, že se neliší na fyziologické úrovni, ale semenáčky tolerantní na chlad jsou charakteristické zvýšenou akumulací antioxidantů, osmolytů a obsahem aminokyseliny tryptofan (Taïbi et al. 2018).

Na borovici lesní jako modelové dřevině byly zkoumány signály prostředí vyvolávající mrazové otužování. V průběhu dvou let byly zaznamenávány změny mrazuvzdornosti jehlic borovice lesní spolu s ročním průběhem délky dne a okolní teploty. Obojí působí jako signály prostředí pro mrazové otužování a tvrdnutí. Oba typy signálů byly nezávisle na sobě účinné, ale rychlost mrazového otužování nebyla aditivní. Maximální rychlost otužování byla $-0,93$ °C za den a bylo dosaženo odolnosti vůči mrazu < -72 °C. Pro otužování byla teplota ještě účinnějším signálem než délka dne (Beck et al. 2004).

Rostliny jsou však schopny tvorbu ledu částečně kontrolovat, čímž snižují riziko mrazu. Tvorbě ledu lze zabránit produkcí antinukleátorů, jako jsou proteiny proti mrazu, které umožňují přechlazení mízy (Pearce 2001). Ledové bariéry mohou v různých obdobích blokovat šíření ledu v citlivých pletivech (např. ochrana pupenů v zimě) (Charrier et al. 2017).

3.2.5 Reakce fotosystémů na stres podle jeho původu

Rostliny neustále ovlivňuje mnoho různých faktorů a jsou nuceny čelit jak biotickým, tak abiotickým stresům. Tyto faktory je podepisují na fyziologickém stavu rostlin. Jak rostlina na stresor zareaguje závisí na tom, jak dlouho s jakou intenzitou stresový faktor působil. V důsledku působení stresu mohou rostliny přijít o svou schopnost, jak využívat energii z fotonů, která je klíčová pro samotnou fotosyntézu. Může také dojít k poškození buněk a následně k poškození a změnám v metabolismu rostlin. Na rostlinu mohou působit některé z krátkodobých stresů, které mohou trvat několik minut či dlouhodobé, které mají trvání i několik dnů. Celkově projevy stresu na rostlině se dají poznat při poklesu její vitality.

Stres jak z nedostatku, tak přebytku vody závažně mění metabolismus celé rostliny. Pokud rostliny nepřijmou svými kořeny tolik vody, kolik je potřeba k transpiraci prostřednictvím listů, dostávají se tak do vodního stresu (Tezara et al. 1999). Stres má zprvu stromatální účinky, které následně mohou vyvrcholit až k metabolickým a strukturálním změnám. Díky tomu, že PSII má vyšší odolnost na vodní deficit, než PSI se negativní dopady projevují pouze v případě, kdy je deficit dlouhotrvajícím nebo se jedná o extrémní sucho (Chaves et al. 2008).

Stres způsobený vlivem teplot omezuje produkci biomasy a celkovou produktivitu rostlin. Nejcitlivější z procesů na vysoké teploty je fotosyntéza. Vyšší teploty snižují účinnost fotosyntetického transportu elektronů v obou fotosystémech a také jsou spouštěčem změn redukčně-oxidativních vlastností akceptorů PSII (Mathur et al. 2014). V případě OJIP křivky dochází ke snížení maximálního kvantového výtěžku PSII a také k navýšení minimální hodnoty fluorescence (Chen et al. 2009). Vysokoteplotní stres je většinou spojen s vysokou intenzitou světla. Intenzita světla se během mění prostorově i časově. Velký nadbytek světla na rostlinu vede k fotoinhibici, poškození PSII a k trvalému poškození fotosyntézy (Mathur et al. 2014).

Stres způsobený zasolením narušuje transport elektronů z reakčního centra. Změny mohou být pozorovány také v parametrech fluorescence a ve fungování celého PSII (Strasser et al. 2007). Pokud dojde k vysoké míře zasolení schopnost zachycování elektronů v reakčním centru PSII se stává méně účinným. Také bylo mnohokrát zaznamenáno ke snížení maximálního kvantového výtěžku a v případě

nefotochemického zhášení došlo naopak ke zvýšení (M. Kalaji and Rutkowska 2004).

Stres z nedostatku živin (N, K, P, Mg, S, Ca, Fe) způsobuje rostlinám zhoršené fungování fotosyntetického aparátu. Může snižovat fotochemickou účinnost PSII a také do jisté míry mění hodnoty fluorescence chlorofylu (Wu et al. 2006). Pokud je například zaznamenán nedostatek dusíku (N) dochází k značnému omezení růstu, modifikaci tylakoidních membrán a k jejich celkové funkční deformaci. To ve většině případech vede ke stárnutí rostlinných chloroplastů, snížení transpirace, obsahu chlorofylu, rozpustných sacharidů, stromatální vodivosti a mnoho dalšího (Correia et al. 2005).

Stres těžkými kovy při vysokých hladinách narušují proces fotosyntézy. V rámci tolerance fotosystému, lze konstatovat, že PSI je více tolerantní vůči vlivu těžkých kovů než PSII. Jedním z nejtoxičtějších těžkých kovů je považováno kadmium (Cd). V životním prostředí bylo kadmium vpravováno prostřednictvím fosfátových hnojiv (H. Kalaji and Loboda 2007). Není dokázané, že by Cd nějak zásadně ovlivňoval množství fotosyntetických pigmentů, nebyly potvrzeny žádné významné změny v obsahu jak chlorofylu, a tak b ani v množství karotenoidů (Janeczko et al. 2005). I přesto je známo o kadmiu, že má negativní vliv na fotochemickou účinnost fotosyntetického pochodu. Obecně PSII je na stres vyvolaný těžkým kovem kadmiem citlivější než PSI (Mallick and Mohn 2003).

4 Metodika

4.1 Rostliny použité při výzkumu

Pro měření fluorescence chlorofylu byly použity rostliny Olše lepkavé (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.). Osivo pochází z České republiky, z uznaného porostu v blízkosti Moravského Šternberka.

Semena se musela nejprve nechat naklíčit. Po naklíčení se semena s klíčky přemístila do předem připravených sadbovačů se substrátem. Takto připravené sadbovače byly umístěny do růstových komor. Kde byly vytvořeny ideální podmínky pro jejich růst a prosperitu.

4.1.1 Použití měřicího přístroje FluorPen FP 110

FluorPen FP 110 je přenosné zařízení (obr. 6, 7), napájené pomocí baterie. Tento přístroj umožňuje rychlé, ale přesto přesné měření parametrů fluorescence chlorofylu. Díky jeho mobilitě je možné měření provádět jak v laboratoři, ve skleníku nebo přímo v terénu. Sesbíraná data lze přesně lokalizovat pomocí zabudovaného modulu GPS a také přesně zaznamenává čas jednotlivých měření. FluorPen lze efektivně využít pro studium fotosyntetické aktivity, k detekci stresu, ke screeningu mutací a různých odrůd nebo jej používat k testování herbicidů (PSI (Photon Systems Instruments), spol. s r. o., 2016). FluorPen je poměrně cenově dostupný stejně tak, jako uživatelsky příjemný. Uživatelsky příjemným se stává díky svým dvěma tlačítkům, prostřednictvím nich lze ovládat celý přístroj. Stává se nepostradatelným, především pro svou rychlost při měření a poměrně velké paměti, je tak dokonalým kandidátem pro rozsáhlé screeniny rostlin.

Naměřená data jsou postupně ukládána do již dříve zmíněné velké paměti přístroje. Pokud je potřeba přenést data z FluorPeny do počítače stačí USB nebo Bluetooth komunikace. Rozsáhlý a komplexní software poskytuje přenos získaných dat a řadu dalších funkcí pro prezentaci, jak v tabulkách, tak v grafech. Je kompatibilní pro systém Windows 7 a další vyšší verze a také je možný export dat do aplikace Microsoft Excel.

Pro měření jsou k dispozici různé druhy listových svorek, které poskytnou jemné, ale pevné sevření vzorku listu. Prvním typem je verze S, jedná se o

standardní listovou svorku, která je vhodná pro experimenty, ve kterých je nutná krátkodobá adaptace na tmou. Druhým typem čili verze D jsou odnímatelné svorky na list, pro experimenty, kdy je potřeba dlouhodobá adaptace na tmou. Třetím typem – verze P, je vlastní optická sonda, která se používá v online verzi FP a umožňuje autonomní měření bez obsluhy například v laboratořích. Posledním čtvrtým typem je verze X, představující vlastní otevřené okénkové listové klipy, vhodné pro měření v prostředí s vlivem okolního světla (Manuál FluorPen 2021).

Pomocí FluorPenu lze zjistit následující kritéria:

- F_t : kontinuální výtěžek fluorescence v neaktinickém světle. F_t je ekvivalentní F_0 , pokud je vzorek listů adaptovaný na tmou.
- QY: kvantový výtěžek fotosystému II. QY je ekvivalentní F_v/F_m u vzorků adaptovaných na tmou a F_v'/F_m' u vzorků adaptovaných na světlo.
- OJIP: kinetika indukce fluorescence chlorofylu. Tato křivky OJIP umožňuje sledovat změny, ke kterým dochází při vystavení vysokého ozáření.
- NPQ: nefotochemické zhášení. NPQ je nejčastěji používaným měřicím postupem pro kvantifikaci fotochemického a nefotochemického zhášení. Měření by se mělo provádět se vzorkem adaptovaným na tmou.
- Světelná křivka (QY): kvantový výtěžek fotosystému II odhadovaný z fluorescence, který se měří postupně v několika různých úrovních osvětlení (PSI (Photon Systems Instruments), spol. s r. o., 2016).



Obr.7 Ilustrační fotografie přístroje FluorPen FP 110 spolu s listovou svorkou (Manuál FluorPen 2021).



Obr. 8 Simulace měření, připevnění svorky na list a přiložení listové svorky na FluorPen FP 110 a samotné přikládání Fluorpeny FP 110 na svorku (Manuál FluorPen 2021).

4.1.2 Průběh vlastního měření

Pro experimentální měření byly využity semena olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) z České republiky. Zároveň byly použity v experimentu dva druhy kolíčků pro měření fluorescence pro zjištění jejich odlišnosti. Semena se nechala naklíčit a poté byla přesunuta do plastových sadbovačů o velikosti 6×10 sazenic. Sadbovače se osazovaly na přeskáčku, aby rostliny měly dost prostoru pro růst a nebyly utlačovány jinými sazenicemi. Do sadbovačů se dal substrát a jedno naklíčené semeno. Sadbovače byly ponechány v růstových komorách s upravovanými podmínkami. Jednalo se především o množství hladiny kyslíku, dusíky, světla, teploty a vlhkost v růstových komorách, které všechny tyto aspekty dovolují nastavit a ovlivnit. Po vyrašení dostatečně velkých rostlin, především dostatečně velké listové plochy pro umístění listový svorek se začalo měřit.

Pro měření byly k dispozici dva druhy listových svorek. Jedna standardně vyráběná originální listová svorka (obr. 12) pro měření fluorescence a druhá listová svorka, která byla vyrobena na 3D tiskárně (obr. 14) a poté byla sestavena a opatřena magnety a molitanem, aby přesně kopírovala stavbu a funkčnost originální listové svorky (obr. 13). Originální listová svorka je šedé barvy, tvarem připomíná klasický kolíček na prádlo, je podlouhlá a má zatemňující proužek kovu, pod kterým je otvor, kudy se dostává světelný paprsek vyzářený z Flourpenu. Na přiklopené části lze pak nalézt kus molitanu, který představuje, jak tmavý podklad, aby paprsek neputoval dál, tak oporu listu. Vyrobena listová svorka na 3D tiskárně je růžové barvy, celo-kulatá, která drží na listu pomocí malých magnetek, které tímto spojují k sobě horní a spodní část svorky. Zatemňující část je stejné barvy i materiálu a znovu je pod ním otvor pro paprsek. Na druhé přichytné části je potom kus molitanové gumy, který tvoří tmavý podklad a zajišťuje, aby se nic nepohnulo ani neuvolnilo.

Po přistoupení k sadbovači, bylo vybráno několik rostlin vhodných k měření. Vybírali se především vyrostlejší rostliny s větší listovou plochou, aby na nich dobře oba typy listových svorek držely. Dalším faktorem výběru byla vlhkost substrátu. Vybraly se tedy tři rostliny se suchým substrátem a tři rostliny s vlhkým substrátem. Celkem bylo vybráno šest rostlin pro jednotlivá měření. Na každé rostlině proběhlo měření za pomoci originální listové svorky (obr. 10) i za pomoci vyrobené listové svorky (obr. 11). Pro zavěšení svorek bylo nutné vytvořit kartonovou konstrukci nad sadbovače, ze dvou základních deset a kříže ze dvou

proužků kartonu (obr. 9), jelikož rostlinky nebyly natolik silné, aby udržely tři svorky najednou. Proto se i kolíčky nalepily pomocí papírové pásky. Tato páska tvořila oporu a přidržovala svorky na listech. Celá soustava listové svorky a pásky byla nakonec připevněna na kartonovou konstrukci. Rostliny byly označeny různými čísly a na jejich listy byly nasazeny na každou rostlinu tři listové svorky.

Po instalaci všech 18 svorek bylo nutné minimálně 20 min vyčkat, aby se veškerý chlorofyl v zatemnění dostal do základního stavu. Po uplynulé době probíhalo samotně měření. Fluorpen byl přikládán měřicí hlavicí postupně ke všem listovým svorkám a po odstranění zatemňující plošky z listové svorky byl k listu poslán paprsek světla. Světlo, které je vysláno ve formě záření na zatemněnou část listu je aktinické světlo ($3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Po změření bylo zaevidováno číslo rostliny, typ listové svorky a vlhkost substrátu. Následně byly svorky odejmuty z rostlin. Tímto způsobem byly naměřeny všechny stěžejní hodnoty u všech pozorovaných rostlin. Naměřené hodnoty byly pomocí kompatibilního softwaru přeneseny do počítače a dále byly zpracovávány.



Obr. 9 Sadbovače s rostlinami olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) po instalaci kartonové konstrukce a listových svorek obojího typu (Dobšíková, 2023).



Obr. 10 Originální listové svorky, připevněné lepicí páskou ke kartonové konstrukci. Svorky byly přidělaný v počtu 3 kusů na listy jedné rostliny a plnily zatemňující funkci (Dobšíková, 2023).



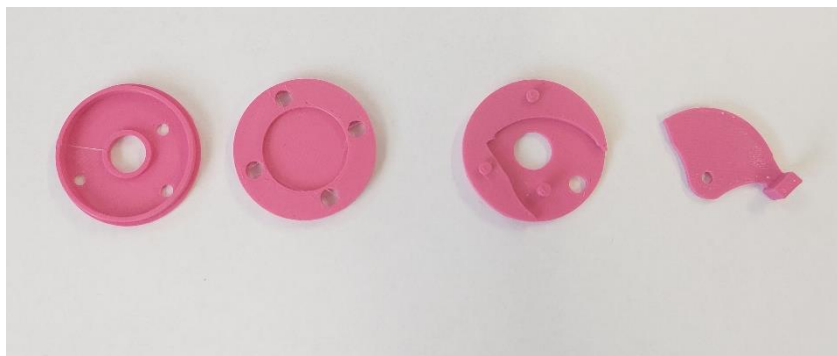
Obr. 11 Vytisknuté listové svorky na 3D tiskárně, připevněné lepicí páskou ke kartonové konstrukci. A následně byly umístěny v počtu 3 kusů na listy jedné z rostlin, v zatemňující fázi (Dobšíková, 2023).



Obr. 12 Originální listová svorka. První fotografie vpravo – svorka se zatemněným otvorem pomocí kovové destičky. Fotografie vlevo – svorka s odtemněným otvorem s oddělanou kovovou destičkou. Fotografie dole – pohled na svorku z boku, klipový mechanismus včetně na spodní straně přidělaný kus molitanové hmoty sloužící jako tmavý podklad (Dobšíková, 2023).



Obr. 13 Vytisknutá listová svorka. První fotografie vpravo – svorka se zatemněným otvorem pomocí plastové destičky. Fotografie vlevo – svorka s odtemněným otvorem s oddělanou plastovou destičkou. Fotografie dole – pohled na rozloženou svorku, která u sebe drží pomocí malých magnetů. Na spodní straně přidělaný kus molitanové hmoty sloužící jako tmavý podklad (Dobšíková, 2023).



Obr. 14 Přímou vyrobené součástky z 3D tiskárny na konstrukci listové svorky. Po přilepení magnetů a molitanové části, byla získána svorka připravená na jednotlivá měření (Dobšíková, 2023).

5 Výsledky

Díky měření rostlin na přelomu ledna a února byly získána data a následně přetransportována do grafů. Byly prováděny analýzy dat, různé statistické testy a výpočty pro získání tížených výsledků.

Podle vytvořených OJIP křivek lze konstatovat, že měření jak s kulatou listovou svorkou (vytisknutou na 3D tiskárně) nebo s plochou listovou svorkou (originální) bylo úspěšné a vytisknutá listová svorka plní svoji funkci.

Při porovnání vlivu vodního stresu na intenzitu fluorescence bylo zjištěno, že vlhkost půdy má opravdu vliv na fluorescenci (obr. 15).

Statistický dvouvýběrový t-test ve kterém se porovnávaly hodnoty F_v/F_m pro mokrý a suchý substrát, vypovídá o tom, že vlhkost substrátu nese významný rozdíl (obr. 19). Dále krabicový graf (obr. 20) ukazuje, že průměrné hodnoty F_v/F_m pro mokrý substrát a suchý substrát dokazují signifikantní rozdíl po dvouvýběrovém t-testu.

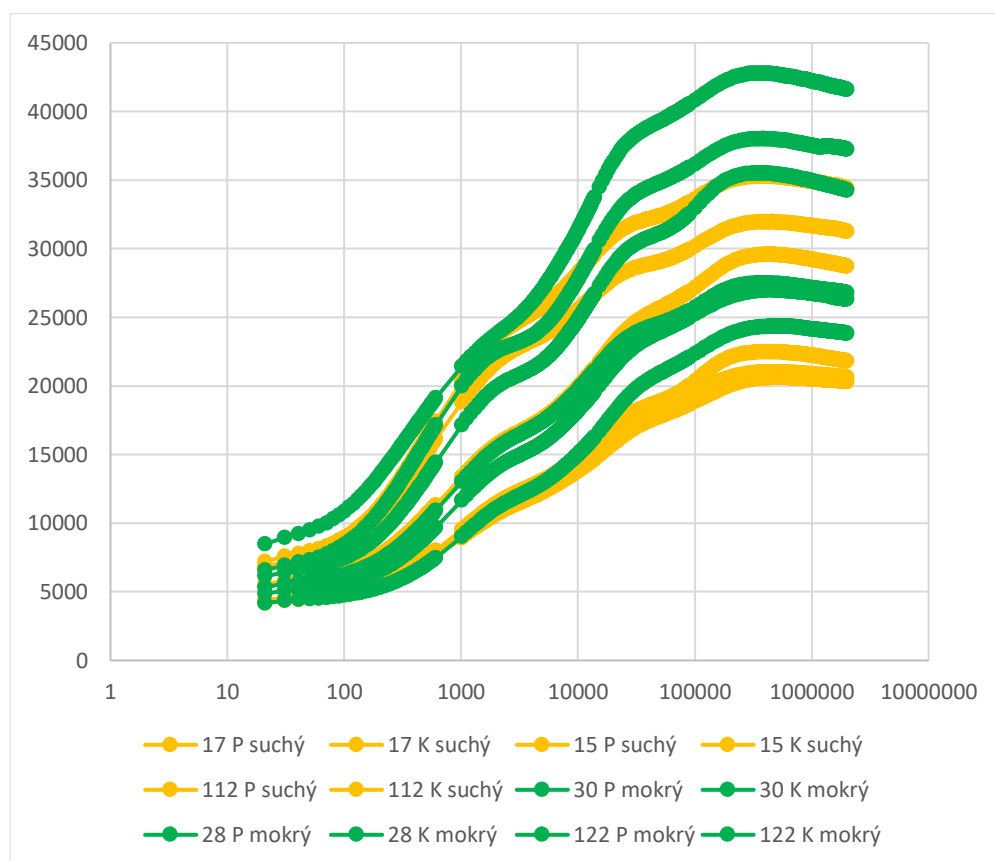
Z pohledu hodnot intenzity fluorescence chlorofylu při měření jednak s plochou listovou svorkou (originální) a jednak s kulatou svorkou (vytisknutou na 3D tiskárně) bylo zjištěno, že hodnoty měřené za pomoci ploché listové svorky (originální) dosahovali celkově vyšších hodnot než hodnoty, které byly měřeny pomocí kulaté (vytisknuté na 3D tiskárně) (obr. 16).

Další výsledek statistického párového t-testu, který říká, že neexistuje signifikantní rozdíl mezi listovými svorkami (obr. 17) a provedený krabicový graf (obr. 18) s porovnáním hodnot F_v/F_m ukázal, že kulatá listová svorka měřila průměrně vyšší hodnoty (0,79) než svorka plochá (0,77).

Jako poslední byla provedena analýza rozptylu porovnávající rozdíly měření na mokré a suché půdě pro hodnoty PI_{ABS} , ABS/RC , TR_0/RC , ET_0/RC , DI_0/RC . Byl použit Factorial ANOVA test a po vytvoření grafu (obr. 21), který říká, že hodnoty pro tyto parametry, jak pro kulatou, tak pro plochou listovou svorku jsou skoro stejné. Až na hodnotu PI_{ABS} , která byla kulatou listovou svorkou naměřena až dvojnásobně vyšší. Po provedení Wilcoxonova testu pro stejné parametry, lze tvrdit, že mezi výsledky měření pro plochou a kulatou svorkou je významný rozdíl a pro měření mokrý a suchý substrát je také významný rozdíl.

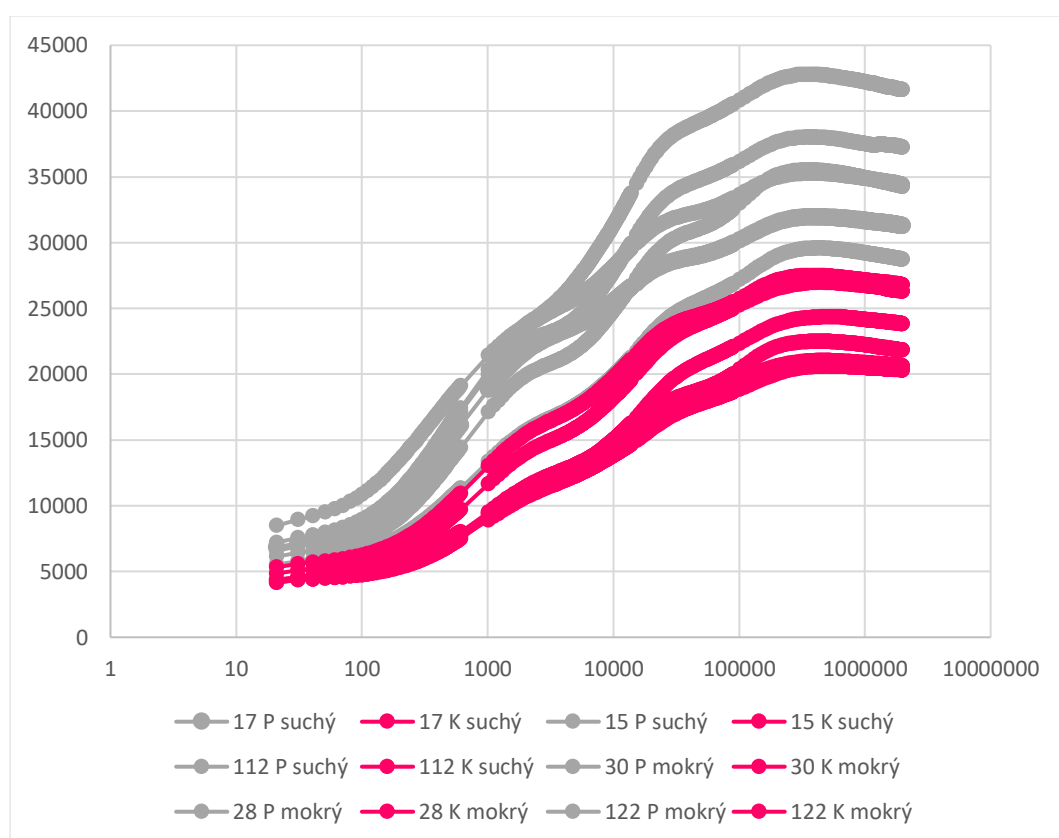
5.1 OJIP křivky

Dle grafu (obr. 15) lze konstatovat, že vlhkost půdy má vliv na množství intenzity vyzářené fluorescence chlorofylu. Je jasně vidět, že po porovnání suchého a mokrého substrátu, hodnoty fluorescence rostlin v mokrému substrátu (zelené křivky), tedy rostlin, které nebyly pod vodním stresem vykazují vyšší hodnoty. Kdežto rostliny v suchém substrátu (žluté křivky) čili rostliny, které byly pod stresem z nedostatku vody, vykazují nižší hodnoty fluorescence. Díky tomuto zjištění lze konstatovat, že rostliny jsou ovlivňovány vodním stresem a následně se tento stres promítá na jejich fyziologickém stavu a následně pak na intenzitě fluorescence.



Obr. 15 OJIP křivka porovnání mokrého a suchého substrátu. Na ose x je čas v milisekundách (logaritmická osa) a na ose y hodnoty intenzity fluorescence chlorofylu.

Na tomto grafu (obr. 15) vidíme porovnání měření fluorescence chlorofylu v závislosti na typu listové svorky. Měření probíhalo s plochou originální listovou svorkou (šedé křivky) a kulatou vytisknutou na 3D tiskárně listovou svorkou (růžové křivky). Při pohledu na graf lze konstatovat, že hodnoty intenzity fluorescence chlorofylu jsou vyšší u ploché originální listové svorky, kdežto hodnoty u kulaté vytisknuté listové svorky vykazují poměrně nižší hodnoty. Dle grafu, lze říct, že listové svorky měří lehce odlišně, ale jak plochá, tak kulatá listová svorka nám udává hodnoty pospolu (křivky nejsou rozmístěny různě po grafu, ale tvoří dva celky).



Obr. 16 OJIP křivka porovnání měření kulaté listové svorky (vytisknuté na 3D tiskárně (K) a ploché listové svorky originální (P). Na ose x je čas v milisekundách (logaritmická osa) a na ose y hodnoty intenzity fluorescence chlorofylu.

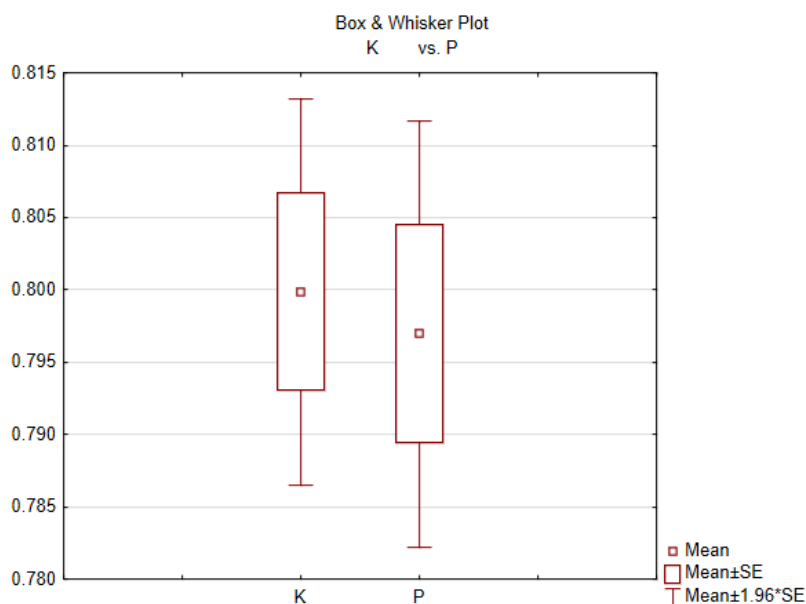
5.2 Indexy

Průměrná hodnota F_v/F_m měření za pomoci kulaté listové svorky (vytisknuté) je 0,7999, což je větší hodnota než pro měření plochou listovou svorkou (originální) 0,7969. Směrodatná odchylka byla o dvě tisíce větší právě u ploché listové svorky. Byl použit statistický výpočet za pomoci párového t-testu s výsledkem $p = 0,2720$. Tato skutečnost značí, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje signifikantní rozdíl mezi indexem F_v/F_m ploché a kulaté listové svorky.

T-test for Dependent Samples (DATA_OJIP)										
Marked differences are significant at $p < .05000$										
Variable	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p	Confidence -95.000%	Confidence +95.000%
K	0.799889	0.016685								
P	0.796944	0.018455	6	0.002944	0.005844	1.234161	5	0.271983	-0.003188	0.009077

Obr. 17 Tabulka s popisnou statistikou a hodnotou p z výpočtu párovým t-testem.

Krabicový graf (obr. 18) znázorňuje výsledky z měření ploché (originální) a kulaté (vytisknutou) listové svorky (osa x). Z grafu je patrné, že kulatá listová svorka průměrně měřila lehce vyšší hodnoty (0,79) než svorka plochá (0,77), která je charakteristická i vyšší směrodatnou odchylkou. Díky t-testu však můžeme tvrdit, že mezi měřeními není signifikantní rozdíl pro hladinu spolehlivosti 95 %.



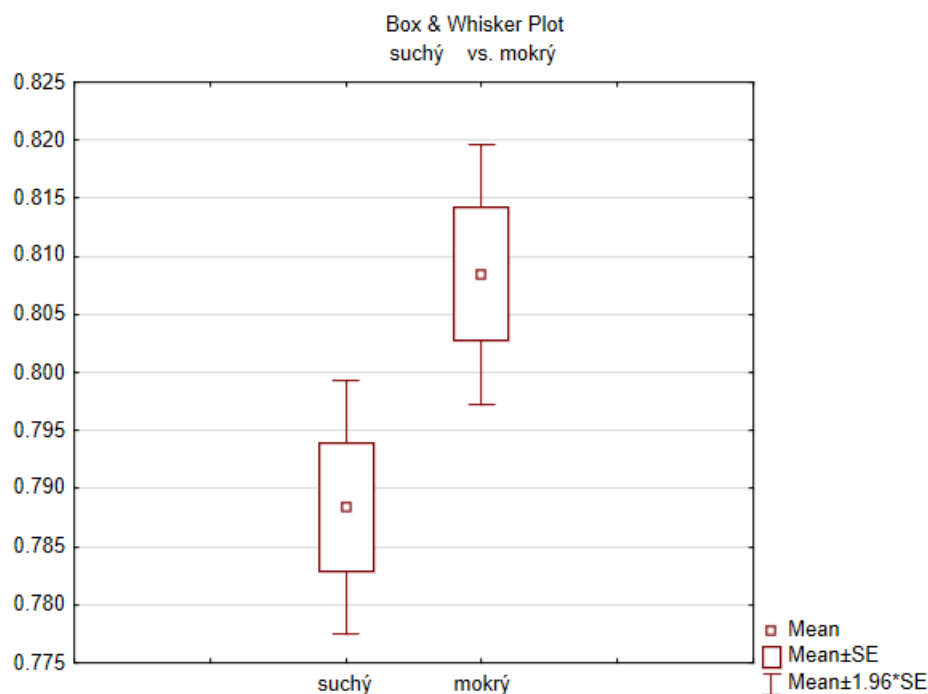
Obr. 18 Krabicový graf s porovnáním hodnot F_v/F_m . Pro varianty listových svorek Kulatá (vytisknutá na 3D tiskárně) a Plochá (originální listová svorka). Osa y značí hodnotu F_v/F_m a osa x rozlišuje kategorie kolíčku. Dle legendy malý červený čtvereček značí průměrnou hodnotu, obdélník reprezentuje směrodatnou odchylku a svislice vyznačují území s 95 % spolehlivostí směrodatné odchylky.

Na obr. 19 jsou znázorněné výsledky dvou-výběrového t-testu, který porovnával výsledky z měření na suché a mokré půdě. Rostliny na suché půdě mají průměrnou hodnotu $F_v/F_m = 0,7884$, kdežto na mokré půdě dosahovaly hodnoty $F_v/F_m = 0,8084$. Dvou-výběrovým t-testem byla zjištěna hodnota $p = 0,0309$, která značí, že měření na suché vs. mokré půdě nese významný rozdíl v indexu F_v/F_m na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

T-test for Independent Samples (DATA_OJIP)											
Note: Variables were treated as independent samples											
Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	p Variances
suchý vs. mokrý	0.788389	0.808444	-2.51071	10	0.030875	6	6	0.013662	0.014007	1.051257	0.957592

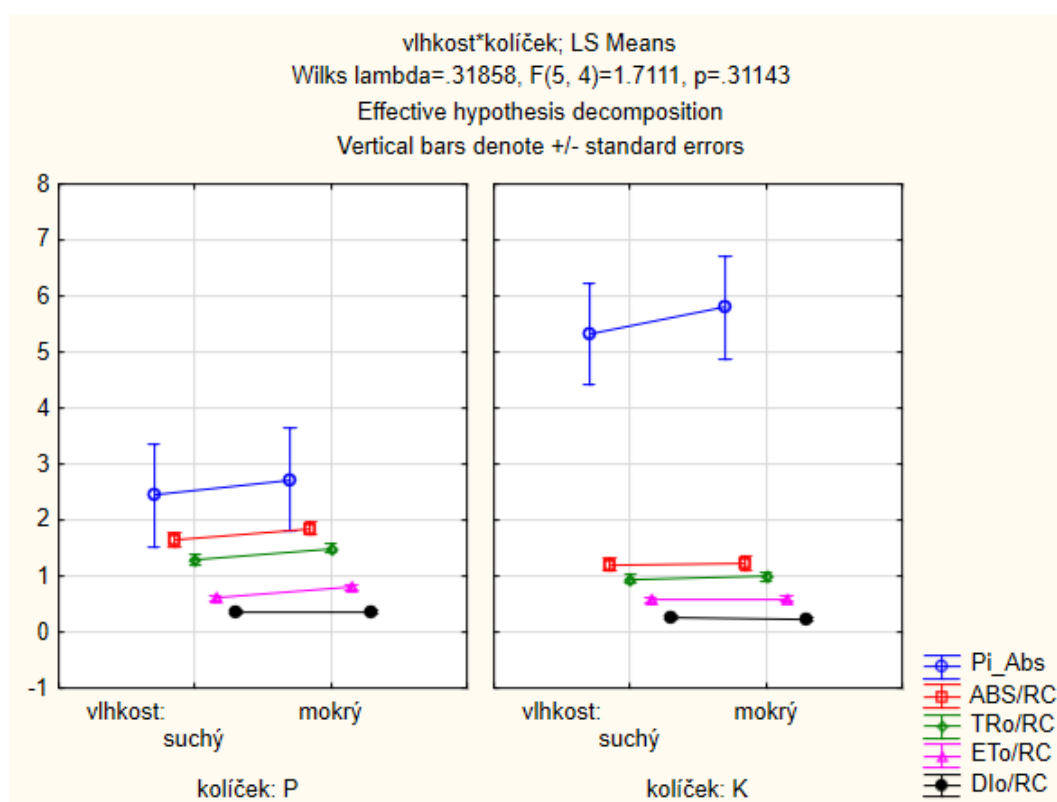
Obr. 19 Tabulka s popisnou statistikou a hodnotou p z výpočtu dvou-výběrovým t-testem.

Obr. 20 zobrazuje krabicový graf s hodnotami F_v/F_m pro rostliny na suché a mokré půdě (kategorie zaneseny na ose x). Z grafu vyčteme, že průměrné hodnoty na suché půdě mají poměr $F_v/F_m = 0,79$, avšak na mokré půdě dosahují hodnoty poměru $F_v/F_m = 0,81$. Směrodatná odchylka je v tomto případně takřka stejná. Z grafu lze soudit, že po provedení dvou-výběrového t-testu zaznamenáváme signifikantní rozdíl mezi výsledky měřených kategorií vlhkosti půdy pro hladinu spolehlivosti 95 %.



Obr. 20 Krabicový graf s porovnáním hodnot F_v/F_m . Pro varianty vlhkosti půdy mokrá / suchá. Osa y značí hodnotu F_v/F_m a osa x rozlišuje vlhkost půdy. Dle legendy malý červený čtvereček značí průměrnou hodnotu, obdélník reprezentuje směrodatnou odchylku a svislice vyznačují území s 95 % spolehlivostí směrodatné odchylky.

Tento graf (obr. 21) je výsledkem Factorial ANOVA testu, kdy v levé části obrázku můžeme pozorovat hodnoty pro plochou listovou svorku (originální) a v pravé části obrázku pro kulatou listovou svorku (vytisknutou). Levé části grafů vyobrazují data pro suchou půdu a pravé části pro mokrou. Z grafu vyčteme, že plochá svorka průměrně měřila vyšší hodnoty (ABS/RC, či TR_0/RC) než svorka kulatá. Naopak hodnota PI_{ABS} byla kulatou listovou svorkou naměřena vyšší takřka dvojnásobně. Také vyčteme, že průměrně na mokré půdě dochází k měření vyšších hodnot než na půdě suché. Směrodatná odchylka byla nejvyšší pro hodnotu PI_{ABS} .



Obr. 21 Analýza rozptylu porovnávající rozdílnost měření na mokré a suché půdě pro hodnoty PI_{ABS} , ABS/RC, TR_0/RC , ET_0/RC , DI_0/RC . Levý graf zobrazuje hodnoty naměřené plochou listovou svorkou (originální); pravý graf kulatou listovou svorkou (vytisknutou). Pravá část grafů vykazuje hodnoty rostlin v mokré půdě; levá na suché. Dle legendy symbolem značíme průměrnou hodnotu a svislicemi 0,95 intervaly spolehlivosti.

Tabulka (obr. 22) zobrazuje výsledky po statistickém testu z programu Statistica 14 TIBCO. Byl proveden Wilcoxonův test a zjištěny parametry p. Z tabulky vyčteme, že u měřených hodnot PI_{ABS} , ABS/RC, TR_0/RC , ET_0/RC , DI_0/RC v rámci kategorií vlhkosti půdy (suchá varianta, mokrá varianta) zamítáme nulovou hypotézu, že mezi výsledky není významný rozdíl na hladině spolehlivosti 95 % ($p \leq 10^{-6}$).

Také zamítáme nulovou hypotézu, že mezi výsledky měření plochou listovou svorkou a kulatou listovou svorkou není významný rozdíl na hladině spolehlivosti 95 % ($p \leq 10^{-6}$). Nelze však zamítnout nulovou hypotézu, že je významný rozdíl v naměřených výsledcích pro kombinaci vlhkosti půdy a různých druhů listových svorek na hladině významnosti 95 %. V tomto případě nabývá p hodnoty 0,3114.

Multivariate Tests of Significance (DATA_OJIP)						
Sigma-restricted parameterization						
Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0.000000	8.845327E+09	4	5	0.000000
vlhkost	Wilks	0.000000	1.017457E+08	4	5	0.000000
kolíček	Wilks	0.000000	1.923350E+08	4	5	0.000000
vlhkost*kolíček	Wilks	0.318583	1.711117E+00	5	4	0.311429

Obr. 22 Tabulka s výsledky Wilcoxonova testu, kde hodnota p značí, zda na hladině spolehlivosti 95 % vykazujeme signifikantní rozdíl měření na mokré/suché půdě a pro druhy listové svorky.

6 Diskuze

Globální oteplování vede ke zvýšení teploty Země. Oteplování je jeden z hlavních abiotických stresů představující vážnou hrozbu pro rostliny. Fotosyntéza je jedna z nejdůležitějších metabolických procesů v rostlinách. Její studium poskytuje drahocenné informace o zdraví rostlin. Fotosyntéza je nejcitlivější proces na stres z vysoké teploty vzhledem k rostlinným buňkám, které pak způsobují razantní změny v redukčně-oxidačních vlastnostech akceptorů PSII a také snižují účinnost fotosyntetického transportu elektronů v obou fotosystémech (H. M. Kalaji et al. 2016).

Díky měření fluorescence těchto rostlin a za pomoci získaných parametrů, byl zjištěn fakt, že rostliny vystavené teplotnímu stresu změnily svůj tok energie a vysokou teplotu vedou ke zvýšenému rozptýlení energie, čímž už nezachycují fotony. Tato skutečnost může vést rostlinu k ochraně před oxidativním stresem. Zároveň vysokoteplotní stres doprovází rostliny ke změnám v heterogenitě PSII, což by mohl být hnací motor adaptačních mechanismů, aby rostliny tento stres zvládaly dobře a neodráželo se to na jejich fyziologickém stavu.

Jedna ze studií, která se zabývala vlivy stresu na rostliny, konkrétně vliv sucha a intenzity ozáření v laboratorních podmínkách na poměrně mladých rostlinách odrůdy prosa perlového (*Pennisetum glaucum* (L.) Morrone) a čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) různého původu (Francie, Indie a Texas) zjistila, že intenzita záření u častěji zavlažovaných rostlin značně zvyšovala transport elektronů a rychlost asimilace CO₂, avšak to samé neplatilo pro fluorescenci, kdy se její hodnoty snižovaly. U rostlin, které nebyly vystaveny stresu suchem byla naměřena hodnota poměru F_v/F_m okolo 0,83 – hodnota typická pro zdravé rostliny. Kdežto rostliny, které byly vystaveny stresu suchem, vykazovaly mnohem nižší hodnoty, ale vedly si lépe pod vlivem vysokého ozařování. Tyto pokusy s rostlinami ukázaly, že se reakce na sucha a ozáření u jednotlivých druhů dost lišily. Obecně toto zjištění o reakcích rostlin na stresy a některé z použitých metod mohou být potenciálně užitečné v budoucnu při kontrole a výběru odolných odrůd rostlin na různé stresové faktory (Masojídek et al. 1991). Díky této studii můžeme i potvrdit, že stresový faktor sucha má vliv na fluorescenci chlorofylu u rostlin a na její hodnoty.

Častým jevem je zaplavování stromů. Proto tato studie rozebírá vliv vodního stresu na fyziologický stav. Během vegetačního období byly studovány vlivy zaplavení na výměnu plynů, na fluorescenci chlorofylu a na růstové reakce

sazenic kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia* Cheel), který se používá při obnově lužních lesů v jižní Číně. Sazenice byly zaplaveny po dobu 180 dnů, poté byly odvodněny a ponechány na zotavení dalších 60 dnů. Poměr F_v/F_m však během kontrol nevykazoval velké rozdíly, ale obsah chlorofylu, rychlost fotosyntézy, rychlost transpirace a stromatální vodivost byla nižší než na začátku pokusu. To potvrzuje, že vodní stres ovlivňuje fyziologii rostlin a také fluorescenci chlorofylu (Jing et al. 2009).

U kultivarů javor babyka (*Acer campestre* L.), javor mléč (*A. platanoides* L.) a javor horský (*A. pseudoplatanus* L.) byl zkoumán vliv vodního stresu (sucha) na parametry kontinuální excitační fluorescence chlorofylu a na přechod OJIP. Porovnání stresu suchem na úrovni celého stromu a vysychání oddělených listů v laboratorních podmínkách je hodnoceno pomocí fluorescenčních parametrů i diferenční kinetiky. Pro účel studie byly použity sedmileté stromy. U vybraných stromů se zavedla pravidelná zálivka a u ostatních bylo striktně dodržováno sucho. Po nějaké době po výzkumu a dodržování zálivek, nastalo samotné měření. Ve studii se diskutuje o využívání F_v/F_m poměru při zhodnocování naměřených dat. Závěr studie je takový, že pokud je nutné identifikovat stres suchem je vhodné používat přednostně parametr PI_{ABS} , než F_v/F_m poměry (Banks 2018). Z toho plyne že naše měření a hodnocení naměřených dat fluorescence by mělo být správně zvolené, protože jsme používali tento parametr také pro hodnocení výsledků, nejen zmíněný poměr F_v/F_m .

Další ze studií, která se zabývala faktem, že rostliny, které se volně vyskytují v přírodě jsou vystaveny a ovlivněny mnoha nepříznivými faktory a žijí v mnohdy nepříznivých podmínkách. Toto vede k poklesu růstu, vývoje rostliny. Tedy se podmínky značně odrazí na její fyziologii a ovlivní i tak její výnosy. Právě fluorescence chlorofylu představuje dobrý nástroj k hodnocení stavu rostlin a k míře stresu. Konkrétně analýza fluorescenčních signálů je poskytovatelem podrobných informací o působícím stresu na rostlinu. Studie pojednává a různých typech rostlinných stresů, ať už se jedná o sucho, nízké a vysoké teploty, množství ozáření, zavodnění nebo mineralizace půdy. Zmiňuje metody pro využití parametrů fluorescence chlorofylu, jako je například OJIP křivka, matematický model JIP-test, poměr F_v/F_m a další parametry. Celkově přináší aktuální informace o metodách měření a předepisuje důležitost a určitý potenciál měření fluorescence chlorofylu (Kalaji et al. 2016). Z tohoto můžeme konstatovat, že jsme výzkum prováděli dle běžně používaných metod a naše interpretace výsledků a použití dat bylo správné.

7 Závěr

Tato bakalářská práce pojednávala o problematice využití fluorescence pro zjišťování stavu lesních dřevin. Součástí práce bylo demonstrativní měření fluorescence chlorofylu za pomoci dvou druhů listových svorek na olších (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) původem z uznaného porostu nedaleko města Šternberk, odkud pocházela semena. Ta se následně nechala v laboratoři naklíčit a poté byly vloženy do růstových komor, kde se simulovaly ideální podmínky pro růst.

Několikaměsíční jedinci byly podrobeny měření za pomoci přístroje FluorPen FP 110, díky kterému se zjišťovaly různé parametry včetně ABS/RC; Tro/RC; Eto/RC; Fv/Fm a další. Z těchto dat bylo možné zjistit další parametry a laboratorní výzkum se zaměřil především na OJIP, která značí kinetiku indukce fluorescence chlorofylu a z křivky lze vypočítat změny projevující se při vysokém ozáření. Také se měřil parametr Fv/Fm – kvantový výtěžek fotosystému.

V rámci měření FluorPenem byla získána data z celkem šesti rostlin, kdy na třech byla půda suchá (simulace stresu) a na zbylých třech půda vlhká. Také bylo na každé rostlině provedené měření za pomoci dvou druhů listových svorek, kdy první byla originální svorka od výrobce a druhá byla vyrobena za pomoci technologie 3D tisku. Po naměření se data zpracovala a vyhodnotila.

Z grafů OJIP křivky plyne, že vlhkost substrátu má vliv na množství intenzity vyzářené fluorescence chlorofylu, kdy jedinci vystaveni stresu z nedostatku vláhy prokazatelně vyzařují menší množství fluorescence. Naopak jedinci s dostatečnou vláhou v půdě mají OJIP křivky vyšších hodnot. Na rostlinách se tento stres projevuje na fyziologickém stavu a může být měřen a monitorován přístrojem FluorPen. Graf OJIP křivek porovnávající data naměřené druhy listových svorek vykazuje, že se křivky lehce liší. Originální listová svorka vykazuje lehce vyšší hodnoty oproti svorce z 3D tisku; křivky jsou však udávající hodnoty pospolu (tvoří dva celky).

Průměrná hodnota F_v/F_m změřená vytisknutými listovými svorkami byla 0,7999 a pro originální svorky platí hodnota 0,7969. Výpočtem pomocí párového t-testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ neexistuje signifikantní rozdíl mezi indexem F_v/F_m . Za pomoci dvouvýběrového t-testu naopak zamítáme nulovou hypotézu, že neexistuje rozdíl mezi naměřenými hodnotami F_v/F_m na mokré a suché půdě ($\alpha = 0,05$). Wilcoxonův test z hodnot PI_{ABS} , ABS/RC, TR_0/RC , ET_0/RC , DI_0/RC také zamítá hypotézu, že existuje neexistuje významný rozdíl hodnot na mokré a suché půdě pro hladinu spolehlivosti 95 % při měření v kombinaci druhů listových svorek.

Závěrem se dá říci, že laboratorní výzkum prokázal, že existuje významný rozdíl ve vyzařování fluorescence chlorofylu v závislosti na vlhkosti půdy. Rostliny vystavené stresu suchem vykazují nižší hodnoty na OJIP křivkách i nižší poměr F_v/F_m . Práce také prokázala, že se díky FluorPenu dá monitorovat stres rostlin díky jejich fyziologickým projevům a zjistila, že listová svorka vyrobená technologií 3D tisku dokáže měřit stejné hodnoty, jako originální svorka od výrobce. Pro lesnickou praxi lze doporučit monitoring stresu rostlin pomocí této metody a přináší nový druh svorky pro samotné měření.

8 Literatura

- Agathokleous, Evgenios, Kitao, Mitsutoshi, and Calabrese, Edward J. (2019), 'Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science', *Trends in Plant Science*, 24 (4), 318-27.
- Appenroth, K. J., et al. (2001), 'Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements', *Environ Pollut*, 115 (1), 49-64.
- Banks, Jonathan M. (2018), 'Chlorophyll fluorescence as a tool to identify drought stress in *Acer* genotypes', *Environmental and Experimental Botany*, 155, 118-27.
- Barber, James, et al. (1989), 'The origin of chlorophyll fluorescence *in vivo* and its quenching by the photosystem II reaction centre', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 323 (1216), 227-39.
- Beck, Erwin H., Heim, Richard, and Hansen, Jens (2004), 'Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening', *Journal of Biosciences*, 29 (4), 449-59.
- Brody, Seymour S. and Rabinowitch, Eugene (1957), 'Excitation Lifetime of Photosynthetic Pigments *in vitro* and *in vivo*', *Science*, 125 (3247), 555-55.
- Buschmann, Claus, et al. (1994), 'Spectrometer for fast measurements of *in vivo* reflectance, absorptance, and fluorescence in the visible and near-infrared', *Remote Sensing of Environment*, 48 (1), 18-24.
- Clausen, S. and Apel, K. (1991), 'Seasonal changes in the concentration of the major storage protein and its mRNA in xylem ray cells of poplar trees', *Plant Mol Biol*, 17 (4), 669-78.
- Correia, Carlos M., et al. (2005), 'Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study', *European Journal of Agronomy*, 22 (3), 337-47.
- Dmuchowski, Wojciech, et al. (2012), 'Effect of salt stress caused by deicing on the content of microelements in leaves of linden', *Journal of Elementology*, 19, 65-79.
- Dmuchowski, Wojciech, et al. (2022), 'Strategies of urban trees for mitigating salt stress: a case study of eight plant species', *Trees*, 36 (3), 899-914.

- Gazol, Antonio, et al. (2020), 'Tree Species Are Differently Impacted by Cumulative Drought Stress and Present Higher Growth Synchrony in Dry Places', *Frontiers in Forests and Global Change*, 3.
- Goltsev, V. N., et al. (2016), 'Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus', *Russian Journal of Plant Physiology*, 63 (6), 869-93.
- Govindjee, Govindjee and Papageorgiou, George (2004), *Chlorophyll A Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* 1-41.
- Grabolle, M. and Dau, H. (2005), 'Energetics of primary and secondary electron transfer in Photosystem II membrane particles of spinach revisited on basis of recombination-fluorescence measurements', *Biochim Biophys Acta*, 1708 (2), 209-18.
- Guisse, B., Srivastava, A., and Strasser, R. J. (1995), 'THE POLYPHASIC RISE OF THE CHLOROPHYLL-A FLUORESCENCE (O-K-J-I-P) IN HEAT-STRESSED LEAVES', *ARCHIVES DES SCIENCES*, 48 (2), 147-60.
- Gupta, Bhaskar and Huang, Bingru (2014), 'Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization', *International Journal of Genomics*, 2014, 701596.
- Hasanuzzaman, M., et al. (2013), 'Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants', *Int J Mol Sci*, 14 (5), 9643-84.
- Charrier, G., et al. (2017), 'Monitoring of Freezing Dynamics in Trees: A Simple Phase Shift Causes Complexity', *Plant Physiol*, 173 (4), 2196-207.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., and Pereira, J. S. (2003), 'Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant', *Funct Plant Biol*, 30 (3), 239-64.
- Chaves, M. M., Flexas, J., and Pinheiro, C. (2008), 'Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell', *Annals of Botany*, 103 (4), 551-60.
- Chen, Li-Song, Li, Pengmin, and Cheng, Lailiang (2009), 'Comparison of thermotolerance of sun-exposed peel and shaded peel of 'Fuji' apple', *Environmental and Experimental Botany*, 66 (1), 110-16.
- Janeczko, A., et al. (2005), 'Protection of winter rape photosystem 2 by 24-epibrassinolide under cadmium stress', *Photosynthetica*, 43 (2), 293-98.

- Jing, Y., et al. (2009), 'Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Melaleuca alternifolia* seedlings to flooding and subsequent recovery', *Photosynthetica*, 47, 595-601.
- Kalaji, Hazem M., et al. (2016), 'Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions', *Acta Physiologiae Plantarum*, 38 (4), 102.
- Kalaji, HM and Loboda, T (2007), 'Photosystem II of barley seedlings under cadmium and lead stress', *Plant Soil and Environment*, 53 (12), 511.
- Kalaji, MH and Rutkowska, A (2004), 'Reactions of photosynthetic apparatus of maize seedlings to salt stress', *Zesz Probl Post NaukRol*, 496, 545-58.
- Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931), 'Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation', *Naturwissenschaften*, 19 (48), 964-64.
- Kijowska-Oberc, Joanna, et al. (2020), 'Changes in Proline Levels during Seed Development of Orthodox and Recalcitrant Seeds of Genus *Acer* in a Climate Change Scenario', *Forests*, 11 (12).
- Latimer, Paul, Bannister, T. T., and Rabinowitch, E. (1956), 'Quantum Yields of Fluorescence of Plant Pigments', *Science*, 124 (3222), 585-86.
- LICHTENTHALER, H. K., et al. (1998), 'Plant Stress Detection by Reflectance and Fluorescence', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851 (1), 271-85.
- Lichtenthaler, Hartmut K. (1988), 'In Vivo Chlorophyll Fluorescence as a Tool for Stress Detection in Plants'.
- (1996), 'Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants', *Journal of Plant Physiology*, 148 (1), 4-14.
- Lichtenthaler, Hartmut K. and Rinderle, Ursula (1988), 'The Role of Chlorophyll Fluorescence in The Detection of Stress Conditions in Plants'.
- Mallick, Nirupama and Mohn, F. H. (2003), 'Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55 (1), 64-69.
- Masojídek, Jiří, et al. (1991), 'The Synergistic Effect of Drought and Light Stresses in Sorghum and Pearl Millet 1', *Plant Physiology*, 96 (1), 198-207.
- Mathur, Sonal, Agrawal, Divya, and Jajoo, Anjana (2014), 'Photosynthesis: Response to high temperature stress', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 116-26.

- Maxwell, K. and Johnson, G. N. (2000), 'Chlorophyll fluorescence - a practical guide', *Journal of Experimental Botany*, 51 (345), 659-68.
- Mohammed, G. H., Binder, W. D., and Gillies, S. L. (1995), 'Chlorophyll Fluorescence - a Review of Its Practical Forestry Applications and Instrumentation', *Scandinavian Journal of Forest Research*, 10 (4), 383-410.
- Pearce, Roger S. (2001), 'Plant Freezing and Damage', *Annals of Botany*, 87 (4), 417-24.
- Pollastrini, Martina, et al. (2016), 'CHLOROPHYLL a FLUORESCENCE ANALYSIS IN FORESTS'.
- Ritchie, Gary A. (2006), 'Chlorophyll Fluorescence: What Is It and What Do the Numbers Mean?'
- Roháček, K. and Bartak, Milos (1999), 'Technique of the Modulated Chlorophyll Fluorescence: Basic Concepts, Useful Parameters, and Some Applications', *Photosynthetica*, 37, 339-63.
- Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W. (1986), 'Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer', *Photosynthesis Research*, 10 (1), 51-62.
- Silva, Jorge Marques da (2016), 'Monitoring Photosynthesis by In Vivo Chlorophyll Fluorescence: Application to High-Throughput Plant Phenotyping'.
- Srivastava, Alaka, et al. (1997), 'Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320 (1), 95-106.
- Stirbet, A. and Govindjee (2011), 'On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient', *J Photochem Photobiol B*, 104 (1-2), 236-57.
- Strasser, Bruno and Strasser, Reto (1995), 'Measuring Fast Fluorescence Transients to Address Environmental Questions: The JIP-Test', *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, 977-80.

- Strasser, Reto J., et al. (2007), 'Biophysical Phenomics Reveals Functional Building Blocks of Plants Systems Biology: a Case Study for the Evaluation of the Impact of Mycorrhization with *Piriformospora indica*', in Ajit Varma and Ralf Oelmüller (eds.), *Advanced Techniques in Soil Microbiology* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 319-41.
- Taïbi, Khaled, et al. (2018), 'Distinctive physiological and molecular responses to cold stress among cold-tolerant and cold-sensitive *Pinus halepensis* seed sources', *BMC Plant Biology*, 18 (1), 236.
- TESTER, MARK and DAVENPORT, ROMOLA (2003), 'Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants', *Annals of Botany*, 91 (5), 503-27.
- Tezara, Wilmer, et al. (1999), 'Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP', *Nature*, 401.
- Tyree, Melvin, Davis, Stephen, and Cochard, Hervé (1994), 'Biophysical Perspectives of Xylem Evolution: Is There a Tradeoff of Hydraulic Efficiency for Vulnerability to Dysfunction?', *IAWA journal / International Association of Wood Anatomists*, 15, 335-60.
- Walker, David and Walker, Richard J. (1987), 'The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis'.
- Wu, Chu, et al. (2006), 'Effects of different concentrations of nitrogen and phosphorus on chlorophyll biosynthesis, chlorophyll a fluorescence, and photosynthesis in *Larix olgensis* seedlings', *Frontiers of Forestry in China*, 1 (2), 170-75.

Webové stránky:

PSI (Photon Systems Instruments), spol. s r. o. Photon Systems Instruments. [online] Drásov: © 2016 [cit. 2023– 05–04]. Dostupné z: <<https://handheld.psi.cz/products/fluorpen-and-par-fluorpen/#details>>

Manual Version: 2021/12 , PSI (Photon Systems Instruments), spol. s r.o., dostupné na <https://handheld.psi.cz/documents/FP_manual-new%20format-vs1.0-edit-2021.pdf> navštíveno 4.4.2023

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

3D	trojdimenzionální
ABS/RC	průměrný tok absorbance na reakční centrum, zdánlivá velikost antény fotosystému II
ADP	adenosindifosfát
ANOVA	analýza rozptylu
ATP	adenosintrifosfát
DI ₀ /RC	tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum fotosystému II
ET ₀ /RC	tok elektronů z plastochinonu Q _A na Q _B
F ₀	minimální fluorescence
FIK	fluorescenční indukční křivka
F _M	maximální fluorescence
F _M /F _V	maximální kvantový výtěžek fotosystému II
F _S	ustálený stav fluorescence
F _V	variabilní fluorescence
LED	elektroluminiscenční dioda
NDVI	normalizovaný rozdílový vegetační index
PAM	pulzní amplitudová modulace
PI _{ABS}	performační index konzervace energie od fotonů k plastochinonu Q _B
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
RC	reakční centrum
TR0/RC	maximální tok energie zachycený fotosystémem II