



systém s názvem We Speak Plantish. Byl koncipován jako plně robotizované prostředí pro pěstování rostlin, vybavené automatizovaným závlahovým systémem (viz obr. 6). Rostliny v něm rostly v řízených podmínkách, přičemž vše probíhalo zcela bez lidského zásahu.

Jednotlivé rostliny byly pomocí dopravníkového systému (na válečkovém principu) pravidelně přesouvány pod fluores-

cenční zobrazovací jednotku. Tam byl na velkoplošné obrazovce promítán jejich fluorescenční obraz, který odhaloval aktuální fyziologický stav. Návštěvníci tak mohli v reálném čase sledovat, jak rostliny reagují např. na tepelný stres cíleně aplikovaný během prezentace.

Projekt byl výjimečný nejen technickou úrovní, ale i tím, že přístupnou formou ukázal, jak rostliny „mluví“ prostřednictvím

světla a jak jim díky moderním technologiím můžeme naslouchat i porozumět.

### Závěrem

Poznat a pochopit průběh fotosyntézy znamená porozumět samotným základům života na Zemi. Bez tohoto mimořádného procesu by neexistoval kyslík, atmosféra, jakou známe, ani život v celé jeho rozmanitosti. Přestože jsme v posledních desetiletích výrazně pokročili, stále jsme jen na prahu pochopení všech jemných mechanismů fotosyntézy. Jsou nejen složité, ale i překvapivě přizpůsobivé – různé organismy dokážou fotosyntézu provozovat za extrémních podmínek, v temných hloubkách oceánů i v okolí aktivních sopek.

A kdo ví – možná jednoho dne vyšleme fotosyntetické organismy i na jiné planety, třeba do horních vrstev atmosféry Venuše, kde by mohly začít přetvářet její prostředí a vytvořit podmínky vhodné pro život.

Fotosyntéza není jen klíčem k pochopení minulosti, ale i nadějí pro budoucnost. A i když je život až neuvěřitelně odolný, zároveň zůstává křehký a vzácný – stejně jako světlo, které ho udržuje.

Použitou literaturu uvádíme na webové stránce Živý.

Tomáš Hájek

## Fluorescence chlorofylu – fyzikální jev ve službách výzkumu fotosyntézy

**Zdaleka ne všechno světlo, které rostlina pohltí svou zelení, je využito ve fotosyntéze. Někdy jen zanedbatelná, jindy převládající část zachycené světelné energie je přeměněna na teplo. Vždy ale malou část energie vyzáří molekuly chlorofylu okamžitě zpět v podobě fluorescence. Aniž bychom to pouhým okem zaznamenali, rostliny tak přes den vyzařují slabé červené světlo, které ovšem dokážeme zaznamenat pomocí fluorometrů. Tím dostáváme do ruky šikovný nástroj umožňující poodkrýt, co se při fotosyntéze děje, aniž bychom museli s rostlinou manipulovat. V textu si ukážeme základní předpoklady a praktické aspekty měření fluorescence chlorofylu, neboť jde o metodu poměrně dostupnou a uživatelsky velmi jednoduchou. Přesto, anebo právě proto ale někdy svádí k nesprávným očekáváním nebo interpretacím. Některé termíny použité v textu jsou vysvětleny ve slovníku na závěr článku.**

Chlorofylová fluorescence je jednoduchý proces a jeho využití umožňuje zkoumat, jak rostliny provádějí fotosyntézu, tedy jak efektivně využívají energii slunečního světla pro zabudování oxidu uhličitého do cukrů. Pomáhá nám pochopit, jak reagují na své prostředí, především na běžné stresové faktory, jakými jsou nedostatek vody

a živin, nízká nebo vysoká teplota, působení toxinů či patogenů apod. (viz i předchozí článek na str. 166–169). Takový stres bývá ještě umocněn světlem, pro rostliny nepostradatelným zdrojem energie, zároveň ale nevyhnutelným zdrojem dalšího stresu.

Abychom pochopili, jak fluorescenci chlorofylu prakticky využít, musíme si vy-

světlit její původ. I když může posloužit při zkoumání téměř jakýchkoli fotosyntetizujících organismů, např. mechů, řas, sinic a lišejníků, budeme v textu pro názornost pracovat s listem. Cílem je seznámit od začátku s poměrně nesnadným tématem a poskytnout stručnou příručku pro zvládnutí měření a interpretaci nejrozšířenějších fluorescenčních parametrů.

### Podstata chlorofylové fluorescence

Fluorescence je rozšířená vlastnost mnoha organických i anorganických látek. Po zachycení fotonu určité vlnové délky (určitě energie) – excitaci – dojde po velice krátké době k vyzáření fotonu o delší vlnové délce (menší energie) – emisi. Tuto vlastnost mají i molekuly chlorofylů, které v chloroplastech rostlinných buněk zachycují viditelné záření, především v oblasti modrého a červeného světla, a emitují fluorescenci na rozhraní červeného a blízkého infračerveného světla (obr. 1). Chlorofyly mají ve fotosyntetickém aparátu dvě role – podílejí se na zachytávání fotonů ve světlo-sběrných anténách, koncentrujících energii fotonů do reakčních center fotosystémů. V těch jsou uloženy molekuly chlorofylu *a*, které energii dopadajících fotonů absorbují, a tím excitují svůj elektron do vyšší energetické hladiny. Není-li excitovaný elektron využit pro fotosyntézu (fotochemii), či není-li jeho excitační energie odvedena nefotochemickým zhasením v podobě tepla (nefotochemií), okamžitě (v řádu nanosekund) se vrací na původní energetickou hladinu tím, že svou excitační energii vyzáří fluorescencí. A tuto autofluorescenci, konkrétně chlorofylu *a* v reakčním centru fotosystému II (FS II), můžeme pak experimentálně ovlivňovat, měřit a interpretovat (obr. 2).

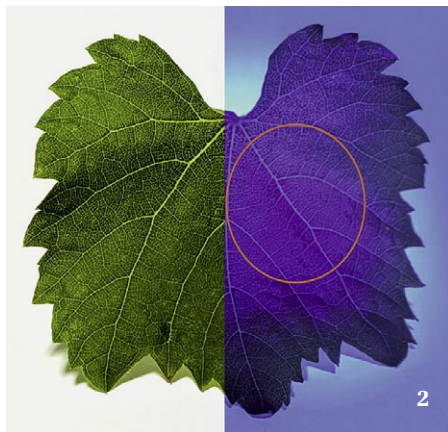
Intenzita fluorescence tedy závisí na dvou konkurenčních procesech – fotochemické a nefotochemické formě využití energie. Poběží-li fotosyntéza při nízké intenzitě světla (ozáření), bude většina excitovaných elektronů účinně využita fotochemickým způsobem – především pro fixaci  $\text{CO}_2$ . Menší část excitační energie elektronů bude nefotochemicky přeměněna na teplo a jen malá část energie zůstává nevyužita ani jedním z procesů a je nakonec vyzařena jako fluorescence. Pokud však bude rostlina vystavena přímému slunečnímu záření, fotochemie nebude mít kapacitu účinně využít excitované elektrony, většinou pro nedostatek  $\text{CO}_2$  anebo karboxylačního enzymu Rubisco v chloroplastu. Tím vzrůstá účinnost nefotochemických dějů jako hlavního ochranného mechanismu před přílišnou ozářeností.

Jak ale můžeme měřením samotné fluorescence odvodit, jaká je účinnost fotosyntézy a konkurenčních nefotochemických procesů? Tuto rovnici o dvou neznámých vyřešíme pomocí měření indukované fluorescence s využitím pulzně modulovaného fluorometru. Měření přitom není rušeno okolním světlem, které také obsahuje červenou složku, díky použití přesně řízených (modulovaných) záblesků měřicího světla. Modulace umožňuje selektivní detekci fluorescence vyvolané (indukované) těmito záblesky, a tím účinně oddělení signálu od pozadí. V následujících kapitolách si prakticky vysvětlíme, jak mohou vypadat měřicí protokoly pro vyčíslení účinností fotochemických a nefotochemických procesů.

### Měříme základní fluorescenční poměr

Budeme-li na list aklimatizovaný na tmu svítit slabým měřicím světlem, získáme hodnotu základní fluorescence ( $F_0$ ; obr. 3). Protože je intenzita měřicího světla natolik nízká, že nerozproudí tok elektronů do fotosyntézy, je fotochemické i nefotochemické zhášení nulové; molekuly plastochinonu, které odebírají excitovaný elektron, jsou neobsazené (oxidované). Když poté list krátce ozáříme saturačním zábleskem, veškeré plastochinony se nakrátko zasytí elektrony (redukuji), čímž se zablokuje tok elektronů do fotosyntézy a další excitované elektrony nemohou takto uzavřené reakční centrum opustit. A protože k aktivaci nefotochemických procesů dochází až po rozeběhnutí fotochemie, je výtěžek fluorescence v tuto chvíli maximální ( $F_m$ ). Samotné hodnoty obou parametrů ( $F_m$  a  $F_0$ ) ani jejich rozdíl, tedy variabilní fluorescence ( $F_v$ ), nám ale nic neřeknou. Je třeba je sjednotit, k čemuž využíváme podíl parametrů  $F_v$  a  $F_m$ ; ty pak můžeme porovnávat mezi různými rostlinami nebo pod vlivem stresu.

Z výše popsaného měření  $F_0$  a  $F_m$  můžeme spočítat základní fluorescenční poměr,  $F_v/F_m$  (výpočet uvádíme v přehledu na konci článku). Jde o zdaleka nejpoužívanější fluorescenční parametr, nejspíš proto, že k jeho změření stačí pouhá sekunda či dvě. Jeho velikost vypovídá o maximální kvantové účinnosti fotochemie FS II – vyčísluje funkčnost FS II bez vlivů následných procesů. Jeho hodnota je u nestresovaných  $\text{C}_3$  rostlin přizpůsobených světelným podmínkám asi 0,83, tedy 83 % absorbovaného světla FS II může využít ve fotochemii, zbytek se ztrácí v podobě tepla a fluores-



cence. U  $\text{C}_4$  rostlin  $F_v/F_m$  dosahuje asi 0,78 a u bezcévných rostlin (mechů, řas) to může být ještě méně. Snížené hodnoty oproti obvyklému maximu napovídají, že je FS II buď poškozen (projeví se nárůstem  $F_0$  anebo poklesem  $F_m$ ), nebo má aktivovaný nějaký ochranný mechanismus trvalého zhášení, např. u přezimujících listů (projeví se především poklesem  $F_m$ ). Pokles  $F_v/F_m$  bývá doprovázen snížením rychlosti fotosyntézy.  $F_v/F_m$  dobře koreluje s maximální kvantovou účinností fotosyntézy, což je měřítko toho, jak rychle se zvyšuje rychlost fotosyntézy s přibývajícím ozářením (obr. 4d). Jinak řečeno, vyjadřuje množství molů uvolněného kyslíku nebo fixovaného oxidu uhličitého na mol absorbovaných fotonů při nízkých hladinách ozáření, kdy je rychlost fotosyntézy limitována právě pouze světlem (obr. 4d). Maximální hodnoty kolem 0,08 (8 %) značí, že je třeba alespoň 1/0,08 = 13 fotonů (kvant) pro uvolnění/fixaci jedné molekuly  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ . Poškozením FS II může účinnost klesnout např. na 4 %, tedy potřeba fotonů pro výměnu jedné molekuly  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  by stoupla na 25 a to se projeví i poklesem  $F_v/F_m$  (obr. 4).

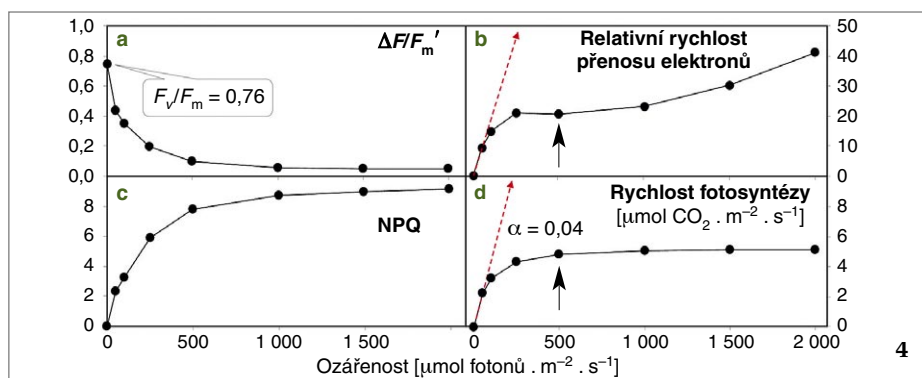
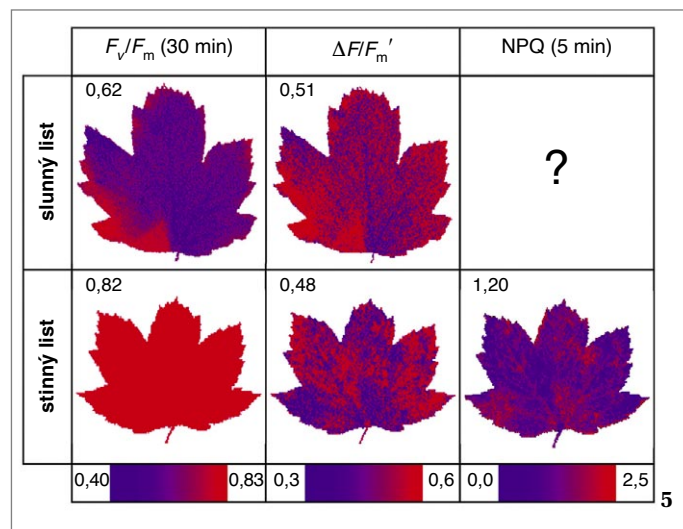
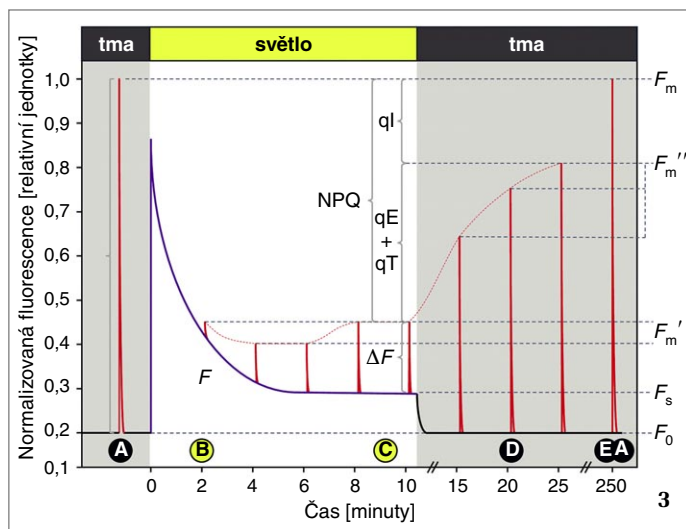
Velkou výhodou měření  $F_v/F_m$  je jeho rychlost. Lze tak jedním přístrojem změřit velké množství rostlin. Výrobci fluorometrů dodávají sady zatemňovacích kolíčků – ty se naklapnou na list, po požadované době zatemnění se do držáku nasadí optika fluorometru a otevře se zatemňovací clona. Držák optiky zajišťuje její neměnnou pozici vůči povrchu listu po celou dobu měření. Kdyby se např. mezi měření  $F_0$  a  $F_m$  optika k listu přiblížila, hodnotu  $F_m$ , a tedy i  $F_v/F_m$  by to chybně navýšilo. Záleží na okolnostech, na jak dlouho měření list zatemníme. Během zatemnění se navyšuje  $F_m$  tím, jak

1 V lahvičce je velmi zředěný extrakt chlorofylu v acetonu (chlorofyl se dobře rozpouští v organických rozpouštědlech). Když na ni ve tmě posvítíme modrým světlem, chlorofyl i přes nízkou koncentraci téměř veškeré světlo absorbuje. Protože ale excitovaný elektron v izolované molekule chlorofylu nemá možnost energii předat dále, vyzáří se zpět v podobě červené autofluorescence s maximem emise při vlnové délce 685 nm.

2 Posvítíme-li modrým světlem na list, lze rovněž fluorescenci spatřit, ale protože je chlorofyl součástí biochemických struktur, významná část excitační energie se uplatní dříve, než dojde k emisi fluorescence, která je tak méně očividná (v kroužku), ovšem dobře měřitelná.

3 Schematizovaný záznam fluorescence typického měřicího protokolu. Černou barvou je zobrazena fluorescence vyvolaná slabým měřicím světlem ( $F_0$ ), modrá představuje fluorescenci při aktinickém světle a červená fluorescenci vyvolanou záblesky saturačního světla (blíže ve slovníku na konci článku). Měření začíná s temnostně aklimatizovaným listem (A) odečtením minimální ( $F_0$ ) a maximální fluorescence ( $F_m$ ), z nichž můžeme spočítat variabilní fluorescenci  $F_v$  ( $F_m - F_0$ ) a základní fluorescenční poměr  $F_v/F_m$  (zde má hodnotu 0,80). Následuje zhášecí analýza, kdy po zapnutí aktinického světla fluorescence ( $F$ ) prudce vzroste a obratem pomaleji klesá – zhášá se (B) tím, jak se rozbíhá fotosyntéza i nefotochemické procesy a otevíráním průduchů. Zde došlo k ustálení fluorescence ( $F_s$ ) i maximální fluorescence na světle ( $F'_m$ ) po 8 minutách (C). Obvykle až z těchto ustálených parametrů počítáme hodnoty účinnosti fotosystému II (FS II) na světle a z  $F_m$  a  $F'_m$  i velikost nefotochemického zhášení NPQ. Po zhasnutí aktinického světla můžeme v rámci relaxační analýzy sledovat, jak se postupně obnovuje maximální fluorescence  $F_m''$  (D) tím, jak se nejdříve deaktivují nefotochemické procesy (qE a qT) a případně i vratným poškozením FS II (fotoinhibicí, qI). V našem případě došlo k obnovení  $F_m$  až po čtyřech hodinách temnostní relaxace (E).

4 Světelné křivky fluorescenčních parametrů (obr. a–c) a hrubého fotosyntetického příjmu  $\text{CO}_2$  (d) změřené u porostu rašeliníku bradavčitého (*Sphagnum papillosum*), který byl plně nasycen vodou. Se stoupající intenzitou ozáření klesá účinnost elektronového přenosu v FS II ( $\Delta F/F_m'$ ) s tím, jak se rozbíhají nefotochemické procesy (NPQ), neboť stále větší počet fotonů, které chlorofyl absorbuje, nelze využít (to lze zobrazit jako plochy mezi červenou šipkou a světelnou křivkou). Vynásobíme-li  $\Delta F/F_m'$  hodnotou ozáření (na ose x), dostáváme informaci o relativní rychlosti přenosu elektronů (b), která za určitých podmínek koreluje s rychlostí fotosyntézy (d). V našem případě se elektronový transport i fotosyntéza nasytí již při středních ozářenítech (černá šipka), což je dáno především nedostatkem  $\text{CO}_2$ , protože voda v mechovém porostu značně zpomaluje rychlost jeho difuze k buňkám. Při vyšších ozářenítech však vidíme, že elektronový transport zrychluje.



Je to tím, že se aktivuje alternativní spotřebič elektronů (zde asi kyslík v Mehlerově reakci, blíže v textu), čímž hodnota elektronového toku přestává být prediktorem rychlosti fotosyntézy. Už poměrně nízká počáteční strmota světelné křivky fotosyntézy (d), tedy hodnota její maximální kvantové účinnosti ( $\alpha = 0,04$ , červená šipka) naznačuje nějaké trvalé snížení kapacity fotosyntézy právě na úrovni FS II, což potvrzuje snížená hodnota  $F_v/F_m$  oproti potenciálnímu maximu 0,83 (a). Je to pravděpodobně dáno trvalou přítomností určité míry NPQ, která je u mechů běžná – zvládnout stres je pro bezcévné rostliny důležitější než maximalizovat fotosyntézu.

**5** Pomocí zobrazovací fluorescence chlorofylu lze sledovat rozložení fotosyntézy v ploše. V našem případě v listech javoru kleny (*Acer pseudoplatanus*) odebraných za horkého slunečného odpoledne z osluněné a odvrácené strany stromu. Pro každý z tisíců obrazových bodů jsou spočteny parametry  $F_v/F_m$ ,  $\Delta F/F_m'$  a NPQ a jejich hodnota zobrazena pomocí barevné škály. Rozložení  $F_v/F_m$  po 30minutovém zatemnění bylo v ploše slunného listu heterogenní a průměr 0,62 značí výrazné snížení vlivem fotoinhibice. Zato stinný list za stejnou dobu zatemnění dokázal  $F_v/F_m$  relaxovat v celé ploše až k teoretickému maximu 0,83. Rozložení  $\Delta F/F_m'$  a NPQ po pěti minutách při mírné ozáření aktinickým světlem odhalilo skrytou prostorovou heterogenitu. To ukazuje na rozdílnou citlivost obou parametrů vůči různým intenzitám stresu. Proč ale nemůžeme zobrazit NPQ pro slunný list? Protože pro výpočet NPQ potřebujeme znát plně relaxovanou hodnotu  $F_m$ ,

která není zatížena fotoinhibiční složkou nefotochemického zhašení qI (obr. 3). V tomto konkrétním případě byla relaxovaná hodnota  $F_v/F_m = 0,80$  změřena až druhý den ráno a její  $F_m$  by tak mohlo být dodatečně použito k vyjádření NPQ.

dochází k odbourávání nefotochemického zhašení, které však může mít původ ve více mechanismech s odlišnou dobou relaxace. To si vysvětlíme v kapitole Relaxační analýza. V praxi se aplikuje zatemnění na alespoň 15 minut; v případě takto krátkého zatemnění je třeba důsledněji dodržovat stejný čas zatemnění pro všechny měřené rostliny. Opačným přístupem je využití přirozeného zatemnění přes noc s měřeními před svítáním – pak máme jistotu, že naměřená hodnota  $F_m$  je skutečně maximální.

### Měříme fluorescenční parametry na světle

Nevýhodou použití parametru  $F_v/F_m$  je omezená interpretovatelnost pro rychlost fotosyntézy, protože při měření je fixace  $\text{CO}_2$  nulová. Proto můžeme s měřením fluorescence pokračovat v aktinickém světle (blíže ve slovníku). Na světle se rozbíhají fotochemické děje – rozproudí se přenos elektronů přes FS II, aktivují se fotosyntetické enzymy a pomalu se otevírají průduchy, aby zajistily přísun  $\text{CO}_2$ . Zároveň se aktivují ochranné nefotochemické procesy, z nichž nejvýznamnější je přeměna nadbytečné energie excitovaného elektronu na neškodné teplo, které zprostředkovává karotenoidní barvivo zeaxantin ze skupiny xantofylů. Tím zákonitě klesá fluorescence – zhaší se, což označujeme jako Kautského jev (obr. 3). Záblesk saturačního světla vyvolá v daný okamžik maximální fluo-

rescenci na světle  $F_m'$ , jejíž hodnota bude vždy menší než  $F_m$ , protože část excitační energie odeberou již aktivované nefotochemické děje. Velikost nefotochemického zhašení vyčíslujeme parametrem NPQ (Non-Photochemical Quenching, viz přehled parametrů).

Navýšení  $F_m'$  vůči aktuální úrovni fluorescence na světle  $F$  (v ustáleném stavu  $F_s$ ) označujeme jako  $\Delta F$  ( $\Delta F = F_m' - F_s$ ). Její velikost je dána aktuální kvantovou účinností elektronového přenosu v FS II,  $\Delta F/F_m'$ , jejíž hodnota může být v teoretickém intervalu 0 až  $F_v/F_m$ , především v závislosti na intenzitě aktinického světla (obr. 4a). Když vynásobíme účinnost elektronového přenosu hodnotou ozáření, která byla absorbována FS II, dostáváme informaci o relativní rychlosti přenosu elektronů FS II, RETR (Relative Electron Transport Rate, obr. 4b), jejíž hodnota bývá dobře korelována s rychlostí asimilace  $\text{CO}_2$ , tedy vlastní fotosyntézou. I proto jsou  $\Delta F/F_m'$  spolu s NPQ nejvyužívanějšími parametry kinetiky fluorescence chlorofylu na světle;  $\Delta F/F_m'$  může do určité míry nahradit přístrojově a časově náročnější gazometrická měření fotosyntézy.

Fluorometry často umožňují nastavit intenzitu aktinického záření, a tak proměřit tzv. světelné křivky. S narůstající ozářeností klesá účinnost elektronového přenosu (čím více světla, tím větší podíl nefotochemie i fluorescence) a saturuje se rychlost elektronového přenosu a zejména fotosyntézy – zprvu rychlý nárůst se s přibývajícím ozářením zpomaluje (obr. 4b). Nárůst fotosyntézy se pro nedostatek  $\text{CO}_2$  anebo enzymu Rubisco zastaví (obr. 4d), ale elektronový transport může růst dále, protože elektrony nemusejí sloužit pouze pro fixaci  $\text{CO}_2$ . Přebytky, a tedy nežádoucí elektrony mohou být relativně bezpečně odčerpány i jinými biochemickými procesy, např. fotorespirací nebo Mehlerovou reakcí, při které elektrony odebírá místo NADP molekula kyslíku. Takto vzniklý kyslíkový radikál je však bezpečně zneškodněn již připraveným biochemickým aparátem (obr. 4b).

### Relaxační analýza

Po zhasnutí aktinického světla můžeme ještě sledovat dynamiku obnovy fotosyntetického aparátu měřením rychlosti, jakou se obnovuje hodnota maximální fluorescence ve tmě ( $F_m''$ , obr. 3). Umožní nám to



rozdílit rychle a pomalu odeznívající složky NPQ. Zpočátku se rychle odbourává nefotochemicky účinný pigment xantofylového cyklu zeaxantin, především byl-li list předtím vystaven vyšší intenzitě světla. Tuto složku NPQ označujeme  $qE$ . Následující, ale někdy nesnadno oddělitelnou složkou je  $qT$ , která souvisí s přesunem částí světlosběrných antén mezi fotosystémy při relaxaci po vystavení listu nižší intenzitě světla. V obr. 3 jsou obě složky znázorněny společně prostřednictvím navýšení  $F_m''$  po (např.) 15 minutách od zhasnutí aktinického světla. Delší dobu relaxace vyžadují procesy spojené s vratným, případně i nevratným poškozením FS II (fotoinhibicí, kdy je třeba část fotosystému vytvořit znovu, nebo až fotodestrukci). Tuto složku označujeme  $qI$  a lze ji znázornit jako rozdíl mezi  $F_m''$  po (např.) 15 minutách ve tmě a  $F_m$  plně relaxovaného listu na začátku protokolu.

### Na závěr

Zaměřili jsme se na nejpoužívanější a nej-univerzálnější protokol měření indukované fluorescence chlorofylu, který může za určitých podmínek i nahradit gazometrická měření. Vedle této pomalé kinetiky fluorescence dokážou dnešní fluorometry zaznamenávat i rychlou kinetiku, odrážející počáteční fotochemické reakce v FS II během saturačního záblesku, kterým měříme  $F_m$ . Fluorescence totiž během maximálně sekundového měření narůstá v několika fázích s dobou trvání od desetin až po stovky milisekund; podle kódů těchto fází bývá analýza označována jako OJIP. Záznam přináší řadu specifických parametrů, jejichž interpretace jde už za cíle našeho článku.

Indukovaná fluorescence chlorofylu je silný, citlivý a široce uplatnitelný nástroj pro výzkum rostlin. Její předností je, že umožňuje rychle a nedestruktivně vyhodnotit především míru stresu, který se rychle projevuje právě na úrovni fotosyntetického aparátu. Nachází využití v široké škále aplikací a podmínek, od terénního/laboratorního a základního/aplikovaného výzkumu až po monitorování v zemědělství, lesnictví i kvalitě vody.

### Slovník pojmů a parametrů

- Aktinické světlo aktivuje fotochemii, tedy fotosyntézu. Jde v podstatě o viditelné záření o určité intenzitě vyjádřené ozářeností.
- Fotochemie, fotochemické zhášení excitace elektronu v molekule chlorofylu je proces, kdy elektron odchází do elektron-

6 Výkonný přenosný fluorometr (vlevo vzadu) využívá svazku optických vláken, která přivádějí všechny typy světla na vzorek (zde vidíme červené aktinické světlo) a zároveň odvádějí vyzářenou fluorescence zpět k analyzátoru. Detailní průběh měření můžeme sledovat na počítači nebo tabletu. Držák (v popředí) zajišťuje neměnné umístění optické sondy vůči listu po celou dobu měření. Kapesní, méně výkonné fluorometry bez vláknové optiky se přikládají přímo na list.

7 Zobrazovací fluorometr umožňuje zobrazovat plošnou fluorescence z celých rostlin nebo jejich částí (obr. 5). Lze jej účinně využít i k měření většího množství vzorků najednou, pro které se dají vyčíslit fluorescenční parametry samostatně. Mohou to být např. semenáčky při selekci mutací ve šlechtění, stélky mechů, suspenze řas anebo, tak jako zde, listové terčíky. Všechny snímky a orig. T. Hájek

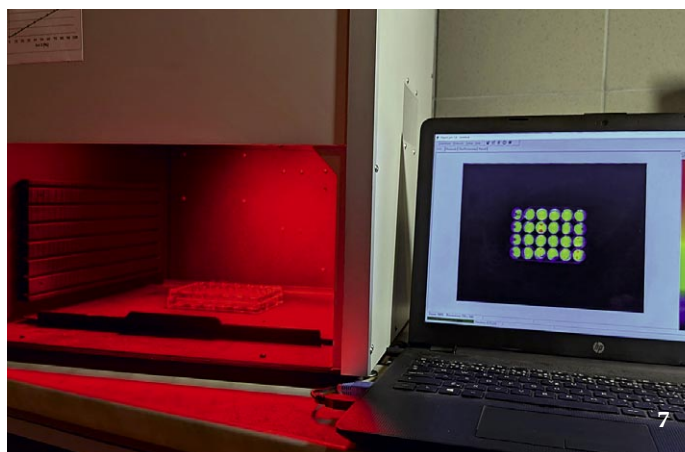
-transportního řetězce, jehož hlavním cílem je tvorba ATP a produkce NADPH využitelné při fixaci  $CO_2$ , tedy fotosyntéza.

- Fotosystémy (FS) II a I jsou bílkovinné komplexy obsahující chlorofyly. V tylakoidních membránách chloroplastů spolupracují v uvedeném pořadí FS II a FS I na zachytávání světelné energie pro její přeměnu na energii chemickou, potřebnou pro zabudování  $CO_2$  do cukrů – fotosyntézu. Většina fluorescence pochází z FS II, který je navíc náchylný k poškození, a dobře tak odráží působení stresu.

- Měřicí světlo je aplikováno jako krátké slabé záblesky v přesné frekvenci, takže nestačí k aktivaci fotosyntézy (nemá aktinický efekt). Na světle lze jím vyvolanou fluorescence odlišit od úrovně červeného světla v pozadí.

- Nefotochemie, nefotochemické zhášení (NPQ) – excitace elektronu v molekule chlorofylu, je proces zprostředkovaný především zeaxantinem, karotenoidním barvivem xantofylového cyklu. Tvorba zeaxantinu je aktivována světlem za účelem odebrat nevyužitelnou excitační energii a přeměnit ji na neškodné teplo dříve, než dojde k jejímu nežádoucímu přenosu např. na kyslík, což může vyvolat oxidativní stres.

- Ozářenost vyjadřuje hustotu fotonového toku ve fotosynteticky aktivní, tedy i viditelné části spektra. Protože fotosyntéza je kvantové povahy (jeden foton excituje jeden elektron), energie („barva“) fotonu není pro fotochemické procesy významná. Proto se ozářenost udává v molech fotonů (kvant)



dopadajících na jednotku plochy (listu) za jednotku času, nejčastěji v  $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ . Listy otočené ke slunci mohou být vystaveny ozářenosti až 2 000  $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ .

- Plastochinon je tzv. primárním elektronovým akceptorem v FS II. V oxidované formě (PQ) odebrá elektrony, které pak ve své redukované formě  $PQH_2$  (plastochinol) transportuje dále do fotochemie, aby se zase vrátil jako PQ. PQ je tedy zhášeč fluorescence, zatímco jeho nedostatek (nahromaděním  $PQH_2$ ) fluorescence zvyšuje.

- Saturační záblesk vysoké intenzity světla slouží k tomu, aby na velmi krátkou dobu plně uzavřel (saturoval) všechna reakční centra FS II. Tím se zastaví fotochemické děje a veškerá excitační energie je buď odvedena do nefotochemie, nebo vyzářena jako fluorescence. Díky tomu lze změřit maximální úroveň fluorescence za daných podmínek ( $F_m$ ,  $F_m'$  či  $F_m''$ ) a vyčíslit účinnost fotochemických a nefotochemických procesů za daných světelných podmínek. Saturační záblesk obvykle trvá necelou sekundu a ozářenost může dosahovat např. 4 000  $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$  (listům přizpůsobeným na stín stačí méně, aby je záblesk nepoškodil).

### Přehled klíčových parametrů

- $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  = maximální kvantová účinnost fotochemie FS II, běžně označovaná „ $F_v$  nad  $F_m$ “ nebo „ $F_v$  ku  $F_m$ “.
- $\Delta F/F_m' = F_q'/F_m' = \Phi PSII = (F_m' - F_0')/F_m'$  = aktuální kvantová účinnost fotochemie FS II na světle.

- NPQ =  $(F_m - F_m')/F_m' = F_m/F_m' - 1$  = nefotochemické zhášení (název parametru je totožný s názvem mechanismu). Nabývá hodnotu mezi 0 a zhruba 10 (nejde tedy o vyjádření účinnosti na škále 0–1 jako v případě obou fotochemických parametrů).

- $qE$ ,  $qT$ ,  $qI$  – složky nefotochemického zhášení relaxující ve tmě během zhruba 5, 20 a více minut, lze vyjádřit jako rozdíl NPQ na světle a NPQ v čase např. 5 minut ( $qE$ ), jako rozdíl mezi NPQ v čase např. 5 a 20 minut ( $qT$ ) a jako NPQ v čase např. 20 minut ( $qI$ ). Jde o mírné zjednodušení protokolu, který nevyužívá měření parametru  $F_0'$  (blíže v seznamu literatury).

- REFR =  $\Delta F/F_m' \times \text{ozářenost} \times 0,84 \times 0,5$  = relativní rychlost přenosu elektronů FS II. Hodnoty 0,84 a 0,5 vycházejí z předpokladu, že jen 84 % fotonů je pohlceno fotosystémy a z nich polovina FS II.

Doporučenou literaturu najdete na webových stránkách Živý.