

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Markéta Palovská

Analýza primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů: srovnání vybraných metod a možné využití při studiu genetické variability
Analysis of primary photosynthetic processes in conifers: A comparison of selected methods and their possible utilisation for the study of genetic variability

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Marie Kočová, CSc.

Konzultant: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2015

Podpis

Práce byla podporována projekty Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze
SVV-2013-267205, SVV-2014-260081, SVV-2015-260209

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Daně Holé, Ph.D. za rady, čas a trpělivost, které mi věnovala v celém průběhu psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Marii Kočové, CSc. za to, že mě zasvětila do metody polarografických měření a Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D. za osvětlení metody měření reflektance. Děkuji také Ing. Janu Kaňákovi, Ph.D. a všem spolupracovníkům z Fakulty lesnické a dřevařské ČZU za to, že mi umožnili práci na testovacích porostech borovice a Ing. Janu Stejskalovi, Ph.D. děkuji za rady a pomoc při výpočtech heritability.

Abstrakt

Jehličnany jsou významné jak z ekologického, tak ze socioekonomického hlediska, výzkum některých oblastí jejich biologie však zaostává. Týká se to např. jejich genetiky a šlechtění a zčásti i fyziologie. Vzhledem k tomu, že při kvantitativně-genetických analýzách potřebných pro šlechtění je třeba hodnotit vždy mnoho vzorků, a také proto, že klasické metody měření jsou poměrně pracné, uvažuje se o využití některých parametrů popisujících např. aktivitu fotosyntetického elektron-transportního řetězce (ETC). Metod měření aktivity fotosyntetického ETC je sice celá řada, ale jejich použití na jehličnanech nese různé problémy. V této práci se zabývám touto problematikou z různých úhlů. V první části práce jsem srovnávala aktivity částí fotosyntetického ETC u 8 druhů jehličnanů pomocí analýzy fluorescence chlorofylu (Chl) na intaktních jehlicích a pomocí polarografického měření na izolovaných chloroplastech. Každá metoda měla jinou vypovídací hodnotu. V druhé části jsem měřila fluorescenci Chl, reflektanční spektra a obsahy pigmentů u 536 geneticky definovaných stromů *Pinus sylvestris* L. Odhalila jsem poměrně vysokou genetickou variabilitu i heritabilitu v řadě parametrů. Stanovila jsem také vhodnost použití řady reflektančních indexů pro odhad obsahu pigmentů a vody v jehlicích. V třetím bloku jsem optimalizovala spektrofotometrickou metodu měření aktivity Fotosystému II s inhibovaným komplexem produkujícím kyslík a ověřila jsem její použitelnost pro jehličnany.

Klíčová slova

dědivost, fluorescence chlorofylu, fotosyntetické pigmenty, fotosyntéza, chloroplasty, genetická variabilita, jehličnany, komplex produkující kyslík, spektrální odrazivost

Abstract

Conifers are important both ecologically and socioeconomically, however, some parts of their biology are not that well researched. This includes genetics and breeding and partly even physiology. Because quantitative genetic analyzes applied in breeding necessitate an analysis of a large number of samples, and conventional methods of analysis are quite time-consuming, certain parameters describing e.g. the activity of photosynthetic electron-transport chain (ETC) are considered for such use. Several methods of the measurement of the activity of photosynthetic ETC exist, but there are some problems with their usage in conifers. I studied this issue from different points of view in three parts of this thesis. 1) I compared the photosynthetic ETC activity in 8 species of conifers using chlorophyll (Chl) fluorescence measurements on intact needles and polarographic measurements in isolated chloroplasts. Each method brought different information. 2) I measured Chl fluorescence parameters, reflectance spectra and pigment content in 536 genetically defined trees of *Pinus sylvestris* L. Many parameters showed relatively high genetic variability and heritability. I have also determined the suitability of various reflectance indices to estimate pigment and water content of needles. 3) I have optimized the spectrophotometric method for the measurement of the activity of Photosystem II with inhibited oxygen evolution complex and checked its applicability for conifers.

Key words

chlorophyll fluorescence, chloroplasts, conifers, genetic variability, heritability, oxygen-evolving complex, photosynthesis, photosynthetic pigments, spectral reflectance

Obsah

1 Úvod.....	6
2 Cíle práce.....	7
3 Přehled literatury.....	8
3.1 Primární fotosyntetické procesy.....	8
3.2 Metody měření/odhadování účinnosti různých částí fotosyntetického ETC a jejich využití u jehličnanů.....	9
3.2.1 Systémy založené na polarografii.....	10
3.2.2 Systémy založené na spektrofotometrii.....	13
3.2.3 Systémy založené na měření fluorescence Chl a.....	14
3.2.4 Systémy založené na termoluminiscenci.....	31
3.3 Vnitrodruhová variabilita u jehličnanů v parametrech týkajících se primárních fotosyntetických procesů.....	32
4 Materiál a metody.....	44
4.1 Rostlinný materiál a rozvržení pokusů.....	44
4.1.1 Pokusný blok 1.....	44
4.1.2 Pokusný blok 2.....	46
4.1.3 Pokusný blok 3.....	49
4.2 Metody.....	50
4.2.1 OJIP křivka indukce fluorescence Chl.....	50
4.2.2 Izolace fotochemicky aktivních chloroplastů.....	55
4.2.3 Stanovení obsahu Chl v suspenzích chloroplastů.....	56
4.2.4 Měření aktivity fotosyntetického elektron-transportního řetězce pomocí Clarkovy elektrody.....	57
4.2.5 Stanovení hmotnosti sušiny a obsahu fotosyntetických pigmentů v jehlicích.....	60
4.2.6 Spektrofotometrické stanovení rychlosti redukce DCPIP.....	61
4.2.7 Měření spektrální reflektance.....	64
4.3 Statistická analýza.....	70
4.3.1 Pokusný blok 1.....	70
4.3.2 Pokusný blok 2.....	71
4.3.3 Pokusný blok 3.....	72
5 Výsledky.....	73
5.1 Pokusný blok 1.....	73
5.2 Pokusný blok 2.....	75
5.3 Pokusný blok 3.....	82
6 Diskuze.....	92
7 Souhrn.....	100
8 Seznam použité literatury.....	102
9 Příloha.....	I
9.1 Příloha 1.....	I
9.2 Příloha 2.....	II
9.3 Příloha 3.....	XXI

1 Úvod

Jehličnany jsou jedny z nejstarších skupin rostlin, které se na Zemi objevily. V současnosti je v oddělení *Pinophyta*, třídě *Pinopsida* a řádu *Pinales*, kam jehličnany patří, rozeznáváno více než 600 druhů v rámci 8 čeledí a přibližně 70 rodů. Najdeme je na všech kontinentech kromě Antarktidy (především ovšem na severní polokouli), ve všech klimatických pásmech od polárního po tropické a jsou součástí téměř všech hlavních vegetačních typů světa. Jejich ekologický význam je nesmírný; lesy s dominantními jehličnatými druhy představují 40 % světových lesních porostů, slouží jako jedno z hlavních úložišť (sinků) v globálním cyklu uhlíku a poskytují životní prostředí mnoha druhům dalších organismů, s kterými jsou často provázány složitými vztahy. Ekonomický význam pro člověka je rovněž velký: 60–70 % světové produkce dřeva užívaného ve stavebnictví, k výrobě papíru i k jiným účelům pochází právě z jehličnatých stromů. Využívá se také jejich pryskyřice, případně jedlá semena, a je nutné zmínit i jejich úlohu v krajinářství a zahradnictví (Farjon et al. 2010).

Studiu jehličnanů je věnováno mnoho vědeckých prací (zadání slova „conifer“ do databáze Web of Science poskytlo více než 15 000 výsledků jen od r. 1945). Ne všechny směry výzkumu jsou na tom ale stejně a např. v oblasti kvantitativní či populační genetiky nebo i v některých oblastech fyziologie je oproti krytosemenným rostlinám stále co dohánět. V Laboratoři genetiky rostlin Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze jsme se jehličnany začali zabývat přibližně před deseti lety, a to v souvislosti s analýzou primárních fotosyntetických procesů. V Laboratoři byla vypracována optimální metodika pro izolaci fotosynteticky aktivních chloroplastů použitelná pro různé druhy jehličnanů a umožňující polarografické stanovení aktivit pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán (Holá et al. 2012). Ve spolupráci s dalšími pracovišti byla také provedena analýza primárních fotosyntetických procesů u smrku ztepilého (*Picea abies* [L.] Karst.) dlouhodobě vystaveného zvýšené koncentraci CO₂ ve vzduchu (Holá et al., článek v přípravě). V rámci tohoto výzkumu se ukázaly některé zajímavé metodické aspekty, kterými stálo za to se zabývat dále, a moje práce tedy částečně navazuje na tento předchozí výzkum. Kromě toho Laboratoř v současnosti navázala spolupráci s kolegy z Katedry genetiky a šlechtění lesních dřevin Fakulty lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze, kteří měli velký zájem o využití měření účinnosti primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů pro účely kvantitativně genetických studií. Otestováním této možnosti jsem se ve své práci tudíž také zabývala.

2 Cíle práce

Tato práce se věnuje různým metodám analýzy primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů a má tři hlavní cíle:

1) Zjistit, zda (a jak) si odpovídají informace o účinnosti různých částí fotosyntetického elektron-transportního řetězce získané pomocí analýzy kinetiky rychlé části křivky indukce fluorescence chlorofylu (OJIP analýza) a pomocí měření fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů. Za tímto účelem bylo testováno osm vybraných druhů jehličnanů reprezentujících podčeledi Pinoideae, Piceoideae a Abiotiedae v rámci čeledi Pinaceae a čeleď Taxaceae. Druhy se lišily fotochemickou aktivitou měřenou v izolovaných chloroplastech. Výchozím předpokladem bylo, že mezidruhové rozložení hodnot těchto aktivit reprezentujících účinnost Fotosystémů I a II a celého fotosyntetického elektron-transportního řetězce bude souhlasit s mezidruhovým rozložením hodnot těchto parametrů fluorescence chlorofylu, které charakterizují účinnost odpovídajících částí fotosyntetického elektron-transportního řetězce.

2) Zjistit, zda lze dvě rychlé, „nedestruktivní“ metody (OJIP analýzu a měření spektrální odrazivosti) a jednu „destruktivní“, pomalejší, ale na technické provedení jednoduchou metodu (spektrofotometrické stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů) využít při analýze genetické variability jehličnanů, a zjistit, které parametry získané těmito metodami jsou pro tento účel nejvhodnější. Za tímto účelem byl hodnocen geneticky definovaný soubor několika set jedinců západočeské populace druhu *Pinus sylvestris* L. Výchozím předpokladem bylo, že alespoň v některých parametrech bude testovaná populace vykazovat genetickou variabilitu a koeficient dědivosti nebude nulový; parametry s nejvyšší dědivostí by pak byly doporučeny pro další využití a kvantitativně genetický rozbor.

3) Zavést a optimalizovat metodu inhibice komplexu produkujícího kyslík (součást Fotosystému II) a vyzkoušet možnost spektrofotometrického měření aktivity Fotosystému II za přítomnosti umělého donoru a akceptoru elektronů v takto modifikovaných vzorcích izolovaných chloroplastů. Za tímto účelem byla provedena řada metodických pokusů na různém rostlinném materiálu včetně *Picea abies* (L.) H. Karst. Výchozím předpokladem bylo, že alespoň některou z metodik popsaných v literatuře pro práci s lupenitými listy (nebo kombinaci různých metodik) se podaří optimalizovat a využít i pro chloroplasty izolované z jehlic.

3 Přehled literatury

3.1 Primární fotosyntetické procesy

Fotosyntéza je jedním ze základních biofyzikálních a biochemických procesů na Zemi. Její primární fáze se u zelených rostlin (včetně jehličnanů) odehrává na tylakoidní membráně chloroplastů, kde dva velké pigment-proteinové komplexy, fotosystém II (PS II) a fotosystém I (PS I), zachycují fotony slunečního záření prostřednictvím takzvaných světlosběrných anténových komplexů LHC („light harvesting complex“). Energie těchto fotonů excituje elektrony molekul chlorofylu (Chl) obsažených v LHC PS II a PS I a je rezonancí přenášena mezi molekulami Chl až do reakčního centra (RC) PS.

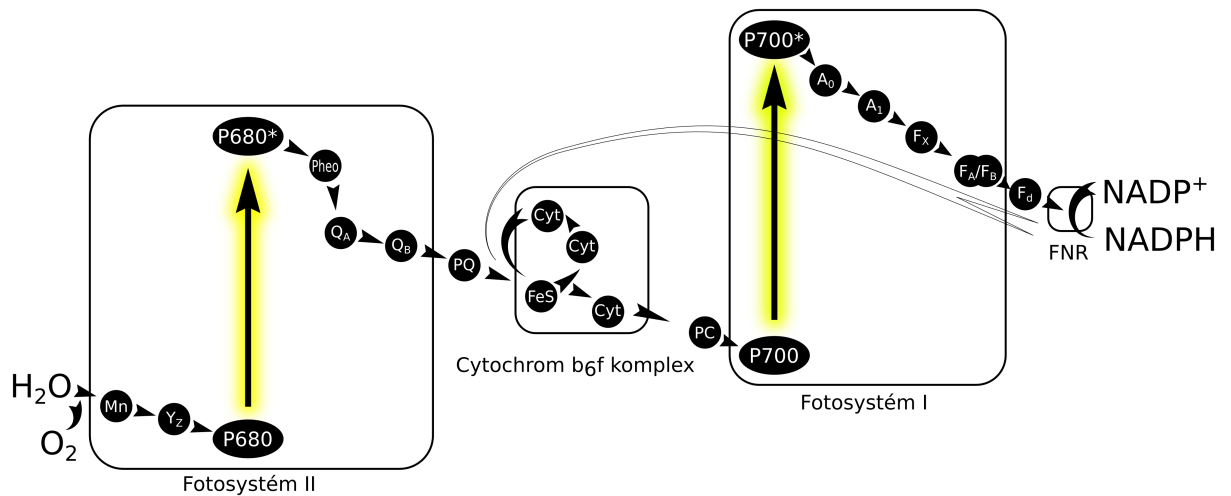
V RC PS je speciální pár Chl *a* (nazývaný P680 u PS II nebo P700 u PS I) schopný separace náboje neboli vypuzení vysokoenergetického elektronu a jeho předání molekule akceptoru. Na každý PS připadá velké množství Chl a dalších pigmentů, které nejsou schopny separace náboje a spolu s polypeptidy, na které jsou vázány, se nazývají světlosběrná anténa. Tato anténa může být vnitřní a vnější. Vnitřní anténa je přímo součástí pigment-proteinového komplexu PS I/PS II a lze ji považovat za neoddělitelnou složku těchto komplexů. Vnější anténa je součástí oddělitelného membránového komplexu (LHC) a některé její složky se mohou přemísťovat mezi PS I a PS II.

Excitační energie a separace náboje je pohonem pro průchod elektronů komplikovaným elektron-transportním řetězcem (ETC – „electron-transport chain“) zobrazeným na Obr. 1 ve formě známého Z-schématu. Koncovými akceptory elektronů jsou obvykle molekuly NADP^+ . Kromě tohoto lineárního ETC mohou v tylakoidní membráně chloroplastů probíhat dvě varianty cyklického transportu elektronů kolem PS I. Navíc mohou být elektrony z PS I předávány nejen na NADP^+ , ale také na O_2 v tzv. pseudocyklickém transportu elektronů (Mehlerově reakci) (Roach et Krieger-Liszkay 2014)

Průchod elektronů ETC je na několika místech spojen s přenosem protonů přes tylakoidní membránu proti elektrochemickému gradientu. Mezi PS II a PS I elektrony procházejí komplexem cytochromu b_6f skrze tzv. Q-cyklus, který se velkým dílem zaslouhuje o tvorbu tohoto gradientu. Energie gradientu protonů na membráně je využívána enzymem ATP-syntázou pro tvorbu ATP.

Po separaci náboje je třeba do RC PS II dodat chybějící elektron. Zdrojem těchto elektronů jsou molekuly vody, které jsou štěpeny na $\text{O}_2 + 4 \text{H}^+$ uvnitř Mn centra v komplexu produkujícím kyslík (OEC, „oxygen evolving complex“), který je součástí komplexu PS II.

K tomuto štěpení dochází na lumenální straně tylakoidní membrány a vzniklé H^+ tedy přispívají k celkovému protonovému gradientu.



Obr. 1: Z-schéma fotosyntetického elektron-transportního řetězce. Umístění elektronových přenašečů (černé elipsy a kruhy) na vertikální ose znázorňuje gradient elektronegativity. Obdélníky se zaoblenými rohy zobrazují hranice jednotlivých (pigment-)proteinových komplexů. Zvýrazněné šipky označují místa exitace a separace náboje. Mn – manganatý ion v enzymu štěpícím vodu (OEC – „oxygen evolving complex“). Y_Z – tyrozin. P680 – primární donor e⁻ PS II (speciální pár Chl *a*). P680* – excitovaný primární donor. Pheo – primární akceptor e⁻ (feofytin). Q_A – plastochinon pevně vázaný na PS II. Q_B – plastochinon, který disociuje z PS II. PQ – mobilní plastochinon v membráně. FeS – železosírné centrum. Cyt – cytochrom. PC – plastocyanin. P700 – primární donor PS I (speciální pár Chl *a*). P700* – excitovaný primární donor. A₀ – primární akceptor e⁻ (modifikovaný Chl). A₁ – sekundární akceptor e⁻ (fylochinon). F_X, F_A a F_B – železosírná centra. F_d – feredoxin. FNR – feredoxin NADP⁺ reduktáza. Převzato a upraveno podle Govindjee (2004)

3.2 Metody měření/odhadování účinnosti různých částí fotosyntetického ETC a jejich využití u jehličnanů

Fotosyntetický ETC jakožto jeden ze základních a nejdůležitějších biologických procesů je samozřejmě dlouhodobě objektem zájmu mnohých vědeckých pracovišť. Studií, které se zabývají stanovením jeho účinnosti, je nepřehledné množství. Pro výzkumníka, který se chce fotosyntézou zabývat, ale jehličnany nejsou první a většinou ani druhou volbou. Unikátní charakter jehlic totiž vytváří různé technické problémy pro použití dále zmíněných metod. Možností jak měřit účinnost fotosyntetického ETC, resp. jeho dílčích složek, je mnoho. V následujícím přehledu stručně popisuji princip jejich hlavních variant a uvádím příklady studií, v nichž tyto metody byly použity k analýze primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů.

3.2.1 Systémy založené na polarografii

Polarografie byla poprvé vyvinuta v roce 1922 Jaroslavem Heyrovským. Základním principem je měření proudu vzniklého oxidací/redukci chemických látek ve vzorku v závislosti na napětí. Historicky první a nejuniverzálnější měřicí zařízení využívá rtuťovou kapající elektrodu nebo její obdoby rtuťovou kapkovou a rtuťovou filmovou elektrodu. Elektrody z pevných ušlechtilých kovů (zlato nebo platina) do určité míry omezují spektrum měřitelných látek, ale umožňují technické provedení se stabilní plochou povrchu elektrody. V rozsahu napětí -700 až 0 mV je kyslík nejvýznamnějším reaktantem na povrchu elektrody, a proto se polarografie skvěle hodí k měření obsahu kyslíku v roztoku (Armstrong 1994).

Existují různá technická provedení kyslíkových elektrod, jako cylindrická elektroda (která byla vyvinuta k měření okysličení kořenů rostlin v anaerobním prostředí), rotační a vibrační elektrody (které řeší problém pomalé difúze kyslíku vodním prostředím) a membránové elektrody (které oddělují prostředí okolí elektrody od prostředí vzorku membránou propustnou pro plyny) (Armstrong 1994). V biologii nejčastěji používanou kyslíkovou elektrodou je Clarkova elektroda ze skupiny membránových elektrod, která se nazývá podle svého vynálezce. Využívá teflonovou membránu, která od vzorku odděluje roztok KCl s platinovou měřicí a Ag/AgCl referenční elektrodou. Podle velikosti se elektrody dělí na makroelektrody a mikroelektrody se špičkami úzkými až v řádu mikrometrů (Armstrong 1994).

V kontextu suspenzí tylakoidních membrán je polarografie používána pro měření přirozené produkce kyslíku OEC nebo spotřeby O_2 navozené přidáním různých látek k osvětlené suspenzi izolovaných chloroplastů nebo tylakoidních membrán (Izawa 1980).

Studium produkce kyslíku v nebuněčných systémech (izolované chloroplasty nebo subchloroplastové částice) za pomoci chemických látek interagujících s ETC sahá daleko do minulosti až k objevu Hillovy reakce v roce 1937 (Walker 2002). Hill tehdy ke svému překvapení pozoroval, že přidání umělých akceptorů elektronů ferrioxalátu anebo ferrikyanidu do vzorku rozbitých chloroplastů výrazně znásobí produkci kyslíku. Od té doby bylo objeveno velké množství látek, které fungují jako donory a akceptory elektronů pro ETC nebo inhibitory transportu elektronů na specifických místech řetězce. Objevy těchto látek se výrazně zasloužily o objasnění Z-schématu a dnes nám umožňují navrhnout a měřit přenos elektronů vybranými úseky ETC.

Řádově nejvíce je známo různých ***inhibitorů transportu elektronů*** a hledání nových je

stále v zájmu výzkumníků, protože mnohé z nich je možno použít jako herbicidy. V možnostech této práce ani jejím cílem není podat úplný přehled všech těchto známých inhibitorů. Sepíšu zde pouze příklady některých používanějších tak, aby byla reprezentována všechna možná místa působení těchto látek. Podrobnější přehledy lze najít například v Barr et Crane (2005) a historický pohled popisuje Trebst (2007).

Inaktivace **OEC** nacházejícího se na **donorové straně PS II** bývá založena na extrakci iontů Mn^{2+} , Ca^{2+} nebo Cl^{-} . Nejpoužívanější je extrakce Mn^{2+} inkubací vzorku s Tris-HCl, vystavení hydroxyaminu nebo azidu (Barr et Crane 2005). OEC je také velmi citlivý k teplotnímu stresu. Dean et Pocock (2004) například použili pro jeho inaktivaci 2,5 min vystavení vzorku chloroplastů 50 °C. Zvláštním případem inhibitorů přirozeného transportu elektronů na donorové straně PS II jsou hydroxylamin a karbonylkyanid-fenylhydrazony (CCCP), které zároveň působí jako umělé donory elektronů pro PS II (Trebst 2007).

S oběma hlavními podjednotkami PS II (D1 a D2) těsně sousedí **cytochrom b_{559}** , který se pravděpodobně účastní cyklického transportu okolo PS II a ochrany PS II před fotoinhibicí. Ovlivnění funkce tohoto proteinu můžeme docílit vystavením karbonylkyanid-4-(trifluorometoxy)fenylhydrazonu (FCCP) (Barr et Crane 2005).

Na **akceptorové straně PS II** může řada inhibitorů zabránit přenosu elektronů z chinonových přenašečů Q_A na Q_B a nebo soutěžit s plastochinonem (PQ) o vazbu k Q_B . Jsou to například N'-(3,4-dichlorfenyl)-N,N-dimethylmočovina (DCMU, komerčně používána jako herbicid diuron), 2-chloro-4-(ethylamin)-6-(isopropylamin)-S-triazin (komerčně používán jako herbicid atrazin) a rodina fenolových inhibitorů (Barr et Crane 2005, Trebst 2007).

Aktivitu komplexu **cytochromu b_6f** lze inhibovat např. 2,5-dibromo-3-metyl-6-isopropyl-p-benzochinonem (DBMIB), 2,4-dinitrofenyléterem 2-iodo-4-nitrothymolu (DNP-INT) a dalšími látkami (Barr et Crane 2005). Tyto dva inhibitory se liší v některých chemických vlastnostech: DBMIB může být redukován a interaguje s -SH skupinami proteinů (Trebst 2007).

Funkce proteinového přenašeče **plastocyaninu** může být inhibována např. KCN nebo $HgCl_2$. $HgCl_2$ ale v závislosti na použité koncentraci ovlivňuje i jiné části ETC (Trebst 1980).

Redukce **ferredoxinu** může být inhibována chelatačním činidlem disalicylidenpropandiaminem (DSPD), jehož specificita a tedy i použitelnost je však sporná (Trebst 1980). **Cyklický transport okolo PS I** může být inhibován antimycinem A (Barr et Crane 2005).

Jak je zřejmé už z Hillova pokusu, dodání umělých **akceptorů elektronů** je nezbytné pro všechna měření aktivity ETC v bezbuněčných systémech. Mezi běžně používané akceptory elektronů patří 2,6-dichlorofenolindofenol (DCPIP), ferrikyanid draselný (FeCy, hexakynoželezitan tridraselný) a Methylviologen (MeV, N,N'-dimetyl-4,4'-bipiridiniumchlorid). DCPIP přebírá elektrony pravděpodobně na více místech ETC. DCPIP a FeCy mohou být použity jako akceptory elektronů jak za PS I, tak za PS II (Izawa 1980). MeV (komerčně používán jako herbicid paraquat) působí jako velmi efektivní a specifický akceptor elektronů z PS I, který živým rostlinám efektivně zabraňuje ve využití světelné energie (Izawa 1980, Barr et Crane 2005). Látky schopné přebírat elektrony z PQ jsou rozpustné v tucích, jako oxidované fenylendiaminy (především diaminoduren, DAD, 2,3,5,6-tetrametyl-p-fenylendiamin) a chinony (především DBMIB) (Izawa 1980). Silikomolybdenát přebírá elektrony z PS II v reakci, která není citlivá na DCMU (Izawa 1980).

Pro izolovanou reakci probíhající skrz PS I je potřeba také dodání **donoru elektronů** na donorové straně PS I. Prvním objeveným donorem elektronů byl v roce 1960 DCPIPH₂ (malé množství DCPIP redukováné askorbátem), který předává elektrony PS I (Trebst 2007). Podobným způsobem lze v přítomnosti askorbátu použít také DAD nebo N,N,N',N'-fenylendiamin (TMPD). TMPD je zvláštní tím, že je schopný také přebírat elektrony z PS II. Samotný bez přidání redukčního či oxidačního činidla může tedy být použit k zajištění obchvatu okolo cytochromu *b₆f* a přenášet elektrony přímo z PS II na PS I (Trebst 2007). Po inhibici OEC je také možné použití donoru elektronů pro PS II, kterým nejčastěji bývá 1,5-difenylkarbazid (DPC) (Vernon et Shaw 1969).

První práce, které zkoušely použití polarografické metody měření primárních fotosyntetických procesů na jehličnanech, se zabývaly především vypracováním metody izolace fotochemicky aktivních chloroplastů. Oku et Tomita (1971) a Oku et al. (1971) měřili produkci kyslíku při navozeném přenosu elektronů H₂O → FeCy u *Pinus thunbergii* Parl. Senser et Beck (1978) a Afif et al. (1995) prováděli podobná měření u *Picea abies* (L.) Karst.

Několik prací se zabývalo izolací chloroplastů z etiolovaných jehlic a zkoumáním jejich fotochemické aktivity. Dalo by se to nazvat *ex vitro* fotoaktivací chloroplastů. Oku et al. (1974) u *Pinus sylvestris* L. nezjistili v těchto podmínkách aktivitu PS II (reakce H₂O → DCPIP), ale zjistili aktivitu PS I (DCPIP → MeV). Oku et al. (1975) dále měřili přenos elektronů H₂O → DCPIP u *P. abies*, a to polarograficky i spektrofotometricky (viz níže). Oku

et Tomita (1980) také polarograficky u *P. abies* měřili aktivitu přenosu $H_2O \rightarrow FeCy$.

Malhotra (1976) zkoumal vliv SO_2 na *Pinus contorta* var *latifolia* Engelm. ex S. Wats. mimo jiné také polarograficky, měřením rychlosti reakce $H_2O \rightarrow FeCy$.

Eastman et al. (1988) polarograficky (přenos elektronů z H_2O na 2,6-dichlo-*p*-benzochinon) hodnotili aktivitu PS II u semenáčků křížence *Picea glauca* (Moech) Voss x *Picea engelmannii* Parry ex Engelm. vystavených vlivu sucha.

Zhang et al. (2009) sledovali roční změny v řadě parametrů včetně aktivity PS I a PS II u *Juniperus chinensis* L. a *Juniperus przewalskii* Kom. Ve shodě s očekáváním byly naměřené aktivity v zimě nižší.

3.2.2 Systémy založené na spektrofotometrii

Všechny výše popsané chemikálie samozřejmě mohou být využity i v jiných experimentálních uspořádáních. Druhým často používaným způsobem detekce fotochemické aktivity chloroplastů nebo tylakoidů je spektrofotometrické stanovení redukčních stavů akceptorů elektronů. DCPIP, ale také FeCy, totiž mění své absorpční spektrum podle svého redukčního stavu. DCPIP má absorpční maximum okolo 590 nm a vlnové délky 590, 600 a 610 nm jsou často používány pro detekci této změny. FeCy má absorpční maximum okolo 410 nm. Technicky je měření podobné běžnému měření kinetiky chemické reakce pomocí spektrofotometru. Jediným problémem je, že vzorek je třeba v průběhu ozařovat aktivačním zářením, a to tak, aby nebyla ovlivněna stanovení absorbance vzorku. Někteří autoři tento problém řešili ozařováním vzorku červeným aktivačním zářením a čidlo odstínili odpovídajícím filtrem (Oku et Tomita 1976). Jiným přístupem je měření jen ve vybraných časových bodech, kdy je aktivační světlo vypnuto (Tůmová 2001, Nováková 2003, Pacholíkova 2009, <http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/investigating-light-dependent-reaction-photosynthesis>,

<http://www.marietta.edu/~spilatr/biol309/labexercises/Photosynthesis.pdf>,

<http://ableweb.org/volumes/vol-16/5-nscott.pdf>).

Také tato metoda byla v řadě studií využita ke stanovení účinnosti primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů. Např. Öquist et al. (1974) hledali optimální vlastnosti měřicího média pro měření redukce DCPIP u *P. sylvestris* a *P. abies*. Lewandowska et al. (1976, 1977) zkoumali rozdíly ve fotochemické aktivitě PS I a PS II v různých částech koruny *Picea sitchensis* (Bong.) Carr., ve snaze popsat a vysvětlit morfologické rozdíly v jehlicích.

Pomocí spektrofotometrického měření redukce DCPIP a převodu získaných parametrů na fotochemickou kapacitu na listovou plochu zjistili, že PS I na rozdíl od PS II vykazoval závislost fotochemické kapacity na umístění jehlic v koruně.

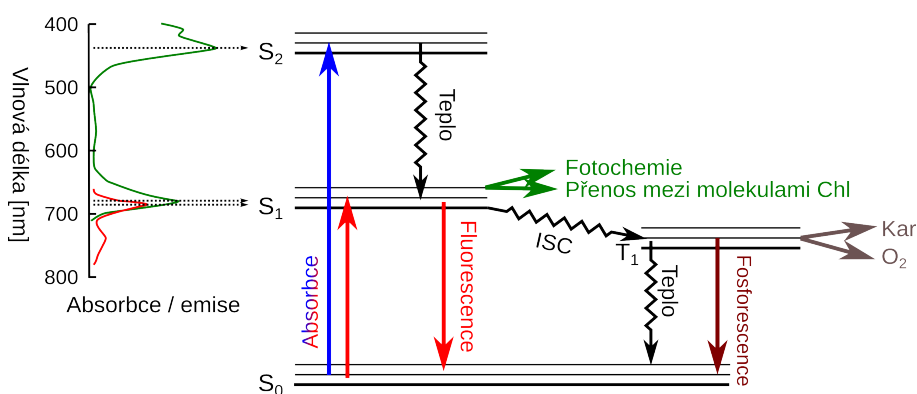
Martin et al. (1978) se zabývali vztahem odolnosti k mrazu a aktivity fotosyntetického ETC u *P. sylvestris*, za použití metod spektrofotometrického měření redukce DCPIP a měření fluorescence chloroplastové suspenze. Zjistili, že v procesu adaptace na mráz vzniká blok transportu mezi PS II a PS I, ale samostatné reakce transportu elektronů okolo PS I nebo PS II jsou stále aktivní.

Oku et Tomita (1976) a Lewandowska et Öquist (1980) studovali na semenáčcích *P. abies* nebo *P. sylvestris* pěstovaných ve tmě fotoaktivaci částí ETC. Ze spektrofotometrických měření redukce DCPIP kombinovaných s měřením fluorescence suspenze chloroplastů vyplynulo, že kapacita ETC je limitovaná v bodě štěpení vody.

Eastman et al. (1998) na semenáčcích křížence *P. glauca* x *P. engelmannii* testovali vliv stresu suchem na jednotlivé části ETC spektrofotometrickým měřením přenosu elektronů z $H_2O \rightarrow DCPIP$ a z $DPC \rightarrow DCPIP$.

3.2.3 Systémy založené na měření fluorescence Chl *a*

Energie excitovaného elektronu molekuly Chl nemusí být vždy využita pouze k pohonu fotosyntetického ETC. Obr. 2 zobrazuje Jablonského diagram energetických hladin molekuly Chl *a* a možných přechodů mezi nimi.

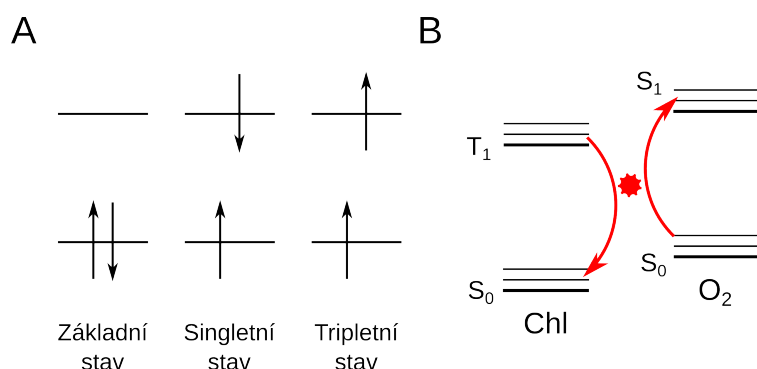


Obr. 2: Vlevo schématické znázornění absorpčního a fluorescenčního spektra chlorofylu (Chl) *a*. Jednotlivým maximům odpovídají přechody na různé energetické hladiny. Vpravo Jablonského diagram znázorňující energetické hladiny Chl *a* a možné energetické přechody mezi nimi. S_0, S_1, S_2 – singletní energetické stavy, T_1 – první tripletní excitovaný stav. Kar – karotenoidy. ISC – „intersystem crossing“, tj. přechod mezi singletním a tripletním stavem. Převzato a upraveno podle Misra et al (2012) a Porcar-Castell et al. (2014).

Z fyziologického hlediska lze osudy kvanta energie pohlceného Chl rozdělit do tří skupin:

pohon fotosyntetického ETC, vyzáření ve formě fluorescence a tzv. disipaci ve formě tepla, která shrnuje všechny ostatní děje. Tyto tři procesy jsou ve vzájemné kompetici, takže změna v efektivitě jednoho se ihned projeví na rychlosti druhých dvou (Maxwell et Johnson 2000). Kvantifikujeme je nejčastěji pomocí tzv. kvantových výtěžků („quantum yields“), neboli poměru počtu kvant energie prošlých příslušným procesem vůči celkovému počtu pohlcených fotonů. Je třeba si uvědomit, že kvantový výtěžek se nerovná energetickému výtěžku, protože část energie je těsně po absorpci ztracena ve formě tepla při přechodu z S_2 do S_1 stavu, nebo mezi vibračně rotačními hladinami.

Za fyziologických podmínek pochází fluorescence Chl téměř výlučně z energie prvního excitovaného singletního stavu Chl *a* a představuje maximálně 3–5 % absorbovaného světla (Roháček 2002). To je výrazně méně než u Chl v roztoku, kde fluorescence dosahuje až 30 % (Krause et Weis 1991). Chl *b* se *in vivo* na fluorescenci nepodílí, protože zachycenou energii efektivně předává molekulám Chl *a* (Roháček et Barták 1999). Karotenoidy (Kar) ve světlosběrné anténě působí jako ochranné pigmenty, které odčerpávají energii z nebezpečného tripletního stavu Chl *a*. Do tohoto tripletního stavu se molekula Chl dostane z excitovaného singletního stavu takzvaným „intersystem crossing“, změnou, při které dochází k otočení spinu excitovaného elektronu (viz Obr. 3A). Tripletní stav Chl *a* je nebezpečný tím, že může interagovat s kyslíkem za vzniku vysoce reaktivního singletního kyslíku (viz Obr. 3B). Další funkcí Kar je rozšiřování absorpčního spektra LHC.



Obr. 3: A – znázornění elektronových hladin a spinů e^- , rozdíl mezi základním, excitovaným singletním a tripletním stavem. Volně podle Braslavsky et al. (1996). B – částečný Jablonského diagram, vznik nebezpečného singletního kyslíku interakcí s tripletním chlorofylem (Chl). Volně podle Krasnovsky (2007) a Krieger-Liszkay (2005).

Fluorescenci Chl lze měřit poměrně snadno a především neinvazivně a díky tomu ji lze dobře využít k získání informací o stavu fotosyntetického aparátu. Co se týče technických

zařízení určených k měření fluorescence Chl, existuje velká rozmanitost jak v případě použitých zdrojů excitačního světla, tak v případě senzorů, tj. čidel. Zdrojem excitačního světla mohou být různé druhy žárovek, LED výbojky, laser a v určitých případech i přirozený zdroj, tedy slunce. Klasické žárovky mají tu nevýhodu, že produkují velké množství tepelného záření, což může vést k narušení výsledku měření. Výzkumník by měl vždy věnovat pozornost spektrálním vlastnostem/zvolené vlnové délce použitého zdroje excitačního záření, protože různé vlnové délky mohou vést k různým výsledkům. Klasickým příkladem je rozdílné absorpční spektrum PS I a PS II a tedy možnost upřednostnění jednoho z nich zvolenou vlnovou délkou. Pokud je vzorek měřen v temné komůrce, bývá zachycený signál ze vzorku často odváděn k čidlu optickým vláknem. Jako čidla jsou často používány fotodiody, díky jejich velké rychlosti, dále to mohou být fotonásobiče, interferometry a další. Zvláštní kategorií senzorů jsou běžné nebo termální kamery (fluorescence Chl je hlavně v červené a blízké infračervené oblasti), které umožňují získání informace o prostorovém uspořádání fluorescenčního signálu v ploše listu (Fernandez-Jaramillo et al. 2012).

Většina metod měření fluorescence Chl je založena na zkoumání takzvaného fluorescenčního indukčního jevu. V roce 1931 si Kautsky všiml (a v kratičkém článku publikoval), že fluorescence temnotně adaptovaných listů po vystavení fotosynteticky aktivnímu záření rychle stoupne do maxima, pak pomalu klesá, až se za několik minut ustálí (citováno podle Govindjee 1995). Tomuto jevu se dnes říká Kautskyho efekt, fluorescenční indukční jev či fluorescenční přechodový jev. Dělíme jej na rychlou fázi před dosažením maxima (do cca 1 s) a následnou pomalou fázi od maxima k dosažení ustáleného stavu (v řádu několika jednotek až desítek minut).

Pomalá fáze křivky indukce fluorescence Chl

Měření pomalé fáze je technicky jednodušší a historicky nejstarší. Nejpřímočařejší metoda používá jako aktivační záření modré světlo, které lze snadno, například filtrem, odlišit od slabého červeného fluorescenčního signálu. Určitým vylepšením je metoda pulsní amplitudové modulace (PAM – „pulse amplitude modulation“). Tato metoda umožňuje měření fluorescence v podmínkách přirozenějšího aktivačního záření (např. slunečního). Vzorek je při ní vystaven kromě kontinuálního aktivačního záření rychle se opakujícím slabým zábleskům měřicího záření. Za fluorescenční signál je pak považováno záření vyvolané zábleskem měřicího světla po odečtení základní hladiny mezi záblesky. Předpokládá se, že měřící světlo je natolik slabé a záblesky dostatečně vzdálené, že nedochází k ovlivnění

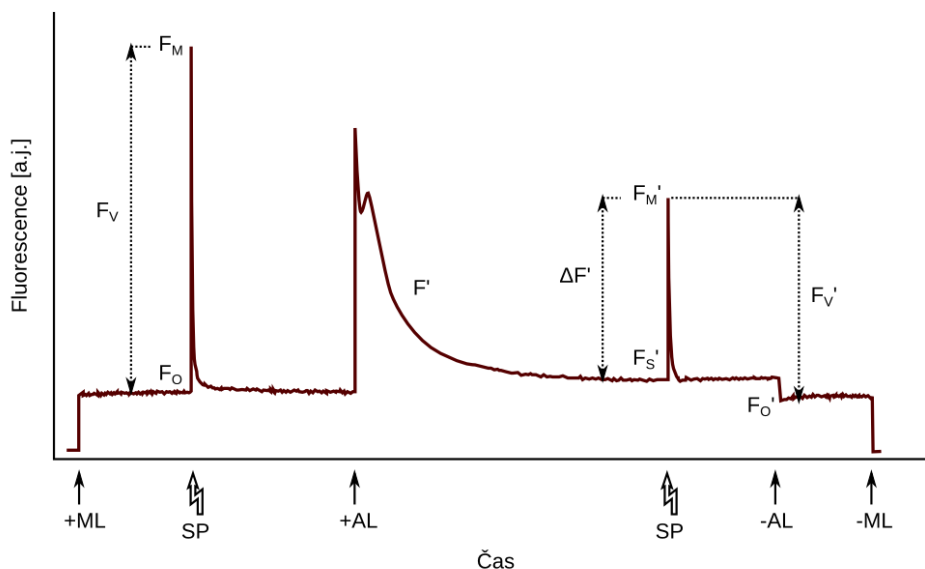
chování vzorku. Ve všech experimentálních uspořádáních ale vždy nějaká část vyzářené fluorescence unikne, a proto je vždy nutné brát v potaz pouze relativní vztahy naměřených hodnot (Maxwell et Johnson 2000).

Křivky intenzity fluorescence získané těmito metodami jsou v mnohých směrech podobné a parametry z nich získané se nazývají shodně (Obr 4). V temnotně adaptovaném stavu je ETC „prázdný“ a připravený zpracovat energii elektronů. PS II je tzv. otevřený, což znamená, že akceptor elektronů Q_A je v oxidovaném stavu. Intenzitu fluorescence v čase $t = 0$ označujeme jako F_0 , neboli minimální fluorescenci za temnotně adaptovaného stavu. V případě metody PAM za F_0 označujeme intenzitu fluorescence změřenou ještě před zapnutím aktivačního světla. Krátkým saturujícím pulsem záření můžeme získat hodnotu F_M , maximální fluorescenci za temnotně adaptovaného stavu. Saturující puls způsobí uzavření všech RC PS II neboli redukci primárního akceptoru feofytinu a Q_A . Fluorescence pak opět klesá. Rozdíl mezi F_M a F_0 bývá označován jako variabilní fluorescence F_V . Po zapnutí aktivačního světla dochází rychle k redukci primárního akceptoru feofytinu, prvního stabilního akceptoru Q_A a přenašečů elektronů dále v ETC. S vzrůstajícím poměrem uzavřených RC vůči otevřeným stoupá i intenzita fluorescence Chl *a* (Roháček 2002, Brestic et Zivcak 2013).

Během několika minut po zapnutí aktivačního světla dojde v chloroplastu k aktivaci řady mechanismů, které rostlinu chrání před nadměrným ozářením. Ty jsou souhrně nazývané mechanismy nefotochemického zhášení fluorescence v užším slova smyslu (NPQ – „nonphotochemical quenching“). Se vznikem gradientu protonů na tylakoidní membráně dochází ke změnám konformace LHC proteinů. Ty vedou k interakci molekul Chl *a* s molekulami zeaxantinu, který se podílí na přeměně excitační energie do tepla. Zeaxatin vzniká v takzvaném xantofylovém cyklu z neaktivního violaxantinu přes meziprodukt antheraxantin činností enzymu violaxantindeepoxidázy. Opačně působícím enzymem v tomto cyklu je zeaxantinepoxidáza. Aktivita violaxantindeepoxidázy stoupá se zvyšujícím se pH v lumen tylakoidu. Dalším mechanismem nefotochemického zhášení jsou tzv. stavové přechody. PS II a LHC II proteiny jsou za světla fosforylovány a dochází k odpojení části LHC II, která se přesouvá k PS I a podporuje tak aktivitu tohoto PS (Müller et al. 2001).

Po několika minutách poklesu v důsledku aktivace těchto mechanismů se fluorescence ustálí na hladině F_S' („steady state“) a vzorek dosáhne takzvaného světelně adaptovaného stavu. Obdobně jako u temnotně adaptovaného stavu lze poté krátkým saturujícím pulsem

získat hodnotu F_M' , která je ovšem nižší než F_M (působením NPQ). V případě metody PAM můžeme také po vypnutí aktivačního světla změřit F_0' , minimální fluorescence za světelně adaptovaného stavu (Roháček 2002, Brestic et Zivcak 2013).



Obr. 4: Znázornění typického časového průběhu měření fluorescence chlorofylu (Chl) metodou PAM („pulse amplitude modulated“) a získané základní parametry. a.j. – arbitrární jednotky. ML – měřící/modulované světlo. SP – saturační puls, AL – aktivační/aktinické světlo. F_0 , F_0' – minimální fluorescence v temnotně resp. světelně adaptovaném stavu. F_M , F_M' – maximální fluorescence v temnotně resp. světelně adaptovaném stavu. F_S' – ustálená („steady state“) fluorescence ve světelně adaptovaném stavu. $\Delta F'$ – fotochemické zhášení fluorescence otevřenými RC PS II Převzato a upraveno podle Brestic et Zivcak (2013).

Z výše uvedených základních parametrů fluorescence Chl je možné odvodit řadu dalších parametrů, které vyjadřují různé vlastnosti fotosyntetického aparátu a jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Základní a odvozené parametry získané z měření pomalé kinetiky fluorescence chlorofylu (Chl). PS – fotosystém, RC – reakční centrum. Převzato a upraveno z (Brestic et Zivcak 2013), doplněno o synonymní označení parametrů z Roháček (2002) a Misra et al. (2012).

Parametr	Název a fyziologický význam	Výpočet
F , F'	Intenzita fluorescence temnotně nebo světelně adaptovaného vzorku	
F_0	Minimální fluorescence temnotně adaptovaného vzorku (RC PS II otevřená)	
F_0'	Minimální fluorescence světelně adaptovaného vzorku (RC PS II otevřená). Hodnota může být měřena přímo nebo vypočítána	$F_0' = \frac{F_0}{F_V/F_M + F_0/F_M}$
F_M , F_M'	Maximální fluorescence temnotně nebo světelně adaptovaného vzorku (RC PS II zavřená)	
F_S' (= F_S , někdy F')	Ustálená hodnota fluorescence za dané intenzity světla.	

Tab. 1 – Pokračování.

Parametr	Název a fyziologický význam	Výpočet
F_V	Variabilní fluorescence temnotně adaptovaného vzorku	$F_V = F_M - F_0$
F_V'	Variabilní fluorescence světelně adaptovaného vzorku	$F_V' = F_M' - F_0'$
$F_Q' (= \Delta F', F_Q, \Delta F)$	Fotochemické zhášení fluorescence otevřenými RC PS II	$F_Q' = F_M' - F_S'$
F_V/F_M	Maximální kvantový výtěžek PS II (temnotně adaptovaný stav)	$F_V/F_M = 1 - \frac{F_0}{F_M}$
$\Phi_{PSII} (= F_Q'/F_M')$	Efektivní kvantový výtěžek PS II za dané intenzity světla	$F_Q'/F_M' = \frac{F_M' - F_S'}{F_M'}$
F_V'/F_M'	Maximální kvantový výtěžek PS II za dané intenzity světla	$F_V'/F_M' = 1 - \frac{F_0'}{F_M'}$
NPQ	Nefotochemické zhášení fluorescence Chl	$NPQ = \frac{F_M - F_M'}{F_M'}$
qP	Koeficient fotochemického zhášení založený na modelu PS II bez konektivity („puddle model“)	$qP = \frac{F_M' - F_S'}{F_M' - F_0'}$
qL	Koeficient fotochemického zhášení založený na modelu PS II s absolutní konektivitou („lake model“)	$qL = \frac{F_M' - F_S'}{F_M' - F_0'} \cdot \frac{F_0}{F_S'}$
qN	Koeficient nefotochemického zhášení variabilní fluorescence Chl	$qN = \frac{F_M - F_M'}{F_M - F_0'}$
Φ_{NO}	Kvantový výtěžek neregulované disipace energie v PS II	$\Phi_{NO} = \frac{1}{NPQ + 1 + qL(F_M/F_0 - 1)}$
Φ_{NPQ}	Kvantový výtěžek regulované disipace energie v PS II	$\Phi_{NPQ} = 1 - \Phi_{PSII} - \Phi_{NO}$

Adaptace vzorku na tmou a měření celé indukční křivky fluorescence jsou činnosti poměrně časově náročné. Proto se často používají různé zjednodušené protokoly, které umožňují rychlé změření velkého množství vzorků, ale nepodávají tak komplexní informace o stavu fotosyntetického aparátu rostliny. Jednou z nejběžnějších takto používaných metod je vystavení temnotně adaptovaného vzorku jedinému saturačnímu pulsu, stanovení F_0 , F_M a vypočítání F_V/F_M . Časová náročnost tohoto měření je srovnatelná s náročností měření rychlé části fluorescenční indukční křivky (OJIP, viz dále), ale podává podstatně méně informací.

Další metoda vynechává adaptaci vzorku na tmou a umožňuje stanovit parametr ETR („electron transport rate“) při známé intenzitě ozáření (I):

$$ETR_1 = I \cdot 0,84 \cdot 0,5 \cdot \Phi_{PSII} \quad (1)$$

kde 0,84 je empiricky stanovený koeficient, který zohledňuje fakt, že ne všechno dopadající záření (I) je pohlceno Chl, ale část je odražena nebo listem prostoupí. Tento koeficient je vhodný pro zdravé listy mnoha druhů rostlin, ale pro silně stresované listy je třeba jej upravit.

Koeficient 0,5 reprezentuje odhad poměru fotonů pohlcených PS II vůči počtu fotonů pohlcených oběma PS (Maxwell et Johnson 2000, Brestic et Zivcak 2013).

Jiná metoda vynechává použití saturačních pulsů a stanovuje intenzitu fluorescence v předem daných časových okamžicích. Hlavním jejím výstupem je tzv. relativní poměr poklesu fluorescence Chl („fluorescence decrease ratio“):

$$R_{FD} = \frac{F_P - F_S'}{F_S'} \quad (2)$$

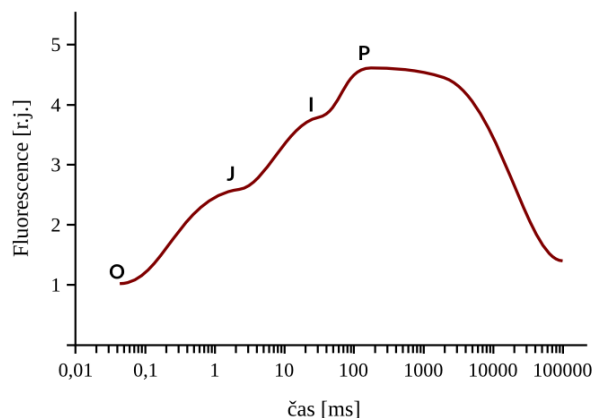
kde F_P označuje maximální fluorescenci Chl (Brestic et Zivcak 2013).

„Slow induction curve and recovery“ je metoda, která naopak rozšiřuje základní měření fluorescenční indukční křivky. F_M a F_O v této variantě nejsou měřeny pouze dvakrát (na začátku a na konci), ale v pravidelných intervalech v průběhu celého přechodu z temnotně adaptovaného stavu na stav světelně adaptovaný a po vypnutí aktivačního světla i během opětovné adaptace na tmu. Saturační pulsy jsou následovány krátkými okamžiky vypnutého aktivačního světla a zapnutím zdroje infračerveného záření (Brestic et Zivcak 2013).

Studii, které použily některou z variant měření pomalé kinetiky fluorescence Chl u jehličnanů je velké množství (mnoho set). Jejich úplný výčet přesahuje možnosti této práce, proto je v této části jmenovitě neuvádím. V kapitole 3.3 jsou ale shrnuty studie používající u jehličnanů tuto metodu k výzkumu vnitrodruhové variability což je tématicky bližší jednomu z cílů této práce.

Rychlá fáze křivky indukce fluorescence Chl (OJIP analýza)

Rychlá fáze fluorescenčního indukčního jevu je označována OJIP. K jejímu měření se nejčastěji používá souvislý saturační puls modrého světla trvajícím většinou 1 s. Pokud zobrazíme časový průběh nárůstu fluorescence v semilogaritmickém zobrazení (Obr. 5) odhalí se „stupňovitý“ charakter tohoto nárůstu, který zůstává při běžném (nelogaritmickém) zobrazení skrytý. Název OJIP vychází z tradičního označení bodů – „stupňů“ – fluorescenční indukční křivky. Začátek křivky je označován jako O („origin“), následují inflexní body J a I (kdysi označované I_1 a I_2) a bod dosažení maxima se označuje P („peak“). Kromě hlavních inflexních bodů se v některých případech na OJIP křivce objevují další inflexní body, např. mezi O a J se zejména při stresu horkem objevuje bod K, případně před ním ještě bod L (Stirbet et Govindjee 2011, Stirbet et al. 2014).



Obr. 5: Typický tvar fluorescenční indukční křivky v semilogaritmickeém zobrazení. O, J, I, P – významné body rychlé části fluorescenčního indukčního jevu. r.j – relativní jednotky. Převezato a upraveno z Stirbet et Govindjee (2011)

Současné vysvětlení OJIP křivky je založeno především na teorii Duysens et Sweers (1963), která říká, že rychlost konverze světelné energie na chemickou je limitována především na straně akceptorů elektronů Q_A a Q_B („quencher“, zhášec fluorescence Chl). Alternativní hypotézou je vysvětlení podle Stirbet et al. (2014), rozebrané podrobněji dále.

Úsek O–J se nazývá fotochemická fáze, protože rychlost nárůstu fluorescence Chl je velmi ovlivněna použitou intenzitou ozáření a není příliš citlivá na odlišnosti v teplotě vzorku. Intenzivnější ozáření vede k rychlejšímu nárůstu fluorescence a zkrácení doby nutné k dosažení bodu J. Nárůst fluorescence v tomto úseku je vysvětlován redukcí akceptorů Q_A a Q_B . V bodě J dochází k dočasnému vyrovnání rychlosti redukce Q_A a Q_B a odběru elektronů PQ. Tento jednoduchý model ale nestačí k úplnému vysvětlení tvaru O–J fáze. Kinetiku fluorescence ovlivňují mnohé další faktory (Stirbet et al. 2014). Patří mezi ně konektivita PS II, tedy pravděpodobnost přenosu excitační energie z jednoho komplexu PS II na druhý díky blízkému kontaktu anténových Chl. Při porovnání křivky OJIP dvou vzorků, ve kterých má PS II odlišnou konektivitu, bylo zjištěno, že rozdíl mezi těmito dvěma křivkami je největší okolo 100–150 μ s. Bod tohoto maxima byl nazván L a parametr F_L je zařazen do některých analýz OJIP křivky. S konektivitou souvisí heterogenita PS II, kdy část komplexů PS II tvoří dimery a část samostatné jednotky. Vznik bodu K u vzorků stresovaných horkem je většinou připisován ztrátě funkce OEC a následné akumulaci P_{680}^+ , který může působit jako zhášec fluorescence. Při temnotní adaptaci také nemusí dojít k úplné oxidaci PQ, naopak u některých vyšších rostlin a řas dochází ve tmě spíše k jeho redukcí. To má za následek zvýšení F_0 a F_J , což vede ke špatným odhadům podílu funkčních RC PS II (viz dále). Řešením tohoto problému je vystavení vzorku krátkému pulsu „far-red“ záření (energie pro PS I bez aktivace

PS II) před samotným měřením OJIP (Stirbet et Govindjee 2011, Stirbet et al. 2014).

Oblast J–I–P se nazývá termální fáze, protože je velmi ovlivněna teplotou vzorku a je méně citlivá k rozdílům v použité intenzitě ozáření. V jejím průběhu dochází k postupné redukci PQ. V bodě I je dočasně vyrovnána rychlost redukce PQ a jeho oxidace aktivitou PS I skrze cytochrom *b₆f*. Po bodu I může dokonce následovat krátké snížení fluorescence Chl způsobené zvýšenou aktivitou PS I. Minimum tohoto je označováno jako tzv. bod D („dip“). V bodě P dochází ke kompletní „dopravní zácpě“ v ETC. Enzym ferredoxinreduktáza je v temnotně adaptovaném stavu neaktivní a během měření OJIP u vyšších rostlin nestihne dojít k jeho aktivaci. Důsledkem toho se přenašeče elektronů v ETC předcházející ferredoxinreduktáze hromadí v redukovaném stavu až do zahlcení celého ETC. Hodnota fluorescence odečtená v bodě P je označována také jako F_M , protože se předpokládá, že všechna RC PS II jsou uzavřena (Stirbet et Govindjee 2011, Stirbet et al. 2014).

Na základě statistického modelování energetických toků vyvinuli Strasser et al. (2000, 2004) takzvaný JIP-test, který byl dále rozšířen autory Stirbet et Govindjee (2011). Jde o výpočetní metodu, která umožňuje z několika základních parametrů odečtených z křivky OJIP stanovit řadu odvozených parametrů, které podávají různé informace o efektivitě a aktivitě různých částí ETC a jsou shrnuty v Tab. 2. Aby bylo sestavení takového matematického modelu možné, museli vědci zavést řadu předpokladů a zjednodušení. Hodnoty fluorescence většiny významných bodů křivky OJIP jsou odečítány v předem stanovených časech (viz Tab. 2). Pro většinu výpočtů je předpokládána nulová konektivita PS II a komplexy PS II jsou považovány za homogenní monomery, přesto některé vypočítané parametry umožňují tuto konektivitu odhadnout. Úplný seznam všech 17 předpokladů je možné najít v Stirbet et Govindjee (2011).

Tab. 2: Parametry JIP testu. PS – fotosystém. RC – reakční centrum. Převzato a upraveno podle Stirbet et Govindjee (2011). Vynechány jsou parametry vztahující toky energie na plochu listu.

Parametr	Název a fyziologický význam	Výpočet
F_0	První spolehlivá hodnota fluorescence po zapnutí světla.	$F_{20\mu s, 40\mu s \text{ nebo } 50\mu s}$
F_K	Hodnota fluorescence v čase 300 μs (případný bod K)	$F_{300\mu s}$
F_J	Hodnota fluorescence v čase 2 ms (bod J)	F_{2ms}
F_I	Hodnota fluorescence v čase 30 ms (bod I)	F_{30ms}
F_M (F_P)	Maximální naměřená hodnota fluorescence	$\max(F_t)$
$t_{F_{max}}$	Čas potřebný k dosažení maximální fluorescence F_M	

Tab. 2 – Pokračování.

Parametr	Název a fyziologický význam	Výpočet
Area	Plocha nad OJIP křivkou shora ohraničená přímkou s rovnicí $f(t)=F_M$	$F_M \cdot t_{F_{max}} - \int_0^{t_{F_{max}}} F_t$
Technické parametry		
V_v	Variabilní fluorescence (funkce času t)	$F_t - F_0$
F_v	Maximální variabilní fluorescence	$F_M - F_0$
V_t	Relativní variabilní fluorescence (funkce času t)	$(F_t - F_0)/F_v$
M_0	Odhad směrnice relativní variabilní fluorescence V_t v okolí bodu O.	$(\Delta V/\Delta t)_O$ $= 4(F_K - F_0)/F_v$ [ms^{-1}]
S_m	Normalizovaná plocha nad OJIP křivkou (předpokládá se, že odpovídá počtu redukcí a oxidací molekuly Q_A během měření OJIP, a tedy souvisí s celkovým počtem přenašečů elektronů v ETC)	Area/ F_v
Definice energetických toků		
J^{ABS}	Rychlost absorpce fotonů všemi PS II	
J^{TR}	Rychlost přeměny excitační energie na chemickou (redukce Q_A) („trapping“)	
J_O^{TR}	Maximální J^{TR} (v bodě O)	
J^{DI}	Rychlost disipace excitační energie	
J_O^{ET2}	Rychlost toku energie z Q_A na Q_B	
J_O^{RE1}	Rychlost toku energie až k PS I	
Kvantové výtěžky, efektivity a pravděpodobnosti		
ϕ_{P_0}	Maximální kvantový výtěžek PS II	$J_O^{TR}/J^{ABS} = 1 - F_0/F_M$
ϕ_{P_t}	Kvantový výtěžek PS II (funkce času t)	$J^{TR}/J^{ABS} = 1 - F_t/F_M$ $= \phi_{P_0}(1 - V_t)$
ϕ_{ET2_0} (ϕ_{E_0})	Kvantový výtěžek transportu elektronů z Q_A na Q_B	$J_O^{ET2}/J^{ABS} = 1 - F_J/F_M$ $= \phi_{P_0}(1 - V_J)$
ϕ_{RE1_0} (ϕ_{R_0})	Kvantový výtěžek transportu elektronů až k PS I	$J_O^{RE1}/J^{ABS} = 1 - F_I/F_M$ $= \phi_{P_0}(1 - V_I)$
ϕ_{D_0}	Kvantový výtěžek disipace zachycené energie	F_0/F_M
ψ_{ET2_0} (ψ_{E_0})	Efektivita/pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_A na Q_B (frakce elektronů přenesených mezi Q_A a Q_B vztažená na exciton zachycený RC PS II)	$J_O^{ET2}/J_O^{TR} = 1 - V_J$
ψ_{RE1_0} (ψ_{R_0})	Efektivita/pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen až k PS I (frakce elektronů přenesených za Q_A vztažená na exciton zachycený RC PS II)	$J_O^{RE1}/J_O^{TR} = 1 - V_I$
δ_{RE1_0} (δ_{R_0})	Efektivita/pravděpodobnost, s jakou bude elektron přenesen z Q_B až k PS I	J_O^{RE1}/J_O^{ET2} $= (1 - V_I)/(1 - V_J)$

Tab. 2 – Pokračování.

Parametr	Název a fyziologický význam	Výpočet
Specifické energetické toky (na jedno RC PS II)		
J^{ABS}/RC (ABS/RC)	Průměrný tok absorpce na RC, neboli zdánlivá velikost antény PS II	$(M_o/V_j) \cdot (1/\phi_{p_o})$
γ_{RC2} (γ_{RC})	Pravděpodobnost, že Chl v PS II funguje jako RC	Chl_{RC}/Chl_{TOTAL} $= 1/(ABS/RC + 1)$
RC/J^{ABS}	Počet RC redukujících Q_A vztahovaný na Chl, který je součástí antény	$\phi_{p_o} (V_j/M_o)$
J_o^{TR}/RC (TR0/RC)	Maximální tok energie zachycený PS II	M_o/V_j
J_o^{ET2}/RC (ET0/RC)	Tok elektronů z Q_A na Q_B	$(M_o/V_j) \cdot (1 - V_j)$
J_o^{RE1}/RC (RE0/RC)	Tok elektronů z Q_A až k PS I	$(M_o/V_j) \cdot (1 - V_I)$
DI_o/RC	Tok disipované energie vyjádřený na jedno RC PS II	$(ABS/RC) - (TR0/RC)$
Rychlostní konstanty deexcitace		
k_N	Rychlostní konstanta nefotochemické deexcitace	$k_F \cdot J^{ABS}/F_M$
k_P	Rychlostní konstanta fotochemické excitace	$k_F \cdot J^{ABS} \cdot F_V/(F_o \cdot F_M)$ $= k_N \cdot F_V/F_o$
Performační indexy (kombinace parametrů)		
PI_{ABS}	Performační index konzervace energie od fotonů ke Q_B	$[\gamma_{RC2}/(1 - \gamma_{RC2})] \cdot [\phi_{p_o}/(1 - \phi_{p_o})] \cdot [\psi_{ET2o}/(1 - \psi_{ET2o})]$
PI_{TOTAL}	Performační index konzervace energie od fotonů až k PS I	$PI_{ABS} \cdot [\delta_{RE1o}/(1 - \delta_{RE1o})]$
Hnací síla („driving force“) pro fotochemickou aktivitu		
DF_{TOTAL}		$\log(PI_{ABS})$

Analýza křivky OJIP byla u jehličnanů použita dosud pouze v několika studiích. Meinander et al. (1996) použili metodu OJIP a měření reflektance k odhadu míry stresu rostlin *P. sylvestris*, které byly vystaveny různým zvýšeným koncentracím CO_2 a O_3 po dobu tří měsíců. Mnohé fyziologické parametry se nelišily, ale rostliny vystavené zvýšenému O_3 měly větší efektivní velikost antény PS II a rostliny vystavené CO_2 měly velikost antény naopak menší.

Manes et al. (2001) použili analýzu OJIP ke zkoumání vztahu stresu suchem a vlivu zvýšeného množství O_3 na semenáčky *Pinus halepensis* Mill. Své výsledky vysvětlují určitým antagonistickým vztahem mezi reakcemi na tyto dva stresy.

Corrêa et al. (2008) zkoumali toky látek mezi mykorhizní houbou *Pisolithus tinctorius* a

Pinus pinaster L. za nízké/vysoké koncentrace N v substrátu. JIP-test použili k sledování fyziologického stavu rostliny v průběhu experimentu, ale nenašli prokazatelný vliv mykorrhizace v žádném z parametrů JIP-testu.

Katanić et al. (2012) porovnávali parametry JIP-testu vegetativních pupenů a jehlic z daného roku u *P. abies* a zjistili, že v pupenech je rychlost ETC pravděpodobně limitována rychlostí přenosu elektronů z Q_A na Q_B .

Pollastrini et al. (2014) studovali kompetitivní interakce mezi stromy buku, břízy a *P. abies* v prostředí experimentálních smíšených lesů různých stáří a v prostředí monokultur. V mladém smíšeném lese byl parametr PI_{TOTAL} vztažený na plochu stanoviště vyšší než u monokultur a hodnoty parametrů jednotlivých stromů byly ovlivněny především faktem, že bříza stínila ostatní stromy.

Zpožděná fluorescence Chl

Většina prací využívajících fluorescenci Chl *a* se zabývá okamžitou, bezprostřední („prompt“) fluorescencí. Zpožděná („delayed“) fluorescence Chl je překvapivý fenomén způsobený faktem, že všechny fotosyntetické reakce jsou reverzibilní. Elektrony se mohou v ETC s určitou pravděpodobností vracet a může dojít k rekombinaci náboje za vzniku excitovaného Chl, který následně vyzáří foton. Z čím vzdálenějšího místa v ETC se elektron vrací, tím delší dobu mu to trvá a tím nižší je pravděpodobnost, že cestu dokončí. Intenzita zpožděné fluorescence tedy od okamžiku vypnutí aktivačního světla postupně klesá a tvar křivky zpožděné fluorescence nese informace o stavu jednotlivých částí fotosyntetického aparátu (Goltsev et al. 2009).

Zpožděná fluorescence podobně jako „okamžitá“ fluorescence pochází především z PS II a má stejné spektrum. Lze ji ale pozorovat po vypnutí aktivačního záření dlouho poté, co „okamžitá“ fluorescence zcela vyprchala (po 5 ns až 1 hodině). Principiálně odlišné výsledky dávají měření zpožděné fluorescence vzorku, který byl původně ozářen krátkým saturačním pulsem, a vzorku, který byl vystaven dlouhodobému aktivačnímu záření, které bylo náhle vypnuto (Goltsev et al. 2009).

Speciálním případem protokolu je měření fluorescenční indukční křivky okamžité fluorescence společně se zpožděnou fluorescencí. V krátkých intervalech je aktivační světlo zapínáno a vypínáno. Za světla je měřena rychlá fluorescence, za tmy po 5 ns (které stačí k vyprchání „okamžité“ fluorescence) je změřena fluorescence zpožděná. Jako příklad používaných délek intervalů světla a tmy lze uvést protokol, ve kterém se střídají v poměru

3:1 (světlo:tma) a cykly se postupně prodlužují z 400 μ s až na 10 s (přístroj M-PEA, Hansatech Instruments, King's Lynn, UK). Aby byl z křivek zpožděné fluorescence vyloučen vliv předchozích cyklů, je vždy od hodnot následujícího cyklu odečtena poslední hodnota v cyklu předchozím (Goltsev et al. 2009).

Zpožděná fluorescence je výrazně slabší než „okamžitá“, vždy méně než 1 %, což vytváří určité nároky na citlivost detekčních zařízení. Zakázkově vyrobené přístroje jednotlivých laboratoří navíc podávají systematicky odlišné výsledky a není vhodné je při srovnávání slučovat (Goltsev et al. 2009).

Existuje několik prací na jehličnanech, kde bylo měření zpožděné fluorescence využito pro různé účely. Itoh et al. (1981) použili měření fluorescenčního indukčního jevu v kombinaci s měřením zpožděné fluorescence ke studiu etiolovaných jehlic a chloroplastových supenzí *P. abies*. Gyllenstrand et al. (2014) měřili zpožděnou fluorescenci na semenáčcích stejného druhu a zjistili, že na rozdíl od mnohých vyšších rostlin (Goud et al. 2009) zpožděná fluorescence tohoto druhu smrku nevykazuje za konstantních podmínek žádný cirkadiální rytmus.

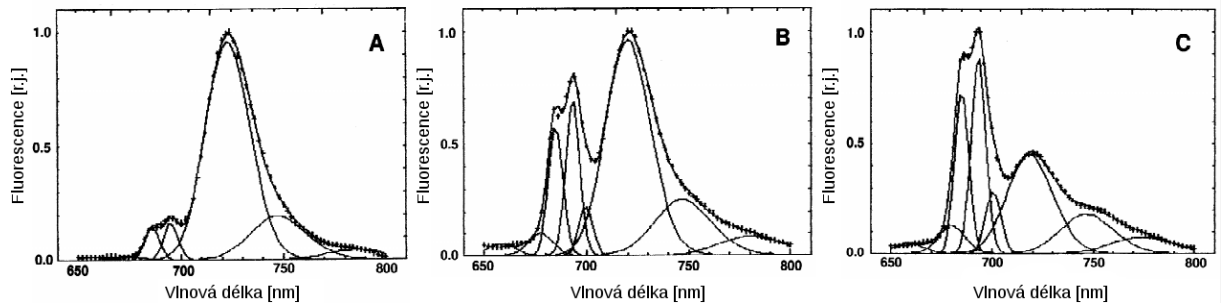
Grigor'ev et Pakhar'kova (2001) studovali vliv průmyslového znečištění prostředí na *P. sylvestris* pomocí metod okamžité i zpožděné fluorescence a zjistili, že stromy v znečištěných oblastech mají kratší a méně výrazné období zimní dormance, což je může činit náchylnějšími k chladovému stresu.

Komplexní analýzu fluorescence Chl v průběhu roku u *Taxus cuspidata* Siebold & Zucc. provedli Yokono et al. (2008) a to měřením spektra okamžité fluorescence při 77 K a jeho poklesu v čase (obdobu měření zpožděné fluorescence použita pro celé spektrum).

Spektrum fluorescence Chl při 77 K

Zvláštní kategorií měření fluorescence Chl jsou spektra změřená na vzorcích zchlazených na 77 K, tedy na teplotu tekutého dusíku. Je zřejmé, že při této teplotě neprobíhají žádné procesy spojené s pohybem molekul přenašečů elektronů, ani fotosyntetické regulační mechanismy, a lze očekávat i jiné zastoupení rotačně-vibračních hladin molekul Chl. Spektrum fluorescence se oproti fyziologickým podmínkám výrazně mění (viz Obr 6). Původní dvě maxima v 685 nm (odpovídající fluorescenci PS II) a v 720-740 nm (odpovídající fluorescenci PS I) se v 77 K rozštěpí na zřetelná tři maxima v 685 nm, 695 nm (PS II) a 735 nm (PS I) (Misra et al. 2012). Tato metoda dnes pro svou technickou náročnost a závislost tvaru spektra

na koncentraci Chl není příliš oblíbená, ale v minulosti měla zásadní vliv na objevení a výzkum stavových přechodů (Misra et al. 2012, Porcar-Castell et al. 2014). Vzorek před zmražením vystavený záření vlnové délky upřednostňující PS I nebo PS II si po zmražení zachová rozložení LHC II vyrovnávající toto upřednostnění, což se projeví na výškách jednotlivých maxim fluorescenčního spektra (Murakami 1997, Misra et al. 2012).



Obr. 6: Fluorescenční spektra chlorofylu (Chl) u sinice *Synechocystis* sp. PCC 6714 při teplotě 77 K. Buňky rostly pod (A) oranžovým, (B) krátkovlnným červeným a (C) dlouhovlnným červeným světlem. Převzato a upraveno podle Murakami (1997).

Metoda měření fluorescence při 77 K byla použita na jehličnanech jen v několika málo studiích a z jejich datace je zřejmé, že dnes tato metoda u výzkumníků nepatří k příliš oblíbeným. Brouers et Wolwertz (1980) použili měření fluorescenčního spektra při 77 K ke zkoumání stability etioplastů po vystavení různým chemickým látkám u *Pinus jeffreyi* Grev. et Balf.

Strand et Öquist (1985) zkoumali poškození fotosyntetického aparátu *P. sylvestris* způsobené silným ozářením v kombinaci s mražením vzorku jehlic nebo izolovaných chloroplastů a zjistili změny odpovídající poškození PS II. Strand et Lundmark (1987) na tomtéž druhu pokračovali ve studiu vztahu fotoinhibice a vystavení semenáčků mrazu v přirozených venkovních podmínkách pomocí měření indukční křivky při 77 K.

Öquist et Malmberg (1989) studovali vztah adaptace semenáčků *P. sylvestris* a *P. contorta* na mráz a jejich odolnosti k fotoinhibici pomocí různých metod měření včetně měření indukčního jevu při 77 K, ale nezjistili mezi mrazovou adaptací a fotoinhibiční odolností souvislost. Zjistili však závislost na teplotě použité při ozařování.

Špunda et al. (1998) našli rozdíly v 77 K fluorescenčních spektrech u jehlic *P. abies* z různých částí koruny, které nebyly závislé na tom, zda byly jehlice před zmražením světelně nebo temnotně adaptované.

Raskin et Marder (1997) měřili u semenáčků *Pinus brutia* L. a ječmene pěstovaných ve tmě různou dobu po vyklíčení fotosyntézu pomocí několika metod včetně měření spektra

fluorescence při 77 K. Z výsledků vyplývalo že během vývoje dochází k akumulaci neaktivního PS II.

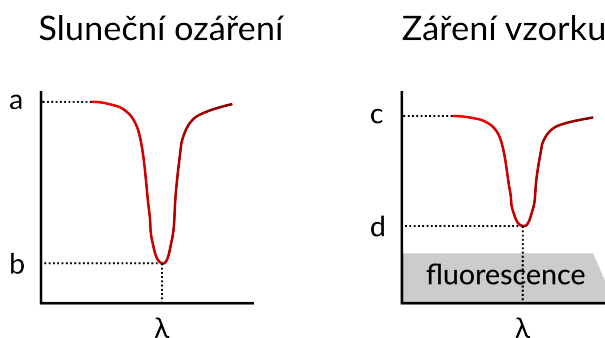
Ivanov et al. (2006) zkoumali aktivitu fotosyntetických komplexů různými metodami včetně studia spektra fluorescence Chl u jehlic a zelené primární kůry *P. sylvestris* během léta a zimy a zjistili, že schopnost fotosyntetizovat je v primární kůře v zimě lépe zachována a proto může mít významnou roli pro přežití stromků v zimním období.

Fluorescence indukovaná sluncem

Doposud jsem popisovala především metody využívající umělý zdroj světla v laboratorních (nebo přírodních, ale vyžadujících přímý kontakt měřicího přístroje s rostlinou) podmínkách. Fluorescence indukovaná sluncem (**SIF** – „solar induced fluorescence”) je, jak už název napovídá, metoda měřící fluorescenci Chl vyvolanou slunečním zářením. Její hlavní předností je fakt, že nepotřebuje žádné předchozí zatemnění vzorku a díky tomu výzkumníkovi umožňuje měření na velkou vzdálenost: z věže, letadla nebo i satelitu (Porcar-Castell et al. 2014). Princip této metody i její uskalí byly podrobně a přehledně popsány v mnoha souborných člancích, například Smorenburg et al. (2002), Meroni et al. (2009), Porcar-Castell et al. (2014).

Základní otázkou, která byla při měření SIF řešena, bylo, jak odlišit poměrně slabé záření fluorescence od silného odraženého záření (reflektance), které jej na většině vlnových délek překrývá. Elegantní odpovědí na tento problém je metoda **FLD** („Fraunhofer line depth/discriminator“). Ve slunečním spektru se vyskytují takzvané Fraunhoferovy čáry – tmavé úzké oblasti způsobené pohlcením specifických vlnových délek slunečního záření prvky slunečního obalu a zemské atmosféry. Čáry vzniklé při průletu záření zemskou atmosférou se někdy (především spíše v anglických textech) nazývají tellurické. Při odrazu světla nedochází ke změně jeho vlnové délky a proto se tyto čáry vyskytují i ve spektru odraženého světla. Při fluorescenci naopak vždy dochází k posunu vlnové délky vyzářeného světla oproti absorbovanému a fluorescenční záření pak doslova vyplňuje Fraunhoferovy čáry (Porcar-Castell et al. 2014).

Vlastní měření SIF spočívá v získání pouhých 4 parametrů: sluneční ozáření a záření vzorku uprostřed (uvnitř) spektrální čáry a v jejím těsném okolí (vně) (parametry a, b, c a d viz Obr. 7).



Obr. 7: Schématické znázornění spektra v okolí Fraunhoferovy čáry. a, b, c, d – změřené hodnoty. λ – vlnová délka středu Fraunhoferovy čáry. Převzato a upraveno podle Smorenburg et al. (2002)

Výpočet fluorescence stojí na dvou předpokladech: Reflektance i intenzita fluorescence jsou v úzkém rozsahu vlnových délek v okolí Fraunhoferovy čáry konstantní. Nejdříve je vypočítána reflektance na základě toho, kolikrát se po odrazu snížila „hloubka“ Fraunhoferovy čáry.

$$R_{\lambda} = \frac{c-d}{a-b} \quad (3)$$

Odečtením odraženého světla od záření vzorku uvnitř Fraunhoferovy čáry lze snadno získat intenzitu fluorescence.

$$F_{\lambda} = d - R_{\lambda} b \quad (4)$$

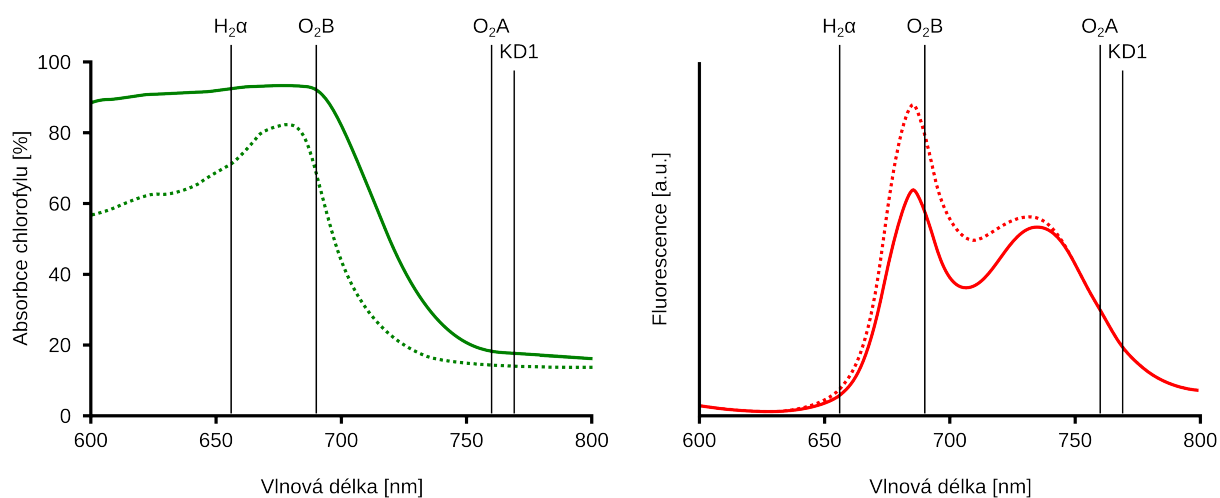
Úpravou vzorců (3) a (4) lze získat obvykle používaný vzorec pro výpočet fluorescence (Smorenburg et al. 2002, Porcar-Castell et al. 2014).

$$F_{\lambda} = \frac{ad - bc}{a - b} \quad (5)$$

Oba základní předpoklady výše uvedeného výpočtu (neměnnost reflektance i fluorescence) jsou ovšem v praxi často porušeny. Proto vznikly složitější způsoby výpočtu, založené na lineární nebo polynomiální interpolaci spektra v blízkém okolí (podrobněji Meroni et al. 2009).

V současnosti prováděné analýzy SIF se zaměřují spíše na porovnání měření v čase (denní cyklus a roční cyklus) a mezi různými vlnovými délkami. Fraunhoferových čar, které se nacházejí v oblasti fluorescence Chl, je několik. Nejčastěji používané jsou čára vodíková ($H_2\alpha$, 656 nm), draslíková (KD1, 769 nm), a tellurické čáry kyslíková (O_2B , 690 nm) a kyslíková (O_2A , 760 nm) (Porcar-Castell et al. 2014). Signál změřený v čáře O_2B je velmi blízko absorpčnímu maximu Chl (viz Obr. 8) a je tedy velmi citlivý na reabsorpci, naopak fluorescenční signál v čáře O_2A tuto vlastnost nemá. Poměr fluorescence v červené („red“) a

„far red“ oblasti F_R/F_{FR} se proto často používá k odhadu obsahu Chl. Interpretace tohoto poměru je ale mnohem složitější. Na škále dní jsou jeho změny především určovány změnami NPQ a tento poměr je přímo úměrný účinnosti využití světelné energie. Na škále ročních období je naopak mezi F_R/F_{FR} a účinností využití světelné energie úměra nepřímá. Do interpretace SIF dále vstupuje řada dalších faktorů, jako vliv teploty na tvar fluorescenčního spektra, struktura listu anebo koruny stromu a relativní příspěvek fluorescence PS I vůči PS II (Porcar-Castell et al. 2014). F_R/F_{FR} také závisí na spektru aktivačního světla. Různé vlnové délky pronikají různě hluboko do listu/koruny, kde excitují Chl. Fluorescenční záření pak musí absolvovat různě dlouhou cestu k povrchu a má tedy různou pravděpodobnost reabsorbce (Buschman 2007).



Obr. 8: Schématické znázornění absorpčního spektra Chl (vlevo) a naměřeného spektra fluorescence (vpravo) listu s vysokým (plná čára) a nízkým (tečkovaně) obsahem Chl. Vyznačeny jsou vlnové délky nejčastěji používaných Fraunhoferových čar. Převzato a upraveno podle Gitelson et al. (1998).

Velkou nevýhodou SIF oproti měření fluorescenční indukční křivky je to, že neumožňuje zjistit kvantový výtěžek fotochemických procesů, protože neumožňuje změřit F_M . Způsobem, jak obejít tuto nepříjemnost, by mohlo být propojení SIF se stanovením hrubé primární produkce, i když kvůli komplexitě faktorů ovlivňujících SIF toto zatím nebylo vyřešeno. Podobnost map získaných satelitním měřením SIF a globálních modelů hrubé primární produkce dává naději na budoucí propojení (Porcar-Castell et al. 2014).

Použití SIF pro studium fotosyntetické aktivity velkých ploch porostů, které je nejslibnějším využitím této metody, není z principu taxonomicky specifické. Studie zaměřené na jehličnany se zabývají porovnáním velkoplošných měření boreálních lesů s měřeními na úrovni jednotlivých stromů, a tedy kvantifikaci možnosti extrapolace jednoho měření

na druhé. Louis et al. (2005) porovnávali měření SIF na úrovni korun s měřeními fluorescence indukované laserem a měření F_v/F_M jehlic u *P. sylvestris* a našli mezi nimi korelace.

3.2.4 Systémy založené na termoluminiscenci

Termoluminiscence je slabé záření vyzařované předem ozářeným vzorkem v průběhu jeho ohřívání. Využití termoluminiscence není omezeno pouze na vzorky schopné fotosyntézy, ale používá se v široké škále oborů jako mineralogie, archeologie a studium různorodých biologických a biochemických objektů. Fyzikální princip vzniku tohoto záření je zpětná rekombinace kladných a záporných nábojů, kterým byl ve studeném vzorku znemožněn pohyb. Zahřátí vzorku zvýší vibrační energie atomů a molekul a umožní nábojům překonání energetických bariér bránících rekombinaci. Při rekombinaci nábojů dojde ke snížení energie systému, která se projeví vyzářením fotonu (Ducruet et Vass 2009).

Ve fotosyntéze je původcem termoluminiscence především PS II, kde dochází k rekombinaci nábojů mezi manganatými ionty (nebo tyrozinovými zbytky) v OEC a sekundárními chinonovými akceptory Q_A a Q_B . Luminiscence z PS II má emisní spektrum, které je podobné spektru fluorescence Chl s maximy 695 a 735 nm. Měření termoluminiscence fotosyntetických vzorků vyžaduje poměrně složité technické zařízení umožňující rychlé změny teploty a komplikované automatické ozařování vzorku. Nejčastějším přístupem je rychlé ohřívání vzorku z 77 K nebo -30 °C na 70 °C. Na získané křivce termoluminiscence se pak při konkrétních teplotách objeví různé čáry termoluminiscence, které odpovídají různým typům rekombinace náboje (Tab. 3) (Ducruet et Vass 2009).

Měření termoluminiscence na jehličnanech se zabývalo jen několik studií. Ivanov et al. (2001) a Ivanov et al. (2002) zkoumali změny termoluminiscence v závislosti na ročním období u vzrostlého stromu *P. sylvestris*, a to každodenním měřením po dobu dvou let, a zjistili pravidelné změny v intenzitě čáry B (rekombinace $S_2Q_B^-$). Sveshnikov et al. (2006) měřili termoluminiscenci semenáčků téhož druhu borovice adaptovaných na chlad a zjistili, že u nich dochází k posunu čáry B směrem k nižším teplotám.

Tab. 3: Hlavní termoluminiscenční čáry fotosyntetického vzorku a jejich fyziologický původ. S₂/S₃ – redukční stavy Mn v OEC (jednotlivé fáze Kokova cyklu). Převzato a upraveno podle Vass (2003) a Ducruet et Vass (2009).

Název	Teplota (T _M)	Původ	PS II	Komentář
LTL	-250, -220, -200 °C		ne	Energie zachycená v agregovaných Chl
Z	-160 °C	Chl ⁺ (?) Chl ⁻ (?)	ne	
Z _v	-30 až -100 °C	(P ₆₈₀ ⁺ Q _A ⁻)	ano	T _M závisí na teplotě při ozáření
A _T	-10 až -20 °C	TyrZ ⁺ Q _A ⁻	ano	Poškození Mn iontů v OEC
A	Cca -15 °C	S ₃ Q _A ⁻ ?	ano	
Q	2 až 10 °C	S ₂ Q _A ⁻	ano	Poškození Q _B nebo inhibice pomocí DCMU
B	30 až 38 °C	S _{2/3} Q _B	ano	pH lumen > 7
B ₂	28 až 32 °C	S ₂ Q _B ⁻	ano	pH lumen < 7
B ₁	20 až 30 °C	S ₃ Q _B ⁻	ano	pH lumen < 7
AG	45/35 °C	S ₂ /S ₃ Q _B ⁺ e ⁻	(ano)	Elektron ze stromatu v intaktních chloroplastech
C	52/55 °C	TyrD ⁺ Q _A ⁻	ano	Minoritní čára posílená vystavením DCMU
HTL1	60 až 85 °C	?	ne	Různé čáry neznámého původu a oxidativní chemiluminiscence
HTL2	120 až 140 °C	Peroxidy lipidů	ne	Termolyze C-O-O- vazby

3.3 Vnitrodruhová variabilita u jehličnanů v parametrech týkajících se primárních fotosyntetických procesů

Na rozdíl od bylin (především hospodářsky významných druhů), je prací, které studovaly možné vnitrodruhové rozdíly v účinnosti primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů, poměrně málo. Přehled metodických aspektů těchto studií uvádím v Tab. 4.

Z Tab. 4 je zřejmé, že nejčastějším analyzovaným rodem byla borovice (13 studií na celkem 12 druzích: *P. sylvestris*, *P. pinaster*, *P. halepensis*, *P. brutia*, *P. cembra* L., *P. monticola* Dougl. Ex D. Don, *P. elliotii* Engelm. var. *elliottii*, *P. radiata* D. Don, *P. canariensis* Chr. Sm. Ex DC, *P. strobus* L., *P. flexilis*, *P. ponderosa*), dále smrk (11 studií na celkem 5 druzích: *P. abies*, *P. glauca*, *P. pungens* Engelm., *P. rubens* Sarg., *P. mariana* (Mill.) B.S.P., *P. rubens* Sarg.), jedle (1 studie, *Abies alba* Mill.) a pseudotsuga (*Pseudotsuga meziensii* (Mirb.) Franco var. *glauca*, 1 studie).

U některých studií byly známy pouze mateřské rostliny a potomci byli podle mateřských rostlin sdruženi do rodin (Bigras 2000 a 2005, Marshall et al. 2001, Major et al. 2009, Corcuera et al. 2011, Salmela et al. 2011), ale existují i práce srovnávající jasně definované genotypy – klony (Westin et al. 1995, Westin et al. 1999, Koehn et al. 2003, Major et al. 2003,

Bown et al. 2009, Xue et al. 2013), nebo potomky kontrolovaných křížení (Blodner et al. 2005, Major et al. 2007). Řada prací naopak srovnává celé populace (geneticky nedefinované, nebo nepříliš definované) (Robakowski et Laitat 1999, Westin et al. 2000, Lopez et al. 2009, Gomory et al. 2010, Luttge et al. 2011, Michelozzi et al. 2011, Reinhardt et al. 2011, Romsakova et al. 2012, Yildiz et al. 2014). Pouze v malém množství se lze setkat s pracemi věnujícími se přímo kvantitativní genetické analýze (Romsakova et al. 2012).

Téměř vždy se jednalo o studie s mladými stromky, zatímco studií na dospělejších stromech je minimum (35leté – Gomory et al. (2010) a Romsakova et al. (2012), 21leté – Luttge et al. (2011), 18leté – Westin et al. (1999), 14leté – Westin et al. (1995)). Stromky byly často pěstovány v kontrolovaných podmínkách skleníku (Robakowski et Laitat 1999, Koehn et al. 2003, Major et al. 2003, 2007, 2009, Bown et al. 2009, Salmela et al. 2011, Yildiz et al. 2014) nebo klimatických komor (Bigras 2000, 2005, Blodner et al. 2005, Lopez et al. 2009, Michelozzi et al. 2011); v těchto případech šlo o takzvané nádobové pokusy (pěstování v květináčích s vhodným substrátem) a v jednom případě bylo dokonce použito pěstování v hydroponii (Lopez et al. 2009). Zbylé studie využívaly k pěstování venkovní testovací plochy v různých lokalitách: Švédsko (Westin et al. 1999, 1999, 2000), USA (Marshall et al. 2001, Koehn et al. 2003, Reinhardt et al. 2011), Kanada (Major et al. 2009), Nový Zéland (Xue et al. 2013), Slovensko (Gomory et al. 2010, Romsakova et al. 2012), Španělsko (Corcuera et al. 2011) a Skotsko (Salmela et al. 2011). Luttge et al. (2011) měřili ETR u druhu *P. sylvestris* také přímo v polském Bělověžském pralese.

V řadě studií byly stromky vystaveny různým stresovým faktorům, např. mrazu (Westin et al. 1995 a 1999, Major et al. 2003 a 2007, Yildiz et al. 2014), suchu (Bigras 2005, Blodner et al. 2005, Lopez et al. 2009, Michelozzi et al. 2011), vysoké teplotě (Bigras 2000), nedostatku dusíku či fosforu (Bown et al. 2009) nebo UV záření (Robakowski et Laitat 1999). Existuje také práce věnovaná vlivu různé ozářenosti a interakci rostliny s parazitem (Major et al. 2009). Kromě těchto případů se dále lze setkat i se studiemi zaměřenými na srovnání populací pocházejících z různých míst a lépe či hůře přizpůsobených na určité podmínky prostředí (Westin et al. 2000, Lopez et al. 2009, Gomory et al. 2010, Corcuera et al. 2011, Luttge et al. 2011, Michelozzi et al. 2011, Reinhardt et al. 2011, Salmela et al. 2011, Romsakova et al. 2012).

S dvěma výjimkami (Gomory et al. 2010 a Romsakova et al. 2012), kteří využili jednoduchou analýzu rychlé části indukční křivky fluorescence Chl, používaly tyto práce pro

měření účinnosti fotosyntetického ETC analýzu pomalé části indukční křivky fluorescence Chl, případně jednoduchou analýzu rychlé části indukční křivky. V používaných přístrojích není příliš velká variabilita; nejčastěji byla fluorescence Chl měřena pomocí PAM-fluorometru 2000 od německé firmy Walz (téměř v polovině prací), případně přístrojů vyráběných britskou firmou Hansatech Instruments. Naproti tomu značně variabilní jsou konkrétní podmínky měření ať už se jedná o intenzitu saturačního pulsu ($200 \text{ až } \geq 10000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) či jeho délku (0,8–2 s), délku zatemnění jehlic (15 min – 8 hod) nebo další technické parametry měření.

Obvykle byl ale hodnocen jen jeden nebo několik základních parametrů fluorescence Chl. Velká část studií hodnotí pouze parametr F_v/F_M (Westin et al. 1995, 1999, 2000, Marshall et al. 2001, Blodner et al. 2005, Michelozzi et al. 2011, Reinhardt et al. 2011, Salmela et al. 2011, Xue et al. 2013, Yildiz et al. 2014). V několika studiích byly stanoveny další základní parametry odvozené z analýzy pomalé fáze fluorescenční indukční křivky, tj. Φ_{PSII} , qP , qN , NPQ nebo F_v'/F_M' (Bigras 2000, 2005, Koehn et al. 2003, Major et al. 2003, 2007, 2009, Bown et al. 2009, Lopez et al. 2009, Corcuera et al. 2011, Luttge et al. 2011). Pár studií zkoumalo parametr ETR měřením při několika úrovních ozáření (Bown et al. 2009, Major et al. 2009, Luttge et al. 2011) a jedna studie se zabývala parametrem R_{FD} (Robakowski et Laitat 1999). Podrobněji se analýzou primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů v této souvislosti nezabýval dosud nikdo.

Tab. 4: Přehled studií, ve kterých byla studována geneticky podmíněná variabilita v aktivitě primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů. Označení některých fotosyntetických parametrů byla změněna tak, aby odpovídala označení v kapitole 3.2.3. PAR – fotosynteticky aktivní záření. PEA – Plant Efficiency Analyser.

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatemnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Picea abies</i> (L.) Karst	Testovací plocha založena 1983 v severním Švédsku z řízků zakořeněných 1977. Vybrané 3 klony na testovací ploše reprezentující 3 růstové kategorie, každý klon na ploše reprezentován 11 rametami. V roce 1991 odebráno 10–15 větviček ze středních částí větví horního přeslenu, rozděleno do 5 skupin mrazových teplot a umístěno do igelitových sáčků. Chlazení v sáčcích v etanolové lázni 2 hod z 15–20 °C na 5 °C, pak rychlostí 5 °C/hod na –25 °C. Skupiny sáčků vyndavány při změně každých 5 °C a uchovány ve 5 °C ve tmě. Měření před a po mrazovém testu.	1 hod (5 °C)	F_0, F_M (saturující puls 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Stanoveno F_V/F_M .	Plant stress fluorometer (BioMonitor)	Studium rozdílů v odolnosti k mrazu mezi klony s různou růstovou rychlostí	Westin et al. (1995)
<i>Picea abies</i> (L.) Karst., <i>Picea pungens</i> Engelm., <i>Pinus sylvestris</i> L., <i>Pinus cembra</i> L., <i>Abies alba</i> Mill.	3–4leté semenáčky pocházející ze školek ve Francii, Belgii, Polsku a Finsku. Pěstování v květináčích ve skleníku. Rostliny vystaveny UV–B záření nízké (4 hod, 12,32 $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) / vysoké (8 hod, 24,64 $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) dávky.	bez zatemnění	F_M, F_S' měřeno při vlnových délkách 690 a 730 nm. Stanoveno R_{FD} pro obě vlnové délky	KFM-002 fluorometer sestavený na Technical University of Budapest	Porovnání vlivu UV-B záření na fotosyntetický aparát v závislosti na lokalitě původu genetického materiálu (u několika druhů)	Robakowski et Laitat (1999)
<i>Picea abies</i> (L.) Karst	Vybrané tři klony na testovací ploše stejné jako ve studii Westin et al. (1995). Mrazové testy a měření fluorescence jako Westin et al. (1995) ve třech dnech v průběhu podzimu 1995.	viz Westin et al. (1995)	viz Westin et al. (1995)	viz Westin et al. (1995)	Studium souvislosti mitotické aktivity, růstové rychlosti a odolnosti k mrazu v průběhu roku	Westin et al. (1999)

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatměnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	Semenáčky vypěstovány ze semen pocházejících z 12 rodin rozdělených do 3 výškových kategorií. Výsev 3.3.1997, pěstování v květináčích v růstové komoře (den/noc 16/8 hod, 340 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 25/20 °C, po měsíci 20/15 °C). Den před testem odolnosti k horku polovina semenáčků aklimatizována na teplo (5 hod, 38 °C, 215 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). 5 jehlic 1 cm pod terminálním pupenem odebráno a upevněno na vlhkou textilii do Petriho misek uzavřených parafilmem. Misky umístěny na 30 min do horké lázně (42, 44, 46, 48 nebo 50 °C). Měření 1 hod po aklimatizaci a 1 hod po testech horkem. Optické vlákno namířeno na jehlice na Petriho misce ze vzdálenosti 1 cm pod úhlem 60°.	30 min	F_0 , F_M (saturační puls 1 s 1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), aktivační záření 5 min 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, změřeno F_S' , F_M' , F_0' . Stanoveno F_V/F_M , F_V'/F_M' , Φ_{PSII} , qP a qN	PAM 2000 (Walz)	Odhad odolnosti k extrémnímu horku u šlechtěných rychle (vs pomalu) rostoucích stromů	Bigras (2000)
<i>Picea abies</i> (L.) Karst	2leté semenáčky z 12 přirozených populací a 6 semenných sadů zasazeny v roce 1986 na testovací ploše v severním Švédsku ve sponu 1x1 m. V roce 1994 zbylo cca 50 % přeživších rostlin. Testování odolnosti k mrazu v průběhu let 1996 a 1997 (25 jednodenních odběrů vzorků). 10 jehlic/strom použito k mrazovým testům podle Westin et al. (1999).	viz Westin et al. (1995)	viz Westin et al. (1995)	viz Westin et al. (1995)	Porovnání odolnosti k mrazu v průběhu roku u genetického materiálu z přirozených populací/semenných sadů původem z severní/jižní části Švédska	Westin et al. (2000)

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatemnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco var. <i>glauca</i> , <i>Pinus ponderosa</i> Dougl. Ex Laws., <i>Pinus monticola</i> Dougl. Ex D. Don	Semenáčky vypěstovány ze semen sebraných z vybraných mateřských rostlin z nižších poloh experimentálního lesa Priest River (Idaho). Pěstování podle druhů na třech plochách v témže lese: <i>P. ponderosa</i> vysazena ve sponu 1.21 × 0.61 m; v roce 1995 probírka (–75 % stromů). <i>P. menziesii</i> a <i>P. monticola</i> vysazeny ve sponu 1.06 × 0.61 m; v roce 1996 probírka (–75 % stromů). K měření vybrány 4 rodiny každého druhu (2 vysoké, 2 nízké – třídy odpovídají třetinám percentilu výšky z roku 1995). 9leté stromy měřeny v dvouměsíčních intervalech od února do října 1997. Do června měřeny loňské jehlice, poté už jehlice z aktuálního roku. Jehlice otrhány a narovnány abaxiální stranou k přístroji.	15 min	F_0 , F_M (2 s ozáření 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Stanoveno F_V/F_M	CF-1000 chlorophyll fluorescence measurement system (P.K. Morgan Instruments)	Studium geneticky podmíněné variability v populacích	Marshall et al. (2001)
<i>Pinus elliotii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>	30 semen z kontrolovaných křížení (AxA, AxB, AxC, AxD, AxE, Axneznámý) vyseto v dubnu 1996 a pěstováno ve skleníku, od srpna 1996 venkovní pěstování (experimentální les Harrison, Mississippi). Měření 16.6.–1.4.1997	neuveдено	F_0 , F_M , aktivační záření 10, 50, 100, 200, 500 a 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ každá úroveň ozáření 5 min, pro každou intenzitu ozáření stanoveno F_0' , F_M' a F_S' , F_V/F_M , Φ_{PSII} , qP , qN	PAM-2000 (Walz)	Úvodní odhady geneticky podmíněné variability v několika sledovaných parametrech fluorescence Chl	Koehn et al. (2003)

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatměnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Picea rubens</i> Sarg., <i>Picea mariana</i> (Mill.) B.S.P.	Materiál dvou druhů původem ze 3 kanadských regionů (Nové Skotsko, Nový Brunswick a Ontario) a 6 lokalit (2 lokality/region), všechny lokality v obdobné zeměpisné šířce a výšce ale s odlišnou mírou zalesnění. Klony <i>P. rubens</i> získány z 15–20 stromů/lokality v roce 1996, semena <i>P. mariana</i> sebrána z dominantních a kodominantních stromů a zasazena v červnu 1998. Pěstování v standardních podmínkách ve skleníku. V prosinci 1998 měření 8 semenáčků z každé lokality: 2 sady 6 jehlic narovnaný na lepící pásku, 1. vystavena –40 °C na 30 min a měřena, 2. měřena okamžitě, pak vystavena –20 °C na 30 min a měřena.	30 min, temná komora	F_0 , F_M (saturační puls 0,8 s $>3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), aktivační záření 4 min $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ + saturující puls každých 20 s, F_M' , F_S' , F_0' . Stanoveno F_V/F_M , qP a qN	PAM-2000 (Walz)	Porovnání mezidruhové a vnitrodruhové variability ve fluorescenčních parametrech a odolnosti k mrazu	Major et al. (2003)
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	Genetický materiál odpovídá Bigras (2000). Výsev 26.8.1997, pěstování 18 týdnů v růstové komoře (den/noc 16/8 hod, $340 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 22/20 °C), poté přesazení do polystyrenových nádob s rašelinou a pěstování v růstové komoře (stabilní teplota 20 °C). 13.4.1998 zahájen stres suchem (konec zalévání) trvající 21 dní. Každý den stresu odebráno 5 jehlic ze 2 semenáčků z každé rodiny. Měření optickým vláknem naměřeným na jehlice narovnané na Petriho misce ze vzdálenosti 1 cm pod úhlem 60°.	30 min	F_0 , F_M (saturační puls 1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po 1 s), aktivační záření 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 5 min, změřeno F_S' , F_M' , F_0' . Stanoveno F_V/F_M , F_V'/F_M' , Φ_{PSII} , Φ_P (fotochemická efektivita otevřených RC PS II), qP a qN	PAM 2000 (Walz)	Odhad odolnosti k suchu u šlechtěných rychle (vs. pomalu) rostoucích stromů	Bigras (2005)

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatemnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Picea abies</i> (L.) Karst	Semenáčky vypěstovány ze semen pocházejících ze 2 kontrolovaných křížení reprezentujících nižší a vyšší rezistenci k chladu. Semena klíčila ve skleníku (18–22 °C den, 15–18 °C noc), po 3–4 měsících semenáčky přesunuty do růstové komory (PAR 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 60% vlhkost, 20 °C), po 1 roce v růstové komoře zahájen stres suchem (polovina rostlin nezalévána). Měření fluorescence pravidelně v průběhu 21 dní stresu suchem.	neuvedeno	Stanoveno F_v/F_m , podrobnosti neuvedeny	Mini-PAM (Walz)	Studium, zda potomstvo odolné k mrazu je také odolné k suchu; enzymatické aktivity společné oběma reakcím na stres	Blodner et al. (2005)
<i>Picea rubens</i> Sarg., <i>Picea mariana</i> (Mill.) B.S.P.	Původní genetický materiál: sérií kontrolovaných křížení byly získány hybridy označené indexy 0, 25, 50, 75 a 100, kde 0 odpovídá čisté <i>P. mariana</i> a 100 čisté <i>P. rubens</i> . Experimentální materiál tvořila další generace kříženců, vybrány 3 křížení pro každý index po 4 semenáčcích. Semena vyseta v červnu 1998. Pěstování ve skleníku s kontrolovanou teplotou a vlhkostí v průběhu sezóny. Rostliny zalévány/hnojeny 2x týdně. 16h denní cyklus podpořen sodíkovými výbojkami. Jehlice odebrány 18–22.12.1998 uprostřed terminál a narovnány na lepicí pásku. Vzorky vystaveny teplotám 5 °C (kontrola), –20 °C a –40 °C (chlazení rychlostí 5 °C.h ⁻¹ , 30 min v dané teplotě, přesun do 5 °C). Vzorky kontroly použity pro měření při –20 °C.	30 min, temná komora (20 °C)	F_0 , F_M (saturující puls 0,8 s >3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), aktivační záření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se saturujícími pulsy každých 20 s po dobu 4 min. Stanoveno F_v/F_m , Φ_{PSII} a qN	PAM-2000 (Walz)	Analýza genetické podmíněnosti znaků spojených s fotosyntézou a odolností k mrazu u mezidruhových kříženců	Major et al. (2007)

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatměnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Pinus radiata</i> D. Don	Řízky 5 klonů reprezentujících gradient růstových rychlostí (původně 400 klonů). Kořeny inokulovány spory <i>Rhizopogon rubescens</i> . Pěstování v květináčích ve skleníku s termostatem (18±4 °C den, 15±4 °C noc), zalévány roztoky se dvěma koncentracemi dusíku (1.43 a 7.14 mol.m ⁻³) a dvěma koncentracemi fosforu (0.084 a 0.420 mol.m ⁻³). Měření 6, 9 a 18měsíční rostliny. 2 vybrané klony po 9 a 18 měsících měřeny v kultivační komoře.	vzorky adaptované na světlo i tmu, 30 min, standardní kolíčky 2030-B a DLC-8	F ₀ , F _M (saturační puls 0,8 s 8000 μmol.m ⁻² .s ⁻¹), aktivační světlo zvyšováno každých 30 s po 4 min. Stanoveno F _v /F _M , Φ _{PSII} , ETR a Stern-Volmerovo nefotochemické zhášení N _q = F _M /(F _M '-1).	Mini-PAM-2000 (Walz)	Rozdíly mezi klony s odlišnou růstovou rychlostí v reakci na nedostatek N a/nebo P	Bown et al. (2009)
<i>Pinus canariensis</i> Chr. Sm. Ex DC	Semenáčky vypěstovány ze semen sebraných z 5 lokalit (375 semenáčků/lokalita). Pěstování 2 měsíce v hydroponii (den/noc: 25/20 °C, 60/80% vlhkost), stres suchem navozen přidáním PEG 6000, což vedlo ke snížení vodního potenciálu v průběhu 10 dní na -1 nebo -1,5 MPa. Měření fluorescence na 8 jehlicích/semenáček odebraných 7. a 11. den "sucha".	30 min	F ₀ , F _M (saturační puls 0,8 s 6600 μmol.m ⁻² .s ⁻¹), okolní "ambient" aktivační světlo, F _S ', F _M ', F ₀ '. Stanoveno F _v /F _M , F _v '/F _M ', Φ _{PSII} .	PAM-fluorometer FMS 2 (Hansatech Instruments)	Geneticky podmíněné rozdíly v odolnosti vůči suchu mezi populacemi z lokalit s odlišným klimatem	Lopez et al. (2009)
<i>Pinus strobus</i> L.	Genetický materiál z 2 oblastí (New Foundland – osamělé lesíky, napadení nosatci, Ontario – souvislý porost), každá 3 lokality, v každé 10 rodin. Semenáčky předpěstovány 1 rok ve skleníku a v létě 1995 vysazeny ve venkovním prostředí (kanadský výzkumný les Petawawa) při 3 úrovních zastínění. Měření v říjnu 2002. Jehlice pro měření narovnány do speciální kyvety určené pro vzorek.	30 min, plastová krabice	F ₀ , F _M (saturační puls 0,8 s, >3000 μmol.m ⁻² .s ⁻¹), aktivační záření 10, 25, 50, 100, 150, 125, 500, 1000, 1500 a 2000 μmol.m ⁻² .s ⁻¹ , saturační pulsy každých 20 s, pro každou intenzitu ozáření stanoveno F _M ', F ₀ ' (po ozáření červeným světlem). Stanoveno F _v /F _M , Φ _{PSII} , qP, qN a ETR	PAM-2000 (Walz)	Stromky pod větším ozářením rostou rychleji, ale jsou více napadány nosatci. Studium geneticky podmíněných rozdílů populace, která po napadení nosatci zůstala ve formě osamělých lesíků, od populace souvislého lesa.	Major et al. (2009)

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatemnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Picea abies</i> (L.) Karst	Genetický materiál původem z 12 slovenských a několika zahraničních lokalit vysazen na 5 plochách na Slovensku na výškovém gradientu 450–1250 m.n.m v roce 1974 (ve sponu 2x2 m). Pro měření zvoleny 3 lokality původu s kontrastním klimatem a 2 (nejvyšší a nejnižší) testovací plochy. V říjnu 2009 (po krátkém období celodenních mrazů) odebrány ~80 cm dlouhé větve z horní části koruny a uskladněny ve tmě dva dny. Měření na loňských jehlicích.	30 min	Měření rychlé fáze fluorescenční indukční křivky, ozáření 2100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (= 50% intenzita saturujícího záření) po dobu 1 s, stanoveno F_0 , F_M , F_V , t_M , Area.	PEA (Hansatech Instruments)	Porovnání vlivu genetického původu a vlivu prostředí na odolnost vůči mrazu	Gomory et al. (2010)
<i>Pinus pinaster</i> (Ait.)	Semenáčky vypěstovány ze semen sebraných ze známých mateřských rostlin z různých podnebí (Francie, Španělsko, Maroko). Pěstování ve školkách na mezofytním a xerofytním stanovišti na východě a západě Španělska. Na 1 a 2letých semenáčcích měřeny jehlice z aktuálního roku.	30 min, standardní kolíčky FMS 2	F_0 (modulované světlo 0.6 kHz, v přítomnosti far-red záření 7 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), F_M (saturační puls 1 s 20 kHz 6000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ bílého světla). PAR: 1500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na xerofytním stanovišti a 1360 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na mezofytním. F_S' , F_M' , F_0' . Stanoveno F_V/F_M , Φ_{PSII} , qP , NPQ	PAM fluorometer FMS 2 (Hansatech Instruments)	Výzkum vnitrodruhové variability, odolnost populací vůči zimnímu stresu	Corcuera et al. (2011)
<i>Pinus sylvestris</i> L.	4–6leté stromy v polském Bělověžském pralesi z vlhkého a suchého stanoviště, dále 21leté stromy ve výzkumném ústavu Sekocin původem z 8 evropských lokalit. Měření přímo na stromě (Bělověžský prales, 2–6 vzorků/strom), nebo ihned po odstřížení slunné větve (Sekocin, 3 vzorky/strom). Trs loňských jehlic upevněn do standardního 2030-B kolíčku a měřen.	Vzorky adaptované na světlo i tmu, 30 min	Aktivační záření zvyšováno během 4 min v 8 krocích po 30 s, saturující puls 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ po 800 ms, Stanoveno F_V/F_M , Φ_{PSII} a ETR	Mini-PAM (Walz)	Výzkum variability mezi větvíčkami, jedinci a skupinami různého evropského původu	Luttge et al. (2011)

Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatměnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	6měsíční semenáčky původem ze dvou lokalit (Řecko, Itálie) s odlišným klimatem (60 semenáčků/lokalita). Semenáčky přeneseny do růstové komory (den/noc 16 / 8 h, 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 24/17 °C, relativní vlhkost 65 %, zalévání 1x týdně), pěstovány v květináčích a 3 týdny aklimatizovány. Zastavení zalévání na 28 dní, poté zalévání obnoveno. Po dobu sucha a 2 následujících týdnů měření 1x týdně na 4 rostlinách/lokalita.	8 h (přes noc)	F_0 (slabý měřicí paprsek), F_M (saturující puls bílého světla 0,8 s >10000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), Stanoveno F_V/F_M	PAM-2000 (Walz)	Porovnání odpovědi na suchu u semenáčků ze dvou klimaticky odlišných lokalit	Michelozzi et al. (2011)
<i>Pinus flexilis</i> James	Čerstvě vyklíčené semenáčky původem z dvou lokalit různé nadmořské výšky zasazeny v roce 2006 na třech plochách podél výškového gradientu v Niwot Ridge v USA. Sazení v blocích společně s <i>Picea engelmannii</i> . Měření 35 jedinců v létě dané sezóny.	25 min, standardní kolíčky	F_0 (slabý měřicí paprsek), F_M (saturační puls bílého světla 0,8 s). Stanoveno F_V/F_M	Mini-PAM (Walz)	Porovnání geneticky podmíněných rozdílů ve fyziologii u dvou populací z odlišné nadmořské výšky	Reinhardt et al. (2011)
<i>Pinus sylvestris</i> L.	Semenáčky vypěstovány ze semen pocházejících z 32 volně sprášených rodin z 8 populací s kontrastním klimatem ve Skotsku. Výsev v létě 2007, pěstování ve skleníku v květináčích pod mírným zastíněním. V létě 2008 semenáčky přesazeny do větších květináčů, v srpnu 2009 přesunuty do venkovního prostředí na stoly ve výzkumném ústavu v Edinburghu. Měření ve 14 časových bodech v období září 2009 až květen 2010. Odebrány jednotlivé jehlice na protilehlých stranách vedoucího výhonu, ihned zatměny a měřeny.	~20 min	F_0, F_M (saturační puls 2500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Stanoveno F_V/F_M	Handy PEA (Hansatech Instruments)	Výzkum geneticky podmíněné variability mezi populacemi z geoklimaticky různých lokalit	Salmela et al. (2011)

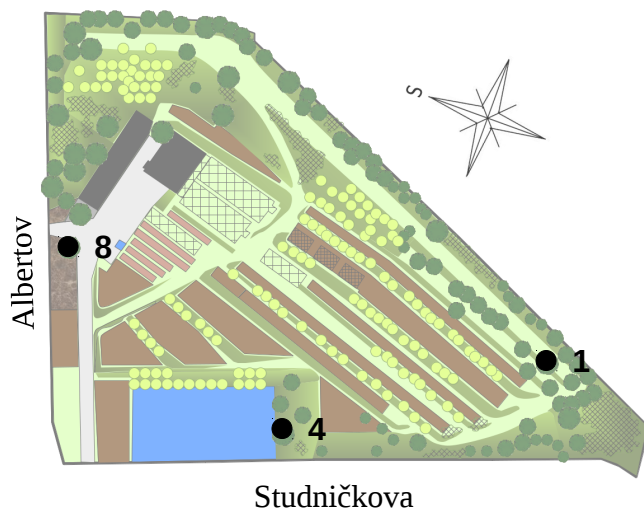
Rostlinný druh	Pokusný materiál, podmínky růstu a protokol pokusů	Zatemnění	Průběh ozařování při měření fluorescence Chl, parametry	Přístroj a výrobce	Zaměření článku	Citace
<i>Picea abies</i> (L.) Karst	Materiál stejný jako ve studii Gomory et al. (2010). Měření a mrazové testy provedeny v říjnu 2009 podle vzoru Gomory et al. (2010)	viz Gomory et al. (2010)	viz Gomory et al. (2010), dále stanoveno F_v/F_M	Viz Gomory et al. (2010)	Analýza jednonukleotidových polymorfismů u stromů původem z kontrastních lokalit a korelace těchto polymorfismů s fyziologickými parametry	Romsakova et al. (2012)
<i>Pinus radiata</i> D. Don	Testováno 40 klonů, z toho 20 "geneticky lepších" (vzniklých kontrolovaným opylením stromů s vyšším objemem dřeva) a 20 "geneticky horších" (vzniklých volným opylením stromů vykazujících větší a menší příznaky Mg deficience). V červenci 2002 zasazeno na čtyřech plochách na Novém Zélandu po třech 1letých rametách od každého klonu. V únoru 2006 měření 4–6 plně rozvinutých jehlic v severní (slunné) části koruny.	doba neuvedena, napsáno pouze "dark-adapted"	Stanoveno F_v/F_M , podrobnosti neuvedeny	Mini-PAM (Walz)	Výzkum variability genotypů ve využití půdních živin	Xue et al. (2013)
<i>Pinus brutia</i> Ten.	Semena ze 4 lokalit v Turecku (n.m.v. 800–1150 m). Do květináčů vyseto mnoho semen a po 60 dnech pěstování ve skleníku (~20 °C přes den) vybrán a ponechán 1 největší semenáček/květináč a květináče přesunuty do skleníku (~15 °C přes den). Měření před a po mrazovém testu: zchlazení na 5 °C během 1 hod, poté chlazení rychlostí 5 °C/hod na cílovou teplotu (-5 °C, -10 °C, -15 °C nebo -20 °C). Tato teplota konstatní po dobu 1 hod, a pak ohřátí stejnou rychlostí. Celkový počet rostlin = 25 opakování x 3 fáze růstu (měsíce) x 4 mrazové teploty x 4 místa původu	15 min	Stanoveno F_v/F_M , podrobnosti neuvedeny	Handy PEA (Hansatech Instruments)	Studium geneticky podmíněných rozdílů v odolnosti k mrazu mezi populacemi z různých lokalit	Yildiz et al. (2014)

4 Materiál a metody

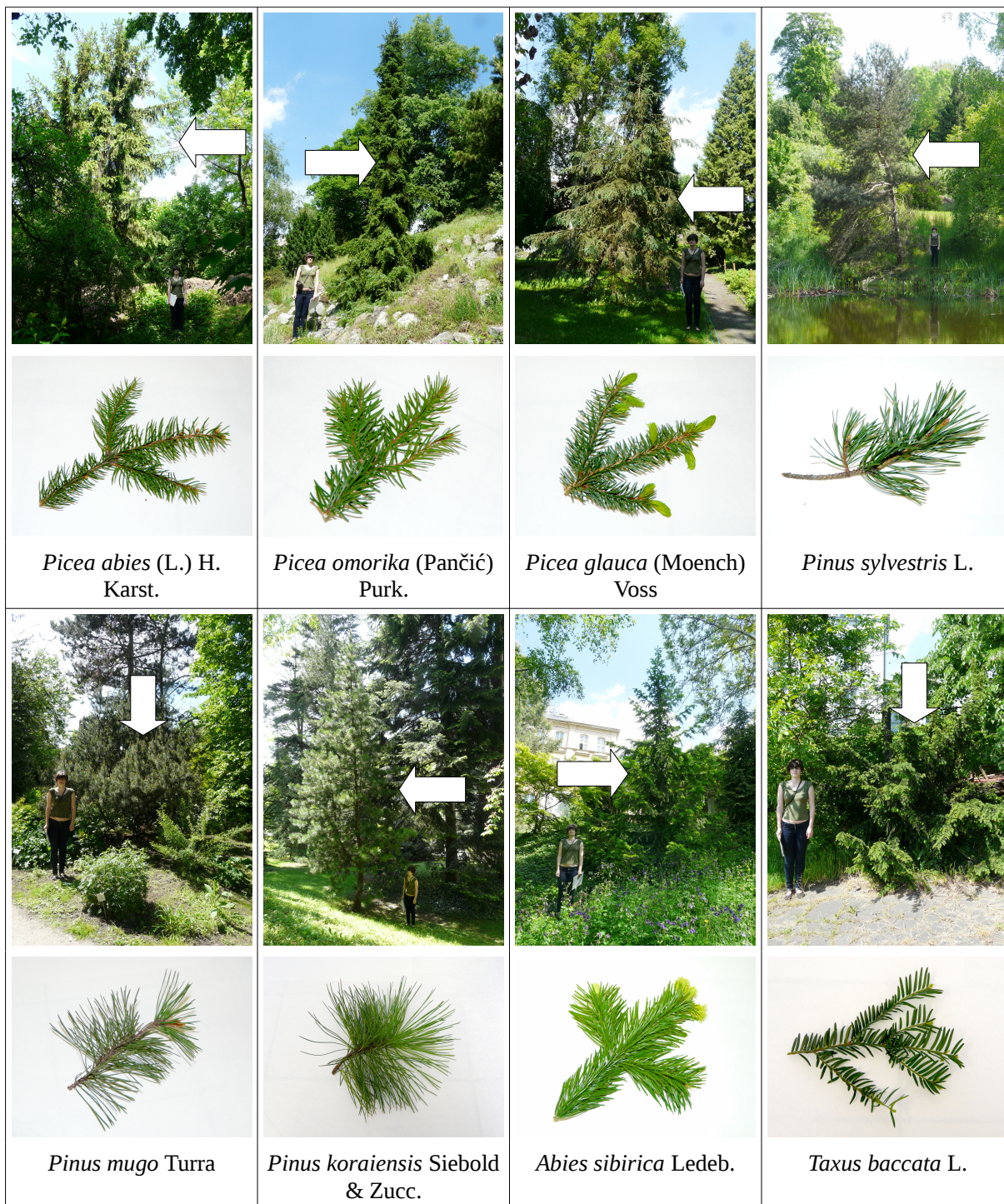
4.1 Rostlinný materiál a rozvržení pokusů

4.1.1 Pokusný blok 1

Analýzu OJIP parametrů fluorescence Chl, polarografická měření fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů a stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a vody v jehlicích jsem provedla na 8 druzích stromů: *Picea abies* (L.) H. Karst., *Picea omorika* (Pančić) Purk., *Picea glauca* (Moench) Voss, *Pinus sylvestris* L., *Pinus mugo* Turra, *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc., *Abies sibirica* Ledeb. a *Taxus baccata* L. Druhy *P. abies*, *P. sylvestris* a *T. baccata* rostly na pozemku Brožkovy genetické zahrady PřF UK v Praze (GPS souřadnice 50°4'7.788"N, 14°25'33.691"E, nadmořská výška 213–224 m.n.m.), ostatních pět druhů na pozemku Botanické zahrady PřF UK v Praze (GPS souřadnice: 50°4'16.167"N, 14°25'17.739"E, nadmořská výška 195–226 m.n.m.). Přesná lokalizace stromů je uvedena na Obr. 9. Každý druh byl reprezentován jedním jedincem (vzhledem k tomu, že jich v některých případech více nebylo k dispozici a vzhledem k celkovému experimentálnímu zaměření tohoto bloku). Měření jsem dělala ve dnech 14.4.–24.4.2014. Každý den jsem provedla měření na jednom druhu. Z východní strany stromu jsem ráno v 7:30 středoevropského letního času odebrala 9 rozvětvených koncových, ze země dosažitelných větviček (Obr. 10), které jsem v igelitových sáčkách přenesla do laboratoře, kde jsem po zatemnění (viz kap. 4.2.1) změřila OJIP křivky fluorescence Chl. Měřila jsem na jehlicích pocházejících z loňského roku (tj. 2013), protože letošní ještě nebyly dostatečně vyvinuté. Měřit jsem začala v 8:00 a skončila 8:30–9:00. Poté jsem ze tří skupin větviček (1, 2, 3), (4, 5, 6) a (7, 8, 9) připravila tři vzorky izolovaných chloroplastů a změřila fotochemické aktivity celého elektron-transportního řetězce, PS I a II, a to spřažené s fotofosforylací i rozspřažené od fotofosforylace. Také jsem stanovila obsah sušiny a Chl v jehličí výše uvedených skupin větviček. Při zpracování dat jsem dbala na to, abych k hodnotám fotochemických aktivit chloroplastů pro příslušné skupiny větviček přiřadila vždy odpovídající hodnoty fluorescenčních parametrů, obsahu pigmentů a hmotnosti sušiny.



Obr. 9: Plánky Botanické zahrady (nahore, převzato a upraveno z <https://www.natur.cuni.cz/fakulta/aktuality/soubory-aktualit/technicka-mapa-botanicke-zahrady>) a Brožkovy genetické zahrady (vlevo, vytvořila D. Holá) s vyznačenými stromy měřeními v pokusném bloku 1:
 (1) *P. abies*, (2) *P. omorika*, (3) *P. glauca*,
 (4) *P. sylvestris*, (5) *P. mugo*,
 (6) *P. koraiensis*, (7) *A. sibirica*,
 (8) *T. baccata*



Obr. 10: Fotografie měřených stromů a typických odebraných koncových větvíček. Foto D. Holá.

4.1.2 Pokusný blok 2

V týdnech 14.7.–18.7.2014 a 4.8.–8.8.2014 jsem měřila OJIP křivky fluorescence Chl, spektrální reflektanci jehlic a stanovila obsah pigmentů a sušiny v jehlicích 536 stromů borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.) z pokusných výsadeb Lesů české republiky, s.p., (LČR) ve dvou lokalitách („Nepomuk“ a „Skelná huť“). Tyto výsadby slouží k testování kvality

potomstva pocházejícího ze semenných sadů 43 – Silov u Nepomuka (lesní správa Klatovy) a 79 – Doubrava (lesní správa Plasy). Oba semenné sady vznikly naroubováním vybraných jedinců výborných lesnických vlastností (fenotypu) z porostů západních Čech. Každý vybraný jedinec (klon) je v nich zastoupen několika rouby (rametami), které jsou rozmístěny tak, aby bylo minimalizováno opylení příbuzných rostlin. Stromy v těchto semenných sadech se volně vzájemně opylují a jsou vzdáleností izolovány od jiných plodných porostů borovice. Charakteristiky semenných sadů jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab. 5: Charakteristiky semenných sadů, z nichž pocházely genetické zdroje materiálu pro pokusný blok 2. Převzato a upraveno podle Kaňák (2011).

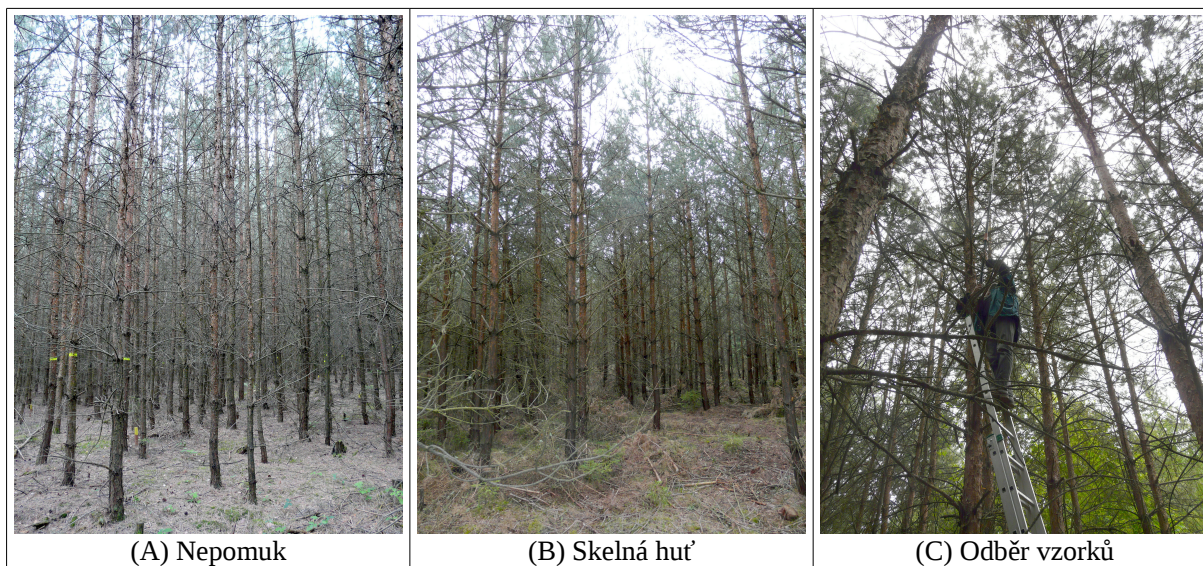
Semenný sad	Doubrava	Silov u Nepomuka
Evidenční číslo	79	43
LČR, lesní správa	Plasy	Klatovy
GPS souřadnice	49°54'31.034"N, 13°26'33.605"E	49°28'52.587"N, 13°31'41.536"E
Přírodní lesní oblast	06 Západočeská pahorkatina	06 Západočeská pahorkatina
Soubor lesních typů	3I dubovobukový, půda kyselá uléhavá	4S bukový, půda živná středně bohatá svěží
Hospodářský soubor	8241	451
Počet klonů	87	45
Počet ramet	1165	410
Spon (rozestupy stromů) [m]	6 × 6	6 × 6
Celková plocha [ha]	6,48	2,24
Rok založení	1980	1975
LVS (lesní vegetační stupeň)	2	4
Nadmořská výška [m n.m.]	380	480–500
Testován na ploše	Skelná Huť	Nepomuk

Semena z těchto sadů byla v letech 1991 a 1994 použita k vypěstování testovacích výsadeb podle náhodného blokového schématu po skupinách podle mateřských rostlin za účelem zjištění heritability fenotypových znaků, podle kterých byly vybírány klony v semenných sadech. V případě starší plochy „Nepomuk“ byla semena pocházející od jednoho klonu vždy smíchána do jedné skupiny. V případě plochy „Skelná huť“ byly jednotlivé mateřské ramety považovány za separátní skupiny. Do pokusných výsadeb byly také zařazeny kontroly, neboli semena pocházející z běžných lesních porostů. Podrobným popisem všech těchto čtyř ploch, jakožto i určením otcovských rostlin vybraných kvalitních jedinců na pokusných plochách se zabýval Kaňák (2011). Určení rodičovských rostlin provedl na základě morfologie šišek a

především pomocí metody „Random Amplified Polymorphic DNA“. Charakteristiky testovacích ploch jsou uvedeny v Tab. 6, fotografie zde rostoucích stromů na Obr. 11.

Tab. 6: Charakteristiky testovacích ploch, na kterých rostly stromy hodnocené v pokusném bloku 2. Převzato a upraveno podle Kaňák (2011) a doplněno o údaje o našich měřeních.

Testovací plocha	Skelná Hut'	Nepomuk	
	Celá plocha	Východní část	Západní část
GPS souřadnice	49°55'53.489"N, 13°6'43.268"E	49°29'40.735"N, 13°33'5.702"E	
Lesní správa	Plasy	Klatovy	
Číslo porostu	157 E 1	358 J 1c	
Bonita pro borovici	5	2	
Soubor lesních typů	5K5 jedlovobukový, půda kyselá	3S1 dubovobukový, půda živná	
Hospodářský soubor	133	453	
Počet potomstev	85 klonů, 320 ramet	38 klonů	
Počet parcel	960 + (7 kontroly)	163 + (3+3 kontroly)	
Počet opakování	3 (potomstev ramet)	4 (potomstev klonů)	
Celková plocha ha	1,23	0,81	
Rok založení	1994	1991	
lesní vegetační stupeň	4–5	3	
Nadmořská výška [m n.m.]	615	490	
Expozice	mírný SV pravidelný svah	mírný JV pravidelný svah	
Podloží	karbonské sedimenty	hrubozrná biotitická žula	
Lesní typ	4Q1 chudá dubová jedlina borůvková	3S1 dubová bučina šťavelová	3O6 jedlodubová bučina šťavelová
Půdní typ	pseudoglej planický	kambizem modální oligo/mesotrofní	pseudoglej modální mesotrofní
Humusová forma	mor typický	moder typický	mulový moder
Acidita	velmi silně kyselá	středně kyselá	
Půdní druh	písčitohlinitá, vlhká, ulehlá	písčitohlinitá, čerstvě vlhká	písčitohlinitá, vlhká
Hloubka půdy	středně hluboká až hluboká	hluboká	
Cílový hosp. soubor	27 oglejená chudá stanoviště	45 živná stanoviště střed. poloh	47 oglej. stanoviště střed. poloh
Přírodní lesní oblast	06 Západočeská pahorkatina		
Datum našeho měření	4.8.–8.8.2014	14.7.–18.7.2014	
počet změřených jedinců	210	326	



Obr. 11: Fotografie porostů borovic na pokusných plochách a dokumentace způsobu odběru vzorků ze žebříku pomocí teleskopických nůžek.

Ve spolupráci s Fakultou lesnickou a dřevařskou ČZU v Praze a katedrou experimentální biologie rostlin PŘF UK v Praze jsem provedla v týdnech 14.7.–18.7. a 4.8.–8.8.2014 měření fyziologických parametrů vybraných 536 jedinců. Během dopoledne a brzkého odpoledne byla z 5–6. přeslenu vybraných stromů odebrána jedna větev délky cca 0,5 m (Obr. 11C). Větve byly označeny podle souřadnice stromu na pokusné ploše (schéma umístění stromů viz přílohu 1) a v otevřených přeprávkách dovezeny do naší laboratoře (Brožkova genetická zahrada), kde byly uskladněny v nevytápěné místnosti do rána. Další den byla z každé větve odebrána řada koncových větviček. Pro všechna měření byly zvoleny loňské jehlice/větvičky (tj. přírůstky z r. 2013), protože letošní (přírůstky z r. 2014) ještě nebyly dost velké a dostatečně vyvinuté pro některé použité metody. Čtyři reprezentativní větvičky byly vybrány pro měření fluorescence Chl OJIP a následně spektrální reflektance. Toto pořadí bylo zvoleno vzhledem k tomu, že měření reflektance je potenciálně destruktivnější (vzorek zahřívá) než měření fluorescence. Ostatní větvičky byly použity pro stanovení obsahu pigmentů a sušiny. Každý den bylo takto zpracováno 40–120 větví. Pořadí, v jakém byly větve zpracovávány, odpovídalo pořadí, v jakém byly předešlý den odebírány, aby byl co možná nejvíce vyloučen případný vliv doby skladování větve. Odběr větviček a měření trvalo vždy od 8:30 do 11:30–16:00 podle počtu zpracovaných vzorků.

4.1.3 Pokusný blok 3

Metodické pokusy zaměřené na možnost analýzy fotochemické aktivity chloroplastů s inhibovaným OEC jsem prováděla průběžně v roce 2014 a na začátku roku 2015. Vzhledem

k tomu, že jsem nejprve musela vyzkoušet možné metodické postupy vypracované pro lupenité listy a v minulosti popsané v literatuře, pracovala jsem v tomto případě především s fazolem (*Phaseolus vulgaris* L.) a dále pak špenátem (*Spinacia oleracea* L.), ječmenem (*Hordeum vulgare* L.), sójou (*Glycine max* (L.) Merr.) a případně dalšími druhy bylin. Byly to obvykle zbytkové rostliny z jiných pokusů prováděných v naší laboratoři a byly pěstovány ve skleníku. Jako reprezentant jehličnanů mi sloužil výše zmíněný smrk (*Picea abies* (L.) H. Karst.) rostoucí v Brožkově genetické zahradě.

4.2 Metody

4.2.1 OJIP křivka indukce fluorescence Chl

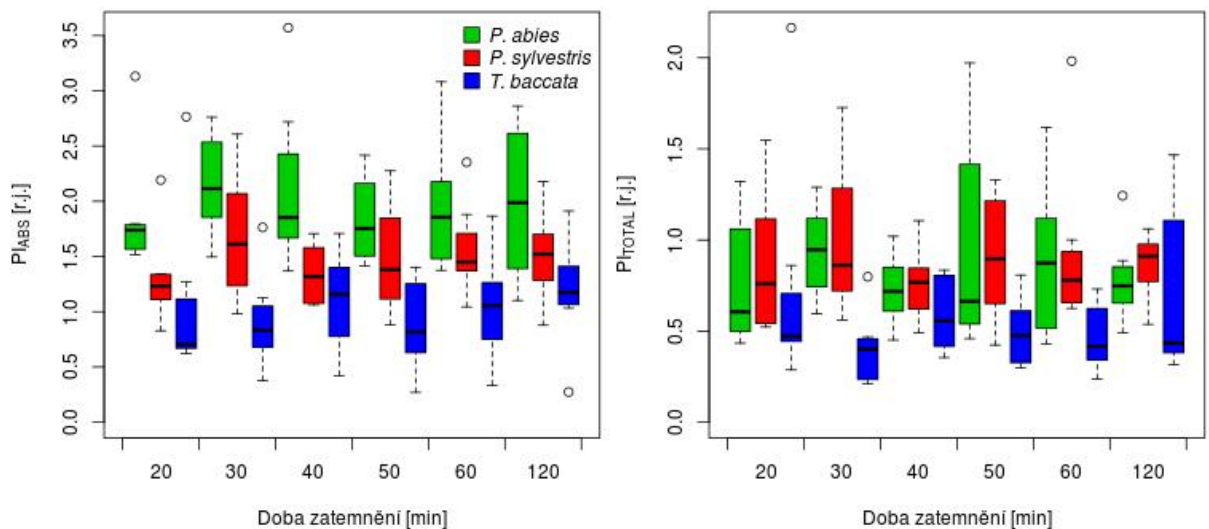
Přístrojem FluorPen FP100 (Photon System Instruments, Brno, Česká republika) jsem měřila OJIP část fluorescenční indukční křivky. Použila jsem protokol, který předem zatemněný (viz dále) vzorek vystaví po dobu 1 s saturačnímu pulzu modrého záření ($\lambda=455$ nm) jehož intenzitu jsem nastavila na $3000 \mu\text{mol } \gamma \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Hodnoty fluorescence Chl byly zaznamenány v době 10 μs až 2 s od excitačního pulzu, a to každých 10 μs do času 600 μs , každých 100 μs do času 14 ms, každou 1 ms do času 90 ms a každých 10 ms do času 2 s. Z naměřených hodnot fluorescence F_0 (v čase 40 μs), F_K (v čase 300 μs), F_J (v čase 2 ms), F_I (v čase 30 ms) a F_M (maximální hodnota fluorescence) jsem stanovila fluorescenční parametry V_J , V_I , M_0 , Φ_{P0} , Φ_{E0} , Φ_{R0} , Φ_{D0} , Ψ_{E0} , Ψ_{R0} , δ_{R0} , γ_{RC} , ABS/RC , $TP0/RC$, $ET0/RC$, $RE0/RC$, DI_0/RC , PI_{ABS} , PI_{TOTAL} . Výpočet těchto parametrů i jejich fyziologický význam jsem již popsala v literárním přehledu (kapitola 3.2.3).

Před vlastními pokusnými bloky 1 a 2 jsem provedla několik pokusů s cílem upravit tuto, v laboratoři již dříve hojně využívanou metodu, pro použití na jehličnanech. Výsledky uvádím rovnou v této kapitole, protože z nich vyplývá metodika ostatních pokusů. Jak jsem již psala v literárním přehledu, materiál musí být před měřením Kautského efektu temnotně adaptovaný. Abych stanovila vhodnou dobu zatemnění v našich podmínkách na jehličnanech, provedla jsem krátkou sérii pokusů na třech druzích jehličnanů rostoucích v Brožkově genetické zahradě (*P. abies*, *P. sylvestris* a *T. baccata*). Přímou na stromě jsem alobalem zatemnila 48 koncových větviček rozdělených do skupin pro zatemnění v délce 20, 30, 40, 50, 60 a 120 min. Po určené době zatemnění jsem v černém pytli nasunutém na strom stáhla alobal z větvičky a změřila fluorescenční křivku. Výsledky jsou uvedeny v Obr. 12 a Tab. 7. Hodnoty jednotlivých parametrů se v čase statisticky prokazatelně nelišily, přesto jsem pro

jistotu zvolila pro všechny následující pokusy dobu zatemnění 30 minut, kterou volila i většina autorů pracujících touto metodou s jehličnany (viz kap. 3.3).

Potřebovala jsem také vybrat nejvhodnější způsob, jak jehlice uspořádat do měřicího přístroje. Přístroj obsahuje snímací okénko o průměru 4 mm, které je určené k přiložení na listovou plochu a mělo by být v ideálním případě zcela zaplněno jednou vrstvou orientovaných jehlic. Někteří výzkumníci (Nippert et al. 2004, Major et al. 2007) řešili tento problém tak, že utržené jehlice připevnili na podložku lepicí páskou. Naše laboratoř měla naopak již jisté zkušenosti s měřením jehlic ještě na větvičce (*in situ*), které byly shrnuty do přístroje v mnoha vrstvách, aby bylo jisté, že celá plocha snímacího okénka bude zaplněna.

V rámci předchozího pokusu jsem tedy také vyzkoušela na malém množství větviček (4 opakování x 6 skupin lišících se dobou zatemnění) předem narovnat a podlepit jehlice *in situ* papírovou lepicí páskou do jedné vrstvy. Hodnoty některých parametrů získané v těchto měřeních se na první pohled lišily od hodnot parametrů z měření jehlic shrnutých pod okénko přístroje (data neuvedena). To však bylo způsobeno nedokonalým pokrytím snímacího okénka, a takové hodnoty bylo nutné považovat za nesmyslné. Metodu podlepování jehlic jsem tudíž pro pracnost, časovou náročnost a nároky na přesnost uspořádání jehlic pro další pokusy zavrhl.

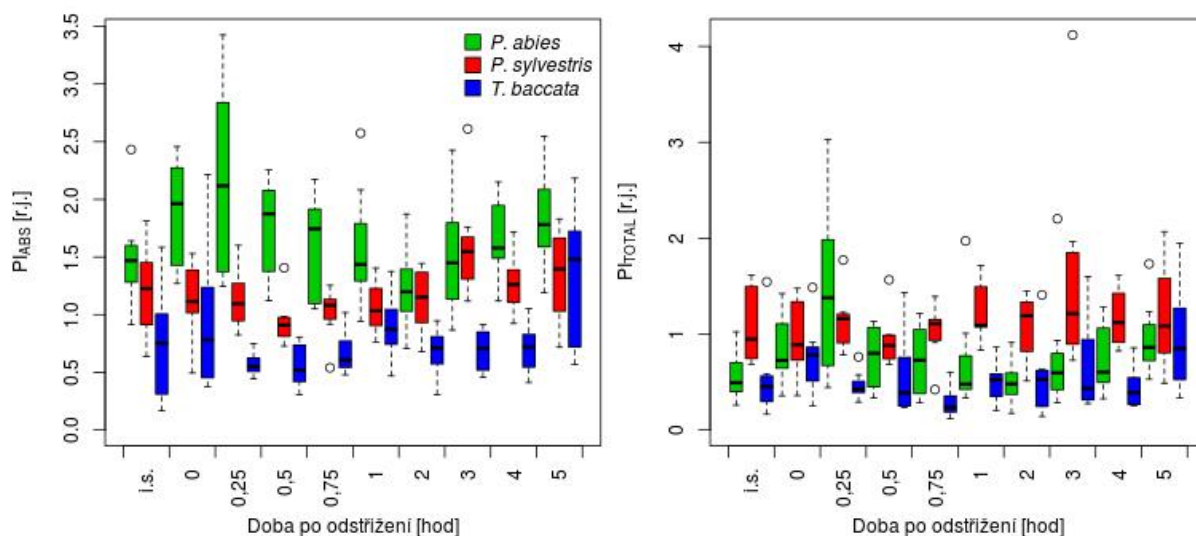


Obr. 12: Závislost vybraných fluorescenčních indexů (viz Tab. 2, str. 22) na době zatemnění. r.j. – relativní jednotky u tří druhů jehličnanů. Obdélníky jsou ohraničeny zesponu a shora 1. a 3. kvartilem, vodorovná linie značí medián, vousy sahají k nejvyšší/nejnižší hodnotě vzdálené od obdélníku 1,5 rozpětí kvartilů, odlehlé hodnoty označeny kroužky.

Tab. 7: Hodnoty OJIP parametrů v pokusu zaměřeném na zjištění optimální doby zatemnění u tří druhů jehličnanů. Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (p) z jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) testující vliv doby zatemnění. Druhy jsem nesdružila do jednoho testu (dvoufaktorová ANOVA), protože rozdílnost ve variabilitě v rámci jednotlivých druhů by mohla narušit předpoklad homogenity rozptylu.

druh	<i>P. abies</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>T. baccata</i>	druh	<i>P. abies</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>T. baccata</i>
index	p	p	p	index	p	p	p
V _J	0,655	0,761	0,237	δ _{R0}	0,609	0,858	0,573
V _I	0,600	0,715	0,412	γ _{RC}	0,860	0,882	0,580
M ₀	0,658	0,860	0,215	ABS/RC	0,830	0,895	0,575
φ _{P0}	0,896	0,362	0,994	TP0/RC	0,789	0,941	0,314
φ _{E0}	0,698	0,537	0,588	ET0/RC	0,861	0,914	0,341
φ _{R0}	0,598	0,828	0,316	RE0/RC	0,599	0,525	0,819
φ _{D0}	0,896	0,362	0,994	DI ₀ /RC	0,891	0,656	0,967
ψ _{E0}	0,655	0,761	0,237	PI _{ABS}	0,817	0,537	0,826
ψ _{R0}	0,600	0,715	0,412	PI _{TOTAL}	0,709	0,819	0,374

Abych ověřila, že budu v pokusném bloku 1 moci měřit odstřižené větvičky donesené do laboratoře, provedla jsem další krátkou sérii pokusů na třech druzích jehličnanů rostoucích v Brožkově genetické zahradě. Změřila jsem OJIP křivky u 80 koncových větvíček pro každý druh. Větvičky byly rozřazeny do skupin podle doby mezi odstřížením a měřením: *in situ*, ihned po odstřížení, 15, 30 a 45 min po odstřížení, 1, 2, 3, 4 a 5 hod po odstřížení. Odstřihávání jsem provedla v jednotný čas 8:30 ráno a větvičky jsem uskladnila v otevřených kartonových krabicích ve stínu ve venkovním prostředí. Větvičky jsem zatemnila 30 min před měřením, pro některé skupiny to znamenalo zabalení do alobalu přímo na stromě, pro některé přikrytí kartonové krabice s danou skupinou větvíček alobalem. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 13 a v Tab. 8. U některých parametrů ukázala analýza rozptylu statisticky průkazné rozdíly mezi skupinami. Změny hodnot těchto parametrů v čase ale na první pohled nepůsobily jako monotónní nárůst nebo pokles a mohly být způsobeny například vnitřním cirkadiálním rytmem rostliny. Abych kvantifikovala vliv odstřížení větvičky, stanovila jsem směrnice lineární regrese závislosti parametru na době odstřížení. Tyto směrnice byly ve všech případech velice nízké, a proto jsem usoudila, že měření OJIP křivek na větvičkách odebraných ze stromů i s jistou časovou prodlevou mohu v pokusném bloku 1 skutečně použít.



Obr. 13: Závislost vybraných fluorescenčních indexů (viz Tab. 2, str. 22) na době po odstřížení větvičky u tří druhů jehličnanů. r.j. – relativní jednotky. Obdélníky jsou ohraničeny zespodu a shora 1. a 3. kvantilem, vodorovná linie značí medián, vousy sahají k nejvyšší/nejnižší hodnotě vzdálené od obdélníku 1,5 rozpětí kvartilů, odlehlé hodnoty označeny kroužky.

Tab. 8: Hodnoty fotosyntetických parametrů v pokusu zaměřeném na zjištění vlivu odstřížení a délky uskladnění větvičky u tří druhů jehličnanů. Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (p) z jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) testující vliv dob od odstřížení. V případě signifikantního výsledku testu ANOVA jsem stanovila směrnici regresní přímky reflektující změnu indexu v čase od odstřížení. Zvýrazněné hodnoty směrnice se statisticky významně liší od nuly.

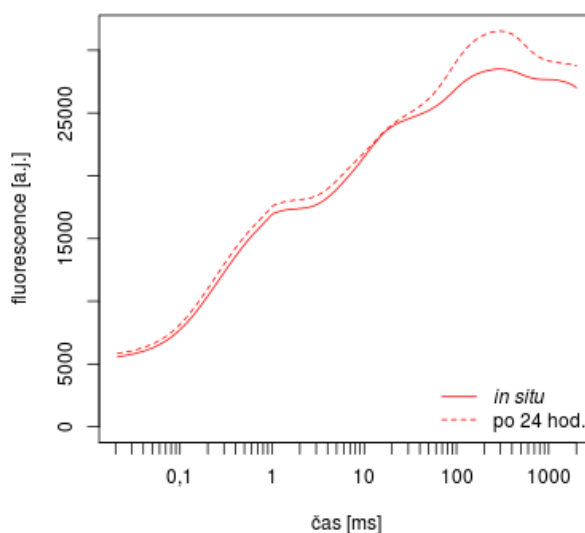
Druh	<i>P. abies</i>		<i>P. sylvestris</i>		<i>T. baccata</i>	
	p	Směr. [hod]	p	Směr. [hod]	p	Směr. [hod]
V_J	<0,001	0,0033	<0,001	-0,0157	0,002	-0,0088
V_I	0,013	-0,0008	0,025	-0,0057	0,045	-0,0027
M_0	0,093		0,118		0,030	-0,0201
φ_{P0}	0,076		0,269		0,105	
φ_{E0}	<0,001	-0,0018	<0,001	0,0134	0,003	0,0090
φ_{R0}	0,013	0,0009	0,030	0,0050	0,021	0,0032
φ_{D0}	0,076		0,269		0,105	-0,0059
ψ_{E0}	<0,001	-0,0033	<0,001	0,0157	0,002	0,0088
ψ_{R0}	0,013	0,0008	0,025	0,0057	0,045	0,0027
δ_{R0}	0,018	0,0034	0,034	-0,0046	0,122	
γ_{RC}	0,312		0,018	-0,0051	0,046	0,0019
ABS/RC	0,380		0,012	0,0706	0,046	-0,0274
TP0/RC	0,388		<0,001	0,0618	0,037	-0,0035
ET0/RC	0,061		<0,001	0,0618	0,003	0,0166
RE0/RC	0,003	0,0038	<0,001	0,0256	0,007	0,0051
DI ₀ /RC	0,264		0,363		0,101	

Tab. 8 – Pokračování.

Druh	<i>P. abies</i>		<i>P. sylvestris</i>		<i>T. baccata</i>	
Index	p	Směr. [hod]	p	Směr. [hod]	p	Směr. [hod]
PI _{ABS}	0,037	-0,0180	0,006	0,0642	0,002	0,0639
PI _{TOTAL}	0,019	-0,0022	0,335		0,050	

Podobně jsem před pokusným blokem 2 potřebovala ověřit, že budu moci měřit větvičky dokonce až následující den po odebrání. Porovnála jsem tedy stejným způsobem 8 větviček měřených ihned s 8 větvičkami měřenými 24 hod po odštížení. Měření jsem tentokrát provedla již pouze u *P. sylvestris*. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 14 a uvedeny v Tab. 9.

Obě OJIP křivky se na první pohled příliš nelišily, rozdíl byl vidět až na konci měření. Když jsem základní fluorescenční hodnoty (F_0 , F_K , F_J , F_I , F_M) porovnála Studentovým t-testem, rozdíly mezi měřením *in situ* a 24 hod po odštížení průkazné nebyly. Při porovnání odvozených parametrů (Tab. 9) jsem našla průkazné rozdíly především pro parametry charakterizující celý ETC (φ_{R0} , ψ_{R0} , δ_{R0} , RE0/RC, PI_{TOTAL}) nebo transport mezi PS II a PS I. V dalších parametrech byly hladiny statistické významnosti již vyšší. Rozhodla jsem se tedy (vzhledem k tomu, že zorganizovat odběry a měření v pokusném bloku 2 technicky jinak by bylo nesmírně obtížné), že měření 24 hod prodlevou nakonec použiji (také s ohledem na to, že během této doby větvičky používané při měření stále zůstaly *in situ* na velkých větvích) a při interpretaci výsledků budu zejména u výše uvedených parametrů opatrnější.



Obr. 14: Průměrné OJIP křivky indukce fluorescence chlorofylu (Chl) větvíček *Pinus sylvestris* měřených *in situ* a 24 hod po odštížení. a.j. – arbitrární jednotky.

Tab. 9: Výsledky pokusu zaměřeného na porovnání OJIP parametrů měřených ihned po odstřížení větviček s parametry měřenými na větvičkách uskladněných 24 hod. Uvedeny jsou průměry (Pr.) a směrodatné odchylky (SD) obou skupin a hladiny statistické významnosti (p) Studentova t-testu.

Index	Ihned		24 hod.		p
	Pr. [r.j.]	SD [r.j.]	Pr. [r.j.]	SD [r.j.]	
V _J	0,502	0,026	0,466	0,015	0,010
V _I	0,819	0,025	0,736	0,023	<0,001
M ₀	1,109	0,103	1,040	0,078	0,174
φ _{P0}	0,786	0,015	0,798	0,010	0,108
φ _{E0}	0,391	0,024	0,426	0,015	0,008
φ _{R0}	0,142	0,020	0,211	0,019	<0,001
φ _{D0}	0,214	0,015	0,202	0,010	0,108
ψ _{E0}	0,498	0,026	0,534	0,015	0,010
ψ _{R0}	0,181	0,025	0,264	0,023	<0,001

Index	Ihned		24 hod.		p
	Pr. [r.j.]	SD [r.j.]	Pr. [r.j.]	SD [r.j.]	
δ _{R0}	0,364	0,055	0,495	0,039	<0,001
γ _{RC}	0,264	0,018	0,264	0,013	0,927
ABS/RC	2,812	0,259	2,796	0,192	0,896
TP0/RC	2,208	0,170	2,230	0,141	0,792
ET0/RC	1,099	0,104	1,190	0,077	0,082
RE0/RC	0,396	0,044	0,588	0,038	<0,001
DI ₀ /RC	0,604	0,095	0,566	0,058	0,381
PI _{ABS}	1,331	0,281	1,642	0,235	0,040
PI _{TOTAL}	0,779	0,248	1,643	0,418	<0,001

Co se týče počtu technických opakování, která jsem při měření v rámci pokusných bloků 1 a 2 realizovala, provedla jsem v případě pokusného bloku 1 na každé odebrané větvičce čtyři měření (pokaždé na jiné části větvičky) a stanovila z nich průměrnou křivku OJIP pro danou větvičku. V případě pokusného bloku 2 byly z každé větve odebrány čtyři větvičky, každá byla změřena jednou a výsledné křivky byly opět zprůměrovány. Ve výsledku byl tedy každý vzorek (biologické opakování) reprezentován 4 technickými opakováními.

4.2.2 Izolace fotochemicky aktivních chloroplastů

Při práci s jiným materiálem než s jehlicemi (pokusný blok 3) jsem z listů nejprve odstranila centrální žilku a čepele jsem nastříhala na malé kousky (menší než 1 cm²). Navážku 2–3 g čerstvé hmoty těchto kousků jsem zamíchala do 40 ml izolačního média – A (Tab. 10) a homogenizovala 18 s při 15000 rpm (OV5, VELP Scientifica, Miláno, Itálie, s VSS2CCR2 dispergačním nástavcem). Izolační médium bylo předchlazené na 4 °C a všechny následující kroky jsem prováděla při této teplotě. Homogenát jsem precedila přes 8 vrstev gázy a centrifugovala 10 min při 6000x g. Pelet jsem resuspendovala skleněnou tyčinkou obalenou vatou v malém množství (odhadnuto podle množství peletu, většinou 1 ml) resuspendačního média – A (Tab. 10). Vyšší množství chloroplastů ve vzorku přispívá k jejich trvanlivosti. Vzorek jsem skladovala ve tmě ve 4 °C. Uvedený postup je v naší laboratoři zavedený již řadu let a osvědčil se pro různé druhy rostlin s lupenitými listy (Makovec 1975, Kočová 1980).

Na rozdíl od běžných listů jsou jehlice pro svou mechanickou tuhost, lignifikované buněčné stěny a obsah mnohých sekundárních metabolitů náročným materiálem na izolaci fotochemicky aktivních chloroplastů a vyžadují složitější postup. Naše laboratoř před několika lety po velkém množství metodických pokusů takový postup vyvinula (Holá et al. 2012) a s jistou modifikací jsem jej používala při svých pokusech (v rámci pokusných bloků 1 a 3) i já. Jehlice jsem nastříhala na krátké úseky (3–5 mm) a navážku 3 g jsem ihned nasypala do 50 ml předchlazeného izolačního média – B (Tab. 10) a homogenizovala 1 min při 18000 rpm (OV5, VELP Scientifica, Miláno, Itálie, s VSS2CCR2 dispergačním nástavcem). Homogenát jsem přecedila přes 8 vrstev gázy a centrifugovala 2 min při 200x g. Supernatant jsem pak centrifugovala 2 min při 500x g. Tyto dva kroky centrifugace slouží především k odstranění buněčných stěn a zbytků buněk, které by mohly negativně ovlivňovat následná měření. Supernatant z druhého kroku jsem pak znovu centrifugovala 10 min při 6000x g. Pelet jsem resuspendovala v resuspendačním médiu – B (Tab. 10). Vzorčky jsem skladovala stejně jako v předchozím případě. Všechny kroky jsem prováděla při 4 °C. Takto vyizolované chloroplasty jsou podle Hallovy (1972) nomenklatury II. třídy, typu C.

Tab. 10: Použitá média pro izolaci chloroplastů a měření jejich fotochemické aktivity.

Název média	Složení	Citace
Izolační médium – A (zároveň měřicí médium PS II – A)	0,4 M sacharóza, 50 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ (pH 7,0 upraveno HCl)	Kočová 1980
Izolační médium – B	0,4 M sacharóza, 50 mM Hepes, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 20% (w/v) PEG (pH 7,6 upraveno NaOH)	Holá et al. 2012
Resuspendační médium – A	0,4 M sacharóza, 50 mM Tris, 2 mM MgCl ₂ , 40% v/v glycerol (pH 7,0 upraveno HCl)	Kočová 1980
Resuspendační médium – B	1,2 M sacharóza, 50 mM Hepes (pH 6,9 upraveno NaOH)	Holá et al. 2012
Měřicí médium PSI	40 mM sacharóza, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , (pH 6,5 upraveno NaOH)	Holá et al. 2003
Měřicí médium PSII – B	0,4 M sacharóza, 50 mM Hepes-NaOH, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ (pH 6,9 upraveno NaOH)	Holá et al. 2012
Měřicí médium celý řetězec	50 mM tricin, 30 mM NaCl (pH 8,0 upraveno HCl)	Benešová 2014

4.2.3 Stanovení obsahu Chl v suspenzích chloroplastů

Do 5 ml 80% (v/v) acetonu jsem zamíchala 50 µl chloroplastové suspenze a centrifugovala 10 min. při 4000x g a 4 °C, abych odstranila případné nečistoty, které by mohly vadit při následujícím měření absorbance. Supernatant jsem rychle přelila do jiné zkumavky.

Spektrofotometrem (Anthelie Advanced 2, Secomam, Lyon, Francie) jsem stanovila absorbance (A_λ) na vlnových délkách (λ) 645 nm, 663 nm a 710 nm a vypočítala obsah Chl podle vzorce (Arnon 1949):

$$\text{Chl} = 20,2(A_{645} - A_{710}) + 8,02(A_{663} - A_{710}) \quad (6)$$

Výslednou hodnotu jsem pak vynásobila 100 (ředění vzorku).

4.2.4 Měření aktivity fotosyntetického elektron-transportního řetězce pomocí Clarkovy elektrody

Clarkovou elektrodou lze měřit rychlost reakce štěpení kyslíku na povrchu platinové katody. Za stálé teploty a míchání měřeného roztoku tedy lze stanovit koncentraci kyslíku ve vzorku. Clarkovou elektrodou (Theta'90, Praha, Česká republika) jsem měřila změny koncentrace kyslíku v suspenzích izolovaných chloroplastů, a to v uzavřené, speciálně konstruované komůrce (Bartoš et al. 1975) o objemu 5 ml. Teplota 25 °C byla udržována stálým prouděním vody prostory na stranách komůrky. Dále bylo do komůrky vloženo magnetické míchadlo. Abych mohla měřit aktivitu fotosyntetických procesů, osvětlovala jsem komůrku „bílým“ světlem o intenzitě $800 \mu\text{mol } \gamma \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Kalibraci systému jsem prováděla ráno a odpoledne před a po všech měřeních v daném dni. Kalibrace zahrnuje stanovení nulové hladiny rozpuštěného O_2 v destilované vodě tak, že komůrkou probublává N_2 nejméně 15 min než se výstup ustálí, a obdobně je stanovena hladina O_2 při probublávání vzduchem (počítá se s 20,96% koncentrací kyslíku ve vzduchu). Rozdíl odečtený na zapisovači je pak použit při výpočtu změn koncentrace O_2 ve vzorku (viz rovnice (7)).

Na elektron-transportní řetězec v tylakoidní membráně izolovaných chloroplastů lze působit mnohými chemikáliemi, které působí jako inhibitory přenosu, umělé donory nebo akceptory elektronů. Správnou kombinací těchto látek lze docílit stabilní fotosyntetické reakce a měřit aktivitu určité části elektron-transportního řetězce. V naší laboratoři byly v minulosti vypracovány vhodné postupy pro měření aktivity PS II, PS I a celého řetězce, které jsem používala i já. Aktivitu PS II jsem měřila následujícím postupem:

- 1) Do komůrky jsem dala 5 ml temperovaného (pokojová teplota) měřicího média PS II – A nebo B (Tab. 10), podle toho, zda šlo o vzorky izolované z lupenitých listů nebo jehlic.
- 2) Přidala jsem takový objem vzorku izolovaných chloroplastů, který odpovídal 7 μg Chl.
- 3) Nechala jsem komůrkou probublávat dusík tak dlouho, dokud se koncentrace kyslíku

nepřiblížila k nule.

- 4) Přidala jsem 57 μl zásobního roztoku FeCy rozpuštěného v destilované vodě tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 2 mM. FeCy působí jako umělý akceptor elektronů mimo jiné i z plastochinonu.
- 5) Přidala jsem 50 μl zásobního roztoku DMBQ rozpuštěného v 96% (v/v) ethanolu tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 1 mM. DMBQ působí jako umělý akceptor elektronů z plastochinonu.
- 6) Komůrku jsem rychle zavřela a nechala vzorek minutu ustálit ve tmě.
- 7) Zapnula jsem světlo a po další minutě jsem začala odečítat změny koncentrace O_2 po dobu 2 min.

Aktivitu PS I jsem měřila následujícím postupem:

- 1) Do komůrky jsem dala 4,45 ml temperovaného (pokojová teplota) měřicího média PS I (Tab. 10)
- 2) Přidala jsem 50 μl zásobního roztoku askorbátu sodného tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 10 mM. Askorbát sodný působí jako redukční činidlo – redukuje DCPIP.
- 3) Přidala jsem 250 μl zásobního roztoku DCPIP tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 0,25 mM. DCPIP působí jako umělý donor elektronů před PS I.
- 4) Přidala jsem 125 μl zásobního roztoku MeV tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 0,1 mM. MeV působí jako umělý akceptor elektronů především z železosírného centra F_B ve PS I a předává elektrony O_2 , takže uměle navozuje jeho spotřebu.
- 5) Přidala jsem 50 μl zásobního roztoku DCMU tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 0,01 mM. DCMU působí jako blokátor transportu elektronů z Q_B na plastocyanin a tedy zabranuje přenosu elektronů z PS II na PS I.
- 6) Přidala jsem 50 μl zásobního roztoku azidu sodného (NaN_3) tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 5 mM. NaN_3 působí jako inhibitor endogenních kataláz.
- 7) Přidala jsem takový objem vzorku izolovaných chloroplastů, jaký odpovídal 7 μg Chl.
- 8) Komůrku jsem rychle zavřela a nechala vzorek minutu ustálit ve tmě.
- 9) Zapnula jsem světlo a po další minutě jsem začala odečítat změny koncentrace O_2 po dobu 2 min.

Aktivitu celého řetězce jsem měřila následujícím postupem:

- 1) Do komůrky jsem dala 4,85 ml temperovaného (pokojová teplota) měřicího média

pro celý řetězec (Tab. 10).

- 2) Přidala jsem 125 μl zásobního roztoku MeV tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 0,1 mM.
- 3) Přidala jsem 50 μl zásobního roztoku NaN_3 tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 5 mM.
- 4) Přidala jsem takový objem vzorku izolovaných chloroplastů, který odpovídal 7 μg Chl.
- 5) Komůrku jsem rychle zavřela a nechala vzorek minutu ustálit ve tmě.
- 6) Zapnula jsem světlo a po další minutě jsem začala odečítat změny koncentrace O_2 po dobu 4 min. Při měření aktivity celého řetězce dochází k produkci i spotřebě kyslíku, kdy spotřeba mírně převažuje. Naměřené změny koncentrace byly poměrně malé a proto bylo vhodné pro větší přesnost čas tohoto měření prodloužit na 4 minuty.

Všechna tato měření jsem navíc prováděla i ve variantě s přidavkem 25 μl zásobního roztoku chloridu amonného (NH_4Cl) tak, že výsledná koncentrace v komůrce byla 5 mM. NH_4Cl zvyšuje propustnost tylakoidní membrány pro protony a rozpráhuje tedy elektron-transportní řetězec od fotofosforylace. Zásobní roztoky FeCy, DMBQ, MeV a askorbátu sodného jsem v každém pokusném dnu připravovala čerstvé, ostatní zásobní roztoky vydrží delší dobu.

Každé měření u každého vzorku jsem zopakovala nejméně dvakrát (nebo vícekrát, pokud se první dvě měření lišila více než o 10 %) a hodnoty těchto technických opakování jsem pak zprůměrovala.

Aktivitu všech reakcí přepočtenou na jednotku hmotnosti Chl a jednotku času jsem vypočítala podle vzorce:

$$\text{Aktivita}(\text{Chl}) = \frac{0,258 \cdot \text{změřeno} \cdot 10^6}{\text{kalibrace} \cdot t \cdot c} \quad [\text{mmol O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (7)$$

kde 0,258 je konstanta rozpustnosti kyslíku při atmosferickém tlaku a teplotě 25 °C, *kalibrace* znamená rozdíl mezi naměřenými hodnotami při probublávání dusíkem a vzduchem v arbitrárních jednotkách – dílcích na stupnici zapisovače (průměrná hodnota pro ranní a odpolední kalibraci), *změřeno* znamená posun zapisovače za příslušnou dobu měření vzorku, opět v arbitrárních jednotkách, *t* je doba měření (120 nebo 240 s) a *c* je koncentrace Chl v komůrce [mg/ml]. Všechny tři aktivity jsem v pokusném bloku 1 také přepočítala na jednotku hmotnosti sušiny a jednotku času podle vzorce:

$$\text{Aktivita}(\text{S}) = \text{Aktivita}(\text{Chl}) \cdot \text{Chl} \cdot (a+b) \cdot \text{S} \quad [\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (8)$$

kde Chl(a+b) je součet obsahu Chl *a* a *b* v jehlicích (viz níže) a S je hmotnost sušiny v jehlicích (také viz níže).

4.2.5 Stanovení hmotnosti sušiny a obsahu fotosyntetických pigmentů v jehlicích

V případě pokusného bloku 1 byly pro každý směsný vzorek tři větviček naváženy 2x3 hromádky krátkých (2–4 mm) segmentů jehlic o hmotnosti cca 0,1 g. Měla jsem tedy 18 hromádek pro každý strom. Polovina byla určena pro stanovení hmotnosti sušiny a druhá polovina pro stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů. Hromádky určené pro stanovení sušiny jsem sušila 14 dní při 80 °C (UM500, Memmert, Schwabach, Německo) a následně zvážila na mikrováhách. Hromádky určené pro stanovení obsahu pigmentů jsem přesypala do zkumavek, zalila 10 ml N,N-dimethylformamidu (DMF), překryla parafilmem a alobalem a nechala extrahovat 14 dní v lednici. Každý den jsem všechny vzorky promíchala na laboratorní třepačce. Spektrofotometrem (Anthelie Advanced 2, Secomam, Lyon, Francie) jsem poté stanovila absorbance (A_λ) extraktu na vlnových délkách (λ) 647 nm, 664 nm, 710 nm a 480 nm a vypočítala obsahy Chl *a*, Chl *b* a celkových Kar podle vzorců (Wellburn 1994):

$$\text{Chl } a = 11,65 \cdot (A_{664} - A_{710}) - 2,69 \cdot (A_{647} - A_{710}) \text{ [mg/ml]} \quad (9)$$

$$\text{Chl } b = 20,81 (A_{647} - A_{710}) - 4,53 (A_{664} - A_{710}) \text{ [mg/ml]} \quad (10)$$

$$\text{Kar} = [1000 (A_{480} - A_{710}) - 0,89 \cdot \text{Chl } a - 52,02 \cdot \text{Chl } b] / 245 \text{ [mg/ml]} \quad (11)$$

Výsledné hodnoty z těchto vzorců jsem pak ještě vynásobila 10, abych odstranila faktor ředění vzorku.

V případě pokusného bloku 2 bylo vzorků podstatně více, proto bylo vhodnější jiné uspořádání. Pro stanovení hmotnosti sušiny byly předem zvážené plastové mikrozkušavky (1,5 ml) naplněny nastříhanými jehlicemi z jednotlivých stromů. Pro stanovení obsahu pigmentů byly předem zvážené mikrozkušavky naplněny nadrobno nastříhanými středními částmi jehlic do úrovně o něco nižší, než odpovídalo rysce 1 ml. Všechny zkumavky byly poté zváženy a uchovány při -20 °C pro pozdější zpracování. Předzmrázení narušilo buňky v jehlicích, což mi umožnilo zkrátit dobu sušení i extrakce na 7 dní. Protože jehlic pro stanovení obsahu pigmentu bylo výrazně větší množství než v pokusném bloku 1, musela jsem extrakt před měřením ředit DMF nejméně 1:2, abych dosáhla spolehlivě měřitelné koncentrace pigmentů. Podle toho pak byly upraveny výpočty konečné koncentrace pigmentů ve vzorku.

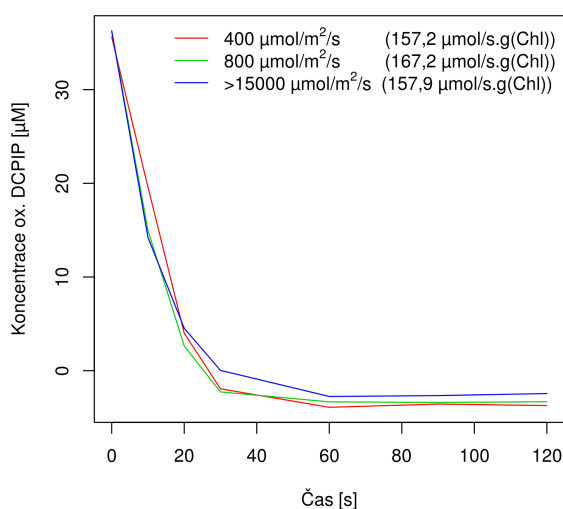
4.2.6 Spektrofotometrické stanovení rychlosti redukce DCPIP

Chemickou látku DCPIP lze použít jako umělý akceptor elektronů. DCPIP je ve své oxidované formě modrý a ve své redukované formě čirý. Tuto změnu barvy lze v suspenzích izolovaných chloroplastů sledovat spektrofotometricky na vlnové délce 600 nm (Pacholíkova 2009) či 590 nm (Eastman et. al 1998). V naší laboratoři tato metoda nebyla nikdy předtím použita, proto jsem na základě literatury navrhla pro pokusný blok 3 u nás proveditelný protokol a provedla řadu experimentů s cílem metodu vyzkoušet a optimalizovat. Zvolila jsem metodu, jejíž technické provedení bylo odvozeno především z prací Tůmová (2001), Nováková (2003), Pacholíkova (2009). Na počátku jsem nejprve musela vyřešit některé záležitosti spíše technického charakteru, které popisují v této kapitole. Většina pokusů souvisejících s touto metodou měření a s třetím cílem mé diplomové práce je však uvedena v kapitole 5.3. Obecný postup měření byl následující:

- 1) Do dvou kyvet (označených „zero“ a „DCPIP“) jsem dala po 2 ml (minus množství ostatních přidávaných složek) měřicího média. To bylo vybráno na základě metodických pokusů (viz dále).
- 2) Přidala jsem takový objem vzorku izolovaných chloroplastů, který odpovídal předem určenému množství Chl (zvoleno na základě metodických pokusů popsanych dále).
- 3) Do kyvety označené „DCPIP“ jsem přidala 40 (v počátečních pokusech) nebo 20 μl zásobního roztoku DCPIP tak, že výsledná koncentrace v kyvetě byla 100 nebo 50 μM (a do „zero“ 20 μl destilované vody). Koncentraci DCPIP jsem v průběhu metodických pokusů posléze snížila na polovinu, protože směs v kyvetě byla příliš tmavá a absorbance byla špatně měřitelná.
- 4) Suspenzi jsem špičkou automatické pipety, kterou jsem přidávala poslední složku, zamíchala a co nejrychleji jsem vzorky zavřela v měřicím prostoru spektrofotometru (Anthelie Advanced 2, Secomam, Lyon, Francie).
- 5) Vynulovala jsem přístroj na vzorek v kyvetě „zero“ a změřila v kyvetě „DCPIP“ absorbanci DCPIP ($\lambda=590\text{ nm}$) v čase $t = 0\text{ s}$, kterou jsem převedla na koncentraci oxidovaného DCPIP (molární absorpční koeficient $\epsilon=1,6 \cdot 10^4\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- 6) Kyvetu „DCPIP“ jsem umístila před diaprojektor a vystavila ji „bílému“ světlu o zvolené intenzitě (viz dále) po dobu 10 s.
- 7) Opakováním kroků 5) a 6) jsem změřila koncentraci oxidovaného DCPIP v časech $t = 10, 20, 30, 60, 90$ a 120 s. Z naměřených hodnot jsem pak odvodila rychlost

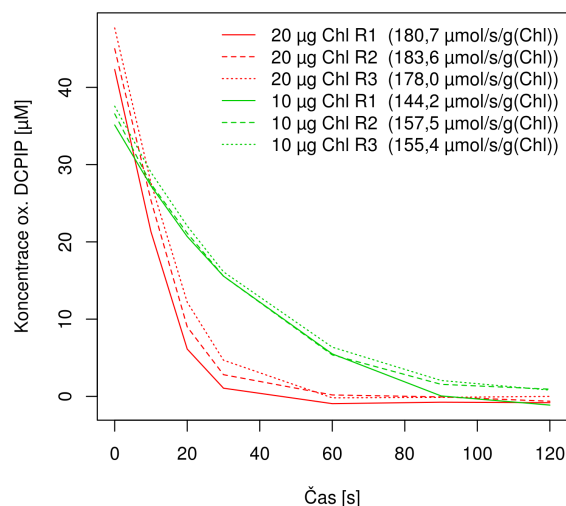
redukce DCPIP ze směrnice lineární regrese závislosti množství oxidovaného DCPIP na čase během prvních 20 s, které u většiny měření představovaly lineární část reakce.

V prvních metodických pokusech jsem vyzkoušela závislost této metody na intenzitě záření. Použila jsem 100 μM výslednou koncentraci DCPIP, měřící medium PS II – A (viz Tab. 10) a množství chloroplastové suspenze *P. vulgaris* odpovídající 20 μg Chl. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 15. Metoda se v rozsahu použitých intenzit světla nezdála na intenzitě světla závislá. Použité intenzity byly pravděpodobně saturační. Pro všechny následující pokusy jsem zvolila intenzitu záření 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, což odpovídalo intenzitě použité při polarografických měřeních.



Obr. 15: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro různé intenzity záření. V závorkách jsou uvedeny odhady rychlosti redukce DCPIP (fotochemické aktivity) získané ze směrnice lineární regrese v prvních 20 s.

V druhém metodickém pokusu jsem vyzkoušela citlivost metody na množství chloroplastů v kyvetě. Do kyvety jsem dala vzorky různě koncentrovaných chloroplastových suspenzí, odpovídající 10 nebo 20 μg Chl. Výsledky tohoto pokusu znázorňuje Obr. 16. Jako vhodnější se ukázalo použití menšího množství Chl (10 μg), protože koncentrovanější suspenze velice rychle vypotřebovala většinu oxidovaného DCPIP, což nebylo příznivé pro odhad rychlosti redukce DCPIP z lineární části křivky. Abych pozdější pokusy sjednotila s pokusy založenými na polarografickém měření fotochemické aktivity chloroplastů, rozhodla jsem se v pokusech, kde byly použity obě tyto metody nakonec použít objemy vzorků reprezentující 7 μg Chl.

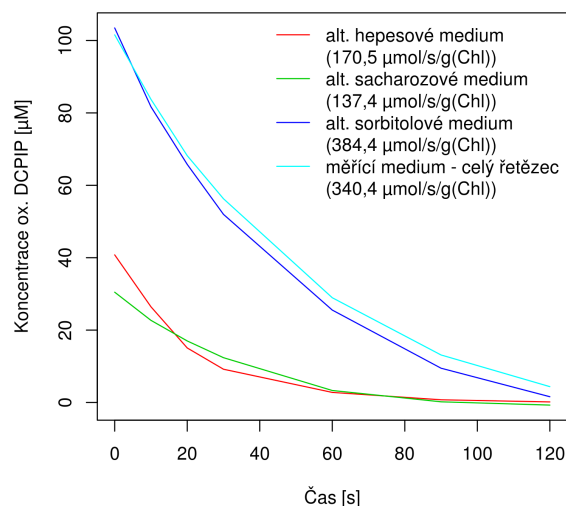


Obr. 16: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro různé množství chloroplastů v kyvetě. Označení R1, R2 a R3 odpovídají různým ředěním chloroplastové suspenze. R1 byla suspenze o koncentraci 0,447 g(Chl)/l, R2 0,251 g(Chl)/l, R3 0,120 g(Chl)/l. V závorkách jsou uvedeny odhady rychlosti redukce DCPIP (fotochemické aktivity) získané ze směrnice lineární regrese v prvních 20 s.

Ve třetím metodickém pokusu jsem vyzkoušela různá měřící media použitá různými autory pro měření redukce DCPIP (Tab. 11). Zařadila jsem také nejjednodušší v naší laboratoři používané měřící medium pro celý řetězec (Tab 10). Výsledky z tohoto pokusu jsou zobrazené na Obr. 17. Z médií, ve kterých chloroplastová suspenze vykazovala větší fotochemickou aktivitu (tj. alternativní sorbitolové medium a měřící medium pro celý řetězec), jsem pro další pokusy zvolila měřící medium pro celý řetězec, jehož složení bylo jednodušší.

Tab. 11: Alternativní měřící média.

Název média	Složení	Citace
Alternativní hepesové měřící médium	40 mM HEPES, 10 mM KCl	Tůmová 2001, Nováková 2003, Pacholíkova 2009
Alternativní sacharozové měřící médium	250 mM sacharóza, 30 mM H ₂ KO ₄ P	Vernon et Shaw 1969
Alternativní sorbitolové médium	100 mM sorbitol, 5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 1 mM KCN, 15 mM Tricin	Castelo-Branco et al. 2008



Obr. 17: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro různá měřící media. V závorkách jsou uvedeny odhady rychlosti redukce DCPIP (fotochemické aktivity) získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s.

4.2.7 Měření spektrální reflektance

Reflektance (R_λ) pro danou vlnovou délku (λ) je definována jako poměr intenzity odraženého světla (L_λ) k intenzitě osvětlení (E_λ).

$$R_\lambda = \frac{L_\lambda}{E_\lambda} \quad (12)$$

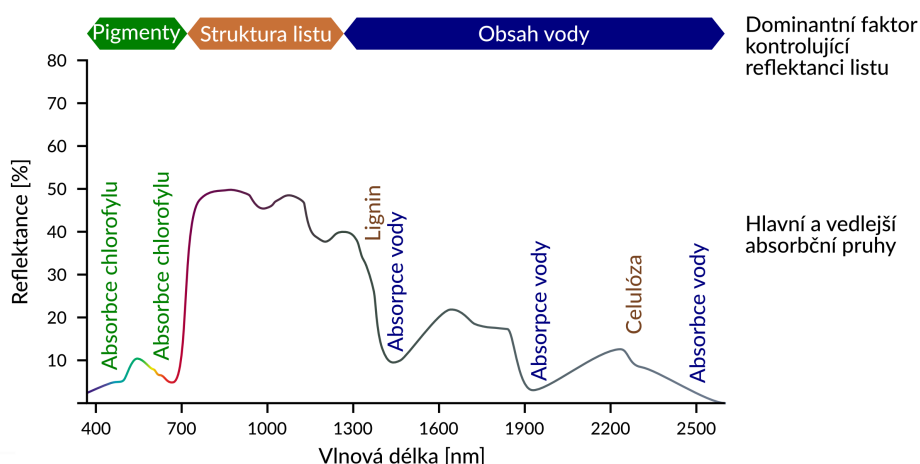
Spektrum reflektance jsem měřila přístrojem FieldSpec 4 Wide-Res (Analytical Spectral Devices Inc., Boulder, Colorado, USA) s připojenou kontaktní sondou. Přístroj měří spektrum v rozsahu vlnových délek 350–2500 nm třemi detektory měřícími v různých vlnových délkách. Přesnost přístroje je 3 nm v oblasti okolo 700 nm a 30 nm v oblasti 1400–2100 nm. Kontaktní sonda obsahuje snímací okénko o průměru 10 mm, které je třeba přiložit na prostor zaplněný jehlicemi narovnanými jedním směrem na maximálně černé podložce (matný černý autolak). Aby došlo k vyloučení vlivu konkrétního uspořádání jehlic pod sondou, měřila jsem každý vzorek 5x a mezi jednotlivými měřeními jsem jehlice znovu přeuspořádala. Výsledné spektrum vzorku jsem stanovila jako souhrn mediánů vypočítaných z těchto 5 opakování pro každou vlnovou délku.

Kalibrace přístroje (stanovení E_λ) se provádí přiložením sondy na maximálně odrazivý povrch dodávaný výrobcem. Dále je pro kalibraci nutné měření v situaci, kdy do přístroje nepřichází žádné světlo, tzv. „dark current“. Protože spektrum zdroje světla a další vlastnosti přístroje se mohou měnit s jeho teplotou, prováděla jsem měření (podle návodu) až půl hodiny po jeho zapnutí a po změření každých čtyř vzorků jsem provedla novou kalibraci. Měření

„dark current“ jsem prováděla před každým novým vzorkem.

Přístroj umožňuje nastavení počtu vnitřních opakovaných měření pro minimalizaci šumu, které se navenek projeví jako prodloužení doby jednoho měření. Pro kalibraci bylo zvoleno nastavení 50x. V případě vzorku je situace složitější. Silné světlo vycházející z okénka sondy ohřívá vzorek a pokud by bylo zvoleno příliš dlouhé měření, mohlo by dojít k ovlivnění výsledku. Z dřívějších laboratorních zkušeností Laboratoře ekofyologické anatomie rostlin Přf UK vychází vhodné nastavení 15x.

Ze spektra reflektance (Obr. 18) je možné získat informace o obsahu fotosyntetických pigmentů, vody a dalších látek v listech. V literatuře se nachází nepřehledné množství empiricky stanovených indexů k tomuto používaných. Pro měření na borovicích (pokusný blok 2) jsem vybrala takové indexy, které byly již jinými autory úspěšně použity na úrovni jehlic jehličnanů, preferenčně právě u borovice (Tab. 12). Protože jsem nenašla žádné indexy, které by uspokojivě odrážely obsah vody u jehličnanů, seznam jsem doplnila o dva indexy známé z literatury, kde byly vyzkoušené na topolu.



Obr. 18: Shéma typického spektra reflektance listu/jehlice. Převzato a upraveno podle Keyworth et al. (2009).

Tab. 12: Seznam použitých reflektančních indexů, jejich vzorců a kritérií, podle kterých byly vybrány.

Indexy korelující s obsahem Chl (korelační koeficient $R^2 > 0,55$) na úrovni jehlic u <i>Picea mariana</i> (Mill.) Britton, Sterns, Poggenb (Croft et al. 2014)			
Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Modified NDVI	MNDVI8	$(R_{755} - R_{730}) / (R_{755} + R_{730})$	Mutanga et Skidmore (2004)
Datt 99	Datt99	$(R_{850} - R_{710}) / (R_{850} - R_{680})$	Datt (1999)
Maccioni 2001	Macc01	$(R_{780} - R_{710}) / (R_{780} - R_{680})$	Maccioni et al. (2001)
Vogelmann index	VOG1	R_{740} / R_{720}	Vogelmann et al. (1993)

Tab. 12 – Pokračování.

Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Red edge inflection point	REIP	$700 + 40 \frac{(R_{670} + R_{780})/2 - R_{700}}{R_{740} - R_{700}}$	Guyot et Baret (1988)
Zarco and Miller	ZM	R_{750}/R_{710}	Zarco-Tejada et al. (2001)
Normalized difference VI – red edge	NDVI _{re}	$(R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705})$	Gitelson et Merzlyak (1994)
Revised OSAVI	ROSAVI	$1,16(R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705} + 0,16)$	Wu et al. (2008)
Indexy korelující s obsahem Chl (korelační koeficient $R^2 \geq 0,80$) na úrovni jehlic u <i>Pinus sylvestris</i> L. (Hernández-Clemente et al. 2012)			
Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Pigment-specific simple ratio	PSSRa	R_{800}/R_{680}	Blackburn (1998)
Pigment-specific simple ratio	PSSRb	R_{800}/R_{635}	Blackburn (1998)
Chlorophyll index red edge	CI _{red edge}	R_{750}/R_{710}	Haboudane et al. (2002), Meggio et al. (2010)
Reflectance band ratio index	DattNIR CabCar	$R_{860}/R_{550} * R_{708}$	Datt (1998)
Transformed Cab absorption in reflectance index / Optimized soil-adjusted vegetation index	TCARI/ OSAVI	$\frac{3 \left((R_{700} - R_{670}) - 0,2 \frac{(R_{700} - R_{550})}{(R_{700}/R_{670})} \right)}{1,16(R_{800} - R_{670}) / (R_{800} + R_{670} + 0,16)}$	Haboudane et al. (2002), Meggio et al. (2010)
Indexy korelující s poměrem Kar a Chl (korelační koeficient $R^2 \geq 0,80$) na úrovni jehlic u <i>Pinus sylvestris</i> L. (Hernández-Clemente et al. 2012)			
Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Simple ratio	SR550/570	R_{550}/R_{570}	-
Simple ratio	SR540/570	R_{540}/R_{570}	-
Simple ratio	SR550/560	R_{550}/R_{560}	-
Simple ratio	SR530/570	R_{530}/R_{570}	-
Simple ratio	SR540/560	R_{540}/R_{560}	-
Plant sensing reflectance index	PSRI	$R_{672} / (R_{550} + 3R_{708})$	Merzlyak et al. (1999)
Photochemical reflectance index	PRI	$(R_{570} - R_{530}) / (R_{570} + R_{530})$	Gamon et al. (1992)
Indexy korelující s obsahem Kar (korelační koeficient $R^2 \geq 0,80$) na úrovni jehlic u <i>Pinus sylvestris</i> L. (Hernández-Clemente et al. 2012)			
Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Simple ratio	SR515/560	R_{515}/R_{560}	-

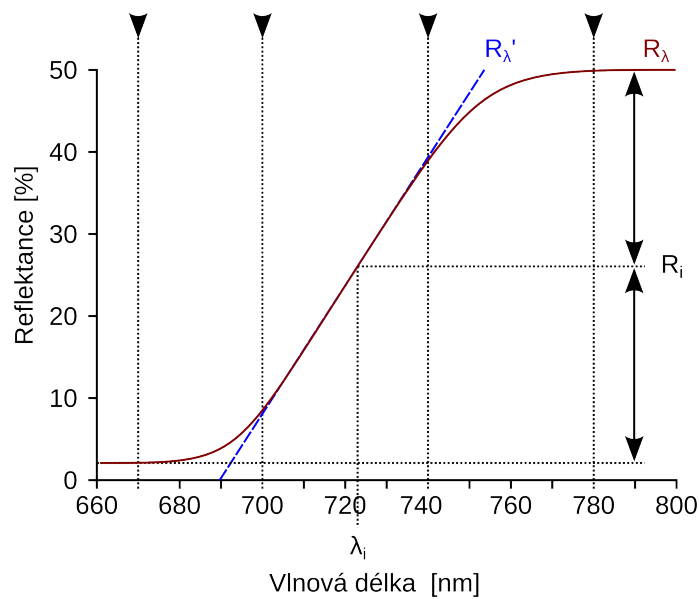
Tab. 12 – Pokračování.

Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Modified photochemical reflectance index	PRIm1	$(R_{515} - R_{530}) / (R_{515} + R_{530})$	Hernández-Clemente et al. (2011)
Carotenoid concentration index	CRI 500	$1/R_{515} - 1/R_{550}$	Gitelson et al. (2003, 2006)
Carotenoid concentration index	CRI 700	$1/R_{515} - 1/R_{700}$	Gitelson et al. (2003, 2006)
Indexy korelující s vodním potenciálem (korelační koeficient $R^2 \geq 0,40$) a relativním obsahem vody (korelační koeficient $R^2 \geq 0,55$) na úrovni jehlic u <i>Pinus edulis</i> Engelm. (Stimson et al. 2005)			
Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Normalized Difference Water Index	NDWI	$(R_{860} - R_{1240}) / (R_{860} + R_{1240})$	Gao 1996
Normalized Difference Vegetation Index	NDVI	$(R_{860} - R_{690}) / (R_{860} + R_{690})$	Penuelas et al. 1993
Absorption index 970 and 1200 nm	AI970	$1 - \frac{\text{plocha nad křivkou } R_{970} \text{ až } R_{1200}}{\text{plocha nad úsečkou } R_{970} \text{ až } R_{1200}}$	-
Indexy korelující s relativním obsahem vody (korelační koeficient $R^2 \geq 0,80$) na úrovni listu u <i>Populus</i> spp. (Eitel et al. 2006)			
Název indexu	Zkratka	Výpočet	Původní citace
Maximum difference water index	MDWI	$\frac{R_{\max 1500-1750} - R_{\min 1500-1750}}{R_{\max 1500-1750} + R_{\min 1500-1750}}$	-
Water index	WI	R_{900} / R_{970}	Penuelas et al. 1997

Za bližší popis stojí jeden z nejpoužívanějších indexů pro stanovení obsahu Chl, tzv. REIP. Reflektuje polohu „red edge“ neboli prudkého nárůstu reflektance v oblasti vlnových délek 670–750 nm. Tato „hrana“ se u materiálu s nízkým obsahem Chl posouvá směrem k modré, naopak u materiálu s vysokým obsahem Chl se posouvá směrem k vyšším vlnovým délkám. Pu et al. (2003) popisují čtyři principiálně odlišné matematické metody, jak ho spočítat. Vybrala jsem dva nejjednodušší a nejčastěji používané postupy. Prvním je určení vlnové délky inflexního bodu křivky spektra, tedy maxima první derivace. Tato metoda je ze všech nejcitlivější k lokálním odchylkám. K získání první derivace jsem použila v programu R matematickou metodu „Savitzky-Golay filtering“, která proloží každý bod a okno okolních bodů vybrané velikosti polynomem vybraného řádu. Zvolila jsem okno 7 bodů a polynom 3. řádu. Toto nastavení dostatečně vyhladilo má data. Parametr získaný touto metodou budu nadále označovat zkratkou REIPderiv.

Druhý způsob výpočtu pochází původně z Guyot et Baret (1988) a předpokládá, že nárůst

reflektance je v oblasti 700–740 nm lineární (Obr. 19).



Obr. 19: Princip výpočtu REIP pomocí čtyř vlnových délek – vyznačené svislé čáry. R_λ – skutečné spektrum reflektance. R_λ' – lineární aproximace reflektance. Převzato a upraveno z Guyot a Baret (1988)

Nejdříve je stanovena rovnice přímky procházející body R_{700} a R_{740} .

$$R_\lambda' = \frac{R_{740} - R_{700}}{40} \lambda + R_{700} - 700 \frac{R_{740} - R_{700}}{40} \quad (13)$$

Poté je zvolena reflektance „inflexního bodu“ jakožto střed mezi dvěma hodnotami, které jsou bezpečně daleko před a za „red edge“, R_{670} a R_{780} .

$$R_i' = \frac{R_{670} + R_{780}}{2} \quad (14)$$

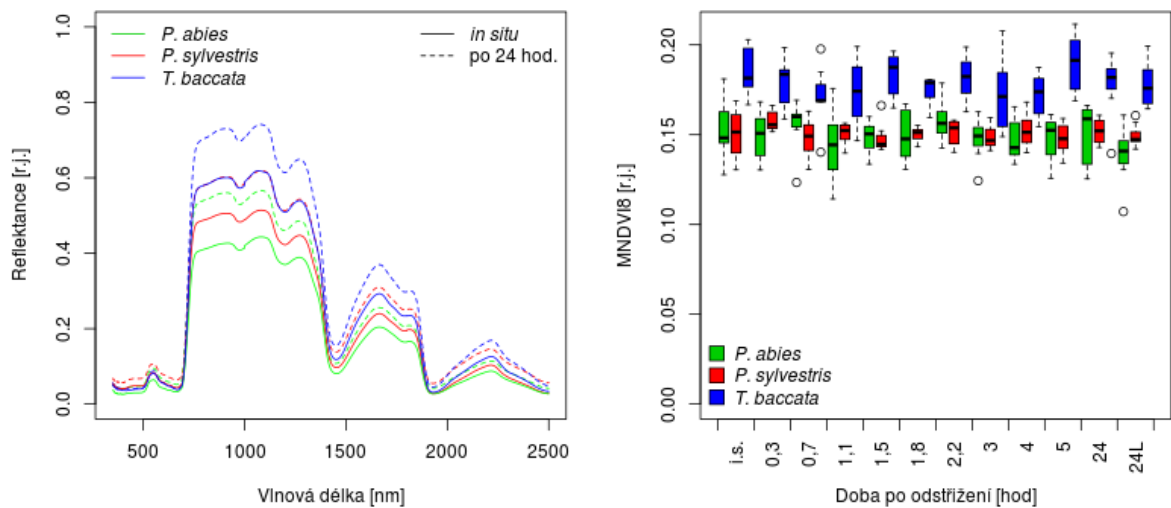
Dosazením R_i' ze vzorce (14) za R_λ' v rovnici (13), a následnými úpravami lze získat vzorec pro vlnovou délku „inflexního bodu“.

$$\lambda_i = 700 + 40 \frac{((R_{670} + R_{780})/2) - R_{700}}{R_{740} - R_{700}} \quad (15)$$

Takto získaný parametr budu v následujícím textu označovat REIP-4body. Z výpočtu je zřejmé, že REIP-4body je spíše středem souměrnosti nežli inflexním bodem, přestože je tak tradičně nazýván. Tento parametr je nejméně citlivý vůči lokálním odchýlkám v okolí inflexního bodu (Pu et al., 2003).

Abych ověřila, že budu moci měřit reflektanci v pokusném bloku 2 následující den po odběru větví, provedla jsem podobně jako u fluorescence OJIP nejprve krátký metodický pokus. Na třech druhích jehličnanů v Brožkově genetické zahradě jsem nejprve změřila

reflektanční spektrum jehlic *in situ* u osmi větviček, poté jsem ráno v 8:30 odstříhla 11 skupin koncových větviček (po 8 větvičkách), uskladnila je ve venkovním prostředí na určené doby a změřila reflektanci v laboratorním prostředí. Protože měření reflektance je časově náročnější než měření OJIP křivky fluorescence Chl, měřila jsem prvních několik skupin v intervalech tak krátkých, jak to rychlost měření umožňovala. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v Obr. 20 a Tab. 13. Vzhledem k tomu, že i v případech kdy analýza rozptylu ukázala statisticky průkazné rozdíly mezi skupinami, nebyla směrnice regresní přímky reflektující změnu příslušného indexu v čase od odstřížení většinou statisticky průkazně odlišná od nuly (a tam, kde se od nuly průkazně lišila, byla její hodnota velmi nízká – s výjimkou DattNIR CabCar indexu u smrku), usoudila jsem, že měření reflektance 24 hod po odebrání větví mohou v rámci pokusného bloku 2 skutečně použít.



Obr. 20: Vlevo vybraná průměrná spektra reflektance z metodického pokusu zaměřeného na zjištění vlivu odstřížení a délky uskladnění větvičky u tří druhů jehličnanů. Vpravo závislost vybraného reflektančního indexu na době od odstřížení. i.s. – *in situ*. Skupina větviček 24L byla uskladněna 24 hod v lednici.

Tab. 13: Hodnoty reflektančních indexů v metodickém pokusu zaměřeném na zjištění vlivu odstřížení a délku uskladnění větvičky u tří druhů jehličnanů. Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (p) z jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) testující vliv dob od odstřížení. V případě signifikantního výsledku testu ANOVA jsem stanovila směrnici regresní přímky reflektující změnu indexu v čase od odstřížení. Zvýrazněné hodnoty směrnice se statisticky významně liší od nuly.

Druh	P. abies		P. sylvestris		T. baccata	
	p	Směr. [/hod]	p	Směr. [/hod]	p	Směr. [/hod]
MNDVI8	0,512		0,572		0,269	
Datt99	0,193		0,423		0,271	
Macc01	0,211		0,522		0,282	
VOG1	0,121		0,059		0,307	
REIPderiv	0,233		0,007	-0,0015	0,025	-0,0027

Tab. 13 – Pokračování.

Druh	P. abies		P. sylvestris		T. baccata	
	p	Směr. [/hod]	p	Směr. [/hod]	p	Směr. [/hod]
REIP-4body	0,640		0,048	0,0067	0,190	
ZM	0,149		0,005	-0,0023	0,339	
NDVIre	0,194		<0,001	-0,0004	0,324	
ROSAVI	0,493		0,052		0,091	
PSSRa	0,329		<0,001	-0,0268	0,234	
PSSRb	0,226		0,001	-0,0254	0,065	
CIred edge	0,149		0,005	-0,0023	0,339	
DattNIR CabCar	<0,001	-0,4108	<0,001	-0,1110	0,276	
TCARI/ OSAVI	<0,001	0,0011	0,002	0,0001	0,156	
SR550/570	0,096		0,020	-0,0004	0,008	0,0011
SR540/570	0,082		0,050	-0,0003	0,006	0,0012
SR550/560	0,058		0,014	-0,0001	0,074	
SR530/570	0,119		0,370		0,013	0,0012
SR540/560	0,095		0,083		0,160	
PSRI	0,316		<0,001	0,0002	0,254	
PRI	0,121		0,370		0,014	-0,0006
SR515/560	0,287		0,002	0,0004	0,531	
PRIm1	0,126		0,005	0,0003	0,256	
CRI 500	<0,001	-0,0648	<0,001	-0,0192	0,489	
CRI 700	<0,001	-0,0622	<0,001	-0,0187	0,324	
NDWI	<0,001	0,0003	0,006	-0,0002	<0,001	-0,0004
NDVI	0,346		<0,001	-0,0004	0,090	
AI970	<0,001	-0,0053	<0,001	-0,0051	0,632	
MDWI	0,603		<0,001	-0,0006	0,007	-0,0009
WI	0,345		0,036	-0,0001	<0,001	-0,0003

4.3 Statistická analýza

4.3.1 Pokusný blok 1

Míru korelace mezi fluorescenčními indexy a hodnotami fotochemické aktivity jsem stanovila v programu R příkazem *corr.test()* z balíčku *psych*. Tento příkaz umožňuje stanovit Pearsonovy korelační koeficienty mezi dvěma sadami parametrů a zároveň stanovit hladiny jejich statistické významnosti upravené s ohledem na opakované testování. Jako data jsem použila průměry pro jednotlivé druhy.

4.3.2 Pokusný blok 2

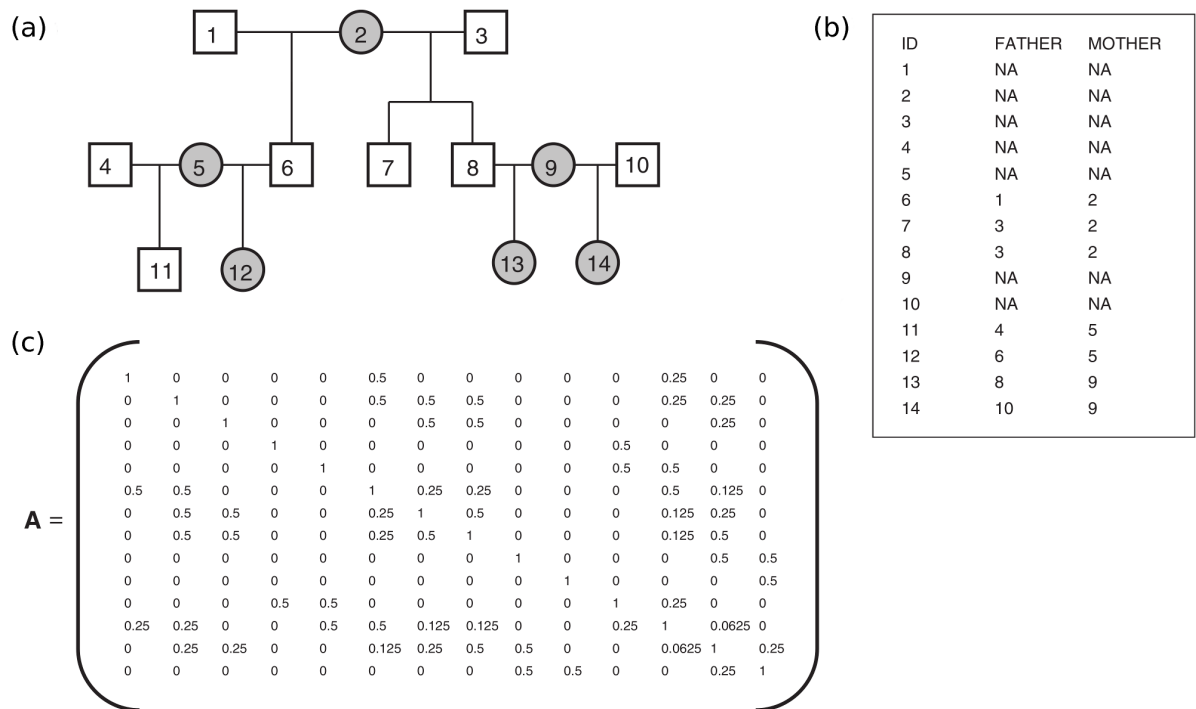
Pro analýzu heritability (aditivní složky genetické variability fenotypového znaku) všech stanovených parametrů jsem použila takzvaný „animal model“ patřící do rodiny smíšených modelů (mixed models). Úvod do tohoto modelu a rady pro jeho praktické použití jsou popsány ve Wilson et al. (2010) a podrobnější matematický popis například v jedné z řady původních prací (Shaw 1987). Model pracuje s příbuzenskou maticí, kterou je možné odvodit ze známého rodokmenu (viz Obr. 21). Předpokládá korelaci ve fenotypových znacích mezi příbuznými jedinci a na základě míry této korelace odhaduje (netriviálním způsobem) šlechtitelskou hodnotu („breeding value“) jedinců. Šlechtitelská hodnota je souhrnný vliv všech na daný znak aditivně působících genů daného jedince. V rámci modelu je s „breeding value“ nakládáno jako s náhodným efektem.

Matematických metod, pomocí kterých použité programy hledají optimální „breeding value“, existuje několik. Nejčastěji se používá metoda restringované maximální věrohodnosti REML (Restricted maximum likelihood). Tato metoda každé sadě parametrů „breeding value“ přiřadí hodnotu věrohodnosti (likelihood), která vyjadřuje, s jakou pravděpodobností by za dané sady parametrů vznikly naměřené fenotypy. Program pak sérií iterativních kroků hledá takové parametry „breeding value“, které mají věrohodnost nejvyšší.

U „animal modelu“ je třeba předem odfiltrovat jiné zdroje vnitřní korelace dat. Například prostorová blízkost příbuzných jedinců, a tedy jejich zvýšená podobnost, vede k nadhodnocení heritability (Wilson et al. 2010). Do modelu aplikovaného na data z borovic jsem proto zahrнула dva polynomy druhého stupně zohledňující vliv řádky a sloupce, ve které byl strom zasazen. Statistickou analýzu jsem prováděla ve spolupráci s Ing. Janem Stejskalem, Ph.D. z Fakulty lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze. Příbuzenskou matici jsem sestavila v programu R příkazem *makeA()* z balíčku *nadiv*. Koeficient heritability jsem vypočítala příkazem *lmeKin()* z balíčku *coxme*. Jan Stejskal zároveň provedl hlubší analýzu heritability fluorescenčních parametrů ve specializovaném komerčním šlechtitelském programu ASReml. Srovnala jsem 36 odpovídajících odhadů heritability z obou programů (holý model heritability bez zahrnutí polynomiální regrese pro každou plochu zvlášť, data neuvádím). Rozdíly mezi nimi byly v průměru 1 % a v žádném z parametrů nebyly větší než 5 %.

Dále jsem stanovila Pearsonovy korelační koeficienty kvantifikující korelace mezi skupinami reflektančních indexů a vybranými skupinami parametrů charakterizujících obsah

fotosyntetických pigmentů zjištěný po jejich extrakci z jehlic, obsah vody v jehlicích a vybrané fluorescenční parametry. Tuto analýzu jsem prováděla podobně jako v pokusném bloku 1 příkazem `corr.test()` v programu R.



Obr. 21: Ilustrace tvorby příbuzenské matice pro „animal model“. (a) Příklad rodomene se 14 jedinci. (b) Typická struktura souboru vkládaného do statistického programu. V prvním sloupci jsou unikátní identifikátory jedinců, v dalších unikátní identifikátory jejich otců a matek. (c) Vygenerovaná příbuzenská matice. Jednotlivé řádky i sloupce náležejí jedincům 1–14. Na diagonále jsou jedničky, protože jedinec si je absolutně příbuzný sám se sebou. Převzato a upraveno z Wilson et al. (2010).

4.3.3 Pokusný blok 3

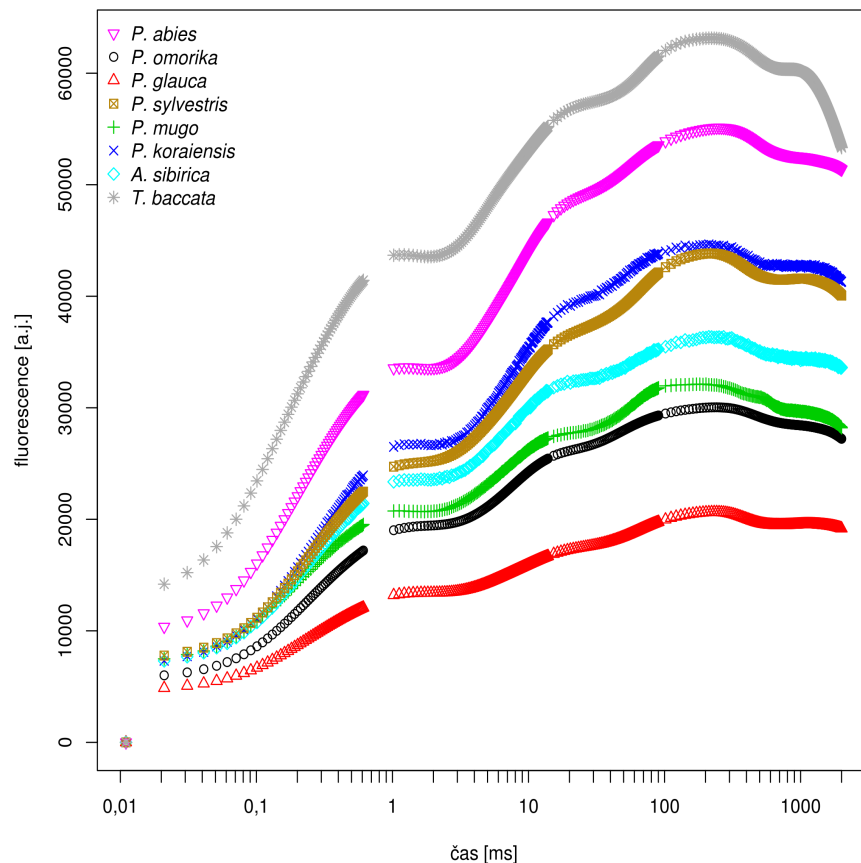
Tento blok byl zaměřen na optimalizaci metodiky a většinou nebyla potřeba speciální statistická analýza. Naměřené hodnoty jsem tedy charakterizovala pomocí průměrů a směrodatných odchylek z technických opakování.

5 Výsledky

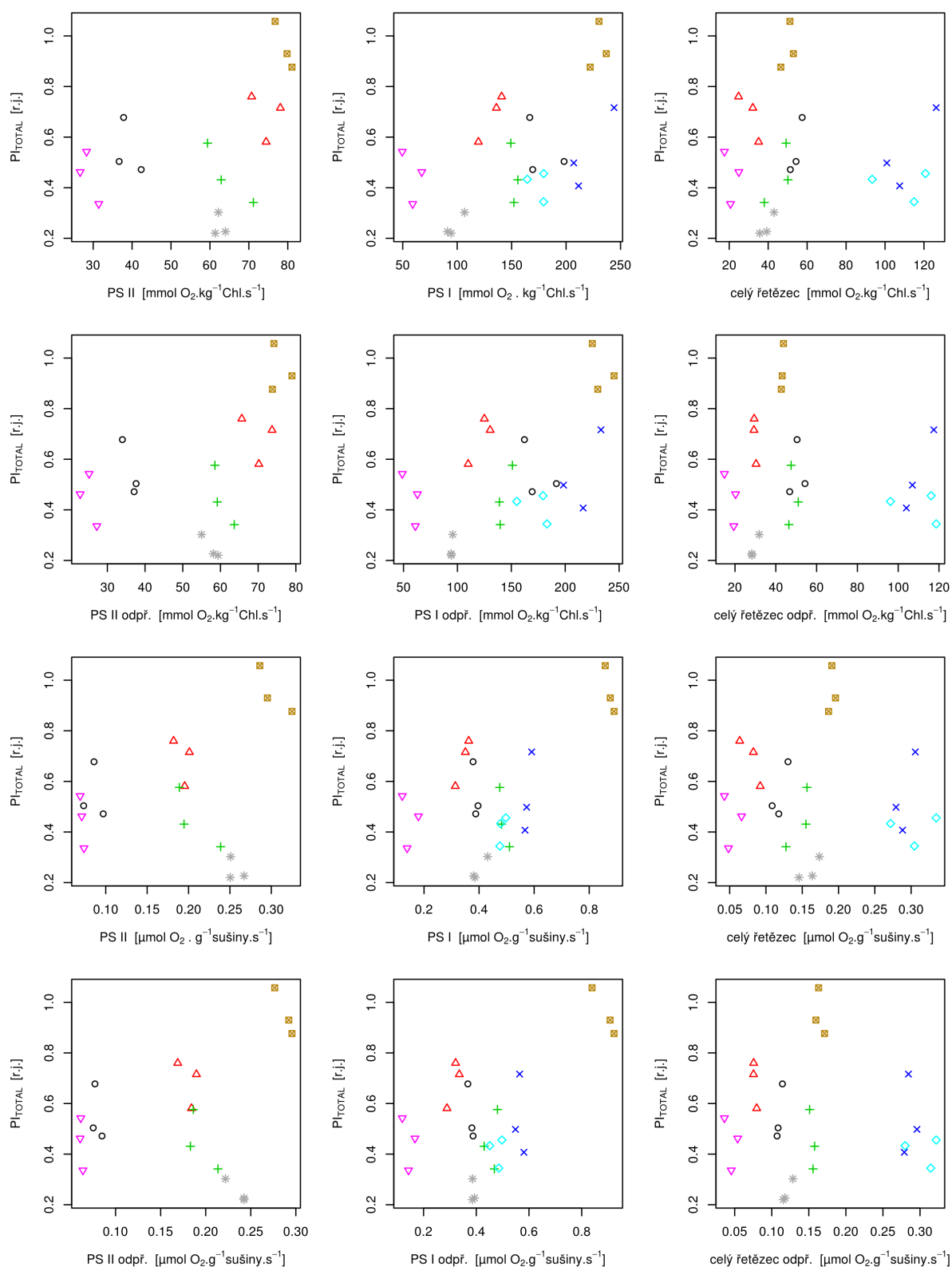
5.1 Pokusný blok 1

V rámci pokusného bloku 1 jsem porovnávala účinnost primárních fotosyntetických procesů analyzovanou pomocí kinetiky rychlé fáze křivky indukce fluorescence Chl a pomocí polarografického měření fotochemické aktivity PS II, PS I nebo celého ETC v suspenzích izolovaných chloroplastů. Jako materiál mi přitom sloužilo 8 různých druhů jehličnanů.

OJIP křivky jednotlivých druhů jehličnanů jsou znázorněny na Obr. 22. Na Obr. 23 je sada grafů vyjadřující vztah mezi fotochemickými aktivitami (v přepočtu jak na jednotkové množství Chl, tak na jednotku hmotnosti sušiny) a fluorescenčním parametrem PI_{TOTAL} , který nejvíce shrnuje procesy probíhající ve fotosyntetickém ETC. Odpovídající grafy pro ostatní fluorescenční parametry jsou vzhledem k jejich množství uvedeny v příloze 1. Hodnoty korelačních koeficientů popisující korelaci mezi fotochemickými aktivitami a fluorescenčními parametry jsou uvedeny v Tab. 14.



Obr. 22: Průměrné křivky indukce fluorescence chlorofylu (OJIP) pro jednotlivé druhy jehličnanů (n=9 biologických opakování). Směrodatné odchylky nejsou pro větší přehlednost grafu zobrazeny. a.j. – arbitrární jednotky.



Obr. 23: Hodnoty vybraného fluorescenčního parametru PI_{TOTAL} , vynesené proti hodnotám fotochemických aktivit PS II, PS I a celého řetězce, a to v normální variantě i ve variantě, kdy bylo přidáno NH_4Cl , což vedlo k odpřažení transportu elektronů od fotofosforylace (grafy odpř.). V horní polovině je fotochemická aktivita vztažena na jednotku hmotnosti chlorofylu (Chl), v dolní na hmotnost sušiny. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barvou a tvarem symbolu, legenda je uvedena u Obr. 22. r.j. – relativní jednotky.

Tab. 14: Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu – korelace mezi fotochemickými aktivitami a fluorescenčními indexy. Přestože některé hodnoty jsou poměrně vysoké (maximum 0,78), po opravě na mnohonásobné testování nevyšla žádná hodnota statisticky významně odlišná od nuly.

Aktivita	PS II				PS I				Celý řetězec			
	Chl		Sušiny		Chl		Sušiny		Chl		Sušiny	
	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne
V _J	-0,20	-0,22	-0,15	-0,17	-0,34	-0,36	-0,44	-0,45	0,12	0,10	0,09	0,06
V _I	-0,71	-0,72	-0,38	-0,40	-0,26	-0,23	-0,33	-0,30	0,39	0,35	0,35	0,31
M ₀	-0,14	-0,17	0,06	0,03	-0,58	-0,59	-0,43	-0,44	-0,09	-0,11	0,01	-0,05
Φ _{P0}	-0,25	-0,23	-0,14	-0,13	0,48	0,52	0,37	0,41	0,37	0,34	0,32	0,29
Φ _{E0}	0,07	0,09	0,07	0,09	0,43	0,46	0,47	0,50	0,05	0,05	0,06	0,07
Φ _{R0}	0,66	0,68	0,37	0,40	0,37	0,35	0,44	0,42	-0,32	-0,29	-0,29	-0,25
Φ _{D0}	0,25	0,23	0,14	0,13	-0,48	-0,52	-0,37	-0,41	-0,37	-0,34	-0,32	-0,29
Ψ _{E0}	0,20	0,22	0,15	0,17	0,34	0,36	0,44	0,45	-0,12	-0,10	-0,09	-0,06
Ψ _{R0}	0,71	0,72	0,38	0,40	0,26	0,23	0,33	0,30	-0,39	-0,35	-0,35	-0,31
δ _{R0}	0,69	0,70	0,32	0,34	0,13	0,09	0,15	0,12	-0,39	-0,35	-0,38	-0,34
γ _{RC}	0,02	0,05	-0,15	-0,12	0,65	0,66	0,40	0,42	0,29	0,28	0,15	0,17
ABS/RC	0,03	0,00	0,19	0,16	-0,63	-0,65	-0,38	-0,40	-0,31	-0,31	-0,17	-0,20
TP0/RC	-0,11	-0,14	0,15	0,12	-0,63	-0,63	-0,35	-0,35	-0,24	-0,25	-0,08	-0,13
ET0/RC	0,02	0,00	0,23	0,22	-0,33	-0,31	0,02	0,02	-0,35	-0,33	-0,19	-0,20
RE0/RC	0,78	0,78	0,51	0,52	0,00	-0,03	0,20	0,16	-0,51	-0,46	-0,41	-0,37
DI0/RC	0,19	0,17	0,21	0,19	-0,55	-0,59	-0,37	-0,40	-0,36	-0,34	-0,25	-0,25
PI _{ABS}	0,11	0,14	0,10	0,13	0,62	0,65	0,57	0,59	0,27	0,25	0,25	0,24
PI _{TOTAL}	0,49	0,51	0,33	0,36	0,60	0,61	0,63	0,64	-0,08	-0,08	-0,05	-0,05

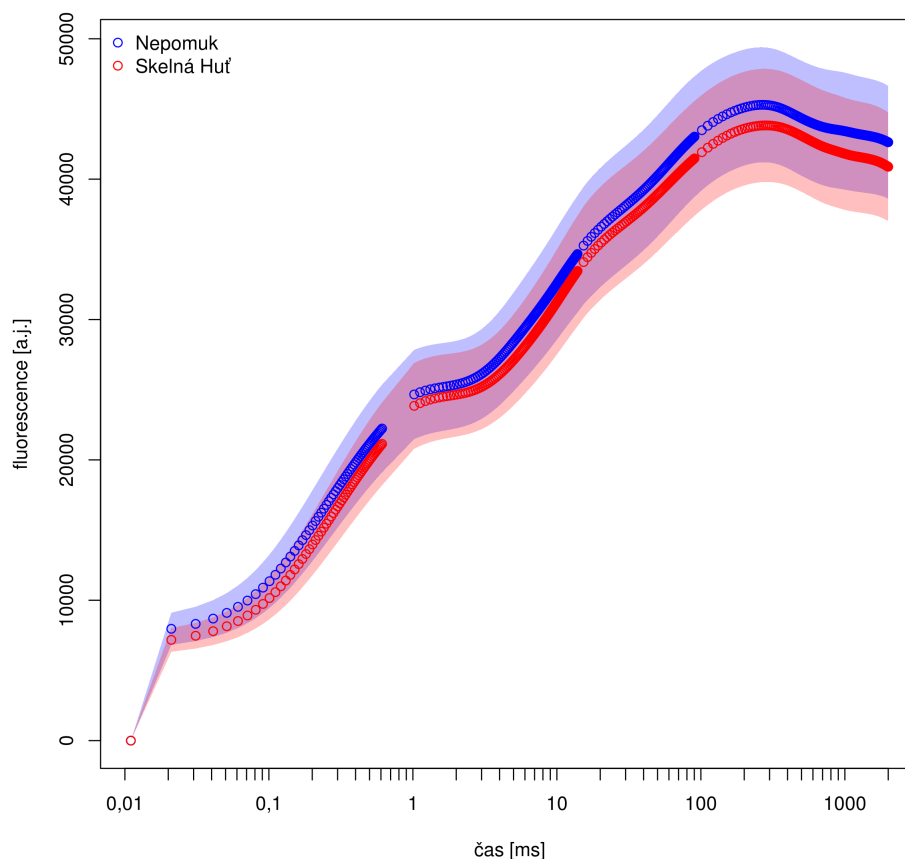
5.2 Pokusný blok 2

V rámci pokusného bloku 2 jsem testovala možnost využití různých parametrů fluorescence Chl, indexů spektrální odrazivosti a obsahů či poměrů fotosyntetických pigmentů stanovených po jejich extrakci z jehlic, k analýze vnitrodruhové variability západočeské populace *P. sylvestris*. Zajímalo mne především, zda hodnocené parametry budou vykazovat heritabilitu (a jak vysokou), a také zda určité indexy spektrální odrazivosti skutečně dobře odpovídají biochemickým/fyziologickým parametrům, s kterými jsou v literatuře spojovány.

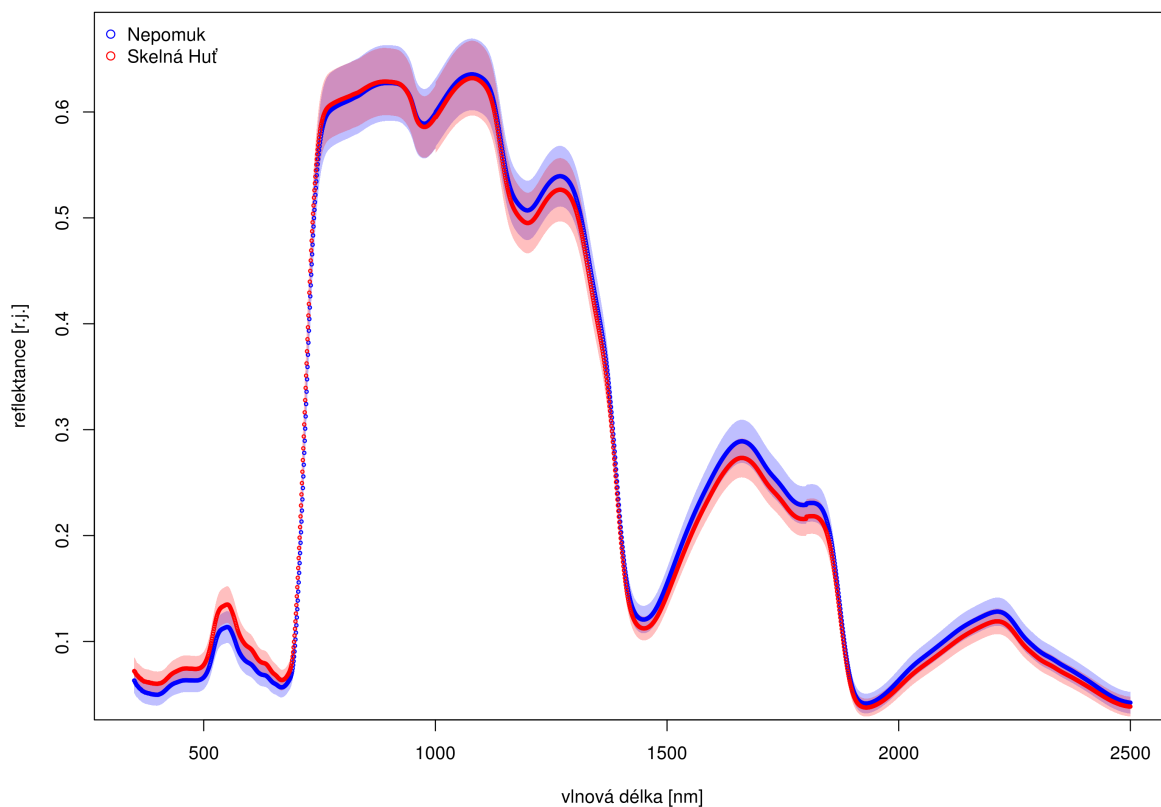
Křivky indukce fluorescence OJIP pro obě testované plochy jsou znázorněny na Obr. 24. a spektra reflektance na Obr. 25. Variabilita mezi potomstvy jednotlivých mateřských genotypů

ve vybraných parametrech fluorescence Chl a reflektance je zobrazena na Obr. 26. Obdobné grafy pro ostatní hodnocené parametry jsou v příloze 3. Na každém z těchto grafů se potomstva mateřských genotypů liší svým pořadím. Pořadí mateřských stromů z hlediska jednotlivých parametrů jsou shrnuta v Tab. 15. Z těchto grafů je patrné, že v mnohých sledovaných parametrech variabilita mezi potomstvy existuje a je ji možno kvantifikovat. Heritabilita hodnocených parametrů je uvedena v Tab. 16.

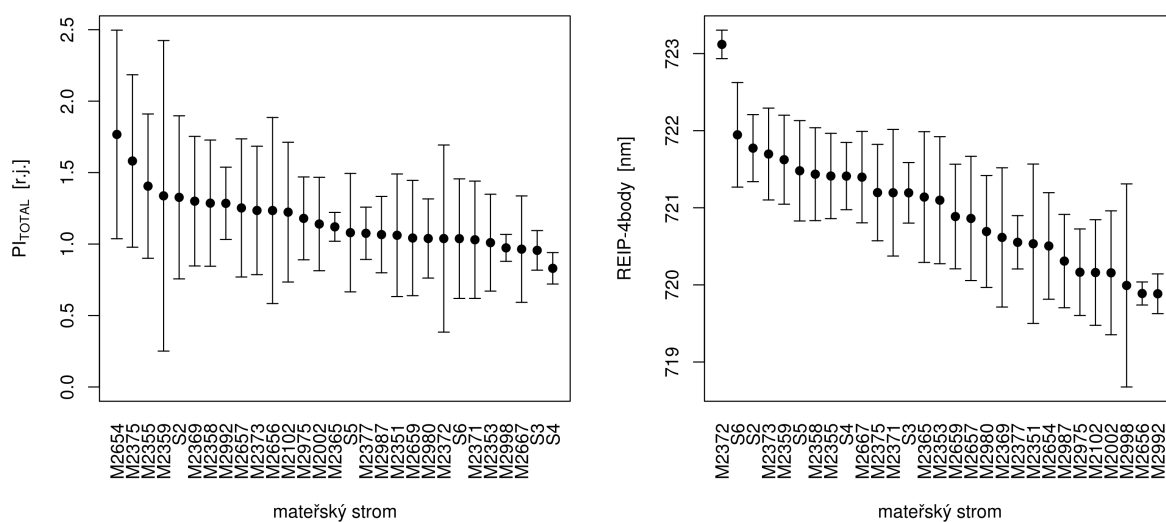
Dále jsem data z tohoto pokusného bloku využila k porovnání vhodnosti použití různých reflektančních indexů, respektive jejich korelace s dalšími vybranými biofyzikálními/biochemickými parametry. Zvolila jsem jednak obsahy fotosyntetických pigmentů stanovené spektrofotometricky a obsah vody, ale také několik fluorescenčních parametrů, které s obsahy pigmentů určitým způsobem souvisí. Např. ABS/RC reflektuje velikost světlosběrných antén PS II a DI_0/RC popisuje disipaci přebytečné energie. Také jsem zařadila srovnání performačních indexů (PI_{ABS} , PI_{TOTAL}) s reflektančními indexy korelujícími s obsahem vody. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 17–20.



Obr. 24: Průměrné křivky indukce fluorescence chlorofylu (OJIP) pro dvě testované plochy (Nepomuk a Skelná Huť). Směrodatné odchytky jsou vyznačeny světlejšími plochami. a.j. – arbitrární jednotky.



Obr. 25: Průměrná spektra reflektance jehlic ze dvou testovacích ploch (Nepomuk a Skelná Huť). Směrodatné odchylky jsou vyznačeny světlejšími plochami. r.j. – relativní jednotky.



Obr. 26: Variabilita testovaných stromů ve vybraném fluorescenčním parametru PI_{TOTAL} a reflektančním indexu REIP-4body. Stromy byly rozděleny do skupin podle genotypu matky. Zobrazeny jsou průměry a směrodatné odchylky. Data jsou smíchána z obou testovacích ploch.

Tab. 15: Pořadí potomstev mateřských stromů dle měřených parametrů. Barevně je odlišeno 5 mateřských stromů prvních v pořadí v příslušném parametru (modrá) a 5 posledních mateřských stromů (žlutá).

	M	S2	M	S5	M	M	M	M	S4	M	M	M	M	S6	M	M	M	M	M	M	S3	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	23		29		23	23	23	26		23	23	23	23		23	23	29	21	26	26		23	26	29	29	20	23	29	20	23	29	26	26	
	65		98		51	59	55	67		58	69	71	53		75	73	80	02	57	54		77	56	87	75	02	72	92	59					
Chl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29					
Chl a	1	2	3	4	5	7	6	8	11	12	10	13	9	15	14	16	17	19	20	22	18	21	25	24	23	26	27	28	29					
Chl b	1	2	3	5	4	6	8	12	7	9	13	11	14	10	17	22	18	19	21	16	27	25	15	20	23	26	24	28	29					
Kar	1	2	5	3	7	8	4	6	13	11	14	12	9	18	10	15	21	22	20	19	16	17	27	25	24	28	23	26	29					
Chl a/Chl b	6	17	20	9	24	21	10	12	22	27	15	25	5	28	7	4	19	16	11	26	2	3	29	18	13	14	23	8	1					
Chl/Kar	4	18	6	25	10	15	21	27	9	7	12	14	24	2	28	26	3	5	11	17	29	23	1	8	16	13	20	19	22					
Obsah vody	7	26	8	18	15	28	27	24	6	14	12	19	17	21	23	22	1	10	5	4	16	2	3	11	9	13	29	25	20					
V _J	27	25	6	13	15	18	10	9	5	29	4	12	24	26	19	8	20	11	14	21	16	1	2	17	7	22	3	28	23					
V _I	7	25	6	23	9	15	12	11	2	22	5	8	14	17	18	16	21	10	13	26	28	1	3	19	4	20	24	29	27					
M ₀	4	14	21	13	9	16	3	10	12	28	2	11	22	23	15	8	25	19	17	24	18	1	6	20	7	26	5	29	27					
φ _{P0}	26	27	5	16	20	18	22	24	21	8	23	19	11	9	25	15	7	10	17	4	12	6	28	14	13	3	29	2	1					
φ _{E0}	5	10	20	17	15	13	21	24	25	2	26	19	7	3	14	23	9	16	18	8	11	29	28	12	22	6	27	1	4					
φ _{R0}	24	5	22	10	21	15	19	20	28	7	26	23	16	12	13	14	8	18	17	4	3	29	27	11	25	6	9	1	2					
φ _{DO}	4	3	25	14	10	12	8	6	9	22	7	11	19	21	5	15	23	20	13	26	18	24	2	16	17	27	1	28	29					
ψ _{E0}	3	5	24	17	15	12	20	21	25	1	26	18	6	4	11	22	10	19	16	9	14	29	28	13	23	8	27	2	7					
ψ _{R0}	23	5	24	7	21	15	18	19	28	8	25	22	16	13	12	14	9	20	17	4	2	29	27	11	26	10	6	1	3					
δ _{R0}	27	7	21	6	23	14	17	18	28	13	22	24	19	15	12	11	8	20	16	3	1	29	26	9	25	10	2	5	4					
γ _{RC}	29	23	2	16	25	15	28	21	12	7	26	18	8	11	17	24	5	9	14	6	13	27	19	10	22	4	20	3	1					
ABS/RC	1	6	26	14	5	15	3	10	18	23	4	12	22	20	13	7	25	21	17	24	16	2	11	19	8	28	9	27	29					
TP0/RC	1	8	28	14	5	15	3	9	20	23	4	11	22	18	13	6	25	21	17	24	16	2	12	19	7	26	10	27	29					
ET0/RC	1	3	29	14	4	13	2	11	27	12	5	10	16	8	9	6	24	23	19	21	17	15	25	20	7	26	22	18	28					
RE0/RC	3	2	27	9	14	16	8	20	28	15	17	23	22	13	11	7	18	25	21	6	1	29	26	12	24	19	4	5	10					
DI ₀ /RC	1	3	26	16	7	15	4	8	14	23	5	11	21	20	9	12	24	22	17	25	19	10	6	18	13	28	2	27	29					
PI _{ABS}	24	16	8	14	21	15	25	22	19	4	26	17	9	6	18	23	5	12	13	7	10	29	28	11	20	3	27	1	2					
PI _{TOTAL}	26	13	10	11	22	14	24	21	28	7	25	20	12	8	15	19	6	17	18	3	5	29	27	9	23	4	16	1	2					
MNDVI8	1	2	25	3	7	6	4	5	8	9	13	14	11	16	10	21	22	24	17	23	12	20	18	15	28	19	26	29	27					
Datt99	1	2	16	5	7	3	6	4	9	8	14	13	12	15	11	19	25	24	18	21	10	23	26	17	27	20	22	29	28					
Macc01	1	2	16	5	6	3	7	4	9	8	14	13	12	15	11	20	26	24	19	21	10	23	25	17	27	18	22	29	28					
VOG1	1	2	24	4	8	5	6	3	7	10	13	14	9	17	11	21	23	20	16	25	15	22	18	12	27	19	26	29	28					
REIPderiv	1	2	14	3	4	5	6	7	9	10	12	13	11	17	8	21	29	22	24	15	16	25	18	20	27	23	18	28	26					
REIP-4body	1	2	20	4	5	3	7	6	10	9	14	12	11	13	8	18	25	26	16	19	15	22	17	21	28	23	24	29	27					
ZM	1	2	25	4	8	5	6	3	7	11	14	15	12	17	9	22	23	20	16	24	10	18	19	13	26	21	27	29	28					
NDVIre	1	2	25	4	9	5	6	3	7	11	13	15	10	20	8	21	23	18	16	24	12	19	17	14	26	22	29	27	28					
ROSAVI	1	2	29	8	7	6	3	5	4	11	13	16	14	18	9	21	25	19	17	24	10	20	15	12	23	22	26	28	27					
PSSRa	2	1	29	9	17	16	14	10	8	18	15	21	13	24	5	22	23	11	7	27	12	6	3	4	26	19	28	20	25					
PSSRb	1	2	29	7	14	17	10	9	3	18	13	19	12	21	4	22	24	16	8	27	15	11	5	6	25	20	28	23	26					
CIred edge	1	2	25	4	8	5	6	3	7	11	14	15	12	17	9	22	23	20	16	24	10	18	19	13	26	21	27	29	28					
DattNIR	1	2	26	3	15	7	8	4	6	11	17	12	9	18	5	23	21	19	10	24	14	13	20	16	28	22	29	25	27					
CabCar																																		
TCARI/OSAVI	29	28	13	25	18	26	21	27	23	22	17	19	20	16	24	12	10	11	15	8	14	9	5	7	3	6	4	1	2					
SR550/570	4	9	29	13	17	24	16	14	8	19	10	18	15	26	5	22	23	6	3	27	21	7	1	2	25	11	28	12	20					
SR540/570	2	11	29	12	16	22	15	13	8	19	9	18	17	26	5	24	25	6	4	27	21	7	1	3	23	10	28	14	20					
SR550/560	23	19	28	13	14	24	25	8	7	16	10	17	12	27	11	22	20	5	3	26	21	4	1	2	18	6	29	9	15					
SR530/570	2	18	28	13	12	21	17	14	7	16	8	15	20	24	6	26	27	10	4	23	25	5	1	3	19	9	29	11	22					

Tab. 15 – Pokračování.

	M	S2	M	S5	M	M	M	M	S4	M	M	M	M	S6	M	M	M	M	M	S3	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
	23	65	29	98	51	59	55	67		58	69	71	53		75	73	80	02	57	54		77	56	87	75	02	72	92	29	26	59	
SR540/560	8	20	28	16	9	24	22	7	6	15	10	14	18	25	13	27	21	12	1	19	26	4	3	2	11	5	29	17	23			
PSRI	8	16	1	15	6	4	11	13	22	7	19	10	20	5	23	14	21	26	27	3	18	25	29	28	9	17	2	24	12			
PRI	28	12	2	17	19	9	13	16	23	14	22	15	10	6	24	4	3	20	26	7	5	25	29	27	11	21	1	18	8			
SR515/560	10	23	1	17	6	7	11	12	19	5	15	9	21	8	26	16	20	25	27	2	13	24	28	29	4	14	3	22	18			
PRIm1	12	22	1	16	8	6	11	14	20	5	18	9	21	7	24	13	17	25	26	3	10	27	29	28	4	19	2	23	15			
CRI/500	2	1	29	8	24	16	14	12	9	20	13	17	10	23	3	22	15	11	4	26	18	7	5	6	27	21	28	19	25			
CRI/700	3	1	29	9	22	16	15	13	2	19	12	14	10	17	4	23	20	11	5	27	18	8	7	6	26	24	28	21	25			
NDWI	29	27	25	17	16	20	28	24	19	14	9	23	22	21	26	18	13	15	6	4	5	12	2	1	8	10	7	11	3			
NDVI	1	2	29	6	17	16	10	7	4	19	15	18	11	23	3	20	22	14	9	26	13	12	5	8	27	21	28	24	25			
AI970	11	12	14	9	28	21	26	15	27	17	23	7	8	16	19	18	1	2	4	3	24	5	25	20	22	6	29	13	10			
MDWI	1	21	29	15	19	27	14	24	12	25	16	23	13	26	10	18	4	5	3	8	9	7	2	6	20	11	28	17	22			
WI	29	27	28	15	13	26	22	24	10	14	23	18	20	21	25	19	5	17	6	7	4	2	3	1	11	9	16	12	8			

Tab. 16: Hodnoty heritability (koeficientu dědivosti) různých měřených parametrů vypočítané pro jednotlivé pokusné plochy.

Obsahy fotos. pigmentů a vody v jehlicích

Parametr	Skelná Hut'	Nepomuk
Chlorofyl (Chl)	0,0122	0,0572
Chl <i>a</i>	0,0140	0,0728
Chl <i>b</i>	0,0406	0,0335
Karotenoidy (Kar)	0,0939	0,1016
Poměr Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	0,3074	0,1172
Poměr Chl/Kar	0,4429	0,2358
Voda (g/g)	0,1712	0,0453

Parametry fluorescence Chl

Parametr	Skelná Hut'	Nepomuk
V_J	0,0492	0,2669
V_I	0,1897	0,1713
M_0	0,0954	0,3258
φ_{P0}	0,0233	0,1278
φ_{E0}	0,0343	0,2513
φ_{R0}	0,1630	0,1631
φ_{D0}	0,0233	0,1278
ψ_{E0}	0,0492	0,2669
ψ_{R0}	0,1897	0,1713
δ_{R0}	0,2370	0,1561
γ_{RC}	0,2009	0,2918
ABS/RC	0,1624	0,2856
TP0/RC	0,2000	0,3175
ET0/RC	0,3171	0,1006
RE0/RC	0,3161	0,1706
DI ₀ /RC	0,0676	0,1909
PI _{ABS}	0,1079	0,2532
PI _{TOTAL}	0,1604	0,1464

Indexy spektrální odrazivosti

Parametr	Skelná Hut'	Nepomuk
MNDVI8	0,3309	0,2134
Datt99	0,2201	0,1455
Macc01	0,2189	0,1404
VOG1	0,3615	0,1016
REIPderiv	0,2390	0,1643
REIP-4body	0,2391	0,2066
ZM	0,3761	0,1082
NDVIre	0,4102	0,0752
ROSAVI	0,3199	0,0645
PSSRa	0,4531	0,0004
PSSRb	0,5279	0,0004
CIred edge	0,3761	0,1082
DattNIR CabCar	0,6353	0,0909
TCARI/OSAVI	0,3132	0,0535
SR550/570	0,2604	0,0001
SR540/570	0,2255	0,0001
SR550/560	0,3376	0,0212
SR530/570	0,1596	0,0579
SR540/560	0,2240	0,1383
PSRI	0,1465	0,0003
PRI	0,1583	0,0583
SR515/560	0,2223	0,0435
PRIm1	0,2197	0,0185
CRI 500	0,5160	0,0159
CRI 700	0,4383	0,0004
NDWI	0,4137	0,1392
NDVI	0,4723	0,0004
AI970	0,5982	0,0712
MDWI	0,2218	0,0335
WI	0,2789	0,1335

Tab. 17: Korelace skupiny reflektančních indexů, které by podle literatury měly korelovat s obsahem chlorofylu stanoveným spektrofotometricky po jejich extraxi z jehlic. Data z obou testovacích ploch jsou zde smíchána. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu. Všechny hodnoty byly statisticky významně odlišné od nuly (hladina významnosti byla opravena proti mnohonásobnému testování v rámci této tabulky).

	MNDVI18	Dat99	Macc01	VOG1	REIP-4body	REIPderiv	ZM	NDVIre	ROSaVI	PSSRa	PSSRb	Clred edge	DatNIR CabCar	TCARI/OSAVI
Chl	0,676	0,702	0,701	0,672	0,727	0,643	0,683	0,676	0,662	0,309	0,485	0,683	0,657	-0,722
Chl a	0,675	0,700	0,699	0,670	0,726	0,643	0,679	0,673	0,657	0,309	0,479	0,679	0,651	-0,719
Chl b	0,652	0,680	0,680	0,653	0,702	0,621	0,665	0,658	0,648	0,297	0,483	0,665	0,648	-0,703

Tabulka 18: Korelace skupiny reflektančních indexů, které by podle literatury měly korelovat s poměrem obsahu karotenoidů (Kar) a chlorofylu (Chl), s obsahem nebo poměrem fotosyntetických pigmentů, určeným na základě spektrofotometrického stanovení po jejich extrakci z jehlic, a s dvěma vybranými parametry fluorescence Chl. Data z obou testovacích ploch jsou zde smíchána. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu. Hodnoty statisticky významně odlišné od nuly jsou zvýrazněny (hladina významnosti byla opravena proti mnohonásobnému testování v rámci této tabulky).

	SR550/570	SR540/570	SR550/560	SR530/570	SR540/560	PSRI	PRI
Chl/Kar	0,023	0,070	0,044	0,142	0,152	0,101	-0,142
Kar	0,075	0,126	-0,101	0,108	0,046	0,177	-0,107
Chl	0,077	0,141	-0,091	0,147	0,090	0,208	-0,146
ABS/RC	0,153	0,180	-0,100	0,086	-0,019	0,002	-0,086
DI ₀ /RC	0,153	0,180	-0,108	0,078	-0,025	0,010	-0,078

Tabulka 19: Korelace skupiny reflektančních indexů, které by podle literatury měly korelovat s obsahem karotenoidů (Kar) stanoveným spektrofotometricky po extraxi z jehlic a s dvěma vybranými parametry fluorescence chlorofylu. Data z obou testovacích ploch jsou zde smíchána. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu. Hodnoty statisticky významně odlišné od nuly jsou zvýrazněny (hladina významnosti byla opravena proti mnohonásobnému testování v rámci této tabulky).

	SR515/560	PRIm1	CRI 500	CRI 700
Kar	0,068	0,083	0,334	0,382
ABS/RC	-0,111	-0,089	0,255	0,321
DI ₀ /RC	-0,108	-0,081	0,288	0,362

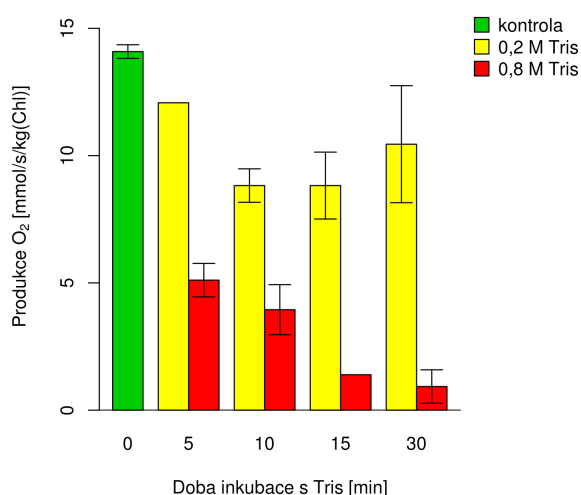
Tabulka 20: Korelace skupiny reflektančních indexů, které by podle literatury měly korelovat s vodním potenciálem nebo relativním obsahem vody, s gravimetricky stanoveným obsahem vody v jehlicích a dvěma vybranými parametry fluorescence chlorofylu. Data z obou testovacích ploch jsou zde smíchána. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu. Hodnoty statisticky významně odlišné od nuly jsou zvýrazněny (hladina významnosti byla opravena proti mnohonásobnému testování v rámci této tabulky).

	NDWI	NDVI	AI970	MDWI	WI
Voda (g/g)	0,215	-0,094	0,111	0,239	0,288
PI _{ABS}	0,333	-0,254	0,163	0,075	0,310
PI _{TOTAL}	0,252	-0,206	0,098	-0,013	0,181

5.3 Pokusný blok 3

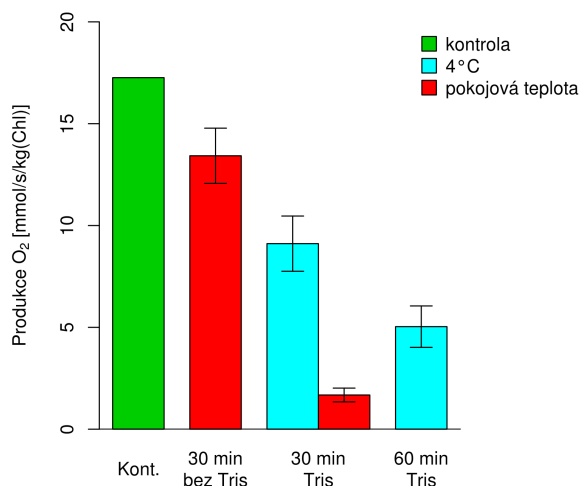
Ve třetí části diplomové práce jsem zaváděla a optimalizovala metodu inhibice OEC a spektrofotometrického měření aktivity PS II v takto modifikovaných chloroplastech. Protože tato metoda u nás v laboratoři předtím nikdy nebyla zkoušena a protože většina studií, které jsem v literatuře na toto téma našla, byla prováděna na lupenitých listech, pracovala jsem i já zpočátku s rostlinným materiálem jiným než jehličnany a až po konečné optimalizaci jsem tuto metodu vyzkoušela na druhu *P. abies*.

V první části tohoto pokusného bloku jsem se pokusila inhibovat OEC po vzoru prací Vernon et Shaw (1969) (suspenze chloroplastů izolovaných z listů *Spinacia oleracea* L. inkubována s 0,2 M Tris po dobu 5 min za pokojové teploty) a Castelo-Branco et al. (2008) (totéž s použitím 0,8 M Tris, 30 min v 4 °C). V prvním pokusu jsem inkubovala suspenzi izolovaných chloroplastů po různou dobu s různě koncentrovaným roztokem Tris. Produkci kyslíku jsem měřila pomocí Clarkovy elektrody. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na Obr. 27.



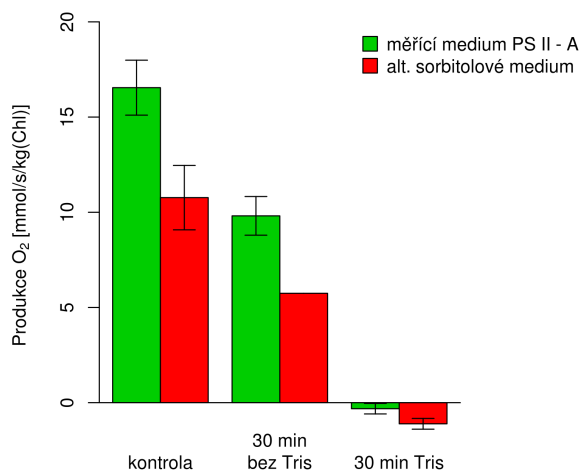
Obr. 27: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody v suspenzi chloroplastů izolovaných z listů *Phaseolus vulgaris*, která byla před měřením inkubována (pokojová teplota) po určitou dobu s roztoky Tris v poměru 1:5. Po zvolené době jsem do měřicí komůrky dala celou směs suspenze chloroplastů s Tris. Jako kontrola sloužil vzorek izolovaných chloroplastů, který nebyl inkubován s Tris. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchylky z technických opakování (n=2).

Pro následující pokusy jsem se na základě těchto výsledků rozhodla používat 0,8 M Tris. V druhém pokusu jsem otestovala, jaký má teplota při inkubaci s Tris (a také bez Tris) vliv na fotochemickou aktivitu chloroplastů. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na Obr. 28.



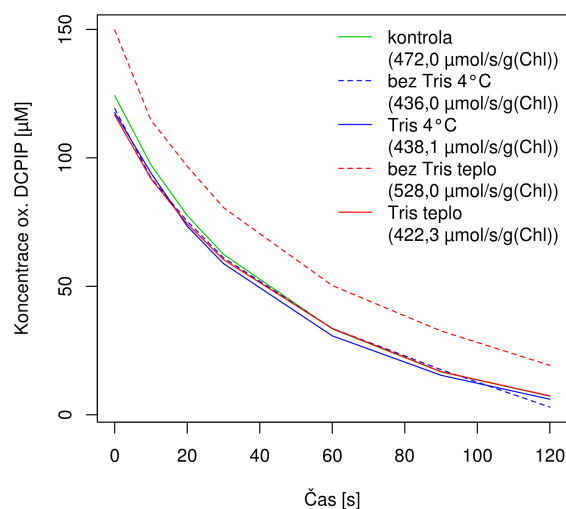
Obr. 28: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody v suspenzi chloroplastů izolovaných z listů *Phaseolus vulgaris*, která byla před měřením inkubována s 0,8 M Tris buď ve 4 °C nebo v pokojové teplotě v poměru 1:5. V pokusu byl analyzován i vliv inkubace chloroplastů bez Tris, pouze s použitým měřicím médiem PS II – A (Tab. 10) v poměru 1:5 v pokojové teplotě (2. sloupec). Po zvolené době jsem do měřicí komůrky dala celou směs suspenze chloroplastů s Tris nebo měřicím médiem. Jako kontrola sloužil vzorek chloroplastů bez jakékoli inkubace. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchytky z technických opakování (n=2).

Na základě výsledků tohoto pokusu jsem pro následující pokusy zvolila inkubace v pokojové teplotě. V dalším pokusu jsem pro měření aktivity PS II vyzkoušela alternativní sorbitolové médium o složení 100 mM sorbitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM KCN, 15 mM Tricin (Castelo-Branco et al. 2008). Výsledky jsou uvedeny na Obr. 29.



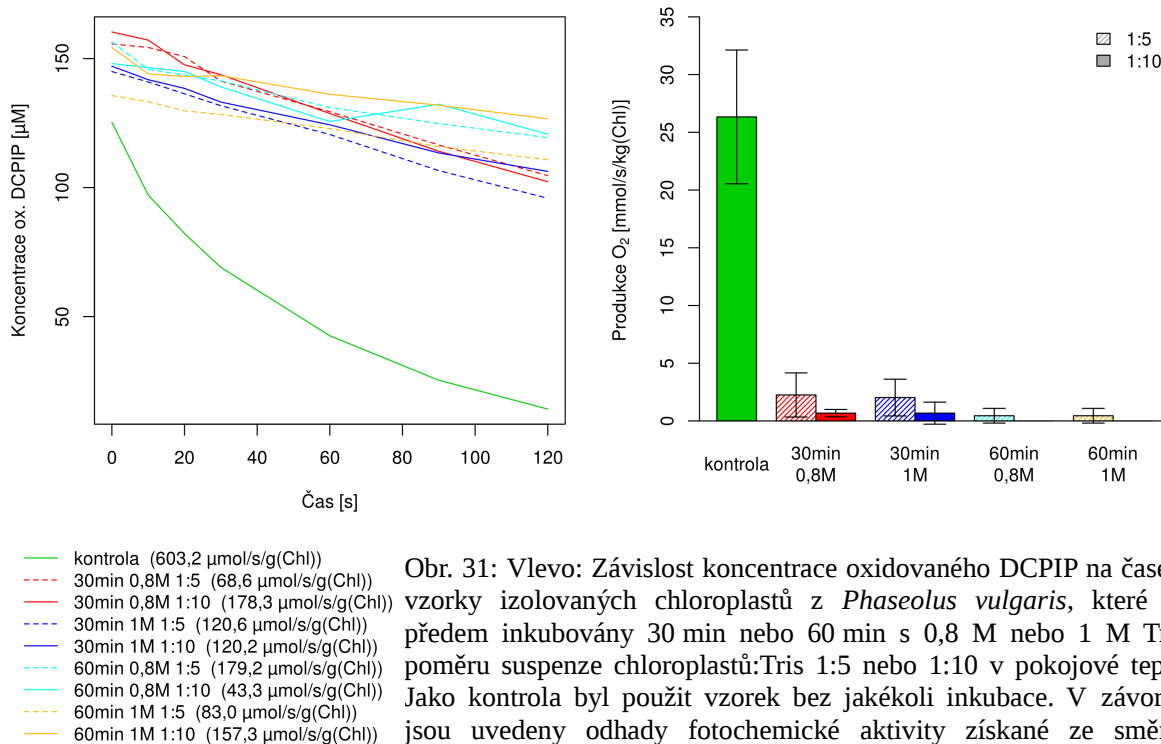
Obr. 29: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody v suspenzi chloroplastů izolovaných z listů *Hordeum vulgare*, která byla před měřením inkubována v pokojové teplotě s 0,8 M Tris v poměru 1:5. Zařazena i kontrola vlivu inkubace s použitým měřicím médiem v poměru 1:5 v pokojové teplotě (3. a 4. sloupec). Po zvolené době jsem do měřicí komůrky dala celou směs suspenze chloroplastů s Tris nebo měřicím médiem. Jako kontrola sloužil vzorek chloroplastů bez jakékoli inkubace. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchytky z technických opakování (n=2).

Na základě výsledků tohoto pokusu jsem zavrhla použití výše zmíněného alternativního media, protože kontrolní vzorek suspenze chloroplastů v něm vykazoval nižší fotochemickou aktivitu. Po výše uvedených pokusech jsem přistoupila k testování toho, zda inhibici OEC pomocí Tris bude možné detekovat i spektrofotometricky pomocí sledování redukce DCPIP. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na Obr. 30.



Obr. 30: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro vzorky izolovaných chloroplastů z *Phaseolus vulgaris*, které byly předem inkubovány 30 min s Tris v poměru 1:5 v pokojové teplotě (teplo) nebo 4 °C. Jako kontrola byl použit vzorek bez jakékoli inkubace. V závorkách jsou uvedeny odhady fotochemické aktivity získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s. Znázorněny jsou průměry z tehnických opakování (n=2)

Z výsledků tohoto pokusu je zřejmé, že inhibice pomocí Tris při použití této metody měření nebyla úspěšná. Rychlost redukce DCPIP se mezi vzorky v podstatě nelišila. Rozhodla jsem se tedy vyzkoušet jednak vyšší koncentraci Tris (1 M), jednak prodloužit dobu inkubace na 60 min a zvýšit poměr chloroplastové suspenze:Tris (kromě 1:5 i 1:10). Aktivitu PS II jsem měřila jak polarograficky, tak spektrofotometricky. Výsledky uvádí Obr. 31.

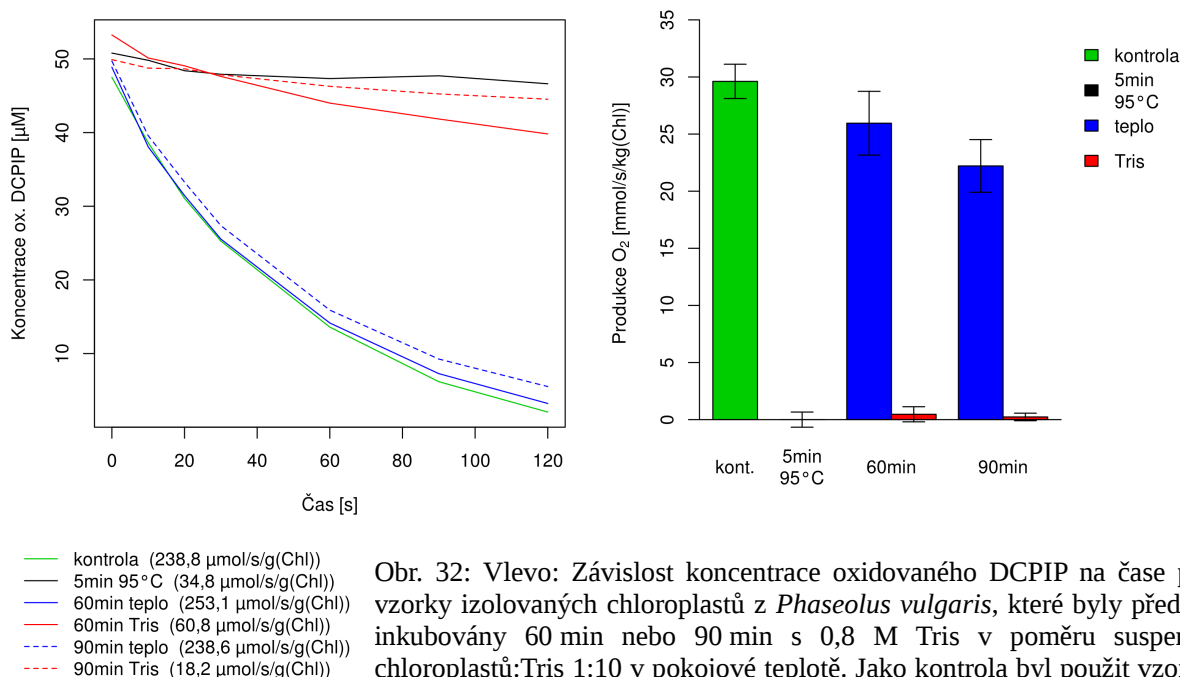


Obr. 31: Vlevo: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro vzorky izolovaných chloroplastů z *Phaseolus vulgaris*, které byly předem inkubovány 30 min nebo 60 min s 0,8 M nebo 1 M Tris v poměru suspenze chloroplastů:Tris 1:5 nebo 1:10 v pokojové teplotě. Jako kontrola byl použit vzorek bez jakékoli inkubace. V závorkách jsou uvedeny odhady fotochemické aktivity získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s. Znárodněny jsou průměry z technických opakování (n=2). Vpravo: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody u stejných vzorků suspenze chloroplastů. Uvedeny jsou průměry směrodatné odchylky z technických opakování (n=2).

Polarografické měření ukázalo, že při použití poměru suspenze chloroplastů:Tris 1:10 je inhibice výraznější než u poměru 1:5, a že prodloužení doby inkubace také dále snižuje aktivitu PS II. Zároveň ukázalo, že vliv 0,8 M a 1 M Tris je obdobný. Spektrofotometrické měření v tomto případě poskytlo poněkud nesourodé výsledky, nejnižší hodnotu směrnice regresní přímky vyjadřující rychlost redukce DCPIP jsem však získala také u vzorku, kde byla použita 60 min inkubace s 0,8 M Tris v poměru suspenze chloroplastů:Tris 1:10. Tuto variantu jsem tedy zvolila pro všechny následující pokusy. Zároveň jsem přešla na nižší koncentraci DCPIP (50 μM), protože s koncentrací 100 μM byla směs na začátku měření velice tmavá a absorbance byla těžko měřitelná.

Protože zvolený postup sice výrazně snížil rychlost redukce DCPIP, ale stále ještě ji neinhiboval úplně, rozhodla jsem se dobu inkubace s Tris prodloužit ještě o dalších 30 min, abych zjistila, jak prodloužení doby pobytu vzorku v pokojové teplotě ovlivní jeho fotochemickou aktivitu. Měřila jsem kromě vzorků inkubovaných s Tris i vzorky ponechané příslušnou dobu v pokojové teplotě bez přidání dalších složek. Abych vyloučila možnost, že by DCPIP byl redukován jinými chemickými složkami suspenze chloroplastů než pigment-

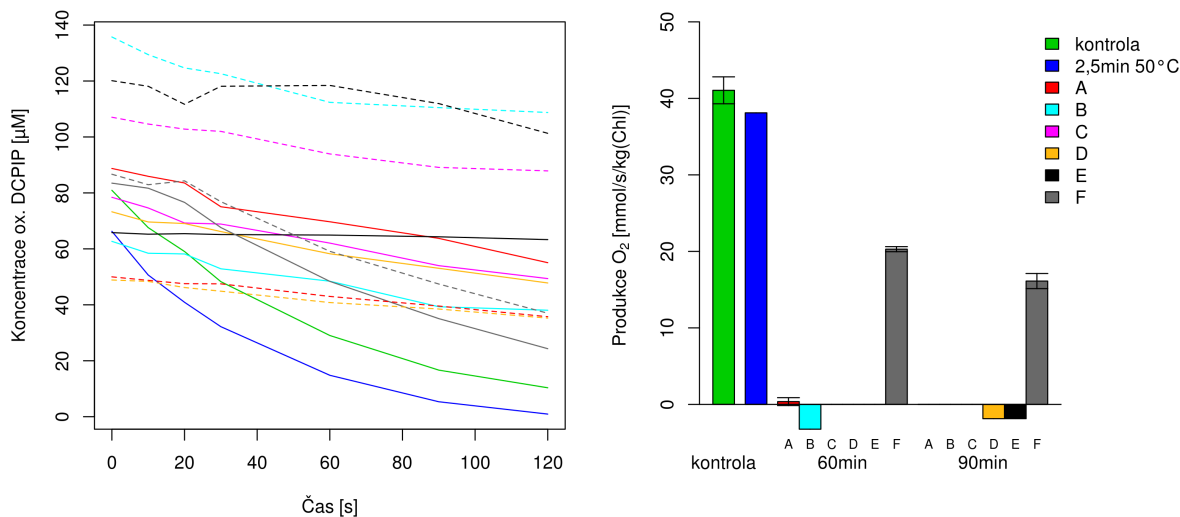
proteinovými komplexy ETC, vystavila jsem část vzorků před měřením vysoké teplotě (95 °C, 5 min). Výsledky znázorňuje Obr. 32.



Obr. 32: Vlevo: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro vzorky izolovaných chloroplastů z *Phaseolus vulgaris*, které byly předem inkubovány 60 min nebo 90 min s 0,8 M Tris v poměru suspenze chloroplastů:Tris 1:10 v pokojové teplotě. Jako kontrola byl použit vzorek bez jakékoli inkubace. V závorkách jsou uvedeny odhady fotochemické aktivity získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s. Znázorněny jsou průměry z technických opakování (n=2). Vpravo: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody u stejných vzorků suspenze chloroplastů. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchylky z technických opakování (n=2).

Zatímco spektrofotometrické měření neukázalo vliv doby pobytu vzorku (bez Tris) v pokojové teplotě, když byla aktivita PS II měřena polarograficky, pozorovala jsem určitý pokles jejích hodnot s prodloužením doby, po kterou byl vzorek ponechán v pokojové teplotě. Co se týče inhibice pomocí Tris, o něco větší byla tehdy, když byl vzorek inkubován s Tris delší dobu, ale rozdíl nebyl až tak výrazný (a to i ve srovnání se vzorkem zničeným 5 min zahřátím na 95 °C).

V následujícím pokusu jsem se rozhodla vyzkoušet modifikovaný postup popsáný v Garza-Ortiz et al. (2004) a inkubaci vzorku v Tris zkombinovat s centrifugací a následnou resuspendací. Protože Yamashita et al. (1971) a Drechsler et Neumann (1982) uvádějí, že přidání FeCy má také inhibiční vliv, otestovala jsem i tuto možnost. Vyzkoušela jsem také inhibici OEC krátkým teplotním šokem 2,5 min 50 °C podle Dean et Pocock (2004). Popis variant postupů inkubací a centrifugací a výsledky tohoto pokusu jsou na Obr. 33. Všechny centrifugace jsem prováděla při pokojové teplotě.



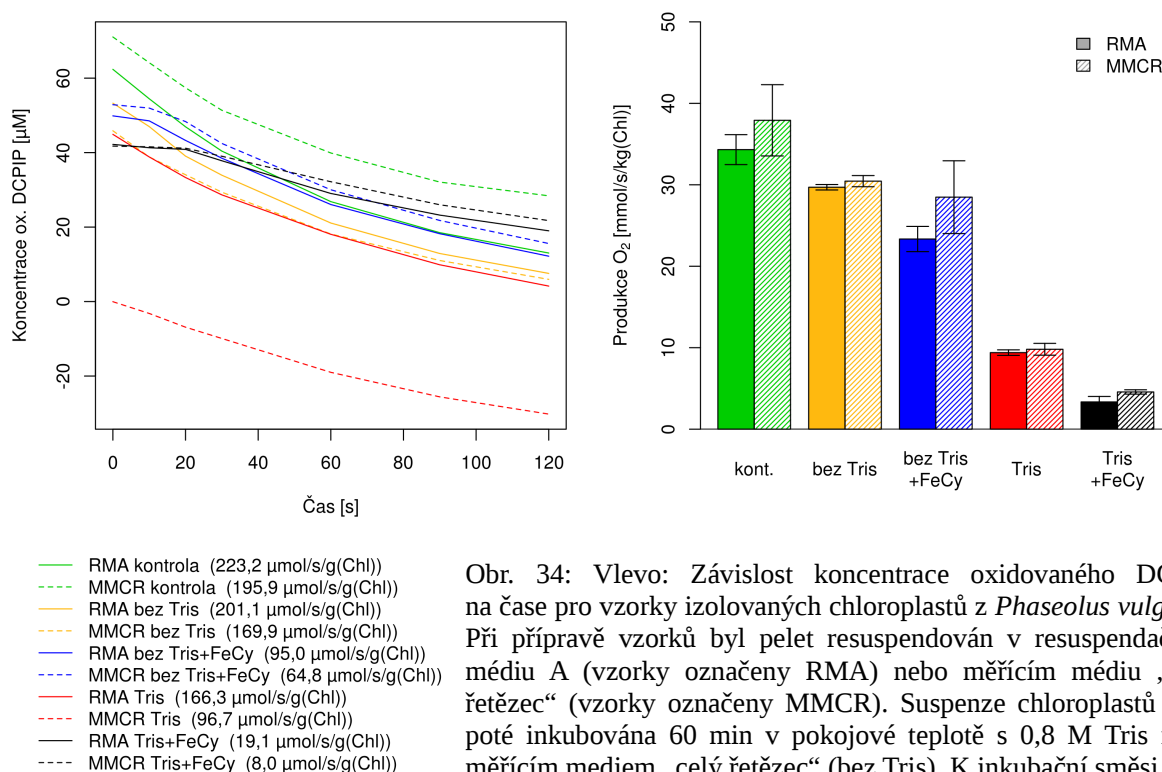
- kontrola (311,1 µmol/s/g(Chl))
- 2,5min 50°C (360,9 µmol/s/g(Chl))
- 60min A (23,1 µmol/s/g(Chl))
- 60min B (63,7 µmol/s/g(Chl))
- 60min C (131,2 µmol/s/g(Chl))
- 60min D (60,5 µmol/s/g(Chl))
- 60min E (5,35 µmol/s/g(Chl))
- 60min F (98,1 µmol/s/g(Chl))
- 90min A (34,6 µmol/s/g(Chl))
- 90min B (158,0 µmol/s/g(Chl))
- 90min C (60,8 µmol/s/g(Chl))
- 90min D (38,4 µmol/s/g(Chl))
- 90min E (120,4 µmol/s/g(Chl))
- 90min F (34,0 µmol/s/g(Chl))

Obr. 33: Vlevo: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro vzorky izolovaných chloroplastů z *Phaseolus vulgaris*, které byly připraveny jedním z několika postupů: A – Suspenze chloroplastů byla inkubována s 0,8 M Tris v poměru suspenze chloroplastů:Tris 1:10 v pokojové teplotě 60/90 min a poté centrifugována po 2 min na 5000x g. Pelet byl resuspendován v malém množství resuspendačního media. B – Suspenze chloroplastů byla inkubována s Tris (jako A). Po 10 min inkubace byla směs centrifugována po 2 min při 5000x g a resuspendována v původním množství Tris. Inkubace byla dokončena do celkového času 60/90 min a následována centrifugací a resuspendací jako u (A). C – Suspenze chloroplastů byla inkubována s Tris (jako A).

Po 15 min inkubace byla směs centrifugována po 10 min při 1000x g a resuspendována v původním množství Tris. Inkubace byla dokončena do celkového času 60/90 min jako u (A). D – Suspenze chloroplastů byla inkubována s Tris (jako A). Každých 15 min inkubace byla směs centrifugována po 10 min při 1000x g a resuspendována v původním množství Tris. E – jako A. Do inkubační směsi bylo přidáno malé množství zásobního roztoku (FeCy) takže výsledná koncentrace byla 0,5 mM. F – jako D. Místo roztoku Tris bylo použito měřící medium s přídavkem FeCy. Jako kontrola byl použit vzorek bez jakékoli inkubace. Zařazen byl také vzorek, který byl vystaven těsně před měřením teplotnímu šoku 2,5 min při 50 °C. V závorkách jsou uvedeny odhady fotochemické aktivity získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s. Znázorněny jsou průměry z technických opakování (n=2) Vpravo: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody u stejných vzorků suspenze chloroplastů. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchylky z technických opakování (n=2).

Z výsledků měření produkce kyslíku Clarkovou elektrodou lze považovat všechny varianty, kde byla použita inkubace s Tris (A, B, C, D, E) za nulové a proto jsem se pro posouzení jejich účinnosti zaměřila na výsledky spektrofotometrických měření, ze kterých vychází ale varianta E jako nejlepší. Centrifugace a resuspendace neměly velký vliv na efektivitu inhibice. Také rozdíl mezi inkubací 60 min a 90 min se nezdál výrazný. Směrnice regresní přímky pro prvních 20 s u varianty 90 min E je pravděpodobně ovlivněna náhodným skokem v bodě 20 s, jak je vidět z následného časového průběhu grafu. Teplotní šok neměl rozeznatelný inhibiční vliv. Dále jsem tedy pracovala s FeCy, i když jsem pro jistotu vždy zkoušela inkubaci i bez FeCy, a používala jsem délku inkubace 60 min.

Abych si ověřila, jestli by inhibici OEC pomocí Tris a FeCy nemohlo hrát roli uchování vzorku v médiu bez glycerolu (resuspendační medium A pro izolaci chloroplastů z lupenitých listů obsahuje 40 % (v/v) glycerol) provedla jsem následující pokus: Během přípravy vzorku izolovaných chloroplastů jsem pelet získaný centrifugací resuspendovala buď v resuspendačním mediu A, nebo v měřicím mediu „celý řetězec“. Vzorky jsem poté inkubovala 60 min při pokojové teplotě s Tris nebo v měřicím mediu „celý řetězec“ a do inkubační směsi jsem v polovině případů přidala FeCy. Výsledky uvádí Obr. 34.

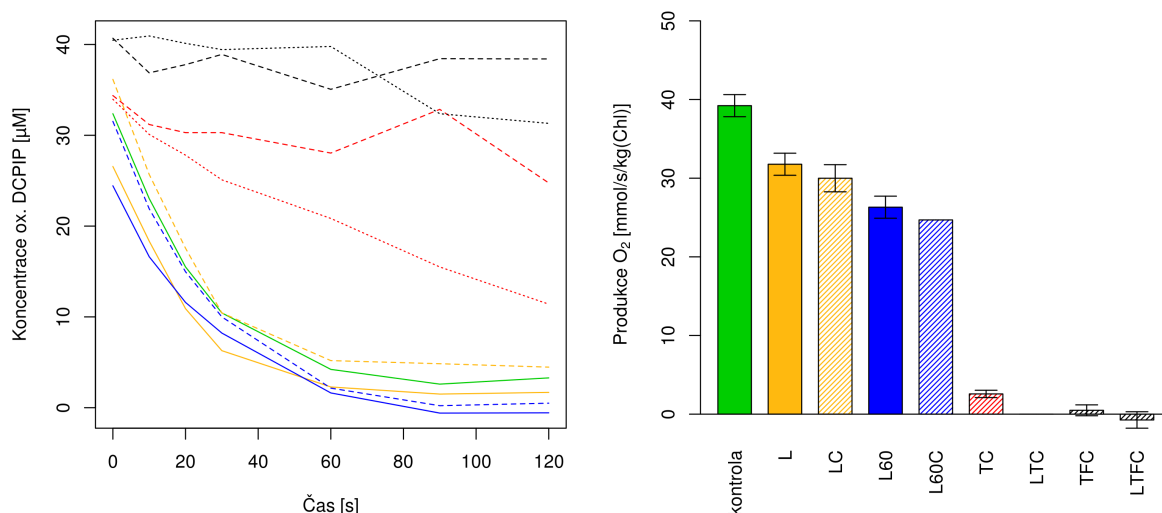


Obr. 34: Vlevo: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro vzorky izolovaných chloroplastů z *Phaseolus vulgaris*. Při přípravě vzorků byl pelet resuspendován v resuspendačním mediu A (vzorky označeny RMA) nebo měřicím mediu „celý řetězec“ (vzorky označeny MMCR). Suspenze chloroplastů byla poté inkubována 60 min v pokojové teplotě s 0,8 M Tris nebo měřicím mediem „celý řetězec“ (bez Tris). K inkubační směsi bylo v některých případech přidáno malé množství zásobního roztoku FeCy, takže výsledná koncentrace byla 0,5 mM. Jako kontroly byly použity vzorky bez jakékoli inkubace. V závorkách jsou uvedeny odhady fotochemické aktivity získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s. Znázorněny jsou průměry z technických opakování (n=2). Vpravo: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody u stejných vzorků suspenze chloroplastů. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchylky z technických opakování (n=2).

Typ média, v němž byly chloroplasty uchovávány, nehrál žádnou výraznou roli. Pokus také ukázal, že samotné přidání FeCy k inhibici OEC nestačí, je nutná inkubace s 0,8 M Tris. Nejlepší výsledky opět poskytla kombinace Tris a FeCy, překvapivě však v tomto případě u polarografických měření nebyla aktivita vzorků přímo nulová.

V literatuře (King-Díaz et al. 2006) jsem také našla, že někteří autoři vzorky izolovaných chloroplastů před každým experimentem vystavili působení lytického media o složení 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM KCN a 30 mM tricin-KOH (pH 8,0), čímž

došlo k uvolnění tylakoidů. V následujícím pokusu jsem se rozhodla ověřit hypotézu, že Tris nemůže dostatečně účinně působit na celé izolované chloroplasty, a lépe působí na tylakoidy uvolněné lytickým médiem. Vyzkoušela jsem před inkubací s Tris (resp. Tris+FeCy) zařadit 5min inkubaci s výše uvedeným lytickým médiem v poměru suspenze chloroplastů:lytické médium 1:10. Po 5 minutách jsem ke směsi přidala 10 dílů 1,6 M Tris (vzorek označen LTC) a případně i malé množství FeCy (LTFC). Také jsem vyzkoušela samotný vliv inkubace s lytickým médiem na aktivitu PS II a to po dobu 5 min (L a LC) a 60 min (L60 a L60C). Z praktických důvodů jsem většinu 60 min inkubací ukončila centrifugací 2 min při 5000x g a resuspendací peletu v malém množství resuspendačního media A, a takto připravené vzorky (LC, L60C, TC, LTC, TFC, LTFC) jsem uložila v 4 °C. Vzorky L a L60 jsem na konci inkubace necentrifugovala, ale směs lytického media a chloroplastů jsem ihned použila k měření. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 35.



- kontrola (243,9 μmol/s/g(Chl))
- L (226,3 μmol/s/g(Chl))
- LC (264,0 μmol/s/g(Chl))
- L60 (185,7 μmol/s/g(Chl))
- L60C (238,2 μmol/s/g(Chl))
- TC (87,8 μmol/s/g(Chl))
- LTC (58,5 μmol/s/g(Chl))
- TFC (4,9 μmol/s/g(Chl))
- LTFC (41,6 μmol/s/g(Chl))

Obr. 35: Vlevo: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro vzorky izolovaných chloroplastů ze *Spinacia oleracea* L., L60 – Suspenze chloroplastů inkubována 5 nebo 60 min s lytickým médiem v poměru 1:10. Směs byla po inkubaci přímo vložena do kyvety. LC, L60C – jako L a L60, ale směs byla po inkubaci centrifugována 2 min při 5000x g a resuspendována v malém množství resuspendačního media A. TC – Suspenze chloroplastů byla inkubována 60 min s 0,8 M Tris (pH 8,0) v poměru 1:10. Po inkubaci byla směs centrifugována a resuspendována jako u LC. LTC – Suspenze chloroplastů byla inkubována 5 min s lytickým médiem v poměru 1:10. Po 5 minutách bylo přidáno 10 dílů 1,6 M Tris (pH 8,0) a směs byla inkubována 60 min. Po inkubaci byla směs centrifugována a resuspendována jako u LC. TFC, LTFC – jako TC a LTC, ale současně s přidáním Tris přidáno malé množství zásobního roztoku FeCy, takže výsledná koncentrace byla 0,5 mM. Jako kontrola byl použit vzorek bez jakékoli inkubace. V závorkách jsou uvedeny odhady fotochemické aktivity získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s. Znázorněny jsou průměry z technických opakování (n=2). Vpravo: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody u stejných vzorků suspenze chloroplastů. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchylky z technických opakování (n=2).

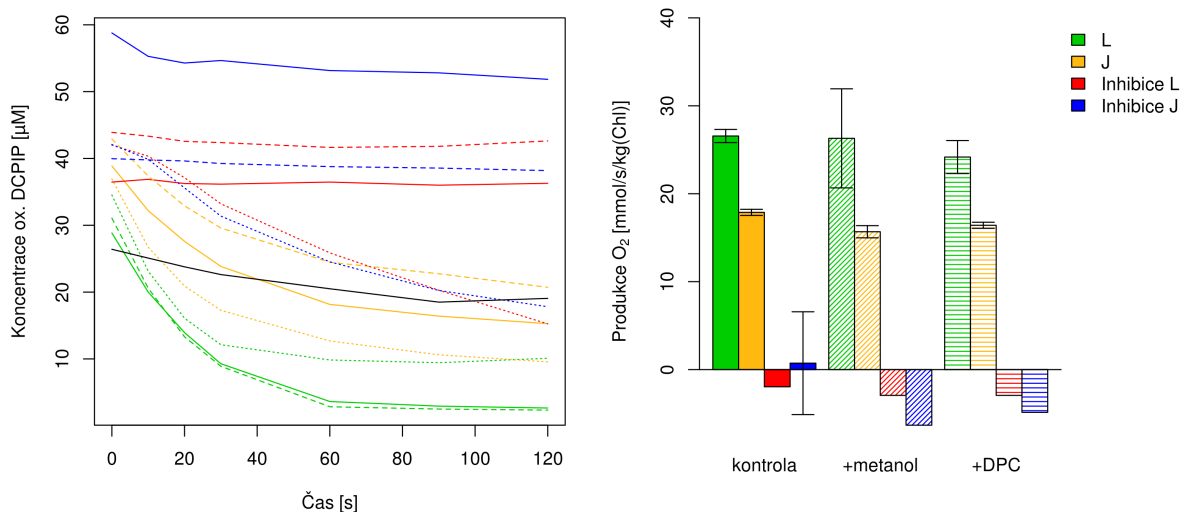
Vyplývá z nich, že působení lytického media samo o sobě snižuje aktivitu PS II jen mírně, v kombinaci s Tris a FeCy ale k inhibici OEC přispívá. Tento postup jsem se tedy rozhodla považovat za dostatečný a doporučit jej pro přípravu vzorků s inhibovaným OEC.

V následujícím pokusu jsem se již rozhodla uvedený postup vyzkoušet nejen na chloroplastech izolovaných z lupenitých listů (vzorky L) ale i z jehlic (vzorky J). Měřila jsem aktivitu PS II (polarograficky i spektrofotometricky) v kontrolních vzorcích a ve vzorcích s OEC inhibovaným výše uvedeným postupem (po izolaci ke vzorku přidáno lytické medium v poměru 1:10 a ponecháno 5 min v pokojové teplotě, přidán Tris a FeCy tak, že výsledný poměr chloproplastové suspenze:roztok byl 1:20 a výsledná koncentrace FeCy 5 mM a Tris 0,8 M, ponecháno v pokojové teplotě a poté centrifugováno při 5000x g 2 min a resuspendováno v resuspendačním mediu A (vzorky L) nebo B (vzorky J)). Zároveň jsem při měření k těmto čtyřem variantám vzorků již zkusila přidat DPC (výsledná koncentrace) a protože se DPC nerozpouští ani ve vodě, ani v etanolu, ale v metanolu, přidala jsem pro jistotu ke vzorkům i čistý metanol. DPC v roztoku samovolně redukuje DCPIP, proto jsem mezi spektrofotometrická měření zahrнула i průběh redukce DCPIP v kyvetě neobsahující žádné chloroplasty. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 36.

Podle očekávání při polarografických měřeních vzorky s inhibovaným OEC neprodukovaly kyslík a při spektrofotometrických měřeních nedocházelo k redukci DCPIP. Redukci DCPIP umožnilo přidání DPC, přidání čistého metanolu nikoli. Zajímavé bylo, že u chloroplastů izolovaných z jehlic DPC umožnil obnovení aktivity PS II přibližně na polovinu původních hodnot, zatímco u chloroplastů izolovaných z lupenitých listů pouze na cca třetinu (spektrofotometrické měření). Další zajímavostí byla spotřeba kyslíku pozorovaná při polarografickém měření u vzorků s inhibovaným OEC po přidání DPC nebo čistého metanolu.

V každém případě jsem mohla konstatovat, že mnou vypracovaný postup inhibice OEC u izolovaných chloroplastů skutečně funguje, lze ho aplikovat jak na rostliny s lupenitými listy, tak na jehličnany a využít k srovnání aktivity PS II mezi vzorky s inhibovaným OEC/normálními vzorky na základě spektrofotometrických měření rychlosti redukce DCPIP a za použití DPC jako umělého donoru elektronů. V každém případě jsem mohla konstatovat, že mnou vypracovaný postup inhibice OEC u izolovaných chloroplastů skutečně funguje, lze ho aplikovat jak na rostliny s lupenitými listy, tak na jehličnany a využít k srovnání aktivity PS II

mezi vzorky s inhibovaným OEC/normálními vzorky na základě spektrofotometrických měření rychlosti redukce DCPIP a za použití DPC jako umělého donoru elektronů.



- L (216,4 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- J (162,2 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- IL (3,1 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- IJ (64,2 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- - L+metanol (257,7 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- - J+metanol (143,8 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- - IL+metanol (19,3 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- - IJ+metanol (4,9 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- ... L+DPC (267,7 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- ... J+DPC (230,5 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- ... IL+DPC (69,9 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- ... IJ+DPC (92,8 $\mu\text{mol/s/g(Chl)}$)
- DPC+DCPIP (odpovídá 37,5)

Obr. 36: Vlevo: Závislost koncentrace oxidovaného DCPIP na čase pro vzorky izolovaných chloroplastů z *Spinacia oleracea* L. (vzorky L) a *Picea abies* (L.) Karst. (vzorky J). Inhibice (IJ, IL) – Po izolaci ke vzorku přidáno lytické médium v poměru 1:10 a ponecháno 5 min v pokojové teplotě, přidán Tris a FeCy tak, že výsledný poměr chloroplastové suspenze:roztok byl 1:20 a výsledná koncentrace FeCy 5 mM a Tris 0,8 M, ponecháno v pokojové teplotě a poté centrifugováno při 5000x g 2 min a resuspendováno v resuspendačním mediu A (vzorky L) nebo B (vzorky J). +metanol – Do reakční směsi byl přidán metanol tak, že výsledná koncentrace byla 1% (v/v). +DPC – Do reakční směsi přidán

DPC rozpuštěný v metanolu tak, že výsledná koncentrace DPC byla 0,5 mM, a metanolu 1% (v/v). V závorkách jsou uvedeny odhady fotochemické aktivity získané ze směrnice lineární regrese prvních 20 s. Znázorněny jsou průměry z technických opakování (n=2). Vpravo: Hodnoty fotochemické aktivity PS II (spřažené s fotofosforylací) měřené pomocí Clarkovy elektrody u stejných vzorků suspenze chloroplastů. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchylky z technických opakování (n=2).

6 Diskuze

Tato práce byla zaměřena na analýzu primárních fotosyntetických procesů u jehličnanů a měla tři hlavní cíle; podle toho byly také pokusy rozděleny do tří pokusných bloků. Jelikož účelem každého z těchto bloků bylo něco jiného a takto jsou popsány i v kapitolách Materiál a metody a Výsledky, budu se i zde zabývat každým pokusným blokem zvlášť.

V **prvním pokusném bloku** jsem se snažila porovnat parametry JIP-testu založeného na měření rychlé části křivky indukce fluorescence Chl (OJIP analýze) s fotochemickými aktivitami izolovaných chloroplastů měřenými polarograficky pomocí Clarkovy elektrody u osmi druhů jehličnanů. Nejsou mi známy práce, které by na jehličnanech takového porovnání prováděly, proto je velmi obtížné výsledky diskutovat. Naši původní hypotézou bylo, že mezidruhové rozložení hodnot těchto aktivit reprezentujících účinnost PS I a II a celého fotosyntetického ETC bude souhlasit s mezidruhovým rozložením hodnot těchto parametrů fluorescence Chl, které charakterizují účinnost odpovídajících částí fotosyntetického ETC. Tedy např. aktivita PS II měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů by mohla korelovat s parametry ϕ_{P0} , ϕ_{E0} , ψ_{E0} , $ET0/RC$ nebo PI_{ABS} , aktivita PS I by mohla korelovat s parametrem δ_{RE0} a aktivita celého řetězce by mohla korelovat s parametry ϕ_{R0} , ψ_{RE0} , $RE0/RC$ nebo PI_{TOTAL} . To jsem hodnotila pomocí Pearsonova korelačního koeficientu.

Překvapivě, žádná z korelací mi nevyšla statisticky významná. Některé hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu sice vyšly poměrně vysoké (i když statisticky nesignifikantní), v těch několika případech se ale jednalo o situace, kdy fluorescenční parametry, které vypovídají o toku elektronů z PS II až k PS I, byly srovnávány s polarograficky stanovenou aktivitou PS II a fluorescenční parametry, které vypovídají o vnitřních pochodech v PS II, byly srovnávány s aktivitou PS I. Tyto vysoké hodnoty lze tedy považovat za zcela náhodnou shodu.

Z výsledků vyvozují, že u jehličnanů nelze výsledky získané z OJIP analýzy fluorescence Chl nahradit výsledky polarografického měření a *vice versa*. V žádném případě nejde výsledky získané jednou metodou extrapolovat, resp. srovnávat s výsledky získanými metodou druhou. Každá z těchto metod poskytuje parametry, které vypovídají trochu o něčem jiném jak z fyzikálního/chemického, tak z biologického hlediska. Fluorescence Chl sleduje účinnost primárních fotosyntetických procesů v intaktních listech, odpovídá okamžitému

stavu odrážejícímu situaci, která souvisí s podmínkami prostředí, ve kterých se daný jehličnan zrovna nachází, s regulačními procesy, které v listech zrovna probíhají, s aktuálními anatomickými, biochemickými a fyziologickými vlastnostmi listu. Polarografické měření aktivity jednotlivých PS nebo celého fotosyntetického ETC probíhá v optimálních podmínkách, při dostatečném zásobení ETC donory/akceptory elektronů, při saturační ozářenosti, optimální teplotě atp. Tato metoda je tedy vhodná pro zjištění toho, jak by daný jehličnan (ať už by se jednalo o druh, genotyp, stresovaný či nestresovaný vzorek) reagoval v naprosto optimálních podmínkách, a měření fluorescence Chl se zase hodí pro zjištění konkrétní situace v konkrétních podmínkách. Obojí má tedy svou vlastní (jinou) vypovídací hodnotu a obě metody se doplňují spíše než překrývají. Rozhodně by ale bylo zajímavé toto porovnání vyzkoušet na více druzích jehličnanů.

Při izolaci chloroplastů se z jehlic také uvolňují různé obsahové látky, které mohou s měřením fotochemické aktivity v těchto podmínkách interferovat. K tomu pravděpodobně došlo v případě borovice *P. koraiensis* a jedle *A. sibirica*, které vykazovaly nulovou fotochemickou aktivitu PS II. V případě tohoto konkrétního druhu borovice je to zajímavé, protože Oku et al. (1974) sice při měření fotochemické aktivity chloroplastů izolovaných z jehlic *P. thurnbergii* (ETC z vody na DCPIP, tedy podobně jako v mém případě) také nezjistili aktivitu PS II (i když PS I fotochemicky aktivní u jejich vzorků byl), ale ti pracovali s etiolovanými semenáčky. V předchozí práci z naší laboratoře (Holá et al. 2012) *P. sylvestris* pěstovaná v normálních podmínkách vykazovala při polarografickém měření poměrně vysokou aktivitu PS II, stejně jako jiné druhy borovic (např. *P. contorta*, *P. cembra*, *P. nigra* Arnold, *P. aristata* Engelm. a *P. mugo* Turra). V dalších třech pracích, jejichž autoři prováděli polarografické měření fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů u borovic (Oku et Tomita 1971 a Oku et al. 1971 u *P. thunbergii* a Malhotra 1976 u *P. contorta*), se jednalo o přenos elektronů mezi vodou a FeCy, který může přebírat elektrony nejen za PS II, ale i za PS I (Izawa 1980). Tito autoři nicméně získali normálně měřitelné fotochemické aktivity chloroplastů.

V případě *A. sibirica* – jedle sibiřské – jsem potvrdila to, co při polarografickém měření aktivity PS II u jedlí pozorovaly již dříve moje kolegyně z Laboratoře genetiky rostlin, které ji hodnotily u druhů *A. koreana* Wils, *A. grandis* [Douglas] Lindl., *A. concolor* [Gordon] Lindl. ex Hildebr a *A. homolepis* Sieb. & Zucc. (Holá et al. 2012). Rovněž druh *Tsuga canadensis* [L.] Carriere sledovaný v tomto článku vykazoval velmi nízkou aktivitu PS II. Zdá se tedy, že

pro rod *Abies* (a možná i pro rod *Tsuga* a alespoň některé druhy borovic) je tato situace typická. Bylo by velmi zajímavé zjistit, jaké konkrétní látky se při izolaci chloroplastů z jehlic těchto druhů uvolňují a interferují s aktivitou PS II (aktivitu PS I přitom nijak neovlivňují). Pokud by byly identifikovány a pokud by se ukázalo, že takto působí i na jiné rostlinné druhy (např. plevele), mohly by být třeba potenciálně využity jako herbicidy.

V **druhém pokusném bloku** jsem vyzkoušela rychlé a nedestruktivní metody měření fluorescence Chl za účelem hodnocení jejich použitelnosti jakožto fyziologických markerů pro šlechtitele lesních dřevin. Hodnotila jsem západočeskou, geneticky definovanou populaci *P. sylvestris* na dvou plochách pokusných výsadeb (Nepomuk a Skelná Huť). *P. sylvestris* je v České republice druhým ekonomicky nejvýhodnějším rodem lesních stromů (hned po smrku) – pokrývá 16,9 % našich lesních porostů (Korecký 2012). Z hlediska genetiky a šlechtění je hlavní lesnickou činností zakládání semenných sadů. Sady první generace jsou sestaveny z klonů jedinců získaných z přirozené populace, které vykazují žádoucí fenotyp (Kaňák 2011). Sady dalších generací vznikají na základě výběru elitních jedinců se známými rodiči, u kterých byla co možná nejlépe prokázána heritabilita žádoucích vlastností. V České republice jsou u *P. sylvestris* zatím pouze semenné sady první generace (Kaňák 2011, Korecký 2012). Žádoucí fenotyp a kvalita stromu se dnes určuje pomocí parametrů jako je rychlost růstu, výška a tvar kmene, jeho šířka ve výši hrudi apod., což jsou v některých případech parametry obtížněji nebo zdlouhavěji hodnotitelné. Vhodným doplněním těchto klasických měření a možná i urychlením procesu tvorby sadů vyšších generací by mohly být parametry fyziologického rázu a v této souvislosti se uvažuje právě o měření účinnosti fotosyntetických procesů.

Vzhledem k tomu, že při hodnocení heritability a kvantitativně genetických analýzách, které se při šlechtění provádějí, je třeba hodnotit vždy velké množství vzorků co možná zároveň, nemohla jsem v této části použít metodu měření fotochemické aktivity pomocí Clarkovy elektrody pro její velkou časovou náročnost. Naproti tomu OJIP analýza je rychlá, nedestruktivní a jak jsem prokázala, i prakticky proveditelná u několika stovek vzorků. Zařadila jsem v této části také měření spektrální odrazivosti a spektrofotometrické stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů po jejich extrakci z jehlic, což jsou rovněž rychlé a snadno proveditelné metody měření fotosyntetických parametrů.

Genetická variabilita v měřeném parametru a jeho dědivost je zcela zásadní pro jeho

úspěšnou selekci. Většina parametrů, které jsem u *P. sylvestris* v tomto pokusném bloku měřila, vykazovala jak genetickou variabilitu, tak i určitou heritabilitu a bylo je tedy možné použít pro kvantitativní genetickou analýzu. Data z měření fluorescence Chl již takovouto analýzou prošla (provedli ji kolegové z Katedry genetiky a šlechtění lesních dřevin Fakulty lesnické a dřevařské ČZU v Praze, jejich práci zde tedy neuvádím a ani nediskutuji) a z těchto výsledků byl připraven článek „Variation in chlorophyll *a* fluorescence parameters in Scots pine is probably selectively neutral” (Čepl et al., submitted, Tree Physiology), jehož jsem spoluautorkou. Funkce *lmeKin()*, kterou jsem při stanovení heritability použila, mi sice neumožnila vypočítat střední chybu odhadu heritability, což by mohlo vést k určité nejistotě ohledně přesnosti koeficientů heritability uváděných v mé práci, nicméně moji kolegové z ČZU, kteří heritabilitu počítali pomocí analýzy založené na tzv. „univariate animal model“ v programu ASReml (Butler et al. 2007), potvrdili, že střední chyba koeficientů heritability je u většiny OJIP parametrů poměrně malá.

Z genetického hlediska je v souvislosti s primárními fotosyntetickými procesy také zajímavý fakt, že chloroplastová DNA je u jehličnanů děděna striktně po otcovské linii (Neale et Sederoff 1988). Analýza mateřské, respektive otcovské části genetické variability pomocí „animal modelu“ by ale bohužel vyžadovala řádově větší soubor měřených jedinců (osobní konzultace Ing. Jan Stejskal, Ph.D.).

Heritabilitu jsem stanovila pro obě testované plochy samostatně. Podle informací od kolegů z ČZU jsou hodnoty heritability kolem 0,2 u lesních stromů považovány za poměrně vysoké. Tuto hodnotu měla většina indexů heritability pro OJIP parametry, vypočítaných ze stromů na testovací ploše Nepomuk, v případě parametrů V_i , ϕ_{RO} , ψ_{RO} , δ_{RO} , RE_0/RC nebo PI_{TOTAL} , a dále parametrů γ_{RC} , ABS/RC a TP_0/RC i pro testovací plochu Skelná Huť. Zejména tyto parametry (které jsou spojené především s pozdější částí fotosyntetického ETC, tedy přenosem elektronu z Q_B na PS I akceptory, a dále s velikostí a funkcí světlosběrné antény) bych tedy pravděpodobně doporučila pro další rozbor.

V případě indexů spektrální odrazivosti byly rozdíly v odhadech heritability mezi oběma testovacími výsadbami větší. Vysokou heritabilitu vykazovaly parametry měřené na Skelné Huti, v případě Nepomuku byla heritabilita těchto indexů celkově nižší. Nicméně indexy MNDVI8, Datt99, Macc01, REIPderiv i REIP-4body, SR540/560, NDWI a WI také vykazovaly na obou pokusných plochách poměrně slušnou heritabilitu. První pětice těchto indexů má odpovídat obsahu Chl, index SR540/560 vyjadřuje poměr Chl/Kar, index NDWI

by měl odpovídat vodnímu potenciálu listů a index WI relativnímu obsahu vody. V případě obsahu pigmentů stanoveném po jejich extrakci z jehlic nebyly hodnoty heritability příliš vysoké s výjimkou poměru Chl/Kar a poměru Chl *a/b*.

Zajímavé je, že mnohé reflektanční indexy měly vyšší hodnotu heritability než parametry, které by měly promoci predikovat (tj. obsahy pigmentů stanovené po jejich extrakci z jehlic, nebo obsah vody). Týká se to všech parametrů, které jsou spojeny s obsahem Chl, a pro plochu Skelná huť to platilo i pro parametry predikující obsah Kar. Dalo by se možná spekulovat, že do spektra reflektance vstupují ještě další dědičné faktory, například minoritní obsahové látky nebo minoritní vlivy vnitřní struktury jehlice, které posouvají heritabilitu daného indexu směrem nahoru.

OJIP parametry bych tedy na základě svých výsledků pro potřeby kvantitativní genetické analýzy obecně upřednostnila před indexy spektrální odrazivosti, nicméně některé z výše uvedených indexů spektrální odrazivosti lze k hodnocení genetické variability a stanovení heritability rozhodně také doporučit.

Rozdíly mezi hodnotami těchto odhadů na obou testovacích plochách se mohou zdát překvapivé. Je však třeba si uvědomit, že heritabilita vztahuje genetickou (aditivní) složku variability k celkové variabilitě a celková variabilita se může měnit v závislosti na různorodosti prostředí. Testovací plocha Nepomuk je z pedologického hlediska různorodější než testovací plocha Skelná huť, což může vysvětlovat, proč byla heritabilita u mnoha parametrů na této ploše nižší. Corcuera et al. (2011), kteří měřili heritabilitu některých parametrů odvozených z pomalé fáze kinetiky indukce fluorescence Chl u druhu *P. pinaster* pěstovaného na mezofytním a xerofytním stanovišti během teplé a chladné zimy, nezjistili žádnou významnou dědivost u parametru F_v/F_m ani Φ_{PSII} , výše heritability qP byla 0,41, ale pouze na xerofytním stanovišti v podmínkách teplejší zimy, a výše heritability u parametru NPQ byla 0,39, resp. 0,23 v podmínkách chladnější, resp. teplejší zimy, ale opět pouze na xerofytním stanovišti.

Semenný sad Doubrava, který je testován na ploše Skelná huť, navíc obsahuje téměř dvojnásobné množství klonů než semenný sad Silov u Nepomuka a stromy hodnocené na ploše Skelná huť měly tedy větší genetickou variabilitu a možná i geneticky podmíněnou variabilitu fenotypů než stromy na ploše Nepomuk.

Je také třeba zdůraznit, že aktivita primárních fotosyntetických procesů v jednom časovém bodě může být jen těžko považována za charakteristiku, na jejímž základě by měla být

prováděna přímo selekce žádoucích stromů. O rychlosti růstu u jehličnanů by mohl více vypovídat např. průběh fotosyntetické aktivity během roku. Bude také zajímavé porovnat výsledky zjištěné na plochách testovacích výsadeb (moje diplomová práce) s výsledky měření, která byla v r. 2015 prováděna na rodičovských stromech v semenných sadech (diplomová práce Anny Šafránkové, v přípravě).

Dalším důležitým úkolem tohoto pokusného bloku bylo posoudit, jak dobře jednotlivé reflektanční indexy odpovídají hodnotám obsahu látek, kvůli kterým byly do této práce zařazeny. Sada parametrů MNDVI8, Datt99, Macc01, VOG1, REIP-4body, REIPderiv, ZM, NDVIre, ROSAVI, PSSRa, PSSRb, CIred edge, DattNIR CabCar a TCARI/OSAVI byla do hodnocení zařazena, protože v literatuře vykazovala dobrou korelaci s obsahem Chl. U všech těchto indexů jsem našla signifikantní korelaci s celkovým obsahem Chl i s obsahy Chl *a* a Chl *b*. Tyto indexy tak mohou ve shodě s literaturou doporučit k aplikaci jakožto nedestruktivní metodu odhadu obsahu Chl. Jako vůbec nejlepší se ukázal index REIP-4body. Doporučuji tedy pro *P. sylvestris* v našich podmínkách použít metodu výpočtu REIP podle Guyot et Baret (1988) preferenčně před výpočtem pomocí derivace. U ostatních indexů jsem sice našla několik signifikantních korelací, ale hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu byly malé a nelze je považovat za prakticky použitelné pro odhad obsahu dané látky.

V třetím pokusném bloku jsem se snažila zavést metodu inhibice OEC a metodu spektrofotometrického měření aktivity PS II na základě transportu elektronů z umělého donoru elektronů DPC (který do fotosyntetického ETC vstupuje až za OEC) skrze PS II na umělý akceptor elektronů DCPIP a vyzkoušet použitelnost takové metody u jehličnanů. V literatuře jsem našla pouze jedinou práci, jejíž autoři se o něco takového u jehličnanů pokoušeli, a to studii Eastman et al. (1998) na semenáčcích křížence *P. glauca* x *P. engelmannii* stresovaných suchem. Srovnání rychlosti přenosu elektronů u chloroplastů s inhibovaným OEC pomocí takového „obchvatu“ s rychlostí přenosu elektronů z H₂O u chloroplastů bez uměle inhibovaného OEC by umožnilo odhalit případné poškození OEC ve studovaném vzorku a kvantifikovat míru tohoto poškození. Tato měření by v Laboratoři genetiky rostlin v budoucnu mohla být použita k různým účelům jak u jehličnanů, tak u alších rostlinných druhů; proto (a také proto, že metodiky popsané v literatuře byly vyvinuty pro jiné rostlinné druhy než jehličnany) jsem v tomto případě většinu pokusů primárně prováděla na rostlinách s lupenitými listy.

Jakožto rozpouštědlo pro DPC je v protokolech, na které jsem narazila, použit metanol, bez toho, aby byl diskutován jeho vliv na měření. Je známo, že metanol interaguje s OEC (Ho et Styring 2008). Jiné rozpouštědlo použít nelze, ale výzkumník používající tuto metodu by si měl být vědom jeho potenciálního vlivu na měření. Nicméně v mých vlastních pokusech jsem ovlivnění aktivity PS II přidáním metanolu v takovém množství, jaké se přidává, pokud je používán DPC, nepozorovala, a to ani na produkci kyslíku při polarografickém měření, ani na rychlost redukce DCPIP při spektrofotometrickém měření.

Protože při přenosu elektronů z DPC na DCPIP nevzniká ani není rozkládán kyslík, musela jsem použít metodu jinou než měření koncentrace kyslíku pomocí Clarkovy elektrody. Spektrofotometrické stanovení rychlosti redukce DCPIP nebylo dosud v naší laboratoři použito, a proto jsem na začátku řešila určité problémy technického rázu. Experimentální uspořádání, které použili někteří autoři (Oku et Tomita 1976) a které zahrnovalo ozařování vzorků přímo ve spektrofotometru za současné ochrany čidla pomocí různých filtrů, nebylo v mých podmínkách prakticky proveditelné a proto jsem zvolila metodu technicky jednodušší, při které je absorbance měřena jen ve vybraných časových bodech.

Prvním problémem, se kterým jsem se setkala, bylo, že průběh redukce DCPIP v čase v mnohých případech neobsahoval úvodní lineární část, ale rychlost redukce DCPIP klesala už od začátku měření. To je výsledek odlišný od výsledků, se kterými jsem se setkala v literatuře. Öquist et al. (1974) sledovali reakci v řádu minut až 20 min, zdroj <http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/investigating-light-dependent-reaction-photosynthesis> uvádí stabilní reakci 10–20 min. Tůmová (2001), Nováková (2003) a Pacholíkova (2009), z jejichž metodiky jsem především vycházela, určovaly počáteční rychlost redukce DCPIP pomocí extrapolace. Otázkou pro mě však bylo, jakou funkci proložit získanými daty. Fotosyntéza není jednoduchá chemická reakce, a proto nelze z teorie odvodit funkci, kterou by průběh redukce DCPIP měl opisovat. Vyzkoušela jsem data proložit několika funkcemi, především polynomy různého stupně. Regresní křivka sestavená z polynomů 1.–4. stupně neopisovala tvar průběhu redukce DCPIP, polynom 5. stupně již byl poměrně odpovídající, ale směrnice v bodě $t = 0$ s příliš citlivě reagovala na drobné odchylky v měřeních v jednotlivých časech, což v mnohých případech vedlo k nesmyslným hodnotám. Zavrhla jsem tedy snahu proložit křivku daty v celém časovém úseku a stanovila jsem hodnoty směrnice lineární regrese pro prvních 20 s měření, protože u většiny měření byl tento úsek poměrně rovný. V případě, že rychlost redukce DCPIP skutečně klesá od začátku

měření, bude tento způsob výpočtu systematicky mírně podhodnocovat odhad počáteční rychlosti. Toto systematické podhodnocení není ale problém pro porovnání různých vzorků mezi sebou.

Hlavním problémem, se kterým jsem se v třetím pokusném bloku setkala, bylo, že metoda inhibice OEC pomocí inkubace s Tris tak, jak byla popsána v literatuře (Vernon et Shaw 1969, Castelo-Branco et al. 2008), nefungovala v mých pokusech dostatečně účinně. Musela jsem provést řadu pokusů a modifikací, než jsem dosáhla uspokojivého výsledku. Jejich sled a úvahy, které mě vedly k jednotlivým modifikacím a zkoušení různých variant, částečně rozebírám již v kapitole Výsledky. Postup, ke kterému jsem nakonec dospěla, zahrnoval hodinovou inkubaci vzorku izolovaných chloroplastů s Tris a FeCy v pokojové teplotě, kterému předcházelo krátké vystavení hypotonickému médiu za účelem uvolnění tylakoidů do roztoku. Toto zacházení se vzorkem je o poznání „hrubší“ než zacházení popsané v literatuře, ze které jsem původně vycházela (5 min s Tris v pokojové teplotě – Vernon et Shaw 1969, 30 min s Tris ve 4 °C – Castelo-Branco et al. 2008). Vystává tedy otázka, zda při něm nedochází k degradaci některých složek fotosyntetického aparátu takovým způsobem, který by interferoval s následnými měřeními. Určitým uklidněním může být fakt, že tepelný šok byl v literatuře (Dean et Pocock 2004) také popsán jako způsob inhibice OEC. Dá se tedy předpokládat, že OEC je náchylnější k degradaci působením tepla než ostatní složky fotosyntetického ETC. Protože jsem u vzorků inkubovaných hodinu v pokojové teplotě při paralelním polarografickém měření zjistila jen mírné snížení produkce kyslíku, mohu si dovolit předpokládat, že poškození částí PS II, které se podílejí na přenosu elektronů z DPC na DCPIP, je ještě mírnější.

V závěru tohoto pokusného bloku jsem vyzkoušela aplikaci DPC jakožto umělého donoru elektronů a metodu vypracovanou na vzorcích z rostlin s lupenitými listy jsem vyzkoušela i na smrku. Mohla jsem konstatovat, že metoda funguje: DPC obnovilo transport elektronů u obou použitých druhů a měření bylo technicky realizovatelné. Mé výsledky v tomto pokusném bloku lze však považovat za prvotní zkoušky. V budoucnu bude jistě třeba vyzkoušet tuto metodu na dalších druzích jehličnanů a více zhodnotit její přesnost a spolehlivost.

Závěrem lze konstatovat, že všechny tři hlavní cíle této práce byly podle mého názoru splněny. V některých případech ale otevřely nové otázky, které by mohly být dále studovány.

7 Souhrn

- 1) Měření aktivity pigment-proteinových komplexů tylakoidních membrán u 8 druhů jehličnanů pomocí dvou principiálně odlišných metod (polarografické stanovení fotochemické aktivity Fotosystémů I a II a celého fotosyntetického elektron-transportního řetězce v izolovaných chloroplastech a měření rychlé části indukční křivky fluorescence chlorofylu) neukázalo mezi výsledky těchto metod žádnou korelaci. Výsledky jedné z těchto metod tedy není možné srovnávat s výsledky metody druhé, každé mají svou (jinou) vypovídací hodnotu. Polarografická metoda je vhodná pro zjištění toho, jak by daný jehličnan reagoval v naprosto optimálních podmínkách, měření fluorescence chlorofylu se hodí pro zjištění konkrétní situace za daných podmínek prostředí, ve kterých se daný jehličnan zrovna nachází, a souvisí s okamžitými biochemickými, fyziologickými, případně anatomickými vlastnostmi jehlic.
- 2) Na 536 jedincích pocházejících z dvou geneticky definovaných výsadeb *Pinus sylvestris* pocházejících ze západních Čech byla měřena rychlá část fluorescenční indukční křivky a stanoveny parametry JIP-testu. Dále byla změřena spektra reflektance jehlic a stanovena řada reflektančních indexů, a také stanoveny obsahy Chl a Kar po jejich extrakci z jehlic a obsah vody v jehlicích. Ve všech parametrech byla zjištěna genetická variabilita. Některé parametry JIP testu (V_I , Φ_{R0} , Ψ_{R0} , δ_{R0} , γ_{RC} , ABS/RC, TP0/RC, RE0/RC) a reflektanční indexy (MNDVI8, Datt99, Macc01, REIP) vykázaly poměrně vysokou heritabilitu (>0,15) pro obě testované výsadby. Je možné je tedy použít jakožto pomocné parametry ve šlechtění a pro účely kvantitativní genetické analýzy.
- 3) Reflektanční indexy MNDVI8, Datt99, Macc01, VOG1, REIP, ZM, NDVIre, ROSAVI, PSSRa, PSSRb, CIred edge, DattNIR CabCar, TKARI/OSAVI vykazovaly u *Pinus sylvestris* silnou korelaci s obsahem Chl v jehlicích a jsou tedy vhodné pro rychlý a neinvazivní odhad obsahu těchto látek. Reflektanční indexy doporučené v literatuře k odhadu obsahu Kar, poměru Chl a Kar, poměru Chl *a/b*, relativního obsahu vody nebo vodního potenciálu nevykázaly dostatečně silnou korelaci s příslušnými obsahy látek. Jejich praktické využití k odhadu těchto vlastností jehlic tedy nedoporučuji.
- 4) Vypracovala jsem postup spektrofotometrického měření fotochemické aktivity

Fotosystému II (přenos elektronů z umělého donoru elektronů 1,5-difenyلكarbazidu na umělý akceptor 2,6-dichlorofenolindofenol) za současné inhibice komplexu produkujícího kyslík, použitelný i pro jehličnany. Postup se liší od protokolů ve výše popsané literatuře zejména metodou inhibice OEC komplexu produkujícího kyslík, která je složitější a delší, ale účinnější.

8 Seznam použité literatury

- Afif, D., Canut, H., Dizengremel, P. (1995) *Purification of intact chloroplasts from spruce (Picea abies) by free-flow electrophoresis*. *Physiologia Plantarum*, 93(4), 745–749.
- Armstrong, W. (1994) *Polarographic oxygen electrodes and their use in plant aeration studies*. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences, 102, 511–527.
- Amon, D. I. (1949) *Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1–15.
- Barr R., Crane F.L. (2005) *Inhibition or inactivation of higher plant chloroplast electron transport*. In: Pessaraki, M. (Ed.). *Handbook of photosynthesis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 149–168.
- Bartoš J., Berková E., Šetlík I. (1975) *Versatile chamber for gas exchange measurements in suspensions of algae and chloroplasts*. *Photosynthetica* 9, 395–406.
- Benešová, M. (2014) *Odlíšná reakce inbredních a hybridních genotypů kukuřice na sucho: analýza listového proteomu a fotosyntetických procesů*. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Bigras, F.J. (2000) *Selection of white spruce families in the context of climate change: heat tolerance*. *Tree Physiology* 2(18), 1227–1234.
- Bigras, F.J. (2005) *Photosynthetic response of white spruce families to drought stress*. *New Forests* 29(2), 135–148.
- Blackburn, G.A. (1998) *Quantifying chlorophylls and carotenoids at leaf and canopy scales: An evaluation of some hyperspectral approaches*. *Remote Sensing of Environment* 66, 273–285.
- Blodner, C., Skroppa, T., Johnsen, O., Polle, A. (2005) *Freezing tolerance in two Norway spruce (Picea abies [L.] Karst.) progenies is physiologically correlated with drought tolerance*. *Journal of Plant Physiology* 162(5), 549–558.
- Bown, H.E., Mason, E.G., Clinton, P.W., Watt, M.S. (2009) *Chlorophyll fluorescence response of Pinus radiata clones to nitrogen and phosphorus supply*. *Ciencia e Investigacion Agraria* 36(3), 451–464.
- Braslavsky, S. E., Houk, K. N., Verhoeven, J. W. (1996). *Glossary of terms used in photochemistry*. International Union of Pure and Applied Chemistry.
- Brestic, M., Zivcak, M. (2013) *PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications*. In: Rout, G.R., Das, A.B. (Eds.) *Molecular Stress Physiology of Plants*. Springer, Dordrecht – Heidelberg – New York – London, pp. 87–131.
- Brouers, M., Wolwertz, M. R. (1980). *Stability of etiochloroplasts isolated from pine cotyledons as studied by means of low temperature absorption and fluorescence spectroscopy*. *Photosynthesis Research* 1(2), 93–104.
- Buschmann C. (2007) *Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves*. *Photosynthesis Research* 92, 261–271.
- Butler, D., Cullis, B.R., Gilmour, A.R., Gogel, B.J. (2007) *ASReml-R reference manual. AsReml-R estimates variance components under a general linear mixed model by residual maximum likelihood (REML)*. State Queensland, Dep. Prim. Ind. Fish. Brisbane, Queensland, Australia
- Castelo-Branco, P.A., dos Santos, F.J.L., Rubinger, M.M.M., Ferreira-Alves, D.L., Pilo-Veloso, D., King-Diaz, B., Lotina-Hennsen, B. (2008) *Inhibition and uncoupling of photosynthetic electron transport by diterpene lactone amide derivatives* *Zeitschrift fur Naturforschung Section C – Journal of Biosciences* 63(3-4), 251–259.

- Corcuera, L., Gil-Pelegrin, E., Notivol, E. (2011) *Intraspecific variation in Pinus pinaster PSII photochemical efficiency in response to winter stress and freezing temperatures*. PLoS ONE 6(12), e28772.
- Corrêa, A., Strasser, R. J., Martins-Loução, M. A. (2008). *Response of plants to ectomycorrhizae in N-limited conditions: which factors determine its variation?* Mycorrhiza 18(8), 413–427.
- Croft, H., Chen, J.M., Zhang, Y. (2014) *The applicability of empirical vegetation indices for determining leaf chlorophyll content over different leaf and canopy structures*. Ecological Complexity 17, 119–130.
- Datt, B. (1998) *Remote sensing of chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b, and total carotenoid content in Eucalyptus leaves*. Remote Sensing of Environment 66, 111–121.
- Datt, B. (1999) *Visible/near infrared reflectance and chlorophyll content in Eucalyptus leaves*. International Journal of Remote Sensing 20, 2741–2759.
- Dean, R. L., Pocock, T. (2004) *Diphenyl carbazide restores electron transport in isolated, illuminated chloroplasts after electron transport from water has been eliminated by mild heat treatment*. Biochemistry and Molecular Biology Education 32(6), 381–389.
- Drechsler, Z., Neumann, J. (1982) *Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts by ferricyanide*. Plant Physiology, 70(3), 840–843.
- Ducruet, J. M., Vass, I. (2009) *Thermoluminescence: experimental*. Photosynthesis research, 101(2–3), 195–204.
- Duysens, L. N. M., Sweers, H. E. (1963). *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*. In: Japanese Society of Plant Physiologists. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 353–372.
- Eastman, P. A. K., Rashid, A., Camm, E. L. (1998). *Changes of the photosystem 2 activity and thylakoid proteins in spruce seedlings during water stress*. Photosynthetica, 34(2), 201–210.
- Eitel, J.U., Gessler, P.E., Smith, A.M., Robberecht, R. (2006) *Suitability of existing and novel spectral indices to remotely detect water stress in Populus spp*. Forest Ecology and Management 229(1), 170–182.
- Farjon, A. (2010) *Handbook of the World's Conifers*. Brill Academic Publishers, Leiden-Boston.
- Fernandez-Jaramillo, A.A., Duarte-Galvan, C., Contreras-Medina, L.M., Torres-Pacheco, I., Romero-Troncoso, R.D.J., Guevara-Gonzalez, R.G., Millan-Almaraz, J.R. (2012) *Instrumentation in developing chlorophyll fluorescence biosensing: A review*. Sensors 12(9), 11853–11869.
- Gamon, J. A., Peñuelas, J., Field, C. B. (1992) *A narrow-wave band spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency*. Remote Sensing of Environment 41, 35–44.
- Gao, B.C. (1996) *NDWI: A normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space*. Remote Sensing of Environment 58(3), 257–266.
- Garza-Ortiz, A., King-Díaz, B., Sosa-Torres, M. E., Lotina-Hennsen, B. (2004) *Interference of ruthenium red analogues at photosystem II of spinach thylakoids*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 76(1), 85–94.
- Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N., (1994) *Quantitative estimation of chlorophyll-a using reflectance spectra: experiments with autumn chestnut and maple leaves*. Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology 22, 247–252.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C., Lichtenthaler, H.K. (1998). *Leaf chlorophyll fluorescence corrected for reabsorption by means of absorption and reflectance measurements*. Journal of Plant Physiology 152(2), 283–296.

- Gitelson, A. A., Gritz, U., Merzlyak, M. N. (2003) *Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves*. Journal of Plant Physiology 160, 271–282.
- Gitelson, A. A., Keydan, G. P., Merzlyak, M. N. (2006) *Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin content in higher plant leaves*. Geophysical Research Letters, 33, L11402.
- Goltsev, V., Zaharieva, I., Chernev, P., Strasser, R. J. (2009) *Delayed fluorescence in photosynthesis*. Photosynthesis Research, 101(2–3), 217–232.
- Gomory, D., Foffova, E., Kmet, J., Longauer, R., Romsakova, I. (2010) *Norway spruce (Picea abies [L.] Karst.) provenance variation in autumn cold hardiness: adaptation or acclimation?* Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 52(2), 42–49.
- Gould, P. D., Diaz, P., Hogben, C., Kusakina, J., Salem, R., Hartwell, J., Hall, A. (2009) *Delayed fluorescence as a universal tool for the measurement of circadian rhythms in higher plants*. The Plant Journal, 58(5), 893–901.
- Govindjee. (1995) *Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence*. Australian Journal of Plant Physiology 22(4), 131–160.
- Govindjee (2004) *Chlorophyll a fluorescence: A bit of basic history*. In: Papageorgiou G.C., Govindjee, (eds) *Chlorophyll a Fluorescence. A signature of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, pp 1–42.
- Grigor'ev, Y. S., Pakhar'kova, N. V. (2001) *Effect of industrial environmental pollution on winter dormancy in Scotch Pine*. Russian Journal of Ecology, 32(6), 437–439.
- Guyot, G., Baret, F., (1988) *Utilisation de la Haute Resolution Spectrale Pour Suivre l'état des Couverts Végétaux. Proceedings, 4th international colloquium "spectral signatures of objects in remote sensing*. ESA Publication, SP-287, Paris, 279–286.
- Gyllenstrand, N., Karlgren, A., Clapham, D., Holm, K., Hall, A., Gould, P. D., Källman T., Lagercrantz, U. (2014) *No time for spruce: rapid dampening of circadian rhythms in Picea abies (L. Karst)*. Plant and Cell Physiology, 55(3), 535–550.
- Haboudane, D., Miller, J. R., Tremblay, N., Zarco-Tejada, P. J., Dextraze, L. (2002) *Integrated narrow-band vegetation indices for prediction of crop chlorophyll content for application to precision agriculture*. Remote Sensing of Environment 81, 416–426.
- Hall, D.O. (1972) *Nomenclature for isolated chloroplasts*. Nature – New Biology, 235(56), 125–126.
- Hernández-Clemente, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Suárez, L., Morales, F., Zarco-Tejada, P.J. (2011) *Assessing structural effects on PRI for stress detection in conifer forests*. Remote Sensing of Environment, 115, 2360–2375.
- Hernández-Clemente, R., Navarro-Cerrillo, R. M., Zarco-Tejada, P. J. (2012) *Carotenoid content estimation in a heterogeneous conifer forest using narrow-band indices and PROSPECT+DART simulations*. Remote Sensing of Environment 127, 298–315.
- Ho, F.M., Styring, S. (2008) *Access channels and methanol binding site to the CaMn 4 cluster in photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1777(2), 140–153.
- Holá, D., Langrová, K., Kočová, M., Rothová, O. (2003). *Photosynthetic parameters of maize (Zea mays L.) inbred lines and F1 hybrids: their different response to, and recovery from rapid or gradual onset of low-temperature stress*. Photosynthetica, 41(3), 429–442.

- Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Hlízová, E., Fridrichová, L., Lhotáková, Z., Albrechtová, J. (2012) *A universal method for the isolation of photochemically active broken chloroplasts from conifer needles and its possible application in photosynthetic studies*. *Photosynthetica* 50(2), 291–304.
- Itoh, S., Kuramitsu, S., Oku, T., Nishimura, M. (1981) Changes of time courses of delayed fluorescence and prompt fluorescence during in vivo and in vitro photoactivation of the oxygen-evolving system in dark-grown spruce seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 881–889.
- Ivanov, A., Sane, P., Zeinalov, Y., Malmberg, G., Gardeström, P., Huner, N., Öquist, G. (2001) *Photosynthetic electron transport adjustments in overwintering Scots pine (Pinus sylvestris L.)*. *Planta*, 213(4), 575–585.
- Ivanov, A., Sane, P., Zeinalov, Y., Simidjiev, I., Huner, N., Öquist, G. (2002) *Seasonal responses of photosynthetic electron transport in Scots pine (Pinus sylvestris L.) studied by thermoluminescence*. *Planta*, 215(3), 457–465.
- Ivanov, A. G., Krol, M., Sveshnikov, D., Malmberg, G., Gardeström, P., Hurry, V., Öquist, G., Huner, N. P. (2006). *Characterization of the photosynthetic apparatus in cortical bark chlorenchyma of Scots pine*. *Planta* 223(6), 1165–1177.
- Izawa S. (1980) *Acceptors and donors for chloroplast electron transport*. *Methods in Enzymology* 69, 413–434
- Kaňák J. (2011) *Návrh šlechtitelských postupů pro borovici lesní v západních a jižních Čechách*. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská.
- Katanić, Z., Atić, L., Ferhatović, D., Cesar, V., Lepeduš, H. (2012). *PSII photochemistry in vegetative buds and needles of Norway spruce (Picea abies L. Karst.) probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurement*. *Acta Biologica Hungarica* 63(2), 218–230.
- Keyworth, S., Jarmann, M., Medcalf, K. (2009) *Assessing the extent and severity of erosion on the upland organic soils of Scotland using Earth observation*. Environment Systems Limited, Aberystwyth.
- King-Díaz, B., Pérez-Reyes, A., dos Santos, F. J. L., Ferreira-Alves, D. L., Veloso, D. P., Carvajal, S. U., Lotina-Hennsen, B. (2006) *Natural diterpene β -lactone derivative as photosystem II inhibitor on spinach chloroplasts*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(2), 109–115.
- Kočová M. (1980) *Simulace heterozního efektu v aktivitě Hillovy reakce u směsných vzorků chloroplastů kukuřice*. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Koehn, A.C., Roberds, J.H., Doudrick, R.L. (2003) *Variation among slash pine families in chlorophyll fluorescence traits*. *Canadian Journal of Forest Research* 33(6), 1102–1109.
- Korecký, J. (2012) *Zakládání druhé generace semenných sadů borovice lesní. Molekulárně - genetická část*. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská.
- Krasnovsky, A.A. (2007). *Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research*. *Biochemistry (Moscow)* 72(10), 1065–1080.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991) *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics*. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 313–349.
- Krieger-Liszkay, A. (2005) *Singlet oxygen production in photosynthesis*. *Journal of Experimental Botany*, 56(411), 337–346.
- Lewandowska, M., Hart, J. W., Jarvis, P. G. (1976) *Photosynthetic electron transport in plants of Sitka spruce subjected to differing light environments during growth*. *Physiologia Plantarum*, 37(4), 269–274.
- Lewandowska, M., Hart, J. W., Jarvis, P. G. (1977) *Photosynthetic electron transport in shoots of Sitka spruce from different levels in a forest canopy*. *Physiologia Plantarum*, 41(2), 124–128.

- Lewandowska, M., Öquist, G. (1980) *Development of photosynthetic electron transport in Pinus silvestris*. *Physiologia Plantarum* 48(1), 134–138.
- Lopez, R., Rodriguez-Calcerrada, J., Gil, L. (2009) *Physiological and morphological response to water deficit in seedlings of five provenances of Pinus canariensis: potential to detect variation in drought-tolerance*. *Trees – Structure and Function* 23(3), 509–519.
- Louis, J., Ounis, A., Ducruet, J. M., Evain, S., Laurila, T., Thum, T., Aurelab M., Wingslec G., Alonsod L., Pedrosd R., Moya, I. (2005) *Remote sensing of sunlight-induced chlorophyll fluorescence and reflectance of Scots pine in the boreal forest during spring recovery*. *Remote Sensing of Environment* 96(1), 37–48.
- Luttge, U., Escher, P., Paluch, R., Pfan, H., Wittmann, C., Rennenberg, H., Rakowski, K. (2011) *Variability of photosynthetic capacity and water relations of Pinus sylvestris L. in the field*. *Biologia Plantarum* 55(1), 90–98.
- Maccioni, A., Agati, G., Mazzinghi, P. (2001) *New vegetation indices for remote measurement of chlorophylls based on leaf directional reflectance spectra*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B – Biology* 61, 52–61.
- Major, J.E., Barsi, D.C., Mosseler, A., Campbell, M., Rajora, O.P. (2003) *Light-energy processing and freezing-tolerance traits in red spruce and black spruce: species and seed-source variation*. *Tree Physiology* 23, 685–694.
- Major, J.E., Barsi, D.C., Mosseler, A., Rajora, O.P., Campbell, M. (2007) *Predominant paternal inheritance pattern of light-energy processing adaptive traits in red and black spruce hybrids*. *Canadian Journal of Forest Research* 37, 293–305.
- Major, J.E., Mosseler, A., Barsi, D.C., Corriveau-Dupuis, B., Campbell, M. (2009) *Impact of three silvicultural treatments on growth, light-energy processing, and related needle-level adaptive traits of Pinus strobus from two regions*. *Forest Ecology and Management* 257, 168–181.
- Makovec P. (1975) *Kvantitativní genetická analýza Hillový reakce u tabáku a kukuřice*. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Malhotra, S. S. (1976). *Effects of sulphur dioxide on biochemical activity and ultrastructural organization of pine needles chloroplasts*. *New Phytologist*, 76(2), 239–245.
- Manes, F., Donato, E., Vitale, M. (2001). *Physiological response of Pinus halepensis needles under ozone and water stress conditions*. *Physiologia Plantarum* 113(2), 249–257.
- Marshall, J.D., Rehfeldt, G.E., Monserud, R.A. (2001) *Family differences in height, growth and photosynthetic traits in three conifers*. *Tree Physiology* 21, 727–734.
- Martin, B., Mårtensson, O., Öquist, G. (1978) *Effects of frost hardening and dehardening on photosynthetic electron transport and fluorescence properties in isolated chloroplasts of Pinus silvestris*. *Physiologia Plantarum* 43(3), 297–305.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000). *Chlorophyll fluorescence – a practical guide*. *Journal of Experimental Botany* 51(345), 659–668.
- Meggio, F., Zarco-Tejada, P.J., Núñez, L.C., Sepulcre-Cantó, G., Gonzalez, M.R., Martin, P. (2010). *Grape quality assessment in vineyards affected by iron deficiency chlorosis using narrow-band physiological remote sensing indices*. *Remote Sensing of Environment*, 114, 1968–1986.
- Meinander, O., Somersalo, S., Holopainen, T., Strasser, R. J. (1996). *Scots pines after exposure to elevated ozone and carbon dioxide probed by reflectance spectra and chlorophyll a fluorescence transients*. *Journal of Plant Physiology*, 148(1), 229–236.

- Meroni, M., Rossini, M., Guanter, L., Alonso, L., Rascher, U., Colombo, R., Moreno, J. (2009) *Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications*. Remote Sensing of Environment 113(10), 2037–2051.
- Merzlyak, M.N., Gitelson, A.A., Chivkunova, O.B., Rakitin, V.Y. (1999). *Non-destructive optical detection of leaf senescence and fruit ripening*. Physiologia Plantarum 106, 135–141.
- Mikšovská, J. (1994) *Fotosystém II izolovaný ze sinice Synechococcus elongatus, stabilizace fotochemické aktivity glycin betainem*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Michelozzi, M., Loreto, F., Colom, R., Rossi, F., Calamassi, R. (2011) *Drought responses in Aleppo pine seedlings from two wild provenances with different climatic features*. Photosynthetica 49(4), 564–572.
- Misra A.N., Misra M., Singh R. (2012). *Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. In: Misra A.N. (Ed.) *Biophysics*, InTech, Rijeka, Chorvatsko, pp. 171–192
- Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K. (2001) *Non-photochemical quenching. A response to excess light energy*. Plant Physiology, 125(4), 1558–1566.
- Murakami A. (1997) *Quantitative analysis of 77K fluorescence emission spectra in Synechocystis sp. PCC 6714 and Chlamydomonas reinhardtii with variable PS I/PS II stoichiometries*. Photosynthesis Research 53, 141–148.
- Mutanga, O., Skidmore, A.K. (2004) *Narrow band vegetation indices overcome the saturation problem in biomass estimation*. International Journal of Remote Sensing 25(19), 3999–4014.
- Neale, D.B., Sederoff, R.R. (1988) *Inheritance and evolution of conifer organelle genomes*. In: Hanover, J., Keathley, D. (Eds.) *Genetic Manipulation of Woody Plants*. Plenum Press. New York, pp. 251–264.
- Nippert, J.B., Duursma, R.A., Marshall, J.D. (2004) *Seasonal variation in photosynthetic capacity of montane conifers*. Functional Ecology 18(6), 876–886.
- Nováková, M. (2003) *Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát fotoautotrofních organismů, vzájemné porovnání sinic a vyšších rostlin* Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Oku, T., Kawahara, H., Tomita, G. (1971). *The Hill reaction and oxygen uptake in isolated pine chloroplasts*. Plant and Cell Physiology 12(4), 559–566.
- Oku, T., Tomita, G. (1971) *Preparation of photoactive chloroplasts from pine leaves*. Photosynthetica 5(1), 28–31.
- Oku, T., Sugahara, K., Tomita, G. (1974). *Functional development of photosystems I and II in dark-grown pine seedlings*. Plant and Cell Physiology, 15(1), 175–178.
- Oku, T., Hayashi, H., Tomita, G. (1975). *Oxygen evolution in dark-developed spruce chloroplasts*. Plant and Cell Physiology, 16(1), 101–108.
- Oku, T., Tomita, G. (1976) *Photoactivation of oxygen-evolving system in dark-grown spruce seedlings*. Physiologia Plantarum, 38(3), 181–185.
- Oku, T., Tomita, G. (1980) *Photoactivation of the latent O₂-evolving center in chloroplasts isolated from dark-grown spruce seedlings*. Physiologia Plantarum, 48(1), 99–103.
- Öquist, G., Martin, B., Martensson, O. (1974) *Photoreduction of 2, 6-dichlorophenol indophenol in chloroplasts isolated from Pinus silvestris and Picea abies*. Photosynthetica 8, 263–271.
- Öquist, G. (1986). *Effects of winter stress on chlorophyll organization and function in Scots pine*. Journal of Plant Physiology 122(2), 169–179.

- Öquist, G., Malmberg, G. (1989). *Light and temperature dependent inhibition of photosynthesis in frost-hardened and un-hardened seedlings of pine*. *Photosynthesis Research* 20(3), 261–277.
- Pacholík, L. (2009) *Vliv měďnatých iontů (běžného polutantu) na aktivitu fotosystému II sinic (potenciálních dekontaminačních mikroorganismů)*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Penuelas, J., Filella, I., Biel, C., Serrano, L. Save, R. (1993) *The reflectance at the 950–970 nm region as an indicator of plant water status*. *International Journal of Remote Sensing*, 14(10), 1887–1905.
- Penuelas, J., Pinol, J., Ogaya, R., Filella, I., (1997) *Estimation of plant water concentration by the reflectance water index (R900/R970)*. *International Journal of Remote Sensing* 18, 2869–2875.
- Pollastrini, M., Holland, V., Brüggemann, W., Koricheva, J., Jussila, I., Scherer-Lorenzen, M., Berger, S., Bussotti, F. (2014). *Interactions and competition processes among tree species in young experimental mixed forests, assessed with chlorophyll fluorescence and leaf morphology*. *Plant Biology* 16(2), 323–331.
- Porcar-Castell, A., Tyystjarvi, E., Atherton, J., van der Tol, C., Flexas, J., Pfundel, E.E., Moreno, J., Frankenberg, C., Berry, J.A. (2014) *Linking chlorophyll a fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges*. *Journal of Experimental Botany* 65(15), 4065–4095.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989) *Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy*. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 975(3), 384–394.
- Pu, R., Gong, P., Biging, G.S., Larrieu, M.R. (2003). *Extraction of red edge optical parameters from Hyperion data for estimation of forest leaf area index*. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 41(4), 916–921.
- Raskin, V. I., Marder, J. B. (1997). *Chlorophyll organization in dark-grown and light-grown pine (Pinus brutia) and barley (Hordeum vulgare)*. *Physiologia Plantarum* 101(3), 620–626.
- Reinhardt, K., Castanha, C., Germino, M.J., Kueppers, L.M. (2011) *Ecophysiological variation in two provenances of Pinus flexilis seedlings across an elevation gradient from forest to alpine*. *Tree Physiology* 31(6), 615–625.
- Roach, T., Krieger-Liszkay, A. K. (2014) *Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition*. *Current Protein & Peptide Science*, 15(4), 351–362.
- Robakowski, P., Laitat, E. (1999) *Effects of an enhanced ultraviolet-B irradiation on photosynthetic apparatus of several forest coniferous tree species from different locations*. *Acta Physiologiae Plantarum* 21(3), 283–296.
- Roháček, K., Barták, M. (1999) *Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications*. *Photosynthetica*, 37(3), 339–363.
- Roháček, K. (2002) *Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships*. *Photosynthetica*, 40(1), 13–29.
- Romsakova, I., Foffova, E., Kmet, J., Longauer, R., Pacalaj, M., Gomory, D., (2012) *Nucleotide polymorphisms related to altitude and physiological traits in contrasting provenances of Norway spruce (Picea abies)*. *Biologia* 67(5), 909–916.
- Salmela, M. J., Cavers, S., Cottrell, J. E., Iason, G. R., Ennos, R. A. (2011) *Seasonal patterns of photochemical capacity and spring phenology reveal genetic differentiation among native Scots pine (Pinus sylvestris L.) populations in Scotland*. *Forest Ecology and Management*, 262(6), 1020–1029.
- Senser, M., Beck, E. (1978) *Photochemically active chloroplasts from spruce (Picea abies (L.) Karst.)*. *Photosynthetica* 12(3), 323–327.

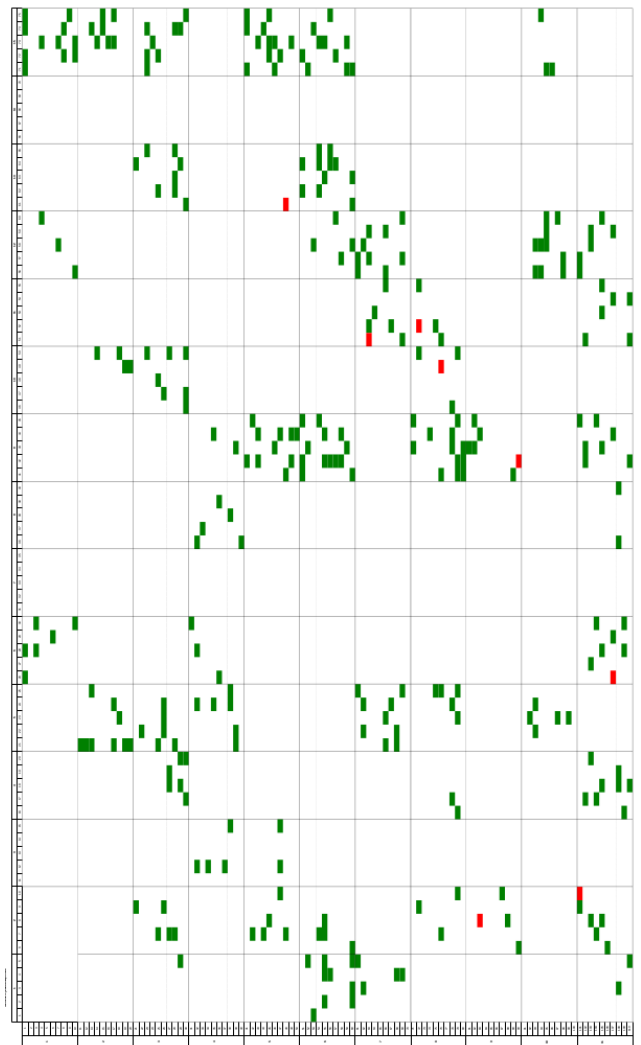
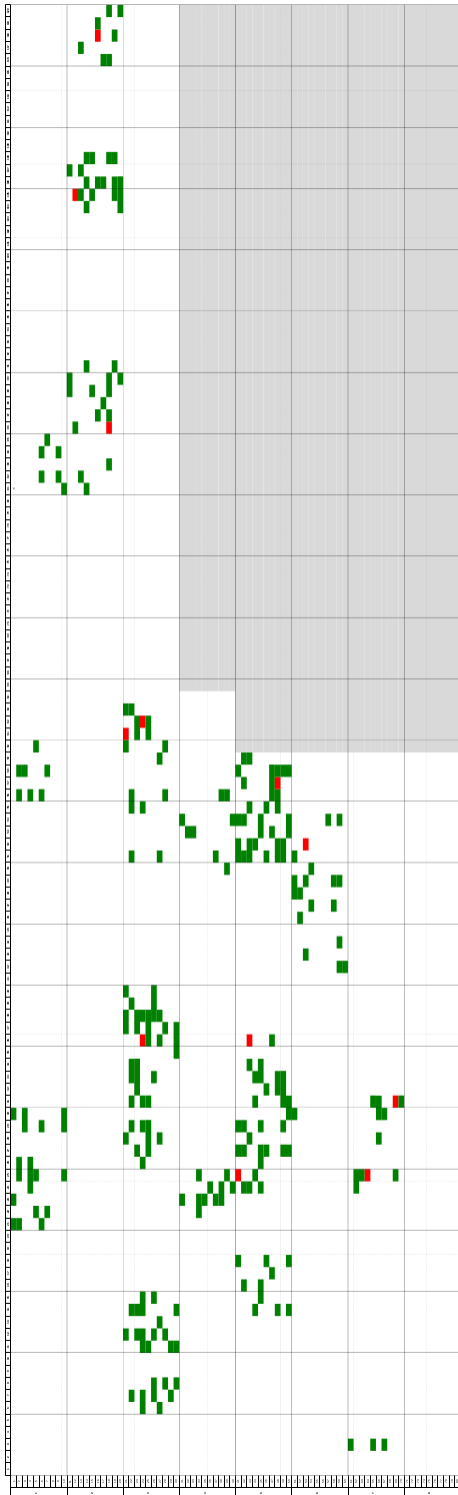
- Shaw, R.G. (1987) *Maximum-likelihood approaches applied to quantitative genetics of natural populations*. *Evolution*, 812–826.
- Smorenburg, K., Courre'ges-Lacoste, G.B., Berger, M., Buschmann, C., Court, A., Del Bello, U., Langsdorf, G., Lichtenthaler, H.K., Sioris, C., Stoll, M.P., Visser H. (2002) *Remote sensing of solar induced fluorescence of vegetation*. In: Owe, M., D'Urso, G. (eds.): *Remote Sensing for Agriculture, Ecosystems, and Hydrology III* (Proceedings of the Society of Photo-optical Instrumentation Engineers (SPIE)) 4542, pp. 178–190.
- Stimson, H.C., Breshears, D.D., Ustin, S.L., Kefauver, S.C. (2005) *Spectral sensing of foliar water conditions in two co-occurring conifer species: Pinus edulis and Juniperus monosperma*. *Remote Sensing of Environment* 96(1), 108–118.
- Stirbet, A., Govindjee (2011). *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), 236–257.
- Stirbet, A., Riznichenko, G. Y., Rubin, A. B. (2014). *Modeling chlorophyll a fluorescence transient: Relation to photosynthesis*. *Biochemistry (Moscow)*, 79(4), 291–323.
- Strand, M., Öquist, G. (1985). *Inhibition of photosynthesis by freezing temperatures and high light levels in cold-acclimated seedlings of Scots pine (Pinus sylvestris). II. Effects on chlorophyll fluorescence at room temperature and 77 K*. *Physiologia Plantarum* 65(2), 117–123.
- Strand, M., Lundmark, T. (1987). *Effects of low night temperature and light on chlorophyll fluorescence of field-grown seedlings of Scots pine (Pinus sylvestris L.)*. *Tree Physiology* 3(3), 211–224.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2000) *The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples*. In: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (eds): *Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation*, Taylor and Francis, London, pp. 445–483.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2004) *Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient*. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (eds): *Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, pp. 321–362.
- Sveshnikov, D., Ensminger, I., Ivanov, A. G., Campbell, D., Lloyd, J., Funk, C., Hüner N.P.A., Oquist, G. (2006) *Excitation energy partitioning and quenching during cold acclimation in Scots pine*. *Tree Physiology*, 26(3), 325–336.
- Špunda, V., Čajánek, M., Kalina, J., Lachetová, I., Šprtová, M., Marek, M. V. (1998). *Mechanistic differences in utilization of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of Norway spruce induced by the vertical distribution of photosynthetically active radiation through the tree crown*. *Plant Science* 133(2), 155–165.
- Trebst A. (1980) *Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localisation of carriers and energy conservation sites*. *Methods in Enzymology* 69, 675–715.
- Trebst, A. (2007) *Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system*. *Photosynthesis Research*, 92(2), 217–224.
- Tůmová, E. (2001) *Vliv kademnatých iontů na fotosyntetický aparát sinice Synechococcus elongatus*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Vass, I. (2003) *The history of photosynthetic thermoluminescence*. *Photosynthesis Research*, 76(1–3), 303–318.
- Vass, I. (2012) *Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1817(1 Special Issue), 209–217.

- Vernon, L.P., Shaw, E.R. (1969) *Photoreduction of 2,5-dichlorophenol indophenol by diphenylcarbazide: a photosystem 2 reaction catalysed by Tris washed chloroplasts and subchloroplast fragments*. *Plant Physiology* 44(11), 1645–1649.
- Vogelmann, J.E., Rock, B.N., Moss, D.M. (1993) *Red-edge spectral measurements of sugar maple leaves*. *International Journal of Remote Sensing* 14(9), 1563–1575.
- Walker, D. A. (2002) *'And whose bright presence'—an appreciation of Robert Hill and his reaction*. *Photosynthesis Research*, 73(1–3), 51–54.
- Wellburn, A.R. (1994) *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution*. *Journal of Plant Physiology* 144(3), 307–313.
- Westin, J., Sundblad, L.G., Hallgren, J.E. (1995) *Seasonal variation in photochemical activity and hardiness in clones of norway spruce (Picea abies)*. *Tree Physiology* 15(10), 685–689.
- Westin, J., Sundblad, L.G., Strand, M., Hallgren, J.E. (1999) *Apical mitotic activity and growth in clones of Norway spruce in relation to cold hardiness*. *Canadian Journal of Forest Research* 29(1), 40–46.
- Westin, J., Sundblad, L.G., Strand, M., Hallgren, J.E. (2000) *Phenotypic differences between natural and selected populations of Picea abies. I. frost hardiness*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15(5), 489–499.
- Wilson, A.J., Reale, D., Clements, M.N., Morrissey, M.M., Postma, E., Walling, C.A., Kruuk L.E.B., Nussey, D.H. (2010) *An ecologist's guide to the animal model*. *Journal of Animal Ecology* 79(1), 13–26.
- Wu, C., Niu, Z., Tang, Q., Huang, W. (2008) *Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices: modeling and validation*. *Agricultural Forest Meteorology* 148(8–9), 1230–1241.
- Xue, J.M., Clinton, P.W., Davis, M.R., Siddiqui, T., Beets, P.N., Leckie, A.C. (2013) *Genotypic variation in foliar nutrient concentrations, delta C-13, and chlorophyll fluorescence in relation to tree growth of radiata pine clones in a serpentine soil*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176(5), 724–733
- Yamashita, T., Tsuji, J., Tomita, G. (1971) *Reactivation of the Hill reaction of Tris-washed chloroplasts*. *Plant and cell physiology*, 12(1), 117–126.
- Yildiz, D., Nzokou, P., Deligoz, A., Koc, I., Genc, M. (2014) *Chemical and physiological responses of four Turkish red pine (Pinus brutia Ten.) provenances to cold temperature treatments*. *European Journal of Forest Research* 133(5), 809–818.
- Yokono, M., Akimoto, S., Tanaka, A. (2008) *Seasonal changes of excitation energy transfer and thylakoid stacking in the evergreen tree Taxus cuspidata: How does it divert excess energy from photosynthetic reaction center?* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1777(4), 379–387.
- Zarco-Tejada, P.J., Miller, J.R., Harron, J., Hu, B., Noland, T.L., Goel, N., et al. (2004) *Needle chlorophyll content estimation through model inversion using hyperspectral data from boreal conifer forest canopies*. *Remote Sensing of Environment* 89, 189–199.
- Zhang, Y., Zhao, Z., Zhang, M., Chen, T., An, L., Wu, J. (2009) *Seasonal acclimation of superoxide anion production, antioxidants, IUFA, and electron transport rates in chloroplasts of two Sabina species*. *Plant Science*, 176(5), 696–701.

9 Příloha

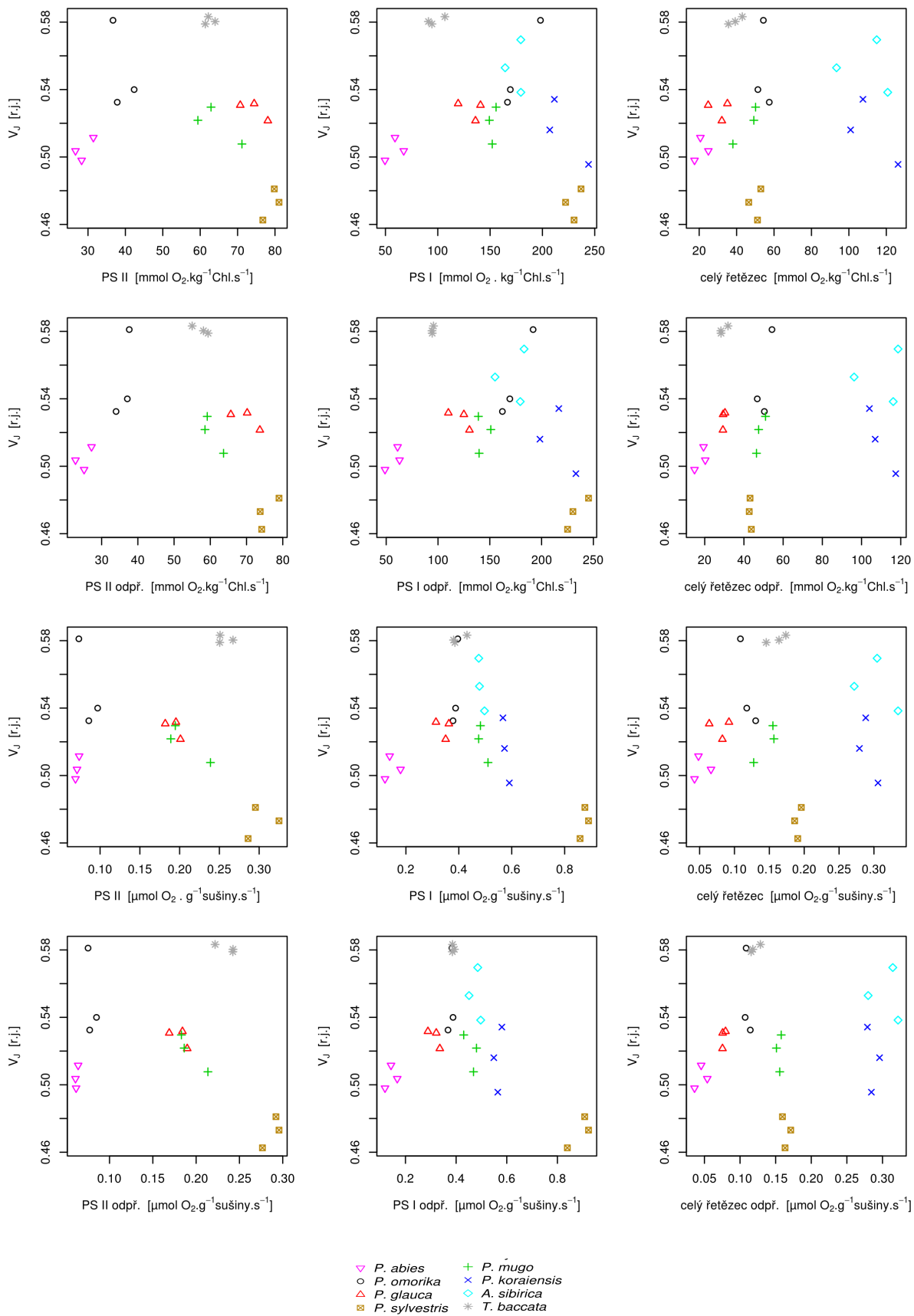
9.1 Příloha 1

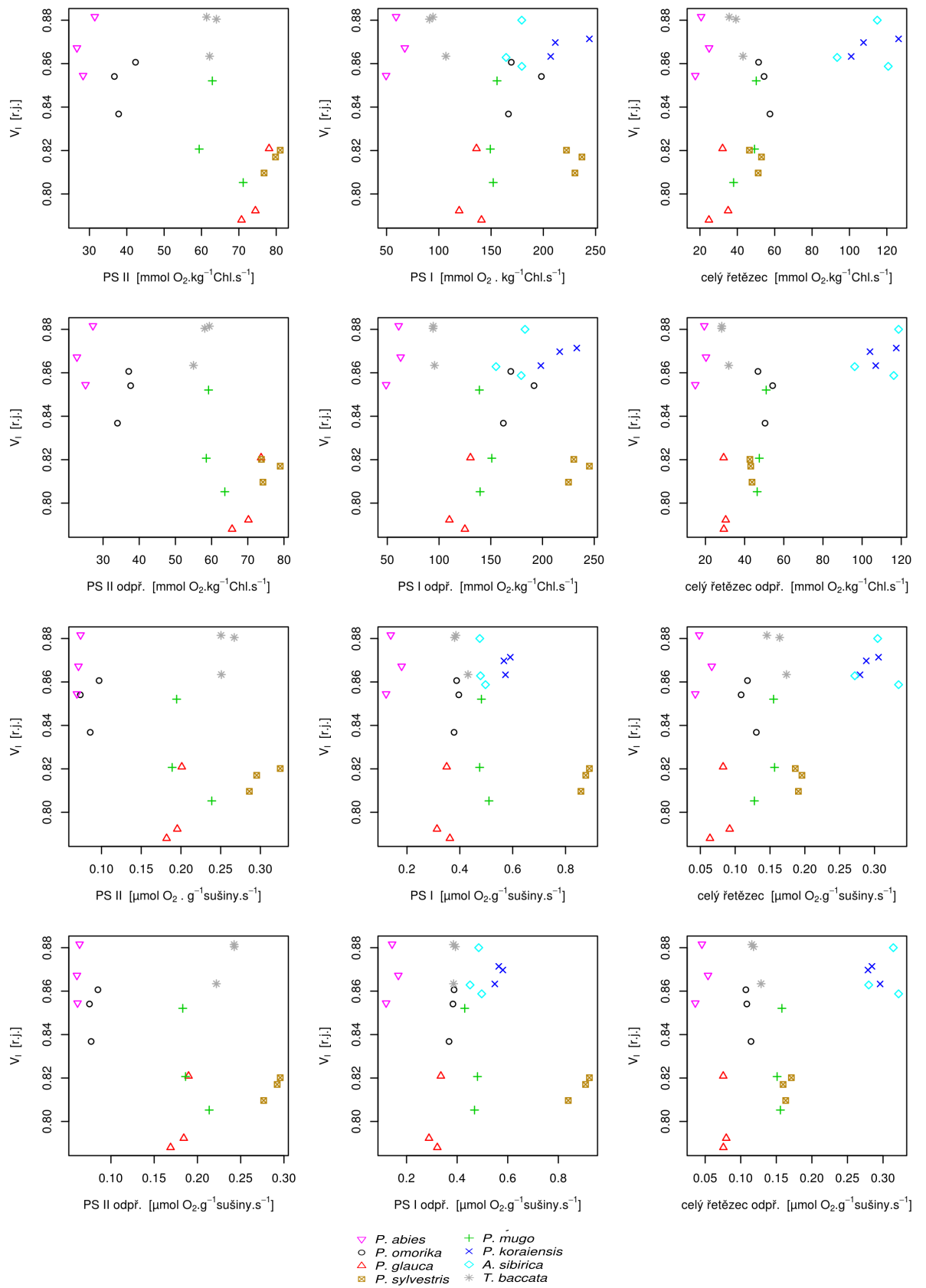
Plánky testovacích ploch Skelná Hut (vlevo) a Nepomuk (vpravo). Zelené obdélníčky představují stromy, ze kterých byly odebírány větve pro analýzu. Červené obdélníčky značí tzv. výběrové stromy. Šedá plocha je bez testovací výsadby.

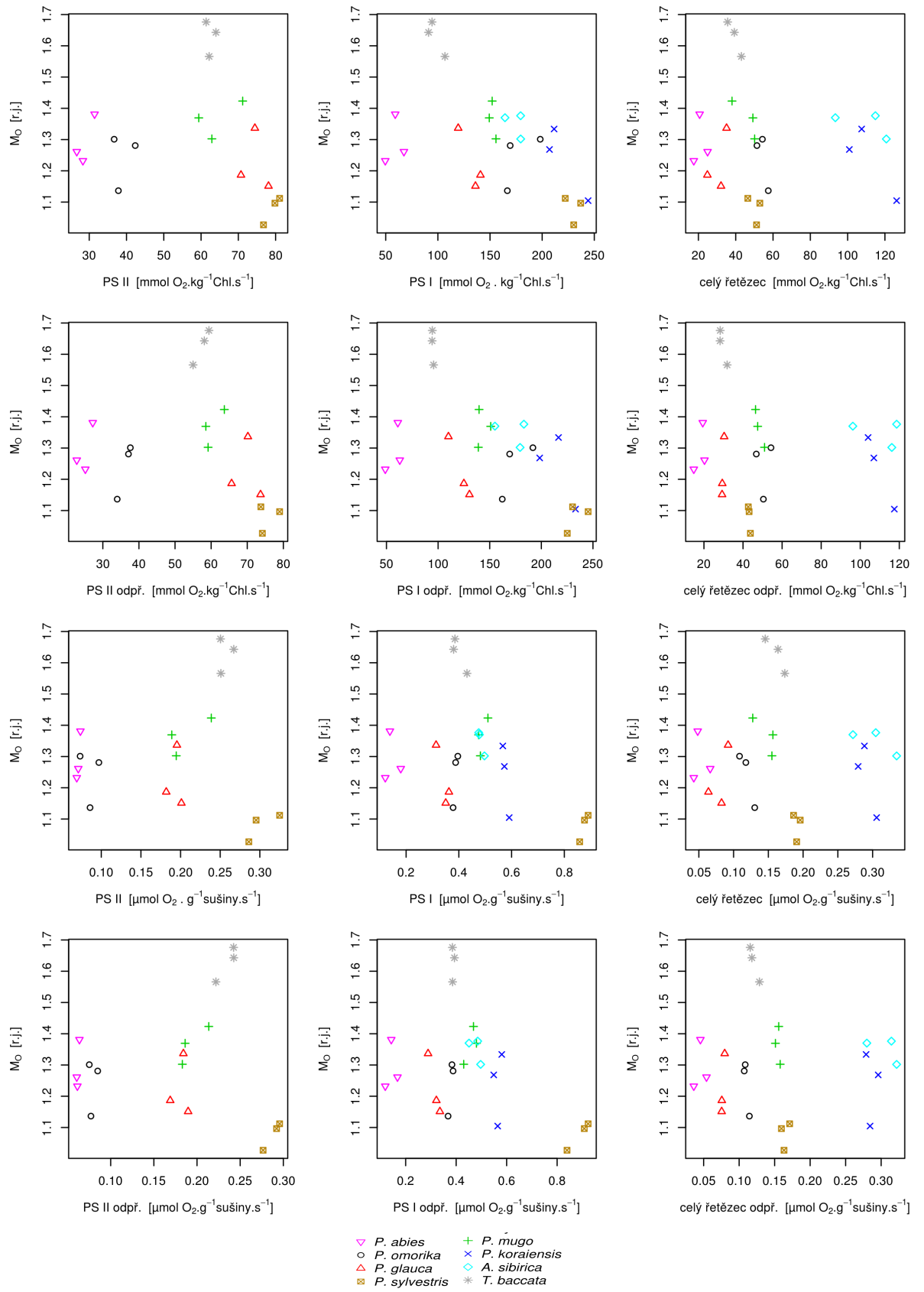


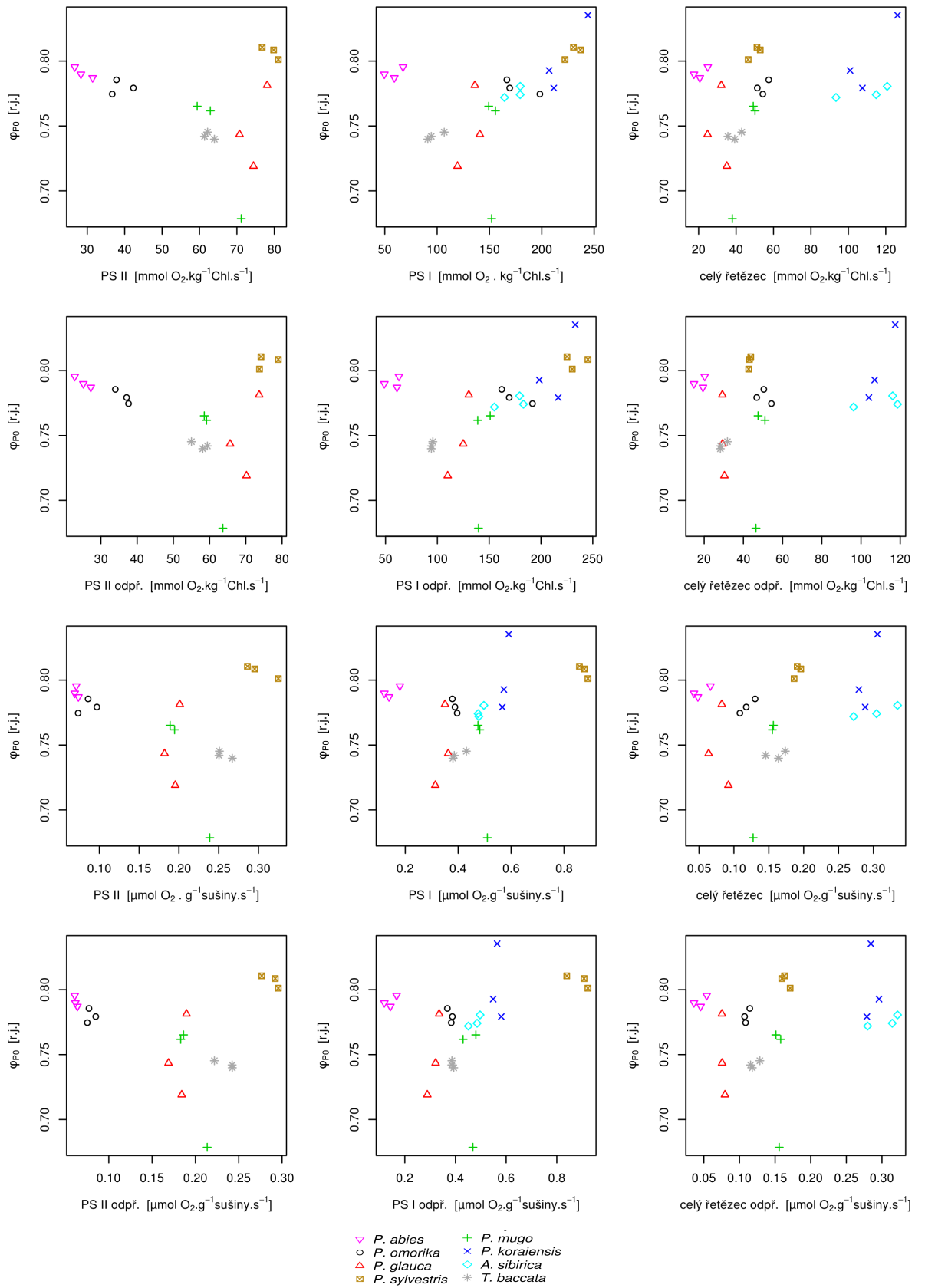
9.2 Příloha 2

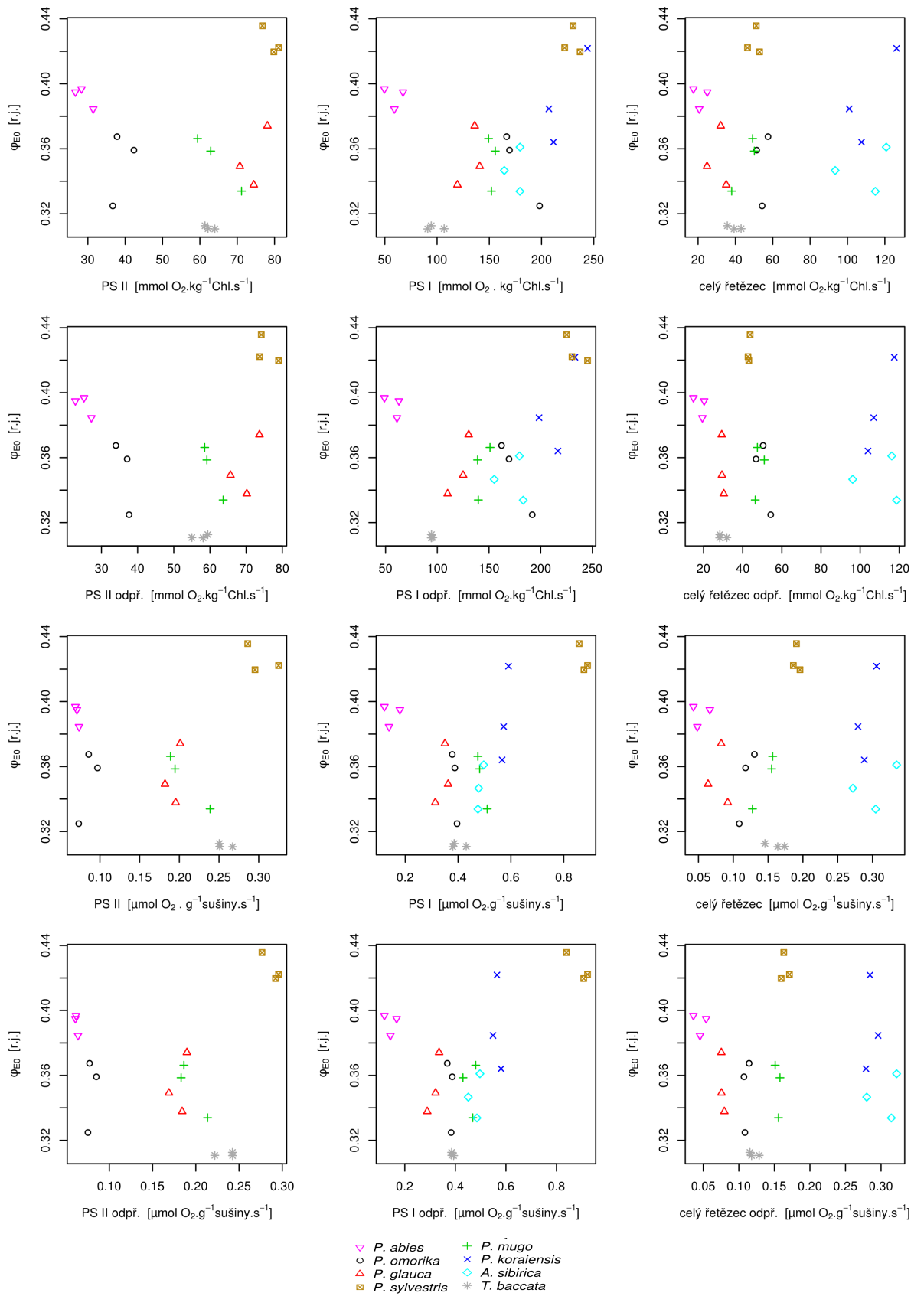
Hodnoty fluorescenčních parametrů, vynesené proti hodnotám fotochemických aktivit PS II, PS I a celého řetězce, a to v normální variantě i ve variantě, kdy bylo do reakční směsi přidáno NH_4Cl , což vedlo k odpřažení transportu elektronů od fotofosforylace (grafy odpř.). V horní polovině každé stránky je je fotochemická aktivita vztažena na jednotku hmotnosti chlorofylu (Chl), v dolní polovině na hmotnost sušiny. r.j. – relativní jednotky.

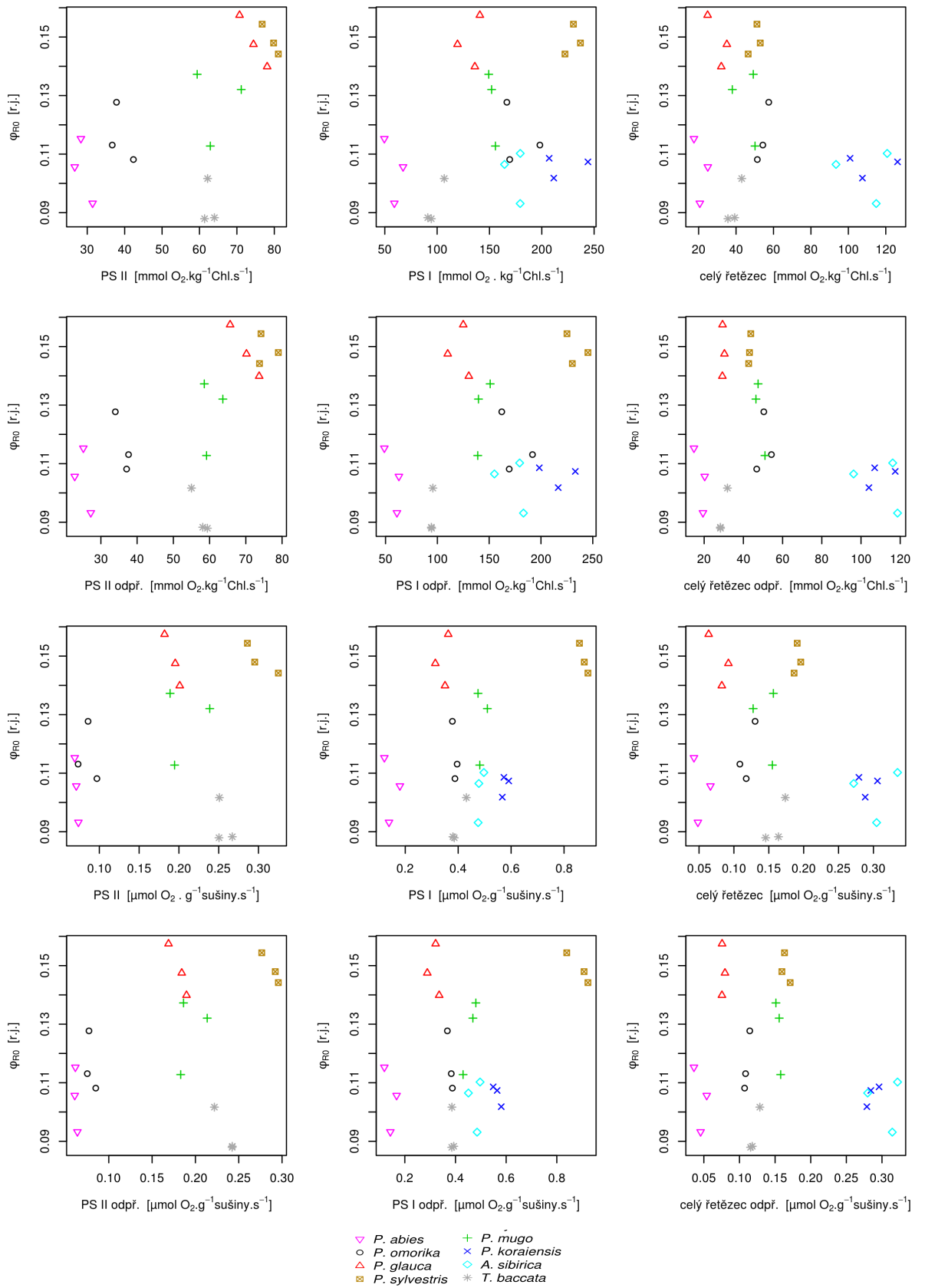


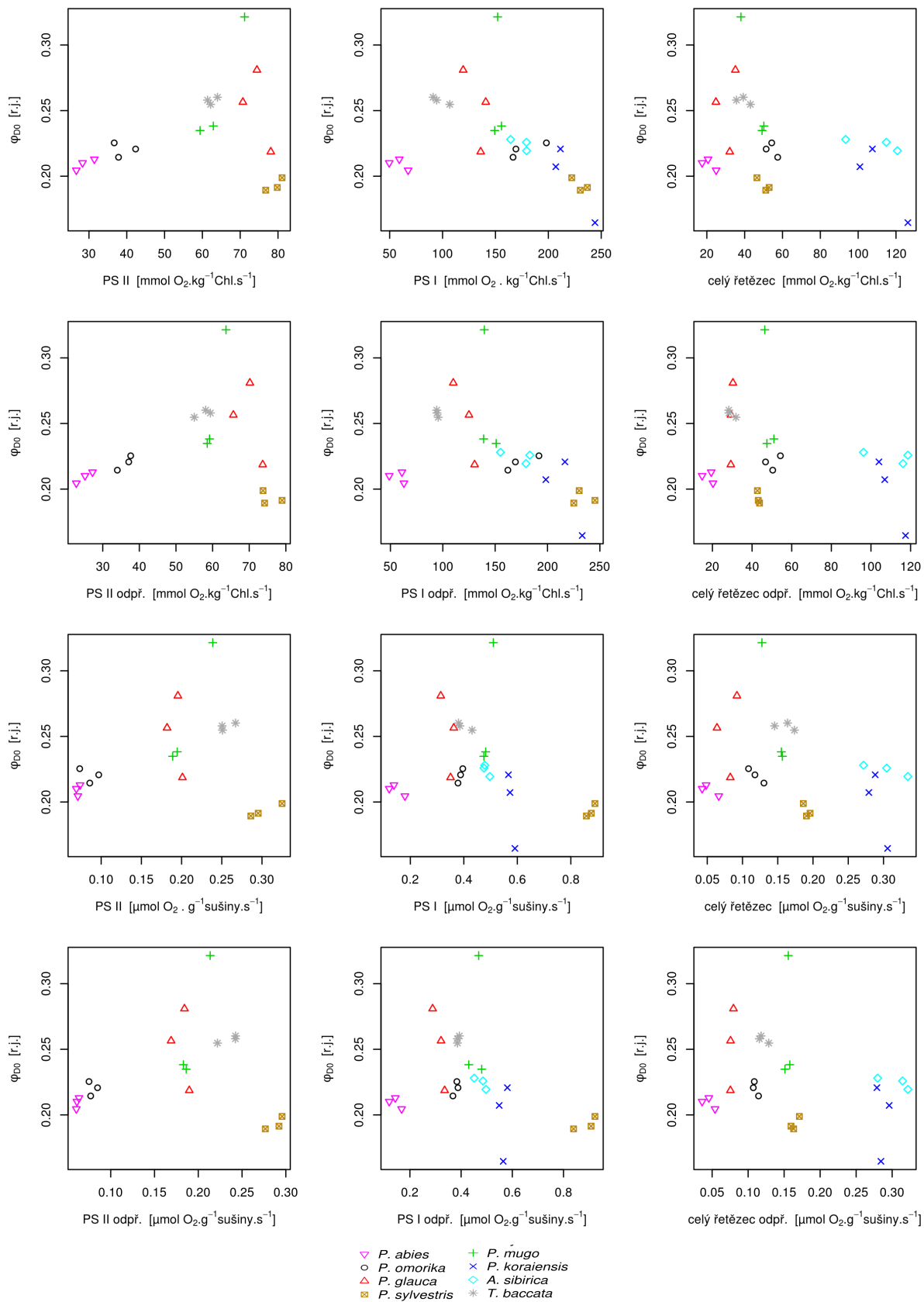


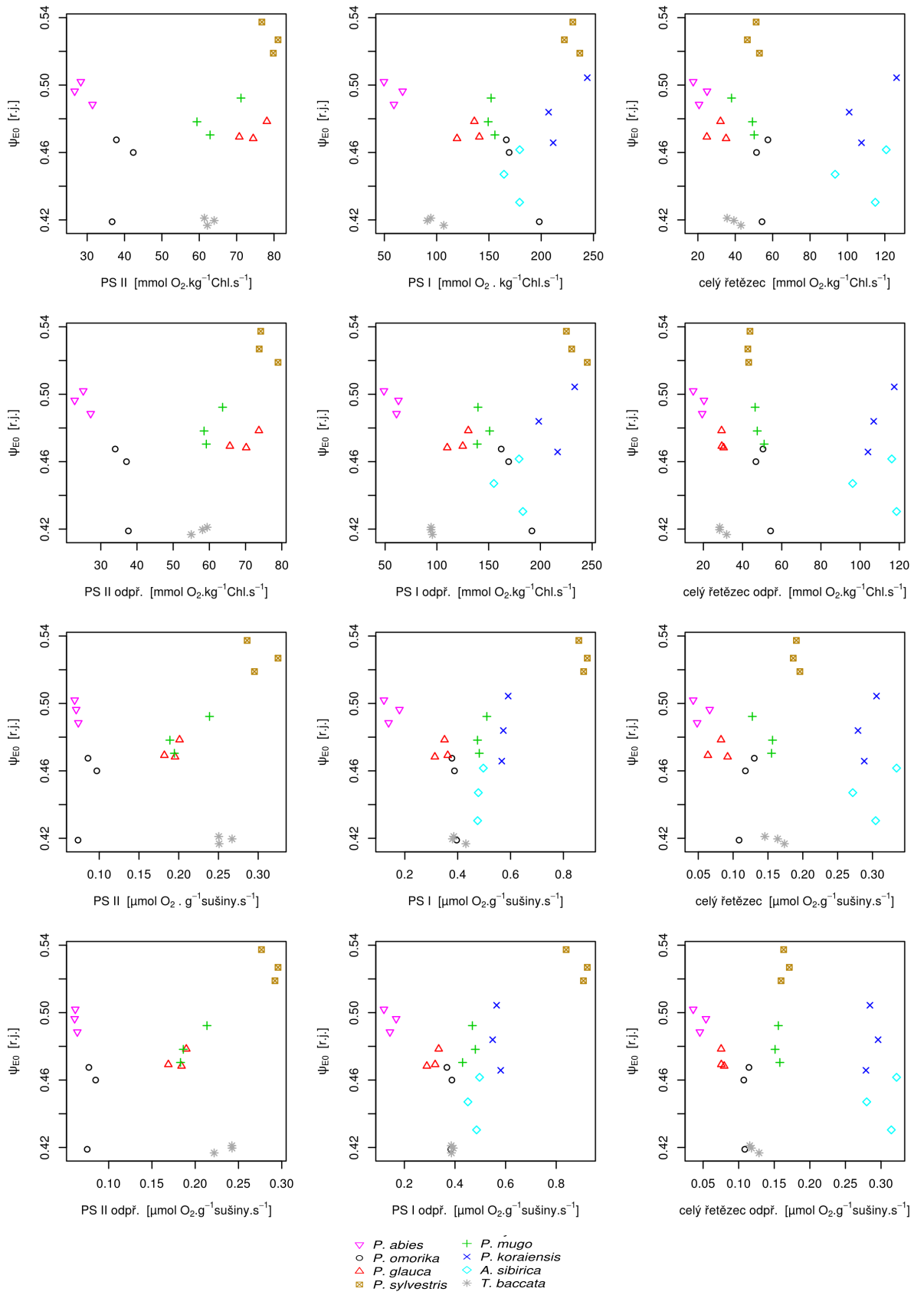


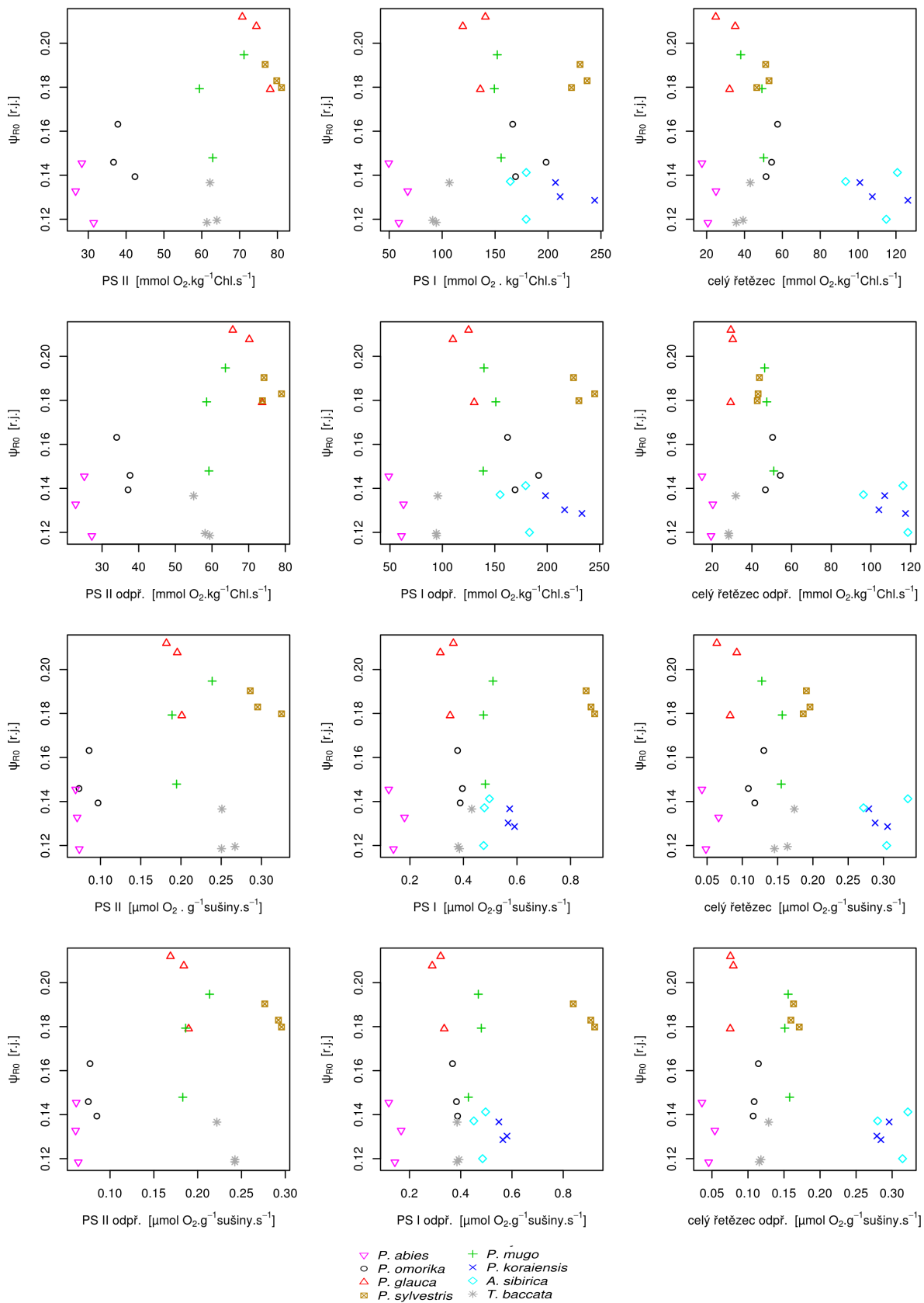


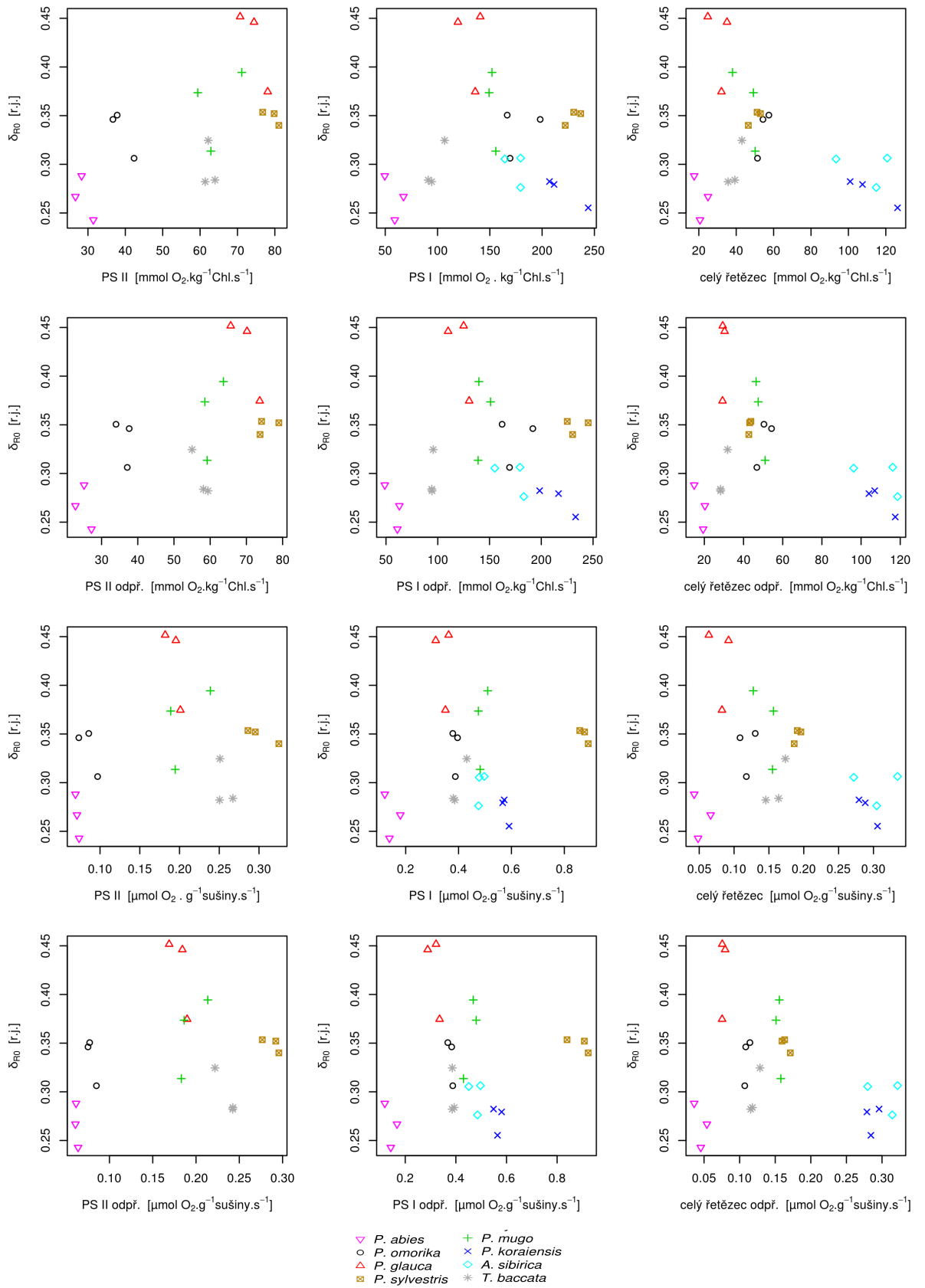


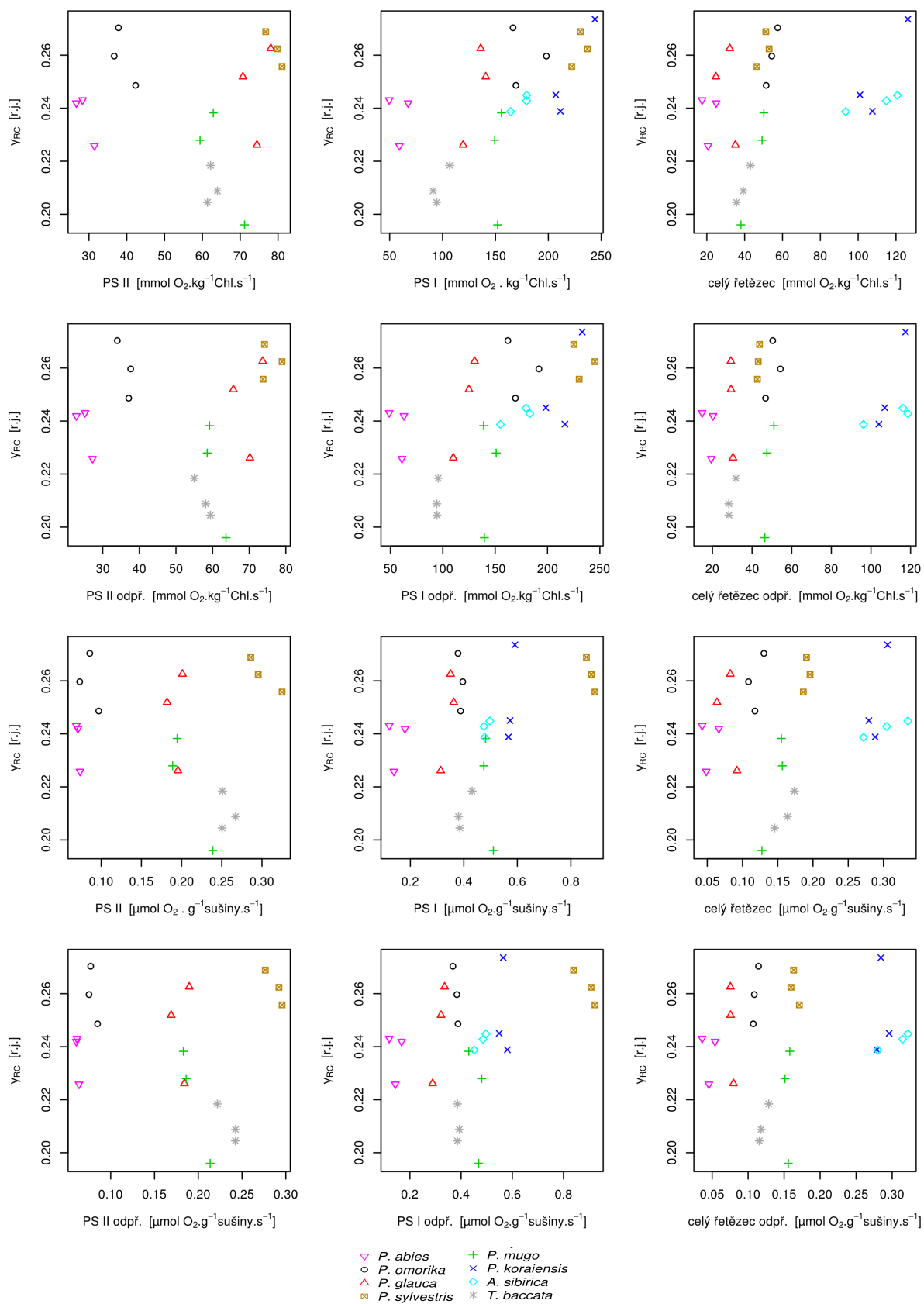


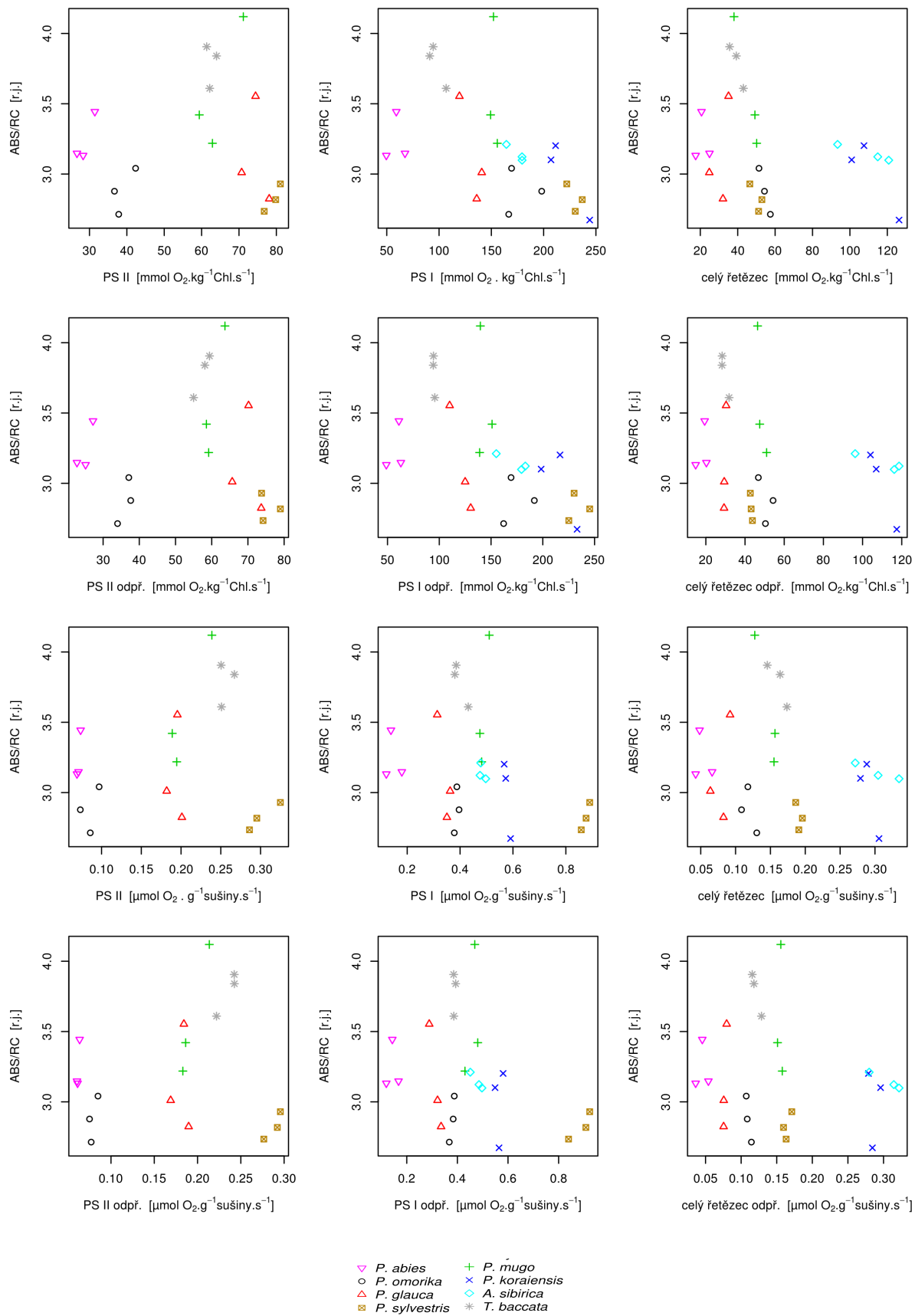


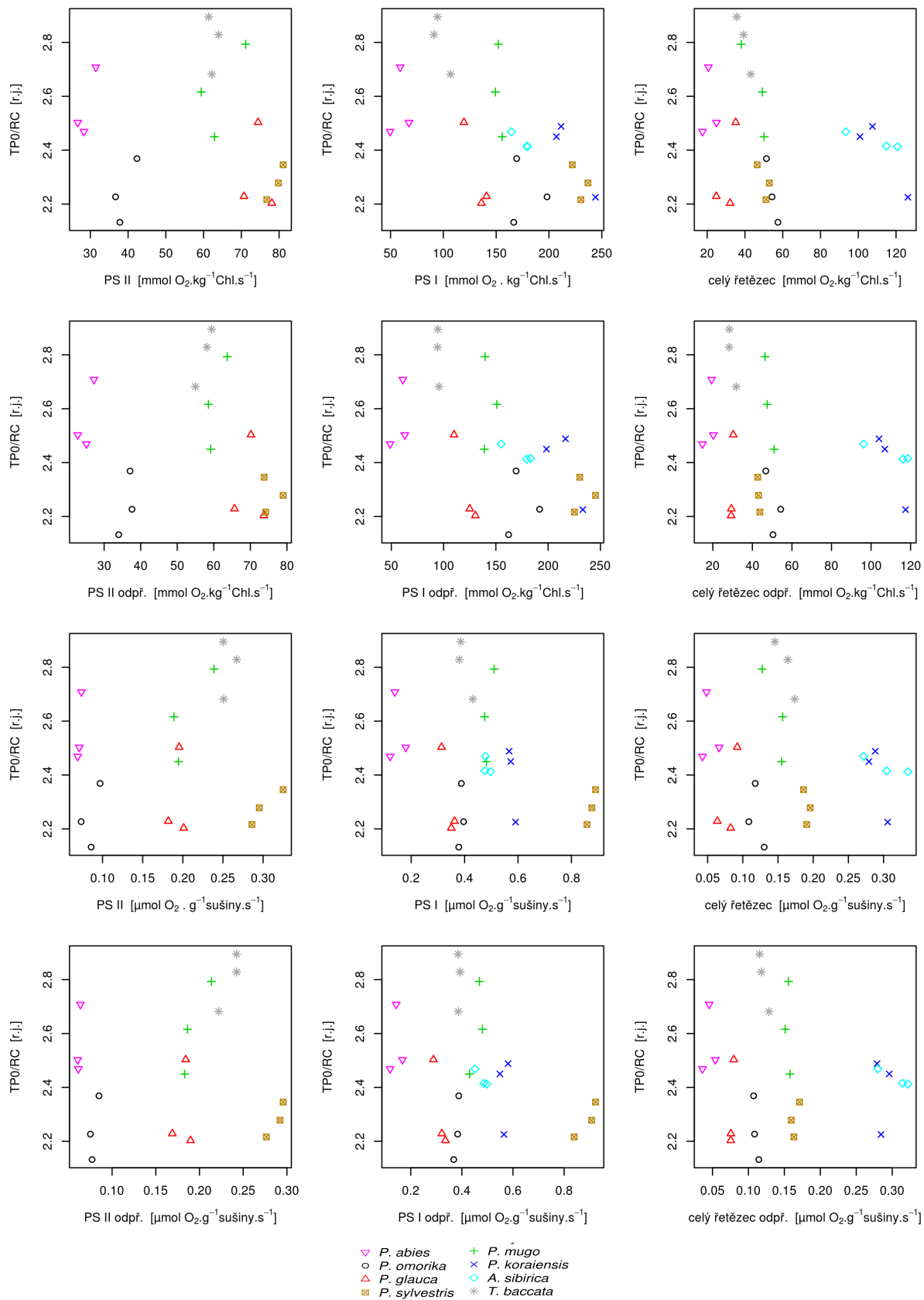


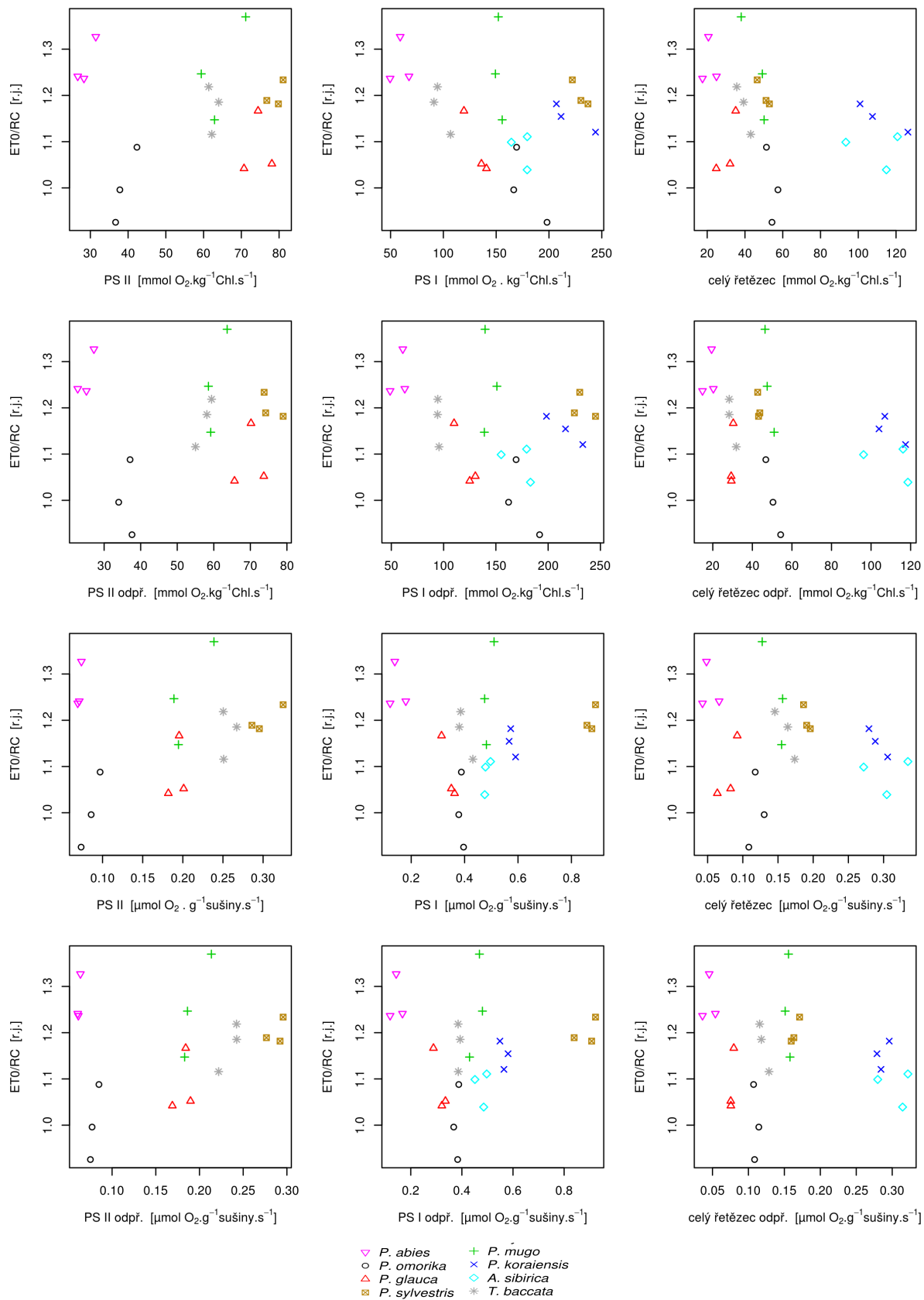


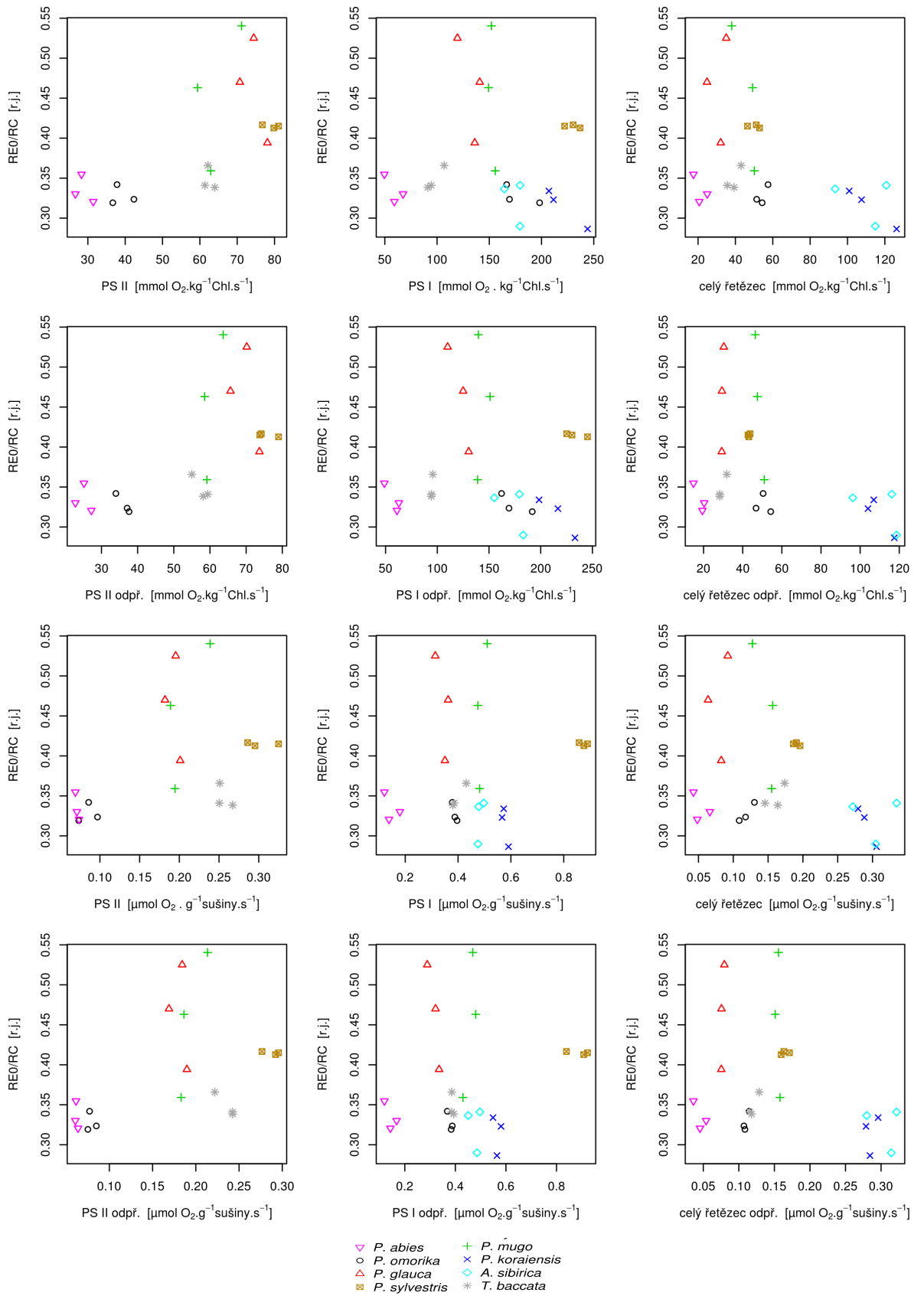


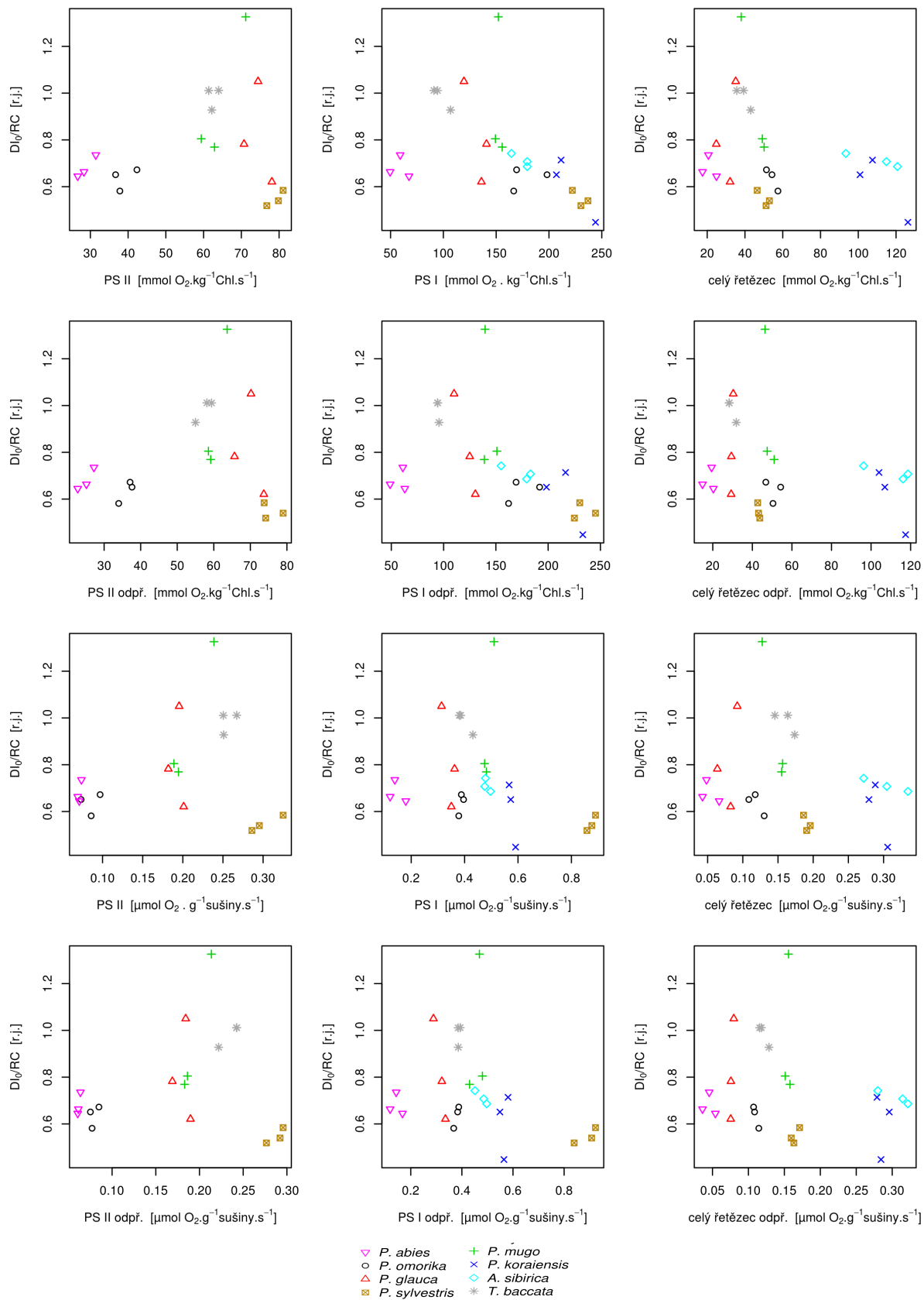


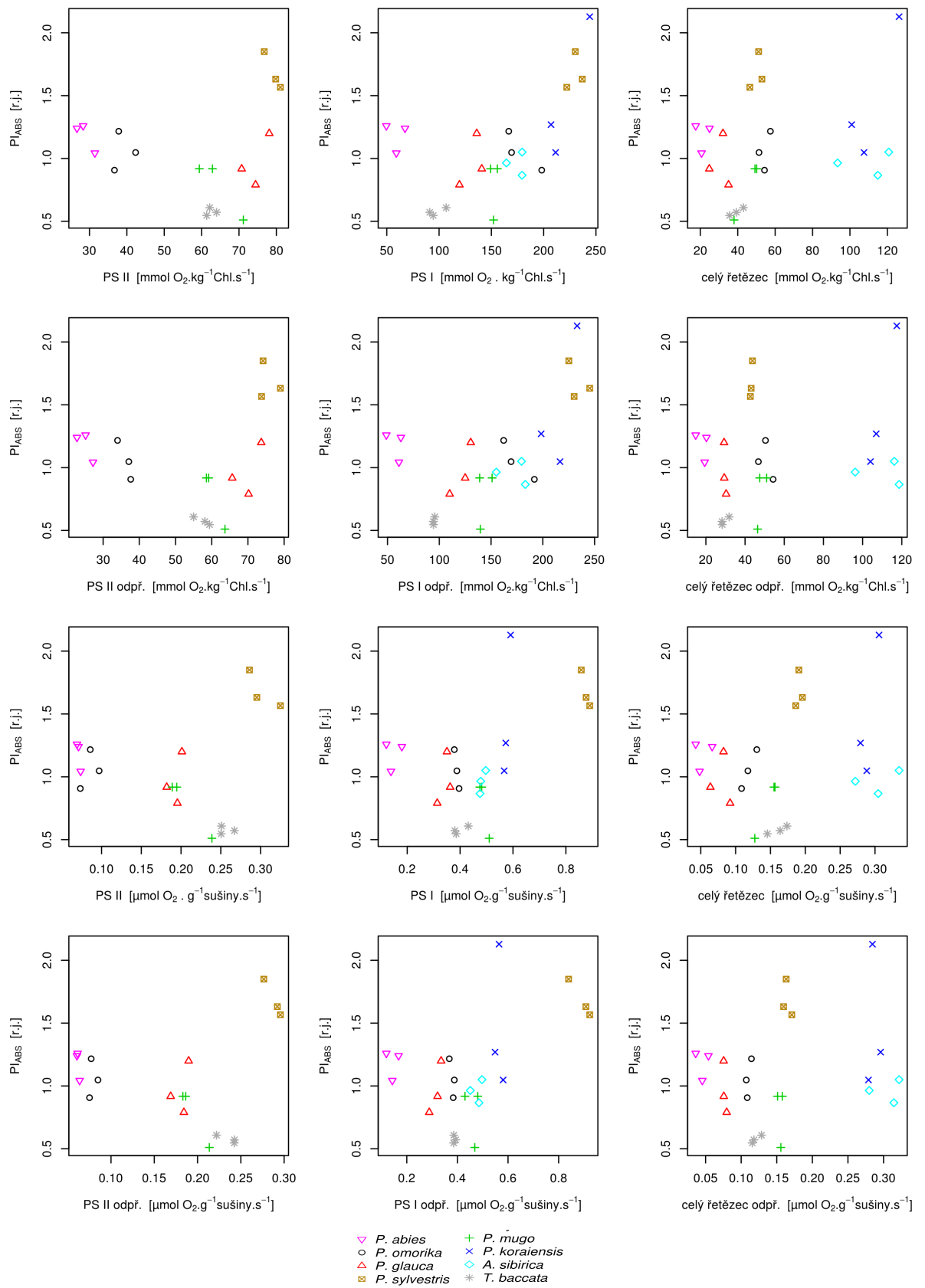


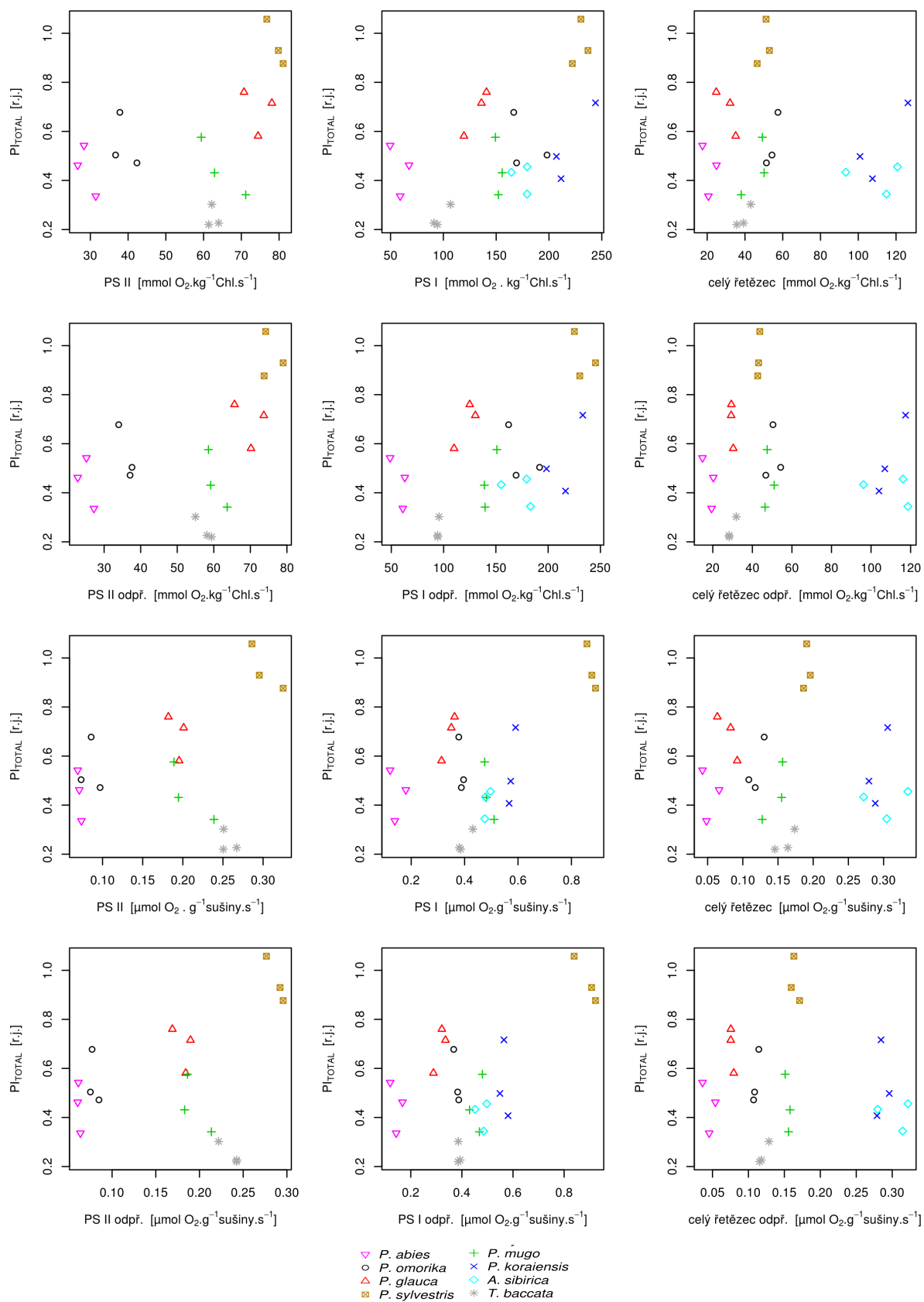






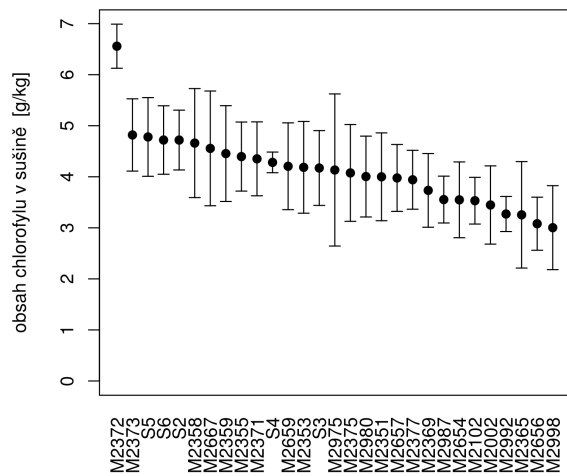




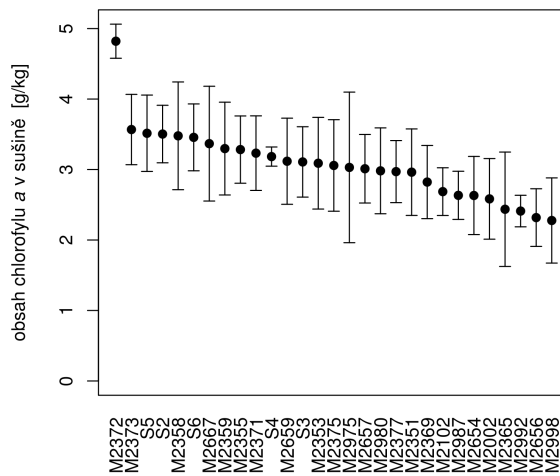


9.3 Příloha 3

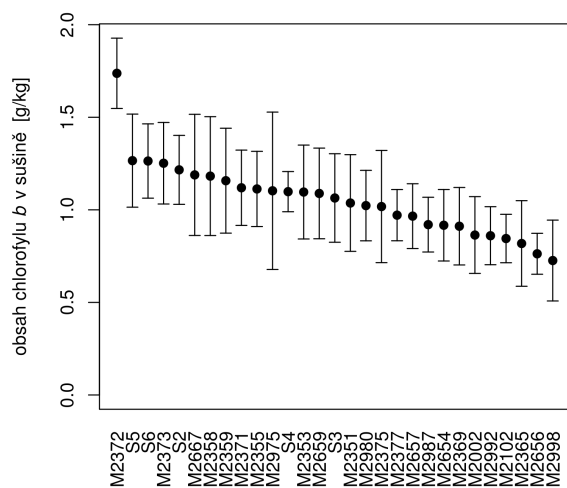
Variabilita testovaných stromů v měřených parametrech. Stromy byly rozděleny do skupin podle genotypu matky. Zobrazeny jsou průměry a směrodatné odchylky. Data jsou smíchána z obou testovacích ploch.



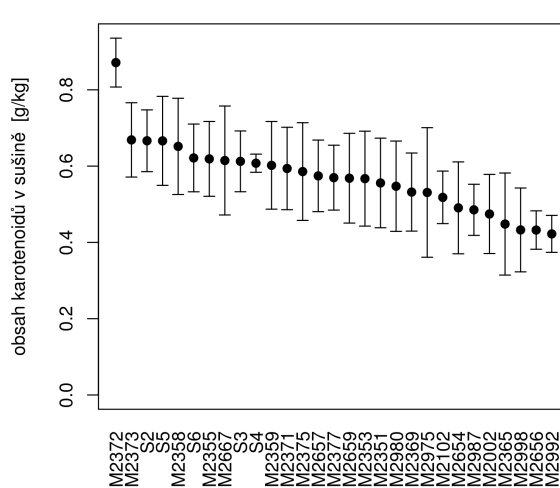
materský strom



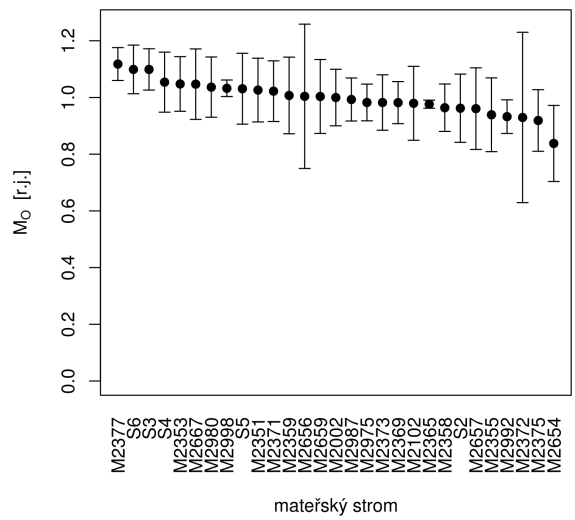
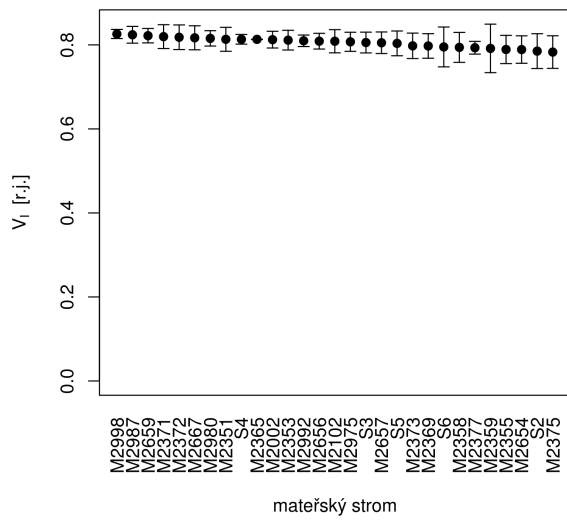
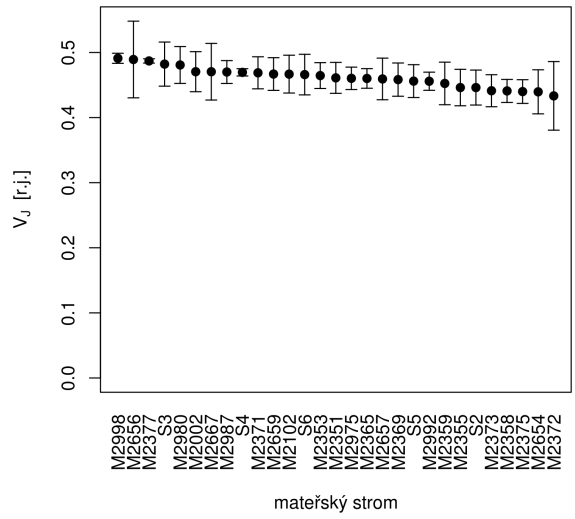
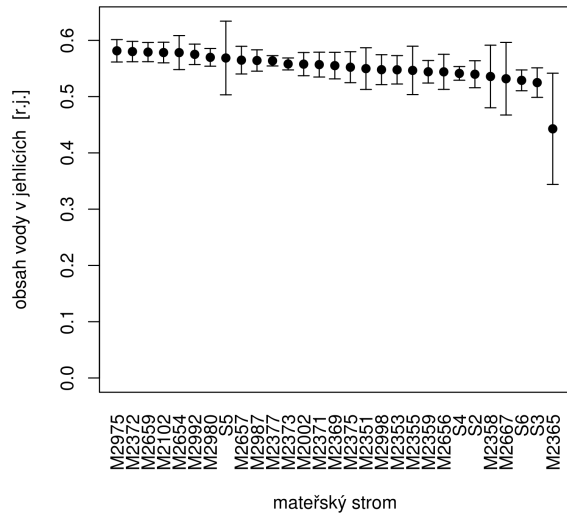
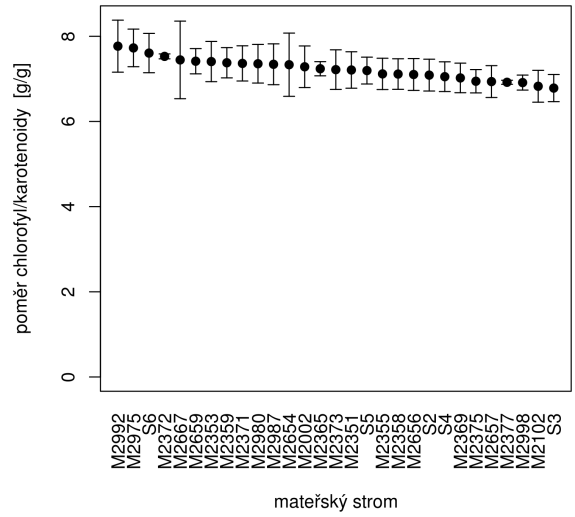
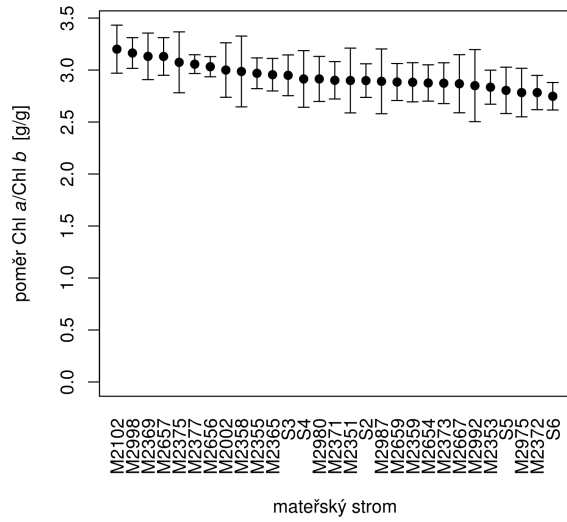
materský strom

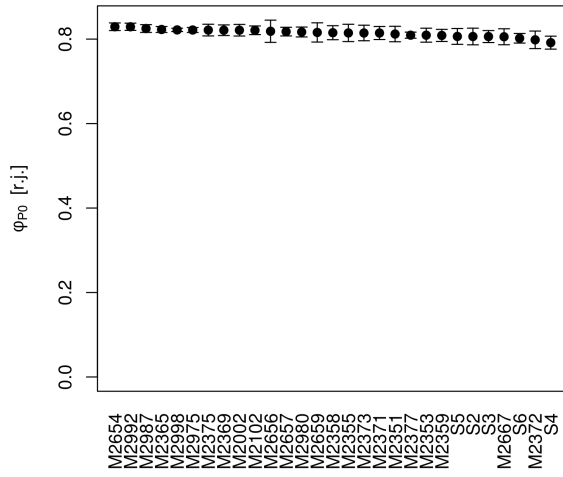


materský strom

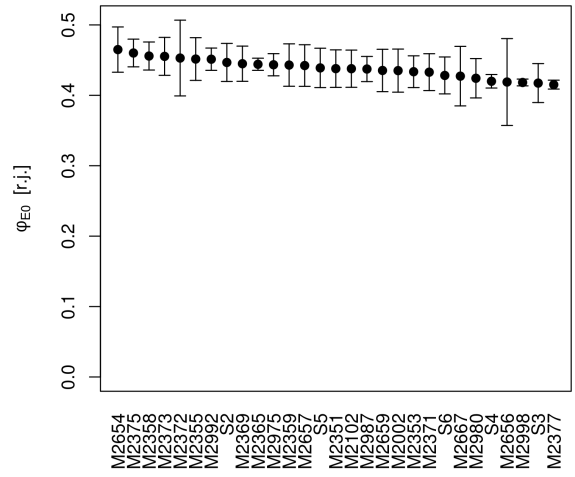


materský strom

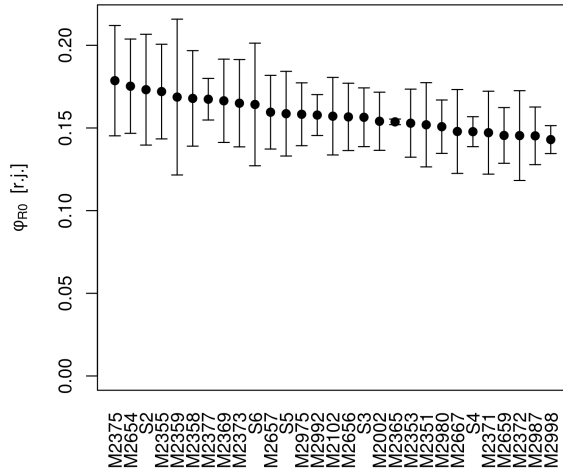




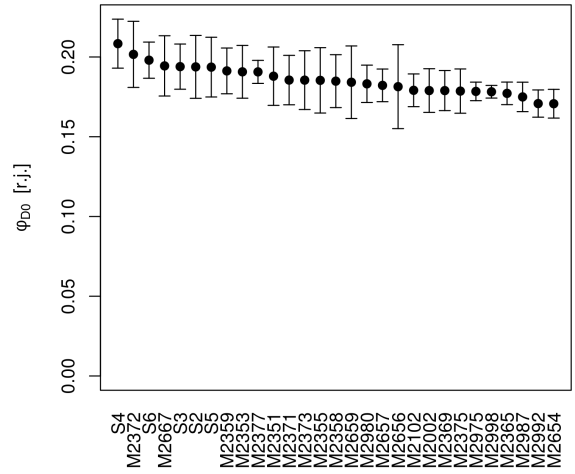
materý strom



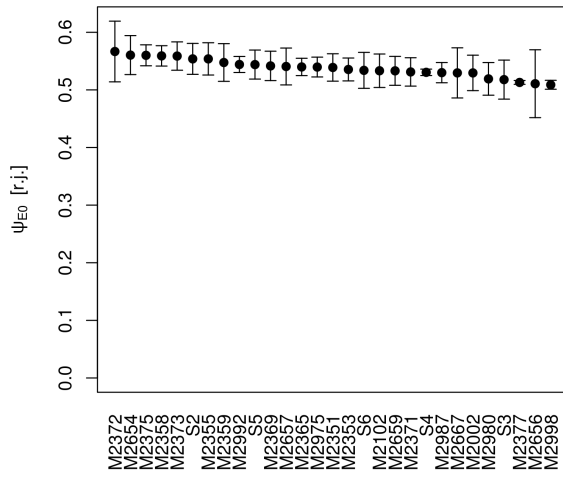
materý strom



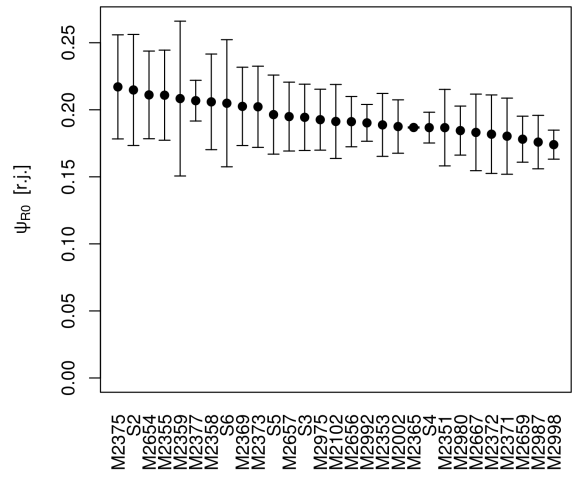
materý strom



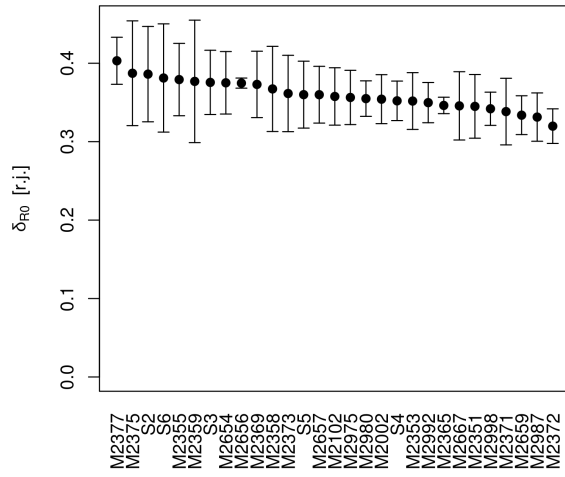
materý strom



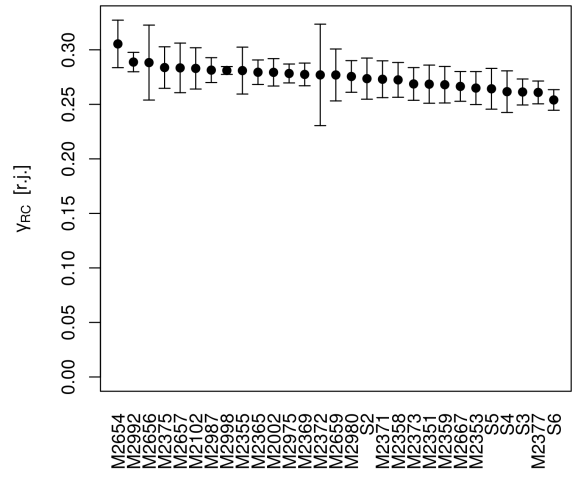
materý strom



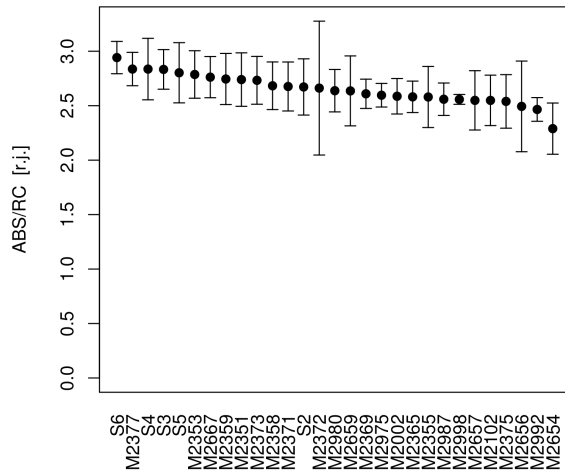
materý strom



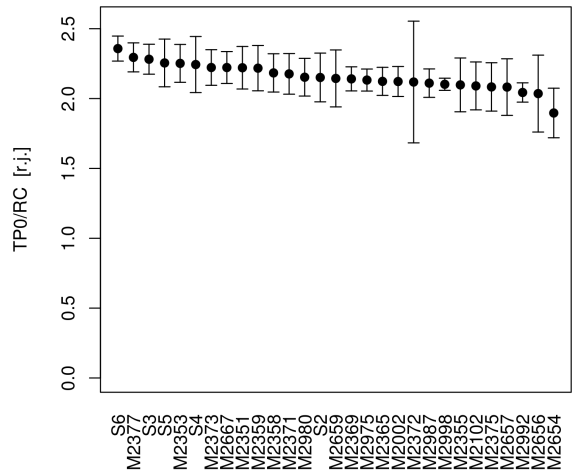
materký strom



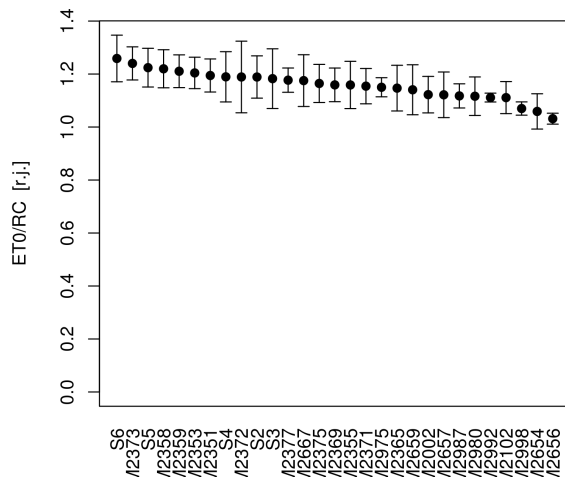
materký strom



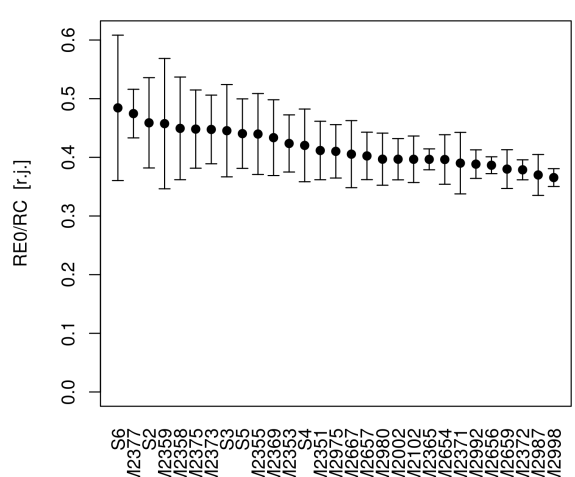
materký strom



materký strom



materký strom



materký strom

