

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Biologická fakulta



Roční průběh základních fluorescenčních parametrů  
dvou stálezelených rostlin

Silvie Svidenská

Vedoucí práce: Mgr. Julie Soukupová, Ph.D.

České Budějovice 29. dubna 2007

SVIDENSKÁ S.(2007) The annual changes of basic Chlorophyll fluorescence parameters in two evergreen plants. Bachelor thesis, Department of Plant Physiology, Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

The aim of this bachelor thesis was to attain information of annual variation of basic chlorophyll fluorescence parameters in two evergreen overwintering plants: *Picea omorica* and *Rhododendron x hybridum*. Here, I measured  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V/F_M$  and NPQ in dark adapted samples under controlled light conditions and under ambient temperature corresponding to that in field.

At first, the principles of photosynthesis and of chlorophyll fluorescence are described. In the second part the results are summarized and discussed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedené v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 SB. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích a na jejích internetových stránkách.

14.5.2007

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Julii Soukupové, Ph.D. za trpělivý přístup, ochotnou pomoc a odborné vedení v průběhu celé mé práce. Ing. Ladislavu Cséfalvay velmi děkuji za pomoc s přístroji a technickým vybavením během experimentů.

Vysvětlivky zkratk:

TAS	Temnotně adaptovaný stav
SAS	Na světlo adaptovaný vzorek
Chl	Chlorofyl
ChlF	Chlorofylová fluorescence
$F_0$	Minimální Chl fluorescenční výtěžek v temnotně adaptovaném stavu
$F_M$	Maximální Chl fluorescenční výtěžek v temnotně adaptovaném stavu
$F_V$	Maximální variabilní Chl fluorescenční výtěžek v temnotně adaptovaném stavu
$F_V/F_M$	Maximální kvantový výtěžek fotochemie PSII
$F_M'$	Maximální Chl fluorescenční výtěžek v na světlo adaptovaném stavu
NPQ	Nefotochemické zhášení Chl fluorescence
RC	Reakční centrum
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
LHC	Světlosběrné proteinové komplexy
ATP	Adenosin trifosfát
$Q_A$	Primární akceptor elektronů
$Q_B$	Sekundární akceptor elektronů
FAR	Fotosynteticky aktivní záření, rozsah vlnových délek: 400 až 700 nm

## Obsah:

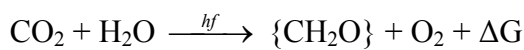
1.	Úvod.....	4
1.1.	Fotosyntéza.....	4
1.1.1	Základy fotosyntézy.....	4
1.1.2	Pigmenty.....	5
1.1.3	Děje světelné fáze fotosyntézy.....	6
1.1.4	Fotosyntéza u stálezelných rostlin.....	7
1.2.	Fluorescence jako metoda studia fotosyntézy.....	8
1.2.1	Základy fluorescence.....	8
1.2.2.	Fluorescenční kinetika a základní fluorescenční parametry.....	9
1.2.3.	Měření fluorescence.....	10
2.	Materiál a metody.....	11
2.1.	Stanoviště a meteorologická data.....	11
2.2.	Rostliny.....	11
2.3.	Měření fluorescence chlorofylu.....	11
2.4.	Měření rychlosti asimilace CO <sub>2</sub> .....	12
3.	Výsledky.....	13
3.1.	Meteorologická data.....	13
3.2.	Rychlost asimilace CO <sub>2</sub> .....	14
3.3.	Změny fluorescenčních indukčních křivek.....	15
3.4.	Sezónní změny fluorescenčních výtěžků F <sub>0</sub> a F <sub>M</sub> .....	17
3.5.	Sezónní změny fluorescenčních parametrů F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub> a NPQ.....	18
3.6.	Korelace F <sub>0</sub> , F <sub>M</sub> , F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub> a NPQ s meteorologickými daty.....	19
4.	Diskuze.....	23
5.	Závěr.....	25
6.	Literatura.....	26

## 1. Úvod

### 1.1. Fotosyntéza

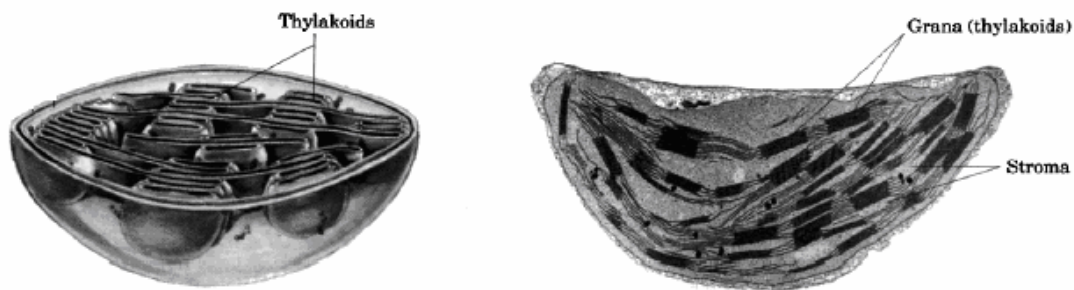
#### 1.1.1. Základy fotosyntézy

Téměř všechny organické látky, které kolují v trofických řetězcích na Zemi, vznikají při fotosyntéze. Fotosyntéza je proces mnoha propojených reakcí, kde zdrojem energie je sluneční záření. Fotosyntetizující organismy, jako například sinice, řasy a vyšší rostliny, využívají elektrony z molekul vody a energii slunečního světla k asimilaci CO<sub>2</sub> do organických sloučenin (Obr. č.1).



Obr.1. Základní rovnice fotosyntézy, kde {CH<sub>2</sub>O} je vzorec strukturální jednotky cukrů, *hf* je excitační energie a ΔG energie dissipovaná zpět do okolí rostliny.

Při štěpení vody uvolňují do atmosféry plynný kyslík. V buňkách vyšších rostlin probíhají fotosyntetické děje ve specializovaných vnitrobuněčných organelách - v chloroplastech (Obr.2). Struktura chloroplastu je obdobná té mitochondriální. Dvě membrány, vnější a vnitřní, obklopují prostor nazývaný stroma, kde se nachází mnoho metabolických enzymů a kde probíhá vlastní fixace CO<sub>2</sub> (Calvinův cyklus).



Obr.2 Struktura chloroplastu – fotosyntetické organely vyšších rostlin

Protože chloroplast je bakteriálního původu, a do eukaryotních fotosyntetizujících buněk byl začleněn endosymbiózou, nachází se ve stromatu sada ribosomů, RNA a DNA. Ve stromatálním prostoru je třetí membrána, tvořená lipidovou dvojvrstvou, na které probíhají procesy zachycení světelné energie-fotofyzikální a fotochemické děje. Tato membrána je označována jako thylakoidní a vytváří zploštělé útvary - thylakoidy. Díky nábojům na proteinech membrány se zploštělé útvary k sobě přibližují a tvoří grana.

Vnitřní prostor thylakoidů, nazývaný lumen, je naplněn kapalnou fází s dalším enzymatickým aparátem.

Všechny děje které jsou součástí procesu fotosyntézy lze rozdělit do dvou základních fází: světelné a temnotní.

Jako světelná část fotosyntézy jsou označovány děje na thylakoidní membráně, při kterých dochází k absorpci slunečního záření, separaci nábojů a přenosu elektronů a následně protonů přes membránu. Výsledkem světelné fáze fotosyntézy je redukce NADP na NADPH+H<sup>+</sup>, generace elektrochemického gradientu na membráně, který je využit pro syntézu ATP. Molekuly ATP a NADPH+H<sup>+</sup> jsou dále využívány v Calvinově cyklu při fixaci CO<sub>2</sub> a jeho přeměně na cukry ve stromatu chloroplastu, popř. jsou dále přenášeny do cytosolu, kde jsou využity v syntéze mnoha jiných molekul, které rostlinné buňky potřebují k životu.

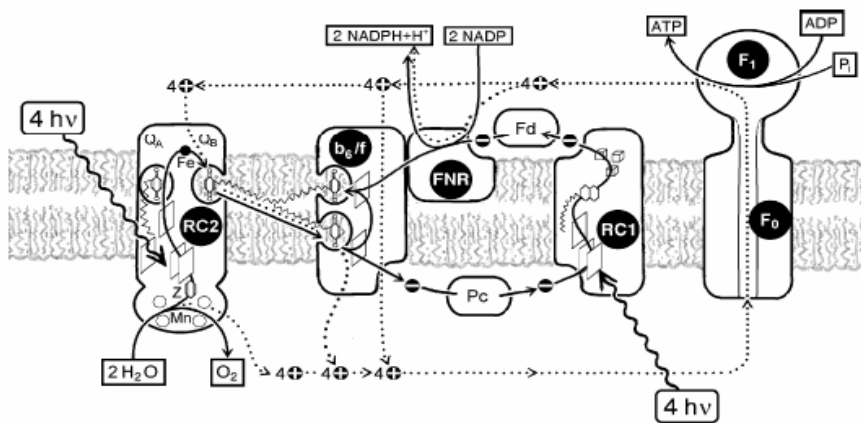
Děje, při kterých dochází k samotnému zabudování uhlíku do organických cukrů za pomoci enzymů Calvinova cyklu ve stromatu chloroplastu, jsou označovány jako temnotní, neboť při nich již není třeba energie záření.

V následujícím textu se soustředím na světelnou fázi, která je charakteristická biofyzikálními ději absorpce záření, emise záření a tepelné disipace energie fotosyntetickými pigmenty.

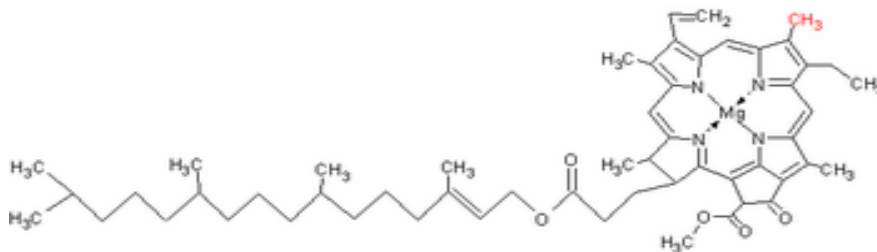
### *1.1.2. Pigmenty*

Absorpci kvant záření a přenos excitační energie zabezpečují pigmentproteinové komplexy, které jsou tvořeny chlorofyly a karotenoidy vázanými na proteiny. S těmito komplexy jsou spojeny chinony a cytochromy a dále enzymy podílející se na rozkladu molekul vody, redukci NADP<sup>+</sup> a výrobě ATP. Celý tento systém je umístěn v tylakoidní membráně (Obr.3). Chlorofyl (Chl) je základním fotosyntetickým pigmentem. Základem jeho struktury je porfyrin, což jsou čtyři tetrapyroly vzájemně spojené methinovými můstky a s komplexně vázaným kationtem Mg<sup>2+</sup> (Obr. 4). Podle rozdílných skupin na II. pyrolovém cyklu rozlišujeme různé chlorofyly, např. Chl a, b, c.

Dalšími důležitými pigmenty jsou karotenoidy - polyizoprenoidy, které se dělí na uhlovodíkové karoteny a kyslíkaté deriváty xantofyly.



Obr.3. Základní schéma fotochemických dějů v thylakoidální membráně. Základními transmembránovými komplexy jsou PSII (RC2), cytochrom  $b_6/f$  komplex, PSI (RC1) a ATPáza. Transport elektronů mezi těmito komplexy zajišťují mobilní přenašeče: plastochinon a plastocyanin (Pc). Plnou čarou je vyznačen pohyb elektronů, tečkovanou čarou pohyb protonů  $H^+$  (Šetlík a kol. 2007).



Obr.4. Struktura molekuly chlorofylu. Převzato z <http://cs.wikipedia.org>

### 1.1.3. Děje světelné fáze fotosyntézy

Světelná fáze fotosyntézy probíhá na čtyřech základních supramolekulárních komplexech vázaných v tylakoidální membráně: fotosystém II (PSII), cytochrom  $b_6/f$  komplex (Cyt  $b_6/f$ ), fotosystém I (PSI) a ATP-syntáza. Transport elektronů mezi těmito komplexy zajišťují mobilní přenašeče: plastochinon (mezi PSII a Cyt  $b_6/f$ ) a plastocyanin (mezi Cyt  $b_6/f$  a PSI) (viz Obr.3).

Fotosyntéza začíná zachycením fotonu v anténě LHClI PSII. Excitace je přenesena na chlorofyl reakčního centra, kde je použita na rozdělení nábojů oxidací primárního donoru P680, k redukci feofytinu a posléze pevně vázaného chinonu  $Q_A$ . Z  $Q_A$  je přenesen na další chinon  $Q_B$ , který vstoupí do kapsy  $Q_B$ . Po redukci  $Q_B$  dvěma elektrony přijme dva protony a vznikne molekula neutrálního plastochinonolu  $PQH_2$ .  $PQH_2$  přenese protony a elektrony ze stromatální strany thylakoidní membrány k lumenu do  $b_6/f$  komplexu. Zde jsou odděleny protony a vyloučeny do lumenu. Elektrony přijme přenašeč plastocyanin (PC), který je transportuje k PSIRC, kde redukují primární donor  $P700^+$ , již předtím oxidovaný primární separací náboje díky excitační energii světla zachyceného chlorofylem v PSI. Po této cestě

napříč thylakoidní membránou je redukován ferredoxin. Odtud mohou být elektrony předány zpět do poolu plastochinonu při cyklickém transportu elektronů, nebo slouží k redukcí NADPH a dalších složek v temnostní fázi fotosyntézy. Zdrojem elektronů pro redukcí P680+ slouží komplex oxidující vodu a vyvíjející kyslík (OEC, oxygen evolving complex) V tomto systému se nachází klastr čtyř vázaných atomů Mn. Během čtyř excitačních cyklů se ze dvou molekul vody uvolní čtyři protony do lumenu a molekulární kyslík difunduje do atmosféry. (Procházka a kol. 1998).

#### 1.1.4. Fotosyntéza u stálezelených rostlin

Stálezelené rostliny rostoucí v klimatických oblastech s velkými ročními výkyvy teplot musely vyvinout mechanismy, které jim umožňují růst a vývoj v těchto podmínkách. U stálezelených rostlin se střídají dvě základní fáze: dormantní stadium a období růstové aktivity.

Přezimující stálezelené rostliny různých rodů obecně vykazují sezónní fluktuace účinnosti fotosyntézy v létě a v zimě: v létě je účinnost fotosyntézy vysoká, v zimě téměř nulová (review Öquist a Huner 2003). V klimatických zónách s mírnými zimami jsou sezónní variace menší než v oblastech s náročnějšími zimními podmínkami. Tyto variace byly zkoumány ve studiích jehličnanů *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii* aj. (Verhoeven a kol. 1996). Obdobné výsledky byly pozorovány také u lišejníků nebo druhů přizpůsobených mírným zimám, jako *Opuntia stricta*, *Malva neglecta* a *Yucca glauca* (Barker Logan Adams Demmig-Adams 1998). Ovšem modelovým organismem pro studium klíčových odpovědí fotosyntézy na sezónní klimatické variace, pro které jsou charakteristické zimní teploty pod bodem mrazu během delších časových period, a které mohou způsobit i kompletní inhibici fotosyntézy, slouží *Pinus sylvestris*. Křivka sezónních změn rychlosti asimilace CO<sub>2</sub> u této rostliny ukazuje rozsáhlé minimum během zimy s nejnižšími hodnotami v březnu, kdy je už vysoká ozářenost a zároveň jsou rozdílné teploty ve dne a v noci – nad a pod 0°C, takže dochází ke střídavému roztávání a mrznutí listů. Široké maximum rychlosti asimilace CO<sub>2</sub> bylo zaznamenáno během léta. K rychlým změnám v fotosyntetické účinnosti, které dobře korelují se změnami minimálních teplot, dochází na jaře a na podzim (Öquist a Huner 2003). Schopnost fotosyntetických organismů udržovat rovnováhu mezi množstvím energie absorbované fotochemickými procesy a jejím následným využitím v metabolismu růstu,



je nazývána fotostáze. Když ozáření přesáhne kapacitu fotosyntetického aparátu vázat CO<sub>2</sub>, indukují se změny vedoucí k fotostázi. Pro dosažení této rovnováhy musí rostliny v zimním období redukovat velikost světlosběrných antén, což je provázeno částečnou ztrátou chlorofylu (Öquist a Huner 2003). Kromě toho, že je snižována efektivní i fyzická velikost antén, snižuje se také počet RC a D1 proteinu. Zde ale nestačí jen snížit účinnost antén, ale také je nutno zvýšit kapacitu nefotochemického zhášení - přeměny části absorbovaného světla na teplo. Tato tepelná disipace je uskutečňována xantofylovým cyklem, postupnou epoxidací zeaxantinu přes antheraxantin na violaxantin (Adams a Barker 1998) a zvyšováním pH gradientu na membráně thylakoidu. Proto během zimního období rostliny mají vyšší obsah xantofylů v listech a obsahu proteinu PsbS vázaného s PSII, který má také zásadní význam pro zhášení excitační energie závislé na xantofylovém cyklu (Öquist a Huner 2003). Během nejtěžší zimy nebyla změřena žádná fotosyntéza, ale po rozmrazení listů byly naměřeny malé, ale pozitivní hodnoty  $F_v/F_M$ , nízký stálý obsah D1 proteinu a s vysoké stabilním NPQ (Öquist a Huner 2003). V jarních měsících, kdy dochází k přechodu z dormance, prudce stoupá účinnost fotosyntézy, protože se metabolismus rostlin vrací k fotosynteticky aktivnímu stavu: zvyšuje se obsah chlorofylu, LHClI komplexů, reakčních center a epoxidovaného stavu xantofylů. Výsledkem nástupu jara je tedy navrácení fotosyntetické kapacity a snížení stálého NPQ, které je charakteristické pro zimu. Naopak, před nástupem do dormantního stadia dochází v rostlinách během podzimu k aklimatizačním změnám umožňujícím jejich existenci v zimním období. Všechny tyto změny jsou spouštěny aktivací určitých genů. Indukce je vyvolána zkrácením fotoperiody a snížením denních teplot na 15-10°C (Öquist a Huner 2003).

Při porovnání čisté fotosyntézy borovice (*Pinus contorta*) a ozimé pšenice (*Triticum aestivum*) v létě a v zimě, byl u borovice pozorován pokles o 80% v dormanci, na rozdíl od pšenice, jejíž asimilační výtěžky zůstaly nedotčeny (Savitch a kol. 2002). Tento pokles souhlasí s faktem, že borovice v dormanci neroste na rozdíl od pšenice.

## 1.2. Fluorescence jako metoda studia fotosyntézy

### 1.2.1. *Základy fluorescence*

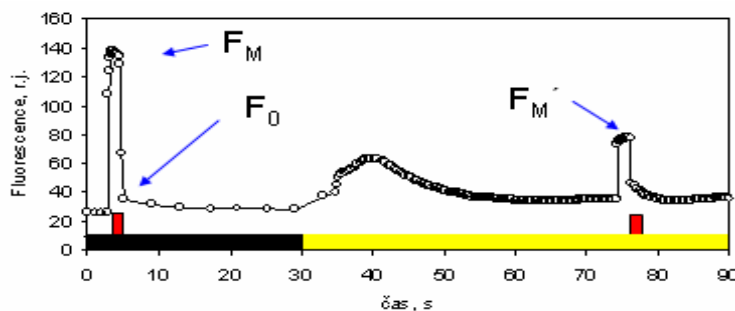
Světlo absorbované chlorofylem ve fotosyntetickém aparátu je zdrojem energie pro primární fotochemické reakce. Za fyziologických podmínek je více než devadesát procent energie využito ve fotochemii. Absorbovaná energie, která není využita k fotochemii,

je chlorofylem zpět emitována v podobě fluorescence, nebo disipována v podobě tepla. V pokojové teplotě pochází většina emitovaného záření z fluorescence fotosystému II (Maxwell a Johnson 2000).

Pokud je fluorescence excitována modrým světlem, je maximum vyzařované fluorescence při vlnových délkách 685 a 735nm. Při vybuzení fluorescence červeným světlem je maximum u 685nm silně potlačeno (Šebánek a kol. 1998). Fotosyntéza, fluorescence a tepelná disipace mají mezi sebou kompetitivní vztah. Pokud tedy vzroste účinnost jedné z těchto veličin, výtěžek ostatních dvou klesá. Měřením a zaznamenáváním změn kvantového výtěžku fluorescence lze tedy získat informace o změnách účinností fotochemie a tepelné disipace. I když celkové množství záření, které jde do fluorescenční emise se pohybuje kolem 1 až 2 %, lze ji bez problémů měřit (Maxwell a Johnson 2000).

### 1.2.2. Fluorescenční kinetika a základní fluorescenční parametry

Když je fotosyntetizující organismus v temnotně adaptovaném stavu (TAS) vystaven aktinickému světlu, výtěžek fluorescence vzrůstá až k lokálnímu maximu a následně opět klesá, až se ustálí na stabilní hodnotě ( $F_S$ ) (Obr.5). Tehdy je fotosyntetický organismus už adaptován na světlo (světelně adaptovaný stav, SAS). Charakteristické změny fluorescence během přechodu z TAS na SAS se nazývají fluorescenční indukce nebo také Kautského jev (Kausky a Hirsch 1931).



Obr.5. Záznam fluorescenční kinetiky u temnotně adaptovaného listu rododendronu. Černá barva u osy x zobrazuje temnotně adaptovaný vzorek, žlutá barva čas, od kdy byl vzorek vystaven aktinickému světlu  $100 \mu\text{mol}(\text{fotonů})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Červené odbělničky označují čas, kdy byly aplikovány saturační pulzy ( $1500 \mu\text{mol}(\text{fotonů})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) pro stanovení maximálního fluorescenčního výtěžku.

Jako první byla změřena úroveň  $F_0$ , následně byla stanovena  $F_M$  v saturačním pulzu. Po 25s temnotní adaptace byl list vystaven aktinickému světlu o dobu 60s, v 76s byla změřena maximální fluorescence u  $F_M'$ .

TAS rostliny lze charakterizovat dvěma úrovněmi fluorescence:

$F_0$  – všechna RC jsou otevřena, primární akceptory  $Q_A$  jsou oxidovány a jsou tak schopny přijímat elektrony,  $F_M$  - všechna RC jsou uzavřena, primární akceptory  $Q_A$  jsou redukovány a nejsou tak schopny přijímat elektrony. Tento stav nastává, když je rostlina vystavena vysokému ozáření, například v podobě saturačního záblesku, který zahltí všechna RC, nebo po aplikaci herbicidů.

Základními fluorescenčními parametry jsou:

$F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$  - maximální kvantový výtěžek PSII ,

$\Phi_{II0} = F_V / F_M$  - efektivní kvantový výtěžek konverze fotochemické energie PSII,

$NPQ = (F_M - F_M') / F_M'$  - nefotochemické zhášení fluorescence. Tento parametr slouží pro kvantifikaci procesů, které způsobují pokles maximální fluorescenční emise při přechodu rostliny z TAS do SAS.

Popis všech fluorescenčních výtěžků TAS i SAS rostlin a fluorescenčních parametrů je detailně uveden v publikaci (Roháček 2002).

### *1.2.3. Měření fluorescence*

Metoda záznamu chlorofylové fluorescence je často využívána při výzkumu fyziologie fotosyntézy. V důsledku širokého rozšíření měřících přístrojů je možné provádět měření v laboratoři, ale i v polních podmínkách. Tato technika umožňuje studovat neinvazivním způsobem fotochemické a nefotochemické procesy v thylakoidních membránách chlorofylů fotosyntetizujících rostlin.

V současné době jsou nejvíce používány fluorimetry pracující na principu pulzní amplitudové modulace (PAM) fluorescenčního signálu (Schreiber a kol. 1986). Lze jimi přesně měřit fluorescenci chlorofylu dokonce i na pozadí denního světla v polních podmínkách.

V praxi jsou dostupné dva typy fluorimetrů: nezobrazovací fluorimetry integrují fluorescenční signál z celého měřeného vzorku a výstupem měření je jediná fluorescenční indukční křivka nebo soubor fluorescenčních parametrů. Lze jimi měřit i velmi rychlé procesy na fotosyntetické membráně (Schreiber 2004). Zobrazovacími fluorimetry lze měřit změny fluorescenční emise chlorofylu v ploše a zobrazit tak prostorovou heterogenitu vzorku, a to jak na mikroskopické tak makroskopické úrovni (Nedbal a Whitmarsh 2004).

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Stanoviště a meteorologická data

Měření byla prováděna v Nových Hradech (48° 47' N, 14° 46' E, 541m. n.m., JZ České republiky od 17.5.2005 do 24.4.2006. Průběh teplot během této kampaně jsem získala z meteorologické stanice, stojící v parku Ústavu systémové biologie a ekologie AVČR. Aktuální ozáření a aktuální ozáření v místech odběru vzorků byly měřeny přímo na stanovišti přístrojem Li-Cor (model Li-250 Light meter, Licor enviromental).

### 2.2. Rostliny

Průběh fluorescenčních parametrů jsem sledovala u dvou rostlinných druhů: smrk omorika (*Picea omorika*) a rododendron (*Rhododendron x hybridum*). Obě sledované rostliny rostou v parku Ústavu systémové biologie a ekologie AVČR a jsou staré přibližně 30 let. Byly vybrány, protože jejich jehlice/listy přetrvávají na rostlině několik let, a já jsem tak mohla sledovat průběh základních fluorescenčních parametrů i během zimního období, kdy se tyto stálezelené rostliny musejí vyrovnávat s nízkými teplotami.

U smrku jsem měřila exponované i zastíněné jednoleté letorosty, u rododendronu jen exponované. U každého měření jsem měla tři opakování, z kterých jsem stanovovala průměr a standardní odchylku.

Měření bylo prováděno na odstřižených vzorcích. Oddělení vzorku od větve rostliny jsem prováděla pod vodou, abych předešla embolismu xylému. Pak jsem je přenesla do laboratoře, kde se v teplotě odpovídající venkovnímu prostředí temnotně adaptovaly po dobu 20 min. Měření probíhala taktéž v teplotách odpovídajících venkovním.

### 2.3. Měření fluorescence chlorofylu

Kinetiku fluorescence chlorofylu a základní fluorescenční parametry jsem měřila pomocí kinetického zobrazovacího fluorimetru FluorCam (690M, uzavřená verze, P.S.Instruments, spol. s r.o., Brno, Česká republika, www.psi.cz) (Obr.6). Měření probíhala paralelně s měřením fluorescence chlorofylu ve venkovních podmínkách (viz bakalářská práce Václava Šloufa). Po temnotní adaptaci jsem vždy aplikovala stejný měřicí protokol - zhášecí analýzu, během kterého byla zaznamenávána fluorescenční indukce. Měřicí protokol byl následující: nejprve byl změřen fluorescenční signál temnotně adaptovaného vzorku ( $F_0$ ) pomocí deseti neaktinických měřících pulsů.



Obr.6. Kinetický zobrazovací fluorimetr, uzavřená verze  
([www.psi.cz/products/fluorcams/open.htm](http://www.psi.cz/products/fluorcams/open.htm))

Pak byla změřena maximální úroveň fluorescenční emise ( $F_M$ ) v bílém saturačním pulsu (1.6s,  $1500\mu\text{mol}(\text{fotonů})\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ). Následovala 30s temnotní adaptace, po které byl vzorek vystaven aktinickému světlu na dobu 90s ( $100\mu\text{mol}(\text{fotonů})\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , 620nm). Na konci této periody byla stanovena úroveň  $F_S$  (*steady-state*). V poslední vteřině trvání aktinického světla byl vzorek opět vystaven saturačnímu záblesku ( $1.6\text{s}$ ,  $1500\mu\text{mol}(\text{fotonů})\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ), během kterého byla změřena úroveň  $F_M$ .

Fluorescenční parametry  $\Phi_0$  a NPQ jsem počítala podle Roháčka (Roháček 2002):

$$\Phi_0 = F_V / F_M = (F_M - F_0) / F_M$$

$$\text{NPQ} = (F_M - F_M') / F_M'$$

#### 2.4. Měření rychlosti asimilace $\text{CO}_2$ :

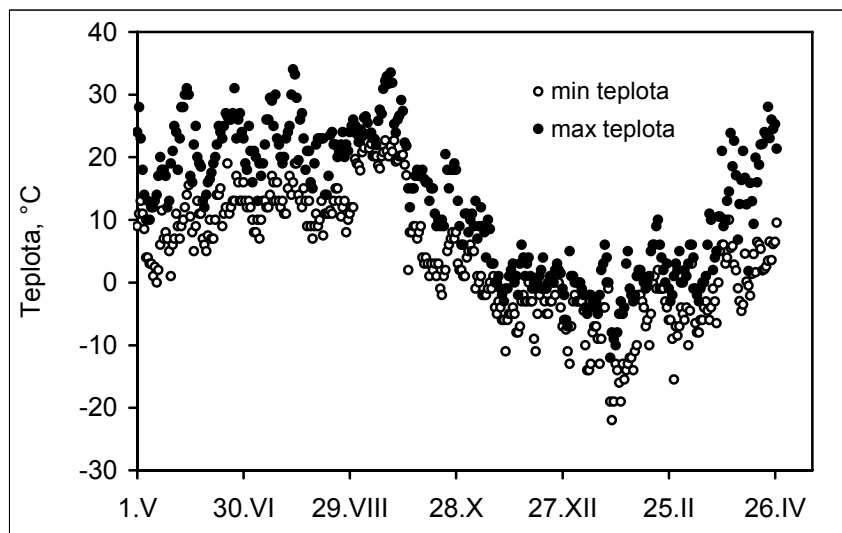
Měření byla prováděna na intaktních listech rododendronu přístrojem CIRAS-1 (PP Systems, Inc., UK, [www.ppsystems.com](http://www.ppsystems.com)) při aktuální ambientní ozáření, teplotě a vzdušné vlhkosti v blízkosti mých odběrových míst. Měření byla prováděna na stále stejných listech. Pro jedno měření bylo použito 5 listů. Listy rododendronu byly při měření uzavřeny v asimilační kyvetě, v konstantní ambientní koncentraci  $\text{CO}_2$  ( $375 \pm 5\mu\text{mol}(\text{CO}_2).\text{mol}^{-1}$ ). Tato měření probíhala paralelně s měřeními fluorescenční emise ve venkovních podmínkách (viz bakalářská práce Václava Šloufa) a měřeními fluorescenční emise v laboratoři, které jsem měla na starosti já.

Výsledky rychlosti asimilace  $\text{CO}_2$  mi byly poskytnuty mou školitelkou, pro srovnání s výsledky mých experimentů v laboratoři.

### 3. Výsledky

#### 3.1. Meteorologická data

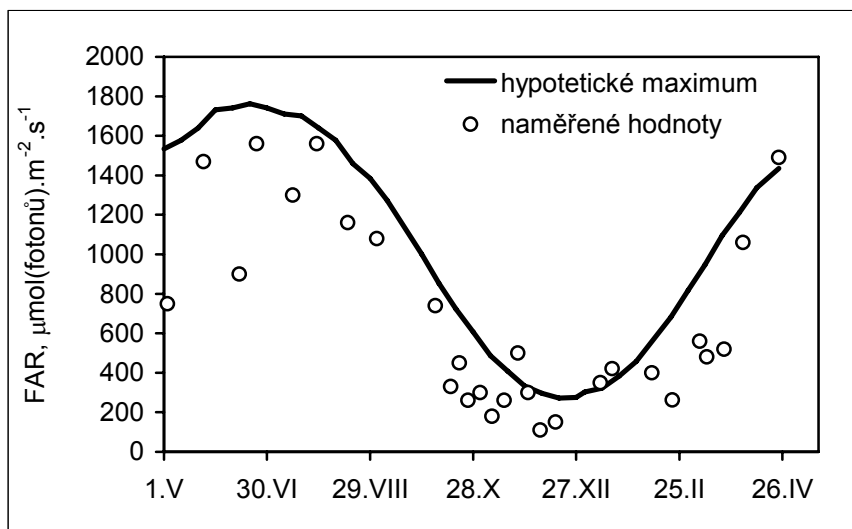
Hlavním cílem této práce bylo monitorovat změny rychlosti asimilace  $\text{CO}_2$ , limitních fluorescenčních výtěžků ( $F_0$ ,  $F_M$ ) a dvou základních fluorescenčních parametrů ( $F_V/F_M$ , NPQ) v průběhu celého roku. Jedním z dalších úkolů bylo ověřit souvislosti mezi výše uvedenými parametry a meteorologickými vlivy – zejména teplotou a intenzitou slunečního záření. Obrázek č.7 popisuje průběh maximálních (plné body) a minimálních teplot (prázdné body) od 1.5. 2005 do 26.4. 2006, tj. během období, kdy jsem prováděla měření. Z grafu vyplývá, že od května 2005 do konce října 2005 a od dubna 2006 byly denní minimální teploty převážně nad  $0^\circ\text{C}$ , a v obdobích od listopadu 2005 do konce března 2006 pod  $0^\circ\text{C}$ .



Obr. 7.

Průběh maximálních denních a minimálních denních teplot, v období kdy byly prováděny experimenty (1.5. 2005 až 26.4. 2006). Data byla získána z meteorologické stanice umístěné v parku na Nových Hradech.

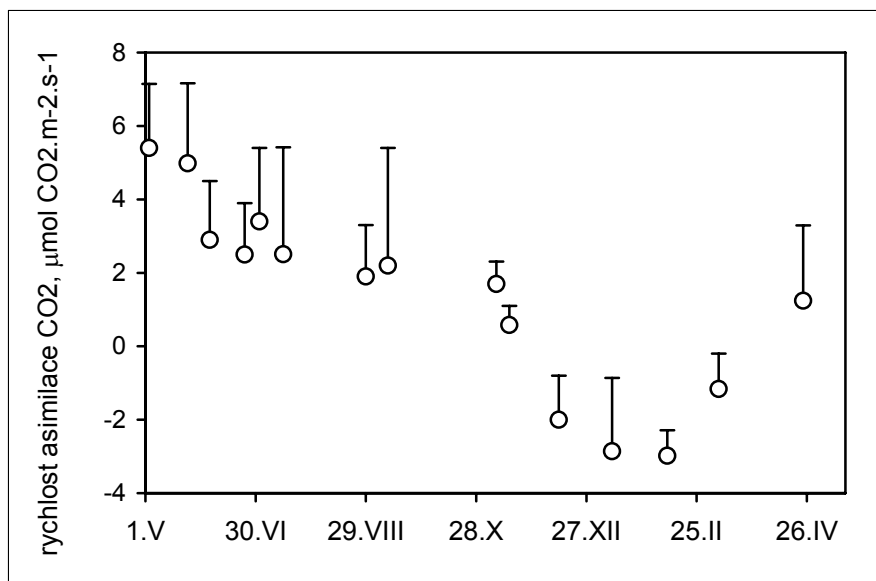
Obrázek č.8 ukazuje průběh aktuálních ozáření na volné ploše (fotosynteticky aktivní radiace, FAR), které jsem naměřila v čase experimentů (prázdné body) a potenciálních maximálních hodnot ozáření (FAR) pro Nové Hrady spočítané podle Jonese (1992) programem PhotosyntAssistant (plná čára). Tato data nám byla poskytnuta Mgr. Otmarem Urbanem, Ph.D. z Ústavu systémové biologie a ekologie AVČR, v.v.i. v Brně (<http://www.usbe.cas.cz/index.php?node=295>).



Obr. 8. FAR naměřený na stanovišti rostlin (měřili jsme společně s Václavem Šloufem, v dopoledních hodinách, přístrojem Li-Cor kolmo k obloze na volném prostranství), a hypotetická maximální ozáření (FAR) pro lokalitu Nové Hradý ve stejném období.

### 3.2. Rychlost asimilace CO<sub>2</sub>

Jednou z metod kterou jsme používali, bylo měření rychlosti asimilace CO<sub>2</sub> (Ciras – I, PP - Systems, Ltd., UK). Obrázek č.9. ukazuje průběh aktuální asimilace CO<sub>2</sub> listů rododendronu měřené v ambientních podmínkách na stanovišti. S výsledky tohoto pokusu porovnávám svá data, záznamy teplot a ozáření (viz dále). Naměřené hodnoty odpovídají průběhu teplot v daném období. Nejvyšší rychlost asimilace CO<sub>2</sub> jsme zaznamenali 3.5. 2005, během léta 2005 postupně klesala. Nejrychlejší pokles byl zaznamenán na podzim (od 8.11. do 12.12. 2005), kdy již denní minimální teploty byly pod 0°C. Tento experiment jsme prováděli pouze u rododendronu, neboť pro měření u smrku jsme neměli potřebné vybavení.



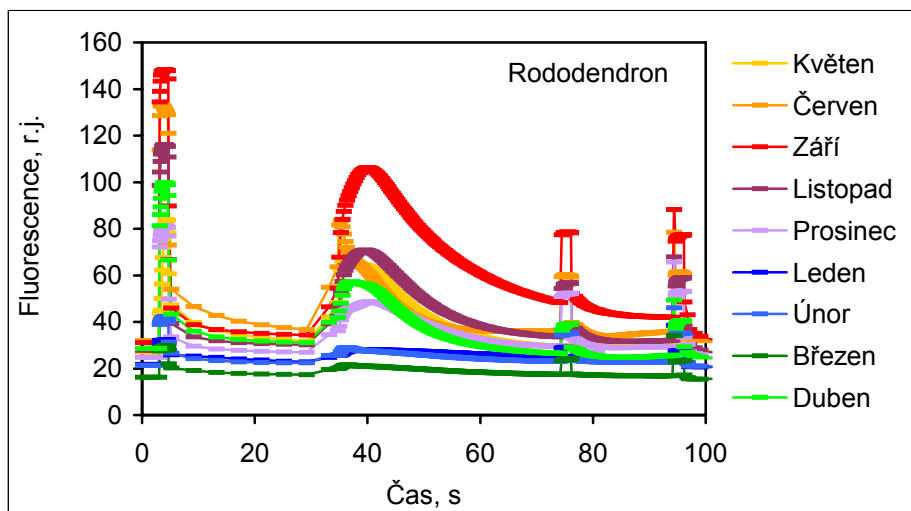
Obr. 9. Rychlosti asimilace CO<sub>2</sub> listů rododendronu měřená v dopoledních hodinách (10-11h) v ambientních podmínkách na stanovišti přístrojem CIRAS-I (PP-Systems, Ltd. UK).

### 3.3. Změny fluorescenčních indukčních křivek během roku

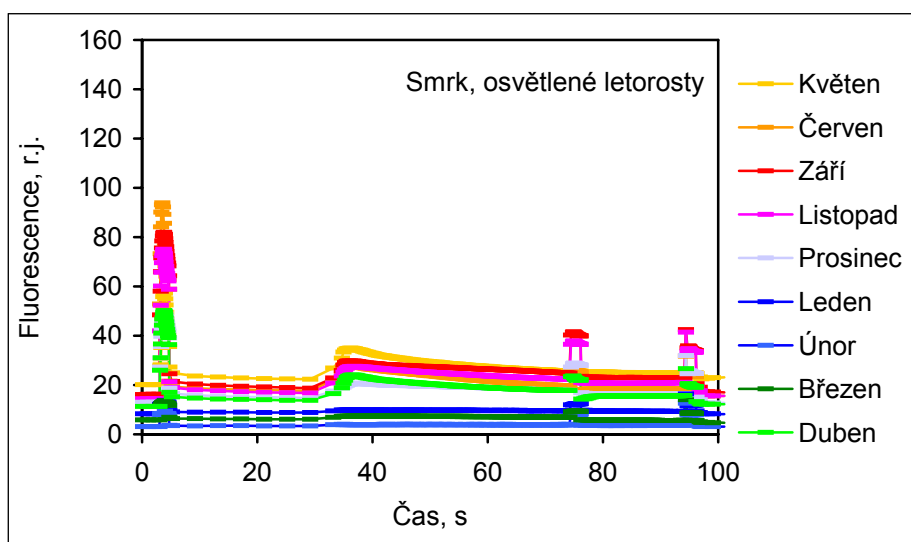
Změny ve fluorescenční indukci v aktinickém světle ( $100 \mu\text{mol}(\text{fotonů})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) během roku po jednotlivých měsících jsou zobrazeny na obrázcích č. 10 (listy rododendronu), č. 11 (osvětlené letorosty smrku) a č. 12 (zastíněné letorosty smrku). U všech sledovaných vzorků jsou minimální hodnoty fluorescenčního signálu dosahovány v měsících zimního období (od listopadu 2005 do konce března 2006). V souladu s pozdním nástupem jara v roce 2006, kdy teploty vzduchu byly pod bodem mrazu až do 26.3. 2006, jsou březnové hodnoty fluorescence blízké těm zimním. Výrazný nárůst je patrný až v dubnu.

Obecně lze říci, že listy rododendronu mají vyšší fluorescenční výtěžek zhruba o 50%, než letorosty smrku. Zastíněné i osvětlené letorosty smrku mají nejvyšší fluorescenční signál v květnu, na rozdíl od rododendronu, který dosahuje svých maxim až v září. Fluorescenční signál zastíněných letorostů je vyšší než u osvětlených, patrně v důsledku většího množství chlorofylu v jehlicích.

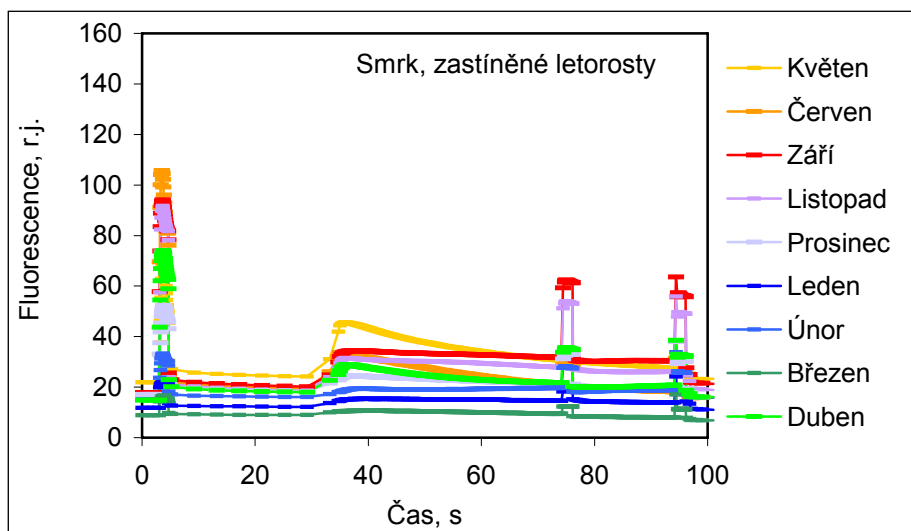




Obr. 10. Fluorescenční indukce u listů rododendronu v různých měsících během roku.



Obr. 11. Fluorescenční indukce u osvětlených letorostů smrku v různých měsících během roku.

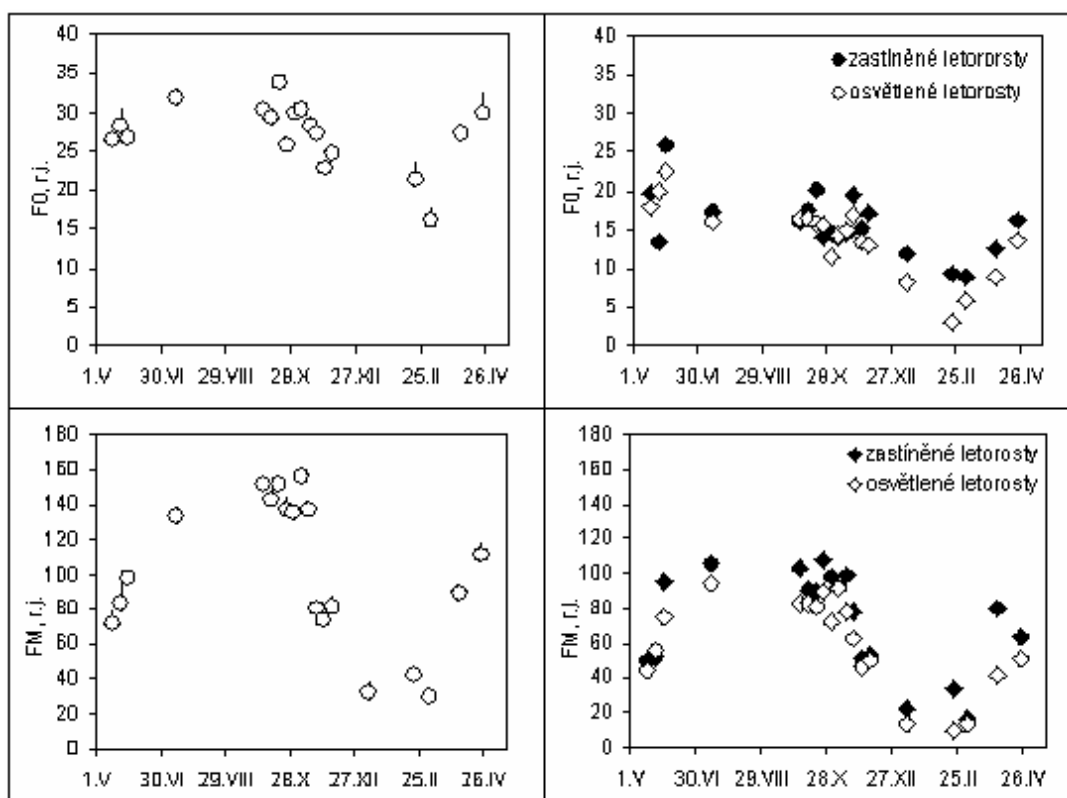


Obr. 12. Fluorescenční indukce u zastíněných letorostů smrku v různých měsících během roku.

### 3.4. Sezónní změny fluorescenčních výtěžků $F_0$ a $F_M$

Z naměřených indukčních křivek jsem vybrala hodnoty fluorescenčních výtěžků  $F_0$  a  $F_M$  jak u listů rododendronu, tak u letorostů smrku, jejichž průběh je ukázán v obrázku č.13.

Z obrázku č.13 lze říci, že hodnoty  $F_0$  u rododendronu jsou obecně vyšší než u obou smrků (ca o 30 %). Jak u letorostů smrku i u listů rododendronu jsou výrazné rozdíly v  $F_0$  mezi letním a zimním obdobím. Od 1.5. 2005 až do 29.11. 2005 jsou hodnoty  $F_0$  rododendronu i u smrku vysoké a stabilní.

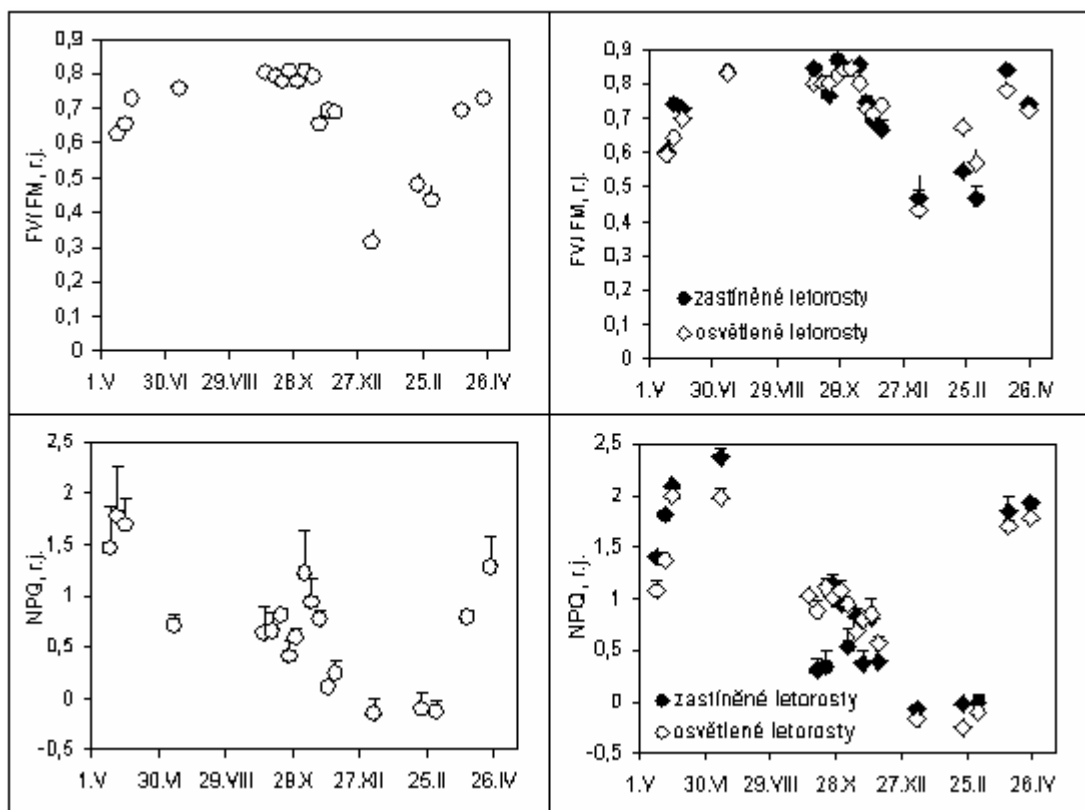


Obr. 13 Fluorescenční výtěžky  $F_0$  (horní panel) a  $F_M$  (spodní panel) u temnotně adaptovaných vzorků rododendronu (levý panel) a smrku (pravý panel). U smrku jsou odlišené osvětlené (prázdné kosočtverce) a zastíněné letorosty (plné kosočtverce).

Pokles nastává od 29.11. 2005 do 6.3. 2006 u rododendronu a od 6.12. 2005 do 21.2. 2006 u smrku, tzn. rododendron na podzim reaguje rychleji.  $F_0$  u osvětlených i zastíněných letorostů smrku mají podobný průběh, jen v zimním období (od 10.1. do 6.3. 2006) jsem naměřila vyšší hodnoty  $F_0$  u zastíněných letorostů. Naopak nejnižší hodnoty  $F_0$  jsem naměřila v období od 21.2. do 6.3. 2006, kdy i minimální denní teploty dosahovaly nejnižších hodnot v daném roce. Rozdíl hodnot  $F_0$  v letním a zimním období je u rododendronu 50%, u osvětlených letorostů smrku 85% a u zastíněných letorostů smrku 70%.

Také hodnoty  $F_M$  vykazují velké rozdíly mezi letním a zimním obdobím. V období od 1.5. a do 30. 6. 2005 jsem pozorovala nárůst hodnot  $F_M$  jak u rododendronu, tak u smrku. Stabilní vysoké hodnoty jsem naměřila od 14.7. do 1.11. 2005 a pokles  $F_M$  jsem zaznamenala od 15.11. 2005 do 10.1. 2006 jak pro rododendron tak pro smrk. Nejnižší hodnoty jsem naměřila v na přelomu měsíců února a března 22.2. až 6.3. 2006. U  $F_M$  jsou rozdíly mezi létem a zimou výraznější, konkrétně u rododendronu 80%, u osvětlených letorostů smrku 90% a u zastíněných letorostů 85%.

### 3.5. Sezónní změny fluorescenčních parametrů $F_V/F_M$ a NPQ



Obr. 14. Průběh fluorescenčních parametrů  $F_V/F_M$  (horní panel) a NPQ (spodní panel) u temnotně adaptovaných listů rododendronu (levý panel) a letorostů smrku (pravý panel), kde jsou odlišeny osvětlené (prázdné kosočtverce) a zastíněné letorosty (plné kosočtverce).

Podle vzorců uvedených v materiálech a metodách, jsem z fluorescenčních výtěžků základních parametrů počítala následující fluorescenční parametry:  $F_V/F_M$  a NPQ. Jejich průběh během sledovaného období je na obrázku 14.

$F_V/F_M$  smrku a rododendronu jsou přibližně srovnatelné a vykazují stejný trend jako  $F_0$  a  $F_M$ . Nárůst hodnot  $F_V/F_M$  jak u rododendronu, tak u smrku jsem pozorovala od 1.5. 2005. Maximálních hodnot bylo dosaženo 14.7. 2005, které se udržely až do 15.11. 2005, tj. do období, kdy se poprvé objevily první ranní mrazíky. Minimální hodnoty jsem naměřila 10.1. 2006 u rododendronu (0,31) i u smrku (0,43 pro osvětlené a 0,47 pro zastíněné letorosty). Rozdíl v hodnotách  $F_V/F_M$  v letním a zimním období je 60% u rododendronu, 50% u osvětlených letorostů a 45% u zastíněných letorostů smrku.

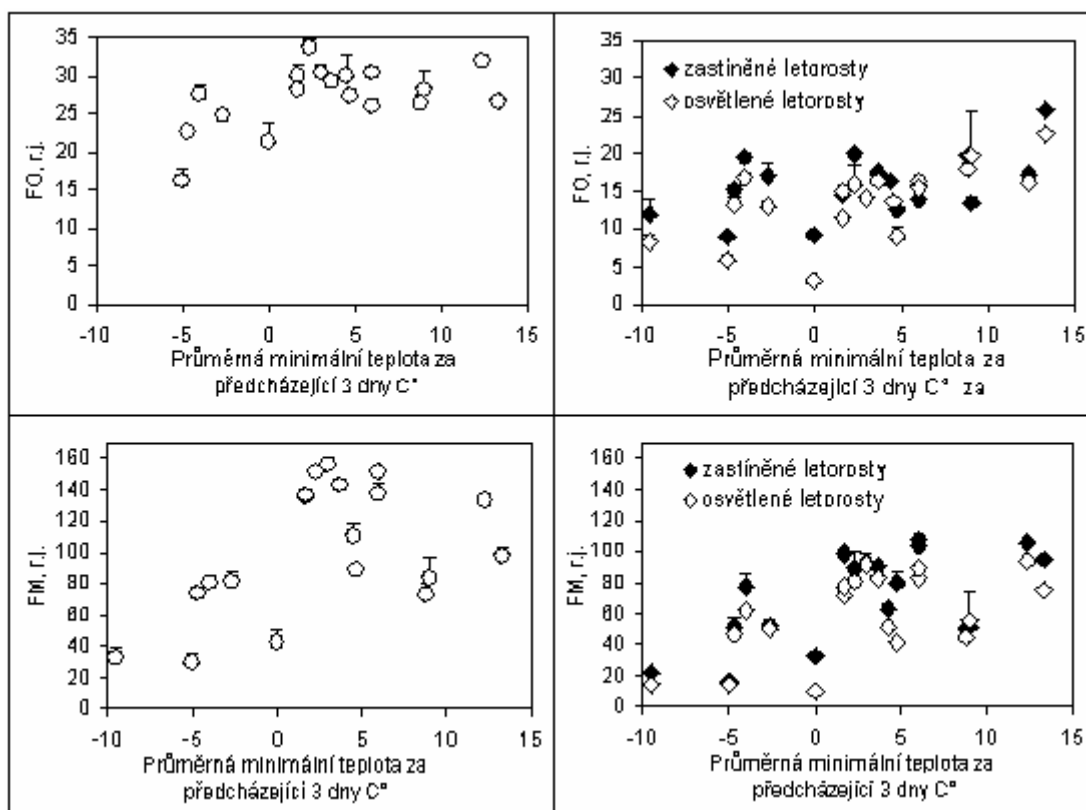
U NPQ jsem nejvyšší hodnoty naměřila 14.7. 2005, nejnižší hodnoty 6.3. 2006 u rododendronu, a v 21.2. 2006 u smrku. U osvětlených i zastíněných letorostů jsem pozorovala velmi podobný průběh. V zimě jsem někdy naměřila záporné hodnoty NPQ, které jsem v obr.14 nezobrazovala. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že v zimě nelze změřit správnou hodnotu  $F_M$  z důvodu inhibice chladem. Proto jsem nepovažovala tato data naměřená za relevantní a neuvádím rozdíl hodnot NPQ pro letní a zimní období.

### 3.6. Korelace $F_0$ , $F_M$ , $F_V/F_M$ a NPQ s meteorologickými daty

Abych získala informace o vztahu klimatologických charakteristik a fluorescenčních parametrů, korelovala jsem průběh těchto parametrů s průběhem minimálních teplot a s naměřenou aktuální ozářeností (FAR) na stanovišti před odběrem vzorků.

Protože mé experimenty sloužily jako doplňující měření pro zjištění informačního potenciálu steady-state fluorescence ( $F_S$ ) měřené v přírodních podmínkách (Soukupová a kol. 2007 a bakalářská práce Václava Šloufa), použila jsem stejný přístup jako Soukupová a kol. Ti zjistili, že hlavním faktorem ovlivňujícím změnu fluorescenční emise ( $F_S$ ) v přírodních podmínkách je teplota. Konkrétně během jarního období, kdy stálezelené rostliny přecházejí ze zimní dormance do fotosynteticky aktivního stavu, je to průměr minimálních denních teplot během předcházejících třech dnů. Proto i já jsem korelovala fluorescenční výtěžky a parametry naměřené během laboratorních experimentů s průměrem minimálních teplot za tři dny předcházející měření.

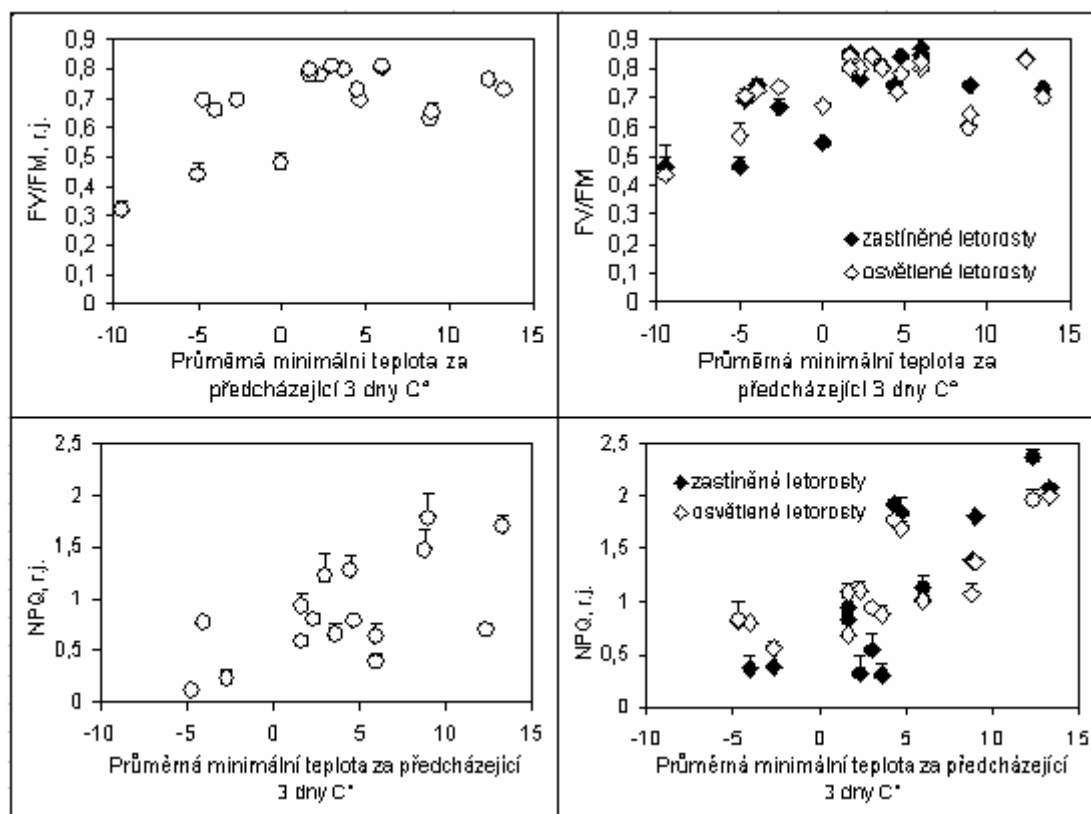
Obrázek č.15 ukazuje korelaci  $F_0$  (horní panel) a  $F_M$  (dolní panel) s teplotou u rododendronu (levý panel) a u smrku (pravý panel), kde jsou odlišené osvětlené (prázdné kosočtverce) a zastíněné letorosty (plné kosočtverce).



Obr. 15. Závislost fluorescenčních výtěžků  $F_0$  (horní panel) a  $F_M$  (dolní panel) na průměru minimálních teplot za předcházející tři dny u listů rododendronu (levý panel) a letorostů smrku (pravý panel). Měření jsem prováděla na temnotně adaptovaných vzorcích.

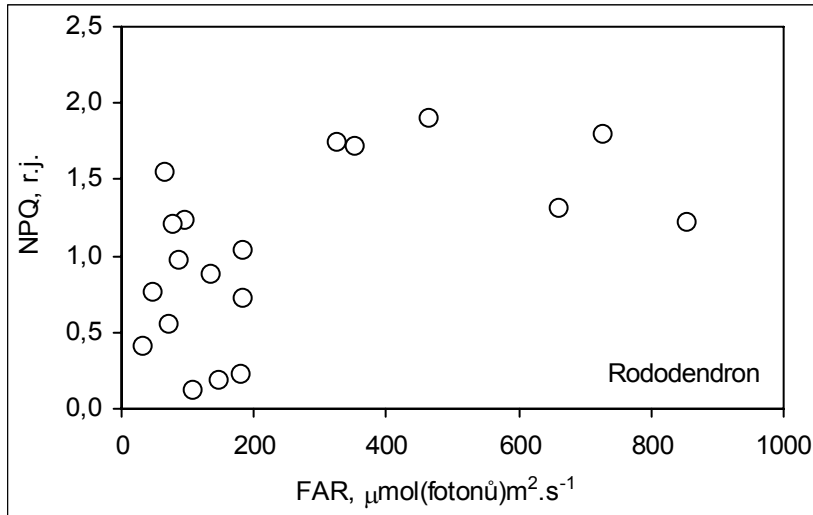
Obecně lze říci, že teplota kolem  $0^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) je mezní hodnotou jak pro rododendron, tak pro smrk. U teplot pod touto hranicí je pozorovatelná lineární závislost  $F_0$  i  $F_M$  u rododendronu. Nad touto hranicí je průběh  $F_0$  i  $F_M$  u rododendronu stabilní. U smrku tato závislost není tak zřetelná. Obrázek č.16 ukazuje podobnou závislost u  $F_V/F_M$  (horní panel) a u NPQ (dolní panel) u rododendronu (levý panel) i u smrku (pravý panel). I u  $F_V/F_M$  u rododendronu i u smrku je mezní hodnotou teplota kolem  $0^\circ\text{C}$ . Pod touto hodnotou je závislost  $F_V/F_M$  na teplotě lineární, nad touto hodnotou jsou hodnoty  $F_V/F_M$  stabilní (kolem 0,8).

U NPQ jsem žádnou mezní hodnotu nepozorovala. V rozmezí teplot  $-5$  až  $13^\circ\text{C}$  se NPQ lineárně zvyšuje. Do tohoto grafu jsem nezahrnovala již výše zmiňované záporné hodnoty NPQ naměřené v zimním období.

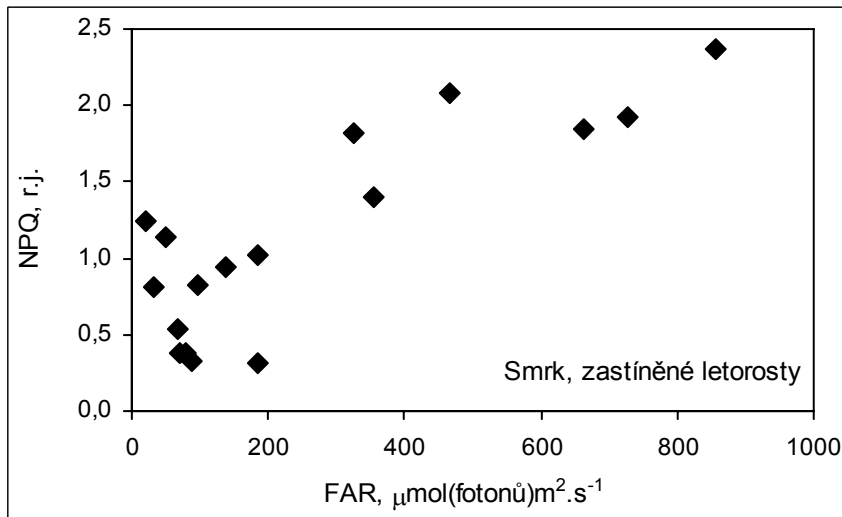


Obr. 16. Korelace FV/FM (horní panel) a NPQ (dolní panel) na průměru minimálních denních teplot za tři dny předcházející měření u listů rododendronu (levý panel) a u letorostů smrku (pravý panel).

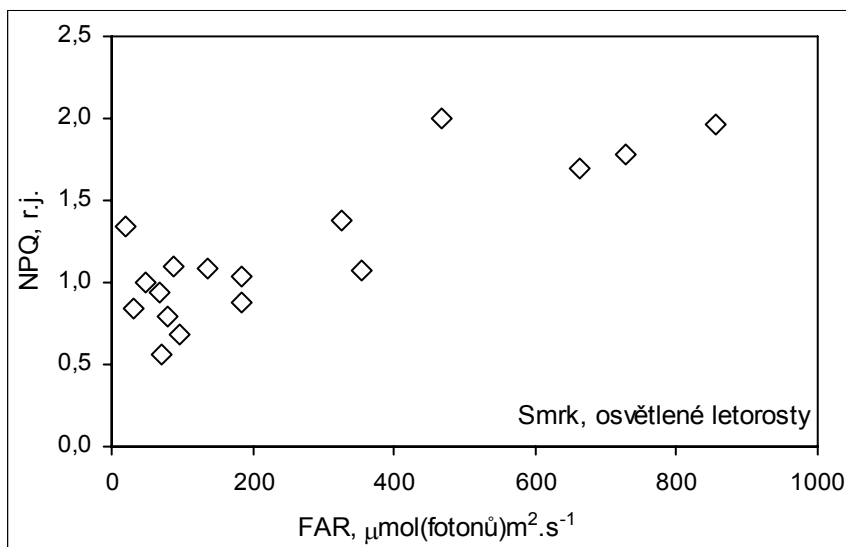
Vzhledem k tomu, že NPQ souvisí s nefotochemickou disipací světelné energie a závisí tedy na ozáření (Ensminger a kol. 2006), vynesla jsem naměřené hodnoty NPQ v laboratoři s aktuální ozářeností, kterou jsem změřila na stanovišti před odběrem vzorků (obrázek č.16). Zde jsem pozorovala lineární závislost až do ca 300  $\mu\text{mol (fotonů).m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Nad touto hodnotou je NPQ stabilní a ve vysokých ozářenístech (nad 800  $\mu\text{mol (fotonů).m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) je u rododendronu zřetelný pokles. U smrku jsem tento pokles nepozorovala zřejmě z důvodu rozdílné architektury listu/jehlice a i koruny keře rododendronu a jehličnanu smrku.



Obr.17



Obr.18



Obr. 19

Korelace NPQ a FAR. Data pro ozáření byla naměřena na stanovišti rostlin přístrojem Li-cor. Obr 17 rododendron, Obr.18 smrk zastíněné obr 19 osvětlené letorosty.

#### 4. Diskuze

Rychlost asimilace CO<sub>2</sub> v průběhu roku vykazovala značné výkyvy: na podzim její hodnoty výrazně poklesly k minimálním hodnotám, které jsme zaznamenali v lednu a na začátku února 2006. Od 9.3.2006 se hodnoty rychlosti asimilace CO<sub>2</sub> opět zvyšovaly, 3.5. 2006 syntézy u stálezelených přezimujících rostlin, které popisuje Öquist a Huner (2003) a Ensminger a kol. (2006).

Mým úkolem bylo měřit sezónní změnu základních fluorescenčních parametrů ( $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V/F_M$  a NPQ). Protože fluorescenční výtěžky  $F_0$  a  $F_M$  souvisí s koncentrací Chl a tedy se stavem LHCI a RC fotosyntetického aparátu, měly tyto parametry obdobný průběh jako rychlost asimilace CO<sub>2</sub> s jarním nárůstem, vysokými hodnotami v létě a prudkým poklesem na podzim. V zimním období s nízkými teplotami rostliny snižují kapacitu biochemické části fotosyntézy (sink) (Ensminger a kol. 2006) a dochází k inhibici elektrontransportních komplexů na thylakoidní membráně. To vše vede k popsáným změnám ve fluorescenčních výtěžcích.

Také roční průběh fluorescenčního parametru  $F_V/F_M$  odpovídal rychlosti asimilace CO<sub>2</sub>. Tato zjištění jsou v souladu s již publikovanými výsledky (Ensminger a kol. 2006). Öquist a Huner (2003) pozorovali, že změny  $F_V/F_M$  a zejména jeho pokles na podzim poukazuje na snížení účinnosti PSII centra v zimě za účelem stabilizace a udržení fotostáze. Fotostáze je mechanismus udržující rovnováhu energie absorbované na PSII a energie, která je spotřebována v asimilačních procesech. Vzhledem k tomu, že v zimě se vlivem nízkých teplot inhibují enzymy Calvinova cyklu, se u neopadavých rostlin, které mají funkční fotochemický aparát i během těchto nepříznivých podmínek, musejí snížit množství absorbované excitační energie. Toho je dosaženo snížením účinnosti přenosu pohlcené energie ze světlosběrných komplexů do RC. Za tímto procesem stojí snižování obsahu chlorofylů v listech a současně zvyšování obsahu karotenoidů. Nefotochemické zhášení fluorescence je v zimě rostlinou navyšováno v důsledku aklimatizace na nízké teploty a vysoké ozáření díky vyšší koncentraci xantofylu v listech. Proto je také vyšší míra deepoxidace a vyšší disipace absorbované energie v podobě tepla (Öquist a Hunner 2003). Naměřila jsem nejvyšší NPQ u rododendronu 24.5. 2005 a u smrku 14.7. 2005. To je v rozporu s mými výsledky. Tyto hodnoty získali Öquist a Huner měřením obsahu karotenů, konkrétně poměru epoxidovaného a deepoxidovaného stavu xantofylů. U fluorescenčního parametru NPQ, který popisuje schopnost rostliny zhášet nadměrné ozáření a které jsem



vyhodnocovala já, naopak v zimě klesal. Je to patrně v důsledku snížení koncentrace chlorofylu a tedy i zmenšení fotosyntetické antény.

Öquist a Huner (2003) a Ensminger a kol (2006) publikovali, že nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím fotosyntézu je teplota. Soukupová a kol. (manuskript) zjistili, že nárůst fluorescenční emise v přírodních podmínkách ( $F_s$ ) u smrku během přechodu z dormance do fotosynteticky aktivního stavu koreluje s průměrnou minimální teplotou za tři předcházející dny. Proto i já jsem korelovala změny  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V/F_M$  a NPQ a s průměrnou minimální teplotou za tři dny, které předcházely měření. Z výsledků (Obr.15 a 16) vyplývá, že zásadní význam pro změnu  $F_0$ ,  $F_M$  a  $F_V/F_M$  u smrku i u rododendronu má teplota kolem  $0^\circ\text{C}$ , což je v souladu se zjištěním Soukupové a kol. U NPQ jsem nepozorovala žádnou hraniční hodnotu, ale lineární závislost (Obr.16). Souvisí to zřejmě s vývojem klimatických faktorů během roku. Vyšší teploty jsou dosahovány v letních měsících, kdy je také obecně vyšší ozáření.

Nicméně, zkoušela jsem i závislost na průměrné teplotě během třech předcházejících dnů, kde mi vyšla podobná korelace jako na průměrné minimální teplotě (data jsem neprezentovala).

Protože NPQ závisí hlavně na ozáření, zkoušela jsem i korelaci NPQ naměřenou v mých experimentech u temnostně adaptovaného vzorku na aktuální ozáření v daném dni před měřením (Obr. 11, 12, 13). Zde jsou dvě význačné hodnoty  $300 \mu\text{mol}(\text{fotonů}).\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a  $800 \mu\text{mol}(\text{fotonů}).\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Pod  $300 \mu\text{mol}(\text{fotonů}).\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  je závislost NPQ na ozáření lineární a nad  $800 \mu\text{mol}(\text{fotonů}).\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  je pozorovatelný pokles u rododendronu. U smrku tento pokles není patrný. Je to zřejmě v důvodu rozdílné architektury smrku a rododendronu jak na úrovni koruny, tak listu/jehlice. Smrk má kuželovitý tvar a překrývající se patra větví s letorosty, u rododendronu, který je nízký a má tvar sféry, je překrytí listů znatelně menší.

## 5. Závěr

V období od května roku 2005 do dubna 2006 jsem měřila průběhy fluorescenční indukce a základních fluorescenčních výtěžků a parametrů ( $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V/F_M$  a NPQ) na temnotně adaptovaných vzorcích v kontrolovaných světelných podmínkách a v teplotách odpovídajících ambientní teplotě ve venkovních podmínkách. Experimenty jsem prováděla na listech rododendronu a osvětlených a zastíněných letorostech smrku. Paralelně jsme měřili rychlost asimilace  $CO_2$  listů rododendronu v ambientních podmínkách na stanovišti.

Z dat získaných zpracováním fluorescenčních indukčních křivek temnotně adaptovaných vzorků jsem získala tyto informace:

Rychlost asimilace  $CO_2$  se v průběhu roku mění a změny odpovídají vývoji v průběhu teplot. Změny výtěžků fluorescenční emise ( $F_0$ ,  $F_M$ ) a průběhy fluorescenčních parametrů ( $F_V/F_M$ , NPQ) během roku také odpovídají průběhům teplot.

Rozdíly fluorescenčních parametrů v letním a zimním obdobím jsou následující:

$F_0$ : rododendronu 60%, smrk - osvětlené letorosty 50% a zastíněné letorosty 45%.

$F_M$ : rododendron 80%, smrk - osvětlené letorosty 90% a zastíněné letorosty 85%

$F_V/F_M$ : rododendron 50%, smrk - osvětlené letorosty 85% a zastíněné letorosty 70%.

Změna fluorescenčních výtěžků i parametrů závisí na teplotě. Já jsem na základě výsledků Soukupové a kol. testovala závislost na průměru minimálních teplot za tři dny předcházející mému měření. Závislost na aktuální ozářenosti měřené na v místě odběru vzorků jsem vyhodnocovala v případě NPQ.

## 6. Literatura

Adams, W.W., Barker, D.H. (1998). Seasonal changes in xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Yucca glauca* Nuttall, *Plant Cell and Environment*, 21, 501-511.

Barker, D.H., Logan, B.A., Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B. (1998). Photochemistry and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in different oriented cladodes of *Opuntia stricta* during the winter. *Aust.J. Plant Physiol.* 25:95–104

Ensminger, E., Busch, F., Huner, N.P.A. (2006). Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis, *Physiologia Plantarum*, 126, 28-44.

Jones, H.G. (1992). *Plants and Microclimate*, 2nd edn. Cambridge, Cambridge University

Kautsky, H. and Hirsch, A. (1931) Neue Versuche zur Kohlendioxidassimilation. *Naturwissenschaften* 48: 964

Nedbal, L. and Whitmarsh, J. (2004). *Chlorophyll a Fluorescence. A signature of Photosynthesis*. G.C. Papageorgiou and Govindjee (Eds.), Springer, Dordrecht, 389.

Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide . *Journal of experimental botany*. 51. 659-668.

Öquist, G., and Huner, N.P.A. (2003). Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 329–355

Procházka, S. a kol. 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia-nakl. AVČR, Praha

Roháček, K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, 40, 13-29

Savitch L.V., Leonardos E.D., Krol M., Jansson S., Grodzinski B., et al. (2002). Two strategies for light utilization in photosynthesis in relation to growth and cold acclimation.

*Plant Cell Environ.* 25:761–71

Šetlík a kol. Fyziologie rostlin. Skripta.

Schreiber, U. (2004) Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. Chlorophyll a Fluorescence. A signature of Photosynthesis, G.C. Papageorgiou and Govindjee (Eds.), Springer, Dordrecht, 279-319.

Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62

Soukupová, J., Cséfalvay, L., Urban, O., Košvancová, M. and Nedbal, L. (manuscript): Annual variation of steady state Chl fluorescence emission of field-grown evergreen plants indicates seasonal onset and offset periods of photosynthesis. Will be submitted to *Remote Sensing of Environment*.

Verhoeven, A.S., Adams, W.W.III., Demmig-Adams, B. (1996). Close relationship between the state of the xanthophyll cycle pigments and photosystem II efficiency during recovery from winter stress. *Physiol. Plant* 96:567–76