



Pedagogická
fakulta
Faculty
of Education

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Pedagogická fakulta
Katedra biologie

Diplomová práce

Studium vlivu stresových faktorů na stavbu
a funkci fotosyntetického aparátu
brukve řepky olejky
(*Brassica napus L. var. napus*)

Vypracovala: Bc. Tamara Rákosníková

Vedoucí práce: RNDr. Renata Ryplová, Ph.D.

České Budějovice 2016

Anotace

Diplomová práce se zabývá vlivem chladného plazmatu, jako stresového faktoru, na obsah a fluorescenci chlorofylů řepky olejky (*Brassica napus* L. var. *napus*). Teoretická část se zabývá řepkou olejkou, fluorescencí, fotosyntetickými pigmenty a vlivem chladného plazmatu na fyziologii rostlin. Na teoretickou část navazuje experimentální měření. V laboratorních podmínkách byl proveden experiment, jehož cílem bylo zjistit vliv chladného plazmatu na množství chlorofylů a fluorescenci chlorofylu. Semena řepky byla ošetřena chladným plazmatem po dobu různých časových intervalů. Práce posuzuje, zdali vykazovaly rostliny vyklíčené z ošetřených semen vyšší hodnoty fyziologických aktivit.

Klíčová slova: chlorofyl, fluorescence, semena řepky, chladné plazma.

Anotation

The thesis deals with the influence of cold plasma, as a stress factor, on content and fluorescence of chlorophylls of oilseed rape. (*Brassica napus L. var. napus*). The theoretical part deals with oilseed rape, fluorescence, photosynthetic pigments and the effects of cold plasma on physiology of plants. The theoretical part continues in experimental measurement. The experiment was done in laboratory conditions. The own experiment was to discover the influence of cold plasma on the amount of chlorophylls and fluorescence of chlorophylls. The rape seeds were treated with cold plasma for the duration of various time intervals. The thesis considers if the plants, which were pruned from treated seeds, show high values of physiological activities.

Keywords: chlorophyll, fluorescence, rape seeds, cold plasma.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Chtěla bych poděkovat RNDr. Renatě Ryplové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, vstřícný a trpělivý přístup, cenné rady a odborný dohled.

Obsah

1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1 Brukev řepka olejka (<i>Brassica napus L. var. napus</i>)	8
2.1.1 Obecná charakteristika	8
2.1.2 Původ a rozšíření	8
2.1.3 Požadavky	9
2.1.4 Choroby	9
2.1.5 Obsažené látky	9
2.1.6 Význam a využití	10
2.2 Plazma	11
2.2.1 Vysokoteplotní plazma	11
2.2.2 Nízkoteplotní plazma	12
2.2.3 Sterilizace plazmatem	12
2.2.4 Vliv plazmatu na fyziologii rostlin	13
2.3 Fotosyntetické struktury	15
2.3.1 Listy	15
2.3.2 Chloroplasty	15
2.4 Fotosyntetické pigmenty	17
2.4.1 Chlorofyly	17
2.4.2 Karotenoidy	18
2.4.3 Uspořádání fotosyntetických pigmentů ve fotosystémech	20
2.5 Metody měření chlorofylu	23
2.5.1 Destruktivní metody	23
2.5.2 Nedestruktivní metody	23
2.6 Sluneční záření	25
2.7 Fluorescence	27
2.7.1 Význam fluorescence	28
2.7.2 Metody měření fluorescence	28
2.8 Stresové faktory	30
2.8.1 Stres	30
2.8.2 Stresory	30
2.8.3 Průběh stresu	30

2.8.4	Druhy stresu	31
3.	Metodika	32
3.1	Kultivace rostlin	32
3.2.	Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů.....	33
3.3	Stanovení fluorescence chlorofylů	34
3.4	Stanovení sušiny.....	35
3.5	Analýza dat.....	35
4.	Výsledky	36
4.1	Fluorescence chlorofylu	36
4.2	Obsah fotosyntetických pigmentů.....	39
4.2.1	Obsah chlorofylu (a+b) 21. den kultivace	39
4.2.2	Obsah karotenoidů 21. den kultivace	41
4.2.3	Obsah chlorofylu (a +b) 28. den kultivace	42
4.2.4	Obsah karotenoidů 28. den kultivace	43
4.2.5	Obsah chlorofylu (a +b) 35. den kultivace	44
4.2.6	Obsah karotenoidů 35. den kultivace	46
4.3	Obsah sušiny	48
4.3.1	Čerstvá hmotnost rostlin.....	48
4.3.2	Hmotnost sušiny.	49
5.	Diskuze	51
6.	Závěr.....	54
7.	Seznam použité literatury	55

1. Úvod

Řepka olejka je hospodářsky významná rostlina, využívaná v potravinářském a technickém průmyslu. Je prováděno mnoho experimentálních studií, jejichž cílem je zvýšit klíčivost semen a aktivitu fotosyntetického aparátu nejen této rostliny. Diplomová práce se zabývá vlivem chladného plazmatu, jako stresového faktoru, na množství fotosyntetických pigmentů a na fluorescenci chlorofylu.

Zatím však chybějí přímé důkazy a záznamy o vlivu chladného plazmatu na aktivitu fotosyntetického aparátu řepky olejky. Z toho důvodu byl proveden experiment, jehož cílem bylo srovnat obsah chlorofylu (a+b), karotenoidů a fluorescenci chlorofylu rostlin řepky olejky, jejichž semena byla ošetřena chladným plazmatem, a rostlin, jejichž semena ošetřena nebyla.

Teoretická část diplomové práce se zabývá charakteristikou řepky olejky, stavbou fotosyntetického aparátu rostlin a dosavadními poznatky o vlivu chladného plazmatu na fyziologické aktivity rostlin.

Praktická část diplomové práce je věnována experimentálnímu měření. V plně kontrolovaných laboratorních podmínkách byl proveden experiment, jehož cílem bylo posoudit vliv chladného plazmatu na fyziologii rostlin. K dispozici byly tři varianty semen, které se lišily dobou ošetření 0 min (kontrola), 3 min a 10 min. Hodnoty fluorescence chlorofylu a obsahu fotosyntetických pigmentů byly měřeny u každé varianty, porovnány a vyhodnoceny. Celkově proběhla tři měření a to 21., 28. a 35. den kultivace rostlinného materiálu. Fluorescence chlorofylu byla měřena pomocí přenosného fluorometru. Množství fotosyntetických pigmentů bylo stanovováno metodou spektrofotometrie.

U ošetřených rostlin byl předpokládán vyšší obsah fotosyntetických pigmentů a fluorescence chlorofylu.

V poslední fázi experimentu byl stanoven obsah sušiny a porovnány rozdíly mezi rostlinami vyklíčenými z ošetřených a neošetřených semen.

Hlavním cílem diplomové práce bylo zjistit, zda ošetření semen chladným plazmatem ovlivňuje množství a složení fotosyntetických pigmentů a fluorescenci chlorofylu.

2. Literární přehled

2.1 Brukev řepka olejka (*Brassica napus L. var. napus*)

2.1.1 Obecná charakteristika

Brukev řepka olejka je jednoletá nebo ozimá bylina čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Hlavní kořen je mohutný ve vrcholové části mírně ztlustlý. Lodyhy jsou rozvětvené, lysé, dosahují výšky 140 –160 cm. Nadzemní část ozimé řepky se objevuje v podzimní fázi listové růžice a v jarní fázi intenzivního prodlužování. Dolní lodyžní listy jsou řapíkaté, vyrůstají v růžici. Horní listy jsou jednoduché střídavé, přisedlé až poloobjímavé, vejčité až čárkovitě kopinaté, celokrajné nebo vykrajované popř. zubaté. Lysé, slabě ojiněné, bez palistů. Květy jsou pravidelné oboupohlavné, čtyřčetné, kališní lístky úzce eliptické až kopinaté, korunní lístky náhle zúžené v nehet, světle žluté. Květenství je hrozen. Řepka začíná kvést nejdříve v poslední dekádě dubna. Doba květu trvá 20-25 dní a většinou probíhá v květnu. Plody jsou šešule skládající se ze dvou chlopní. (Kubát K. 2002)

2.1.2 Původ a rozšíření

Původní výskyt řepky je ve středomoří. Brukev řepku lze považovat za mladý druh, který vznikl křížením brukve zelné (*Brassica oleracea*) a brukve řepice (*Brassica subsp. napobrassica*). (Vašák a kol., 2000)

Brukev řepka olejka je pěstována ve dvou formách: ozimá a jarní. Přičemž ozimý typ je pěstován v západní a střední Evropě (výnosnější typ) a jarní typ je charakteristický pro Čínu, jihovýchodní Asii, drsnější oblasti Kanady, Ukrajinu a Rusko. (Baranyk P., 2007)

2.1.3 Požadavky

Řepku olejku lze pěstovat v bramborářské a řepařské oblasti. Vhodné jsou oblasti s průměrnými teplotami 6,5 – 8,5 °C, úhrnem srážek 550 – 750 mm, nadmořskou výškou 400 – 600 mn.m. Pro pěstování jsou vhodné střední až lehké hlinitopísčité půdy s vysokým obsahem hnojiva. Po zasetí vyžaduje řepka dostatek vláhy a vysokou dostupnost kyslíku. Hloubka výsevu je přibližně 1,5 - 2 cm. Po vyrašení čtyřech pravých listů není požadavek na vláhu tak vysoký. (Bečka D., 2007)

2.1.4 Choroby

Podle Vašáka (2000) je popsáno celkem asi 71 mikroorganismů parazitujících na řepce olejce. Přítomnost parazitů může snížit produkci řepky o 20 – 50 %. Mezi nejčastější onemocnění řepky patří plíseň a hniloby, např. hlízenka obecná, Fómová hniloba, čerň řepky, plíseň zelná, padlí řepky a zelenokvětost řepky. Onemocněním se předchází chemickým ošetřením rostlin. Veškerá chemická ošetření se pěstitelé v dnešní době snaží spíše eliminovat.

2.1.5 Obsažené látky

Majoritní složkou jsou rostlinné oleje (triacylglyceroly), estery vyšších mastných kyselin. Ve srovnání s ostatními oleji obsahuje řepkový olej mnohem menší množství nasycených mastných kyselin a má nižší obsah kyseliny erukové. Naproti tomu je řepkový olej poměrně bohatý na žádoucí nenasycené kyseliny - olejovou, linolovou, a linoleovou.

Glykosidy (glukosinoláty) se běžně vyskytují v rostlinách čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Tyto sloučeniny jsou příčinou štiplavého pachu a hořké chuti. Mohou způsobit zvýšenou aktivitu štítné žlázy.

Řepka obsahuje až dvakrát více vlákniny než sója. Vlákninu představuje především celulóza a lignin. Z dalších složek lze uvést taniny, fyty a sinapin. (Baranyk P., 2007)

2.1.6 Význam a využití

Bečka (2007) rozděluje využití řepky do čtyř oblastí:

- a) Potravinářství – tepelná úprava pokrmů a studená kuchyně.
- b) Krmivářství – šroty, výlisky a krmné směsi.
- c) Oleochemie – rozklad olejů hydrolýzou a alkoholýzou.
- d) Energetické využití – bionafta (MĚRO), využití čistého řepkového oleje jako paliva.

2.2 Plazma

Plazma je čtvrtým skupenským stavem hmoty. Název plazma pro ionizovaný plyn poprvé použil Irwing Langmuir v roce 1928, protože mu chováním tento stav látky připomínal krevní plazmu. Langmuir definoval plazma jako takový objem plynu, kde je vyrovnaný náboj iontů. (Kulhánek P., 2011)

Krejčí (1974) definuje, plazma je soubor velkého počtu částic bez vzájemné pevné vazby, z nichž některé mají elektrický náboj. Součet všech kladných a záporných nábojů je nulový.

Plazma vzniká ionizací plynu, například účinkem vysoké teploty, nebo při elektrickém výboji. Většina hmoty ve vesmíru je ve formě plazmatu. (Krejčí V., 1974).

Strach (1987) definuje plazma jako směs na sebe vzájemně působících elektricky nabitých a neutrálních částic s rozdílnou energií, které udržují celkový kvazineutrální stav, kolektivní chování a mají vlastní plazmovou frekvenci.

Kvazineutralita je podle Stracha (1987) stav blízký neutralitě, protože počet kladně a záporně nabitých částic, v určitém objemu, je prakticky stejný.

Kolektivní chování částic v plazmatu vysvětluje Chen (1984) jako pohyb nabitých částic z místa vyšší do místa nižší koncentrace. V praxi to znamená, že kationy se v plazmatu pohybují do místa vyšší koncentrace anionů a naopak.

Smolka (2009) uvádí, že plazmová frekvence musí být vyšší než střední srážková frekvence.

Podle teploty se plazma dělí na nízkoteplotní a vysokoteplotní.

2.2.1 Vysokoteplotní plazma

Strach (1987) uvádí, že tento typ plazmatu vzniká při vysokých teplotách. Účinkem vysoké teploty dochází k urychlení jader částic a k intenzivnějším srážkám. Dochází k fúzi jader a k uvolnění velkého množství energie, často nekontrolované energie.

Pro praxi je důležité kontrolovat množství uvolněné energie a vhodně tuto energii využívat. Z toho důvodu se v praxi daleko častěji využívá plazma nízkoteplotní.

2.2.2 Nízkoteplotní plazma

Nízkoteplotní plazma nachází uplatnění v zemědělství, lesnictví i technickém průmyslu.

Chladné plazma popisuje Bruchanov (2005) jako plazma, které má velmi malý podíl ionizovaných částic (1 %). Teplota iontů je blízká okolní teplotě, ale rychlost pohybu elektronů odpovídá teplotám několik tisíc stupňů. Jelikož jsou částice málo hmotné, projevuje se navenek jejich teplota jako velmi nízká.

2.2.3 Sterilizace plazmatem

Bruchanov (2005) uvádí, že chladné plazma se vyrábí mezi dvěma kruhovými elektrodami s malým otvorem uprostřed vstřikováním směsi helia (97 %) a kyslíku (3 %). Na elektrody je přivedeno napětí několika kilovoltů s frekvencí 50 Hz. V prostoru mezi elektrodami se plynná směs ionizuje a promění na nízkoteplotní plazma mikrosekundovými pulsy elektrického napětí. Plyn se při tom nezahřívá a nedochází ke vzniku elektrického oblouku. Výhoda spočívá v relativně malé energetické náročnosti, při které lze získat velký objem plazmatu. Bylo realizováno několik pokusů s nízkoteplotním plazmatem, při nich byly zkoumány vlivy na dva druhy bakterií (*Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*). Výsledkem studie bylo, že oba druhy bakterií byly zahubeny.

Suková (2009) definuje plazma jako ionizovaný plyn, který může být využíván k ničení mnohých mikroorganismů. Je to směs plynů s aktivovanými ionty, fotony, elektrony a volnými radikály, která vzniká aplikací elektrického nebo magnetického pole, za použití radiofrekvenčních, dielektrických nebo mikrovlnných zdrojů energie. Chladné plazma dosahuje teploty 30 – 60 °C. Majoritně se vyrábí chladné mikrovlnné plazma ve vakuu, méně často se vyrábí plazma za atmosférického tlaku, kdy je za potřeby účinné chlazení. S tím souvisí výběr použitých plynů např. kyslík, dusík, hélium.

2.2.4 Vliv plazmatu na fyziologii rostlin

Využití chladného plazmatu se v poslední době uplatňuje v mnoho oborech, nejen ve fyziologii rostlin.

Nízkoteplotní plazma se běžně využívá v technologickém průmyslu, například pro čištění a sterilizaci určitých povrchů. V poslední době se tato technologie přesouvá do biologického i potravinářského průmyslu. Hlavním uplatněním aplikace studeného plazmatu je zneškodnění nežádoucích mikroorganismů a ošetření tepelně nestabilních potravin například ovoce, zeleniny a masa. (Schütler a kol., 2013)

Použití plazmových výbojů v praxi nachází v dnešní době stále větší spektrum uplatnění. V zemědělství a lesnictví se nízkoteplotního plazmatu úspěšně užívá k ošetření povrchu semen a k eliminaci fytopatogenních a bakteriálních původců onemocnění rostlin (Park a kol., 2006).

Využití chladného plazmatu je aplikováno taktéž v některých medicínských oborech, například při léčbě kožních onemocnění. (Bender a kol., 2010)

Co se týče fyziologie rostlin, dodnes je známo velmi málo studií, které by potvrdily nebo vyvrátily pozitivní vliv chladného plazmatu na fyziologické aktivity rostlin.

Neustále jsou hledány nové technologie a metody, které by urychlily klíčivost semen. Právě ošetření semen chladným plazmatem je považováno za technologii s velkým potenciálem, která by mohla přinést pozitivní výsledky.

Některé experimenty již prokázaly příznivý vliv chladného plazmatu na klíčivost semen rostlin. Zatím však existuje jen velmi málo studií, které by se zabývaly vlivem chladného plazmatu na aktivitu fotosyntetického aparátu. Právě z toho důvodu byl uskutečněn experiment, jehož cílem je porovnat obsah fotosyntetických pigmentů a fluorescenci chlorofylu u rostlin vyklíčených ze semen ošetřených ledovým plazmatem a ze semen neošetřených.

Gavril a kol. (2012) zaznamenává pozitivní účinky plazmové technologie na klíčivost semen dvou kultur máku setého (*Papaver somniferum L.*) kultivary *Major* a *Orfeus*.

Podle Jiafenga a kol. (2014) mají semena ošetřená chladným plazmatem vyšší klíčivost oproti semenům neošetřeným. Po ošetření semen došlo znatelně k lepšímu růstu pšenice seté i ovsa setého. Působením plazmatu se dále zlepšila absorpce vody

a živin do semen, což způsobuje celkově lepší a rychlejší růst semenáčků. V porovnání s neozářenými rostlinami měly ošetřené semenáčky delší kořeny, dosahovaly vyšší výšky, vyšší hmotnosti, dokázaly lépe absorbovat vodu s živinami a lépe zachycovat světlo pro fotosyntézu.

Aplikace chladného plazmatu má velmi pozitivní účinky na klíčivost semen kukuřice seté. Semenáčky kukuřice seté ošetřené nízkoteplotním plazmatem obsahují více bílkovin v kořenech. Ošetření má zrovna tak vliv na růst primárního kořene rostliny. (Henselová a kol., 2012)

Ling a kol. (2015) uvádí, že semena řepky ošetřená chladným plazmatem mají zlepšenou klíčivost za sucha. Ošetření chladným plazmatem za sucha se zvýší imbibiční síla semene a tak semeno dokáže vyklíčit za sucha. U ošetřených semen došlo k lepšímu a rychlejšímu růstu. Růst rostlin silně koreluje se stresem rostlin. Ze studie lze vyvodit, že s ozářením semen ledovým plazmatem se zlepšuje odolnost vůči stresu suchem u olejnatých semen.

Chladné plazma má schopnost změnit biologické, chemické a fyzikální povrchové vlastnosti semen pšenice. Aplikace plazmatu vede ke snížení počtu volných mastných kyselin v semenech pšenice, čímž je snížena nežádoucí degradace a žluknutí mastných kyselin. (Bußler a kol., 2015)

U rostlin pšenice, jejichž semena byla ošetřena chladným plazmatem, byl zjištěn vyšší obsah chlorofylů (Jiang a kol., 2014).

Podle Baier a kol., (2013) má ošetření rostlin chladným plazmatem jednoznačně pozitivní účinky na likvidaci mikroorganismů přítomných na salátu polníčku.

Pozitivní účinek chladného plazmatu při inaktivaci bakteriálních buněk popsal Fridan a kol., (2007)

Strejšková a kol., (2015) uvádí, že nízkoteplotní plazma má velmi pozitivní vliv na výnosové parametry (počet zrn, výnos a hmotnost). U řepky ozimé ošetření plazmatem v kombinaci s biologickou ochranou snižuje výskyt houbové choroby *Phoma lingam* a hálek krytonosce zelného na kořenech.

Rostliny hrachu, jejichž semena byla ošetřena chladným plazmatem, nevykazují významné rozdíly v obsahu sušiny oproti rostlinám neoplazmovaným. (Bußler, a kol., 2015)

2.3 Fotosyntetické struktury

Hlavním orgánem fotosyntézy jsou listy a v menší míře zelené stonky. V listech zelených rostlin jsou specializované orgány chlorofyly, které obsahují fotosynteticky aktivní pigment chlorofyl, díky němuž může probíhat fotosyntéza.

2.3.1 Listy

Procházka (1998) definuje listy jako rostlinné orgány, které jsou uzpůsobené k maximální absorpci slunečního záření a k maximálnímu zkrácení transportních drah při výměně plynů.

List je tvořen svrchní a spodní epidermis s jejími deriváty, (stomaty, hydatodami a trichomy). (Procházka., 1998)

Morfologicky bývá list rozlišen na řapík (*petiolus*) a čepel (*lamina*), nebo bývá bezřapíkatý, přisedlý. (Nováček F., 2009)

2.3.2 Chloroplasty

Chloroplasty jsou orgány rostlinných buněk, které nejsou obsaženy v pokožkových buňkách a buňkách kořene. Jsou to semiautonomní orgány, mají tedy svou vlastní DNA. Nejpravděpodobněji vznikly endosymbiózou. Původně byly chloroplasty samostatné mikroorganismy, které pronikly do vyšší rostliny a zůstaly s ní v symbióze.

Procházka (1998) definuje chloroplasty jako jednotky schopné absorbovat a fixovat CO₂ a zabudovávat uhlík do sacharidů. V jedné buňce je 20 – 200 chloroplastů, které se liší tvarem i velikostí.

Chloroplasty se vyvíjí z proplastidů. Vývoj z proplastidů je ovlivněn přítomností světla. Kromě chloroplastů může docházet k syntéze několika dalších plastidů například leukoplastů, amyloplastů a chromoplastů. (Ryplová R., 2014)

Povrch chloroplastu tvoří dvě membrány, vnitřní prostředí vyplňuje stroma. Základní strukturní jednotkou jsou tylakoidy, tvořené lipoproteinovými membránami, schopné absorbovat záření. Tylakoidy se mohou vzájemně spojovat

a vytvářet grana. Absorpce kvant záření je zprostředkována pigmentoproteinovými komplexy – chlorofyly a karotenoidy vázanými na bílkoviny. S komplexy jsou spojeny cytochromy a chinony a další enzymy, které se podílejí na oxidaci vody a redukci NADP^+ . Na membráně tylakoidů probíhá první fáze fotosyntézy – světelná fáze. (Procházka S., 1998)

Ve stromatu chloroplastů probíhá druhá fáze fotosyntézy – temnostní fáze. Protože jsou zde obsaženy enzymy, které jsou důležité pro fixaci oxidu uhličitého. Stroma je zásobárnou lipidů a místem, kde probíhá mnoho dalších metabolických dějů např. syntéza mastných kyselin. (Ryplová R., 2014)

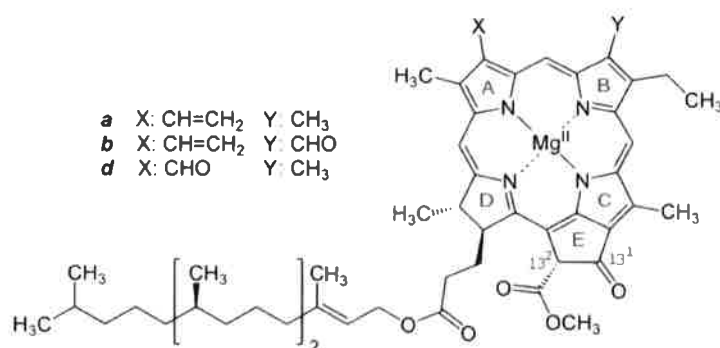
2.4 Fotosyntetické pigmenty

2.4.1 Chlorofyly

Jsou to nejdůležitější fotosyntetické pigmenty obsažené v chloroplastech.

Chemická struktura chlorofylu byla popsána v roce 1931 H. Fischerem. (Velíšek J., 2003)

Velíšek (2003) uvádí, že chlorofyly jsou z chemického hlediska řazeny mezi barviva pyrrolová, odvozená od heterocyklické sloučeniny pyrrolu. Základní stavební jednotkou chlorofylů jsou porfyriny (terapyroly) spojené methinovými můstky a komplexně vázaným kationem Mg^{2+} . Strukturu chlorofylu tvoří substituovaný porfyrinový kruh s centrálně navázaným kationem Mg^{2+} a dlouhý uhlovodíkový řetězec fytol. U chlorofylů převládá lipofilní charakter, jsou tedy rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech.



Obr. č. 1 - Strukturní vzorec chlorofylu
(<https://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorofyl>)

Podle Nováčka (2009) je popsáno asi sedm druhů chlorofylů – chlorofyl a, b, c, d, e, bakteriochlorofyl a bakterioviridin. Přičemž lze předpokládat, že nejsou popsány úplně všechny pigmenty (například u méně známých řas).

Zbarvení chlorofylů popisuje Šebánek a kol., (1983). Chlorofyl a je modrozelený, chlorofyl b žlutozelený a chlorofyly c, d, e jsou modrozelené a doprovázejí v řasách chlorofyl a.

Za nejdůležitější pigment pro fotosyntézu je považován chlorofyl a a chlorofyl b. Rozdíl mezi chlorofylem a a chlorofylem b spočívá v rozdílném substituentu na C3 v pyrrolovém kruhu. U chlorofylu b je oproti chlorofylu a nahrazena methylová skupina skupinou aldehydickou. Záměnou těchto

substituentů je způsobena rozdílná absorpce světla. Oba chlorofyly mají absorpční maximum v modrofialové oblasti spektra s vrcholy (429 – 463 nm), absorpční vrcholy v červené oblasti spektra (660 – 642 nm). Při absorpci světelného kvanta v modré a červené oblasti, může dojít k přechodu molekuly chlorofylu do excitovaného stavu. Excitovaný elektron může být uvolněn z molekuly chlorofylu a předán některému akceptoru. Pro přeměnu energie je nezbytná přítomnost chlorofylu a, všechny ostatní pigmenty mají pouze funkci pomocnou - zachycují dopadající světelná kvanta. (Procházka S., 1998)

Existují dva základní typy tylakoidů – granální a agranální tylakoidy. Podle toho, zdali došlo k vytvoření gran nebo ne, je možné rozlišit tylakoidy na:

- a) Granální tylakoidy - vytvořeny shluky tylakoidů.
- b) Agranální tylakoidy - nevytvoreny shluky tylakoidů.

Procházka (1998) dále rozděluje tylakoidy na stěsnané a nestěsnané. U nestěsnaných tylakoidů jsou vnitřní membrány omývány stromatem, u stěsnaných tylakoidů jsou na sebe membrány nalepeny, a tudíž nemůže dojít k omývání.

2.4.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou žlutě, oranžově a červeně zbarvené akcesorické fotosyntetické pigmenty, které se podílejí na zachycení světelných kvant.

Z chemického hlediska jsou karotenoidy izoprenoidy, jejichž základní skelet tvoří 40 atomů uhlíku. Dělí se na dvě skupiny karoteny a xantofyly. Nejrozšířenějším karotenoidem je lykopen, z něhož izomerizací lze odvodit α a β karoten. Z xantofylů je nejběžnější zeaxantin, violaxantin a lutein. (Velíšek J., 2009)

Podle Procházkovy (1998) jsou karotenoidy akcesorické pigmenty, které doprovázejí chlorofyl v chloroplastech, chrání jej proti poškození ultrafialovým zářením a podílejí se na fotosyntéze a fototropismu rostlin. Karotenoidy převádí energii UV záření na energii tepelnou, proto se řadí mezi takzvané zhášedče či lapače.

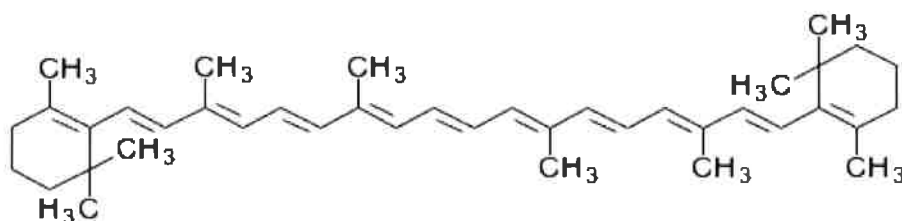
Karotenoidy obsahují 8 izoprenových jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Právě konjugovaným systémem dvojných vazeb je způsobena barevnost karotenoidů. Většina karotenoidů má na všech dvojných vazbách

trans konfiguraci. Působením fyzikálních faktorů, např. UV zářením, může docházet k *cis*-izomeraci, čímž klesá provitaminová účinnost. (Velíšek J., 2009).

Rozdělení karotenoidů podle Velíška (2009):

- Karoteny

Veškeré karoteny vznikají odvozením od acyklického polyneenasyceného uhlovodíku lykopenu. Působením enzymů dochází k cyklizaci a vytvoření tvoří β - nebo α -jononové struktury. Podle typu jononové struktury se rozlišuje α a β karoten. Oba dva typy karotenů jsou prekurzory vitamínu A (retinou).

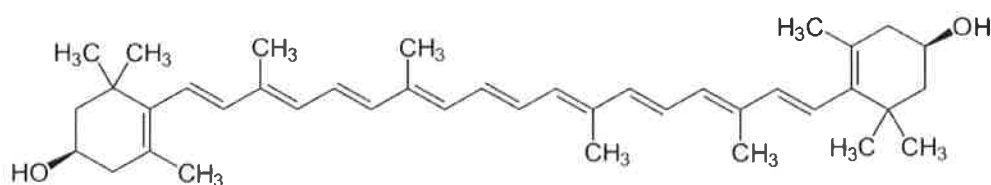


Obr. č. 2 - Strukturální vzorec beta karotenu

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1271&typ=html)

- Xantofyly

Xantofyly jsou oxoderiváty, případně hydroxyderiváty karotenů.



Obr.č. 3 - Strukturální vzorec zeaxanthinu

(<https://cs.wikipedia.org/wiki/Zeaxantin>)

Velíšek (2009) se domnívá, že kvalita a množství karotenoidů závisí na mnoha faktorech, jako je druh rostliny a odrůda, sezona nebo stupeň zralosti.

Dále Velíšek (2009) říká, že většina karotenů je asociována s bílkovinami jako karotenoproteiny, kdežto xantofyly se mohou vyskytovat jako volné látky i jako estery s mastnými kyselinami.

Podle Ryplové (2014) je funkcí karotenoidů chránit rostlinu před nadměrným ozářením. Během ochranného mechanismu dochází k odstranění volných radikálů.

Procházka (1998) uvádí, že veškerá fotosyntetizující barviva jsou obsažena v membránách chloroplastů. Všechny chlorofyly a většina karotenoidů je lokalizována v tylakoidních membránách. Obalové membrány na povrchu chloroplastů jsou téměř žluté díky množství obsažených karotenoidů.

2.4.3 Uspořádání fotosyntetických pigmentů ve fotosystémech

Fotosyntetické pigmenty jsou uspořádané tak, aby dokázaly zachytit co nejvíce světelného záření. Jednotlivé pigmenty jsou ve fotosystému rozvrstveny podle toho, jakou vlnovou délku světla absorbují. Z toho důvodu funguje fotosystém jako past na světelná kvanta. Existují dva typy fotosystémů, které se liší vlnovou délkou, při níž dochází k maximální absorbanci.

V tylakoidních membránách jsou umístěny světlosběrné antény a proteinové komplexy, které dohromady tvoří fotosyntetický aparát fotosystém II (PSII) se světlosběrným komplexem (LHCII), cytochrom b6f komplex (Cyt b6f), fotosystém I (PSI) se svým světlosběrným komplexem (LHCI) a ATP-syntáza. (Nelson a Yocum, 2006)

Nováček (2009) uvádí, že fotosystémy jsou tvořeny světlosběrným (antenálním) komplexem (LHC) a reakčním centrem (RC). Přičemž LHC představuje soustava fotosyntetických pigmentů, které jsou vázány na proteiny. Antenální komplex zachycuje dopadající fotony a předává je do reakčního centra fotosystému. V RC je přítomen pouze chlorofyl a, vázaný na specifický protein. Při excitaci dochází ke snížení redox-potenciál tohoto chlorofylu, který se tak stává silným redukčním činidlem a je schopen přenést svůj elektron na molekulu příslušného přenašeče. Absorpční maximum chlorofylu v PS I je 700 nm, v PS II 680 nm, proto jsou někdy označovány jako fotosystém P₇₀₀ a P₆₈₀.

Do membrán jsou pigmenty vestavěny pomocí bílkovin, pigmenty jsou ve fotosystému orientovány tak, aby fungovaly jako past pohlcující světelné záření. Akcesorické pigmenty tvoří antény, na membráně jsou rozmístěny podle maxima svých absorbcí. Pigmenty umístěné nejvýše absorbují záření o kratších vlnových

délkách a vyšší energii. Při průchodu jednotlivými vrstvami se záření stává energeticky chudší a dlouhovlnější. Maximální množství energie je tedy přeneseno až k reakčnímu centru fotosystému. (Ryplová R. 2014)

Existenci dvou fotosystémů (PS I a PS II) objevil v roce 1957 R. Emerson, z toho důvodu je funkce dvou fotosystémů ve fotosyntéze označována jako Emersonův efekt.

Absorpci světelného kvanta dochází k excitaci molekuly chlorofylu v reakčním centru. Při absorpci druhého světelného kvanta dojde k vyrazení elektronu z elektronového obalu. Tento uvolněný elektron pak putuje elektrontransportním řetězcem.

Ryplová (2014) uvádí, že světlo kratší vlnové délky, modré oblasti spektra, vybudí molekulu chlorofylu do druhého excitačního stavu. Při přechodu do prvního excitačního stavu se část excitační energie uvolní ve formě tepla. Při návratu z prvního excitačního stavu je většina energie spotřebována pro fotosyntézu a zbytek je vyzářen ve formě fluorescenčního záření, nebo se opět přemění v teplo. Světlo delších vlnových délek, červené oblasti spektra, vybudí molekulu chlorofylu pouze do prvního excitačního stavu. K fluorescenci chlorofylu dochází při návratu elektronu z prvního excitačního do základního stavu. Fluorescence je v oblasti dlouhovlnného červeného záření.

Fotosystém II

Fotosystém II má absorpční maximum chlorofylu a při 680 nm, z toho důvodu bývá taktéž označován jako P680.

Po excitaci je elektron předán přes feofytin, až na plastochinon Q_A . Pro redukci plastochinonu Q_B jsou potřebné dva elektrony. Na přenosu elektronu mezi Q_A a Q_B se podílí atom Fe. Pro oxidaci vody jsou potřebné čtyři excitační cykly, v průběhu nichž se uvolní čtyři elektrony do lumenu thylakoidů a molekulární kyslík difunduje do atmosféry. (Nováček F., 2009)

Kromě chlorofylu v RC obsahuje PSII ještě dalších asi třicet molekul chlorofylu v anténě fotosystému, které usměrňují excitační energii na molekuly chlorofylu v reakčním centru.

V PS II dochází k necyklickému toku elektronů. Mechanismus přenosu elektronů v PS II popisuje Nováček (2009). Excitovaná energie je odevzdána z antén na P680 a elektron je odevzdán na feofytin (primární akceptor PSII). Oxidovaný

P680 je redukován elektronem uvolněným z molekuly vody. Redukovaný feofytin předává elektrony na Q_A . Ke dvěma elektronům jsou přijaty dva H^+ ze stromatu a elektrony jsou předány na komplex cytochromu. Na každé dva elektrony, které se uvolní při fotolýze vody, se může v lumenu hromadit 6 H^+ .

Fotosystém I

Fotosystém I má absorpční maximum chlorofylu a při 700 nm, z toho důvodu bývá také označován jako P700.

PS I představuje plastocyaninferredoxinreduktázu v tylakoidních membránách. Skládá se z fotosyntetických pigmentů a reakčního centra P700. Kromě toho obsahuje ještě další polypeptidy, nezbytné pro jeho funkci. (Chitnis, 1995)

V PS II dochází k cyklickému toku elektronů. Princip přenosu elektronů vysvětluje Ryplová (2014). Absorpcí světelného kvanta světlosběrným komplexem PSI a odevzdáním excitované energie dochází k separaci elektrického náboje molekuly P700 v reakčním centru PSI, odkud je elektron odevzdán na centrum Fe-S. Následně dochází k redukci feredoxinu. Elektrony mohou být předány zpět na plastochinony, nebo s využitím dalších dvou protonů ze stromatu redukovat $NADP^+$ na $NADPH+H^+$. (Ryplová R., 2014)

2.5 Metody měření obsahu chlorofylu

Metody stanovení obsahu chlorofylů lze dělit na dvě skupiny - destruktivní a nedestruktivní. Hlavní rozdíl mezi metodami spočívá v tom, zdali je rostlinný materiál zničen, nebo zachován. Výběr metody závisí na mnoha faktorech například na druhu rostliny, ekonomických možnostech, vybavení laboratoře atd.

2.5.1 Destruktivní metody

Destruktivní metody jsou často používané a vhodné zejména tam, kde není nutné zachovat rostlinný materiál. Tyto metody nesou některé nevýhody, například časovou náročnost a pracnost ve srovnání s nedestruktivním stanovením.

Tyto klasické metody stanovení obsahu chlorofylů jsou založeny na extrakci pigmentů z pletiva a na spektrofotometrickém stanovení jejich obsahu (Porra a kol. 1989).

Extrakt fotosyntetických pigmentů ze zelených částí vyšších rostlin obsahuje zejména chlorofyl a, chlorofyl b a směs karotenoidů. Podrobnější složení obsahu pigmentů včetně rozlišení jednotlivých karotenoidů by poskytla vysoko účinná kapalinová chromatografická metoda.

Pro zjištění obsahu chlorofylu a a b v acetonovém extraktu se používá měření absorbance ve vybraných vlnových délkách v jednocentimetrové kyvetě. Nejčastější postup je podle Lichtenthalera (1987).

Obsah chlorofylů v listech se pak uvádí v jednotkách látkového množství (mol) nebo hmotnosti (kg, g, mg) vztažených na jednotku plochy listu, jednotku čerstvé hmotnosti nebo sušiny, případně i na jinou vztažnou veličinu (např. celkový obsah proteinů, objem listu). (Nováček F., 2009)

2.5.2 Nedestruktivní metody

Nedestruktivní metody jsou voleny zejména v případech, kdy nemůže dojít ke zničení rostlinného materiálu. Ve srovnání s předchozími metodami nese toto měření výhody zejména v časové i praktické nenáročnosti.

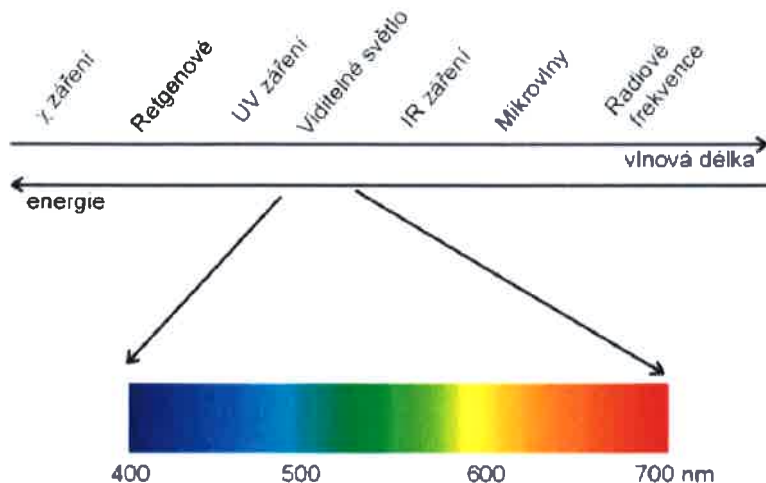
Hák (1990) uvádí, že nedestruktivní metody využívají měření optických spektrálních vlastností listů (lze měřit difúzní propustnost, difúzní odrazivost, fluorescenci chlorofylu). Jako příklad uvádí využití efektu reabsorpce fluorescence chlorofylu v listu, kdy poměr pásů v emisním spektru odráží obsah chlorofylů.

Nedestruktivní metodu měření obsahu chlorofylů vysvětluje například Ilík a kol. (2003). V těchto metodách je měření prováděno pomocí malých ručních přístrojů (chlorometrů) a trvá jen několik sekund. Díky tomu je možné v krátkém čase získat velké množství dat a statisticky vyhodnotit jak obsah chlorofylů v rámci listů na rostlině, tak vytvářet chlorofylový profil rostlin nebo mapy zelenosti porostu. Obsah chlorofylů je možné taktéž vyjádřit v mg na m² listové plochy.

2.6 Sluneční záření

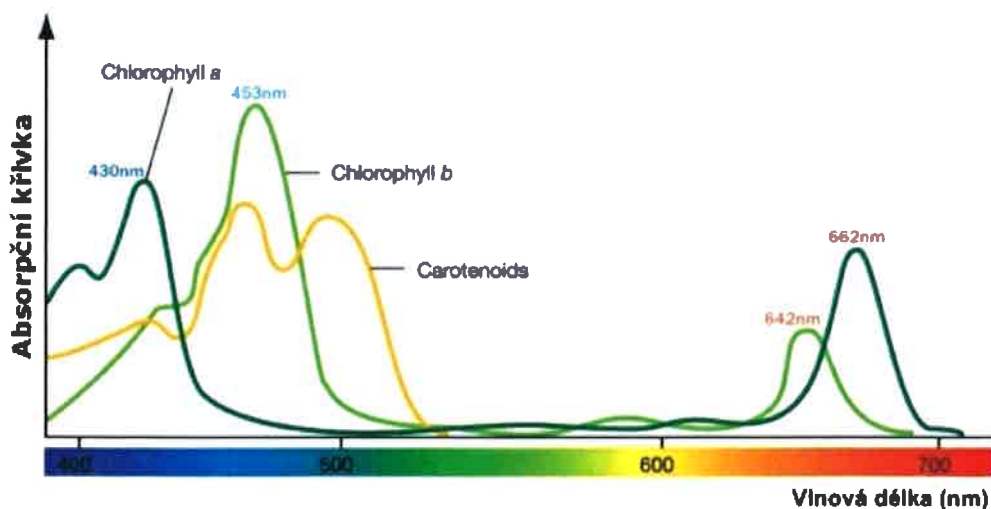
Světlo lze definovat jako elektromagnetické vlnění o určitých vlnových délkách v rozsahu přibližně od 390 do 790 nm. (Klimešová a kol., 2009)

Rozsah a barevné spektrum elektromagnetického vlnění znázorňuje obr. č. 4.



Obr.č. 4 - Elektromagnetické vlnění
(<http://www.jandur.cz/optics/vd/vd1.htm>)

Podle Ryplové (2014) může být pro fotosyntézu využita pouze oblast záření o vlnové délce od 400 nm do 700 nm. Tato část spektra je označována jako fotosynteticky aktivní radiace FAR (angl. PAR). Nejvyšší absorbance fotosyntetických pigmentů je v oblasti modré a červené. Naopak nejnižší absorbanci vykazuje žlutozelená a zelená oblast, zde dochází k odražení záření.



Obr. č. 5 - Absorpční křivky fotosyntetických pigmentů
(<https://rybicky.net/forum/11998-mereni-fotosynteticky-aktivni-radiace>)

Klimešová a kol. (2009) uvádí, že světlo definoval Louis de Broglie v roce 1924 jako elektromagnetické vlnění, které má dualistický (korpuskulárně vlnový) charakter. Korpuskule (částice) jsou fotony, neboli světelná kvanta nesoucí energii, kterou mohou přijímat rostliny.

Energie světla je dána vztahem:

$$E = hc/\lambda$$

Ryplová (2014) uvádí, že energie záření je nepřímo úměrná vlnové délce, proto je světlo delších vlnových délek energeticky chudší. Tento fakt je důležitý pro uspořádání fotosyntetických pigmentů ve fotosyntetickém aparátu.

Pro měření ozáření rostliny se udává hustota toku fotonů v jednotkách $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tzn., kolik molů fotonů dopadne na 1 m^2 listové plochy za jednu sekundu. Nebo se udává energie ozáření v jednotkách W m^{-2} ($1 \text{ W} = 1 \text{ J s}^{-1}$).

(Ryplová R., 2014)

2.7 Fluorescence

Fluorescence představuje schopnost molekuly absorbovat a následně emitovat záření. K emisi záření ve formě fluorescence dochází při přechodu molekuly z excitovaného stavu do stavu základního (Ryplová R., 2014)

Harbinson (2003) uvádí, že fluorescence chlorofylu velmi úzce souvisí s průběhem fotosyntézy.

Podle Govindjee (1995) dochází po absorpci světelného kvanta ke třem možným mechanismům:

- a) Energie fotonů je využita při fotosyntéze.
- b) Energie fotonů je vyzářena ve formě fluorescence.
- c) Energie fotonů je rozptýlena ve formě tepla (disipace).

Přibližně 3-5% absorbované záření je vyzářeno právě ve formě fluorescence. Pokud je intenzita fluorescence nízká, účinnost fotochemických reakcí primární fáze fotosyntézy je vysoká a naopak (Krause a Weis, 1991).

Pfündel (1998) říká, že fluorescence chlorofylu je emitována chlorofylem a, který absorbuje záření v modré a červené oblasti slunečního spektra a nachází se v chloroplastech mezofylových buněk. Za pokojové teploty je fluorescence chlorofylu emitována převážně z fotosystému II (PSII). Malá část dlouhovlnného červeného záření je emitována i z chlorofylu fotosystému I (PSI).

Ovšem pokud je teplota velmi nízká pochází velká část emisního záření z PSI. (Strasser a Butler, 1977).

U fotosyntetizujících organismů je molekulou emitující fluorescenci zejména chlorofyl a. Fluorescence chlorofylu má svůj původ v chloroplastech zelených rostlin (přesněji ve světlosběrných komplexech PS II a I). (Buschman a kol. 2000)

2.7.1 Význam fluorescence

Pavlová (2006) uvádí, že metody měření fluorescence přinášejí poznatky důležité pro pochopení fotochemických a nefotochemických procesů probíhající v tylakoidních membránách chloroplastů.

Dále lze podle Pavlové (2006) vyhodnocením fluorescenčních indukčních křivek (FIK) získat tzv. fluorescenční parametry, které umožňují kvalitativně i kvantitativně charakterizovat funkčnost fotosyntetického aparátu rostlin, jejich fyziologický stav, úroveň stresu, jemuž jsou rostliny vystaveny a též detailně studovat děje probíhající v tylakoidních membránách v obou fotosystémech (PS I a PS II), světlosbrných komplexech, mechanismy regulující elektronový transport, fotoinhibiční, ochranné procesy apod.

2.7.2 Metody měření fluorescence

Měření fluorescence chlorofylu přináší informace o poklesu aktivity fotosyntetického aparátu listu za stresových podmínek. (Lichtenthaler, 1996).

Milan-Almaraz a kol. (2009) uvádí, že metody měření fluorescence se dělí na destruktivní a nedestruktivní. Nedestruktivní metody jsou založené na biochemickém nebo biofyzikálním principu. V posledních letech jsou v oblibě především metody nedestruktivní.

Podle Schreiber a kol. (1986) je nejčastější metodou měření fluorescence chlorofylu reakce na ozáření u rostlin (listů) adaptovaných na tmu. Pro tyto metody jsou využívány fluorimetry, které pracují na principu pulsní amplitudové modulace (PAM).

Podle Ryplové (2014) je měření fluorescence fluorimetrem jednoduchá a nedestruktivní metoda, která přináší informace o stavu fotosyntetického aparátu. Ve srovnání s gravimetrickými metodami nese metoda výhody zejména v tom, že není nutné rostlinný materiál ničit. Pro měření fluorescence se používají fluorimetry. Z naměřených a vyhodnocených absolutních hodnot lze posoudit stav a funkčnost fotosyntetického aparátu

Schreiber a kol. (1986) uvádí, že nejběžnější metodou měření fluorescence chlorofylu je sledování reakce na ozáření u rostlin adaptovaných na tmu. Pro tato

měření bývají používány fluorimetry pracující na principu pulsní amplitudové modulace (PAM).

V listech adaptovaných na tmu jsou při ozáření slabým modulovaným zářením všechna reakční centra PSII reoxidována (otevřena), proto je zaznamenán minimální výtěžek fluorescence chlorofylu (F₀). Po ozáření vzorku dojde k redukci většiny elektronových akceptorů v PSII a dojde k uzavření reakčních center PSII, což se projeví prudkým vzrůstem fluorescence chlorofylu. (Roháček a kol., 2008)

Avšak některými fluorimetry, jev dnešní době možné měřit fluorescenci i za denního světla (Roháček a kol., 2008)

Princip měření je založen na kompetici mezi fotochemickou prací a fluorescencí. Čím více energie je spotřebováno pro fotosyntézu, tím méně energie se vyzáří při fluorescenci. (Ryplová R., 2014)

Hodnoty fluorescence a fotosyntézy kolísají podle toho, zdali je rostlina pod vlivem stresových faktorů nebo ne.

Vliv stresových faktorů popisuje Ryplová (2014). Pokud rostlina není pod vlivem stresových faktorů, je většina excitační energie spotřebována při fotosyntéze a minimální část je vyzářena fluorescencí. Naopak pokud na rostlinu působí stresové faktory, dochází ke snížení fotosyntetické aktivity a energie se uvolňuje ve formě tepla a fluorescenčního záření. Porovnáním fluorescence rostliny rostoucí pod vlivem stresových faktorů a rostliny rostoucí v optimálních podmínkách je možné určit, do jaké míry stresor ovlivňuje funkčnost fotosyntetického aparátu.

2.8 Stresové faktory

2.8.1 Stres

Podle Míchala (1992) je stres stav, ve kterém se nachází živý systém (rostlina), při němž dochází k mobilizaci obranných nebo nápravných procesů vůči podnětům přesahujícím obvyklé rozpětí homeostázy. Organismus se snaží vyrovnat se změnami a obnovit původní stav.

2.8.2 Stresory

Za stresory lze podle Míchala (1992) považovat všechny faktory, které vytváří rostlině nepříznivé podmínky.

Procházka a kol. (1998) rozděluje stresory na 2 základní skupiny:

a) fyzikální stresory

- Fyzikální - (účinky větru, záření a vody).
- Chemické - (nedostatek vody, kyslíku, živin, solí, přítomnost těžkých kovů).

b) biologické stresory

- Herbivorní živočichové.

2.8.3 Průběh stresu

Účinky stresových faktorů podle Míchala (1992) spouští u živých systémů (rostlin) stresovou reakci, během níž nastává několik fází stresu. V první (poplachové) fázi rostlina rozeznává působení stresoru, dochází k neočekávaně velké a relativně krátkodobé odezvě systému. Rychlost návratu do stavu před působením stresoru je považována za měřítko intenzity stresu. Po poplachové fázi nastupuje fáze rezistenční, kdy dochází k aktivaci obranných mechanismů rostliny. Při dlouhodobém působení stresoru může dojít k vyčerpání dostupných energetických rezerv rostliny a ke smrti rostliny, nebo naopak k posílení odolnosti rostliny vůči stresoru.

V přirozených podmínkách často působí několik stresorů najednou, jejich účinek se sčítá. Stres se projevuje mnoha způsoby, nejčastěji dochází k trvalému nebo částečnému zastavení růstu. Stres se velmi silně projevuje také na hospodářském výnosu rostlin. (Míchal L. 1992)

2.8.4 Druhy stresu

Stresové faktory ve většině případů působí na fyziologii rostlin negativně. Existují však i případy, kdy stres ovlivňuje fyziologické aktivity rostlin pozitivně.

Lichtenthaler rozděluje stres podle působení na fyziologickou aktivitu rostlin na:

- Eu-stres - aktivační či stimulační stres, který má pozitivní účinek na vývoj či přežití rostlin. Mírný stres může pozitivně aktivovat buněčný metabolismus, a tak stimulovat fyziologickou aktivitu rostlin. Tento typ stresu nezpůsobuje poškození rostlin, i když působí dlouhodobě.
- Dis-stres - stres způsobující poškození. Má negativní vliv na vývoj a přežití rostlin v daném prostředí. V reálných podmínkách nastupuje dis-stres v případě, že stresor překročí určitou prahovou hodnotu, kterou rostliny nejsou schopny kompenzovat svým vnitřním reparačním mechanismem.

3. Metodika

Semena řepky olejky (*Brassica napus L. var. napus*) byla ošetřena chladným plazmatem. Plazma bylo generováno mezi dvěma hliníkovými elektrodami, používaným plynem byl vzduch. (Ryplová a kol., 2014). K dispozici byly tři varianty semen, které se lišily časovým intervalem ošetření (3 min, 5 min a 10 min).

Experiment probíhal v plně kontrolovaných podmínkách, v kultivačním boxu. Z důvodu prostorové omezenosti kultivačního boxu byly využity pouze dvě ošetřené varianty (3 min, 10 min) a jedna neošetřená varianta (kontrola – K).

Jednotlivá měření byla prováděna v pravidelných týdenních intervalech. Celkově byla provedena 3 měření, a to 21. den, 28. den a 35 den kultivace rostlinného materiálu. U zkoumaných variant rostlin byly zjišťovány tyto charakteristiky: obsah fotosyntetických pigmentů a fluorescence chlorofylu. V poslední fázi, 40. den kultivace, byla zjišťována čerstvá hmotnost a hmotnost sušiny.

3.1 Kultivace rostlin

Pro kultivaci byla využita zemina (Garden Forestina, Střelské Hoštice) o kyselosti $\text{pH} = 4,5-6,5$. Semena řepky byla vyseta do plastových květináčů o rozměrech 11 x 11 x 12 cm. V každém květináči bylo v pravidelných vzdálenostech od sebe vyseto pět semen. Květináče byly umístěny na plata, vždy po pěti tak, aby na každém platě byla vždy jedna a ta samá varianta. Ve výsledku tedy existovala tři plata po pěti květináčích od každé varianty (3 min, 10 min, K). Což ve výsledku znamenalo 75 rostlin od každé varianty.

Plata s rostlinami byla umístěna do kultivačního boxu Fytoscope (PSI, Brno, Česká Republika). Rostliny byly pěstovány v podmínkách, které jsou uvedeny v Tab 1:

Tabulka 1: Podmínky kultivace rostlinného materiálu

Fáze	Teplota °C	Relativní vlhkost %	Ozářenost $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Rozednívání 2 hod	17 → 24	80 → 65	0 → 286
Den 10 hod	24	65	286
Stmívání 2 hod	24 → 17	65 → 80	286 → 0
Noc 10 hod	17	80	0

Rostliny byly pravidelně zalévány, každý den 0,5 litru odstáté vody. V posledním týdnu bylo nutné zvýšit zalévání na 1 litr za den. Sedmý den po zasetí se objevily první děložní lístky.

3.2. Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů

Pro stanovení množství chlorofylů, karotenoidů a fluorescence chlorofylu byl vyžíván vždy první list rostliny. Stanovení množství chlorofylů a fluorescence bylo možné provést až tehdy, když první list dosáhl takové velikosti, že z něj bylo možné vyříznout korkovrtem 6 stejných terčků o známém obsahu. První měření bylo provedeno 21. den kultivace.

Obsah chlorofylů byl stanovován metodou spektrofotometrie. Pro každé měření bylo využito pět rostlin od každé varianty. Z prvního listu bylo vyříznuto šest identických terčků korkovrtem o obsahu 0, 6359 cm² (obsah jednoho terčku). Listové terčky byly rozdrceny v ledové třecí misce s tloučkem a pigmenty byly extrahovány 80% acetonem. Konečné stanovení pigmentů bylo provedeno spektrofotometrem UV VIS 250 (Schimadzu, Japonsko) při vlnových délkách 663 nm, 646 nm a 470 nm.

Stanovení pigmentů bylo provedeno podle Lichtenhalera a Wellburna (1983).
Obsah pigmentů byl stanoven podle rovnic:

$$\text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/ml}) = 12,21 (A_{663}) - 2,81 (A_{646})$$

$$\text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/ml}) = 20,13 (A_{646}) - 5,03 (A_{663})$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 3,27 \text{ chl a} -)104[\text{chl b}]/227$$

Stanovení fotosyntetických pigmentů bylo nutné provést v co nejmenším časovém intervalu, za co nejnižší teploty, aby došlo k minimálním ztrátám pigmentů.



Obr. č. 6 - Stanovení obsahu chlorofylů (vlastní foto)

3.3 Stanovení fluorescence chlorofylů

Před samotným měřením byly rostliny zatemněny po dobu 20 min pomocí připravených krabic. Ihned po vytažení byl do klipu FlorPenu uchycen první list. Po dobu 1 min bylo nutné vyčkat, aby opět došlo k adaptaci fotosystému na tmu a až poté změřit fluorescence. Fluorpen je přenosný, bateriově napájený fluorometr, který umožňuje rychlé stanovení fluorescence. Při měření fluorescence byl využit klasický FluorPen FP 100, který nemá žádné komunikační zařízení, naměřené hodnoty jsou ukládány pouze do paměti přístroje. Při měření byl zjišťován fluorescenční parametr F_v/F_m (Genty a kol., 1989), který udává maximální fotochemickou účinnost fotosystému II.

Opět bylo měřeno pět rostlin od každé varianty.



Obr. č. 7 - Zatemněné rostliny (vlastní foto).

3.4 Stanovení sušiny

40. den kultivace byla stanovována čerstvá hmotnost rostlin a hmotnost sušiny. Pro stanovení sušiny byly vyrobeny obálky z alobalu. Prázdné obálky byly zváženy a hodnoty zaznamenány. Do obálek byly umístěny rostliny bez kořenů a bez prvních listů (ty byly použity pro stanovení fotosyntetických pigmentů). Celkem bylo stanoveno 20 rostlin od každé varianty. Obálky včetně rostlin byly opět zváženy a umístěny do sušárny předehřáté na 105 °C. Rostliny byly sušeny po dobu 4 hodin. Po vysušení byly obálky opět zváženy a zjištěné údaje vyhodnoceny.

3.5 Analýza dat

Veškerá naměřená data byla analyzována v programech Excel a Statistica. Data byla statisticky vyhodnocena faktorovou analýzou variance (one-way ANOVA) a HSD Tukey testem, vše na hladině významnosti 0,05.

Fotografie, zachycující nejdůležitější fáze měření, jsou součástí příloh diplomové práce.

4. Výsledky

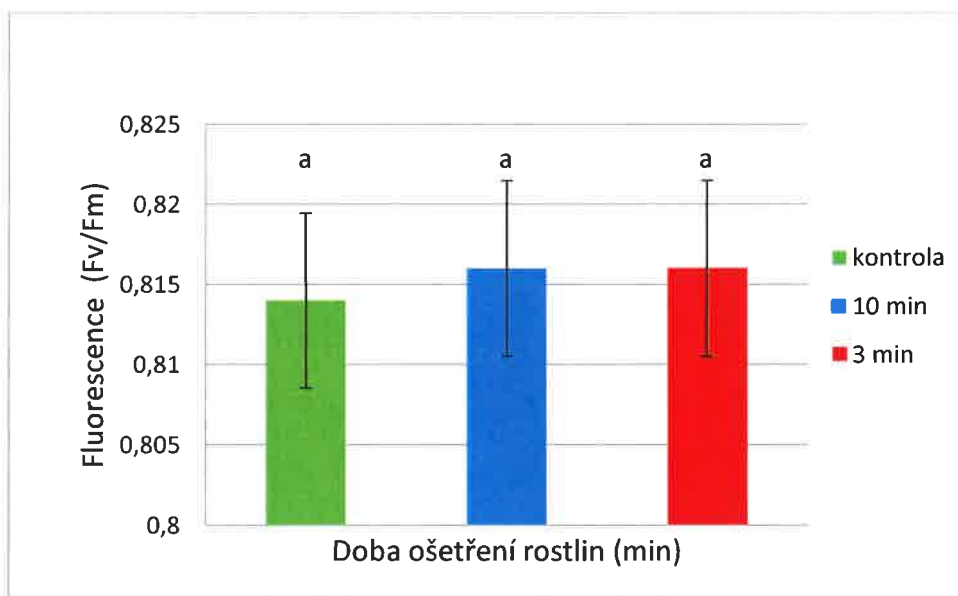
4.1 Fluorescence chlorofylu

21. den kultivace

Tabulka č. 2: Tukey HSD test proměn.

	{1}	{2}	{3}
	M=,81400	M=,81600	M=,81600
0min {1}		0,834629	0,834629
3min {2}	0,834629		1,000000
10min {3}	0,834629	1,000000	

Rozdíly nejsou významné, $p < 0,05$. Varianty se nelišily.



Obr. č. 8: Graf fluorescence chlorofylu prvního listu měřená 21. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

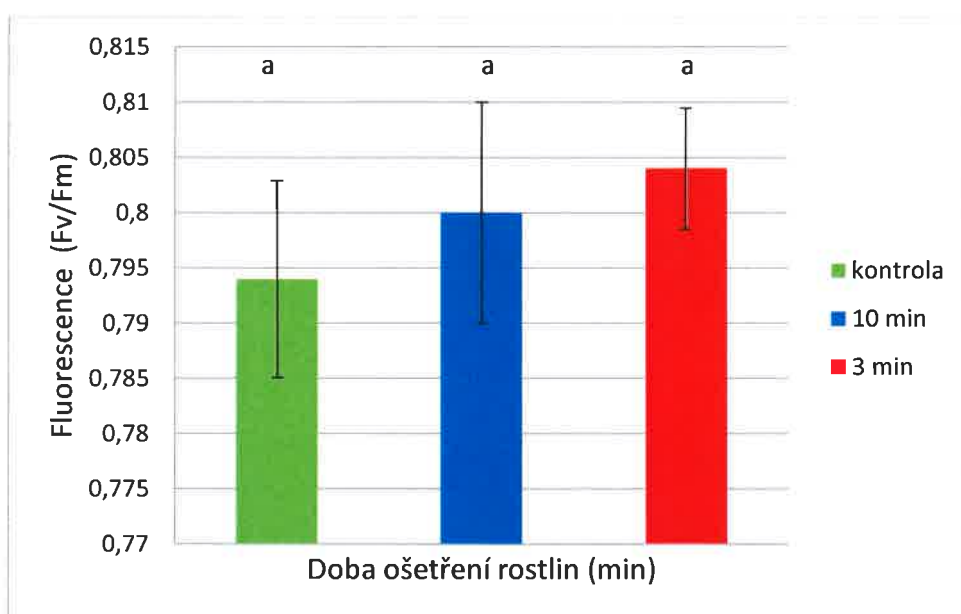
21. den kultivace vykazovaly varianty 3 min a 10 min shodné hodnoty fluorescence. U kontroly byly naměřeny nepatrně nižší hodnoty.

28. den kultivace

Tabulka č. 3: Tukey HSD test proměn.

	{1}	{2}	{3}
	M=,79400	M=,80400	M=,80000
0min {1}		0,184032	0,512705
3min {2}	0,184032		0,735996
10min {3}	0,512705	0,735996	

Rozdíly nejsou významné, $p < 0,05$. Varianty se nelišily.



Obr. č. 9: Graf fluorescence chlorofylu prvního listu měřená 28. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

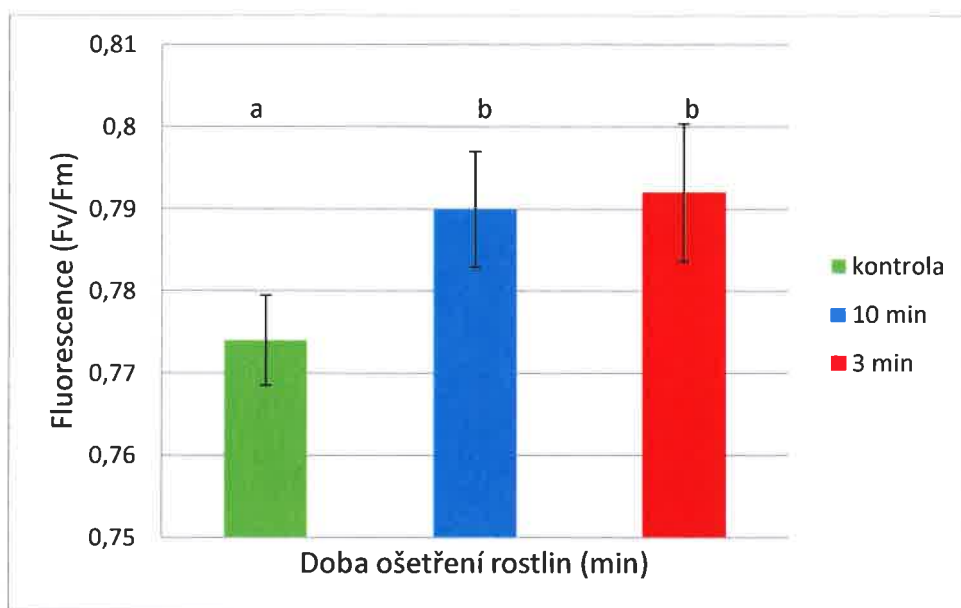
28. den kultivace hodnoty fluorescence u všech třech variant poklesly ve srovnání s prvním měřením. Nejvyšší hodnoty fluorescence vykazovala varianta 3 min, naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u kontroly.

35. den kultivace

Tabulka č. 4: Tukey HSD test proměn.

	{1}	{2}	{3}
	M=,77400	M=,79200	M=,79000
0min {1}		0,004569	0,009959
3min {2}	0,004569		0,896610
10min {3}	0,009959	0,896610	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Varianty se lišily.



Obr. č. 10: Graf fluorescence chlorofylu prvního listu měřená 35. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

35. den kultivace se hodnoty fluorescence snížily. Nejnižší hodnoty vykazovala kontrola, nejvyšší hodnoty vykazovala varianta 3 min.

4.2 Obsah fotosyntetických pigmentů

4.2.1 Obsah chlorofylu (a+b) 21. den kultivace

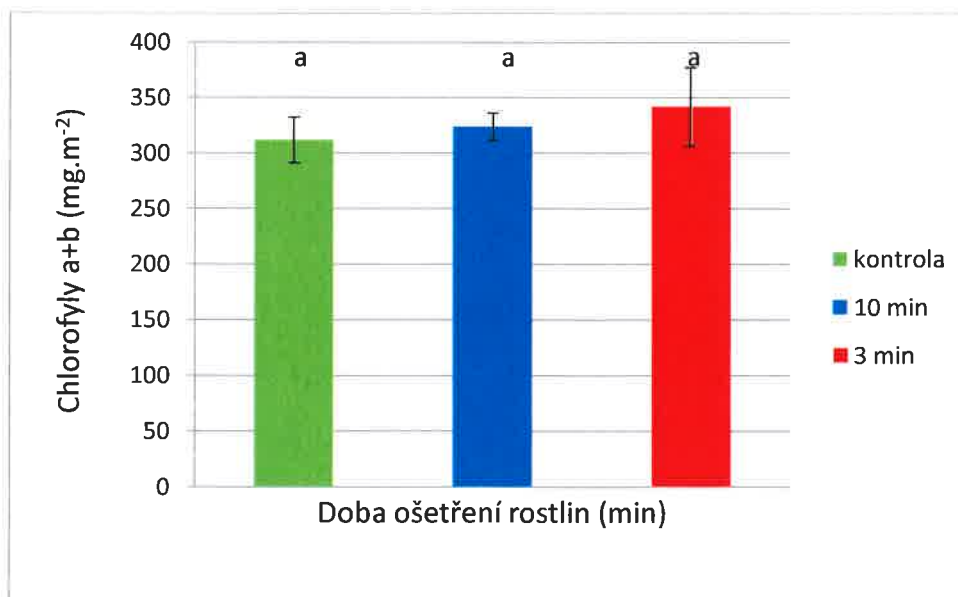
Tabulka 5: Analýza rozptylu.

SČ	SV	PČ	SČ	SV	PČ	F	p
efekt	efekt	efekt	chyba	chyba	chyba		
2293,074	2	1146,537	7235,471	12	602,9559	1,901527	0,191708

Tabulka č. 6: Tukey HSD test proměn.

	{1}	{2}	{3}
	M=311,74	M=341,84	M=323,86
0min {1}		0,170643	0,721618
3min {2}	0,170643		0,499346
10min {3}	0,721618	0,499346	

Rozdíly nejsou významné, $p < 0,05$. Varianty se nelišily.



Obr. č. 11: Graf obsahu chlorofylů (a+b) v g/m² listové plochy měřený 21. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

21. den kultivace vykazovala nejvyšší hodnoty obsahu chlorofylu (a+b) varianta 3 min. Naopak nejnižší hodnoty vykazovala varianta 0 min (kontrola).

4.2.2 Obsah karotenoidů 21. den kultivace

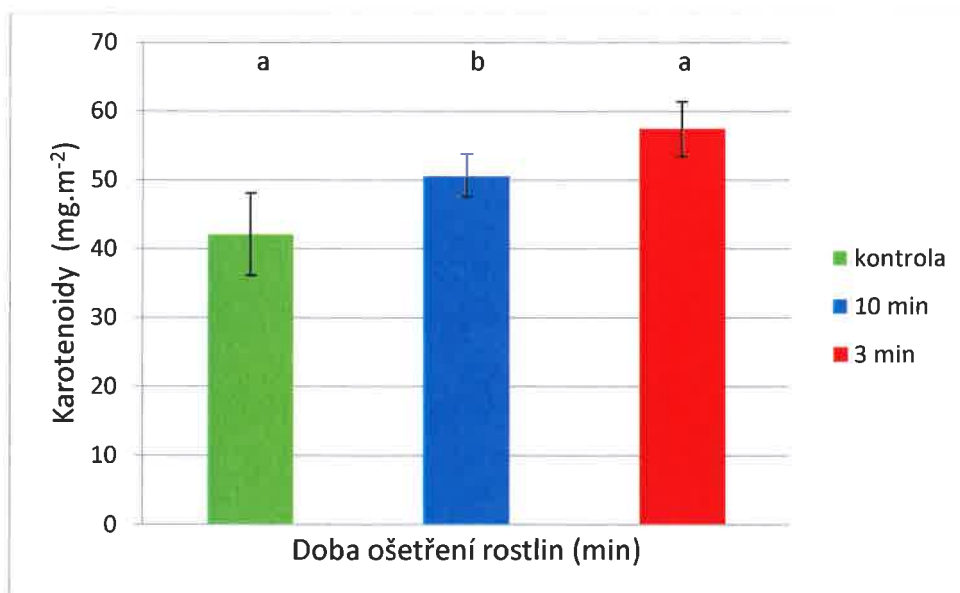
Tabulka č. 7: Analýza rozptylu.

SČ	SV	PČ	SČ	SV	PČ	F	p
efekt	efekt	efekt	chyba	chyba	chyba		
275,1374	2	137,5687	241,6482	12	20,13735	6,831520	0,010453

Tabulka č. 8: Tukey HSD test proměn.

Tukey	{1}	{2}	{3}
	M=50,861	M=60,789	M=52,891
0min {1}		0,011460	0,759524
3min {2}	0,011460		0,040915
10min {3}	0,759524	0,040915	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Varianty se lišily.



Obr. č. 12: Graf změn obsahu karotenoidů v g/m² listové plochy měřený 21. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

Nejvyšší hodnoty vykazovala varianta 3 min, naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u varianty 0 min.

4.2.3 Obsah chlorofylu (a +b) 28. den kultivace

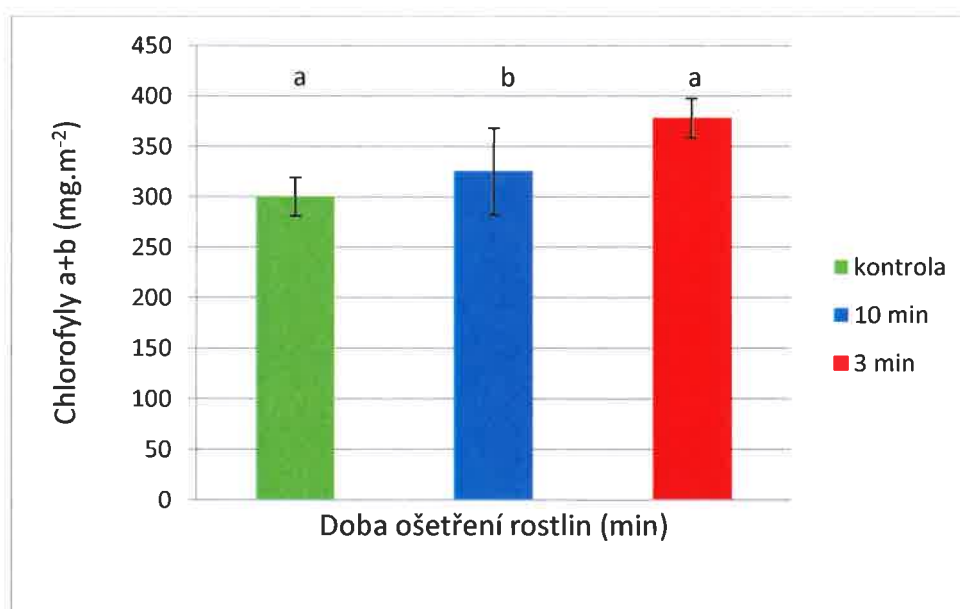
Tabulka č. 9: Analýza rozptylu.

SČ	SV	PČ	SČ	SV	PČ	F	p
efekt	efekt	efekt	chyba	chyba	chyba		
2293,074	2	1146,537	7235,471	12	602,9559	1,901527	0,191708

Tabulka č. 10: Tukey HSD test proměn.

	{1}	{2}	{3}
	M=300,23	M=378,11	M=325,58
0min {1}		0,003504	0,390685
3min {2}	0,003504		0,038249
10min {3}	0,390685	0,038249	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Varianty se lišily.



Obr. č. 13: Graf obsahu chlorofylu (a+b) v g/m² listové plochy měřený 28. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

28. den kultivace vykazovala nejvyšší hodnoty obsahu chlorofylu (a+b) varianta 3 min. Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny opět u kontroly. Obsah chlorofylů se zvýšil u všech variant v porovnání s prvním měřením.

4.2.4 Obsah karotenoidů 28. den kultivace

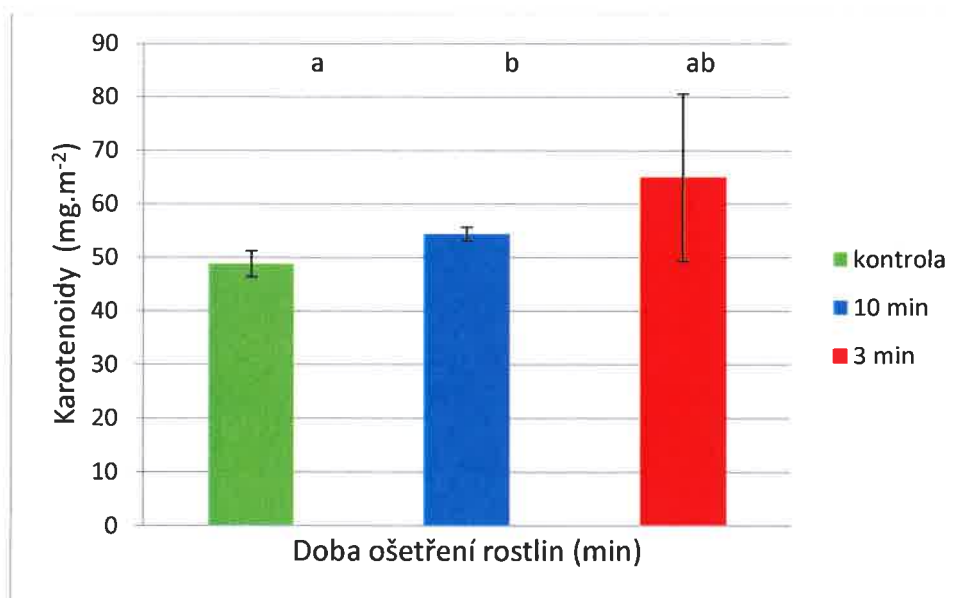
Tabulka č. 11: Analýza rozptylu

SČ	SV	PČ	SČ	SV	PČ	F	p
efekt	efekt	efekt	chyba	chyba	chyba		
674,6032	2	337,3016	1007,265	12	83,93874	4,018426	0,046144

Tabulka č. 12: Tukey HSD test proměn

Tukey	{1}	{2}	{3}
	M=48,830	M=65,001	M=54,418
0min {1}		0,040356	0,612047
3min {2}	0,040356		0,202878
10min {3}	0,612047	0,202878	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Varianty se lišily.



Obr. č. 14: Graf změn obsahu karotenoidů v g/m^2 listové plochy měřený 28. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

Nejvyšší hodnoty vykazovala varianta 3 min, nejnižší opět kontrola.

4.2.5 Obsah chlorofylu (a +b) 35. den kultivace

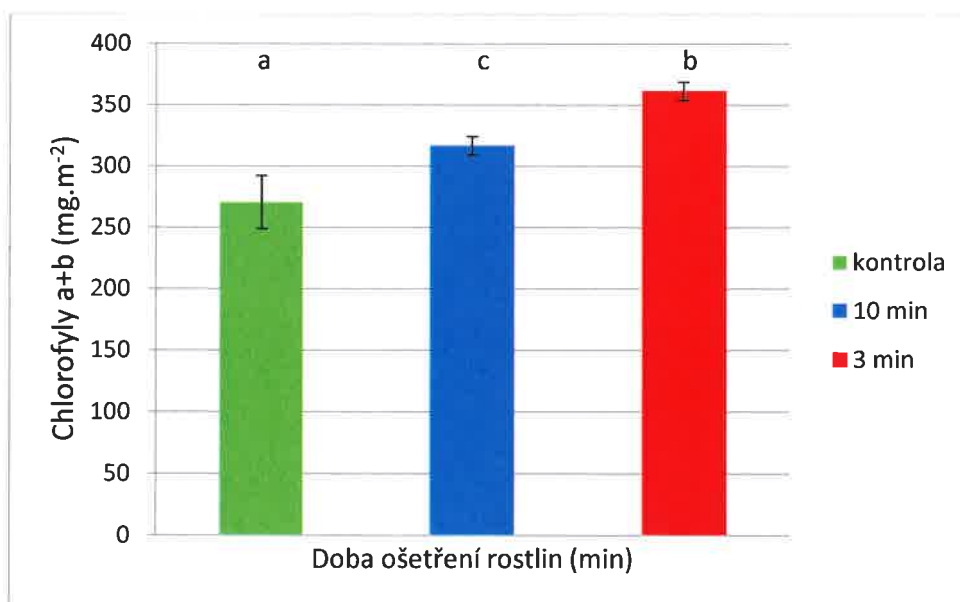
Tabulka č. 13: Analýza rozptylu.

SČ	SV	PČ	SČ	SV	PČ	F	p
efekt	efekt	efekt	chyba	chyba	chyba		
20652,11	2	10326,06	2301,181	12	191,7651	53,84743	0,000001

Tabulka č. 14: Tukey HSD test proměn.

Tukey	{1}	{2}	{3}
	M=270,46	M=361,34	M=316,85
0min {1}		0,000190	0,000667
3min {2}	0,000190		0,000879
10min {3}	0,000667	0,000879	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Varianty se vzájemně lišily.



Obr. č. 15: Graf změn v obsahu chlorofylu (a+b) v g/m² listové plochy měřený 35. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

35. den kultivace vykazovala nejvyšší hodnoty obsahu (a+b) chlorofylu opět varianta 3 min. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u varianty 10 min. Obsah chlorofylů se snížil u všech variant v porovnání s druhým měřením. U varianty 10 min a kontroly došlo ke snížení obsahu chlorofylů také v porovnání s prvním měřením.

4.2.6 Obsah karotenoidů 35. den kultivace

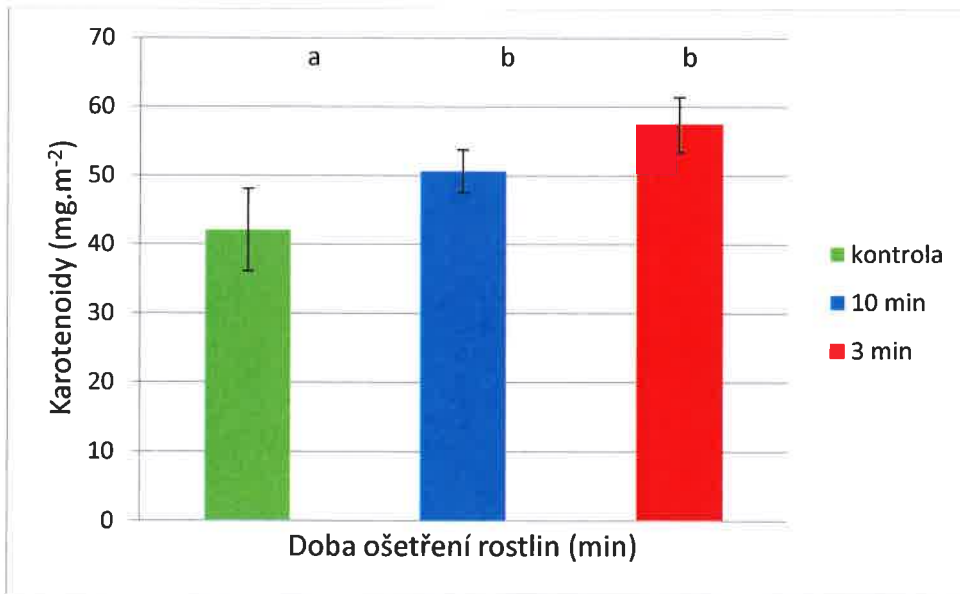
Tabulka č. 15: Analýza rozptylu.

SČ	SV	PČ	SČ	SV	PČ	F	p
efekt	efekt	efekt	chyba	chyba	chyba		
591,1937	2	295,5968	244,1815	12	20,34845	14,52675	0,000624

Tabulka č. 16: Tukey HSD test proměn.

Tukey	{1}	{2}	{3}
	M=42,086	M=57,430	M=50,640
0min {1}		0,000607	0,027907
3min {2}	0,000607		0,082530
10min {3}	0,027907	0,082530	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Varianty se lišily.



Obr. č. 16: Graf změn obsahu karotenoidů v g/m² listové plochy měřený 35. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

Nejvyšší obsah karotenoidů byl naměřen u varianty 3min, naopak nejnižší obsah vykazovala varianta kontrolní. V průběhu ontogeneze rostlin obsah karotenoidů kolísal.

4.3 Obsah sušiny

4.3.1 Čerstvá hmotnost rostlin.

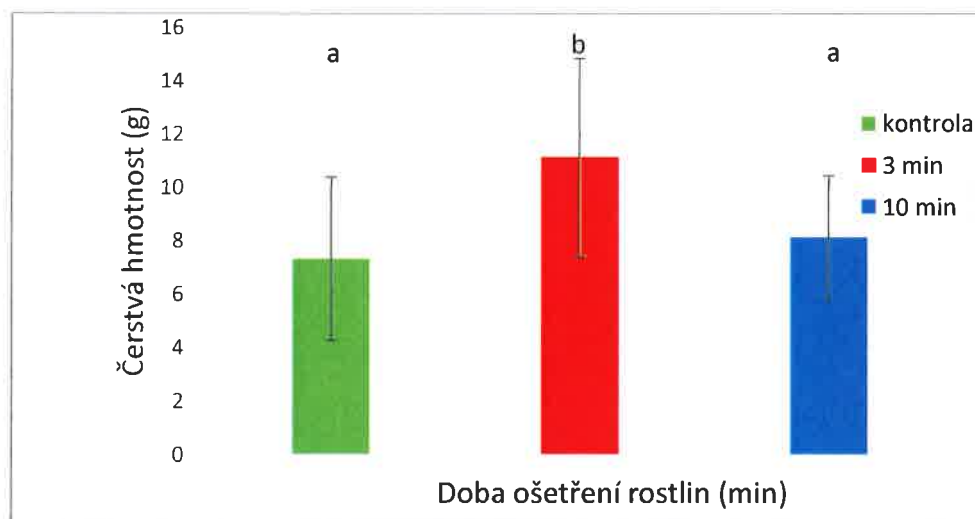
Tabulka č. 17: Analýza rozptylu.

SČ	SV	PČ	SČ	SV	PČ	F	p
efekt	efekt	efekt	chyba	chyba	chyba		
141,4532	2	70,72660	154,9997	42	3,690468	19,16467	0,000001

Tabulka č. 18: Tukey HSD test proměn.

	{1}	{2}	{3}
	M=6,7957	M=11,036	M=8,1013
k {1}		0,000119	0,162716
3min {2}	0,000119		0,000512
10min {3}	0,162716	0,000512	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Ošetřené varianty se lišily.



Obr. č. 17: Graf čerstvé hmotnosti nadzemních částí rostliny v g. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

Nejvyšší čerstvou hmotnost vykazovala varianta 3 min, naopak nejnižší čerstvou hmotnost vykazovala varianta kontrolní.

4.3.2 Hmotnost sušiny.

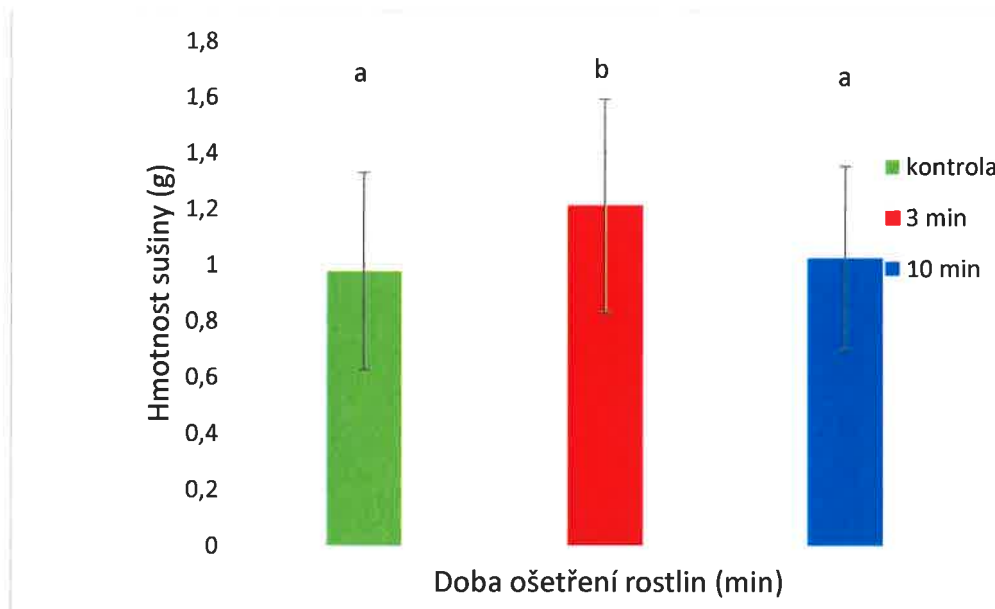
Tabulka č. 19: Analýza rozptylu.

SČ efekt	SV efekt	PČ efekt	SČ chyba	SV chyba	PČ chyba	F	p
0,627969	2	0,313985	2,204142	42	0,052480	5,982986	0,005173

Tabulka č. 20: Analýza rozptylu.

	{1}	{2}	{3}
	M=,95603	M=1,2352	M=1,0298
k {1}		0,005059	0,654921
3min {2}	0,005059		0,047141
10min {3}	0,654921	0,047141	

Rozdíly jsou významné, $p < 0,05$. Varianty se lišily.



Obr. č. 18: Graf sušiny nadzemních částí rostlin v g. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($p < 0,05$) při porovnání každý s každým.

Nejvyšší obsah sušiny v g vykazovala varianta 3 min, naopak nejnižší hmotnost sušiny vykazovala varianta kontrolní.

Naměřená data byla částečně publikována na mezinárodní konferenci a příspěvek otištěn ve sborníku. Konkrétní příspěvek je součástí příloh diplomové práce.

5. Diskuze

Fluorescence byla měřena v průběhu ontogeneze rostlin celkem třikrát. 1. měření, které proběhlo 21. den kultivace, přineslo srovnatelné výsledky parametru F_v/F_m u všech studovaných variant (0 min, 3 min, 10 min). 2. měření (28. den kultivace) taktéž přineslo velmi podobné výsledky u všech variant. Teprve 3. měření, 35. den kultivace, prokázalo statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými variantami.

Cílem práce bylo zjistit, zda aplikace chladného plazmatu na semena řepky ovlivnila parametr F_v/F_m u jednotlivých variant.

Podle Lichtenthalera a kol. (2005) by měla mít zdravá rostlina parametr F_v/F_m přibližně 0,830. Pokud se naměřená hodnota výrazně liší, lze předpokládat, že na rostlinu působí určitý stres.

Krausse a kol. (1991) uvádí, že vliv stresových faktorů je důsledkem vyššího využití energie pro vznik tepla a fluorescence.

Z průměrných hodnot lze vyvodit, že nepatrně nižší hodnoty vykazovala varianta 0 min (kontrola), a naopak vyšší parametr F_v/F_m vykazovala varianta 3 min. Všechny varianty, vykazovaly nižší parametr F_v/F_m v porovnání s parametrem, který uvádí Lichtenthaler (2005). V závěru lze podle zjištěných výsledků konstatovat, že v průběhu ontogeneze rostlin, docházelo k postupnému poklesu F_v/F_m u všech sledovaných variant.

Podle Stobera a kol. (1992) je pokles hodnoty poměru F_v/F_v důsledkem zvyšování obsahu chlorofylu v rostlinách. Naopak růst parametru F_v/F_m souvisí s úbytkem chlorofylu v rostlině (Dambrosio a kol., 1992). Avšak Valentini a kol. (1994) uvádí, že parametr F_v/F_m je ovlivněn mnoha faktory působícími na rostlinu z vnějšího prostředí nejen obsahem chlorofylu.

Z předchozích studií Stobera a Dambrosia vyplývá, že s rostoucí hodnotou F_m/F_v klesá obsah chlorofylů a naopak. Jelikož v průběhu ontogeneze rostlin docházelo k poklesu hodnoty poměru F_v/F_m , měl by se v průběhu ontogeneze zvyšovat obsah chlorofylu.

Obsah a+b chlorofylu byl taktéž měřen v průběhu ontogeneze třikrát. Cílem práce bylo zjistit, jak se budou lišit v obsahu chlorofylu jednotlivé varianty.

Podle Govindjee (2004) způsobuje působení stresu na rostliny snížení obsahu chlorofylu.

1. měření obsahu a+b chlorofylu, 21. den kultivace, nevykazovalo významné rozdíly mezi všemi variantami (0 min, 3 min, 10 min). 2. měření, 28. den kultivace, prokázalo statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými variantami. 3. měření, 35. den kultivace, taktéž prokázalo statisticky významné rozdíly mezi všemi stanovovanými variantami.

Dvě měření ze třech prokázaly ovlivnění obsahu chlorofylu (a+b) v listech. Obě ošetřené varianty (3 min a 10 min) vykazovaly vyšší obsah a+b chlorofylu ve srovnání s kontrolní variantou.

Podle průměrných hodnot si nejlépe vedla varianta 3 min. Tato varianta v průběhu 1. a 3. měření vykazovala nejvyšší výsledky a v 2. měření byly její výsledky srovnatelné s variantou 10 min.

Jiang a kol. (2014) uvádí, že aplikace chladného heliového plazmatu o energii 80 W má pozitivní účinky na fyziologii a anatomii rostlin. Například dochází k urychlení klíčivosti a ke zvýšení klíčivého potenciálu semen pšenice seté. V porovnání s neošetřenou kontrolou se zvýšila výška rostlin, čerstvá hmotnost, průměr stonků a obsah listové plochy. U ošetřených rostlin byl prokázán zvýšený obsah chlorofylu o 9,8 % v porovnání s kontrolou.

V průběhu ontogeneze rostlin kolísal obsah chlorofylu. Při porovnání výsledků prvního a druhého měření došlo k růstu obsahu (a+b)chlorofylů, výsledky naměřené v druhém měření byly vyšší. Třetí měření prokázalo pokles obsahu (a+b) chlorofylu v porovnání s druhým měřením.

Klesání obsahu chlorofylu může souviset se stárnutím rostlin. Protože během senescence rostlin dochází k postupnému úbytku chlorofylu. (Špundová a kol. 2003).

Změny obsahu chlorofylu v listech bylo možné, v průběhu jednotlivých měření, zaznamenat i vizuálně. Při druhém měření byly listy rostlin sytě zelené, někdy až namodralé. Zatímco ve 3. měření některé rostliny již ztrácely výraznou zelenou barvu a začínaly pomalu žloutnout.

Nejvyšší obsah karotenoidů vykazovala ve všech měřeních, (21., 28. a 35 den kultivace) varianta 3 min. Naopak nejnižší obsah karotenoidů byl ve všech měření stanoven u varianty 0 min. V průběhu ontogeneze rostlin, docházelo ke kolísání obsahu karotenoidů. Podle Velíška (2009) může množství karotenoidů v rostlinách, ovlivňovat stupeň zralosti rostlin a mnoho dalších faktorů působících z vnějšího

prostředí. Změny v obsahu karotenoidům odpovídá jíkólísání obsahu chlorofylu (a+b). Nejvyšší obsah karotenoidů byl naměřen 28. den kultivace. Poslední měření prokázalo pokles obsahu karotenoidů u všech studovaných variant.

Sušina představuje 10 – 40 % hmotnosti rostlinného těla. Při měření byla stanovena sušina pouze nadzemních částí rostlin. U řepky olejky by měla podle Bečky a kol. (2007) sušina představovat přibližně 18,9 %. U všech variant (0 min, 3 min, 10 min) bylo prokázáno nižší procento sušiny ve srovnání s tímto údajem.

Bussler a kol. (2015) uvádí, že množství sušiny u semen hrachu ošetřených chladným plazmatem se výrazně nelišilo od sušiny semen, která ošetřena nebyla. V tomto měření se obsah sušiny mezi jednotlivými variantami lišil, zrovna tak jako čerstvá hmotnost rostlin. Podle průměrných hodnot vykazovala nejvyšší hmotnost sušiny varianta 3 min a naopak nejnižší hmotnost byla prokázána u kontrolní varianty. Stejně tak při zjišťování čerstvé hmotnosti vykazovala nejvyšší hodnoty varianta 3 min a naopak nejnižší varianta 0 min (kontrola).

6. Závěr

Výsledky jednotlivých měření přinesly zajímavá zjištění. U všech dostupných variant byly naměřeny různé hodnoty jak obsahu (a+b) chlorofylu, karotenoidů tak i fluorescence chlorofylu. Naměřené hodnoty se lišily v závislosti na délce ošetření. Pokud by měla být vybrána varianta, u níž aplikace chladného plazmatu měla nejefektivnější vliv na jednotlivé parametry, byla by to varianta 3 min.

V průběhu ontogeneze rostlin kolísaly hodnoty v souvislosti s růstem a následnou senescencí rostlin. Celkově nejpřínosnější výsledky přineslo 2. měření, které proběhlo 28. den kultivace. V tento den se nejvíce odlišovaly naměřené hodnoty, jak obsahu a+b chlorofylu, karotenoidů, tak i fluorescence chlorofylu mezi všemi variantami navzájem.

Aplikace chladného plazmatu na semena rostlin ovlivnila procento sušiny v rostlinách. Ošetřené rostliny vykazovaly nižší obsah sušiny než srovnávací kontrola.

Hlavním cílem diplomové práce bylo zjistit, zda aplikace chladného plazmatu ovlivňuje množství fotosyntetických pigmentů a fluorescenci chlorofylu rostlin. Prokázalo se, že tento předpoklad byl správný a technologie chladného plazmatu opravdu ovlivňuje fyziologické aktivity rostlin.

7. Seznam použité literatury

BAIER M., FORSTER J., SCHNABEL U., KNORR D., EHLBECK J., HERPPICH W. B., CHÜTLER O., 2013: Direct non-thermal plasma treatment for the sanitation of fresh corn salad leaves: Evaluation of physical and physiological effects and antimicrobial efficacy. *Postharvest Biology and Technology*, 81–87 s.

BARANYK, P., BALÍK, J., KAZDA, J., KUČTOVÁ, P., SOUKUP, J., ŠKEŘÍK, J., VOLF, M., 2007: Řepka – pěstování, využití, ekonomika. Praha: Profi Press s.r.o., 208 s.

BEČKA D., VAŠÁK J., ZUKALOVÁ H. a MIKŠÍK V., 2007: Řepka ozimá – Pěstitelský rádce. Praha: Kurent s.r.o., 56 s.

BENDER C., MATTHES R., KINDEL E., KRAMER A., LADEMANN J., WELTMENN K. D., EISENBEIß W. and HUBNER N. O., 2010: The irritation potential of nonthermal atmospheric pressure plasma in the HET-CAM Plasma Process, *Polym*, 26 s.

BRUCHANOV M., 2005: Plazmová sterilizace, *Fyzikální metody v medicíně II*, 9 s.

BUBLER, S., STEINS, V. EHLBERK, J., SCHUTLER, O., 2015: Impact of thermal treatment versus cold atmospheric plasma processing on the technofunctional protein properties from *Pisum sativum* Salamanca. In: *Journal of Food Engineering.*, 166-174 s.

BUSCHMANN C., LANGSDORF G., LICHTENHALER H. K., 2000: Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. In: *Photosynthetica* 38: 483-491s.

CRAUSE G. H., WEIS E., 1991: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basic. Institute of botany, university of Monster, Germany, 42: 313 – 49 s.

DAMBROSIO N., SZABO K., LICHTENHALER H. K., 1992: Increase of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 during the autumnal chlorophyll breakdown. *Radiation and Environmental Biophysics* 31: 51-62 s.

FRIDAN G., BROOKS A.D., BALASUBRAMANIAN M., FRIDMAN A., GUTSOL A., VASILETS V. N., AYAN H., 2007: Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Processes and Polymers*, 370-375 s.

GAVRIL B., GAJDOVÁ I., ŠERÁ B., KUČTOVÁ P., ŠERÝ M., ŠPATENKA P., HNATIUC E., 2012: Různá reakce semen kultivarů máku setého po ošetření netermálním plazmatem., 23: 231-235 s.

GENTI B., BRIANTAIS J. M., BAKER N. R., 1989: The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimie et Biophysica acta*,1: 87-92 s.

GOVINDJEE 1995: 63 Years since Kautsky - chlorophyll-a fluorescence. In: *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 131-160 s.

GOVINDJEE, 2004: Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–41 s.

HÁK R., LICHTENHALER H. K., RIENDLE U., 1990: Decrease of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves. *Radiation and Environmental Biophysics* 29: 329-336 s.

HARBINSON J., ROSENQVIST E., 2003: An Introduction to Chlorophyll Fluorescence. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* 1-29 s.

HENSELOVÁ M., SLOVÁKOVÁ L., MARTINKA M., ZAHORANOVÁ A., 2012: Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low temperature plasma. *Biologia*, 490 – 497 s.

CHEN F., 1984: Úvod do fyziky plazmatu. Praha: Academia, 328 s.

CHITINIS P. R., XU Q., CHITINIS V. P. NECHUSTAIR R., 1995: Functional and organization of Photosystem I polypeptides. *Photosynthetic research*, 108: 1076-1075 s.

ILÍK, P., KOURIL, R.; KRUK, J., MYSLIVA-KURDZIEL, B., POPELKOVA, H., STRZALKA, K., NAUS, J. 2003: Origin of Chlorophyll Fluorescence in Plants at 55–75°C. *Photochemistry and Photobiology*, 77, 68–76 s.

JIAFENG J., XIN H., LING L., JIANGANG J., HANLIANG S., QUILAI X., RENHONG Y., YUANHU D., 2014: Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat, 5859: 165-172 s.

JIANG, J. F., He, X., LI, L., Li, J. G., SHAO, H. L., XU, Q. L., YE, H. R. & DONG, Y. H., 2014: Effect of cold plasma treatment on seed germination and growth of wheat. *Plasma Sci. Technol.* 16: 54–58 s.

KLIMEŠOVÁ V., PALÁT K., 2006: Základy obecné chemie pro farmaceuty. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 161 s.

KRAUSE G. H, WEIS E., 1991: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349 s.

KREJČÍ V., 1974: Plazma, čtvrté skupenství hmoty, Praha, 246s.

KUBÁTK., 2002: Klíč ke květeně České republiky. Academia Praha., 273 s.

KULHÁNEK P., 2011: Úvod do teorie plazmatu. Praha, Aldebran Group for Astrophysi, 384 s.

LICHTENHALER H. K., 1987: Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, 350-382 s.

LICHTENHALER H. K., WELLBURN, 1983: Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, 5: 591-592 s.

LICHTENHALER H. K., LANG M., SOWINSKA M., HEISEL F., MIEH J. A., 1996: Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *Journal of Plant Physiology*, 148: 599- 612 s.

LICHTENHALER H. K., LANGSDORF G., LENK S., BUSCHMANN C., 2005: Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica*, 43: 355-369 s.

LING L., JIAFAHG J., JIANGANG IL, MINCHONG S., XIN H., HANLING S. & YUANHUA L., 2015: Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific Reports* 4, 58-59 s.

MÍČHAL I. 1991: Ekologická stabilita. Grada, Praha, 224 s.

MILAN-ALMARAZ J. R., GUEVARA-GONZALES R. G., ROMERO-TRONCOSO J., OSORNOI-RIOS R. A., TORES PACHECO I., 2009: Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: A review. *African Journal of Biotechnology*, 8: 7340-7349 s.

NELSON, YUCUM, 2006: Structure and function of photosystems I and II. *PubMed Commons*, 57: 521-565 s.

NOVÁČEK F., 2009: Fotochemické základy botaniky. Fontána, 284 s.

PARK B. J., LEE D. H., PARK J. C., LEE I. S., LEE K. Y., HYUN S. O., CHUN M. S., CHUNG K. H., 2006: Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure. *Phys Plasmas*, 105: 4539-4544 s.

PAVLOVÁ L., 2005: Fyziologie rostlin, část II: Rostlina a energie. Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova v Praze, 254 s.

PFUNDEL E., 1998: Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynthetic research* 56, 185-195 s.

POORA, R. J., THOMSON 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*, 975: 384-394 s.

PROCHÁZKA S., 1998: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 484s.

ROHÁČEK K., SOUKOPOVÁ J., BARTÁK M., 2008: Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In: *Research Singpost, India* pp 41 -104 s.

RYPLOVÁ R., 2014: Fyziologie rostlin. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 113 s.

RYPLOVÁ R., ŠERÁ B., LANDOVÁ T., PETRÁŠKOVVÁ K., BICANOVÁ L., RÁKOSNÍKOVÁ T., 2014: Odezva semenáčků řepky na ošetření chladným plazmatem. In: *Osivo a sadba XII., Vědecký a technický seminář, 5. 2. 2015, Praha*, 35-40 s.

SCHREIBER U., SCHLIVA U., BILGER W., 1986: Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51-62 s.

SCHÜTLER O., BUBLERS., EHLBECK J., SASCHA R., WERNER B. H., SCHREINER M., NEUGART S., 2015: Impact of cold atmospheric pressure plasma on physiology and flavonol glycoside profile of peas. (*Pisivum sativum* Salamanca), 76: 132-141 s.

SMOLKA P., 1987: Plazmochemie. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009, 64 s.

STOBER F, LICHTENHALER H. K.: 1992 Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat. *Journal of Plant Physiology* 140: 673- 680 s.

STRACH V.: 1987: Úvod do problematiky fyziky plazmatu. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta., 80 s.

STRASSER R. J., BUTTLER W. L., 1977: Energy distribution in photosynthetic apparatus during development. *International congress on Photosynthesis* 336 – 67 s.

STREJČKOVÁ M., BOHATÁ A., ČURN V., BARTOŠ P, OLŠAN P., HAVELKA Z., KŘÍŽP., ŠPETANKA,P., 2015: Aktuální poznatky v pěstování, šlechtění, ochraně a zpracování produktů, 61-64 s.

SUKOVÁ I., 2009: Chladná plazma generovaná mikrovlnami k inaktivaci mikroorganismů. *Food Australia*, 8: 344-347 s.

ŠEBÁNEK, J.,1983: Fyziologie rostlin. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 560 s.

ŠPUNDOVÁ M., POPELKOVÁ H., ILÍK P, SKOTNICA J, NVOTNÝ R., NAUŠ J.: 2003: Ultra-structural and functional changes in the chloroplasts of detached barley leaves senescing under dark and light conditions. *J Plant Physiol* 160: 1051–1058 s.

VALENTINI R., CECCHI G., MAZZINGHI P., MUGNOZA G. S., AGATI G., BAZZANI M., DEANGELIS P., FUSI F., MATTEUCCI G., RAIMONDI V. P. 1994: Remote-sensing of chlorophyll-a fluorescence of vegetation canopies .2. Physiological significance of fluorescence signal in response to environmental stresses. Remote Sensing Of Environment 47: 29-35 s.

VAŠÁK J., 2000: Řepka. Agrospoj. Praha, 99 s.

VELÍŠEK J., 2003: Chemie potravin 3, Tábor: OSSIS, 343 s.

Zdroje obrázků:

Obrázek č. 1 - Strukturní vzorec chlorofylu
(<https://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorofyl>)

Obrázek č. 2 - Strukturní vzorec beta karotenu
(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1271&typ=html)

Obrázek č. 3 - Strukturní vzorec zeaxanthinu
(<https://cs.wikipedia.org/wiki/Zeaxantin>)

Obrázek č. 4 - Elektromagnetické vlnění
(<http://www.jandur.cz/optics/vd/vd1.htm>)

Obrázek č. 5 - Absorpční křivky fotosyntetických pigmentů
(<https://rybicky.net/forum/11998-mereni-fotosynteticky-aktivni-radiace>)

8. Přílohy

Příloha 1: Fotodokumentace

Příloha 2: Ryplová R., Šerá B., Bicanová L., Landová T., Petrášková K.,
Rákosníková T., 2015: Odezva semenáčků řepky olejky na ošetření semen
chladným plazmatem. In: Osivo a sadba XII., Vědecký a technický
seminář, 5. 2. 2015, Praha, 35-40 s

Příloha 1: Fotodokumentace

Foto č. 1: Laboratoř, v níž probíhal experiment.



Obr. č. 19 – Laboratoř, v níž probíhal experiment.

Foto č. 2: Rostliny po vyrašení děložních listů.



Obr. č. 20 - Rostliny po vyrašení děložních listů.

Foto 3: Rostliny umístěné v kultivačním boxu.



Obr. č. 21 - Rostliny umístěné v kultivačním boxu.

Foto č. 4: Zatemněné rostliny před měřením fluorescence.



Obr. č. 22 - Zatemněné rostliny před měřením fluorescence.

Foto č. 5: Pomůcky potřebné pro stanovení obsahu chlorofylů
(led a zkumavky obalené v alobalu).



Obrázek č. 23 - Led a zkumavky obalené v alobalu.

Foto č. 6: Sušení rostlin v sušárně



Obr. č. 24 - Sušení rostlin v sušárně.

Foto č. 7: Obálky s rostlinami po vysušení v exsikátoru.



Obr. č. 25 - Obálky s rostlinami po vysušení v exsikátoru

Foto č. 8: Porovnání variant (0min, 3 min a 10 min).



Obr. č. 26 - Porovnání variant (0 min, 3 min, 10 min).

Příloha 2: Ryplová R., Šerá B., Bicanová L., Landová T., Petrášková K.,

Rákosníková T., 2015: Odezva semenáčků řepky olejky na ošetření semen chladným plazmatem. In: Osivo a sadba XII., Vědecký a technický seminář, 5. 2. 2015, Praha, 35-40 s

ODEZVA SEMENÁČKŮ ŘEPKY NA OŠETŘENÍ SEMEN CHLADNÝM PLAZMATEM

The Response of Rape Seedlings to Cold Plasma Treatment of Seeds

**Renata Ryplová, Božena Šerá, Laura Bicanová, Tereza Landová,
Kamila Petrášková, Tamara Rákosníková
Katedra biologie PF JU v Českých Budějovicích**

Abstract

This study investigated the effect of cold plasma treatment of rape seeds (*Brassica napus* L. var. *napus*) on germination, initial growth and basic physiological characteristics of first leaf (net photosynthesis - P_N and total chlorophyll content). The effects of different duration (0 min, 3 min, 5 min, and 10 min) of cold plasma treatment of rape seeds were studied. Although no significant influence of cold plasma treatment on seed germination was detected, initial growth of rape seedlings was affected. The cold plasma treatment of 5 min improved initial growth, but, on the other hand, negative impact of the 3 min cold plasma treatment on initial growth was found. Net photosynthesis and total chlorophyll content of the first leaf of rape seedlings were affected by cold plasma treatment as well. The effect varied according to the duration of cold plasma treatment and also according to the first leaf on to genotype. Higher P_N values were reached by 20 days old plants of 3 min variant. At the age of 27 days significantly higher net photosynthesis values were reached by the plants of 3 min and 10 min treated variants. On the other hand, in senescent leaves, at the age of 34 days, lower P_N values were detected in 10 min variant. Higher total chlorophyll content was measured in first leaf of 21 days old plants of 3 min as well as 10 min variant, but no significant changes were detected in older plants.

Keywords: rapeseed, cold plasma, chlorophyll, net photosynthesis

Souhrn

Ošetření semen chladným plazmatem je moderní high-tech metoda s potenciálem využití v zemědělství ke zvýšení klíčivosti a produktivity hospodářských plodin. Detailní znalosti vlivu ošetření semen chladným plazmatem na fyziologické charakteristiky rostlin však doposud chybějí. Z tohoto důvodu byl proveden experiment, v jehož průběhu byl sledován vliv ošetření semen brukve řepky olejky (*Brassica napus* L. var. *napus*) na klíčivost, počáteční růst a fyziologické charakteristiky prvního listu (čistá fotosyntéza P_N a množství chlorofylu). Semena byla ošetřena chladným plazmatem po dobu 0 min, 3 min, 5 min a 10 min. Ošetření chladným plazmatem ani v jedné z pokusných variant neovlivnilo klíčivost, avšak počáteční růst ovlivněn byl. Pozitivní vliv bylo možno pozorovat u varianty 5 min, naopak u varianty 3 min se projevil efekt negativní. U rostlin kultivovaných následně ze semen v plně kontrolovaných podmínkách byl zjištěn také vliv ošetření semen na základní fyziologické charakteristiky prvního listu. Efekt ovlivnění se lišil v závislosti na délce oplazmování semen. 20. den kultivace byl zjištěn pozitivní vliv oplazmování na čistou fotosyntézu P_N u varianty 3 min, 27. den byly zjištěny vyšší hodnoty čisté fotosyntézy u varianty 3 min i 10 min. Naopak 34. den kultivace vykazovaly rostliny varianty 10 min snížené hodnoty čisté fotosyntézy. U varianty 3 min i 10 min byl také zjištěn v 21. dnu kultivace vyšší celkový obsah chlorofylu a+b, během dalšího průběhu pokusu však již odchylky v obsahu chlorofylu a+b mezi variantami oplazmovanými a variantou kontrolní zjištěny nebyly. Vliv ošetření chladným plazmatem na čistou fotosyntézu i obsah chlorofylu vykazoval variabilitu v průběhu ontogeneze prvního listu.

Klíčová slova: semena řepky, chladné plazma, chlorofyl, fotosyntéza

Úvod

Brukev řepka olejka je rostlina světového hospodářského významu a mnohostranného využití. Proto je důležité hledat moderní metody vedoucí ke zvýšení klíčivosti semen i zvýšení produkce biomasy této hospodářské plodiny. V této souvislosti je v posledních letech zkoumán vliv ošetření semen plazmatem. Plazma je ionizovaný plyn složený z iontů, elektronů a dalších částic, který vzniká odtržením elektronů z elektronového obalu atomů plynu nebo ionizací molekul. Plazma se může používat ke sterilizaci povrchů (např. Mráz et al. 2013), ale může mít uplatnění i v pěstování rostlin. Předcházející studie prokázaly pozitivní vliv na klíčivost semen a počáteční růst různých druhů rostlin (Kuchtová et al. 2013a, 2013b, Šerá et al. 2009, 2012a, 2012b, 2013). U některých rostlin byl pozorován také pozitivní vliv ošetření semen plazmatem na následnou produktivitu rostlin (Jiang et al, 2014). Doposud však chybějí hlubší studie popisující detailní odpověď fotosyntetického aparátu semenáčků na ošetření semen chladným plazmatem. Z těchto důvodů jsme provedli experiment, během něhož byl sledován vliv ošetření semen chladným plazmatem na klíčivost, rychlost fotosyntézy a obsah chlorofylu u semenáčků brukve řepky olejky.

Metodika

Semena brukve řepky olejky (*Brassica napus* L. var. *napus*) dále jen řepky, byla ošetřena chladným plazmatem. K modifikaci semen bylo použito atmosférické plazma generované mezi hliníkovými elektrodami, použitým plynem byl vzduch. Detailní popis aparatury je v práci Gavril et al. (2011). Semena byla ošetřena při různých časových expozicích (0 min, 3 min, 5 min, 10 min) v počtu 150 kusů na jednu variantu.

V průběhu experimentu byla zjišťována klíčivost a rychlost počátečního růstu rostlin jednotlivých variant a základní fyziologické charakteristiky prvního listu, konkrétně rychlost fotosyntézy a obsah fotosyntetických pigmentů.

Klíčivost a rychlost počátečního růstu

Pro testy klíčivosti byly použity plastové Petriho misky o průměru 9 cm. Na jednu Petriho misku byly umístěny 4 filtrační papíry KA0/80, 6 ml destilované vody a rozmístěno 30 semen. Na jedno ošetření bylo založeno 5 Petriho misek. Misky byly uloženy do tmy při teplotě cca 20°C.

Experiment klíčení byl založen 12. 5. 2014 a trval 19 dnů. Během pokusu byl sledován počet klíčících semen a jejich přírůstky. Poslední den byly vyrostlé rostliny sklizeny, usušeny a byla určena jejich hmotnost.

Fyziologické charakteristiky prvního listu

Kultivace rostlinného materiálu

Ze semen ošetřených chladným plazmatem byly vypěstovány rostliny v plně kontrolovaných laboratorních podmínkách. Vzhledem k omezení prostorovými možnostmi kultivačního boxu byly pro sledování fyziologických charakteristik prvního listu vybrány pouze varianty 3 min, 10 min a varianta kontrolní (0 min). Semena řepky byla vyseta do komerčně připravované zeminy (Garden Forestina, Střelské Hoštice) do plastových květináčů o rozměrech 11 x 11 x 12 cm. Kyselost půdy byla pH 4,5-6,5. Do každého květináče bylo vyseto 5 semen v pravidelných vzdálenostech od sebe. Květináče byly umístěny po pěti na plata, tak, aby na každém platě byly květináče s rostlinami téže pokusné varianty. Takto bylo připraveno vždy 10 květináčů (2 plata) od každé pokusné varianty. Rostliny byly pravidelně

zavlažovány do plat odstátou vodou z vodovodu, 0,5 l na každé plato denně, v posledním týdnu kultivace bylo zavlažováno 1 l vody denně. Rostliny byly umístěny do plně automatického kultivačního boxu Fytoscope (PSI, Brno, Česká Republika) a pěstovány pod režimem uvedeným v Tab. 1:

Tab. 1: Podmínky kultivace rostlinného materiálu

Fáze	Teplota (°C)	Relativní vlhkost (%)	Ozářenost ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Rozednívání 2 hod.	17 → 24	80 → 65	0 → 286
Den 10 hod.	24	65	286
Stmívání 2 hod.	24 → 17	65 → 80	286 → 0
Noc 10 hod.	17	80	0

Měření fotosyntetické výměny plynů

Počínaje 20. dnem kultivace byla v pravidelných týdenních intervalech měřena čistá fotosyntéza (P_N) prvního vyvinutého listu pomocí přístroje LI-6400 XT (LICOR Inc., Lincoln, NE, USA). Měření probíhalo přímo v kultivačním boxu, při denním režimu nastaveného programu (ozáření 286 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). List řepky byl uzavřen do měřicí kyvety přístroje, v níž byly upraveny podmínky měření tímto způsobem: CO_2 400 ppm, rel. vlhkost 56 – 60%, teplota listu 23 °C. Před měřením byl list ponechán v kyvetě cca 10 – 15 min, do ustálení hodnot měřených parametrů. Tímto způsobem bylo provedeno vždy 10 měření náhodně vybraných rostlin od každé pokusné varianty. Měření probíhalo 20., 27. a 34. den kultivace. Další měření již nebylo možné na prvním listu provádět z důvodu jeho senescence.

Stanovení fotosyntetických pigmentů

Následující den po měření fotosyntetické výměny plynů (tj. 21., 28. a 35. den kultivace) byla prováděna analýza fotosyntetických pigmentů. Z prvního listu byly pomocí korkovrtu vytáaty terčíky o známém obsahu, z nichž byly pigmenty extrahovány 80 % acetonem. Množství chlorofylu pak bylo zjišťováno spektrofotometricky podle Lichtenthalera a Wellburna (1983), pomocí spektrofotometru UV VIS 250 (Shimadzu, Japonsko).

Statistická analýza

Získaná data byla zpracována v programech EXCEL a STATISTICA. Data byla normalizována logaritmickou transformací a následně statisticky vyhodnocena jedno faktorovou analýzou variance (one-way ANOVA) a poté HSD Tukey testem, vše na hladině významnosti 0,05.

Výsledky a diskuse

Klíčivost a rychlost počátečního růstu

Klíčivost semen řepky nebyla použitým ošetřením ovlivněna. Naopak v růstových parametrech semenáčků byly nalezeny signifikantní rozdíly vzhledem ke kontrolnímu vzorku

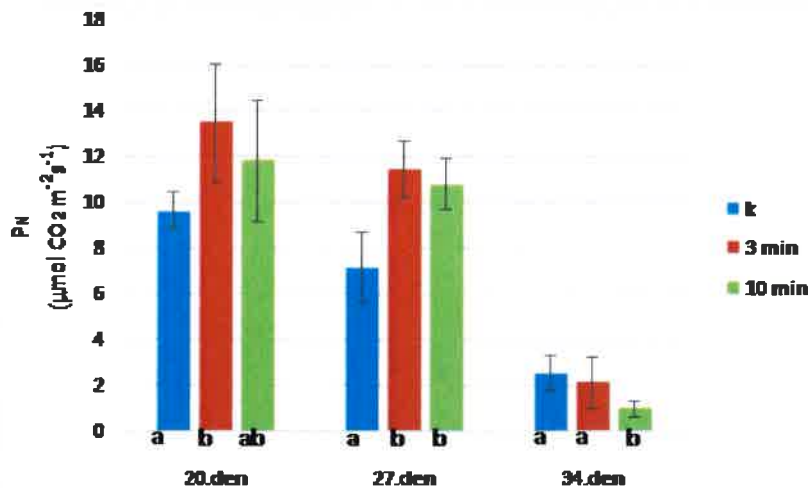
(Tab. 2). Podle porovnání všech měřených charakteristik lze konstatovat, že nejlépe rostly rostliny ze semen ozářených chladným plazmatem po dobu 5 min. U této varianty byl zjištěn pozitivní trend v délkách nadzemních a podzemních orgánů a v množství biomasy. Pozitivní vliv byl zaznamenán především u hmotnosti čerstvých podzemních částí semenáčků po ošetření plazmatem po dobu 5 min v porovnání s kontrolním vzorkem. Naopak nejhůře rostly rostliny řepky ze semen plazmovaných po dobu 3 min. U těchto rostlin byly hodnoty všech sledovaných charakteristik pod hodnotami kontrolního vzorku.

Tab. 2: Charakteristiky klíčení a počátečního růstu oplazmovaných semen řepky olejky z posledního dne pokusu. Označení R znamená podzemní část rostliny a S nadzemní část rostliny. Různá písmena ve sloupci HSD uvádí významné rozdíly zjištěné v testu Tukey ($P < 0.05$) při porovnávání každý s každým. Tučně jsou vyznačené významné rozdíly u ošetřených semen vzhledem k příslušné kontrole.

	klíčení		délka R		délka S		čerstvá biomasa		čerstvá biomasa		sušina		sušina	
	(%)	HSD	(%)	HSD	(%)	HSD	(%)	HSD	(%)	HSD	(%)	HSD	(%)	HSD
kontrola	100	a	100	a	100	a	100	a	100	a	100	a	100	a
3 min	94	a	74	b	86	b	74	a	57	b	72	b	92	a
5 min	97	a	108	a	106	a	328	b	128	a	91	ab	104	a
10 min	102	a	97	ab	96	ab	148	a	119	a	96	a	93	a

Fotosyntetická asimilace CO₂ – čistá fotosyntéza P_N

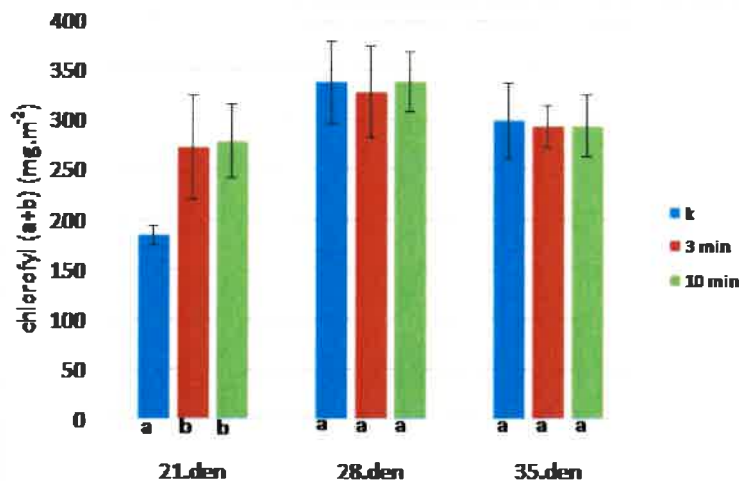
Jednotlivé varianty vykazovaly statisticky významné rozdíly v čisté fotosyntéze prvního listu během celé doby jeho vývoje (Graf 1). V prvním týdnu měření, tj. 20. den kultivace, byla nejvyšší čistá fotosyntéza prvního listu u semenáčků vyrostlých ze semen ošetřených chladným plazmatem po dobu 3 min, než u rostlin kontrolních (o cca 40%). Semenáčky řepky ze semen ošetřených chladným plazmatem po dobu 10 min se v čisté fotosyntéze od ostatních dvou variant významně neodlišovaly. Ve druhém týdnu měření (27. den kultivace) došlo u všech variant pokusných rostlin k mírnému poklesu čisté fotosyntézy prvního listu, zřejmě v souvislosti s jeho probíhající senescencí. I tentokrát byla čistá fotosyntéza semenáčků varianty 3 min výrazně vyšší než u varianty kontrolní (cca 59%). Ve 27. dnu kultivace byla zjištěna výrazně vyšší čistá fotosyntéza také u varianty 10 min (nárůst oproti kontrolní variantě cca 50%), přičemž nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi hodnotami čisté fotosyntézy prvního listu obou ovlivněných variant navzájem. Poslední měření (34. den kultivace) nízké hodnoty čisté fotosyntézy všech zkoumaných variant naznačují značný stupeň senescence. V tomto měření byl zjištěn nejvyšší pokles čisté fotosyntézy u rostlin varianty 10 min, kdy průměrná hodnota čisté fotosyntézy dosahovala pouhých cca 39% hodnoty varianty kontrolní.



Graf 1: Vývoj průměrné rychlosti čisté fotosyntézy (P_N) prvního listu v průběhu experimentu, 20., 27. 34. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($P < 0.05$) při porovnávání každý s každým.

Obsah chlorofylu a+b

U obou oplazmovaných variant pokusných rostlin došlo k významnému zvýšení (cca o 20%) obsahu celkového chlorofylu prvního listu v prvním týdnu měření, tj. 21. den kultivace, (Graf 2). Ve 28. a 35. dnu kultivace již nebyly shledány žádné statisticky významné změny v obsahu celkového chlorofylu v prvním listu mezi jednotlivými zkoumanými variantami. Během vývoje v průběhu experimentu došlo u všech variant v druhém týdnu měření k mírnému nárůstu a ve třetím týdnu měření k mírnému poklesu obsahu celkového chlorofylu v prvním listu, zřejmě v souvislosti s ontogenetickými změnami listu. Pozitivní vliv ošetření semen chladným plazmatem na obsah chlorofylu byl již v minulosti potvrzen u rostlin pšenice (Jiang et al., 2014).



Graf 2: Změny v obsahu chlorofylu (a+b) na m² listové plochy během vývoje prvního listu, 21., 28. a 35. den kultivace. Chybové úsečky značí směrodatné odchylky. Různá písmena u jednotlivých sloupců v grafu značí významné rozdíly dle testu Tukey ($P < 0.05$) při porovnávání každý s každým.

Oplazmování semen po dobu 3 min mělo zřejmě inhibiční vliv na některé parametry počátečního růstu klíčnicích rostlin do 19. dne, avšak již 20. den byly zjištěny u této varianty vyšší hodnoty čisté fotosyntézy i obsahu celkového chlorofylu. Oplazmování semen po dobu 10 minut neovlivnilo klíčivost ani počáteční růst, v 21. dnu kultivace se však projevilo nárůstem obsahu celkového chlorofylu. Pozitivní vliv oplazmování semen po dobu 10 minut na rychlost fotosyntézy bylo možno pozorovat až 27. den kultivace, avšak u senescenčních listů v 34. dnu kultivace byla čistá fotosyntéza rostlin této varianty naopak nejnižší.

Celkově lze tedy konstatovat, že byl zaznamenán vliv plazmování semen řepky na fyziologické a růstové parametry semenáčků. Efekt ovlivnění se lišil v závislosti na délce trvání ošetření semen chladným plazmatem a vykazoval výrazné změny v průběhu ontogeneze prvního listu. K vysvětlení této variability je potřeba dalšího výzkumu na úrovni fyziologických i bio-chemických charakteristik semenáčků.

Závěr:

Ošetření semen chladným plazmatem ovlivnilo růstové a fyziologické charakteristiky v prvních fázích růstu rostlin brukve řepky olejky. Ovlivněny byly charakteristiky počátečního růstu mladých semenáčků (délky nadzemních a podzemních částí semenáčků, hmotnost jejich čerstvé biomasy a hmotnost sušiny kořenů), rychlost fotosyntézy i obsah chlorofylu v prvním listu starších semenáčků. Vliv ošetření semen chladným plazmatem se lišil u jednotlivých pokusných variant v závislosti na délce expozice semen vůči chladnému plazmatu.

Literatura

GAVRIL, B., HNATIUC, E., SERA, B., HRUSKOVA, I., PADUREANU, S., HĂISAN, C., (2011): Possibilities of performing treatments on seeds using cold plasma discharges. In: XVIIth Symposium on Physics of Switching Arc, pp. 189-192, Brno, University of Technology.

HENSELOVA M., SLOVAKOVA L., MARTINKA M. & ZAHORANOVA A. (2012): Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. *Biologia* 67/3: 490—497

JIANG J., HE X., LI L., LI J., SHAO H., XU Q., YE R., DONG Y. (2014): Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. *Plasma Science and Technology*, 16 (1), 54 – 58.

KUCHTOVA P., SERA B., GAVRIL B., SERY M. & HNATIC E. (2013a): Gliding arc plasma modified number of capsules in poppy seed. In: European Biotechnology Congress, Comenius Univ, Bratislava, Slovakia, May 16-18, 2013, Current Opinion in Biotechnology, 24(1): S133-S133. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.05.425

KUCHTOVA P., SERA B., HAJKOVA M., KAZDA J., DVORAK P., GAVRIL B., SERY M., MICAL, HNATIUC E. & SPATENKA P. (2013b): Response of Poppy Seed on Non-thermal Plasma Treatment. In: 11th Scientific and Technical Seminar on Seed and Seedlings, Czech Univ Life Sci Prague (CULS), Prague, Czech Republic, Feb 07, 2013, Seed and Seedlings, 53-58.

LICHTENTHALER H. K., WELLBURN A. R., 1983: Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591 – 592.

MRAZ, I., BERAN, P., SERA, B., GAVRIL, B., HNATIUC, E. (2014): Effect of low-temperature plasma treatment on the growth and reproduction rate of some plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1): 63-67.

SERA B., GAJDOVA I., SERY M. & SPATENKA P. (2013): New physicochemical treatment method of Poppy seeds for agriculture and food industries. – *Plasma Science and Technology*, 15(9):935-938. DOI: 10.1088/1009-0630/15/9/19.

SERA B., GAJDOVA I., GAVRIL B., HNATIUC E., SERY M., SPATENKA P. (2012a): Hemp (*Cannabis sativa L.*) seeds after plasma treatment. Proceedings of the International Conference on Optimisation of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM, art. no. 6231981, 1371-1374.

SERA B., GAJDOVA I., CERNAK M., GAVRIL B., HNATIUC E., KOVACIK D., KRIHA V., SLAMA J., SERY M., SPATENKA P. (2012b): How various plasma sources may effect seed germination and growth. Proceedings of the International Conference on Optimisation of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM, art. no. 6231880, 1365-1370.

SERA B., SERY M., STRANAK V., SPATENKA P. & TICHY M. (2009):
Does cold plasma chase the seed dormancy? Study on seeds of Lambs Quarters
(*Chenopodium album* agg.). - Plasma Science and Technology, 11(6): 750-754.

Contact Address: RNDr. Renata Ryplová, Ph.D. Katedra biologie, PF JU
v Českých Budějovicích, Jeronýmova 10, 371 15 České Budějovice, E-mail:
ryplova@pf.jcu.cz