

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Pedagogická fakulta
Katedra biologie



Diplomová práce

**Vliv vysoké teploty a ozáření
na množství a poměrné zastoupení
fotosyntetických pigmentů rostlin**

Vypracovala: Barbora Trojáčková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Renata Ryplová, Dr.

České Budějovice, Prosinec 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a veškerá použitá literatura a jiné prameny jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích dne 20. 12. 2006

.....
Barbora Trojáčková

Úvodem bych ráda poděkovala vedoucí práce Mgr. Renatě Ryplové a
Mgr. Rostislavu Černému, CSc. za odborné rady a vedení při vypracování celé práce.

Anotace

Diplomová práce se zabývá poměrným zastoupením fotosyntetických pigmentů v rostlinách pšenice seté (*Triticum aestivum*). Rostliny byly pěstovány při dvou různých teplotách 20 °C a 30 °C a dvou různých ozářenítech. Kultivace probíhala vždy jeden měsíc a vzorky byly odebrány po 5 rostlinách z každého boxu, ve kterém byly rozdílné kultivační podmínky. Vzorky byly zváženy a sušeny, z těchto hodnot byly získány data pro růstové křivky. Pro získání hodnot fotosyntetických pigmentů byla vybrána metoda spektrofotometrická. Byly naměřeny hodnoty absorbancí pro chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy. Výsledky byly zpracovány do tabulek a grafů, ze kterých je zřejmý průběh množství pigmentů během kultivace. V práci se potvrdila hypotéza, že se rostliny přizpůsobují stresujícímu prostředí.

Annotation

This thesis concerns about proportional content of photosynthetic pigments in plants of wheat (*Triticum aestivum*). The plants were cultivated at two different temperatures (20 °C and 30 °C) and in two different irradiations. Each cultivation took one month. Five plants per sample were taken from each cultivation box with different conditions. The samples were weighted and dehydrated to obtain data for growth curves. Amount of photosynthetic pigments was measured by spectrophotometry. Absorption for chlorophyll *a*, *b* and carotenoids was measured. These results were processed into tables and graphs where we can see that the trend of amount of photosynthetic pigments is obvious. This thesis confirms the hypothesis, that plants can adapt stress environment.

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární přehled	7
2. 1. Stres	7
2. 2. Teplota	7
2. 3. Teplotní aklimatizace	9
2. 4. Vysokoteplotní aklimatizace	9
2. 5. Vysoká teplota	10
2. 6. Nízká teplota	10
2. 7. Ozáření	10
2. 8. Efekty ozáření	12
2. 9. Odolnost při vysokém ozáření	13
2. 10. Fotosyntetické struktury	13
2. 10. 1. Listy	13
2. 10. 2. Plastidy	13
2. 10. 2. 1. Klasifikace typů plastidů	14
2. 11. Fotosyntetické pigmenty	15
2. 12. Světlosběrná a ochranná funkce karotenoidů ve fotosyntetických membránách	16
2. 12. 1. Světlosběrná funkce karotenoidů	17
2. 12. 2. Ochranná funkce karotenoidů	19
2. 13. Světlosběrné komplexy	20
2.14. Denní kolísání ve složení chlorofylu <i>a/b</i> v LHC 2	22
2. 15. Fotosyntéza	23
3. Materiál a metodika	25
3. 1. Kultivace	25
3. 1. 1. Složení živného roztoku	26
3. 2. Odběr a zpracování vzorků	26
3. 3. Analýza fotosyntetických pigmentů	27
3. 4. Metody stanovení fotosyntetických barviv	27
3. 4. 1. Kolorimetrické stanovení	28
3. 4. 2. Chromatografické stanovení	28
3. 4. 3. Spektrofotometrické stanovení	29
4. Výsledky	31
4. 1. Změny obsahu fotosyntetických pigmentů	33
5. Grafy a Tabulky	39
6. Diskuse	53
7. Závěr	55
8. Seznam použité literatury	56

1. Úvod

Tato práce se zabývá vlivem vysoké teploty a ozáření na množství a poměrné zastoupení fotosyntetických pigmentů rostlin.

V současné době je sledování reakcí rostlin na podmínky růstu ve vyšších teplotách a vyšší intenzitě ozáření velmi aktuální vzhledem k procesu oteplování klimatu.

Cílem diplomové práce je zjistit vliv teploty a intenzity ozáření, tedy stresu, na rostliny pšenice seté (*Triticum aestivum*), zejména se zaměřením na změnu obsahu a zastoupení jednotlivých fotosyntetických pigmentů. Předpokládá se, že rostliny si jako adaptační reakci na zvýšenou teplotu a ozáření vyvinou jakýsi obranný systém, jehož součástí budou i změny v zastoupení fotosyntetických pigmentů.

2. Literární přehled

2. 1. Stres

Stresem rozumíme všechny od normy se odchyloující situace, které organismus nadměrně zatěžují. Každý organismus reaguje na stres specificky. Rostliny jsou schopny se se stresem vyrovnat mnoha mechanismy. Rostlinná odezva na stres se skládá z několika kroků, ve kterých se počáteční schopnost rostliny bránit se snižuje (alarm) a později jsou aktivovány restituční mechanismy, kontrolující následnou obnovu normálního rostlinného odporu (Brunold a kol., 1996). Charakter a průběh takovýchto změn je rozdílný podle stresorů. Záleží však také na fyziologickém stavu buňky nebo celé rostliny a především na intenzitě stresu a jeho trvání. Při příliš dlouhém trvání stresových podmínek, nebo když restituční mechanismy nejsou dost výkonné, rostlina pod vlivem stresových podmínek umírá.

Nejčastějšími stresory, které působí nepříznivě nebo dokonce zhoubně na rostliny, jsou chlad, mráz, nízké teploty, nízká vlhkost, anaerobióza, nepřiměřené množství chemických sloučenin nebo znečištění vzduchu. Za stres jsou tedy považovány takové podmínky, které nejsou pro rostlinu optimální (Brunold a kol., 1996).

2. 2. Teplota

Každá metabolická reakce je charakterizována teplotním koeficientem, který uvádí o kolik se změní rychlost reakce, změníme-li teplotu. Teplotní optima jsou druhově specifická. U vyšších rostlin leží teplotní optima většinou při teplotě 28–32 °C a teploty nad 35 °C již začínají působit škodlivě (Hess, 1983).

Rostliny jsou adaptovány na různé teplotní podmínky. Je to především vlivem různého genetického vybavení mezi rostlinnými druhy, ale významnou roli hraje také životní historie konkrétní rostliny. Obecně musí být rostliny schopny přizpůsobit se různým denním a ročním fluktuacím teploty. Teplotní fluktuace mohou mít přímý vliv na fotosyntetickou redukci uhlíku, syntézu cukrů a transport elektronů, který je limitován počtem mobilních přenašečů elektronů, plastochinonu a plastocyaninu (Brunold a kol., 1996).

Se stoupající teplotou rychlost fotosyntézy roste, při vyšších teplotách se přírůstky rychlosti zmenšují, křivka vytvoří maximum a nakonec začne rychlost fotosyntézy klesat. Pokles začne již při teplotách, které nepoškozují fotosyntetický aparát, ale při ještě vyšších teplotách je významnou složkou poklesu také narušení fotosyntetického aparátu (Burke, 1990). Tvar křivky se také mění s časem, po který je fotosyntetická soustava vystavena vysoké teplotě. Křivka závislosti rychlosti fotosyntézy a teploty nebyla dosud jednoznačně vysvětlena (Šetlík a kol., 1998). Se stoupající teplotou začne být fotosyntéza limitována pochody, které jsou méně závislé na teplotě než biochemické reakce. Takovým pochodem je např. difuze. Rychlostí difuze jsou omezeny nejprve pohyby membránových přenašečů elektronů: chinonů uvnitř membrány, cytochromu c nebo plastocyaninu v roztoku při jednom povrchu membrány a feredoxinu při druhém povrchu. Difuze zprostředkuje dále spojení mezi membránou a Calvinovým cyklem, pokud jde o dodávku $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP. Difuzí se do chloroplastu dostává konečně také CO_2 , jenž může být při vyšších teplotách hlavním činitelem omezujícím rychlost celého souboru reakcí (Šetlík a kol., 1998).

Se stoupající teplotou se urychlují pochody vedoucí k výměně plynů v opačném směru. U C3 rostlin se tak silně uplatňuje fotorespirace, jelikož poměr oxygenázové aktivity Rubisco k aktivitě karboxylační roste s teplotou. S teplotou ale také roste rychlost mitochondriálního dýchání a ten podíl fotosyntézou přeměněné energie, který se spolu s dýcháním využije na syntetické udržovací a opravné pochody. Rychlost těchto pochodů stoupá s teplotou i poté, co fotosyntéza narazí na difuzní omezení. U C4 rostlin nepřítomnost fotorespirace a vysoká karboxylační účinnost umožňují těmto rostlinám asimilovat CO_2 s dobrou účinností při vyšších teplotách. Dávají jim výhodu pro růst na silně osluněných stanovištích také nepřímo: vysoká karboxylační účinnost dovoluje účinnou fotosyntézu i při nízkých koncentracích CO_2 v mezibuněčných prostorech listu, tedy i při částečně přivřených průduších. Tím se omezuje výpar vody transpirací a tak usnadňuje existence na horkých slunných stanovištích. Ve stepích a (polo)pouštích proto často dominují právě C4 rostliny (Burke, 1990).

2. 3. Teplotní aklimatizace

Teplotní aklimatizací rozumíme rozvoj tolerance na poškození způsobené jak nízkou, tak vysokou teplotou. Studie, které zkoumají typy poranění způsobené teplotním stresem, pomáhají určit procesy či strukturní změny v rostlině, při kterých se rostlina adaptuje. Důležité u těchto procesů a rozvoje strukturních změn je doba expozice rostliny. Efekty teploty na aklimatizaci můžeme zjistit několika typy pokusů (Šetlík, 1972):

- 1) rostliny jsou vystaveny rychlým či pomalým změnám teploty,
- 2) jednotlivé rostliny jednoho druhu rostou ve dvou rozdílných prostředích,
- 3) druhy z různých teplotně odlišných regionů jsou dány do prostředí o stejných podmínkách.

V případě této diplomové práce byla použita metoda číslo 2, tedy že rostliny pšenice seté byly vystaveny dvěma rozdílným teplotám a rozdílnému ozáření.

U této metody se dá předpokládat, že vysoká teplota bude redukovat fotosyntetický řetězec a současně bude u rostliny vzrůstat dýchání, což obnáší, že fotosyntéza v asimilačních procesech bude redukována. Rostliny, které jsou adaptovány na chladnější prostředí, mají mnohem vyšší fotosyntetickou kapacitu při nižších teplotách oproti druhům zvyklým na teplé prostředí, např. pouště (Berry a Björkman, 1980). Přizpůsobení se teplotním změnám může zahrnovat dva typy změn a to přizpůsobení se nízkým nebo vysokým teplotám. Pro tuto práci má význam aklimatizace na vysokou teplotu. Vysokoteplotní aklimatizace vychází z rostoucí stability jedné nebo několika chloroplastových komponent. Výzkumy mnoha enzymů ukázaly, že ribulosa - bisfosfát - karboxyláza a fruktosa - difosfát - karboxyláza jsou obvykle při fixaci oxidu uhličitého a aktivitě fotosystému II (PSII) limitovány kroky spojenými s cyklem metabolismu uhlíku při nižší teplotě. Teplotní stabilita thylakoidní membrány je klíčovým komponentem v aklimatizaci na vysokou teplotu (Björkman a kol., 1963).

2. 4. Vysokoteplotní aklimatizace

Fotosyntéza je jedním z procesů, který je velice citlivý na změny teploty a má velký vliv na efektivní růst a potenciál (Berry a Björkman, 1980). Podle Björkmana (1980) je teplotní stabilita chloroplastů založená na struktuře thylakoidní membrány, naopak Teeri (1980),

uvádí, že některé mechanismy teplotní adaptace jsou závislé na syntéze proteinů či jejich funkčních změnách.

2. 5. Vysoká teplota

Inhibice fotosyntézy při vysoké teplotě je způsobena deaktivací PS II, která je spojována s denaturací polypeptidů thylakoidní membrány, disociací světlosběrného komplexu 2 (Light Harvesting Complex 2, LHC 2) z PS II a inhibicí kyslík vyvíjecího komplexu způsobenou uvolněním Mn^{2+} iontů. Obecně jsou PS II komponenty více termolabilní než PS I komponenty. Při vysoké teplotě narůstá také fotorespirace a klesá kvantový výtěžek asimilace CO_2 (Weiss, Berry, 1998). Tento pokles fotosyntézy je reverzibilní a zdá se, že je způsoben zpětnovazebnou regulací Rubisco. Aktivita Rubisco je vysoká v oblasti 20–30 °C, ale při teplotě 30–45 °C klesá o 50 % (Weiss, Berry, 1998). Tolerance na teplo je limitována teplotní stabilitou rozpustných enzymů a membránových struktur. Vysokou teplotou je indukována inhibice produkce O_2 , asimilace CO_2 a fotofosforylace. Ta způsobí pokles množství produkovaného ATP, které je potřebné při asimilaci uhlíku v temnostní fázi fotosyntézy.

2. 6. Nízká teplota

Inhibice fotosyntézy způsobená nízkou teplotou odráží především změny na úrovni chloroplastů. Nízká teplota vyvolává nárůst fluorescence z chlorofylu *a* a naopak pokles kvantového výtěžku elektronového transportu PS II. Akumulují se redukováné elektronové přenašeče, což zvyšuje pravděpodobnost poškození PSII. Také PSI může být původcem fotoinhibice při nízké teplotě u druhů citlivých na chlad (Larcher, 1988).

2. 7. Ozáření

Sluneční záření dopadající na jednotku zemského povrchu za jednotku času je velmi proměnlivá hodnota. Protože se Země otáčí kolem své osy s denní periodou a obíhá kolem slunce s roční periodou, osciluje ozářenost zemského povrchu na kterémkoli místě s oběma těmito periodami. Proto denní úhrny ozáření v daném ročním období nebo za

celý rok můžeme charakterizovat jen průměrnými čísly, která mnohdy nemají skutečný význam. Maximální hodnoty i roční průměry denního ozáření se mění podle polohy místa na zemské kouli pravidelně se zeměpisnou šířkou a k tomu i nepravidelně podle klimatických podmínek, především oblačnosti (Šetlík a kol., 1998).

Fotosyntéza vyžaduje pro svou práci určitou minimální hodnotu ozáření. Také enzym Rubisco, uplatňující se v tzv. temnostní fázi fotosyntézy, je aktivován teprve po osvětlení fotosynteticky aktivní tkáně. Aktivita aktivázy Rubisco je zvyšována při vzrůstu ozáření (Procházka a kol., 1998).

Pokud je překročena minimální hodnota ozáření, ale hustota toku fotonů je malá, uplatňuje se nejvíce regulační mechanismus přechodu LHC ze stavu 1 do stavu 2, který optimalizuje využití excitační energie mezi PSI a PSII, což je důležité právě při nízké, limitující hodnotě světla (Krause, Weiss, 1991).

Se zvyšující se hodnotou toku fotonů roste účinnost fotosyntézy, ale zároveň roste i podíl absorbované energie, která není využita pro fotosyntézu. Proto zde můžeme zaznamenat nárůst nefotochemické disipace energie. Dochází k fotoinhibici fotosyntézy. Excitační energie se mění na teplo. Při určité specifické intenzitě světla fotosyntéza dosáhne svého maxima (saturuje se) a ani při větším osvětlení již neroste (Krause, Weiss, 1991).

Matematický popis závislosti rychlosti pochodu a nasycenosti zářením je shodný s rovnicí enzymatické reakce Michaelise a Mentenové (1), tj.,

$$P = \frac{P_{\max} * I}{I + K_s} \quad (1)$$

kde P je rychlost pochodu, $P_{\max}$ jeho nejvyšší možná rychlost (při vysoké ozáření), I je ozáření a K_s konstanta obdobná konstantě K_m z rovnice Michaelise a Mentenové. K_m je rovna koncentraci substrátu, při níž enzymatická reakce dosahuje poloviny maximální rychlosti, tedy K_s je obdobně ozáření, při níž rychlost fotosyntézy P je polovinou nejvyšší možné rychlosti $P_{\max}$ (Šetlík a kol., 1998).

Při úplné fotosyntéze v neporušených chloroplastech, v buňkách fotosyntetických mikroorganismů a ve fotosyntetických pletivech rostlin omezuje maximální rychlost fotosyntézy při vysokých ozářeních také soubor stromatálních reakcí vazby a redukce CO_2 a rychlost difuze CO_2 z vnějšího prostředí až ke karboxylačnímu enzymu. Kinetická

křivka je pak určena rychlostními konstantami a maximálními rychlostmi všech reakcí, které pochod skládají. Při vyšších ozářeních je patrné, že účinnost využití energie fotosyntézou není lineární a se stoupající ozářeností stále klesá. Nakonec přestane fotosyntéza stoupat, je nasycena zářením. V oblasti nasycení klesá účinnost fotosyntézy nepřímo úměrně stoupající ozářenosti (Šetlík a kol., 1998).

2. 8. Efekty ozáření

Výkonnost fotosyntézy u rostlin při vysoké intenzitě ozáření není závislá na obsahu chlorofylu nebo na absorpci a vychytávání světelných kvant jako u stínomilných rostlin, ale spíše na vztahu mezi fotoinhibicí a stupněm rozpadu chlorofylu. Šíře fotoinhibice je závislá na intenzitě a trvání expozice na vysokém stupni ozáření (Baker, 1996). Fotoinhibice je způsobena přílišným přenosem kvant produkovaných během světelné reakce pro reakční centra, místo aby se přeměnila v teplo či záření. Rozmanité množství kyslíku a volných radikálů ničí reakční centra mimo receptory, které zvyšují redukční sílu. Obvyklými receptory jsou procesy fixace CO_2 zahrnující ribulosa-bisfosfát-karboxylasu, která využívá světelná kvanta. Stínomilné rostliny mají nižší úroveň Rubisco oproti světlomilným rostlinám a především C_3 rostliny mají vyšší enzymatickou úroveň. Světlomilné rostliny s C_4 metabolismem jsou schopny využívat fotosyntetickou energii mnohem efektivněji i bez růstu Rubisco (Burke a kol., 1990).

Obvykle stínomilné rostliny mají nižší kapacitu elektronového transportu, nižší obsah cytochromů, plastochinonu, feredoxinu a ATP syntetázy. Poškození rostliny vysokou intenzitou záření je závislé na koncentraci CO_2 a O_2 sloužící jako receptory zaznamenávající zvýšení redukční síly, která zde vzniká. Nižší teploty způsobují redukci fixace CO_2 a dále snížení dostupnosti receptorů. Modifikace listů, kterou ovlivňuje fotosyntéza, bude mít vliv na odpověď rostliny při stresu z ozáření. Růst a rozvoj listů se mění díky intenzitě záření a to tak, že dochází k prodlužování palisádových buněk a růstu jejich počtu (Šetlík a kol., 1998).

2. 9. Odolnost při vysokém ozáření

Stínomilné rostliny mají pouze omezenou kapacitu na úpravu po vystavení vysokému záření, obvykle jsou poškozeny, popřípadě umírají. Na druhou stranu u světlomilných rostlin výrazně vzrostla kapacita pro světelné nasycení fotosyntézy a to:

- 1) zvýšením úrovně enzymatického metabolismu uhlíku,
- 2) růstem fotosyntetického elektron-transportního řetězce,
- 3) růstem kapacity CO₂ transportu.

Odolnost na stres z vysoké ozářenosti způsobuje např. vosk, kutikula a materiály buněčné stěny v listech, které zvyšují odraz světla z listů (Lichtenthaler a kol., 1998).

2. 10. Fotosyntetické struktury

2. 10. 1. Listy

Listy jsou nejvýznamnější morfologickou strukturou rostlin adaptovanou pro zabezpečení celého komplexu procesů souhrnně označovaných jako fotosyntéza.

V celé říši rostlinných organismů představují listy rostlin orgány velmi specifické. Jsou to většinou tenké ploché útvary, které již od pohledu naznačují vývojové přizpůsobení k maximální absorpci slunečního záření a k maximálnímu zkrácení transportních drah při výměně plynů mezi vnitřním prostorem listu a okolní atmosférou (Procházka a kol., 1998).

2. 10. 2. Plastidy

Plastidy byly poprvé pozorovány v 17.století Grewem. Ten objevil, že zelená hmota v listech má povahu partikulí. V roce 1883 Schimper zavedl pojem plastid. V 60. letech 20. století se zjistilo, že jsou chloroplasty schopny fotosyntézy, tzn. uvolňovat kyslík, syntetizovat ATP a vázat CO₂. Předpokladem vzniku chloroplastů je tzv. endosymbiotická hypotéza.

„Fotosynteticky aktivní plastidy vznikly nitrobuněčnou symbiózou fotoautotrofních mikroorganismů s mikroorganismy heterotrofními.“ Předpokládá se, že k endosymbiotickému vzniku plastidů došlo v evoluci opakovaně (Hooper, 1984).

2. 10. 2. 1. Klasifikace typů plastidů

Typy plastidů podle barvy:

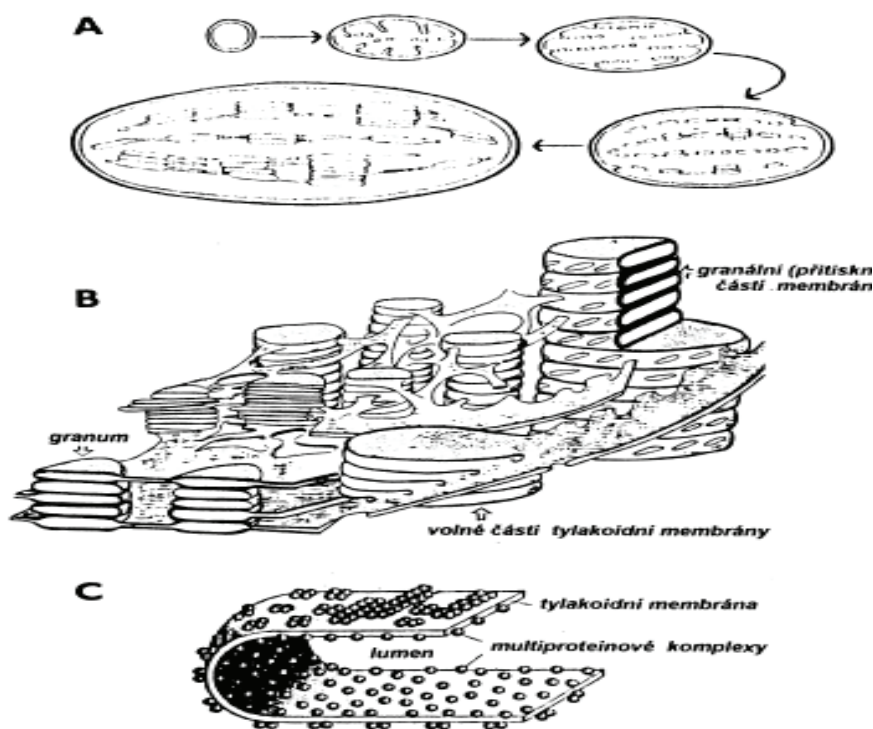
1. barevné – chromoplasty *sensu lato* – fotosynteticky aktivní jsou chloroplasty a fotosynteticky neaktivní chromoplasty *sensu stricto*.
2. bezbarvé – leukoplasty – většinou se dále dělí podle zásobních látek, které se v nich ukládají, např. amyloplasty (obsahují škrob), proteinoplasty (hromadí bílkoviny) a elaioplasty (hromadí tuky) (Beneš, 1994).

U vyšších rostlin jsou chloroplasty stavebně i funkčně podobné, narozdíl od chloroplastů řas. Mají tvar převážně čočkovitý, velikosti 5–10 μm , s ohledem na intenzitu záření. Na světle se zplošťují a jejich objem se zmenšuje, ve tmě nabývají skoro kulovitěho tvaru (Voet a kol., 1995).

Na povrchu chloroplastů je dvojité membrány, jejíž funkcí je nejenom udržení stálého tvaru plastidu, ale i tvorba systémů thylakoidů, ochrana chlorofylů a syntéza thylakoidních lipidů. Tloušťka každé z membrán je 6 až 10 nm. Mezi nimi je periplastidový prostor.

Od vnitřní obalové membrány jsou odvozeny dva membránové systémy chloroplastů: periferní retikulum a systém thylakoidů.

Periferní retikulum je typické u C_4 rostlin. Jde o síťovitý systém kanálků propustujících zejména periferii chloroplastů. Vyskytuje se hlavně v buňkách mezofylu.



Obr.1. Schéma vzniku thylakoidů z vnitřní membrány proplastidu (A), bližší pohled na část soustavy thylakoidů (B) a na výsek z jednoho thylakoidu (C).

Základní jednotkou struktury chloroplastu jsou thylakoidy (Beneš, 1994).

Thylakoidní membrána je klíčovou strukturou fotosyntézy. Ty se vyskytují jako thylakoidy integrální (přítisknuté, naskládané) nebo thylakoidy stromatu (nepřítisknuté, volné).

Bílkoviny tvoří 60–65 % hmotnosti thylakoidních membrán, které tvoří komplexy především s fotosyntetickými barvivy, z nichž významnou složku tvoří chlorofyly. Zbylých 40–35 % tvoří převážně nenasycené mastné kyseliny (Procházka a kol., 1998).

2. 11. Fotosyntetické pigmenty

K fotosyntetickým pigmentům patří chlorofyly, fykobiliny a karotenoidy.

Chlorofyl je hlavním fotoreceptorem ve fotosyntéze (Procházka a kol., 1998). Chlorofyly *a* a *b* jsou nejhojnějšími fotosyntetickými pigmenty v suchozemských rostlinách a u zelených řas. Základem struktury jsou porfiryty, což jsou tetrapyroly vzájemně spojené metinovými můstky ($-\text{CH}=\text{}$) a s komplexně vázaným kationem Mg^{2+} . Hydrofilní charakter porfýritu je do značné míry překryt lipofilním charakterem fytolu, jímž je esterifikován zbytek kyseliny propionové na 7. atomu uhlíku. Rozdíl mezi chlorofylem *a* a chlorofylem *b* je tvořen pouze rozdílnými skupinami na 3. atomu uhlíku. Molekuly chlorofylů mají nepolární charakter, proto je lze extrahovat z rostlinného materiálu organickými rozpouštědly, především acetonem. Molekula chlorofylu se během pohlcení záření oxiduje a zároveň se vrací do základního energetického stavu a přijetím elektronu posléze přechází do počátečního stavu. Chlorofyl se tedy chová jako oxidoredukční systém, který může vyměňovat elektrony jednak v základním, jednak v excitovaném stavu, přičemž počáteční energie těchto stavů se liší. Rozdíl hodnot tvoří energie získaná absorpcí světelného kvanta. V rostlinné buňce nejsou chlorofyly volné, ale tvoří komplexy se specifickými bílkovinami. Chlorofyl *a* tvoří především reakční centra fotosystémů a je hlavní součástí světlosběrných komplexů. Je nezbytný pro vlastní přeměnu energie ve fotosyntéze (Šetlík a kol., 1998).

Spektrální vlastnosti chlorofylů, tj. poloha a výška absorpčních pásů, závisí také výrazně na povaze prostředí v němž jsou barviva rozpuštěna. Spektra barviv se liší, jsou-li rozpuštěna v různých rozpouštědlech. Mění se především s polaritou rozpouštědla. Podobný vliv má také nekovalentní vazba chlorofylů na hydrofobní molekuly bílkovinných komplexů. Absorpční

spektra chlorofyl-proteinových komplexů se navzájem liší, i když obsahují týž chlorofyl. Vazba na bílkovinu posouvá červené absorpční pásy k delším vlnovým délkám.

Dráha biosyntézy zvláštní pro chlorofyly začíná chelatací hořečnatého iontu protoporfyrinem IX. Další kroky jsou: metylace zbytku kyseliny propionové na C-13, β -oxidace tohoto zbytku a uzavření kruhu na C-15, a redukce vinylu na C-8 na ethyl. Tím vznikne protochlorofylid *a*. Z protochlorofylidu vzniká chlorofylid redukcí dvojné vazby mezi uhlíky 17 a 18 na kruhu D. Tato redukce probíhá při biosyntéze chlorofylů u vyšších rostlin jen za působení světla. Fotochemická redukce protochlorofylidu na chlorofylid je významným krokem, v němž se reguluje tvorba chlorofyl-proteinových komplexů v thylakoidech a celé utváření chloroplastů (Šetlík a kol., 1998).

Fykobiliny jsou akcesorické, doplňkové pigmenty u sinic, ruduch a skrytěk. Skládají se z vlastního chromoforu fykobilinu a bílkoviny. Fykobiliproteiny se nacházejí ve fykobilizomech, což jsou útvary na vnější straně thylakoidních membrán. Získanou excitační energii předávají na chlorofyl *a* (Procházka a kol., 1998).

Karotenoidy fungují jako sběrači světelné energie, řídí fotosyntetické procesy a mají velký význam v ochraně fotosyntetického aparátu proti destrukci světlem a O_3 (Procházka a kol., 1998).

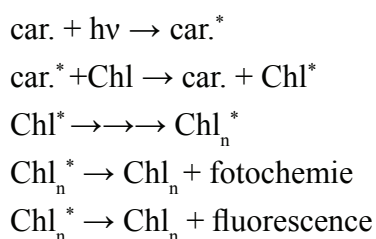
2. 12. Světlosběrná a ochranná funkce karotenoidů ve fotosyntetických membránách

Většina karotenoidů se vyskytuje v zelených listech a hnědých stélkách mořských řas, kde je jejich zbarvení maskováno modrými a zelenými chlorofyly. Karotenoidy jsou opravdu těsně spojeny s chlorofyly, které se nacházejí ve fotosyntetických membránách vyšších rostlin, řas a fotosyntetických bakteriích. Obě pigmentové skupiny jsou organizovány v protein-pigmentových komplexech, spíše než nahodile umístěné v lipoidní membráně. Protein-pigmentové komplexy chlorofylu *b* jsou ukotveny v těsné blízkosti karotenoidů (Šetlík a kol., 1998).

2. 12. 1. Světlosběrná funkce karotenoidů

Schopnost karotenoidů přidělovat absorbované světlo do fotosyntetického reakčního centra poprvé objevil Engelmann, který prosvěťoval mikrospektra skrz vlákna řas a která byla obklopena „kyslík-požírajícími“ pohyblivými bakteriemi. Bakterie shromažďovaly na určitých místech řas kyslík a zde byl lokalizován také chlorofyl *a* jako vedlejší pigment stejně jako karotenoidy (Siefermann-Harms, 1987).

Tato reakční sekvence začala s excitací karotenoidů a vedla k fotosyntetické aktivitě v několika krocích:

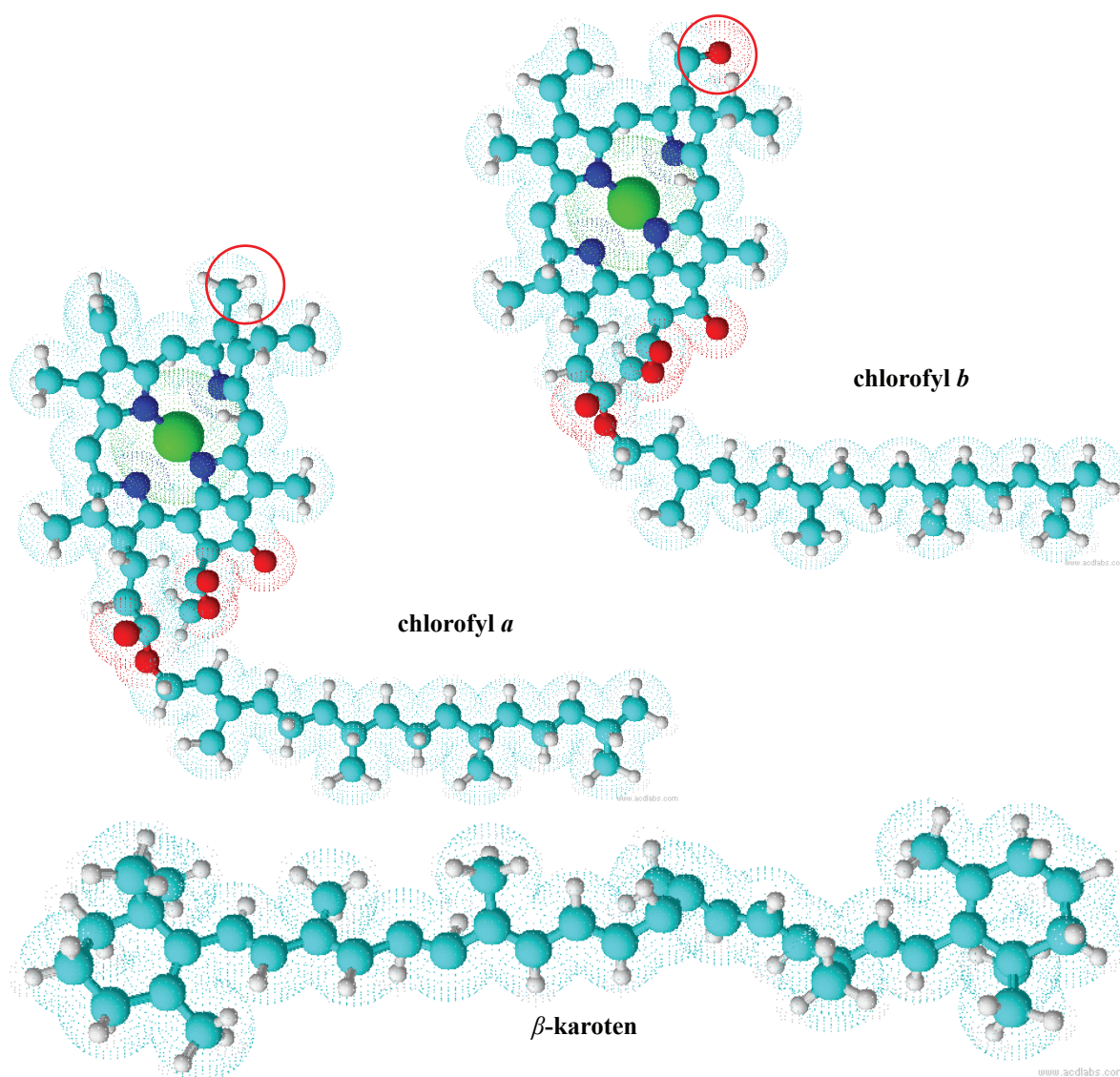


Tato sekvence ilustruje, že účinnost přenosu energie z karotenoidů na chlorofyl může být analyzována porovnáním rychlostí fotosyntetických reakcí, např. uvolnění O_2 , fixace CO_2 .

Prvotní studie světlosběrných funkcí karotenoidů ve fotosyntetických procesech byly prováděny na purpurových bakteriích. U těchto organismů se elektronová spektra karotenoidů a bakteriochlorofylů lehce překrývají. Díky rozdílné absorbanci mohou být oba pigmenty vybuzeny samostatně. Přenos energie z karotenoidů na bakteriochlorofyl má různý význam pro odlišné druhy purpurových bakterií. Např. *Rhodopseudomonas sphaeroides* využívá světlo pohlčené karotenoidy s účinností 90 % srovnatelně s bakteriochlorofylem. 100 % účinnost byla pozorována u jejího světlosběrného pigmentového proteinu B800–850. Na druhou stranu u *Rhodospirillum rubrum* jsou karotenoidy spíše neúčinné, což může být vysvětleno dříve vytvořenou cestou car.^* dělení karotenoidů. U řas a vyšších rostlin se elektronové spektrum karotenoidů a chlorofylů překrývá kvůli červeně posunutému spektru chlorofylů *a, b, c*. Proto nemusí absorbanční spektra jasně odhalit přítomnost karotenoidů (Evans, Terashima, 1987). V těchto případech zjištění účinnosti přenosu energie vyžaduje analýzu za přispění ostatních pigmentů. To může být složité kvůli tomu, že absorbanční spektra karotenoidů *in situ* a v organických roztocích se mohou významně lišit. Proto byla v několika studiích uváděna průměrná data účinnosti přenosu energie zejména při používání

neporušených tkání. U vyšších rostlin β -karoten, lokalizovaný v proteinech reakčního centra, přenáší absorbovanou energii do chlorofylu *a* s vyšší účinností. Účinnost přenosu energie z xanthofylů na chlorofyl *a* ve světlosběrném lutein-proteinovém komplexu chlorofylu *a*, *b* dosahuje 100 %. (Siefermann-Harms, 1987).

Karotenoidy mají schopnost využívat modro-zelené světlo, které je málo nebo vůbec absorbováno chlorofyly. To je velmi důležité pro vodní druhy, které ve svém přirozeném prostředí mohou přijít do styku s modro-zeleným a modrým světlem, ale ne s červeným kvůli absorpčním vlastnostem vody. Pro suchozemské rostliny může být důležitější ekonomický aspekt dané věci: v modrém spektru jsou karotenoidy ve sběru světla účinnější i přes jejich nižší molekulovou hmotnost než chlorofyly (Lichtenthaler, 1987).



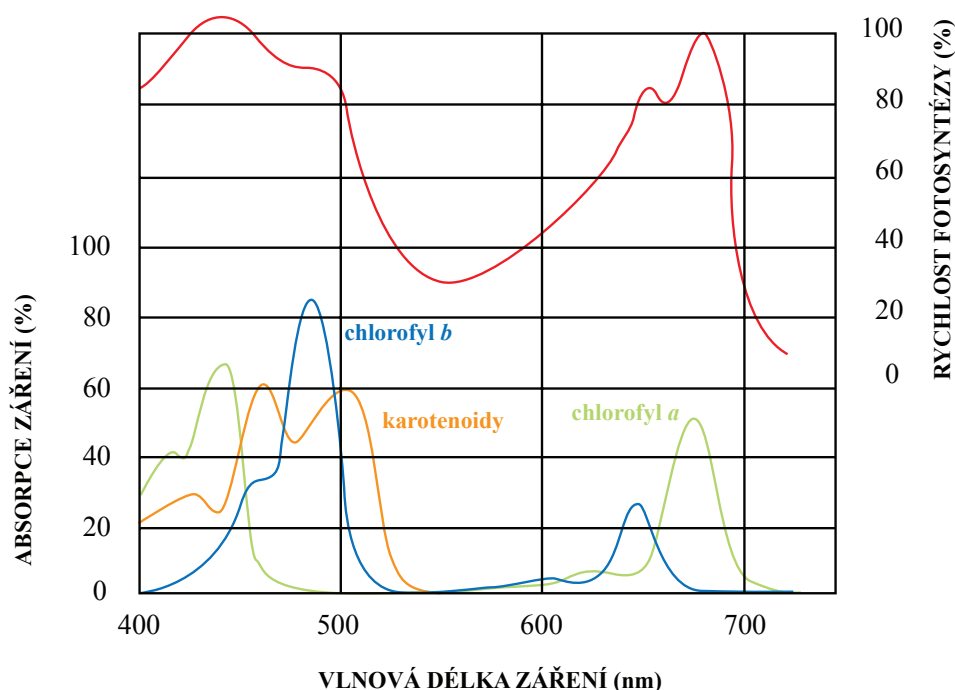
Obr. 2. Chemická stavba tří nejčastějších asimilačních pigmentů.
Kolečkem vyznačen rozdíl mezi chl *a* a chl *b*

Mechanismus excitace energetického přenosu z karotenoidů na chlorofyl je částečně vyřešen. Při absenci energetického přenosu trvá deexcitace karotenoidů méně než 1ps. Energie může být přenesena na chlorofyl bez časového limitu. Následek rozšíření přemístění mezi partnery se nemůže přihodit během energetického přenosu. Tento fakt, že transport energie není podporován teplotou menší než 4K je shodný s přenosným mechanismem, který nezahrnuje rozpouštěcí kroky. Zásadní strukturní požadavek na energetický přenos z karotenoidů na chlorofyl může být vyvozen z těžko připravitelného modelu účinnosti přenosu energie. V tomto modelu byly karotenoidy a porfyrinové chromofory fixovány v jejich přibližné pozici a vyrovnány ve vzdálenosti menší než 1nm. Tato vzdálenost mohla být porovnávána se vzdáleností větší než 2 nm mezi chlorofylovými molekulami v modelech tuto výkonnost umožňující (Lichtenthaler, Rinderle, 1988).

Další důležitou vlastností oproti bakteriochlorofylu je, že karotenoidy téměř nefluoreskují.

2. 12. 2. Ochranná funkce karotenoidů

Pro fotosyntetizující organismy je přítomnost karotenoidů v jejich fotosyntetickém aparátu nezbytná vzhledem ke škodlivosti světla a kyslíku. Ochranná role karotenoidů byla poprvé zkoumána v roce 1956 na *Rhodospseudomonas sphaeroides* a na jejich modro-zelených



Obr. 3. Poměrná pohltivost (absorbance) roztoků tří hlavních typů asimilačních pigmentů při různých vlnových délkách (absorpční spektra), a obvyklé akční spektrum fotosyntézy (relativní rychlost fotosyntézy při ozařování listu světlem různých vlnových délek, horní část grafu). Sestaveno podle různých autorů.

mutantech, kterým chyběly barevné karotenoidy. Nad světlem a pod vlivem dusíku se skupiny nechovaly stejně. Docházelo k růstovým rozdílům. Nad světlem a na vzduchu se růst modro-zelených mutantů zpomaloval, jejich bakteriochlorofyl se odbarvil a bakterie zemřely. Ochranná funkce karotenoidů byla tedy demonstrována na vyšších rostlinách. Pro výzkum se ukázala vhodná hořčičná semínka. Když byly rostliny osvětleny červeným světlem neabsorbovaly chlorofylem. Červené světlo, které excituje chlorofyl, způsobilo jeho destrukci a degeneraci membrány plastidu. *In vitro* je destruktivní efekt červeného světla na chlorofyl také velmi dobrý. Jak vidíme, přítomnost karotenoidů zamezuje destrukci excitovaného chlorofylu i v organických rozpouštědlech. (Siefermann-Harms, 1987).

Fotofyzikální reakce předcházející destrukci chlorofylu a mechanismus ochrany karotenoidy jsou velmi dobře známé. V návaznosti na deexcitační cesty chlorofylu* je pozorována i třetí cesta na fotosyntetické membráně – utváření chl* mezisystémovým přechodem z nejnižšího neexcitovaného stavu se spárovanými spiny elektronů do stavu s nespárovanými spiny. (Lichtenthaler, 1987).

Podle dat z chování chlorofylu *a* v organickém rozpouštědle je poloviční rychlost utváření chl* odhadována na 5,2 ns. Chloroplasty adaptované na temnotu přenášejí 4,5 % absorbované energie, zatímco osvětlené nedosahují úrovně postačující k fotochemickým reakcím. Při vyšších světelných intenzitách se energie zvyšuje s každým přijmutým kvantem. Ačkoliv poloviční čas života chl* v bezkarotenoidových systémech se počítá ve stovkách mikrosekund, tento typ chl je obtížné zjistit v karotenoidy obsahujících membránách, protože je velmi rychle přeměňován na základní chl, hlavně přes energii přenášející cesty. (Siefermann-Harms, 1987).

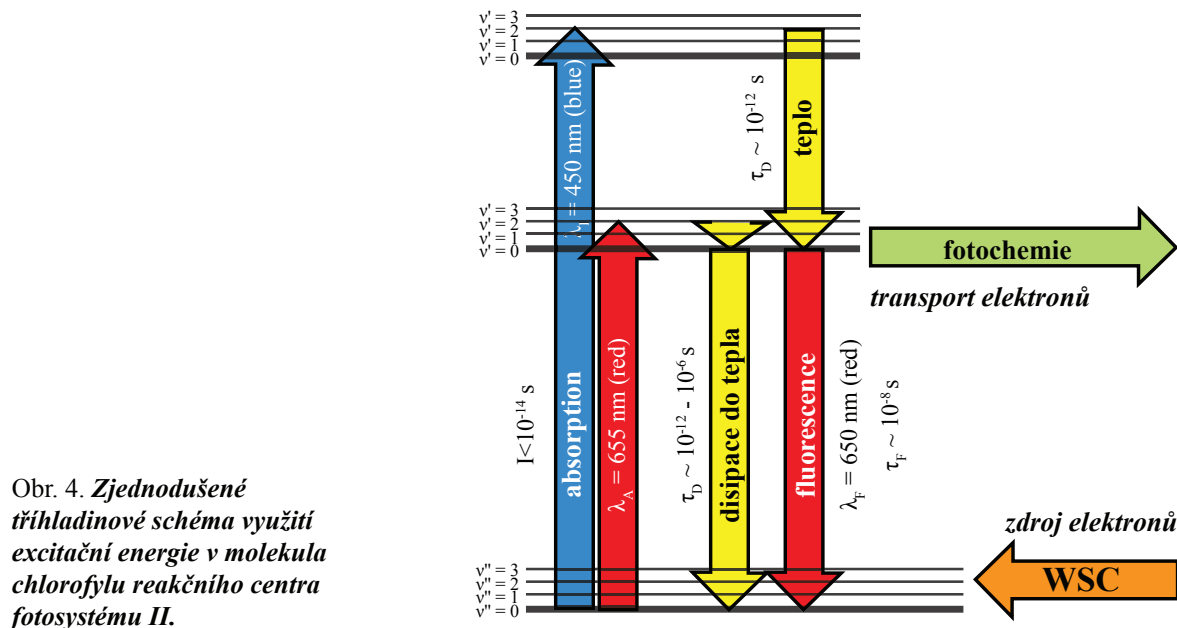
2. 13. Světlosběrné komplexy

V rostlinné buňce nejsou chlorofyly volné, ale tvoří komplexy se specifickými bílkovinami. Tyto komplexy jsou lokalizovány ve fotosyntetizující organele – chloroplastu. Vazba na bílkoviny způsobuje změnu vlastností prostetické skupiny (tj. chlorofylu). Jednotlivé komplexy se liší polohou absorpčních pásů, popřípadě hodnotami E^0 základního a vybuzeného stavu. Všechny molekuly chlorofylových komplexů v buňce nejsou rovnocenné: jsou spojeny do větších celků zvaných anténové (světlosběrné) komplexy obsahující asi 200 molekul

chlorofylu (Šebánek a kol., 1983). Uvnitř jednotky se předává zachycená energie mezi molekulami pigmentu bez podstatné ztráty energie. Tento proces je ukončen přenosem na specializovaný chlorofylový komplex, který absorbuje záření o větší vlnové délce a má v souvislosti s tím menší rozdíl energie mezi základním a vybuzeným stavem. Vzhledem k nižší hodnotě jeho excitační energie už není možný zpětný přenos energie na anténový komplex.

Tato molekula, která představuje reakční centrum spojené s anténovým komplexem, tak nutně shromažďuje veškerou energii pohlcenou celým komplexem na podobném principu, jako ATP shromažďuje chemickou energii makroergických sloučenin. K reakčnímu centru se připojuje systém využívající zachycenou energii, který je tvořen řetězcem oxido-redukčních systémů analogických dýchacímu řetězci. Vedle chlorofylu obsahují anténové komplexy řadu tzv. pomocných barviv, zejména karotenoidy. Jsou to žlutá a červená lipofilní barviva, jejichž funkce spočívá jednak v zachycování světelných kvant v oblasti spektra, kde neabsorbují chlorofyly, jednak v odstraňování radikálových forem kyslíku, které vznikají v průběhu fotosyntézy a působí destruktivně na chlorofyly (Filek a kol., 2004).

Spojením anténových komplexů a reakčních center s přenašečovými složkami vznikají dva fotosystémy označované jako I. a II. Fotosystém I. má v reakčním centru pigment s maximem absorpce při 700 nm (P-700), fotosystém II. obsahuje analogický pigment s maximem při nižší vlnové délce (P-680). Redukovaná forma P-700 v excitovaném stavu je silné redukční činidlo, zatímco P-680 je slabé redukční činidlo. Naproti tomu oxidovaná



forma P-700 je v základním stavu slabé oxidační činidlo a P-680 je silnější oxidační činidlo než molekulární kyslík. Může být proto redukována vodou, což je podstatou fotosyntetické produkce molekulárního kyslíku (Sofrová, 1992).

Světlosběrné antény jsou u všech fotosyntetických organismů. U všech také rozeznáváme podle těsnosti spojení antény s reakčním centrem dva typy antén:

- 1) Vnitřní antény, které jsou v neměnném stechiometrickém poměru k reakčnímu centru a bývají s reakčním centrem těsně spojeny;
- 2) Vnější antény, které jsou s reakčním centrem obvykle spojeny prostřednictvím vnitřní antény, se mohou někdy přemísťovat a buňka jich vytváří více nebo méně podle osvětlení, za něhož roste. LHC 2 a také jiné antény v membránách oxygenní fotosyntézy se mohou dokonce podle podmínek osvětlení přesouvat mezi PS II a PS I (Šetlík a kol., 1998).

Vnitřní antény jsou vždy zanořeny v membráně thylakoidu a jejich bílkoviny jsou hydrofobními vazbami vázány na bílkoviny reakčního centra. Naproti tomu u vnějších antén jsou dvě strukturální uspořádání:

- 1) Vněmembránové antény, které jsou buď přichyceny na povrchu thylakoidů, jak je tomu u zelených sírných fotosyntetických bakterií, sinic a ruduch, nebo jsou v dutině thylakoidu jako u skrytěk. Bílkoviny, na nichž jsou barviva vázána, jsou většinou hydrofilní povahy.
- 2) Vnitromembránové antény, jejichž bílkoviny jsou hydrofobní a prostupují membránu jednou nebo několika α šroubovicemi. Takové jsou antény u purpurových fotosyntetických bakterií, u všech řas kromě ruduch a skrytěk a u všech vyšších rostlin.

2.14. Denní kolísání ve složení chlorofylu *a/b* v LHC 2

Světlosběrný chlorofylový komplex chlorofylu *a/b* fotosystému II (LHC 2) je hlavním komplexem thylakoidní membrány v zelených řasách a vyšších rostlinách. Jeho funkcí je absorbovat světlo a transportovat energii k reakčnímu centru fotosystému II. Jeho světlosběrná anténa hraje důležitou roli jak v krátkodobé, tak v dlouhodobé adaptaci. Exprese genů LHC 2 může být regulována denním cyklem (Liker, Garab, 1995).

Jedna z krátkodobých regulací je změna uspořádání thylakoidů, která zahrnuje protein kinasy a fosfatasy, které katalyzují fosforylaci a defosforylaci LHC 2 atd., které zpětně ovlivňují pohyblivost anténových komplexů a jejich vazbu s fotosystémem I a II.

Dlouhodobá aklimatizace rostlin, např. k rozdílné intenzitě záření, má za následek celkovou změnu v ultrastruktuře membrány a složení anténového systému. To vyžaduje syntézu a nahromadění určitých pigment-proteinových komplexů a degradaci jiných komponent. Aklimatizace je regulována několika úrovnovým regulačním systémem, jehož mechanismus ještě není zcela znám (Burke, 1990).

V rostlinách rostoucích v diurnálních cyklech bylo prokázáno, že hladina mRNA pro LHC 2 prochází také diurnální oscilací. Tato geneticky programovaná regulace byla porovnávána s oscilací množství LHC 2 v thylakoidních membránách mladých listů pšenice a s oscilací chloroplastových proteinů hrachu kódovaných jádrem.

Zdá se, že okrajové antény hrají klíčovou roli v krátko- i dlouhodobých regulačních procesech, zatímco struktura a složení vnitřních antén LHC 2 je méně flexibilní (Liker, Garab, 1995).

2. 15. Fotosyntéza

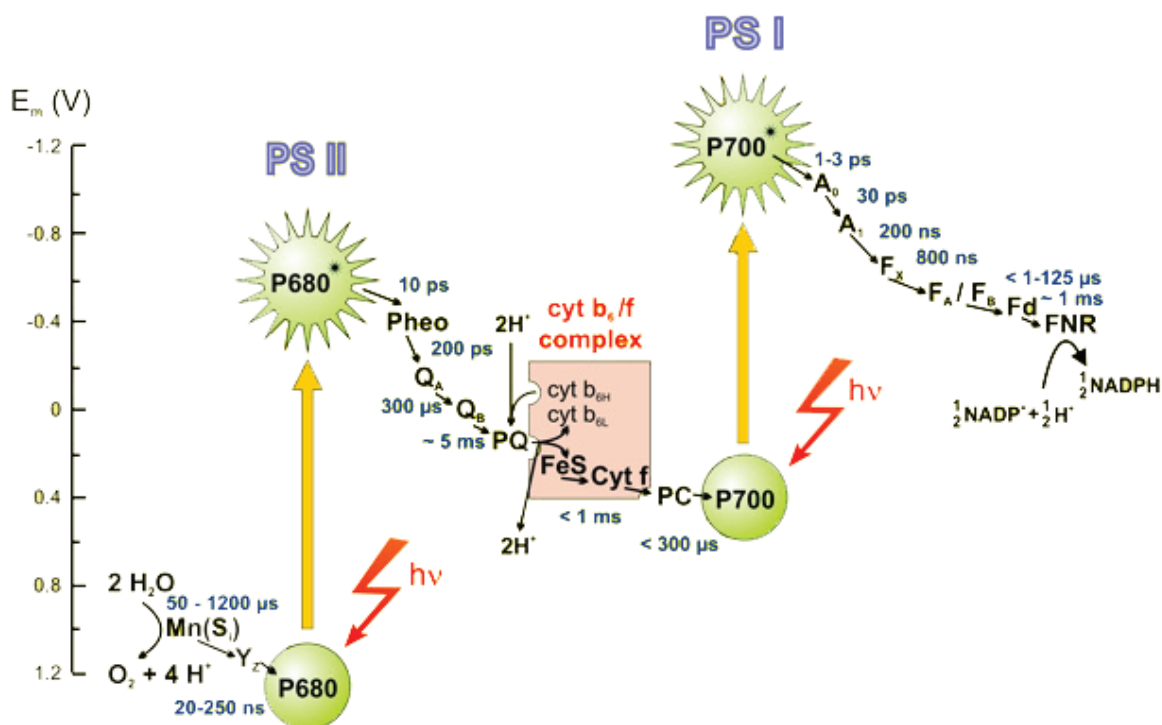
Fotosyntéza je energeticky velmi náročná a závisí na přívodu energie z vnějšího prostředí. Moderní definice fotosyntézy může znít: Fotosyntéza je série procesů, v nichž se mění elektromagnetická energie na chemickou volnou energii, již lze využít k biosyntéze. Touto biosyntézou se rozumí především syntéza sacharidů fixací atmosférického oxidu uhličitého, ale může jít např. také o redukci nitritů.

Obecnou rovnici (2) fotosyntézy lze napsat takto:



Kde H_2D je donor vodíku (respektive protonu a elektronu), D je oxidovaná forma, CH_2O je monomer glycidu, $h\nu$ je kvantum fotosynteticky účinného záření (Beneš, 1994).

Celý proces můžeme rozdělit na dvě fáze: *fotochemickou*, v níž se světelná energie přeměňuje na vhodnou formu energie chemické, tj. na energeticky bohaté formy obou základních biochemických energetických systémů, ATP a NADPH, a *chemickou*, v níž se takto získaná energie využívá k redukci oxidu uhličitého. Přehled o fotochemické, tedy primární fázi fotosyntézy podává takzvané Z-schéma (Obr. 5) navržené R. Hillem a F. Bendallovou v roce 1960 tak, že reagující látky zde byly umístěny podle posloupnosti reakcí a podle oxidačně redukčního potenciálu. Chemická fáze zahrnuje soubor reakcí, v nichž se na úkor chemické energie produktů světelné fáze (NADP, ATP) syntetizují různé organické látky např. sacharidy, organické kyseliny, tuky a bílkoviny. V současné době jsou známy dva způsoby fixace oxidu uhličitého. V prvním případě je první stabilní sloučeninou 3-fosfoglycerát, tedy látka se třemi atomy uhlíku, proto se tento děj nazývá C_3 -fotosyntéza, ve druhém případě je touto sloučeninou čtyř uhlíkatý oxalacetát, jde tedy o C_4 fotosyntézu (Sofrová, 1992).



Obr. 5 „Z-schéma“ lineárního elektronového transportu

3. Materiál a metodika

Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv má stres teploty a ozáření na množství fotosyntetických pigmentů v rostlinách. Pro tento pokus byla vybrána pšenice setá (*Triticum aestivum*). Pšenice setá patří do čeledi Lipnicovité (Poaceae). V ČR se pšenice setá pěstuje ve dvou formách – jarní a ozimá. Pro měření byla vybrána forma ozimá.

3. 1. Kultivace

Pokusy byly prováděny na pšenici seté (*Triticum aestivum*). Rostliny byly pěstovány v kultivačním boxu rozděleným na dvě nezávislé komory, metodou vodní kultury v Knopově živném roztoku, paralelně ve dvou různých intenzitách ozáření (2050 lux a 4400 lux) a dvou rozdílných kultivačních teplotách (20 °C a 30 °C). Zdroj záření byl v obou komorách stejný. Intenzita ozáření E (3) byla regulována vzdáleností rostlin od zdroje záření. Osvětlení je tedy nepřímo úměrné čtverci vzdálenosti a je tím slabší, čím šikměji paprsky dopadají,

$$E = \frac{I}{r^2} * \cos \alpha \quad (3)$$

kde I je svítivost paprsků dopadajících pod úhlem α k normále plochy, vzdálené od zdroje r.

Denní režim v boxu byl upraven: den 12 hod, při teplotě 20 °C a 30 °C, noc 12 hod při teplotě 18 °C. V průběhu pokusu byla teplota kontrolována laboratorním teploměrem. Rozdíl teploty od zadaných podmínek byl max. 2 °C. Intenzita záření dopadající na úroveň listů měla hodnotu 2050 lux a 4400 lux, v závislosti na světelných podmínkách místnosti, ve kterých se box nacházel. Intenzita záření byla naměřena luxmetrem typu Li-250 Light Meter. Hodnoty ozáření jsou průměrné.

Do kultivačních nádob bylo vysazeno 400 semen. 200 bylo kultivováno při teplotě 20 °C a ozáření 2050 lux, zbylých 200 při teplotě 30 °C a ozáření 4400 lux. Semena byla nasazena na dřevěné lišty 20 cm dlouhé 5 mm od sebe, vždy 3 lišty v jednom akváriu. V každé komoře boxu byly použity 2 akvária. Protože byla semena takto blízko u sebe, docházelo k vzájemnému zastínění rostlin, což se projevilo i v množství naměřených pigmentů.

3. 1. 1. Složení živného roztoku:

Knopův živný roztok:

28,8 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	4 ml
10 % KH_2PO_4	2 ml
10 % KNO_3	2 ml
10 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 ml
10 % KCl	1 ml
1 % FeCl_3	1 ml
Destilovaná voda	ad 1000 ml

3. 2. Odběr a zpracování vzorků

Vzorky pro analýzu byly odebírány v 1. měření 10., 16., 19., 23., 26. a 30. den, v případě 2. měření 10., 13., 16., 19., 22. a 25. den kultivace. Vzorky měly být odebírány vždy po třech dnech kultivace, v případě 1. měření to nebylo z technických důvodů možné.

Po deseti dnech kultivace bylo odebíráno vždy po 10 vzorcích z každé komory. Pět vzorků bylo použito pro měření čerstvé biomasy a pro zjištění obsahu fotosyntetických pigmentů. Dalších pět pro zvážení sušiny. Z rostlin byly použity pouze části, v nichž probíhá fotosyntéza (bez kořene).

Čerstvá biomasá byla zjištěna vážením na analytických vahách. Sušina byla zvážena po čtyřhodinovém sušení při 105 °C v sušárně typu ECOCELL 55, LSI-Linie Standard a deseti minutovém ustálení v exikátoru.

Rostliny použité pro zjištění čerstvé biomasy byly dále využity k měření fotosyntetických pigmentů. Vzorky byly rozdrceny v třecí misce. Miska byla vypláchnuta 85 % roztokem acetonu do zkumavky a acetonem doplněna na 10 ml. Poté bylo do centrifugačních zkumavek odlito z každého vzorku po 2 ml extraktu a při 3000 otáček 10 minut centrifugováno. Měření vždy bylo prováděno s jedním slepým vzorkem, jímž byl 85 % aceton a jednou kyvetou, která obsahovala roztok s fotosyntetickými pigmenty. U každého vzorku byla změřena absorbance při vlnové délce 663 nm, 644 nm a 452,5 nm. Výsledky měření byly sepsány do tabulky.

Obsah jednotlivých fotosyntetických pigmentů byl stanoven podle vzorců (4–6) Zieglera a Eggla (Ziegler, Eggle, 1965).

$$c(a) 10,3 * E_{663} - 0,918 * E_{664} [mg / l] \quad \text{pro chlorofyl a (4)}$$

$$c(b) 19,7 * E_{664} - 3,87 * E_{663} [mg / l] \quad \text{pro chlorofyl b (5)}$$

$$c(car) 4,76 * E_{452,5} - 0,226 * c(a + b) [mg / l] \quad \text{pro karotenoidy (6)}$$

3. 3. Analýza fotosyntetických pigmentů

Při měření fotosyntetických pigmentů byl použit spektrální fotometr UV/VIS 1202 (Shimadzu, Japonsko). Při měření ve fotometrickém režimu bylo použito volby měření absorbance. Zdroj zářivé energie zajišťuje wolframjodidová lampa, která vysílá záření na mřížkový monochromátor. Světelný paprsek prochází monochromatickou vstupní šterbinou přímo na kyvetu. Absorpční prostředí tvoří kyvetový prostor s vícemístným držákem. Byly měřeny vždy pouze dva vzorky, z nichž jeden obsahoval rozpouštědlo (85 % aceton) – šlo o slepý vzorek, druhá kyveta byla naplněna vzorkem obsahující fotosyntetické pigmenty. Na klávesnici byla zvolena požadovaná vlnová délka pro jednotlivá měření. Výsledkem měření byly absorbance jednotlivých pigmentů.

Pozn. Pro měření byly vybrány pouze dvě varianty, a to 20 °C při optimálních podmínkách a 30 °C při extrémním ozáření. Těchto dvou krajních variant by bylo možné vhodně využít při pokusech ve školní praxi. Rostliny se vloží do dvou akvárií. V akváriích jsou rostliny ponořeny v kádince se živným roztokem do vody o teplotě 20 °C nebo 30 °C. Voda v akváriích se pravidelně přehřívá na tuto teplotu, ozáření se reguluje vzdáleností rostlin od zdroje (zářivky). Akvária musí být uzavřená, aby byly udrženy stálé podmínky.

3. 4. Metody stanovení fotosyntetických barviv

Na příjmu světelné energie využívané ve fotosyntéze se podílejí u vyšších rostlin kromě chlorofylů *a* a *b* i karotenoidy. Při fotosyntetických studiích se většinou stanovuje množství chlorofylů, a to buď celkové množství (*a+b*), nebo množství jednotlivých chlorofylů *a* a *b* (Šesták, Čatský a kol., 1966).

Množství karotenoidů se nestanovuje tak běžně z toho důvodu, že jsou velmi nestálé – rychle se rozkládají na světle působením kyslíku a různých sloučenin.

Základem každé analýzy je správná volba a odběr vzorku. Odebraný vzorek musí dostatečně charakterizovat studovaný materiál a výsledky musí být statisticky spolehlivé.

Každému měření předchází extrakce.

Cílem extrakce je uvolnění chlorofylu z jeho vazby s lipoproteinovou složkou komplexu, ve kterém je většina chlorofylu v rostlinném materiálu přítomna. K extrakci se nejčastěji používá acetonu, methanolu, ethanolu nebo jejich směsí s benzinem. Většinou stačí čisté rozpouštědlo, popřípadě vhodně ředěné vodou (Šesták, Čatský a kol., 1966).

Extrahovat by se mělo za chladu, aby nedocházelo k rozkladu pigmentů, tzn. že rozmělněné vzorky by se měly ukládat do ledničky. K rozmělněnému materiálu se přilije vhodné polární rozpouštědlo (aceton), rozmíchá se a extrakt se v jednodušším případě dekantuje filtrací (přes filtrační papír), popřípadě se centrifuguje (viz. metodika). Čirý homogenní extrakt lze takto použít k vlastnímu měření fotosyntetických pigmentů.

K měření můžeme využít několika metod: kolorimetrické a chromatografické stanovení, které lze ve školních pokusech vhodně využít, spektrofotometrické stanovení, které je nejpresnější, avšak vyžaduje poměrně nákladné technické vybavení (viz. metodika).

3. 4. 1. Kolorimetrické stanovení

Kolorimetrie je nejstarší modifikací molekulové absorpční spektroskopie. Je založena na skutečnosti, že roztoky určité barevné látky o stejné koncentraci mají stejnou intenzitu zbarvení. Stanovení se provádějí porovnáním intenzity zbarvení vzorku se standardními roztoky ve stejných nádobách (Drbal, Křížek, 1993). Kolorimetr nedovoluje stanovení chlorofylu *a* a *b* díky jejich blízké poloze absorpčních maxim, ale může stanovit jenom celkové množství chlorofylů. Množství chlorofylů (*a+b*) se určí na kalibrační křivce podle extinkční hodnoty.

3. 4. 2. Chromatografické stanovení

Chromatografie je jedna z nejvýznamnějších analytických separačních metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických a anorganických látek. Základy

kapalinové kolonové chromatografie položil na počátku 20. stol. Cvet, který na sloupci sorbentu (stacionární fáze) úspěšně rozdělil listová barviva (Drbal, Křížek, 1999).

Chromatografických technik je několik, nejjednodušší metodou, která se dá využít ve školní praxi je chromatografie na papíře.

U papírové chromatografie je nosičem zakotvené stacionární fáze speciální chromatografický papír, vyrobený z čisté celulózy. Mobilní fázi volíme podle toho, jakého rozdělení chceme docílit. Pokud zvolíme toluen, chlorofyly zůstanou špatně rozlišeny, ale karotenoidy budou dobře patrné. Jestliže zvolíme roztok toluen-methanol (400:1), chlorofyly i karotenoidy jsou odděleny dobře.

Pracovní postup: Z chromatografického papíru vystříhneme obdélník. Na vyznačené místo start, se nanese kapka dělené směsi (acetonový roztok pigmentů). Papír se umístí tak, aby volně nasával mobilní fázi. Zde dochází k vzestupnému vyvíjení. Po ukončení se provádí vyhodnocení (srovnání se standardními vzorky).

Použití papírové chromatografie pro stanovení jednotlivých pigmentů není přesné, ale pro demonstraci pokusu ve škole je plně dostačující.

3. 4. 3. Spektrofotometrické stanovení

Jediná rychlá metoda stanovení obsahu chlorofylu *a* a *b* vedle sebe v extraktu je metoda spektrofotometrická (viz metodika), která však vyžaduje nákladné technické vybavení. K výpočtu množství chlorofylu se používá rovnic sestavených různými autory. Základem rovnic (7–14) jsou specifické extinkční koeficienty, udávající pro danou vlnovou délku hodnotu extinkce roztoku jednotkového množství daného pigmentu v jednotkové délce kyvety (Šesták, 1985).

Arnon (1949) pro 80 % *aceton*:

$$c(a) 12,7 * E_{663} - 2,69 * E_{645} [mg / l] \quad (7)$$

$$c(b) 22,9 * E_{645} - 4,68 * E_{663} [mg / l] \quad (8)$$

Lichtenthaler a Pfister (1978) pro 96 % *ethanol*:

$$c(a) 13,95 * E_{665} - 6,88 * E_{649} [\mu g / ml] \quad (9)$$

$$c(b) 24,96 * E_{649} - 7,32 * E_{665} [\mu g / ml] \quad (10)$$

Röbbelen (1957) pro 85 % *aceton*:

$$c(a) 10,3 * E_{663} - 0,92 * E_{644} [mg / l] \quad (11)$$

$$c(b) 19,7 * E_{644} - 3,87 * E_{663} [mg / l] \quad (12)$$

Smith a Benitez (1995) pro *ether*:

$$c(a) 10,1 * E_{662} - 1,01 * E_{644} [mg / l] \quad (13)$$

$$c(b) 16,4 * E_{644} - 2,57 * E_{662} [mg / l] \quad (14)$$

4. Výsledky

Kultivace rostlin probíhala vždy jeden měsíc a to v listopadu a v květnu, předtím bylo provedeno ještě jedno pokusné měření, jehož výsledky zde nejsou prezentovány.

Po třech dnech kultivace rostliny pšenice seté vyklíčily a již v prvním týdnu vytvořily první listy. V množství vyklíčených rostlin nebyl patrný rozdíl. Také nebyly patrné rozdíly v růstu mezi kontrolními a stresovanými variantami. U kontrolních vzorků byl růst pšenice seté téměř lineární s dobou kultivace, pouze mezi 26. a 30. dnem je při 2. měření znatelný mírný pokles, který je dán stářím rostlin (Tabulka č. 1a, 2a; Grafy a Tabulky: Tabulka 1b, graf č. 1, 3). Při 30 °C je u prvního měření téměř shodný průběh růstu jako u kontrolních variant. U 2. měření jsou znatelné odchylky, zvláště mezi 13. až 16. dnem kultivace je nárůst rostlin téměř o 0,2 g, poté následuje mírný pokles a stejně jako u kontrolních vzorků mezi posledními dvěmi měřeními došlo k poklesu díky stáří rostlin, i když měření bylo provedeno již 25. den kultivace (Tabulka č. 1a, 2a; Grafy a Tabulky: Tabulka 1b, graf č. 2, 3).

Tabulka č.1a

Průměrné hodnoty čerstvé hmoty v gramech

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,1416	0,1525
16	0,1831	0,1612
19	0,1639	0,2068
23	0,2245	0,2680
26	0,3129	0,3442
30	0,3088	0,2699

Tabulka č. 2a

Průměrné hodnoty čerstvé hmoty v gramech

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,1191	0,2255
13	0,1855	0,2085
16	0,2398	0,3922
19	0,2953	0,2943
22	0,3222	0,3752
25	0,3710	0,3215

Množství sušiny také vzrůstá s dobou kultivace. U kontrolních rostlin při 1. měření došlo nejprve k výraznějšímu nárůstu sušiny, od 16. dne následoval mírný vzestup po všechna další měření. Při druhém měření sušina nejprve mírně klesala, ale opět od 16. dne kultivace došlo k vysokému vzrůstu, který byl nejspíše ovlivněn kultivačními podmínkami. Mezi 22. a 25. dnem došlo k poklesu, který odpovídá i snížení čerstvé hmoty naměřené ve stejné dny (Tabulka č. 3a, 4a; Grafy a Tabulky: 2b, graf č. 4, 6). Při 30 °C v 1. měření odpovídá hmotnost sušiny množství čerstvé hmoty. Zjevný je nárůst mezi 16. a 19. dnem kultivace, poté se množství sušiny téměř nemění, stejně jako nárůst čerstvé hmoty. Mezi posledními dvěma dny kultivace došlo opět k mírnému nárůstu. V květnových pokusech hmotnost sušiny méně odpovídala nárůstu čerstvé hmoty. Křivka má téměř shodný průběh jako množství sušiny u kontrolních vzorků. Mezi 16. a 22. dnem je výrazný nárůst a opět mezi 22. a 25. dnem růstu pokles odpovídající snížení hmotnosti čerstvé hmoty při těchto měřeních (Tabulka č. 3a, 4a; Grafy a Tabulky: 2b, graf č. 5, 6).

Tabulka č. 3a

Průměrné hodnoty sušiny v gramech

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,0269	0,0211
16	0,0451	0,0310
19	0,0429	0,0626
23	0,0519	0,0645
26	0,0642	0,0626
30	0,0642	0,0721

Tabulka č. 4a

Průměrné hodnoty sušiny v gramech

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,0234	0,0243
13	0,0188	0,0212
16	0,0227	0,0339
19	0,0565	0,0628
23	0,0688	0,0704
26	0,0368	0,0394

4. 1. Změny obsahu fotosyntetických pigmentů

Množství chlorofylu *a* v kontrolních vzorcích mělo sestupný charakter, u prvního měření byl tento pokles prakticky pravidelný, v druhém měření byl poměrně významný pokles mezi 13. až 22. dnem měření. Hodnoty obou měření se nacházejí v rozmezí 1,051 mg/g až 0,648 mg/g čerstvé hmoty (Tabulka č. 5a, 6a; Grafy a Tabulky: 3b, graf č. 7, 9). Při 30 °C byly hodnoty chlorofylu *a* výrazně vyšší, od hodnot 1,276 mg/g po hodnoty 0,678 mg/g, takže pokles je strmější. Při druhém měření mezi 10. až 13. dnem došlo k nárůstu množství chlorofylu *a* a mezi 13. a 16. dnem k výraznému poklesu, který odpovídá výraznějšímu nárůstu čerstvé hmoty v tomto období kultivace. Při mírném nárůstu čerstvé hmoty došlo k mírnému poklesu množství chlorofylu *a* a výraznému vzrůstu čerstvé hmoty odpovídá úbytek chlorofylu *a*. Od 19. dne kultivace jsou měření téměř identická s pokusy v 1. měření. Můžeme tedy konstatovat, že fotosyntetická aktivita byla vyšší u stresovaných rostlin, tzn. že vysoká teplota a ozáření mají pozitivní vliv na aktivitu fotosyntézy. Rostliny se tedy přizpůsobily těmto extrémním hodnotám velmi rychle (Tabulka č. 5a, 6a; Grafy a Tabulky: 3b, graf č. 8, 9).

Tabulka č. 5a

Množství chlorofylu *a* v mg/g čerstvé hmoty

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,9522	1,2762
16	0,9050	0,9966
19	0,8387	0,9169
23	0,8287	0,7743
26	0,8038	0,7130
30	0,6728	0,6784

Tabulka č. 6a

Množství chlorofylu *a* v mg/g čerstvé hmoty

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,9634	0,8423
13	1,0511	1,1533
16	0,8720	0,5784
19	0,6875	0,7615
23	0,6482	0,6509
26	0,7198	0,6624

Množství chlorofylu *b* v kontrolní variantě má nejprve nepatrný sestupný charakter. V prvním měření od 16. dne kultivace došlo k nárůstu fotosyntetické aktivity, zejména díky zastínění rostlin, které se snažily zachytit co největší množství světla. Zastínění odpovídá i nárůstu čerstvé hmoty. Pokles množství chlorofylu *b* mezi 26 a 30. dnem je dán stářím rostlin, jejichž listy byly již povadlé a rostliny tedy měly přístup ke světlu. V případě druhého měření má křivka odlišný průběh, mezi 16. a 23. dnem kultivace došlo k významnému poklesu, zřejmě díky menšímu zastínění. Významný nárůst při 19. dnu od počátku měření můžeme připisovat tomu, že rostliny dorostly již do takové výšky, kdy se ozářenost začala snižovat. Opětný pokles mezi posledními dvěmi měřeními je dán stářím rostlin (Tabulka č. 7a, 8a; Grafy a Tabulky: 4b, graf č. 10, 12).

V extrémních podmínkách byl průběh chlorofylu *b* trochu odlišný. Hodnoty množství pigmentů jsou vyšší, tzn. že aktivita fotosyntézy byla také vyšší, což se potvrdilo již u chlorofylu *a*. V případě prvního pokusu jsou hodnoty téměř konstantní, což je způsobené vysokou ozářeností, kdy rostliny po celou dobu růstu měly dostatek světla. V případě druhého měření došlo k výraznému nárůstu zejména mezi 10 a 13. dnem kultivace, což odpovídá i nárůstu čerstvé hmoty v tomto období a vzájemné zastínění rostlin bylo vyšší. Poté následoval poměrně významný pokles. Rostliny měly mezi těmito měřeními dostatečné množství světla a nebyly dále nuceny toto světlo v takové míře zachycovat. Od 19. dne kultivace byl průběh podobný jako u 1. měření, pouze mezi 22. až 25. dnem došlo k výraznému nárůstu, který je nejspíše způsoben chybou měření (Tabulka č. 7a, 8a; Grafy a Tabulky: 4b, graf č. 11, 12).

Tabulka č. 7a

Množství chlorofylu *b* v mg/g čerstvé hmoty

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,3305	0,5225
16	0,3234	0,4289
19	0,3100	0,4377
23	0,3329	0,4613
26	0,4177	0,5001
30	0,3540	0,4691

Tabulka č. 8a

Množství chlorofylu *b* v mg/g čerstvé hmoty

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,3859	0,4191
13	0,4431	0,5875
16	0,3889	0,3805
19	0,3029	0,4404
23	0,4465	0,4586
26	0,3692	0,8435

Celkové množství chlorofylů u kontrolních vzorků v 1. měření vykazuje mírný pokles v průběhu prvních 3 měřeních, dále následoval drobný nárůst a mezi 22. až 25. dnem kultivace došlo opět ke snížení. Průběh křivky odpovídá množství chlorofylu *a*, který má dominantnější postavení před chlorofylem *b*. Zastoupení chlorofylu *b* se tedy projevilo drobným nárůstem mezi 23. a 26. dnem kultivace. Při jarním měření došlo k výraznějšímu poklesu mezi 13. a 19. dnem kultivace, což je opět dáno výraznějším poklesem obou typů chlorofylu, který je důsledkem nárůstu čerstvé hmoty. Dále nastal drobný nárůst způsobený vyšším množstvím chlorofylu *b* (Tabulka č. 9a, 10a; Grafy a Tabulky: 5b, graf č. 13, 15). Při 30 °C je celková hodnota chlorofylů vyšší, což je způsobeno zvýšenou intenzitou fotosyntetické aktivity. V 1. měřeních je pokles téměř pravidelný od 1,798 mg/g po 1,147 mg/g čerstvé hmoty. Zde jsou zcela jasně hodnoty obou pigmentů ovlivněny množstvím chlorofylu *a*. Ve druhém pokusu je výrazný nárůst mezi 10. a 13. dnem, kterému následuje pokles z hodnot 1,740 k 0,958 mg/g. 19. až 22. den jsou výsledky měření shodné s prvním pokusem, což je vidět z předchozích grafů. Výrazné vzestupy mezi posledními měřeními jsou velmi ovlivněny vysokou hodnotou chlorofylu *b*, která byla naměřena 25. den kultivace (Tabulka č. 9a, 10a; Grafy a Tabulky: 5b, graf č. 14, 15).

Tabulka č. 9a

Množství chlorofylů v mg/g čerstvé hmoty

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	1,2827	1,7987
16	1,2284	1,4255
19	1,1487	1,3546
23	1,1616	1,2356
26	1,2215	1,2131
30	1,0267	1,1475

Tabulka č. 10a

Množství chlorofylů v mg/g čerstvé hmoty

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	1,3494	1,2614
13	1,4942	1,7408
16	1,2610	0,9589
19	0,9905	1,2019
23	1,0947	1,1094
26	1,0890	1,5059

Množství karotenoidů při 20 °C má v prvním pokusu mírně sestupný charakter. Průběh je téměř shodný s křivkou chlorofylu *a* . To znamená, že s postupným růstem pšenice seté se lineárně snižuje množství pigmentů. Množství karotenoidů má takový průběh díky standardním podmínkám, ve kterých se rostliny nacházely. V druhém měření je pokles výraznější zvláště mezi 13. a 22. dnem pěstování, což odpovídá růstové křivce. Nárůst mezi 22. a 25. dnem měření je dán stářím rostlin (Tabulka č. 11a, 12a; Grafy a Tabulky: 6b, graf č. 16, 18). V tomto případě rozdíl při 20 °C a při stresových podmínkách jsou téměř ve stejném hodnotovém rozmezí. Při stresu je pokles výraznější, což může znamenat, že nejprve rostliny vyprodukovaly větší množství těchto pigmentů, které mají obrannou funkci, a následně se adaptovaly na stresující prostředí. V prvním měření není nárůst pigmentů viditelný, ale ve druhém měření při 30 °C je toto přizpůsobení znatelné od 13. dne kultivace, po kterém dochází k poklesu množství karotenoidů. Mezi 10 a 13. dnem došlo k výraznému nárůstu. Příčinou je vliv teploty a světelného ozáření. Rostlina reagovala na stresové podmínky vysokým nárůstem těchto pigmentů. Zřejmý pokles pigmentů mezi 13. a 16. dnem kultivace však může odpovídat i výraznému navýšení čerstvé hmoty (Tabulka č. 11a, 12a; Grafy a Tabulky: 6b, graf č. 17, 18).

Tabulka č. 11a

Množství karotenoidů v mg/g čerstvé hmoty

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,3617	0,5237
16	0,3668	0,4246
19	0,3379	0,3649
23	0,3344	0,3195
26	0,3181	0,2817
30	0,2792	0,2682

Tabulka č. 12a

Množství karotenoidů v mg/g čerstvé hmoty

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	0,4334	0,3585
13	0,4676	0,5022
16	0,3593	0,2265
19	0,2537	0,2750
23	0,2214	0,2251
26	0,2909	0,2001

Poměr chlorofylu *a* a *b* u kontrolních rostlin má v prvních měřeních opět mírně sestupný charakter, stejně jako u hodnot chlorofylů. Zřetelnější pokles je zaznamenán u obou měření, v prvním případě mezi 23. až 30. dnem kultivace, v druhém mezi 19. a 22. dnem. Příčinou je výraznější pokles chlorofylu *a* a nárůst chlorofylu *b* zvláště ve druhém měření. V druhém měření se objevil nárůst mezi posledními dvěmi hodnotami, což opět kopíruje předchozí hodnoty chlorofylů (Tabulka č. 13a, 14a; Grafy a Tabulky: 7b, graf č. 19, 21). Při stresových podmínkách nemá poměr chlorofylů odlišný charakter, pouze u druhého pokusu došlo k velmi mírnému nárůstu mezi 16. a 22. dnem růstu. Mezi 22. a 25. dnem se hodnoty výrazněji snížily, což je dáno vysokou hodnotou v posledním měření u chlorofylu *b* (Tabulka č. 13a, 14a; Grafy a Tabulky: 7b, graf č. 20, 21).

Tabulka č. 13a

Poměr chlorofylů *a/b* v mg/g čerstvé hmoty

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	2,8811	2,4425
16	2,7987	2,3237
19	2,7050	2,0946
23	2,4892	1,6784
26	1,9243	1,4258
30	1,9008	1,4461

Tabulka č. 14a

Poměr chlorofylů *a/b* v mg/g čerstvé hmoty

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	2,5101	2,1236
13	2,3703	2,0246
16	2,2573	1,6035
19	2,3500	1,7293
23	1,4626	1,7292
26	2,0402	0,7852

Poměr chlorofylů ku karotenoidům je při 20 °C mírně vzrůstající, výrazněji došlo k nárůstu mezi 19. a 22. dnem kultivace v 1. měření, což odpovídá mírnému nárůstu chlorofylu *a*. U druhých měření je nárůst lineární. Hodnoty pro kontrolní vzorky jsou téměř shodné v obou případech měření (Tabulka č. 15a, 16a; Grafy a Tabulky: 8b, graf č. 22, 24). Ve stresujících podmínkách jsou obě měření také podobná, pouze mezi 22. a 25. dnem došlo k nárůstu hodnot při druhém pokusu, což je opět způsobeno vysokou hodnotou chlorofylu *b* (Tabulka č. 15a, 16a; Grafy a Tabulky: 8b, graf č. 23, 24).

Tabulka č. 15a

Poměr chlorofylu *a* ku karotenoidům v mg/g čerstvé hmoty

1.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	3,5464	3,4347
16	3,3486	3,3574
19	3,3998	3,7121
23	3,4737	3,8676
26	3,8402	4,3064
30	3,6769	4,2791

Tabulka č. 16a

Poměr chlorofylu *a* ku karotenoidům v mg/g čerstvé hmoty

2.měření

dny kultivace	20 °C	30 °C
10	3,1087	3,6121
13	3,2110	3,4326
16	3,5099	4,4442
19	3,5205	4,3763
23	4,9590	4,9727
26	3,7676	7,5420

5. Grafy a Tabulky

1.měření		W	W	E663	E644	E452,5	Chlo-a	Chlo-b	Chlo a+b	Car	Chlo	Chlo
9.5.2006		FM [g]	S [g]				mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	a/b	a+b/kar.
20 °C	r1	0,1661	0,0193	1,2856	0,5105	1,4925	0,7690	0,3059	1,0749	0,3645	2,5136	2,9492
	r2	0,1396	0,0317	1,0804	0,4287	1,2051	0,7690	0,3055	1,0744	0,3407	2,5173	3,1532
	r3	0,156	0,0259	1,9001	0,7863	2,1423	1,2083	0,5216	1,7299	0,5374	2,3166	3,2191
	r4	0,1633	0,0214	1,4872	0,5792	1,637	0,9055	0,3463	1,2518	0,3948	2,6149	3,1710
	r5	0,1375	0,0185	1,6121	0,631	1,8199	1,1655	0,4503	1,6158	0,5296	2,5881	3,0512
Průměr		0,1525	0,0234	1,4731	0,5871	1,6594	0,9634	0,3859	1,3494	0,4334	2,5101	3,1087
Směr. Odc		0,0133	0,0055	0,3127	0,1347	0,3513	0,2120	0,0962	0,3067	0,0934	0,1168	0,1082
30 °C												
30 °C	r1	0,3275	0,0299	2,301	1,3057	2,5518	0,6871	0,5135	1,2006	0,2554	1,3380	4,7010
	r2	0,228	0,0206	2,223	1,0721	2,4507	0,9611	0,5490	1,5101	0,3853	1,7506	3,9189
	r3	0,2496	0,0278	2,1072	0,9014	2,301	0,8364	0,3847	1,2211	0,3472	2,1740	3,5170
	r4	0,1824	0,0231	1,3846	0,5254	1,5457	0,7554	0,2737	1,0291	0,3403	2,7602	3,0243
	r5	0,1401	0,0201	1,3694	0,5353	1,5928	0,9717	0,3744	1,3461	0,4643	2,5951	2,8991
Průměr		0,2255	0,0243	1,8770	0,8680	2,0884	0,8423	0,4191	1,2614	0,3585	2,1236	3,6121
Směr. Odc		0,0710	0,0044	0,4617	0,3400	0,4825	0,1250	0,1119	0,1791	0,0758	0,5887	0,7319
2.měření		W	W	E663	E644	E452,5	Chlo-a	Chlo-b	Chlo a+b	Car	Chlo	Chlo
12.5.2006		FM [g]	S [g]				mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	a/b	a+b/kar.
20 °C	r1	0,1832	0,0195	1,7379	0,6969	1,9175	0,9422	0,3823	1,3244	0,4082	2,4647	3,2444
	r2	0,1864	0,02	1,8097	0,7164	2,0275	0,9647	0,3814	1,3461	0,4311	2,5293	3,1228
	r3	0,1028	0,0124	1,3719	0,5332	1,5457	1,3270	0,5053	1,8323	0,6023	2,6259	3,0420
	r4	0,2608	0,0268	2,1351	0,9695	2,4658	0,8091	0,4155	1,2246	0,3624	1,9473	3,3794
	r5	0,073	0,0152	0,8927	0,3721	1,002	1,2128	0,5309	1,7437	0,5338	2,2843	3,2665
Průměr		0,1612	0,0188	1,5895	0,6576	1,7917	1,0511	0,4431	1,4942	0,4676	2,3703	3,2110
Směr. Odc		0,0745	0,0055	0,4746	0,2232	0,5500	0,2122	0,0704	0,2738	0,0981	0,2673	0,1312
30 °C	r1	0,1083	0,013	2,2141	1,0402	2,5331	2,0176	1,1010	3,1185	0,8764	1,8326	3,5585
	r2	0,2249	0,0245	2,0697	0,8712	2,3341	0,9123	0,4070	1,3193	0,4034	2,2417	3,2703
	r3	0,2979	0,0251	2,293	1,0582	2,6862	0,7602	0,4019	1,1621	0,3469	1,8915	3,3498
	r4	0,2352	0,0238	1,993	0,831	2,1854	0,8404	0,3681	1,2085	0,3550	2,2829	3,4040
	r5	0,176	0,0197	2,203	1,0219	2,4935	1,2360	0,6594	1,8954	0,5294	1,8743	3,5804
Průměr		0,2085	0,0212	2,1546	0,9645	2,4465	1,1533	0,5875	1,7408	0,5022	2,0246	3,4326
Směr. Odc		0,0708	0,0051	0,1208	0,1053	0,1923	0,5158	0,3098	0,8243	0,2215	0,2185	0,1339

3.měření		W		W	E663	E644	E452,5	Chlo-a	Chlo-b	Chlo a+b	Car	Chlo	Chlo
15.5.2006		FM [g]	S [g]					mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	a/b	a+b/ka.
20 °C	r1	0,1605	0,0185		1,5189	0,6145	1,6832	0,9396	0,3880	1,3276	0,4089	2,4216	3,2468
	r2	0,2328	0,0265		1,9044	0,7902	2,1279	0,8114	0,3521	1,1635	0,3549	2,3045	3,2781
	r3	0,2379	0,0239		2,1539	0,851	2,223	0,8997	0,3543	1,2540	0,3483	2,5393	3,6008
	r4	0,1983	0,0226		1,6154	0,7195	1,7625	0,8058	0,3995	1,2053	0,3284	2,0168	3,6697
	r5	0,2046	0,0218		1,8693	0,8354	2,0031	0,9036	0,4508	1,3544	0,3557	2,0044	3,8071
	Průměr	0,2068	0,0227		1,8124	0,7621	1,9599	0,8720	0,3889	1,2610	0,3593	2,2573	3,5205
	Směr. Odc	0,0311	0,0029		0,2516	0,0970	0,2318	0,0600	0,0403	0,0803	0,0299	0,2401	0,2473
30 °C	r1	0,3121	0,0331		2,2601	1,1633	2,4982	0,7117	0,4540	1,1657	0,2777	1,5674	4,1984
	r2	0,4892	0,0327		2,3118	1,63	2,5518	0,4562	0,4735	0,9297	0,1425	0,9633	6,5234
	r3	0,4002	0,0344		2,2601	1,2512	2,5151	0,5530	0,3974	0,9503	0,2101	1,3917	4,5240
	r4	0,3652	0,0379		2,1354	1,0038	2,4056	0,5770	0,3152	0,8922	0,2436	1,8307	3,6620
	r5	0,3945	0,0312		2,3635	0,9897	2,6381	0,5941	0,2624	0,8564	0,2585	2,2642	3,3130
	Průměr	0,3922	0,0339		2,2662	1,2076	2,5218	0,5784	0,3805	0,9589	0,2265	1,6035	4,4442
	Směr. Odc	0,0645	0,0025		0,0847	0,2604	0,0845	0,0916	0,0902	0,1211	0,0531	0,4858	1,2531

4.měření		W		W	E663	E644	E452,5	Chlo-a	Chlo-b	Chlo a+b	Car	Chlo	Chlo
18.5.2006		FM [g]	S [g]					mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	a/b	a+b/ka.
20 °C	r1	0,2813	0,0591		2,0351	0,9582	2,1001	0,7139	0,3911	1,1050	0,2550	1,8255	4,3339
	r2	0,2649	0,0483		1,6935	0,6591	1,7023	0,6356	0,2427	0,8784	0,2359	2,6185	3,7236
	r3	0,2456	0,0613		1,683	0,6428	1,6999	0,6818	0,2504	0,9322	0,2572	2,7228	3,6242
	r4	0,3015	0,0412		2,2138	1,0035	2,2989	0,7257	0,3715	1,0973	0,2675	1,9534	4,1025
	r5	0,2469	0,0728		1,6901	0,6564	1,7002	0,6807	0,2588	0,9395	0,2532	2,6298	3,7107
	Průměr	0,2680	0,0565		1,8631	0,7840	1,9003	0,6875	0,3029	0,9905	0,2537	2,3500	3,8990
	Směr. Odc	0,0237	0,0122		0,2468	0,1805	0,2820	0,0351	0,0721	0,1038	0,0114	0,4248	0,3051
30 °C	r1	0,2617	0,0672		2,1381	1,0056	2,2513	0,8062	0,4408	1,2470	0,2997	1,8290	4,1609
	r2	0,2931	0,0589		2,3015	1,1212	2,3998	0,7737	0,4497	1,2234	0,2770	1,7204	4,4165
	r3	0,3029	0,0667		2,3227	1,1397	2,4056	0,7553	0,4445	1,1998	0,2657	1,6993	4,5150
	r4	0,3152	0,0693		2,3451	1,1523	2,4532	0,7328	0,4323	1,1650	0,2628	1,6952	4,4325
	r5	0,2985	0,0521		2,2414	1,0987	2,3618	0,7396	0,4345	1,1741	0,2695	1,7022	4,3565
	Průměr	0,2943	0,0628		2,2698	1,1035	2,3743	0,7615	0,4404	1,2019	0,2750	1,7292	4,3763
	Směr. Odc	0,0200	0,0072		0,0831	0,0583	0,0761	0,0295	0,0071	0,0340	0,0148	0,0566	0,1330

5.měření		W	W	E663	E644	E452,5	Chlo-a	Chlo-b	Chlo a+b	Car	Chlo	Chlo
22.5.2006		FM [g]	S [g]				mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	a/b	a+b/kar.
20 °C	r1	0,3589	0,0701	2,415	1,3809	2,5881	0,6578	0,4976	1,1553	0,2264	1,3219	5,1036
	r2	0,3971	0,0689	2,5328	1,4003	2,6023	0,6246	0,4478	1,0724	0,2006	1,3946	5,3453
	r3	0,3063	0,0651	2,052	0,9989	2,1357	0,6601	0,3832	1,0433	0,2356	1,7226	4,4289
	r4	0,3347	0,0692	2,1989	1,1877	2,3001	0,6441	0,4448	1,0889	0,2185	1,4480	4,9846
	r5	0,3239	0,0705	2,1632	1,1798	2,2875	0,6545	0,4591	1,1136	0,2258	1,4255	4,9327
Průměr		0,3442	0,0688	2,2724	1,2295	2,3827	0,6482	0,4465	1,0947	0,2214	1,4626	4,9590
Směr. Odc		0,0352	0,0021	0,1962	0,1654	0,2045	0,0145	0,0412	0,0424	0,0131	0,1530	0,3364
30 °C	r1	0,3879	0,0723	2,5471	1,482	2,6722	0,6413	0,4985	1,1398	0,2081	1,2863	5,4773
	r2	0,3705	0,0711	2,5982	1,4988	2,6931	0,6852	0,5255	1,2107	0,2178	1,3037	5,5601
	r3	0,3755	0,0687	2,5874	1,4911	2,6866	0,6733	0,5156	1,1889	0,2150	1,3058	5,5305
	r4	0,3429	0,071	2,3225	1,1452	2,5461	0,6670	0,3958	1,0628	0,2618	1,6851	4,0602
	r5	0,3991	0,0688	2,3833	1,1922	2,5783	0,5877	0,3574	0,9450	0,2231	1,6444	4,2353
Průměr		0,3752	0,0704	2,4877	1,3619	2,6353	0,6509	0,4586	1,1094	0,2251	1,4450	4,9727
Směr. Odc		0,0212	0,0016	0,1264	0,1772	0,0681	0,0388	0,0767	0,1080	0,0212	0,2012	0,7562
6.měření		W	W	E663	E644	E452,5	Chlo-a	Chlo-b	Chlo a+b	Car	Chlo	Chlo
25.5.2006		FM [g]	S [g]				mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	mg/g FM	a/b	a+b/kar.
30 °C	r1	0,2851	0,0352	1,9831	0,8952	2,1582	0,6876	0,3494	1,0370	0,2774	1,9681	3,7387
	r2	0,2635	0,0328	1,8524	0,7437	2,0031	0,6982	0,2840	0,9821	0,2919	2,4588	3,3643
	r3	0,2413	0,0411	1,7913	0,7012	1,9843	0,7379	0,2852	1,0231	0,3247	2,5877	3,1512
	r4	0,2661	0,0396	2,0121	1,0023	2,2035	0,7443	0,4494	1,1936	0,2900	1,6561	4,1159
	r5	0,2935	0,0351	2,1854	1,1413	2,3614	0,7312	0,4779	1,2091	0,2706	1,5301	4,4680
Průměr		0,2699	0,0368	1,9649	0,8967	2,1421	0,7198	0,3692	1,0890	0,2909	2,0402	3,7676
Směr. Odc		0,0204	0,0035	0,1533	0,1821	0,1552	0,0253	0,0908	0,1047	0,0208	0,4711	0,5374
30 °C	r1	0,3361	0,0437	2,2318	1,8528	2,5927	0,6333	0,8290	1,4624	0,1910	0,7640	7,6572
	r2	0,3182	0,0421	2,1942	1,7913	2,4813	0,6586	0,8421	1,5007	0,1880	0,7820	7,9835
	r3	0,3005	0,0351	2,1901	1,7892	2,5006	0,6960	0,8909	1,5869	0,2039	0,7813	7,7834
	r4	0,3542	0,0371	2,3214	1,9316	2,7532	0,6250	0,8207	1,4457	0,1987	0,7615	7,2745
	r5	0,2985	0,0389	2,1768	1,6925	2,4967	0,6991	0,8348	1,5338	0,2188	0,8374	7,0113
Průměr		0,3215	0,0394	2,2229	1,8115	2,5649	0,6624	0,8435	1,5059	0,2001	0,7852	7,5420
Směr. Odc		0,0238	0,0035	0,0587	0,0883	0,1140	0,0344	0,0276	0,0568	0,0122	0,0307	0,3936

Tab. č. 1b: Průměrné hodnoty čerstvé hmoty při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	FM20 1.měření	FM20 2.měření	FM30 1.měření	FM30 2.měření
1	0,1416	0,1191	0,1525	0,2255
2	0,1831	0,1855	0,1612	0,2085
3	0,1639	0,2398	0,2068	0,3922
4	0,2245	0,2953	0,2680	0,2943
5	0,3129	0,3222	0,3442	0,3752
6	0,3088	0,3710	0,2699	0,3215

Tab. č. 2b: Průměrné hodnoty sušiny při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	DM20 1.měření	DM20 2.měření	DM30 1.měření	DM30 2.měření
1	0,0269	0,0234	0,0211	0,0243
2	0,0451	0,0188	0,0310	0,0212
3	0,0429	0,0227	0,0626	0,0339
4	0,0519	0,0565	0,0645	0,0628
5	0,0642	0,0688	0,0626	0,0704
6	0,0642	0,0368	0,0721	0,0394

Tab. č. 3b: Průměrné hodnoty chlorofylu *a* při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	ChlA20 1.měření	ChlA20 2.měření	ChlA30 1.měření	ChlA30 2.měření
1	0,9522	0,9634	1,2762	0,8423
2	0,9050	1,0511	0,9966	1,1533
3	0,8387	0,8720	0,9169	0,5784
4	0,8287	0,6875	0,7743	0,7615
5	0,8038	0,6482	0,7130	0,6509
6	0,6728	0,7198	0,6784	0,6624

Tab. č. 4b: Průměrné hodnoty chlorofylu *b* při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	ChlB20 1.měření	ChlB20 2.měření	ChlB30 1.měření	ChlB30 2.měření
1	0,3305	0,3859	0,5225	0,4191
2	0,3234	0,4431	0,4289	0,5875
3	0,3100	0,3889	0,4377	0,3805
4	0,3329	0,3029	0,4613	0,4404
5	0,4177	0,4465	0,5001	0,4586
6	0,3540	0,3692	0,4691	0,8435

Tab. č. 5b: Průměrné hodnoty chlorofylů při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	Chl20 1.měření	Chl20 2.měření	Chl30 1.měření	Chl30 2.měření
1	1,2827	1,3494	1,7987	1,2614
2	1,2284	1,4942	1,4255	1,7408
3	1,1487	1,2610	1,3546	0,9589
4	1,1616	0,9905	1,2356	1,2019
5	1,2215	1,0947	1,2131	1,1094
6	1,0267	1,0890	1,1475	1,5059

Tab. č. 6b: Průměrné hodnoty karotenoidů při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

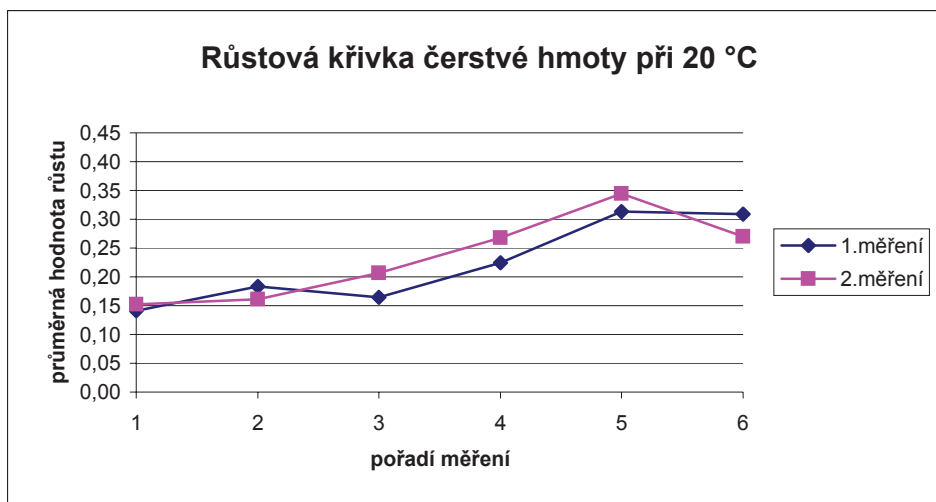
pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	Car20 1.měření	Car20 2.měření	Car30 1.měření	Car30 2.měření
1	0,3617	0,4334	0,5237	0,3585
2	0,3668	0,4676	0,4246	0,5022
3	0,3379	0,3593	0,3649	0,2265
4	0,3344	0,2537	0,3195	0,2750
5	0,3181	0,2214	0,2817	0,2251
6	0,2792	0,2909	0,2682	0,2001

Tab. č. 7b: Průměrné hodnoty chlorofylů a/b při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

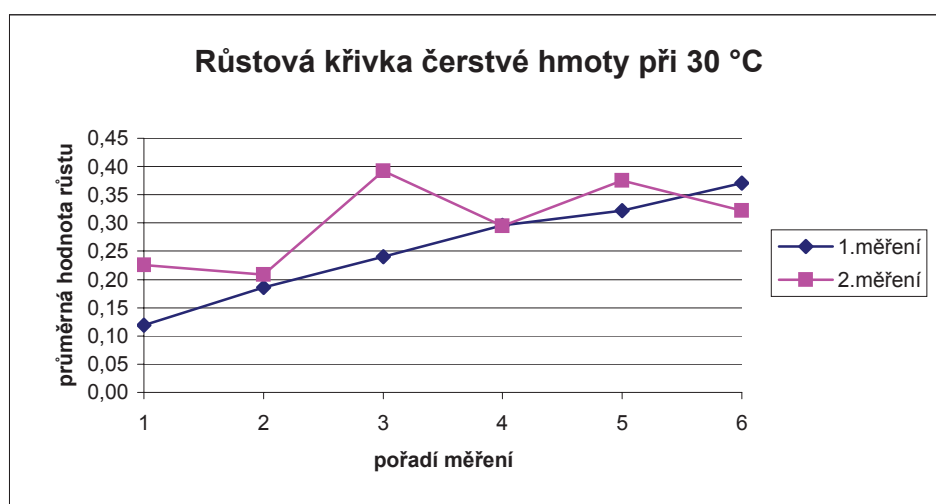
pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	ChlA/ChlB20 1.měření	ChlA/ChlB20 2.měření	ChlA/ChlB30 1.měření	ChlA/ChlB30 2.měření
1	2,8811	2,5101	2,4425	2,1236
2	2,7987	2,3703	2,3237	2,0246
3	2,7050	2,2573	2,0946	1,6035
4	2,4892	2,3500	1,6784	1,7293
5	1,9243	1,4626	1,4258	1,7292
6	1,9008	2,0402	1,4461	0,7852

Tab. č. 8b: Průměrné hodnoty chl/car při 20 °C a 30 °C v 1. a 2.měření

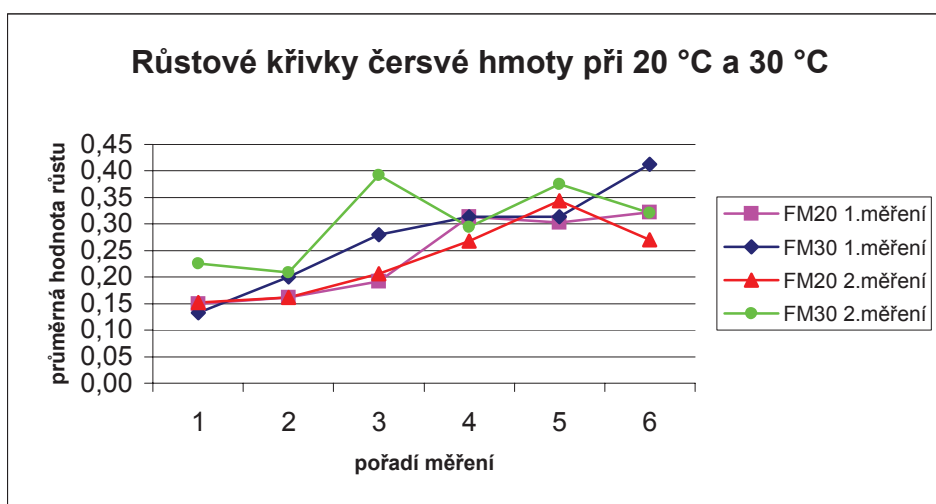
pořadí měření	průměrné hodnoty		průměrné hodnoty	
	Chl/Car20 1.měření	Chl/Car20 2.měření	Chl/Car30 1.měření	Chl/Car30 2.měření
1	3,5464	3,1087	3,4347	3,6121
2	3,3486	3,2110	3,3574	3,4326
3	3,3998	3,5099	3,7121	4,4442
4	3,4737	3,5205	3,8676	4,3763
5	3,8402	4,9590	4,3064	4,9727
6	3,6769	3,7676	4,2791	7,5420



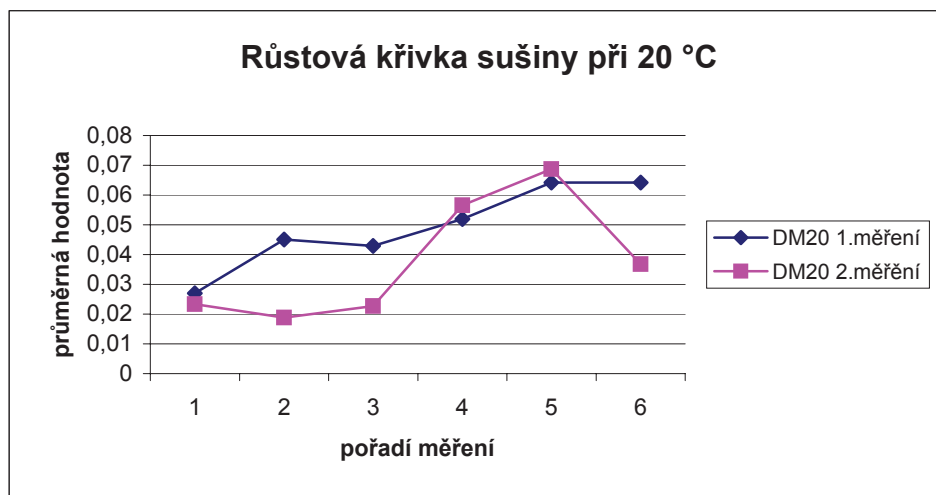
Graf č. 1: Závislost přírůstku čerstvé hmoty v gramech na pořadí měření při 20 °C



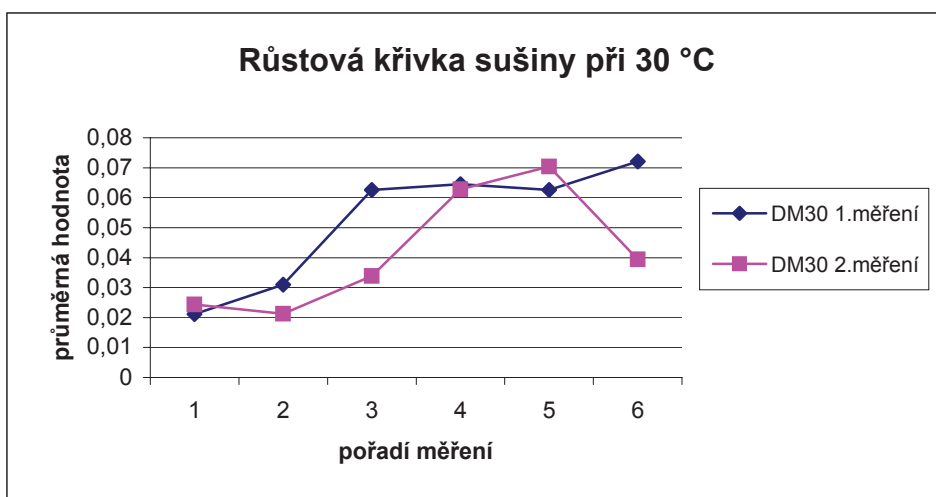
Graf č. 2: Závislost přírůstku čerstvé hmoty v gramech na pořadí měření při 30 °C



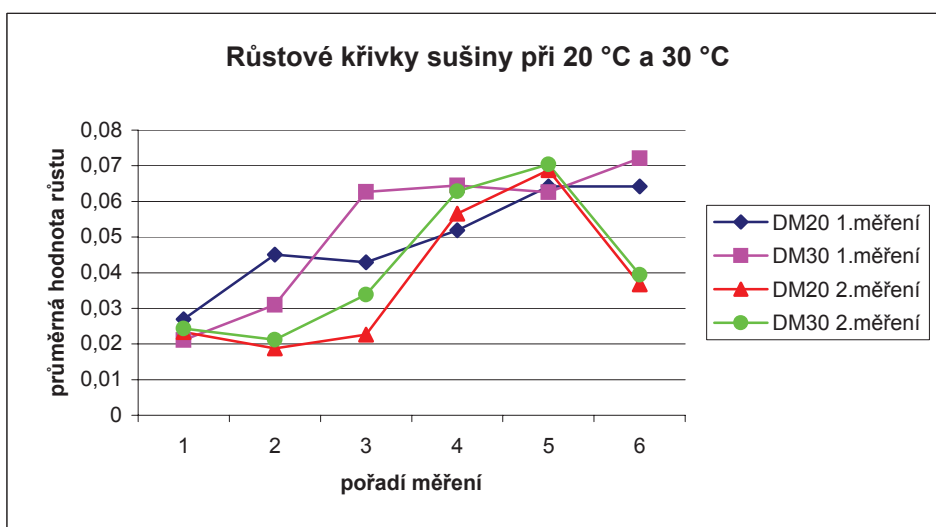
Graf č. 3: Závislost přírůstku čerstvé hmoty v gramech na pořadí měření při 20 °C a 30 °C



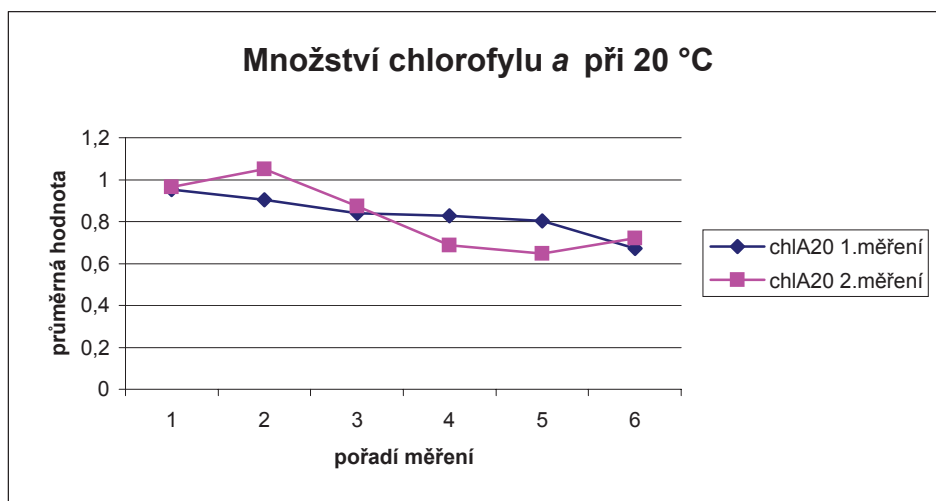
Graf č. 4: Závislost přírůstku sušiny v gramech na pořadí měření při 20 °C



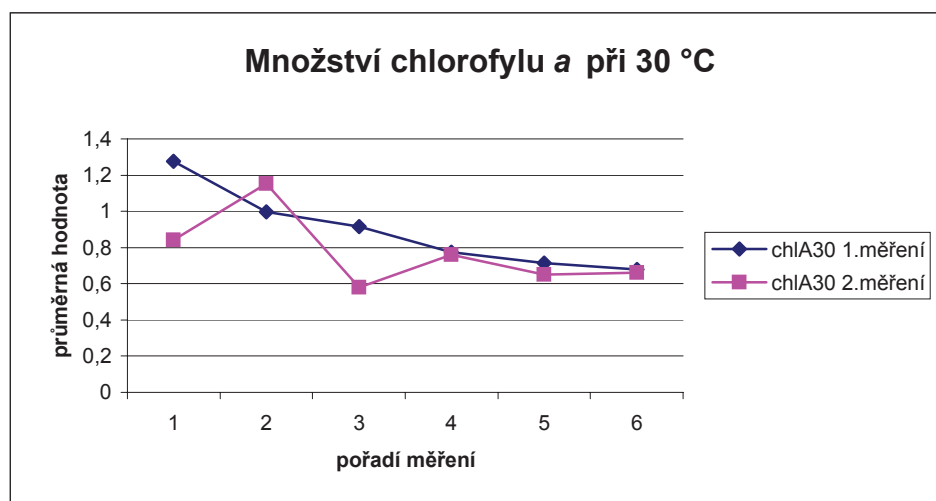
Graf č. 5: Závislost přírůstku sušiny v gramech na pořadí měření při 30 °C



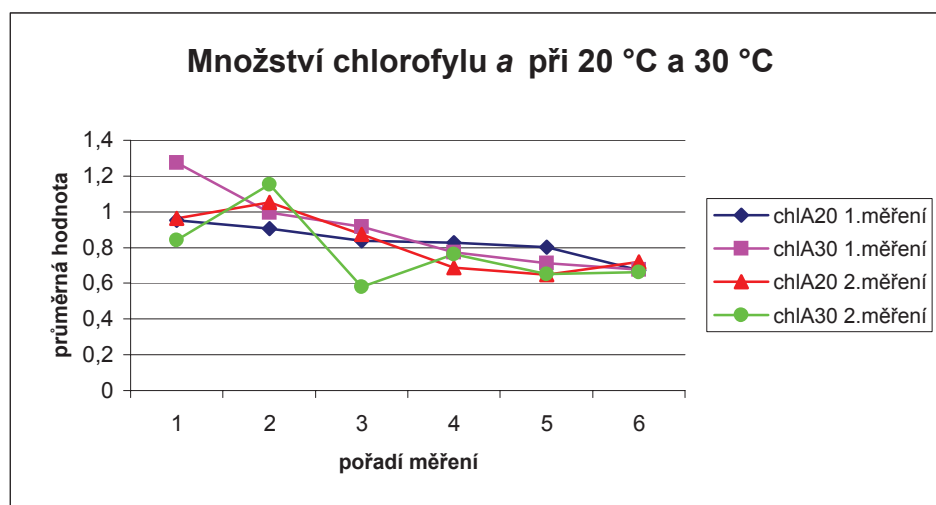
Graf č. 6: Závislost přírůstku sušiny v gramech na pořadí měření při 20 °C a 30 °C



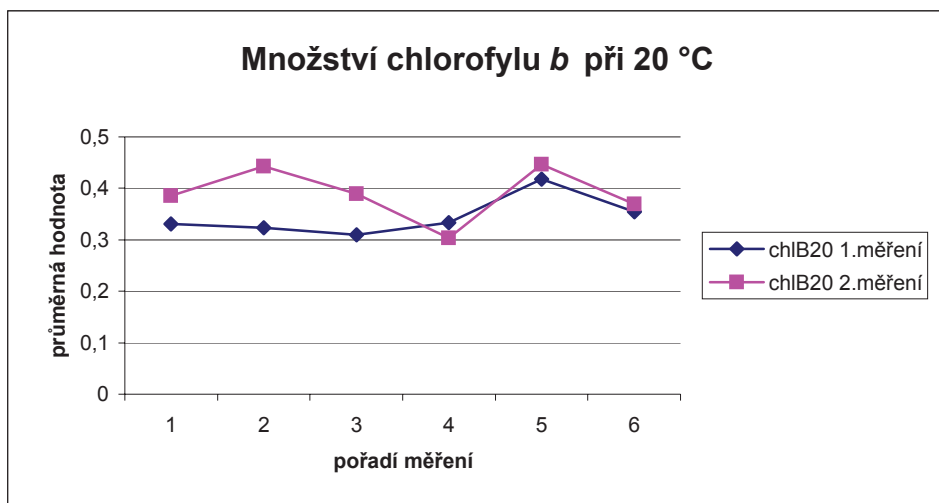
Graf č. 7: Závislost množství chlorofylu a (mg/g) na pořadí měření při 20 °C



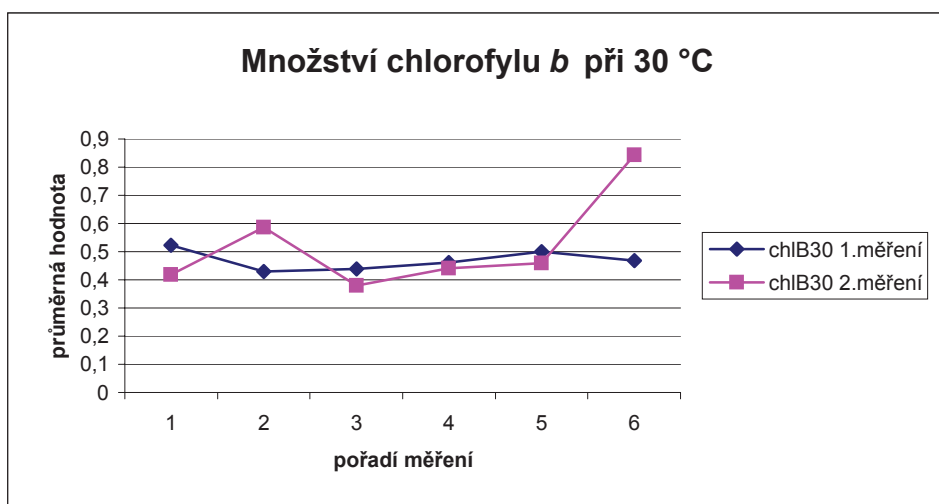
Graf č. 8: Závislost množství chlorofylu a (mg/g) na pořadí měření při 30 °C



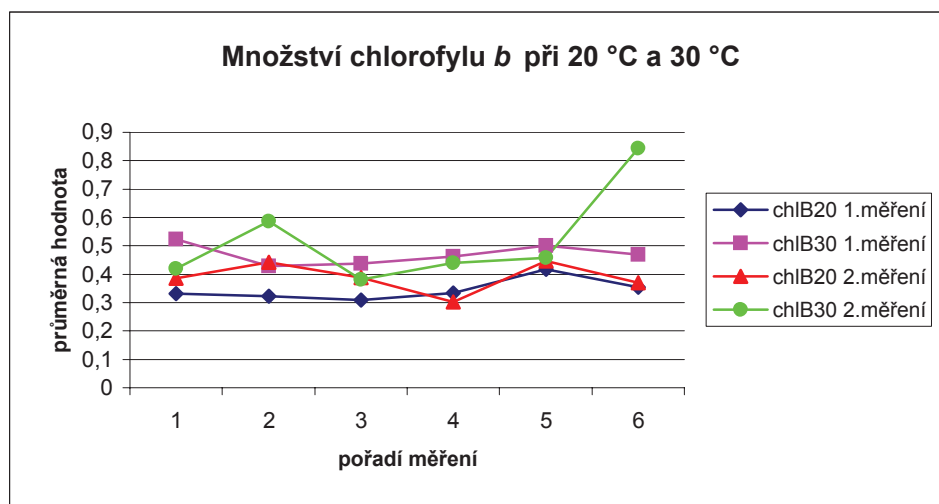
Graf č. 9: Závislost množství chlorofylu a (mg/g) na pořadí měření při 20 °C a 30 °C



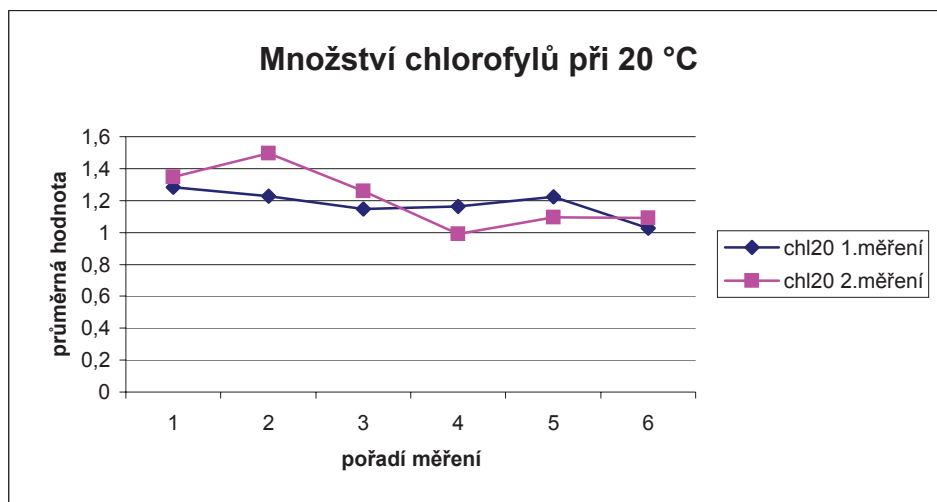
Graf č. 10: Závislost množství chlorofylu *b* (mg/g) na pořadí měření při 20 °C



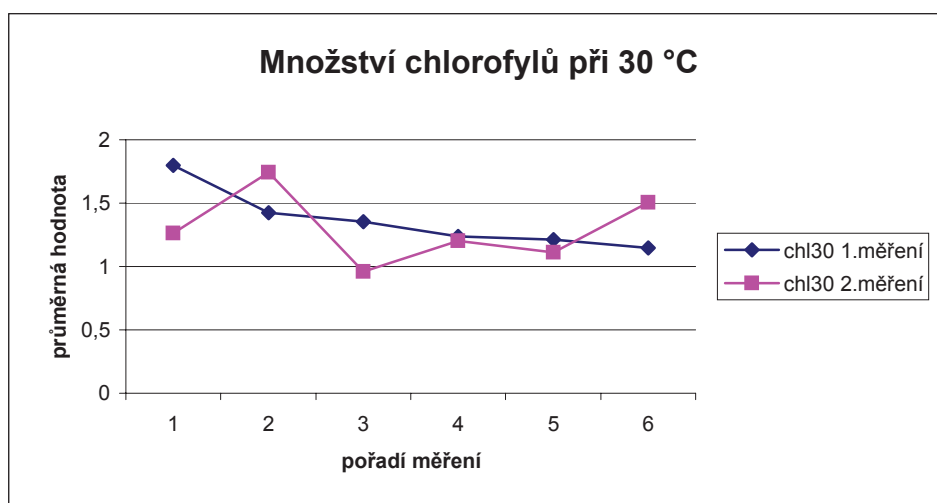
Graf č. 11: Závislost množství chlorofylu *b* (mg/g) na pořadí měření při 30 °C



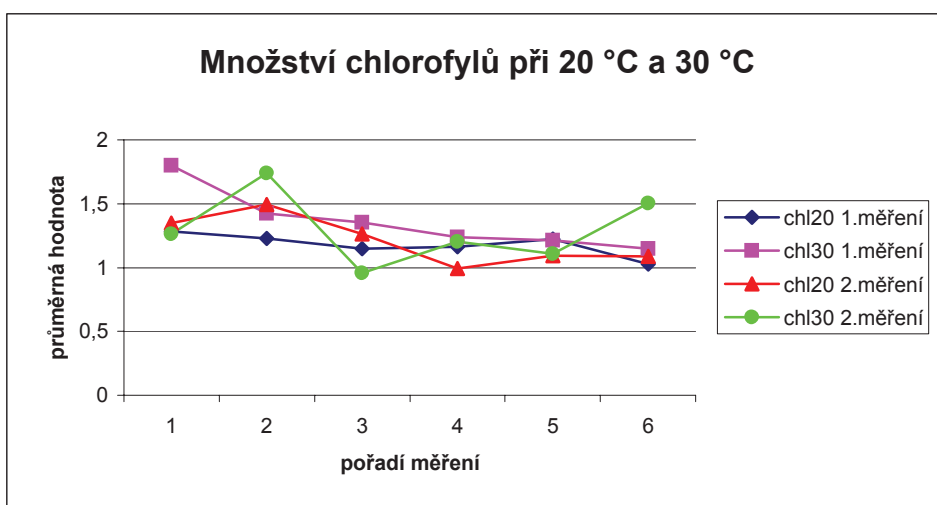
Graf č. 12: Závislost množství chlorofylu *b* (mg/g) na pořadí měření při 20 °C a 30 °C



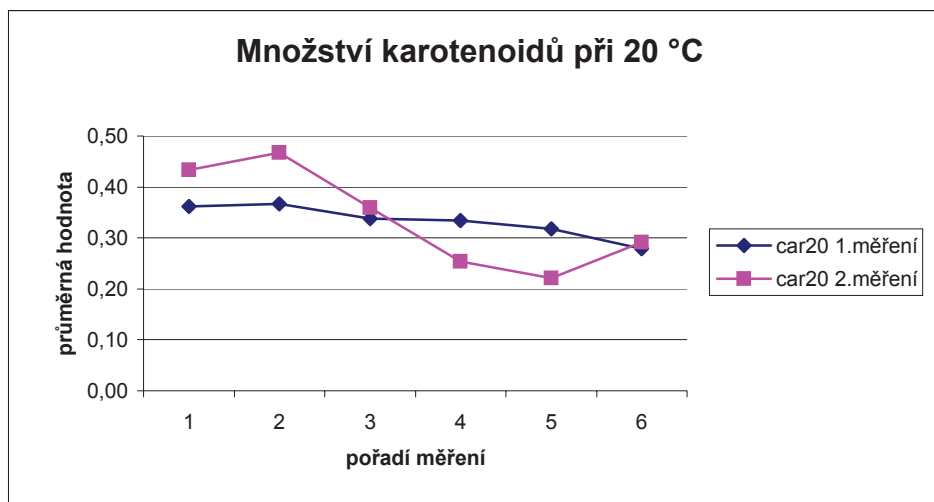
Graf č. 13: Závislost množství chlorofylů (mg/g) na pořadí měření při 20 °C



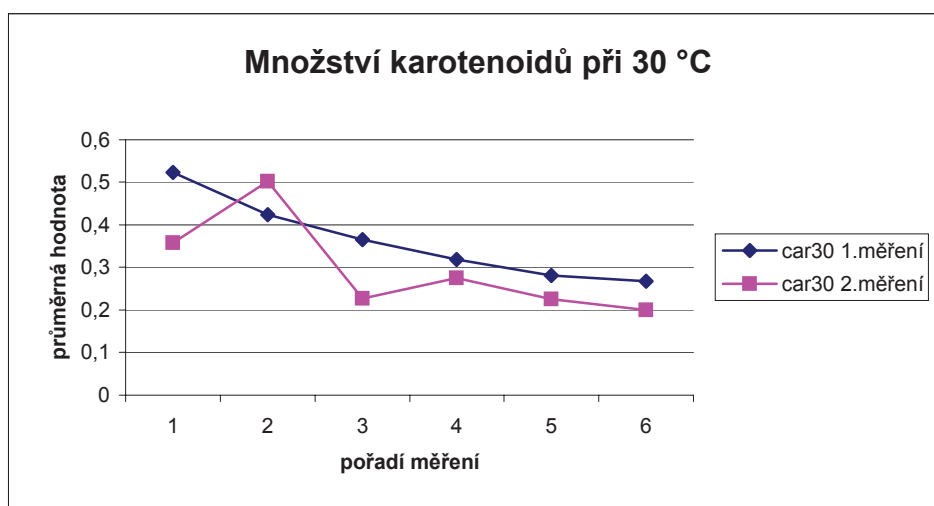
Graf č. 14: Závislost množství chlorofylů (mg/g) na pořadí měření při 30 °C



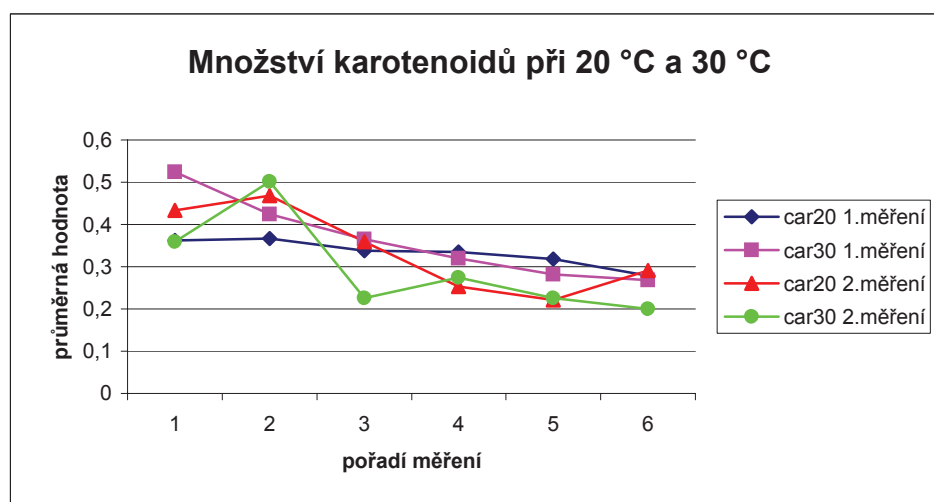
Graf č. 15: Závislost množství chlorofylů (mg/g) na pořadí měření při 20 °C a 30 °C



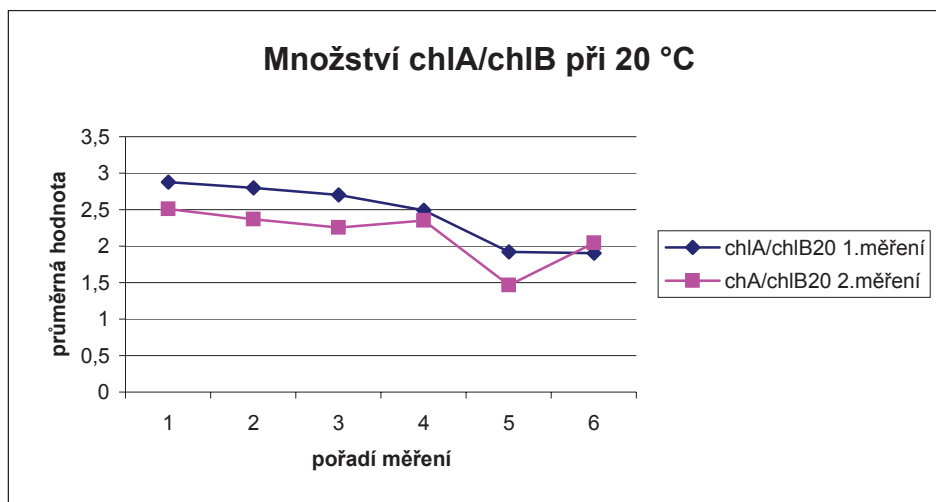
Graf č. 16: Závislost množství karotenoidů (mg/g) na pořadí měření při 20 °C



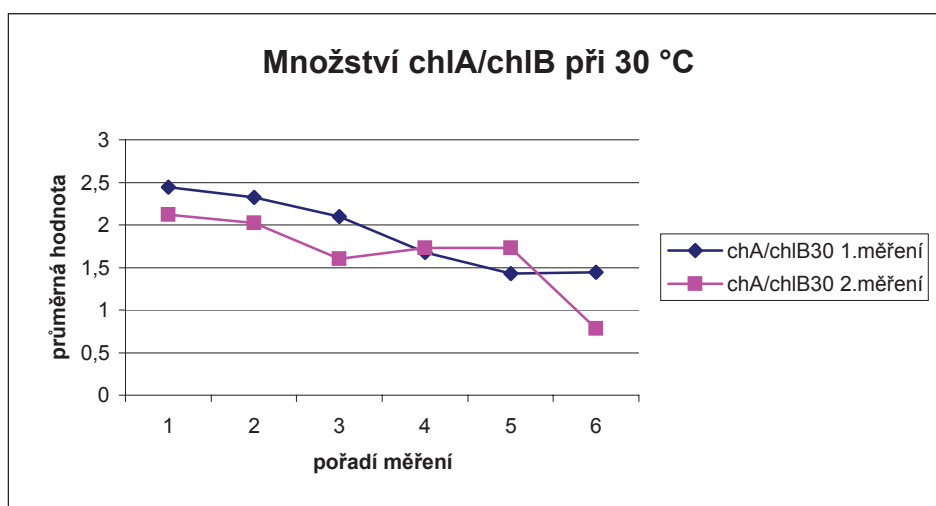
Graf č. 17: Závislost množství karotenoidů (mg/g) na pořadí měření při 30 °C



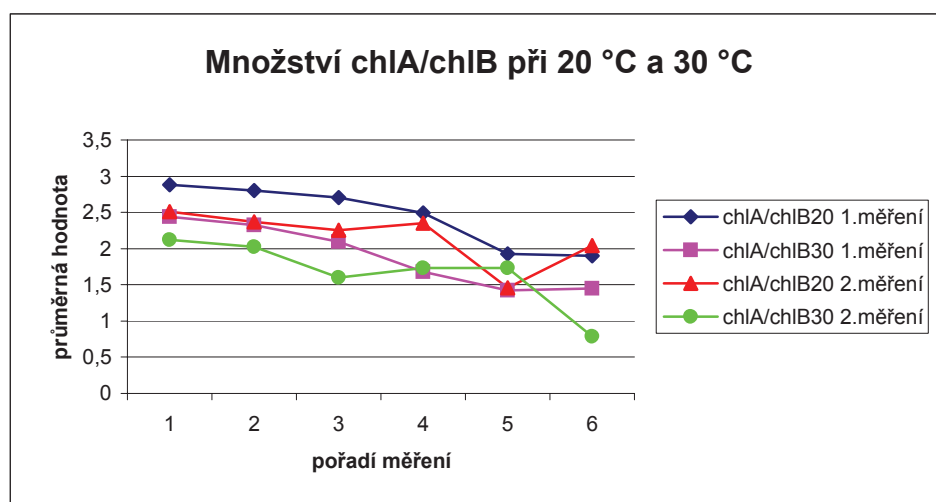
Graf č. 18: Závislost množství karotenoidů (mg/g) na pořadí měření při 20 °C a 30 °C



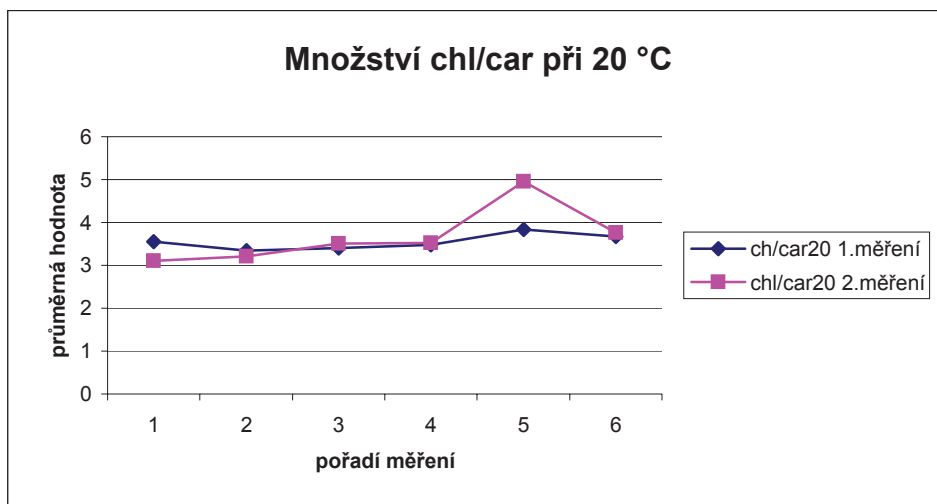
Graf č. 19: Závislost množství chlorofylů *a/b* (mg/g) na pořadí měření při 20 °C



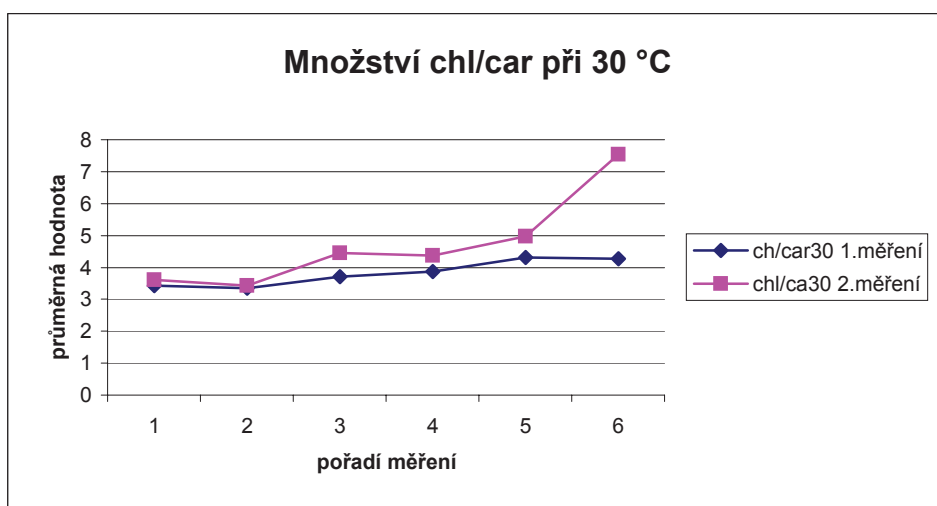
Graf č. 20: Závislost množství chlorofylů *a/b* (mg/g) na pořadí měření při 30 °C



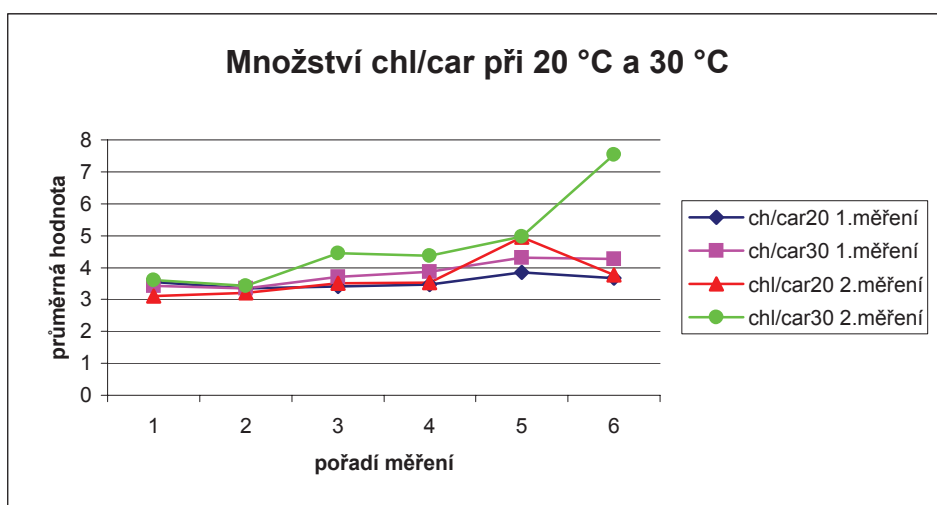
Graf č. 21: Závislost množství chlorofylů *a/b* (mg/g) na pořadí měření při 20 °C a 30 °C



Graf č. 22: Závislost množství chl/car (mg/g) na pořadí měření při 20 °C



Graf č. 23: Závislost množství chl/car (mg/g) na pořadí měření při 30 °C



Graf č. 24: Závislost množství chl/car (mg/g) na pořadí měření při 20 °C a 30 °C

6. Diskuse

Vliv zvýšené teploty a zvýšené ozáření na množství fotosyntetických pigmentů je všeobecně znám (Berry and Björkman, 1980; Teeri 1980; Weiss, Berry, 1998; Krause, Weiss, 1991; Šetlík, 1972; Hess, 1983). Ve většině prací se však autoři zabývají pouze jedním ze stresových faktorů. V této práci však byla použita kombinace obou těchto veličin.

Zvýšená teplota a ozáření neměly vliv na rychlost růstu rostlin, na rozdíl od rostlin, které trpí např. nedostatkem dusíku. Podle Šebánka a kol. (1983) je významná část veškerého dusíku lokalizována v chloroplastech. Význam dusíku spočívá v tom, že má vliv zejména na tvorbu chlorofylu a tvorbu enzymu Rubisco (Ericsson, 1995). V obou případech byla velikost rostlin prakticky stejná a postupně se zvyšovala v závislosti na dnech kultivace.

Menší množství odebíraných rostlin mohlo způsobit určité odchylky v datech. Vždy bylo odebíráno 5 vzorků ke každému měření. Množství sušiny odpovídá naměřeným hodnotám čerstvé hmoty a také se lineárně zvyšuje.

Podle Krause a Weisse (1991) se zvyšující se hodnotou toku fotonů roste účinnost fotosyntézy, to znamená, že fotosyntetická aktivita by při vyšší ozáření měla stoupat. To samé platí i pro stoupající teplotu, kdy rychlost fotosyntézy roste (Šetlík a kol., 1998). Teplota u stresovaných rostlin nebyla natolik vysoká, aby došlo k porušení fotosyntetického aparátu, naopak rostliny se adaptovaly na teplotu 30 °C, což se projevilo vyšším množstvím fotosyntetických pigmentů, a tím i zvýšenou aktivitou fotosyntézy.

Množství chlorofylu *a* jako hlavního fotosyntetického pigmentu (Procházka a kol., 1998) mělo jak u kontrolních, tak u stresovaných rostlin sestupný charakter. V případě 2. měření došlo k výraznému snížení mezi 13. a 16. dnem kultivace, tyto hodnoty odpovídají výraznému nárůstu čerstvé hmoty. U stresujících vzorků byla hladina chlorofylů vyšší vzhledem k vyšší aktivitě fotosyntézy, která je dána podmínkami růstu. Lichtenthaler a Rinderle (1988) poukazují také na to, že u vysoké ozáření má rostlina tzv. „Sun listy“, které obsahují méně thylakoidů v granech, což má za následek změnu fotosyntetického aparátu umožňující efektivnější využití přijímaného světelného záření (chloroplasty vykazují vyšší

fotosyntetickou aktivitu). U kontrolních variant byl průběh téměř lineární, zde se hodnoty chlorofylu *a* snižovaly téměř pravidelně s dobou kultivace rostlin.

Chlorofyl *b* je druhým nejdůležitějším pigmentem v rostlině, jeho funkce odpovídá funkci chlorofylu *a*, hraje však významnou roli při funkci LHC 1 a LHC 2. Chlorofyl *b* slouží k snažšímu vychytávání co nejvíce slunečního záření při zastínění listů, tzn., čím více budou listy zastíněny, tím více bude vzrůstat fotosyntetická aktivita chlorofylu *b* (Lichtenthaler, 1987). Ve výsledcích se potvrdilo, že u kontrolních vzorků rostliny nebyly tolik zastíněné, tím pádem množství chlorofylu *b* bylo nižší, naopak u stresovaných rostlin bylo množství chlorofylu *b* vyšší.

Množství chlorofylů *a+b* je silně ovlivněno hodnotou chlorofylu *a*, hodnoty pigmentů u stresovaných rostlin jsou proto vyšší, významné rozdíly však nejsou patrné.

Pro fotosyntetizující organismy je přítomnost karotenoidů v jejich fotosyntetickém aparátu nezbytná vzhledem ke škodlivosti světla a kyslíku (Siefermann-Harms, 1987). Ve výsledcích můžeme pozorovat, že při 30 °C nejprve došlo k nárůstu množství karotenoidů, který byl způsoben vysokou ozářeností, poté následoval postupný pokles, značící přizpůsobení se rostlin tomuto ozáření.

Poměrné zastoupení chlorofylu *a+b* ku karotenoidům vykazuje mírný nárůst ve stresujících podmínkách, který je ovlivněn především hodnotou chlorofylu *a*. Při květnovém měření vysoká hodnota 26. dne kultivace je zřejmě dána chybou měření.

Ve výsledcích se potvrdilo, že vysoká ozářenost a teplota ovlivňují růst a fotosyntetickou aktivitu rostlin. Podle předpokladů si rostliny vytvořily obranný aparát a rostliny ve stresujících podmínkách vykazovaly zvýšenou fotosyntetickou aktivitu.

7. Závěr

Cíl diplomové práce, že vysoké teplota a ozáření má vliv na množství a poměrné zastoupení fotosyntetických pigmentů rostlin byl potvrzen. Z výsledků lze konstatovat, že proti vysoké teplotě a ozáření si pšenice setá (*Triticum aestivum*) vytváří obranný mechanismus. Rostliny obsahovaly vyšší množství všech fotosyntetických pigmentů. Tedy aktivita fotosyntézy byla vyšší.

V průběhu této práce jsem zjistila, že úvodní uspořádání pokusu nebylo úplně vhodné. Pro případné pokračování v této práci bych proto doporučovala:

- 1) zvýšení plochy pro pěstování rostlin a zvýšení počtu rostlin použitých pro jednotlivá měření.
- 2) při kultivaci rostlin je pěstovat při 20 °C a optimálních podmínkách, při 20 °C a vysokém ozáření, dále při 30 °C v optimálních podmínkách a 30 °C ve stresujícím prostředí.
- 3) rozlišit ozáření jiným způsobem než vzdáleností od zdroje, např. jiným spektrem záření.
- 4) využít i jiné metody měření než spektrofotometrické pro porovnání výsledků.

8. Seznam použité literatury

Arnon D. I., 1949: Cooper enzymes in isolated chloroplastes. *Plant Physiol.* 24: 1–15.

Baker N. R., 1996: *Photosynthesis and the Enviroment*, 196–211 s., Kluwer Academie Publishers.

Beneš K., 1994: Úvod do biologie buňky. Skriptum, BF JU, České Budějovice.

Berry J., Björkman O., 1980: Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants.. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 491–543.

Björkman, O. & P. Holmgren, 1963: Adaptability of the photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats. *Biologia Plantarum* 16: 889–914.

Brunold, Ch., Rueggenger, A., Brandle, R., 1996: *Stress bei pflanzen*. 17–148 s., Verlag Paul Haupt, Berlin, Stuttgart, Wien.

Burke J. J., 1990: High temperature Stress and adaptations in Crops, 295–309 s., Wiley–Liss.

Drbal K., Křížek M., 1993: *Anorganická a analytická chemie*, 98 s., Skriptum, ZF JU, České Budějovice.

Drbal K., Křížek M., 1999: *Anorganická a analytická chemie*, 121–176 s., Skriptum, ZF JU, České Budějovice.

Ericsson T., 1995: Growth and shoot/root ratio of seedlings in ratio to nutrient availability, *Plant and Soil*, 168–169: 205–214.

Evans J. R., Terashima I., 1987: Effects of nitrogen nutrion of electron transport components and fotosynthesis in spinach. *Aust. J. Plant Physiol.* 14: 59–68.

Filek M., Biesaga–Kóscielniak J., Marcińska I., 2004: *Analytical Methods in Plant Stress Biology*, 166 s., Polish Acad. Sci., Krakow.

Hess D., 1983: *Fyziologie rostlin*, 341 s., Academia, Praha.

Hoover J. K., 1984: *Chloroplasts.*, Plenum Press. – In: Kutík J., Beneš K., 1991: Chloroplasty – fotosyntetizující organely rostlinných buněk. *Biologické listy* 56 (4), 292–318.

Krause G. H., Weis E, 1991: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 313–349.

Larcher W., 1988: Fyziologická ekologie rostlin, 165–167 s., Academia, Praha.

Lichtenthaler H. K., 1987: Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes – In: Methods in Enzymology, Vol. 148, 350–382.

Lichtenthaler H. K. a kol., 1998: Plant stress detection by reflectance and fluorescence. Ann. N. Y. Acad. Sci. this volume.

Lichtenthaler H. K., Pfister K., 1978: Practicum der Photosynthese Quelle meyer Verlag, Heidelberg–In: Biochemical Society Transactions, 591–592.

Lichtenthaler H. K., Rinderle U., 1988: Chlorophyll fluorescence signatures as vitality indicator in forest decline research, 327–408 s., Kluwer Academic Publishers.

Liker E., Garab G., 1995: Diurnal fluctuation in composition of chlorophyll *a/b* light harvesting antenna of photosystem II in young wheat leaves, Physiol. Plantarum 93: 187–190.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J a kol., 1998: Fyziologie rostlin, 89–173 s., Academia, Praha.

Röbbelen G., 1957: Untersuchungen an Strahleninduzierten Blattfarbmutaten von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – Z. indukt. Abstammungs – u. Vererbungslehre 88, 189–252.

Siefermann-Harms D., 1987: The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes, Physiol. Plantarum 69: 561–568 s., Copenhagen.

Smith J. H. C., Benitez A., 1995: Chlorophylls: analysis in plant materials. – In: Paech K., Tracey M., V., 1995: Modern Methods of Plant Analysis. Sv. IV., 146–196 s., Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Sofrová D., 1992: Fotosyntéza, 212–228 s., Katedra biochemie PŘF UK, Praha. – převzato z knihy: Šípal Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžicka I., 1992: Biochemie, SPN, Praha.

Šebánek J. a kol., 1983: Fyziologie rostlin, 144–256 s., Státní zemědělské nakladatelství, Praha.

Šesták Z., 1985: Photosynthesis during leaf development, 76–107 s., Academia, Praha.

Šesták Z., Čatský J. a kol., 1966: Metody studia fotosyntetické produkce rostlin, 335–363 s., Academia, Praha.

Šetlík I., 1972: Fotosyntéza. Malé makromolekulární monografie. 10. svazek, Ústav makromolekulární chemie ČSAV, Praha.

Šetlík a kol., 1998: Fyziologie rostlin, 15–50 s., Ústav makromolekulární chemie ČSAV, Praha.

Teeri J. A., 1980: Adaptation of enzymes to temperature variability – In: Turner NC, PJ Kramer (eds): „Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress,“ 251–260 s., New York: John Wiley and Sons.

Voet D., Voetová J. G., 1995: Biochemie, 258–290 s., Victoria Publishing, Praha.

Weis E., Berry J. A., 1998: Plants and high temperature stress – In: Plants and temperature, 329–346 s., Long, S.P., Woodward, F. I., eds. Society for Experimental Biology, Cambridge, UK.

Ziegler H., Eggler K., 1965: Zur quantitative Analyse der Chloroplastenpigmente. Beitr. Biol. Pflanzen. 41, 39–63.