

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze  
Katedra fyziologie rostlin

Eliška Hlízová

# Využití fluorescence chlorofylu ke sledování fyziologického stavu vegetace



Bakalářská práce

Praha, 2008

Školitel: Doc. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. Zuzana Lhotáková

## Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>4</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>5</b>
<b>Literární přehled</b> .....	<b>6</b>
1. Co je to fluorescence .....	6
2. Typy rostlinné fluorescence .....	6
3. Fluorescence chlorofylu .....	8
3.1. Fluorescence chlorofylu na úrovni fotosystému II.....	9
3.1.1. Fluorescenční indukční křivka .....	9
3.1.2 Určení fluorescenčních parametrů metodou saturačních pulzů .....	9
3.1.3. Fluorescenční zhášení .....	11
3.2. Vliv anatomie rostlin, vnějších podmínek prostředí a stresových faktorů na fluorescenci chlorofylu.....	11
3.2.1. Nejčastěji využívané parametry .....	12
3.2.1.1. Určování čistého výtěžku fotosyntézy pomocí „fluorescence decrease ratio“ .....	13
3.2.1.2. Sledování poklesu maximálního kvantového výtěžku PSII v reakci na suboptimální podmínky prostředí pomocí poměru $F_v/F_M$ .....	15
3.2.1.3. Porovnávání intenzity fluorescence s maximy o různé vlnové délce.....	18
3.2.1.3.1. Porovnávání intenzity krátkovlnné a dlouhovlnné fluorescence.....	18
3.2.1.3.1. Využití poměru modro-zelené fluorescence a fluorescence chlorofylu	21
3.2.2. Detekce biotického stresu pomocí fluorescence chlorofylu.....	23
3.3. Dálkový průzkum pomocí fluorescence chlorofylu .....	25
4.3.1. Aktivní techniky dálkového průzkumu .....	26
4.3.2. Pasivní techniky dálkového průzkumu .....	27
<b>Závěr</b> .....	<b>29</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>30</b>

## Abstrakt

Fluorescence chlorofylu představuje záření emitované během deexcitace chlorofylu *a*, který byl excitován absorpcí viditelného či UV záření.

Analýzou fluorescence chlorofylu lze získat mnohé fluorescenční parametry, které umožňují kvalitativně i kvantitativně charakterizovat funkčnost fotosyntetického aparátu rostlin, jejich fyziologický stav, úroveň stresu, jemuž jsou rostliny vystaveny, fotoinhibiční a ochranné procesy.

Tato práce porovnává nejčastěji využívané parametry a vlivy různých stresových faktorů na fyziologický stav rostlin.

Parametr  $R_{FD}$  bývá považován za index vitality rostliny a vyjadřuje míru poklesu fluorescence z  $F_M$  na  $F_S$ . Silně koreluje s výtěžkem čisté fotosyntézy ( $P_N$ ). Maximální kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu  $F_V/F_M$  je dobrým indikátorem fotoinhibice. Fluorescence chlorofylu vykazují maxima v oblasti krátkovlnného červeného a dlouhovlnného červeného (far red) záření. Parametr  $F_{690}/F_{735}$  porovnává jejich intenzitu a bývá používán při zjišťování obsahu chlorofylu. Změny hodnot parametru  $BF/ChlF$ , který porovnává intenzitu modré fluorescence s intenzitou fluorescence chlorofylu, jsou rovněž dobrým indikátorem působení stresových podmínek.

K postihnutí heterogenity fluorescenčního signálu napříč listem slouží v dnešní době stále častěji používané zobrazovací metody. Využití těchto metod napomáhá odhalení působení stresových faktorů ještě před viditelnými projevy na rostlině, čehož by do budoucna mohlo být hojně využíváno například v zemědělství.

Měření fluorescence chlorofylu dnes nachází uplatnění i v bezkontaktním dálkovém průzkumu v podmínkách vnějšího prostředí. Fluorescence chlorofylu zde může být snímána aktivními technikami, kdy je měřena laserem indukovaná fluorescence, i technikami pasivními, kdy je snímána fluorescence indukovaná slunečním zářením.

**Klíčová slova:** fluorescence chlorofylu, fotosyntéza, stres, fotoinhibice, dálkový průzkum, fluorescenční zhášení, fluorescenční parametry, modrá fluorescence

## Abstract

Chlorophyll fluorescence represents radiation emitted during the deexcitation of chlorophyll *a* that have been excited by absorption of visible radiation or UV radiation.

Under various stress conditions the photosynthetic quantum conversion declines, with a concomitant increase in chlorophyll fluorescence, therefore changes of chlorophyll fluorescence can reflect plant physiological status.

By using fluorescence analysis is possible to determine several fluorescence parameters which enable quantitatively and qualitatively characterize function of plant photosynthetic apparatus, physiological status, level of occurring stress factors and photoprotective mechanisms.

Selected fluorescent parameters are introduced. Fluorescence decrease ratio ( $R_{FD}$ ) is considered as a rapid vitality index of the leaves and the values of  $R_{FD}$  are linearly correlated to the net photosynthetic  $CO_2$  fixation rate. Parameter  $F_V/F_M$  is related to the quantum efficiency of PSII and is a good indicator of photoinhibition. Chlorophyll fluorescence of leaves consists of two maxima in the red (near 670 - 690 nm) and far red region (near 730 - 740 nm). By assessing fluorescence ratio red/far-red fluorescence ( $F_{690}/F_{735}$ ) are detected differences in chlorophyll content. Ratio blue-green/chlorophyll fluorescence ( $BF/F_{Chl}$ ) is a sensitive indicator of incidence of various suboptimal conditions.

Recently developed imaging methods detects the distribution of fluorescence signal and gradients in photosynthetic activity across the leaf, as well as its spatial heterogeneity and patchiness. Imaging methods represent a promising tool for early detection of stress factors, which is needed for example in agriculture.

As fluorescence can provide information on photosynthetic activity over long distances the application of remote sensing seems quite suitable. The passive Chl-F techniques detect sun excited emission by measuring the filling of Fraunhofer lines. More recently the interest was also devoted to vegetation remote sensing by laser induced fluorescence. Remote sensing of chlorophyll fluorescence has a high potential to monitor photosynthetic activity and health status of vegetation on the global-scale.

## Seznam použitých zkratk

<b>BF/ChlF</b>	poměr modro-zelené fluorescence a fluorescence chlorofylu
<b>F690/F735</b>	poměr krátkovlnné červené (s maximem o vlnové délce 690 nm) a dlouhovlnné červené fluorescence (s maximem o vlnové délce 735 nm)
<b>F<sub>0</sub></b>	minimální výtěžek fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu
<b>F<sub>0</sub>'</b>	minimální výtěžek fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu
<b>F<sub>D</sub></b>	„fluorescence decrease“ – pokles fluorescence z F <sub>M</sub> na F <sub>S</sub>
<b>F<sub>M</sub></b>	maximální výtěžek fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu
<b>F<sub>M</sub>'</b>	maximální výtěžek fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu
<b>F<sub>P</sub></b>	fluorescence po přechodu z temnotně do světelně adaptovaného stavu
<b>F<sub>S</sub></b>	fluorescence v ustáleném stavu
<b>F<sub>V</sub></b>	maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu
<b>F<sub>V</sub>'</b>	maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu
<b>FIK</b>	fluorescenční indukční křivka
<b>PAM</b>	pulzní amplitudová modulace
<b>P<sub>N</sub></b>	čistá fotosyntéza
<b>PSI</b>	fotosystém I
<b>PSII</b>	fotosystém II
<b>R<sub>FD</sub></b>	„fluorescence decrease ratio“ ( $R_{FD} = F_D/F_S$ )
<b>Φ<sub>PSII</sub></b>	efektivní kvantový výtěžek fotochemických reakcí PSII

## Úvod

Od dob dnes již téměř legendární práce Kautského a Hirshe, kteří poprvé popsali vztah mezi fotosyntetickou aktivitou a fluorescencí chlorofylu, bylo naměřeno množství fluorescenčních dat, avšak k širšímu používání této metody došlo až v poslední době.

Jednou z překážek, která bránila rozšíření používání fluorescence chlorofylu, byla dřívější vysoká cena a obtížná přenosnost fluorimetrů. Díky výraznému technickému pokroku v posledních letech a zkonstruování snadno použitelných přenosných fluorimetrů za dostupnou cenu může být dnes měření fluorescence chlorofylu prováděno v laboratorních i terénních podmínkách, mohou být sledovány jednotlivé listy, celé rostliny a dokonce i porosty. Fluorescence chlorofylu se dostala do centra zájmu biofyziků, molekulárních biologů a ekofyziologů.

Fluorescence chlorofylu spolehlivě odráží stav fotosystému II (PSII), to však neznamená, že by mohla být využívána jen při výzkumu světelné fáze fotosyntézy či sledování fyotosyntetické aktivity. Právě poškození PS II totiž bývá často prvním projevem působení suboptimálních podmínek.

Fluorescence chlorofylu odráží anatomii rostlin a jejich vývojové stadium, stejně tak jejich fyziologický stav, mění se tedy v důsledku působení nejrůznějších stresových faktorů, jakými jsou například nedostatek vody, chlad, vysoké teploty, nadměrná ozáření, působení toxických látek, mechanické poškození listů či nedostatek živin, a poskytuje informace o tom, jak jsou rostliny schopné stres tolerovat.

Metody měření fluorescence chlorofylu postupně nalézají uplatnění i v praktických oborech, jakými je lesnictví, zahradnictví či zemědělství. Fluorescence chlorofylu má velký potenciál stát se velmi využívanou technikou pro určení a zajištění optimálních podmínek (např. hnojení, zavlažování) zemědělským plodinám, detekování rostlin napadených patogeny a selekci odrůd odolných proti stresu.

Fluorescence chlorofylu se jeví jako silný nástroj, který může být využíván v oborech zabývajících se rostlinnou produkcí či k dálkovému průzkumu fotosyntetické aktivity vegetace. Aby však fluorescence chlorofylu mohla poskytnout užitečné informace, je třeba zvolit správnou techniku a metodiku jejího měření, brát v potaz různé rušivé vlivy okolního prostředí a také odfiltrovat vliv anatomie rostlin na modifikaci fluorescenčního signálu.

Cílem této práce je stručně popsat původ fluorescence a shrnout poznatky o využití fluorescence chlorofylu ke sledování fyziologického stavu rostlin pod vlivem stresových

faktorů a představit nejčastěji využívané parametry, které se k interpretaci fluorescence chlorofylu využívají.

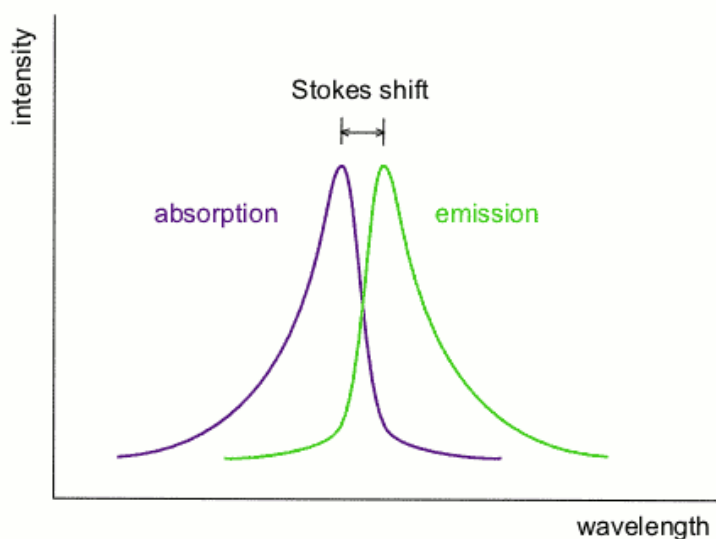
## Literární přehled

### 1. Co je to fluorescence

Emisi záření, ke kterému dochází při přechodu excitované molekuly do základního stavu souhrnně označujeme jako **luminiscenci**.

Excitace může být vyvolána chemickou reakcí, pak mluvíme o **chemoluminiscenci**, nebo absorpcí kvanta záření, která vede k jevu označovanému jako **fluorescence**.

Emitované záření je charakterizováno větší vlnovou délkou a nižší energií než záření excitační. Rozdíl vlnových délek absorpčního a emisního maxima bývá označován jako Stokesův posun (Obr.1).



**Obr.1** Stokesův posun  
Znázornění rozdílu absorpčního a emisního spektra  
Modrá křivka – absorpční spektrum  
Zelená křivka – emisní spektrum  
(wikipedia:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Stokes\\_shift.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Stokes_shift.png))

### 2. Typy rostlinné fluorescence

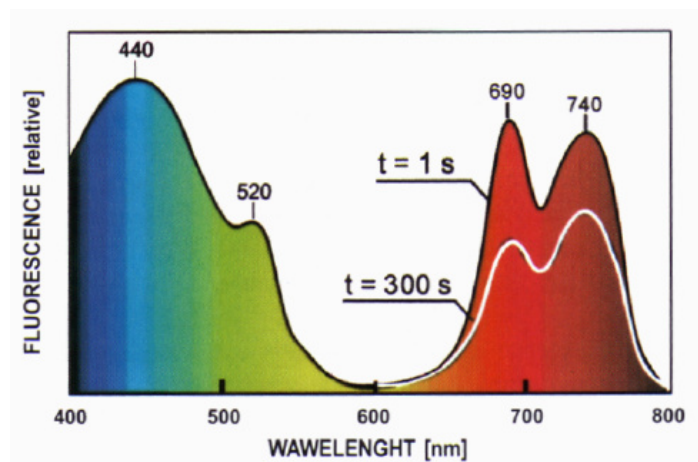
V pletivech zelených rostlin můžeme detekovat fluorescenci dvojího typu, modro-zelenou fluorescenci a fluorescenci chlorofylu.

Za modro-zelenou fluorescenci s maximy v oblasti 440-450 nm (modrá fluorescence) a většinou i 520-530 nm (zelená fluorescence) (Obr. 2) jsou zodpovědní zejména deriváty kyseliny skořicové a ferulové (Hartley, 1973; Lichtenthaler a Schweiger, 1998), různé

fenolické látky a jiné sekundární metabolity (např. berberin), vyskytující se ve vakuolách a buněčných stěnách rostlin (Lang *et al.*, 1991). Intenzita modré fluorescence listů není ovlivněna výkonem fotosyntézy (Stober a Lichtenthaler, 1992).

Odlíšné druhy rostlin i jednotlivé rostliny se liší intenzitou modro-zelené fluorescence, výrazný rozdíl byl pozorován například mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami. Právě díky vyššímu zastoupení ferulových kyselin, vykazují jednoděložné rostliny vyšší míru modro-zelené fluorescence (Lichtenthaler a Schweiger, 1998).

Fluorescence chlorofylu je charakterizována dvěma maximy v oblasti červeného záření: maximem o vlnových délkách 670 – 690 nm (v rámci studia fluorescence chlorofylu nazývané jako krátkovlnné červené záření) a maximem ve vlnových délkách 730 – 740 nm (nazývané jako jako dlouhovlnné červené záření či far-red záření) (Obr. 2) (Lang *et al.*, 1991). 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) (Pfündel, 1998). Ovšem za velmi nízké teploty (-196°C) pochází velká část emisního záření z PSI (Strasser a Butler, 1977).



**Obr.2** Fluorescenční emisní spektra listu tabáku 20 minut preadaptovaného na tmu po ozáření  $t = 1\text{ s}$  - měření 1 vteřinu po ozáření UV-A zářením (340nm)  $t = 300\text{ s}$  - měření 300 sekund po ozáření aktinickým zářením (Bushman *et al.*, 2000)

Zastoupení modré a červené fluorescence bývá odlišné u různých druhů rostlin (Lang *et al.*, 1991), různých jedinců i v rámci jedné rostliny či její části.

Z listového mezofylu je emitována převážně červená fluorescence, protože četné chlorofyly a karotenoidy zde modrou fluorescenci reabsorbují. Naopak intenzita modro-zelené fluorescence je silná především v hlavních cévách listu a v epidermis, kde na rozdíl od mezofylu není vyjma svěřacích buněk chlorofyl zpravidla přítomný (Lang *et al.*, 1994;



Langsdorf *et al.*, 2000). Ze stejného důvodu vykazují vyšší míru modro-zelené fluorescence etiolované listy, zatímco v zelených listech je její míra podstatně nižší (Stober *et al.*, 1994). Rozdílné intenzity modro-zelené a červené fluorescence jsou dobře pozorovatelné u panašovaných listů, kde v zelené oblasti s vysokým obsahem chlorofylu a karotenoidů je vysoká intenzita červené fluorescence a zároveň nízká intenzita fluorescence modré, oproti tomu bílé pruhy vykazují vysokou intenzitu modro-zelené fluorescence na úkor fluorescence červené (Lenk *et al.*, 2007). Porovnání intenzity modré a červené fluorescence se využívá při odhalování působení různých stresových faktorů. Touto problematikou se podrobněji zabývám v kapitole 3.2.1.3.1.

### 3. Fluorescence chlorofylu

Po absorpci kvanta světelného záření přejde elektron molekuly chlorofylu ze základního ( $S_0$ ) do excitovaného ( $S_1$  nebo  $S_2$ ) stavu. Ten je však velmi nestabilní a elektron je předán na další molekulu nebo přejde do základního stavu a energie vznikající při přechodu z excitovaného do základního stavu je vyzářena.

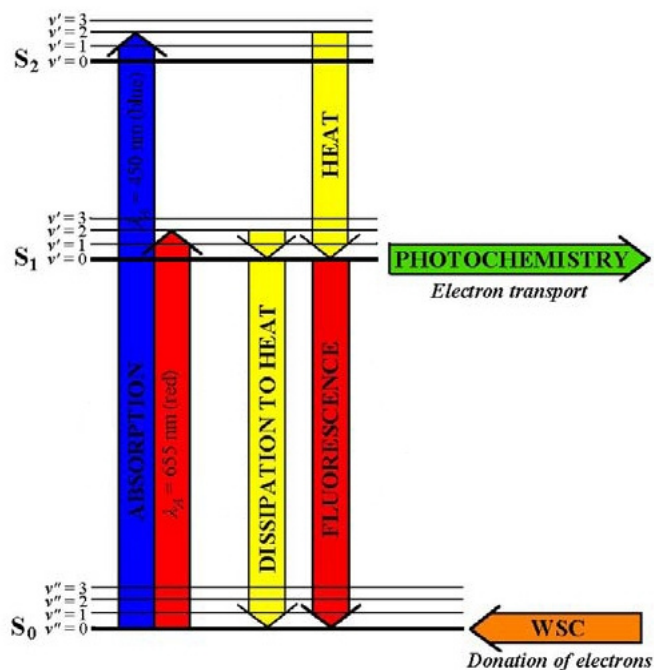
Po absorpci kvanta světelného záření molekulou chlorofylu dojde k jednomu z těchto konkurenčních pochodů :

- 1) energie fotonů je využita pro **fotosyntézu**
- 2) energie fotonů je vyzářena v podobě červeného záření s vlnovou délkou větší než 650 nm – **fluorescence**
- 3) energie fotonů se rozptýlí na teplo – **disipace** (obr. 3)

Tyto tři procesy si navzájem konkurují, pokles zastoupení jakéhokoli z těchto deexcitačních procesů se projeví vzrůstem zastoupení jiného (Govindjee, 1995).

Pouhých zhruba 3-5% absorbované energie je vyzářeno jako fluorescence, což se jeví jako zanedbatelné množství, přesto díky změnám fluorescence můžeme usuzovat na změny účinnosti fotochemických reakcí primární fáze fotosyntézy. V případě, že je intenzita fluorescence nízká, účinnost fotochemických reakcí primární fáze fotosyntézy je vysoká a naopak (Krause a Weis, 1991).

**Obr. 3** Schéma využití excitační energie v molekule chlorofylu reakčního centra PSII.  $S_0$  představuje základní singletní stav,  $S_1$ ,  $S_2$  singletní excitované stavy, horizontální linky znázorňují vibrační stavy uvedených energetických hladin pro různá vibrační čísla ( $v''$  pro základní stav,  $v'$  pro excitované stavy), vertikální šipky znázorňují různé kvantové procesy (šipky směrem nahoru: modrá - absorpce modrého záření, červená - absorpce červeného záření, šipky směrem dolů: žlutá - disipace, červená - fluorescence) zelená horizontální šipka představuje chemické reakce světelné fáze fotosyntézy a oranžová horizontální šipka nábojovou neutralizaci  $Chl^+$  elektrony dodávanými komplexem štěpícím vodu. (upraveno podle Roháček, 2006)



### 3.1. Fluorescence chlorofylu na úrovni fotosystému II

#### 3.1.1. Fluorescenční indukční křivka

Fluorescence chlorofylu je dynamický jev, její intenzita v průběhu času nabývá různých hodnot. Tyto změny poprvé pozoroval v 30. letech H. Kautsky, podle nějž byly změny kvantového výtěžku fluorescence v čase pojmenovány jako Kautského efekt. Záznam těchto změn se nazývá fluorescenční indukční křivka (FIK) (Obr. 4). Analýzou fluorescenční indukční křivky získáme soubor fluorescenčních parametrů. Vezmeme-li v úvahu antiparalelní vztah fluorescence chlorofylu a využití energie záření ve fotosyntéze, poskytneme nám fluorescenční indukční křivka a fluorescenční parametry jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o fotosyntéze. Pomocí fluorescenčních parametrů může být fotosyntéza popisována v závislosti na různých podmínkách (Roháček a Barták, 1999).

#### 3.1.2 Určení fluorescenčních parametrů metodou saturačních pulzů

Nejčastějším způsobem využití metody měření fluorescence chlorofylu je sledování reakce na ozáření u rostlin (listů) adaptovaných na tmu. Bývají používány fluorimetry pracující na principu pulsní amplitudové modulace (PAM) (Schreiber *et al.*, 1986).

V listech adaptovaných na tmu jsou při ozáření slabým modulovaným zářením všechna reakční centra PSII reoxidována – „otevřena“, může být tedy zaznamenán minimální výtěžek fluorescence chlorofylu ( $F_0$ ). Hodnota  $F_0$  je konstantní, nezávislá na fotosyntetické aktivitě. Po ozáření vzorku krátkým saturačním pulzem dojde k redukci většiny elektronových akceptorů v PSII – reakční centra PSII jsou „uzavřena“, což se projeví prudkým vzrůstem fluorescence chlorofylu (během 100 – 200 milisekund), který bývá považován za maximální ( $F_M$ ). Rozdíl mezi  $F_M$  a  $F_0$  je označován jako maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu ( $F_V$ ).

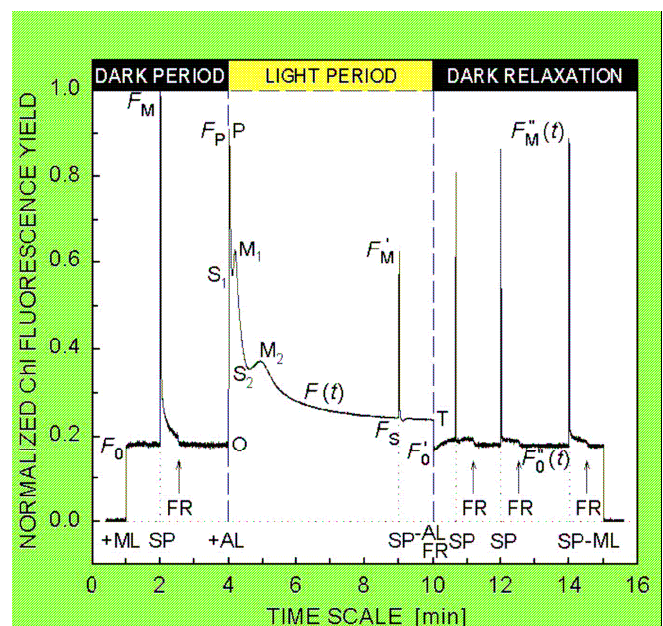
Po zapnutí aktinického záření dojde opět k redukci reakčních center a fluorescence během jedné vteřiny prudce vzroste. Následuje aktivace fotochemických procesů (3 – 5 s), kdy je energie excitovaných elektronů postupně ukládána do vysoce energetických vazeb. Fluorescence v rozmezí několika (obvykle 15-20) minut klesne na úroveň, která se již dále nemění a bývá označována jako fluorescence v ustáleném stavu ( $F_S$ ).

Aplikací metody saturačního pulzu na rostlinu umístěnou na světle můžeme analogicky jako v temnotně adaptovaném stavu určit minimální ( $F_0'$ ), maximální ( $F_M'$ ) a variabilní ( $F_V'$ ) výtěžek fluorescence ve světelně adaptovaném stavu (Roháček a Barták, 1999).

Do dnešní doby bylo definováno velké množství fluorescenčních parametrů, což mnohdy vede k nepochopení. Objevují se proto četné snahy tyto parametry redukovat, odstranit dvojí pojmenování pro tentýž parametr a celkově sjednotit nomenklaturu. Z tohoto důvodu je mnohdy výhodné používat různé relativní parametry, tj. jejich poměry (Maxwell a Johnson, 2000; Roháček, 2002).

**Obr. 4** Fluorescenční indukční křivka zaznamenaná fluorimetrem PAM 2000 na listu fazolu. Dark period označuje časové období kdy byla rostlina ponechána ve tmě, light period je časové období, kdy byla rostlina ponechána na světle (fotosynteticky aktivní fáze), dark relaxation je časové období, kdy byl vzorek opět přesunut do tmy; +MR/-MR označuje zapnutí / vypnutí měřícího záření (ozářenost povrchu  $< 0,1 \mu\text{mol}_{\text{hv}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); +AR/-AR zapnutí / vypnutí aktinického záření ( $290 \mu\text{mol}_{\text{hv}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); SP aplikaci saturačního pulzu (cca  $2500 \mu\text{mol}_{\text{hv}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); FR se šipkou označuje aplikaci far-red záření (cca  $10 \mu\text{mol}_{\text{hv}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 3s)

Fluorescenční parametry jsou popsány v textu a seznamu použitých zkratk (Roháček, 2006)



### **3.1.3. Fluorescenční zhášení**

Při vzrůstu využití excitační energie ve prospěch fotochemických reakcí primární fáze fotosyntézy dochází k poklesu výtěžku fluorescence. Tento jev bývá označován jako fotochemické zhášení.

Je-li excitační energie využívána k jiným než fotochemickým procesům, jedná se o zhášení nefotochemické. Nefotochemické zhášení zahrnuje např. vytváření pH-gradientu, nezářivou disipaci energie na teplo, fosforylaci mobilních světlosběrných komplexů FS II a fotoinhibici reakčních center FS II (Roháček a Barták, 1999).

V případě fotoinhibice byla prokázána pozitivní korelace mezi hodnotou nefotochemického zhášení a koncentrací zeaxantinů v listech, tedy i přímá souvislost s xantofylovým cyklem (Demmig *et al.*, 1988).

Oba typy zhášení vedou k poklesu fluorescence a je nezbytné je dokázat od sebe odlišit (Walters a Horton, 1991), k tomu slouží metoda saturačních pulzů (Bradbury a Baker, 1984; Schreiber *et al.*, 1986).

Změny zastoupení fotochemického a nefotochemického zhášení slouží jako dobrý indikátor stresových podmínek či poškození rostlin (Ritchie, 2006).

### ***3.2. Vliv anatomie rostlin, vnějších podmínek prostředí a stresových faktorů na fluorescenci chlorofylu***

Rostliny jsou vystaveny měnícím se podmínkám prostředí a velkému množství přírodních biotických a abiotických stresů. Většina stresových faktorů přímo či nepřímo omezuje kapacitu rostliny využívat energii fotonů pro fotosyntézu a modifikuje její optické a fluorescenční vlastnosti.

Měření fluorescence chlorofylu v průběhu indukční kinetiky poskytuje aktuální informace o poklesu aktivity fotosyntetického aparátu listu za stresových podmínek, bývá proto v poslední době k detekci stresu stále častěji využíváno (Lichtenthaler, 1996) .

Krátkodobé stresy s dobou působení v rozmezí několika minut až několika hodin přímo narušují fotosyntetickou aktivitu, vliv stresů dlouhodobých, působících na rostlinu několik dnů i déle se může projevovat také poklesem obsahu chlorofylu v listu. Při odhalování stresových faktorů je třeba brát v potaz působení mírných stresů, neboť se jim rostlina může přizpůsobit a na fluorescenci chlorofylu se nemusí projevit (Papageorgiou a Govindjee, 2004).

Za optimálních podmínek je výrazně větší část energie záření absorbovaného fotosyntetickými pigmenty využita pro fotosyntézu než za podmínek stresových. Působení stresových faktorů způsobuje vyšší využití energie pro vznik tepla a fluorescence (Krause a Weis, 1991).

Přestože odhalení působení stresového faktoru na rostlinu je pomocí fluorescence chlorofylu relativně snadné, je mnohdy nemožné přesně odhalit, o který konkrétní stresový faktor se jedná. Sledování fluorescence chlorofylu nám pomáhá odhalit intenzitu a dobu trvání působení nepříznivých podmínek a můžeme její pomocí některé stresory vyloučit, často je však zapotřebí ji doplnit i nějakou jinou metodou (Papageorgiou a Govindjee, 2004).

Bylo prokázáno, že fluorescenci chlorofylu mohou modifikovat i odchylky metabolických reakcí, o kterých se soudí, že s fotosyntézou nijak nesouvisí.

To dokazují například pokusy s Imazapyrem (herbicid, který inhibuje tvorbu postranních řetězců některých aminokyselin a není u něj očekáván přímý efekt na fotosyntetický elektronový transport) (Barbagallo *et al*, 2003). Fluorescence chlorofylu může být tedy rovněž využívána za účelem odhalení různých metabolických odchylek. Myslím však, že je mnohem pravděpodobnější, že jejich souvislost s fotosyntetickým aparátem spíše zatím pouze nebyla prokázána nebo byla podceněna.

### **3.2.1. Nejčastěji využívané parametry**

Při snaze odhalit působení stresového faktoru bývají sledovány některé parametry související s indukční kinetikou, poměry intenzity fluorescence v různých vlnových délkách a koeficienty nefotochemického zhášení. Pro různá měření jsou obvykle zapotřebí různé metody a je nemožné stanovit jediný univerzální parametr, který by jednoznačně popsal fyziologický stav rostliny nebo alespoň tak složitý proces, kterým je fotosyntéza.

Já se zaměřím pouze na parametry, které bývají ke sledování fyziologického stavu rostlin v reakci na nejrozličnější okolní podmínky využívány nejčastěji, za tyto parametry, dle mně dostupné literatury považuji konkrétně sledování poklesu intenzity fluorescence z  $F_M$  na  $F_S$  ( $R_{FD}$ ), zjišťování maximálního kvantového výtěžku PSII pomocí určení poměru  $F_M/F_V$  a porovnávání intenzit fluorescence s maximy o různé vlnové délce.

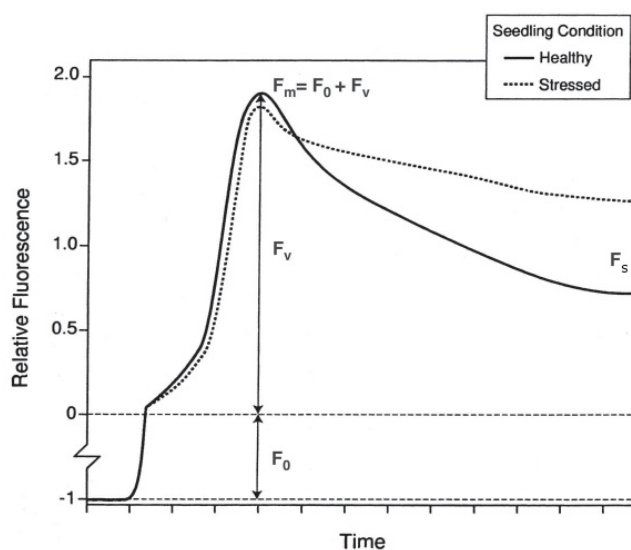
### 3.2.1.1. Určování čistého výtěžku fotosyntézy pomocí „fluorescence decrease ratio“

Rychlý růst a pomalý pokles světlem indukované fluorescence chlorofylu (Kautského efekt) je pozorovatelný pouze za optimálních podmínek. Pod vlivem stresu, kdy je fotosyntetická kvantová konverze narušena nebo úplně inhibována, intenzita fluorescence zůstává vysoká a pokles jejích hodnot z  $F_M$  na  $F_S$  je méně výrazný, pomalý nebo chybí úplně (Obr. 5) (Lichtenthaler *et al.*, 1998; Ritchie, 2006).

**Obr. 5** Indukční křivka fluorescence chlorofylu

Plná čára představuje rostlinu v optimálních podmínkách, přerušovaná čára představuje rostlinu pod vlivem stresu.

$F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_V$ ,  $F_S$  – popis v seznamu zkratk (upraveno podle Ritchie, 2006)



Z důvodu snadnějšího vyjádření míry poklesu intenzity fluorescence z  $F_M$  na  $F_S$  byl zaveden parametr  $R_{FD}$  („fluorescence decrease ratio“), který se vypočítá jako podíl  $F_D$  a  $F_S$  přičemž  $F_D$  odpovídá poklesu fluorescence z  $F_M$  na  $F_S$  („fluorescence decrease“), tedy

$$R_{FD} = F_D / F_S$$

$$\text{přičemž } F_D = F_M - F_S$$

Tento parametr bývá též považován za index vitality rostliny.

Čím výraznější je pokles z  $F_M$  na  $F_S$ , tím vyšší je i hodnota  $R_{FD}$ . Pokles hodnoty  $R_{FD}$  bývá sledován v reakci na různé suboptimální podmínky.

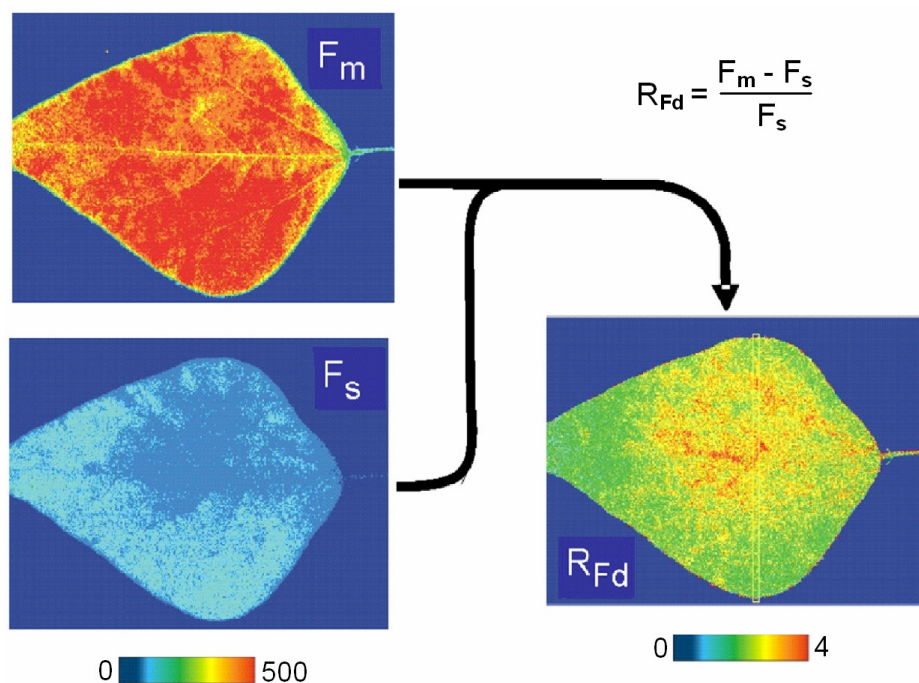
S hodnotou  $R_{FD}$  přímo koreluje výtěžek čisté fotosyntézy ( $P_N$ ) (Lichtenthaler a Miehe, 1997).

Hodnota  $R_{FD}$  je například vyšší u slunných listů (3 - 5,5 pro plně funkční zelené slunné listy na přímém osvětlení) než u listů stinných (1,2 - 2,7 pro plně funkční zelené stinné listy ve stínu), což odráží jejich vyšší fotosyntetickou aktivitu (Lichtenthaler *et al.*, 2005a).

Korelaci s fotosyntetickou aktivitou vykazuje též jednoduchý poměr  $F_M/F_S$ , který ve srovnání s parametrem  $R_{FD}$  nabývá vyšších hodnot (Obr. 8) (Lichtenthaler a Babani, 2000).

Jelikož fotosyntetická aktivita může být odlišná i v rámci jednoho listu, není vhodné brát při měření v úvahu pouze jediný listový bod („point data measurement“), který zřídka bývá reprezentativní pro celý list (Buschmann *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2001). Na působení stresového faktoru totiž nereaguje každá část listu stejně rychle a citlivě, a vznikají tak gradienty oblastí lišících se fotosyntetickou aktivitou. Odlišná intenzita fluorescence je zaznamatelná například při srovnání špičky listu s řapíkem nebo okrajů se středem listu. Například vliv vodního stresu na fluorescenci chlorofylu je po šesti hodinách dobře pozorovatelný na listových okrajích zatímco střed listu vodním stresem nebyl ještě ovlivněn (Lichtenthaler a Miehe, 1997). Z toho důvodu by měření fluorescence chlorofylu jen jediného listového bodu by stres nemuselo ihned odhalit.

Zobrazovacími metodami, kdy je  $R_{FD}$  spočítán pro každý listový bod (pixel), může být znázorněna heterogenita fotosyntetické kapacity v rámci listové plochy (Obr. 6).

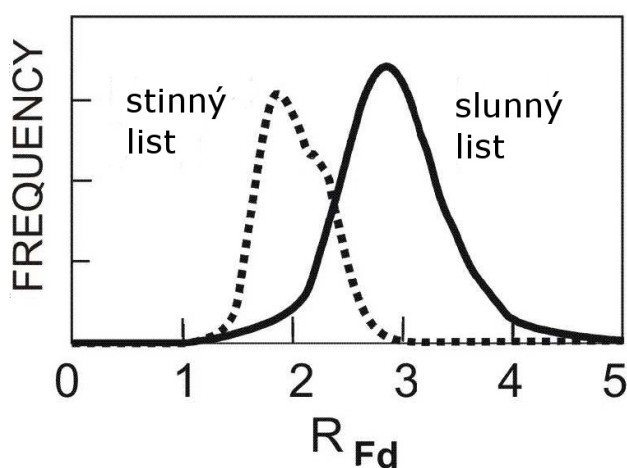


**Obr. 6** Zobrazení fluorescence chlorofylu F690 na listu *Phaseolus vulgaris*. Naměřeny byly parametry  $F_M$  a  $F_S$ . Pro každý pixel byla vypočítána a zobrazena hodnota  $R_{FD}$ . Fluorescence každého pixelu byla znázorněna falešnými barvami od nuly (modrá) po vysokou hodnotu fluorescence (červená). V případě zobrazování  $R_{FD}$  byla falešnými barvami zobrazena jeho absolutní hodnota. (Lichtenthaler *et al.* 2005b)



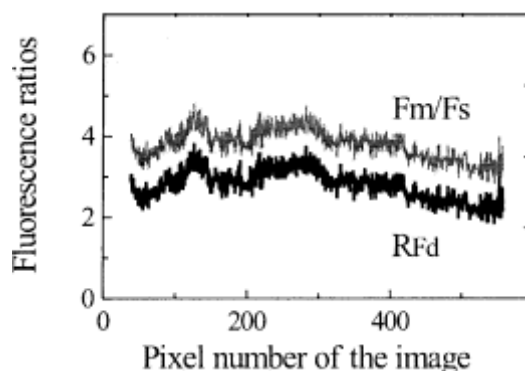
Pro dobré grafické znázornění bývají rovněž často používány histogramy, které zobrazují frekvenci distribuce fluorescence chlorofylu pro  $F_M$ ,  $F_S$ ,  $F_M/F_S$  či  $R_{FD}$  pro každý měřený pixel (Obr. 7) (Lichtenthaler *et al.*, 2005b).

Další možností jak zobrazit hodnoty fluorescence chlorofylu v prostoru je profilová analýza určitého fluorescenčního parametru. Profilová analýza je výborným prostředkem pro detekci gradientů v hodnotách parametrů fluorescence chlorofylu a fotosyntetické aktivity. Profil je založen na konkrétní informaci každého listového pixelu napříč listem (Obr. 8) (Lichtenthaler a Babani, 2000).



**Obr. 7** Histogram zastoupení různých hodnot  $R_{FD}$  pro všechny pixely listu dokazuje vyšší hodnoty parametru  $R_{FD}$  u slunných listů. (upraveno podle Lichtenthaler *et al.*, 2005b)

**Obr. 8** Profil hodnot fluorescenčních parametrů  $R_{FD}$  a  $F_M/F_S$  napříč listovou plochou. Profil je založen na konkrétní fluorescenční informaci z každého z 5000 listových pixelů. (upraveno podle Lichtenthaler a Babani, 2000)



### 3.2.1.2. Sledování poklesu maximálního kvantového výtěžku PSII v reakci na suboptimální podmínky prostředí pomocí poměru $F_V/F_M$

Další metodou jak odhalit vliv nejrůznějších faktorů na fyziologii rostlin pomocí fluorescence chlorofylu je sledování poměru  $F_V/F_M$  a následné určení maximálního kvantového výtěžku efektivity PSII.

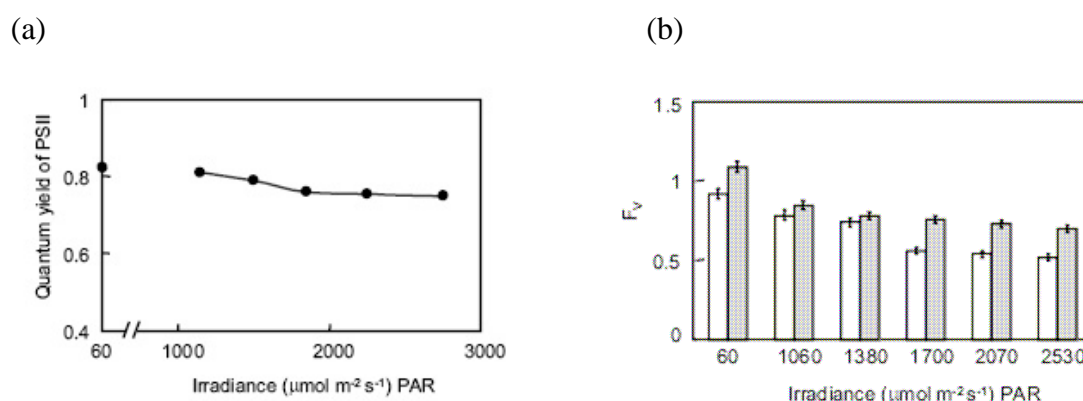


Poměr  $F_V/F_M$  nazývaný jako maximální (či potenciální) kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu nebo též maximální kvantový výtěžek efektivity PSII poskytuje přesný odhad fotosyntetické aktivity. (Papageorgiou a Govindjee, 2004). Vykazuje silný kvantitativní vztah s asimilací  $CO_2$  a tedy i růstem rostliny. Rovněž bývají sledovány cyklické změny jeho hodnoty v průběhu dne a roku (Edwards a Baker, 1993; Ball *et al.*, 1995). Je to důležitý a snadno měřitelný parametr fyziologického stavu fotosyntetického aparátu. U rostlin adaptovaných na tmu nabývá hodnot 0,75 - 0,85. Působení stresových faktorů hodnotu tohoto parametru snižuje (Peterson *et al.*, 2001).

Jeho pokles bývá často sledován v důsledku vzrůstu nefotochemického zhášení v souvislosti s fotoprotektivními mechanismy, jak podrobněji popisují níže.

V některých případech je rovněž vhodné používat poměr  $F_V/F_0$ , např. sledování vlivu salinity (Ranjabarfordoei *et al.*, 2006).

Pokles kvantového výtěžku PSII a hodnoty  $F_V$  byl zaznamenán při vystavení rostliny stoupajícím intenzitám ozáření (Obr. 9).

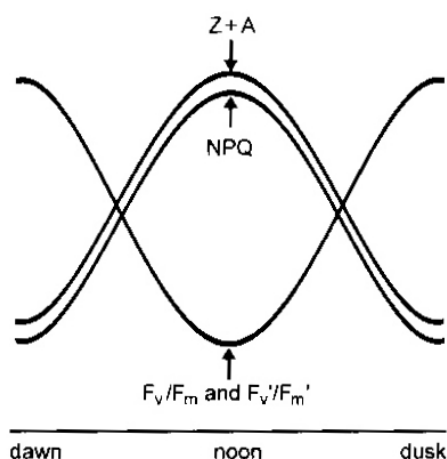


**Obr. 9** Změny kvantového výtěžku PSII (a) a  $F_V$  (b) nepoškozených listů ponechaných 15 minut za teploty  $24^\circ\text{C}$  pod vlivem záření o různých intenzitách (1060, 1380, 1700, 2070, 2530  $\mu\text{mol.m}^{-2}.s^{-1}$  PAR). Jako kontroly byly použity listy ozářované zářením o nízké intenzitě (60  $\mu\text{mol.m}^{-2}.s^{-1}$  PAR). Fluorescence byla měřena ihned po ozáření (kvantový výtěžek PSII na obrázku (a) a  $F_V$  – bílé sloupce na obrázku (b)) a po 30 minutové adaptaci na tmu ( $F_V$  – šedé sloupce na obrázku (b)). V grafech byly použity průměrné hodnoty ze čtyř nezávislých experimentů. (Sanchez a Quiles, 2006)

Pokles maximálního kvantového výtěžku PSII měřený pomocí určení parametrů  $F_V/F_M$  vzniká v důsledku fotoinhibice a je přímo úměrný množství zeaxantinů ve sledovaném vzorku (Bilger a Björkman, 1994). Vzrůst nefotochemického zhášení v souvislosti s fotoinhibicí způsobenou nadměrným ozářením (Demmig a Björkman, 1987) je dobře pozorovatelný

v průběhu dne, kdy v poledních hodinách rostliny čelí vyšší intenzitě ozáření (Obr. 10). Patrný rozdíl byl zaznamenán při porovnávání svrchních částí porostu, které jsou vystaveny intenzivnějšímu záření než jeho spodní části, a během dne vykazují v důsledku fotoprotektivního mechanismu výraznější poklesy v hodnotě  $F_V/F_M$  (Papageorgiou a Govindjee, 2004).

Po vystavení rostlin vysoké intenzitě ozáření byla rovněž prokázána odlišná reakce chloroplastů ve svrchní vrstvě buněk palisádového parenchymu oproti buňkám umístěných ve vrstvě hlubší. Chloroplasty, nacházející se v buňkách, které byly více vzdáleny od povrchu listu, byly zvýšenou iradiací ovlivněny mnohem méně v důsledku nižší hodnoty fotochemického zhášení a vykazovaly vyšší fotosyntetickou výkonnost. Je tedy důležité zvolit takový způsob měření fluorescence chlorofylu, aby výsledky byly reprezentativní pro celý vzorek (v tomto případě list) a nejen pro jeho část (svrchní stranu) (Lichtenthaler *et al.*, 2005a)



**Obr. 10** Znáznornění hladiny zeaxantinu a anteraxantinu (Z+A), nefotochemického zhášení (NPQ) a stupně efektivity PSII před svítáním a po setmění ( $F_V/F_M$ ) a během vystavení slunečnímu záření ( $F_V'/F_M'$ ). V poledne je rostlina vystavena nadměrnému ozáření, což má za následek vzrůst nefotochemického zhášení a rovněž pokles hodnot poměru  $F_V/F_M$  či  $F_V'/F_M'$ . (Papageorgiou a Govindjee, 2004)

Po vystavení rostlin nedostatku vody dochází k uzavírání průduchů, z tohoto důvodu je omezen přísun  $CO_2$ , nejsou zapotřebí produkty světelné fáze fotosyntézy a v důsledku nahromadění přebytečné energie může docházet k poškození fotosyntetického aparátu (efekt je tedy ve výsledku podobný jako při vystavení rostliny nadměrné ozáření) (Grzesiak *et al.*, 2007). Po krátkém působení vodního stresu obvykle ihned nedochází k výraznějšímu poklesu maximálního kvantového výtěžku efektivity PSII ( $F_V/F_M$ ) (Lu a Zhang, 1999), po několika dnech však v souvislosti s výrazným poklesem vodního potenciálu je jeho pokles již znatelný (Koscielniak *et al.*, 2006).

Měření fluorescence chlorofylu bylo prokázáno, že pokles fotosyntetické aktivity nemusí být způsoben uzavřením reakčních center PSII, ale je způsoben vzrůstem nefotochemického zhášení (Martinez-Carrasco *et al.*, 2002), které může stoupnout z 15% na 47%, a chrání PSII před poškozením nadbytečnou energií (Koscielniak *et al.*, 2006).

Je-li parametr  $F_v/F_M$  vynásoben proporcí otevřených reakčních center, získáme efektivní kvantový výtěžek fotochemických reakcí PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) (Maxwell a Johnson 2000).

Pokles maximálního kvantového výtěžku efektivnosti PSII v důsledku působení vodního stresu je také mnohem výraznější u dospělých rostlin než u rostlin mladých a vzniká rovněž v důsledku nefotochemického zhášení, které je intenzivnější u rostlin starších (Xu *et al.*, 2008).

Někteří autoři nepovažují za výhodné tento parametr využívat neboť neodráží vliv krátkodobého působení stresových faktorů tak spolehlivě jako parametr  $R_{FD}$  a působení stresových faktorů jeho hodnotu ovlivňuje pomaleji než hodnotu parametru  $R_{FD}$  (Papageorgiou a Govindjee, 2004).

### *3.2.1.3. Porovnávání intenzity fluorescence s maximy o různé vlnové délce*

K detekci stresu bývá kromě samotné fluorescence chlorofylu rovněž hojně využíváno i sledování modro-zelené fluorescence a následné porovnávání a výpočty poměrů intenzit různých fluorescenčních maxim. Nejčastěji využívanými poměry jsou BF/ChlF (poměr intenzity modro-zelené fluorescence a fluorescence chlorofylu), F690/F735 (poměr krátkovlnné červené fluorescence s maximem o vlnové délce kolem 690nm a dlouhovlnné červené fluorescence s maximem o vlnové délce kolem 735 nm), F440/F520 (poměr modré fluorescence s maximem o vlnové délce kolem 440 nm a zelené fluorescence s maximem o vlnové délce 520 nm) (Schweiger *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1996).

#### 3.2.1.3.1. Porovnávání intenzity krátkovlnné a dlouhovlnné fluorescence

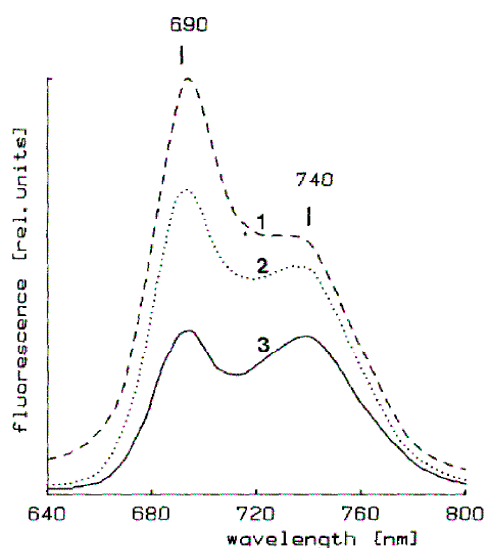
Jednoduchým numerickým vyjádřením porovnání intenzit krátkovlnné a dlouhovlnné fluorescence chlorofylu je poměr F690/F735.

Tento poměr bývá různý u různých rostlin a jeho hodnota se často mění i v rámci jednoho listu. S rostoucím obsahem chlorofylu ve sledované části listu dochází k výraznějšímu vzrůstu fluorescence v oblasti s emisním maximem o vlnové délce 735 nm, zatímco fluorescence s maximem o vlnové délce 690 nm stoupá jen minimálně. Tyto časté rozdíly bývají způsobeny převážně reabsorpcí emitovaného červeného krátkovlnného fluorescenčního záření, která je následkem překrývajícího se absorpčního a emisního spektra chlorofylu. Je tedy logické, že míra reabsorpce bude větší v oblastech s větším obsahem chlorofylu (Lichtenthaler *et al.*, 1986). Na základě této znalosti bývá poměr obou maxim emisního spektra chlorofylu využíván jako indikátor obsahu chlorofylu (který může být snížen v důsledku působení stresových faktorů) a fotosyntetické aktivity (Lichtenthaler *et al.*, 1990; Dambrosio *et al.*, 1992; Gitelson *et al.*, 1998).

Často bývá pokles hodnoty poměru F690/F735 sledován v průběhu vývoje mladých listů, kdy v souvislosti s přirozenými změnami v ontogenezi dochází ke zvyšování obsahu chlorofylu v listu (Obr. 11) (Hák *et al.*, 1990; Šesták a Šiffel, 1997).

Emisní spektrum je v průběhu vývoje rostliny rovněž ovlivněno stářím jednotlivých chloroplastů, formací a degradací fotosyntetického aparátu, konkrétně změnami v pigment-proteinových komplexech a elektronovém transportním řetězci. Rozdíly fluorescence různých vývojových stadií mohou být leckdy nápadnější než při porovnávání stresovaných a nestresovaných rostlin, je proto nutné vývojová stadia rostlin ve výzkumu zohlednit. (Šesták a Šiffel, 1997)

Pokles hodnoty poměru F690/F730 v důsledku zvyšování obsahu chlorofylu bývá též pozorován při zelenání etiolovaných rostlin (Stober a Lichtenthaler, 1992; Babani *et al.*, 1996), její růst zase se změnou barvy listů v průběhu podzimního rozkladu chlorofylu (Dambrosio *et al.*, 1992).



**Obr. 11** Fluorescenční emisní spektra jehlic *Abies alba* pro rostliny odlišného stáří a obsahu chlorofylu měřená v ustáleném stavu.

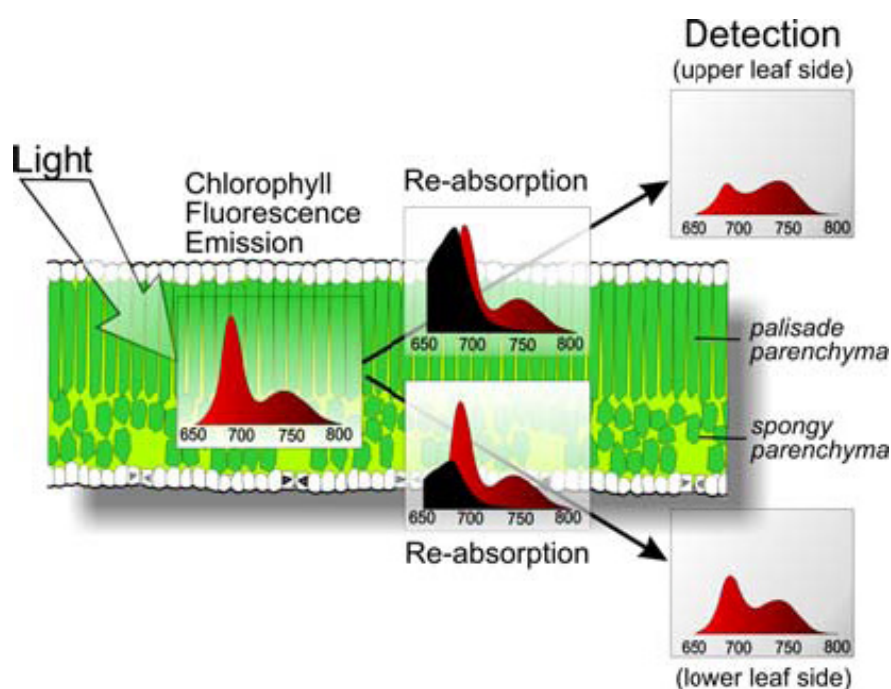
1 – mladé světle zelené jehlice – intenzita fluorescence chlorofylu je nejvyšší, můžeme pozorovat výrazně vyšší hodnoty v oblasti s maximem o vlnové délce 690nm

2 – zelené jehlice

3 – plně vyvinuté tmavě zelené jehlice – nejnižší hodnota poměru F690/F735 (Lichtenthaler *et al.*, 1986)

Výrazné rozdíly mezi tvarem emisního spektra byly rovněž zaznamenány při porovnávání adaxiální (svrchní) a abaxiální (spodní) strany listu. Adaxiální strana je tvořena palisádovým parenchymem, který je složen z většího počtu buněk než spongiózní parenchym, který tvoří stranu abaxiální. Abaxiální strana obsahuje méně chlorofylu, a proto je záření emitované jejími chlorofyly méně ovlivněno reabsorpcí. Z toho důvodu je intenzita fluorescence chlorofylu pocházející z abaxiální strany vyšší a vyšší je i hodnota poměru F690/F735 (Obr. 12) (Dambrosio *et al.*, 1992).

**Obr. 12** Schéma ukazuje reabsorpci červené fluorescence chlorofylu v bifaciálním listu. Fluorescenční emisní spektrum chlorofylu (na obrázku červeně) se překrývá s absorpčním spektrem chlorofylu (na obrázku černě). Reabsorpce závisí na hustotě chlorofylu a její vyšší míra je zaznamenána při detekci fluorescence chlorofylu ze svrchní strany listu, kde je vyšší obsah chlorofylu v buňkách palisádového parenchymu. Oproti tomu menší míra reabsorpce je zaznamenána na spodní straně listu, kde se ve spongiózním parenchymu vyskytuje méně chlorofylu. (Buschman, 2007)



Emisní spektrum je rovněž ovlivňováno strukturou listu (i když v porovnání s vlivem množství chlorofylu podstatně méně). Než se excitační světlo dostane na místo absorpce musí nejprve proniknout listem. Struktura pletiv, přítomnost a velikost mezibuněčných prostor tedy ovlivňují i fluorescenci (Virgin, 1954; Buschmann 2007). Množství chlorofylu ve vzorku je však zodpovědné za 92% rozdílů v hodnotách poměru F690/F735 (Gitelson *et al.*, 1998), tudíž vliv anatomie listu je jen malý.

Výše jsem uvedla několik důkazů o vztahu tvaru emisního spektra fluorescence chlorofylu a poměru F690/F735 na obsahu chlorofylu. Uvědomění si této závislosti je velice důležité,

neboť stres a různá poškození často souvisí s poklesem množství chlorofylu. Nicméně koncentrace chlorofylu se mění pomalu v reakci na různé vnitřní a vnější podněty, takže poměr F690/F735 nemůže být dle některých názorů vždy považován za vhodný indikátor raného stresu, není-li provedeno nějaké doplňující měření (Valentini a kol., 1994).

Hodnota poměru F690/F735 ovšem není závislá pouze na obsahu chlorofylu, ale reaguje na měnící se podmínky prostředí. Změny v hodnotě poměru mohou vzniknout v důsledku změny optických vlastností listu, např. při pohybu chloroplastů v reakci na vysoké intenzity ozáření. Zároveň byl růst hodnoty poměru F690/F735 zaznamenán s rostoucí mírou asimilace CO<sub>2</sub>. Je tedy zřejmé, že tento poměr odráží i fotosyntetickou aktivitu. (Valentini *et al.*, 1994).

Hloubka průniku excitačního záření listem závisí na jeho vlnové délce. Modré záření totiž může být absorbováno i karotenoidy, a tak neproniká tak hluboko do listového mezofylu jako například záření červené.

Propustnost záření listem stoupá s jeho rostoucí vlnovou délkou (červené záření listem pronikne snáze než záření modré). Proto fluorescence chlorofylu excitovaná červeným zářením pochází z hlubších vrstev listu než fluorescence chlorofylu excitovaná zářením modrým. Při průniku listovým pletivem z hlubších vrstev směrem k povrchu bývá s větší pravděpodobností reabsorbována, což má za následek zeslabení intenzity emitovaného záření v oblasti krátkovlnného červeného záření oproti intenzitě dlouhovlnného červeného záření a tedy i pokles hodnoty poměru F690/F735 (Agati, 1998; Buschmann, 2007).

#### 3.2.1.3.1. Využití poměru modro-zelené fluorescence a fluorescence chlorofylu

Poměr modro-zelené fluorescence a fluorescence chlorofylu, označovaný jako BF/ChlF je některými autory považován za citlivější indikátor stresu než poměr F690/F735 (Schweiger *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 1996). Ke zjištění intenzity pouze fluorescence chlorofylu postačí jako excitační záření modré, při sjišťování intenzit modro-zelené fluorescence spolu s fluorescencí chlorofylu je potřeba jako excitační záření použít záření o vlnové délce v UV oblasti.

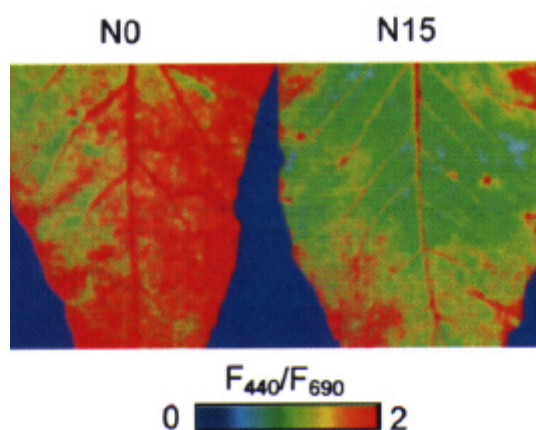
Rostliny vystavené stresovým podmínkám akumulují v epidermis UV absorbující látky (např. ferulové kyseliny, fenolické látky) (Beggs *et al.*, 1985). Ty působí jako filtr, který za stresových podmínek chrání rostliny před průnikem nadbytečného záření do mezofylu, kde by mohlo poškodit fotosyntetický aparát. Proto jsou například slunné rostliny (ale i rostliny

pěstované venku oproti rostlinám pěstovaným ve skleníku) chráněny před UV zářením lépe než rostliny stinné (Schweiger *et al.*, 1996).

Někteří autoři růst hodnoty poměru BF/ChlF vysvětlují jako důsledek výrazného vzrůstu modro-zelené fluorescence zatímco fluorescence chlorofylu roste podstatně méně a tedy i hodnota poměru BF/ChlF stoupá (Lang *et al.*, 1996). Jiní autoři zase zaznamenali pokles obou typů fluorescence, avšak mnohem výraznější v červené oblasti emisního spektra rostliny, nicméně hodnota poměru BF/ChlF fluorescence stoupá též (Stober *et al.* 1993).

Vzrůst hodnoty BF/ChlF byl prokázán např. v důsledku nedostatku vody (Lang *et al.* 1996), poklesu teploty (Bongi *et al.*, 1994), působení nadměrné ozáření v době růstu rostliny (Stober *et al.*, 1993) napadení patogenem (Lüdeker *et al.*, 1996).

Poměr BF/ChlF je považován za jeden z nejcitlivějších indikátorů působení stresu v důsledku nedostatku dusíku (Heisel *et al.*, 1996). Rostliny pěstované při nedostatku dusíku obsahují mnohem méně chlorofylu, což vede k poklesu intenzity fluorescence chlorofylu celého listu. Zároveň mají vyšší obsah flavonolů a ferulových kyselin. Po ozáření UV-A excitačním zářením je fluorescence chlorofylu u rostlin pěstovaných za nedostatku dusíku oproti rostlinám s dostatkem dusíku potlačena, neboť většina UV záření je absorbována hned v epidermis. Hodnota poměru BF/ChlF je tedy vyšší u rostlin pěstovaných za nedostatku dusíku (Obr. 13) (Heisel *et al.*, 1996; Langsdorf *et al.*, 2000; Lichtenthaler *et al.*, 2005b).



**Obr. 13** Zobrazení fluorescenčního poměru  $F_{440}/F_{690}$  listů cukrové řepy. N0 – list rostliny pěstované za nedostatku dusíku, N – 15 – list rostliny pěstované v půdě s vysokým obsahem dusíku. Ke znázornění byly použity falešné barvy, kde modrá barva znamená nejnižší hodnotu a barva červená hodnotu nejvyšší. (Lichtenthaler *et al.*, 2005b)

Byl zkoumán také vliv nedostatku dusíku na hodnotu poměru  $F_{690}/F_{735}$ . Ta je vyšší u rostlin pěstovaných při nedostatku dusíku, neboť z důvodu menšího obsahu chlorofylu dochází jen omezeně k reabsorpci záření o vlnové délce 690nm (Tartachnyk *et al.*, 2006).

Stručně vyjádřeno, intenzita fluorescence chlorofylu klesá a tedy hodnota poměru BF/RF roste:

- Při působení stresových faktorů v jejichž důsledku dochází ke ztrátě chlorofylu a karotenoidů
- Při akumulaci látek absorbujících UV-záření v důsledku stresu v epidermis, které zabraňují průniku UV záření do mesofylu

Intenzita fluorescence chlorofylu stoupá a tedy hodnota BF/RF klesá:

- Dojde-li k v důsledku působení stresového faktoru k blokování elektronového transportu a excitační energie nemůže být využita pro fotosyntézu. Roste tedy intenzita fluorescence chlorofylu zatímco intenzita modro-zelené fluorescence se nemění.

Podle výše zmíněných výsledků je zřejmé, že měření jediného fluorescenčního neposkytne o měřeném vzorku dostatečné informace.

Do dnešní doby byl prozkoumán vliv nejrůznějších stresových faktorů na modro-zelenou fluorescenci i fluorescenci chlorofylu a výsledky se mnohdy velmi zásadně liší i u téměř shodných pokusů. Rostlina odráží působení všech okolních faktorů a snadno přehlédnutý vliv jen jednoho z nich může vést k špatnému pochopení důsledků, které mohou výsledky měření fluorescence podstatně ovlivnit.

### **3.2.2. Detekce biotického stresu pomocí fluorescence chlorofylu**

Vlivu biotických stresorů (patogeny virového, bakteriálního či houbového původu nebo herbivoři) na rostliny jsem se rozhodla věnovat samostatnou kapitolu, neboť obvykle nepůsobí ihned na všechny rostliny v porostu ani na celou rostlinu. Příznaky biotického stresu se projevují nejprve pouze na určitých místech než dojde k jejich rozšíření, a proto i jejich detekce sledováním fluorescence chlorofylu vyžaduje trochu odlišné přístupy.

Zkoumání následků biotického stresu bylo vždy problematické, neboť fyziologické reakce rostlin se obvykle různí v závislosti na druhu rostliny i patogena. K relativně nedávnému pokroku v porozumění raným interakcím mezi patogeny a rostlinami přispělo právě používání analýzy fluorescence chlorofylu. Změny fluorescence chlorofylu bývají zpravidla sledovány i v pletivu obklopujícím napadené místo (Guidi *et al.*, 2007).



Variabilita odpovědí rostlin je zřejmě způsobena převážně interakcí s ostatními environmentálními faktory (např. virové infekce mají větší vliv na fyziologický stav rostliny při nedostatku dusíku nebo vysokém osvětlení) (Balachandran *et al.*, 1997).

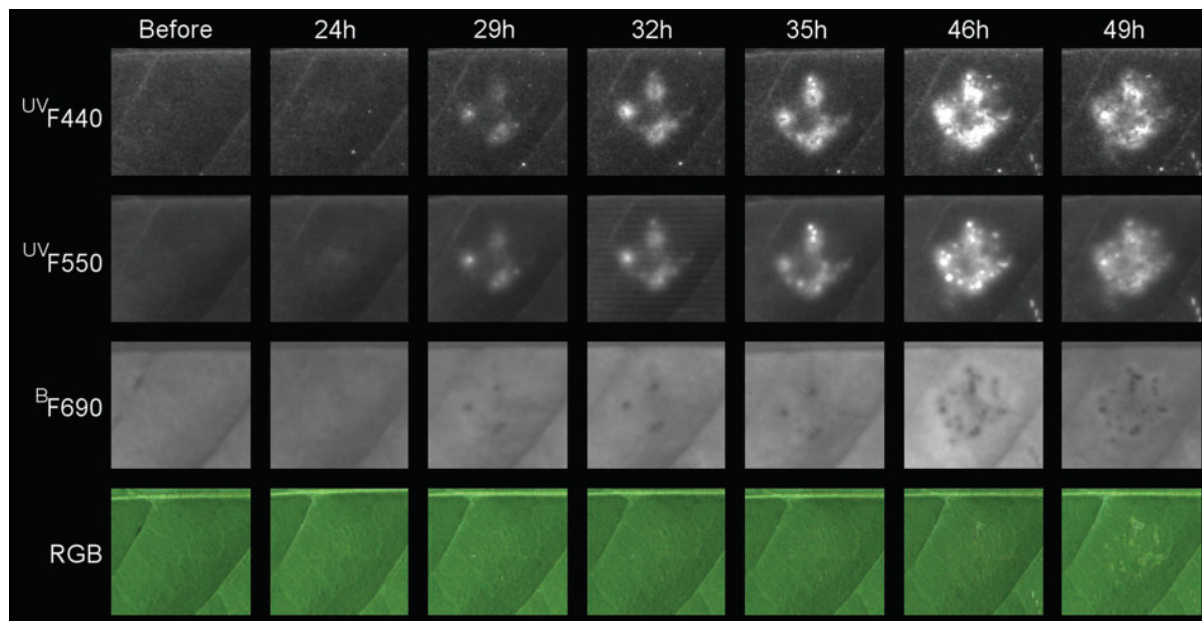
Obvykle existuje větší množství variant, které parametry sledovat, a je třeba u každého typu infekce vybrat ten nejvhodnější. Mohou být sledovány například změny nefotochemického zhášení (Lohaus *et al.*, 2000) nebo změny fluorescenceční indukční kinetiky (Peterson a Aylor, 1995).

Vliv na fyziologický stav rostliny a fluorescenci chlorofylu mají rovněž herbivoři. Efekt napadení není patrný pouze na zkonsumovaných pletivech, ale i na pletivech okolních. Pomocí fluorescence chlorofylu bylo prokázáno, že narušení fotosyntetického aparátu souvisí s lokálními ztrátami vody způsobenými hmyzím ožerem (Tang *et al.*, 2006).

Detekce onemocnění zemědělských plodin způsobených vlivem patogena je stále převážně prováděna vyhodnocováním vizuálních projevů. To je však časově náročné obzvláště v případě, kdy je potřeba překontrolovat několik tisíc sazenic, metody využívající fluorescence chlorofylu mají potenciál tento proces zjednodušit a urychlit (Lüdeker *et al.*, 1996).

Přestože většina fluorimetrů byla vyvinuta za účelem měření fluorescence chlorofylu zelených pletiv s velkým množstvím chlorofylu, mohou být využívány i při měření pletiv s relativně nízkým obsahem chlorofylu např. ovoce, kde jsou v průběhu zrání chloroplasty z velké části degradovány. To bylo sledováno na banánech (Blackbourn *et al.*, 1990) či papaye (Bron *et al.*, 2004). Měření fluorescence chlorofylu bylo prokázáno, že plody bývají fotosynteticky aktivní i v průběhu zrání v období po sklizni. Je tedy možné na základě měření fluorescence chlorofylu detekovat plísňe a další choroby ovoce způsobené nejrůznějšími patogeny ještě před jejich širším rozšířením (Nedbal *et al.*, 2000).

Využívání fluorescence chlorofylu v zemědělství se jeví jako velmi silný nástroj při detekci rostlin či plodů napadených patogeny ještě před viditelnými projevy poškození (Obr. 14) a jsou vyvíjeny různé metody, jak fluorescenci chlorofylu využít v automatizovaném zařízení, které by bylo schopné identifikovat a odstraňovat kupříkladu napadené sazenice (Lüdeker *et al.*, 1996) či ovoce (Nedbal *et al.*, 2000) ještě před projevem viditelných škod.



**Obr. 14** List *Nicotiana tabacum* po inokulaci viru tabákové mozaiky. Zleva doprava: před inokulací, 14 – 49 hodin po inokulaci. První řada znázorňuje intenzitu fluorescence o vlnové délce 440nm – modrá fluorescence (excitační záření – UV záření), druhá řada intenzitu fluorescence o vlnové délce 550nm (excitační záření – UV záření), třetí řada intenzitu fluorescence chlorofylu o vlnové délce 690nm, ve čtvrté řadě jsou obrázky zachycené pomocí RGB kamery, znázorňující okem viditelné symptomy (Lenk *et al.*, 2007)

### 3.3. Dálkový průzkum pomocí fluorescence chlorofylu

Všeobecné snahy o monitorování fyziologického stavu vegetace se v poslední době objevují čím dál tím častěji. Důvodem jsou měnící se environmentální podmínky související především s rostoucím znečištěním životního prostředí a zároveň rostoucí snahy o maximalizaci výnosů úrody prostřednictvím zajištění optimálních podmínek zemědělským plodinám (např. cílené přihnojování a zavlažování, včasné ošetřování či odstraňování rostlin napadených patogeny). Jako ideální nástroj pro zjišťování fyziologického stavu vegetace se jeví bezkontaktní dálkový průzkum, je to totiž jediná technika umožňující monitorování větších oblastí porostů (Cecchi *et al.*, 1994).

Do centra zájmu mnoha výzkumných skupin zabývajících se dálkovým průzkumem vegetace se dnes dostává přímé měření fluorescence chlorofylu z větší vzdálenosti (Zarco-Tejada *et al.*, 2000b; Ananyev *et al.*, 2005), a to díky svému potenciálu odrážet některé fyziologické funkce rostlin a pomáhat odhalit stres ještě před jeho viditelnými projevy, jak bylo podrobněji

probráno v předchozích kapitolách. Dálkově snímaná fluorescence chlorofylu rovněž výrazně koreluje s mírou fixace uhlíku (Carter *et al.*, 1990; Günther *et al.*, 1994). Sledování fluorescence chlorofylu má také potenciál pro sledování kvality vody a uplatnění nalézá i v oceanografickém výzkumu (Papageorgiou a Govindjee, 2004).

V nedávné době byl zájem rovněž soustředěn na měření odrazivosti porostů, která poskytuje důležité informace o fyziologickém stavu rostliny, například o obsahu fotosyntetických pigmentů (Haboudane *et al.*, 2002), v hodnocení fotosyntetické aktivity je však mnohem slabším nástrojem než měření fluorescence chlorofylu. (Méthy *et al.*, 1994; Soukupová *et al.*, 2008). Pro větší přesnost se často měří fluorescence a odrazivost souběžně.

Od dob objevu Kautského indukční kinetiky bylo fluorescence chlorofylu využíváno v laboratorních podmínkách při výzkumu fotosyntézy z fyziologického úhlu pohledu (Cecchi *et al.* 1994). Její použití v terénních podmínkách je však značně komplikovanější. Venku se totiž s rostlinami nedá manipulovat, kvůli okolnímu slunečnímu záření nemohou být v libovolnou dobu adaptovány na tmu či vystaveny modulovanému záření, které se v laboratorních podmínkách běžně používá (Kolber *et al.*, 2005).

Měření fluorescenčního záření v terénu je rovněž problematické z toho důvodu, že je třeba ho měřit odděleně od odraženého světla stejné vlnové délky (Carter *et al.*, 1996).

Přesto byly vyvinuty mnohé pasivní i aktivní metody měření fluorescence chlorofylu, které se dokáží s těmito problémy do značné míry vyrovnat.

#### **4.3.1. Aktivní techniky dálkového průzkumu**

Na krátké vzdálenosti (1-100 mm) se většinou využívá pulsní amplitudové modulace (PAM) Krátké pulsy laseru s vysokou energií indukují fluorescenci, která může být detekována i na pozadí „rušícího“ slunečního záření. Pulsy bývají obvykle aplikovány na jednotlivé listy. I za plného slunečního ozáření uzavřou dostatečně silné blesky záření všechna reakční centra v listu a může být sledován maximální výtěžek fluorescence. Tato metoda je však jen těžko aplikovatelná na úroveň porostu (Ananyev *et al.*, 2005; Kolber *et al.*, 2005). Vývoj fluorescenčních technik bývá též omezován bezpečnostními nařízeními (Papageorgiou a Govindjee, 2004).

Systémy založené na analýze „laser-induced fluorescence transients“ – LIFT pracují se subsaturačními pulsy (pulsy s nižší excitační energií než pulsy saturační) a mohou být využívány k měření dynamiky fluorescenčních parametrů ze vzdálenosti 5 - 30 metrů (Ananyev *et al.*, 2005; Kolber *et al.*, 2005).

Dalším typem zařízení používaným k dálkovému snímání využívající laserem indukované fluorescence je LIDAR (Laser Detection And Ranging). LIDAR může být používán ke sledování fluorescence vycházející vodních i terestrických ekosystémů (Papageorgiou a Govindjee, 2004). LIDAR je rovněž považován za vhodný doplňující nástroj k měření odrazivosti (Stober *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1999).

#### **4.3.2. Pasivní techniky dálkového průzkumu**

Při pasivním dálkovém průzkumu bývá sledována fluorescence chlorofylu, která byla emitována v důsledku absorpce slunečního záření.

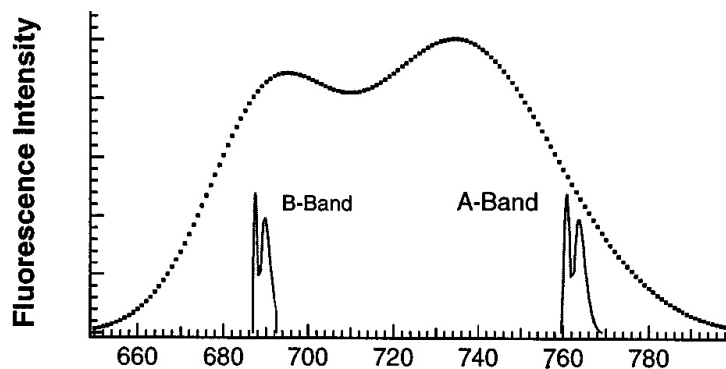
Největším problémem, na který můžeme při jejím měření narazit, je fakt, že v přirozených podmínkách sluneční iluminace odpovídá fluorescence chlorofylu jen malému zlomku detekovaného záření a je nezbytné ji od ostatního záření nějakým způsobem oddělit. Za tímto účelem se hojně využívá snímání fluorescence ve specifických oblastech elektromagnetického spektra, Fraunhoferových liniích (Papageorgiou a Govindjee, 2004). Fraunhoferovy linie je označení pro sadu spektrálních linií, které byly pozorovány jako tmavé pruhy v optickém spektru slunce. Do dnešní doby jich bylo zaznamenáno několik tisíc. Tyto tmavé linie v oblastech určité vlnové délky solárního spektra jsou způsobeny absorpcí záření chemickými prvky ve svrchních vrstvách slunce a také absorpcí molekulárním kyslíkem v zemské atmosféře (Moya *et al.*, 2004).

V oblastech Fraunhoferových linií je intenzita solárního záření zeslabena a fluorescenční signál zde může být lépe kvantifikován.

K měření fluorescence chlorofylu bývají využívány konkrétně linie vzniklé absorpcí vodíku a kyslíku.

Linie H $\alpha$  v oblasti záření s vlnovou délkou 656 nm vzniká jako důsledek absorpce vodíku. Nevýhodou je poměrně nízká, i když zaznamatelná intenzita fluorescence rostlin v této oblasti (McFarlane *et al.*, 1980).

Mnohem vhodnější k měření fluorescence chlorofylu jsou tmavé linie způsobené absorpcí atmosférickým kyslíkem v oblastech s vlnovými délkami 687 nm (B band) a 760nm (A band). Tyto linie se výrazně překrývají s fluorescenčním emisním spektrem listů (Obr. 15). Vlnová délka 687 nm odpovídá krátkovlnné červené fluorescenci a 760 nm dlouhovlnné červené fluorescenci (Liu *et al.*, 2005). Pasivní měření fluorescence tudíž umožňuje určení poměru krátkovlnné a dlouhovlnné červené fluorescence.



**Obr. 15** Emisní spektrum chlorofylu *a* (svrchní křivka), spodní křivky znázorňují Fraunhoferovy linie A a B v oblasti absorpce slunečního záření atmosférickým kyslíkem. (Kebabian *et al.* 1999)

Vliv slunečního záření může být odfiltrován metodou „Fraunhofer line discrimination“ (FLD), kdy se porovnává velikost minima ve spektra solárního záření s velikostí minima emisního fluorescenčního spektra rostliny (Carter *et al.*, 1990; Kebabian *et al.*, 1999; Freedman *et al.*, 2002).

Jedním z přístrojů využívajícím k měření fluorescence chlorofylu absorpci záření o určitých vlnových délkách kyslíkem je Fraunhofer line discriminator (Kebabian *et al.*, 1999).

Fluorescenční záření zelených rostlin prochází komorou obsahující kyslík. Ten zde absorbuje záření o vlnových délkách 762 a 688 nm, což vede k opětovné emisi fotonů, které jsou detekovány pomocí fotonásobiče. Tento indukovaný fluorescenční signál odpovídá intenzitě fluorescence rostlin o vlnových délkách odpovídajících oblasti absorpce atmosférického kyslíku.

Fraunhofer line discriminator může být použit k měření fluorescence chlorofylu jednotlivých listů či rostlin, obzvláště ideální je pak k měření na úrovni rozsáhlejších ploch vegetace (Kebabian *et al.*, 1999).

Někteří autoři považují data získaná měřením pasivní fluorescence chlorofylu za matoucí, neboť její hodnoty jsou ovlivněny převážně kvantitou a hustotou vegetace. Používání těchto pasivních dat k odhalení raného stresu bývá proto mnohdy nesnadné a může dojít k určitým zkreslením (Cecchi *et al.*, 1994).

Z výše uvedeného je zřejmé, že mnoho parametrů běžně zjišťovaných v laboratorních podmínkách (např.  $F_V/F_M$ ) je pomocí pasivního dálkového snímání nedetekovatelných, obzvláště je-li nezbytná předchozí adaptace listů na tmu (Valentini *et al.*, 1994). Pasivní dálkové snímání je schopné zachytit tvar spektra, z nějž mohou být vyvozeny některé spektrální parametry jako například poměr dvou maxim fluorescence chlorofylu  $F_{690}/F_{730}$ ,

na jehož základě můžeme určit obsah chlorofylu a získat informace o fotosyntetické aktivitě (Zarco-Tejada *et al.*, 2000)

Velký potenciál stát se významným parametrem v dálkovém průzkumu má fluorescence v ustáleném stavu  $F_S$ .  $F_S$  byla do současné doby oproti jiným fluorescenčním parametrům studována poměrně méně, přestože je měřitelná aktivními i pasivními technikami, v laboratoři i terénních podmínkách. Bylo prokázáno, že  $F_S$  výrazně koreluje s asimilací  $CO_2$  (Soukupová *et al.*, 2008). Její hodnota bývá nízká v zimních měsících, roste s příchodem jara a její vysoké hodnoty přetrvávají v průběhu vegetační sezóny, na podzim opět klesá. V porovnání se změnami v průběhu roku se  $F_S$  během dne výrazněji nemění. Tento parametr je velmi vhodný ke sledování doby započetí a ukončení vegetační sezóny (Soukupová *et al.*, 2008; Freedman *et al.*, 2002).

## **Závěr**

Analýza fluorescence chlorofylu může sloužit jako rychlá nedestruktivní technika s velkou výpovědní hodnotou o fyziologickém stavu rostlin. Vztah mezi fluorescencí chlorofylu a fyziologickým stavem rostliny však není tak jednoduchý, jak se na první pohled může zdát a bývá ovlivněn mnoha faktory, které musí být při zpracovávání výsledků brány v potaz.

Samotné měření fluorescence chlorofylu je v dnešní době relativně snadné, což vede k jeho hojnému využívání a velkému množství výsledků. Při interpretaci výsledků získaných měřeními fluorescence chlorofylu je potřeba si uvědomit i jeho limity a je vhodné je kombinovat i s jinými metodami.

Přesto se měření fluorescence chlorofylu jeví jako mocný nástroj, který může nalézt uplatnění v mnoha oborech.

## Seznam použité literatury

- Agati G (1998) Response of the in vivo chlorophyll fluorescence spectrum to environmental factors and laser excitation wavelength. *Pure And Applied Optics* 7: 797-807
- Ananyev G, Kolber ZS, Klimov D, Falkowski PG, Berry JA, Rascher U, Martin R, Osmond B (2005) Remote sensing of heterogeneity in photosynthetic efficiency, electron transport and dissipation of excess light in *Populus deltoides* stands under ambient and elevated CO<sub>2</sub> concentrations, and in a tropical forest canopy, using a new laser-induced fluorescence transient device. *Global Change Biology* 11: 1195-1206
- Babani F, Lichtenthaler HK, Richter P (1996) Changes of chlorophyll fluorescence signatures during greening of etiolated barley seedlings as measured with the CCD-OMA fluorometer. *Journal of Plant Physiology* 148: 471-477
- Baker NR, Oxborough K, Lawson T, Morison JIL (2001) High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *Journal Of Experimental Botany* 52: 356
- Balachandran S, Hurry VM, Kelley SE, Osmond CB, Robinson SA, Rohozinski J, Seaton GGR, Sims DA (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100: 203-213
- Ball MC, Butterworth JA, Roden JS, Christian R, Egerton JJG (1995) Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 311-319
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE, Baker NR (2003) Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132: 485-493
- Beggs CJ, Stolzerjehle A, Wellmann E (1985) Isoflavonoid formation as an indicator of UV stress in bean (*Phaseolus-vulgaris* L) leaves - the significance of photorepair in assessing potential damage by increased solar UV-B radiation. *Plant Physiology* 79: 630-634
- Bilger W, Björkman O (1994) Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium-hirsutum* L). *Planta* 193: 238-246
- Blackbourn HD, Jeger MJ, John P, Telfer A, Barber J (1990) Inhibition of degreening in the peel of bananas ripened at tropical temperatures. 4. Photosynthetic capacity of ripening bananas and plantains in relation to changes in the lipid-composition of ripening banana peel. *Annals of Applied Biology* 117: 163-174
- Bongi G, Palliotti A, Rocchi P (1994) Blue-green fluorescence excited by UV laser on leaves of different species originates from cutin and is sensitive to leaf temperature. *Plant Cell and Environment* 17: 777-780
- Bradbury M, Baker NR (1984) A quantitative-determination of photochemical and non-photochemical quenching during the slow phase of the chlorophyll fluorescence induction curve of bean-leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 765: 275-281
- Bron IU, Ribeiro RV, Azzolini M, Jacomino AP, Machado EC (2004) Chlorophyll fluorescence as a tool to evaluate the ripening of 'Golden' papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 33: 163-173
- Buschmann C (2007) Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* 92: 261-271
- Buschmann C, Langsdorf G, Lichtenthaler HK (2000) Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* 38: 483-491

- Carter GA, Jones JH, Mitchell RJ, Brewer CH (1996) Detection of solar-excited chlorophyll a fluorescence and leaf photosynthetic capacity using a Fraunhofer Line Radiometer. *Remote Sensing of Environment* 55: 89-92
- Carter GA, Theisen AF, Mitchell RJ (1990) Chlorophyll fluorescence measured using the fraunhofer line-depth principle and relationship to photosynthetic rate in the field. *Plant Cell and Environment* 13: 79-83
- Cecchi G, Mazzinghi P, Pantani L, Valentini R, Tirelli D, Deangelis P (1994) Remote-sensing of chlorophyll-a fluorescence of vegetation canopies .1. Near and far-field measurement techniques. *Remote Sensing of Environment* 47: 18-28
- Dambrosio N, Szabo K, Lichtenthaler HK (1992) Increase of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 during the autumnal chlorophyll breakdown. *Radiation and Environmental Biophysics* 31: 51-62
- Demmig B, Björkman O (1987) Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of O<sub>2</sub> evolution in leaves of higher-plants. *Planta* 171: 171-184
- Demmig B, Winter K, Kruger A, Czygan FC (1988) Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in nerium-oleander exposed to a combination of high light and water-stress. *Plant Physiology* 87: 17-24
- Edwards GE, Baker NR (1993) Can CO<sub>2</sub> assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis. *Photosynthesis Research* 37: 89-102
- Freedman A, Cavender-Bares J, Kebabian PL, Bhaskar R, Scott H, Bazzaz FA (2002) Remote sensing of solar-excited plant fluorescence as a measure of photosynthetic rate. *Photosynthetica* 40: 127-132
- Gitelson AA, Buschmann C, Lichtenthaler HK (1998) Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology* 152: 283-296
- Govindjee (1995) 63 years since Kautsky - chlorophyll-a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 131-160
- Guidi L, Mori S, Degl'Innocenti E, Pecchia S (2007) Effects of ozone exposure or fungal pathogen on white lupin leaves as determined by imaging of chlorophyll a fluorescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 851-857
- Grzesiak MT, Rzepka A, Hura T, Grzesiak S, Hura K, Filek W, Skoczowski A (2007) Changes in response to drought stress of triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. *Photosynthetica* 45: 280-287
- Günther KP, Dahn HG, Ludeker W (1994) Remote-sensing vegetation status by laser-induced fluorescence. *Remote Sensing of Environment* 47: 10-17
- Haboudane D, Miller JR, Tremblay N, Zarco-Tejada PJ, Dextraze L (2002) Integrated narrow-band vegetation indices for prediction of crop chlorophyll content for application to precision agriculture. *Remote Sensing of Environment* 81: 416-426
- Hák R, Lichtenthaler HK, Rinderle U (1990) Decrease of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves. *Radiation and Environmental Biophysics* 29: 329-336
- Hartley RD (1973) Lignin carbohydrate linkages in plant cell-walls .1. Carbohydrate esters of ferulic acid as components of cell-walls of *Lolium-multiflorum*. *Phytochemistry* 12: 661-665
- Heisel F, Sowinska M, Miehé JA, Lang M, Lichtenthaler HK (1996) Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *Journal of Plant Physiology* 148: 622-631



- Kebabian PL, Theisen AF, Kallelis, S Freedman A (1999) A passive two-band sensor of sunlight-excited plant fluorescence. *Review of Scientific Instruments* 70: 4386-4393
- Kolber Z, Klimov D, Ananyev, G Rascher U, Berry J, Osmond B (2005) Measuring photosynthetic parameters at a distance: laser induced fluorescence transient (LIFT) method for remote measurements of photosynthesis in terrestrial vegetation. *Photosynthesis Research* 84: 121-129
- Koscielniak J, Filek W, Biesaga-Koscielniak J (2006) The effect of drought stress on chlorophyll fluorescence in *Lolium-Festuca* hybrids. *Acta Physiologiae Plantarum* 28: 149-158
- Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349
- Lang M, Lichtenthaler HK, Sowinska M, Heisel F, Miehe JA (1996) Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *Journal of Plant Physiology* 148: 613-621
- Lang M, Lichtenthaler HK, Sowinska M, Summ P, Heisel F (1994) Blue, green and red fluorescence signatures and images of tobacco-leaves. *Botanica Acta* 107: 230-236
- Lang M, Stober F, Lichtenthaler HK (1991) Fluorescence emission-spectra of plant-leaves and plant constituents. *Radiation and Environmental Biophysics* 30: 333-347
- Langsdorf G, Buschmann C, Sowinska M, Babani F, Mokry M, Timmermann F, Lichtenthaler HK (2000) Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynthetica* 38: 539-551
- Lenk S, Chaerle L, Pfundel EE, Langsdorf G, Hagenbeek D, Lichtenthaler HK, Van der Straeten D, Buschmann C (2007) Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *Journal of Experimental Botany* 58: 807-814
- Lichtenthaler, HK (1996) Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology* 148: 4-14.
- Lichtenthaler HK, Babani F (2000) Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 889-895
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M (2005a) How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R-Fd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43: 379-393
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Rinderle U, Schmuck G (1986) Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation And Environmental Biophysics* 25: 297-308
- Lichtenthaler HK, Hak R, Rinderle U (1990) The chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 in leaves of different chlorophyll content. *Photosynthesis Research* 25: 295-298
- Lichtenthaler, HK; Lang, M; Sowinska, M, Heisel F, Miehe JA (1996) Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *Journal of Plant Physiology* 148: 599-612
- Lichtenthaler HK, Langsdorf G, Lenk S, Buschmann C (2005b) Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* 43: 355-369
- Lichtenthaler HK, Miehe JA (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2: 316-320
- Lichtenthaler HK, Schweiger J (1998) Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology* 152: 272-282
- Lichtenthaler HK, Wenzel O, Buschmann C, Gitelson A (1998) Plant stress detection by reflectance and fluorescence. *Stress of Life* 851: 271-285

- Liu LY, Zhang YJ, Wang JH, Zhao CJ (2005) Detecting solar-induced chlorophyll fluorescence from field radiance spectra based on the Fraunhofer line principle. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 43: 827-832
- Lohaus G, Heldt HW, Osmond CB (2000) Infection with phloem limited Abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: Relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biology* 2: 161-167
- Lu CM, Zhang JH (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 1199-1206
- Lüdeker W, Dahn HG, Gunther KP (1996) Detection of fungal infection of plants by laser-induced fluorescence: An attempt to use remote sensing. *Journal of Plant Physiology* 148: 579-585
- McFarlane JC, Watson RD, Theisen AF, Jackson RD, Ehlerl WL, Pinter PJ, Idso SB, Reginato RJ (1980) Plant stress detection by remote measurement of fluorescence. *Applied Optics* 19: 3287-3289
- Martinez-Carrasco R, Sanchez-Rodriguez J, Perez P (2002) Changes in chlorophyll fluorescence during the course of photoperiod and in response to drought in *Casuarina equisetifolia* Forst. and Forst. *Photosynthetica* 40: 363-368
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668
- Méthy M, Olioso A, Trabaud L (1994) Chlorophyll fluorescence as a tool for management of plant resources. *Remote Sensing of Environment* 47: 2-9
- Moya I, Camenen L, Evain S, Goulas Y, Cerovic ZG, Latouche G, Flexas J, Ounis A (2004) A new instrument for passive remote sensing 1. Measurements of sunlight-induced chlorophyll fluorescence. *Remote Sensing of Environment* 91: 186-197
- Nedbal L, Soukupová J, Whitmarsh J, Trtilek M (2000) Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *Photosynthetica* 38: 571-579
- Papageorgiou GC, Govindjee (2004) 'Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration. Vol. 19' (Springer: Dordrecht, Netherlands)
- Peterson RB, Aylor DE (1995) Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus-vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces-appendiculatus*). *Plant Physiology* 108: 163-171
- Peterson RB, Oja V, Laisk A (2001) Chlorophyll fluorescence at 680 and 730 nm and leaf photosynthesis. *Photosynthesis Research* 70: 185-196
- Pfündel E (1998) Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 56: 185-195
- Ranjbarfordoei A, Samson R, Van Damme P (2006) Chlorophyll fluorescence performance of sweet almond [*Prunus dulcis* (Miller) D. Webb] in response to salinity stress induced by NaCl. *Photosynthetica* 44: 513-522
- Ritchie GA (2006) Chlorophyll fluorescence: What is it and what do the numbers mean? *Forest service proceeding* 43: 34-43
- Roháček K (2006) Fotofyzikální děje během fotosyntetické přeměny zářivé energie na biochemicky využitelnou formu. [www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/4.pdf](http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/4.pdf)
- Roháček K, Barták M (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37: 339-363
- Roháček K (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29

- Saito Y, Saito R, Nomura E, Kawahara TD, Nomura A, Takaragaki S, Ida K, Takeda S (1999) Performance check of vegetation fluorescence imaging lidar through in vivo and remote estimation of chlorophyll concentration inside plant leaves. *Optical Review* 6: 155-159
- Sanchez JF, Quiles MJ (2006) Studying photosynthesis by measuring fluorescence. *Journal of Biological Education* 41: 34-37
- Schreiber U, Schliwa 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
- Schweiger J, Lang M, Lichtenthaler HK (1996) Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *Journal of Plant Physiology* 148: 536-547
- Soukupová J, Cséfalvay L, Urban O, Košvancová M, Marek M, Raschew U, Nedbal L (2008) Annual variation of the steady-state chlorophyll fluorescence emission of evergreen plants in temperate zone. *Functional Plant Biology* 35: 63-76
- Stober F, Lang M, Lichtenthaler HK (1993) Characterization of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures of leaves of wheat and soybean grown under different irradiance. *Physiologia Plantarum* 88: 696-704
- Stober F, Lang M, Lichtenthaler HK (1994) Blue, green, and red fluorescence emission signatures of green, etiolated, and white leaves. *Remote Sensing of Environment* 47: 65-71
- Stober F, Lichtenthaler HK (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
- Strasser RJ, Butler WL (1977) Fluorescence emission-spectra of photosystem-I, photosystem-II and light-harvesting chlorophyll a-b complex of higher-plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 462: 307-313
- Šesták Z, Šiffel P (1997) Leaf-age related differences in chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica* 33: 347-369
- Tartachnyk II, Rademacher I, Kuhbauch W (2006) Distinguishing nitrogen deficiency and fungal infection of winter wheat by laser-induced fluorescence. *Precision Agriculture* 7: 281-293
- Tang JY, Zielinski RE, Zangerl AR, Crofts AR, Berenbaum MR, DeLucia EH (2006) The differential effects of herbivory by first and fourth instars of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera : Noctuidae) on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 57: 527-536
- Valentini R, Cecchi G, Mazzinghi P, Mugnozsa GS, Agati G, Bazzani M, Deangelis P, Fusi F, Matteucci G, Raimondi VP (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
- Virgin, HI (1954) The distortion of fluorescence spectra in leaves by light scattering and its reduction by infiltration. *Physiologia Plantarum* 7: 560-570
- Walters RG, Horton P (1991) Resolution of components of nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynthesis Research* 27: 121-133
- Xu ZZ, Zhou GS, Wang YL, Han GX, Li YJ (2008) Changes in chlorophyll fluorescence in maize plants with imposed rapid dehydration at different leaf ages. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 83-92
- Zarco-Tejada PJ, Miller JR, Mohammed GH, Noland TL, Sampson PH (2000). Chlorophyll fluorescence effects on vegetation apparent reflectance: II. Laboratory and airborne canopy-level measurements with hyperspectral data. *Remote Sensing of Environment* 74: 596-608