

Indikace dopadů stresu na vitalitu *in-vitro* kultivovaných rostlin pomocí pokročilých metod fluorescence chlorofylu

Miloš Barták

Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a anatomie rostlin, Laboratoř fotosyntetických procesů, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Univerzitní kampus Bohunice, Kamenice 5, 625 00 Brno

ABSTRACT

Chlorophyll fluorescence technique represents an important tool for estimation of plant photosynthetic performance and evaluation of effects of particular stress factors on plant vitality. It is widely-exploited method in photosynthetic studies of higher plants and other photosynthesizing organisms such as *e.g.* cyanobacteria, algae, lichens and mosses. Recently, there are numerous application of chlorophyll fluorescence ranging from purely photosynthetic to ecophysiological and plant stress studies. Among them, short- and long-term photosynthetic measurements in the field, pre- and post-harvest control of fruits, growth and vitality control in algal biotechnologies are of great importance. In plant tissue cultures and *in vitro* cultivated plants, the method has met less frequent exploitation than in naturally-grown plants. Since the 90-ies of the last century, however, an increasing number of fluorometric studies in *in vitro* plants has been published. Recently, variety of methods based on chlorophyll fluorescence technique is used in *in vitro* studies. This paper brings a theoretical background, overview of recently used fluorometric methods, and commented examples of their typical applications. The emphasis is given to the most recent and advanced techniques, the use of which is expected to expand in the nearest future.

ÚVOD

Metody měření fotosyntézy se obecně dělí na destruktivní (založené na vážení přírůstku biomasy rostlin vzniklé fotosyntetickou činností) a nedestruktivní (metody založené na biochemickém či biofyzikálním principu). V posledních desetiletích nabývají na významu především metody nedestruktivní (přehledně viz např. Millan-Almaraz et al. 2009), které můžeme dále rozdělit na (1) manometrické (změny tlaku měřené pomocí Warburgova přístroje), (2) elektrochemické (přímé měření fotosyntetického vývinu kyslíku pomocí Clarkovy kyslíkové elektrody, (3) měření výměny plynů pomocí infračervených analyzátorů plynů (fotosyntetická fixace CO₂ v uzavřené měřicí komoře), (4) izotopová měření (využívající značeného uhlíku ¹⁴C), (5) metody fotoakustické, (6) matematické modelování (např. biochemické modely fotosyntézy (přehledně např. Farquhar et al. 2001) založené na oxygenační/karboxylační schopnosti enzymu RUBISCO odvozené ze základní studie Farquhar et al. (1980) a v neposlední řadě (7) metody založené na principu měření indukované fluorescence chlorofylu. V tomto příspěvku je hlavní pozornost věnována detailnímu popisu fluorometrických metod a jejich aplikaci v experimentech zaměřených na *in vitro* kultivaci rostlin. Jednotlivé metody jsou charakterizovány, jsou uvedeny jejich výhody a nevýhody a typické využití.

Principy metody fluorescence chlorofylu a postupy měření

Pro studium fyziologických, zejména produkčních a růstových procesů rostlin kultivovaných *in vitro* má zásadní význam nedestruktivní stanovení jejich okamžitého fyziologického stavu, a to bez narušení vnitřního prostředí kultivační nádoby. Z tohoto pohledu je měření fluorescence chlorofylu, respektive odvozených fotosyntetických parametrů velmi vhodnou a perspektivní metodou. V poslední době bylo uveřejněno několik přehledných prací, které se zabývají metodami měření fluorescence chlorofylu, charakteristikou a rozbohem jednotlivých parametrů fluorescence chlorofylu a jejich typickými aplikacemi ve fyziologii rostlin, např. Roháček et Barták (1999), Maxwell et Johnson (2000). V případě studií uskutečňovaných na rostlinách pěstovaných *in vitro* je však využití těchto metod omezeno technickými parametry kultivačních nádob. Přesto se v současné době fluorometrické metody využívají stále ve větší míře. Jsou-li *in vitro* studie zaměřeny specificky na stanovení rychlosti fotosyntézy, respektive jejího ovlivnění konkrétními růstovými podmínkami, pak velkou výhodou představují experimenty, ve kterých je fotosyntéza měřena souběžně jak gazometrickými metodami (výměna plynů mezi rostlinou a okolím, stanovení rychlosti fotosyntetické fixace CO₂), tak metodami fluorometrickými (např. Fila et al. 2006). Takové experimenty umožňují kauzální analýzu limitních faktorů fotosyntézy, neboť mohou korelovat fotosyntetické parametry vztahující se k fotochemické i biochemické části fotosyntézy. V těchto studiích lze zjištěné změny rychlosti fotosyntézy rostlinného materiálu *in vitro* přiřadit konkrétnímu faktoru, například teplotě listu, relativní vlhkosti vzduchu nebo vodivosti průduchů.

Metoda saturačních pulsů

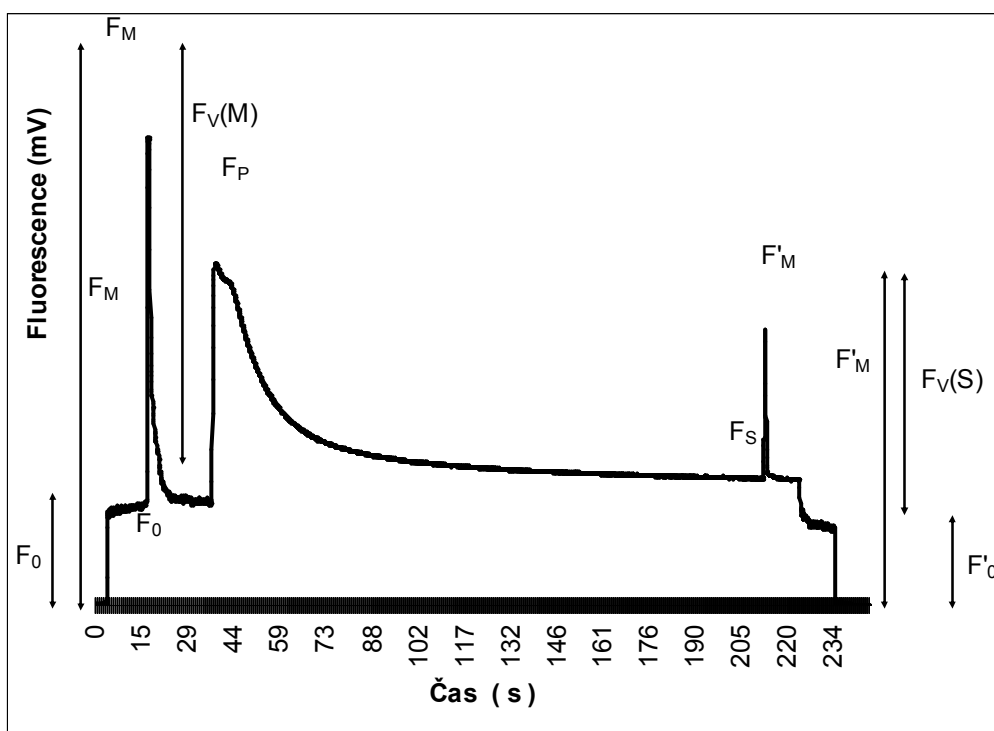
Principem metody je sledování odezvy velikosti emise fluorescence chlorofylu poté, co rostlinu vystavíme krátkodobě pulsu silného světelného záření. Tato metoda se používá pro stanovení maximální a aktuální rychlosti přenosu energie ve fotosystému II a návaznými redoxními systémy membrány thylakoidu. Metoda je založena na principu potlačení fotochemické cesty fotosyntézy, kterého je možno dosáhnout krátkým, ale silným zábleskem (pulzem fotosynteticky aktivního záření) z vhodného umělého zdroje. Krátké saturační ozáření způsobí úplnou redukci chinonu Q_A a tím i dočasné zastavení transportu elektronů ve fotosystému II. Pomocí této metody stanovujeme dva základní parametry fluorescence chlorofylu, a to (1) F_V/F_M (rostlinný materiál je před vystavením saturačního pulsu v temnotně adaptovaném stavu) a (2) kvantový výtěžek fotochemických procesů ve fotosystému II (Φ_{PSII}). Poměr F_V/F_M je často v odborné literatuře nazýván několika synonymy, např. základní fluorescenční poměr, maximální kvantový výtěžek, potenciální kvantový výtěžek, kapacita fotochemických procesů ve fotosystému II. S ohledem na skutečnost, že F_V/F_M patří k nejnáze měřeným fluorescenčním parametrům a že pokles jeho hodnoty velmi citlivě indikuje působení stresu ve fotosyntetickém aparátu, je jeho uplatnění v rostlinných *in vitro* studiích velmi rozsáhlé a příkladů využití je velmi mnoho. Proto na tomto místě uvádím pouze jeden příklad, další jsou uvedeny v následujícím textu při popisu typických aplikací v *in vitro* kulturách. Pomocí hodnot F_V/F_M lze například stanovit rozdíly ve fotosyntetickém aparátu způsobené stářím listů *in vitro* kultivovaných rostlin (Huang et al. 2003).

Pomocí metody saturačních pulsů můžeme stanovit i takzvané fotochemické a nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (bližší viz následující text), které nám napovídají, jaký podíl absorbované energie je fotosyntetickým aparátem využit pro fotosyntézu (tedy syntézu ATP, NADPH a následnou fixaci CO₂) a jaký díl je využit na doprovodné procesy (např. přeměnu absorbované energie na teplo). Proporce mezi

fotochemickým a nefotochemickým zhášením fluorescence chlorofylu velmi citlivě odráží působení stresu na rostliny, a je proto velmi vhodným indikátorem stresu.

Kautského pomalá indukční kinetika

Kautského pomalá indukční kinetika fluorescence chlorofylu je definována jako časová odezva fluorescence chlorofylu získaná na předzatemněném rostlinném vzorku během ozáření trvajícím řádově jednotky minut (Obr. 1). Po ozáření, které je u moderních měřících aparatur vytvářeno přímo světelným zdrojem zabudovaným v přístroji (fluorometru), dojde k nárůstu hodnot fluorescence na úroveň F_P (*angl. peak*) a poté postupně klesá na úroveň takzvané rovnovážné fluorescence F_S (*angl. steady-state fluorescence*). Tento tradiční měřící postup je často doprovázen přidáním saturačního pulsu v temnotně či na světlo adaptovaném vzorku. Po saturačním pulsu je zaznamenán nárůst fluorescence do maximální úrovně F_M (temnotně adaptovaný vzorek) či F'_M (vzorek adaptovaný na světlo). Jednotlivé hodnoty fluorescence chlorofylu získané tímto měřícím postupem se využívají pro výpočet fotosyntetických parametrů fluorescence chlorofylu (viz Tabulka 1).



Obr. 1. Příklad záznamu Kautského křivky fluorescence chlorofylu se dvěma saturačními pulzy (v čase: 15 s, 210 s). Šipkami jsou vyznačeny základní charakteristiky (hodnoty signálů fluorescence chlorofylu: F_0 , F_M , F_V , F_S , F'_M , F'_0) nezbytné pro výpočet parametrů F_V/F_M , qP , qN , Φ_{II} .

Fotochemické a nefotochemické zhášení

Termín “zhášení fluorescence chlorofylu“ v sobě zahrnuje veškeré procesy probíhající v thylakoidní membráně chloroplastu, které snižují hodnotu fluorescence pod její maximální hodnotu. Jedná se o procesy (mechanismy), kterými je excitační energie odváděna z reakčních center (RC PS II). Fotochemické zhášení fluorescence chlorofylu závisí na množství přítomného Q_A v oxidovaném stavu. Proces reoxidace Q_A tedy způsobuje fotochemické

zhášení fluorescence, neboť přenos elektronů z Q_A na následující elektronové přenašeče (Q_B , plastochinonový zásobník, komplex cytochromů b_6-f , atd.) je obvykle ukončen tvorbou NADPH, který je následně využit v biochemické části fotosyntézy. Fotochemické zhášení fluorescence chlorofylu je vyjádřeno koeficientem fotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (qP), který je ekvivalentem množství excitační energie zachycené a přeměněné na chemickou energii v reakčním centru PS II. Nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (qN) v sobě zahrnuje všechny procesy působící pokles kvantového výtěžku fluorescence, které nejsou bezprostředně spjaty s redoxním stavem Q_A . Nefotochemické zhášení je tvořeno třemi základními součástmi podle charakteru fyziologického procesu, který se ve fotosyntetickém aparátu uplatňuje:

- qE energetické zhášení fluorescence (závislé na pH gradientu)
- qT zhášení způsobené odpojením LHC II (fosforylací) a jejich přesunem od PS II k PS I
- qI fotoinhibiční zhášení fluorescence (působené radiačním stresem)

Pro stanovení těchto součástí je nezbytné vystavit rostlinný materiál saturačním pulsům, a to s využitím speciálního postupu (blíže viz Roháček et al. 2008). Matematicky pak platí, že $qN = qE + qT + qI$.

Tabulka 1. Základní parametry fluorescence chlorofylu odvozené z pomalé indukční kinetiky (Kautského kinetika) doplněné o saturační pulsy (zkompileováno z různých literárních zdrojů).

Parametr	Název	Rovnice výpočtu
F_V	variabilní fluorescence	$F_V = F_{V(M)} = F_M - F_0$
F_V/F_M	základní fluorescenční poměr	$F_V / F_M = (F_M - F_0) / F_M$
Φ_{PSII}	kvantový výtěžek elektronového transportu PS II	$\Phi_{PSII} = (F_M' - F_S) / F_M'$
qP	fotochemické zhášení fluorescence	$qP = (F_M' - F_S) / (F_M' - F_0)$
$q(P)_{rel}$	relativní fotochemické zhášení fluorescence	$q(P)_{rel} = (F_M' - F_S) / (F_M - F_0)$
qN	nefotochemické zhášení fluorescence	$qN = (F_M - F_M') / (F_M - F_0)$
$q(N)_{rel}$	relativní nefotochemické zhášení fluorescence	$q(N)_{rel} = [(F_M - F_0) - (F_M' - F_0')] / (F_M - F_0)$
NPQ	nefotochemické zhášení fluorescence	$NPQ = (F_M - F_M') / F_M'$
qI	odhad koeficientu fotoinhibičního zhášení fluorescence	$qI = 0,832 - (F_V / F_M)$
q_0	zhášení základní fluorescence	$q_0 = (F_0 - F_0') / F_0$
Rfd	relativní pokles fluorescence (<i>syn.</i> index vitality)	$Rfd = (F_P - F_S) / F_S$

Rychlé indukční kinetiky

Rychlá indukční kinetika fluorescence chlorofylu je definována jako nárůst fluorescence chlorofylu, který je zaznamenán na temnotně adaptovaném (zatměném) vzorku fotosyntetizujícího organismu během prvních jednotek sekund poté, co byl vzorek vystaven velmi krátkému působení (1-2 s) záření. Kinetika má typický polyfázický charakter, který vykazuje několik významných bodů (úrovní), které jsou označeny symboly písmen O, J, I, P

(Obr. 2). Proto se tyto kinetiky někdy v odborné literatuře uvádí jako OJIP křivky (Strasser et al. 2004). Bod „O“ označuje "počáteční fluorescenci (*angl. Origin*)" a odpovídá úrovni základní fluorescence, která bývá v jiných studiích také označována zkratkou F_0 . Body značené jako „J“ a „I“ odráží krátkodobou rovnováhu mezi množstvím excitační energie absorbovaného záření v PS II a odčerpáváním (přenosem) této energie pomocí redoxního stavu chinonů. Hodnot fluorescence typické pro body „J“ a „I“ je dosaženo ve velmi krátkém časovém úseku od okamžiku ozáření vzorku: 2 a 30 ms. Úroveň fluorescence chlorofylu označená „P“ (*angl. Peak*) představuje maximální dosaženou hodnotu (F_P). Obecně platí, že postupný nárůst fluorescence chlorofylu z úrovně O do úrovně P odráží postupné hromadění redukovaného chinonu (Q_A) a inhibici elektronového transportu systémem přenašečů v thylakoidní membráně chloroplastu (Lazár 2009).

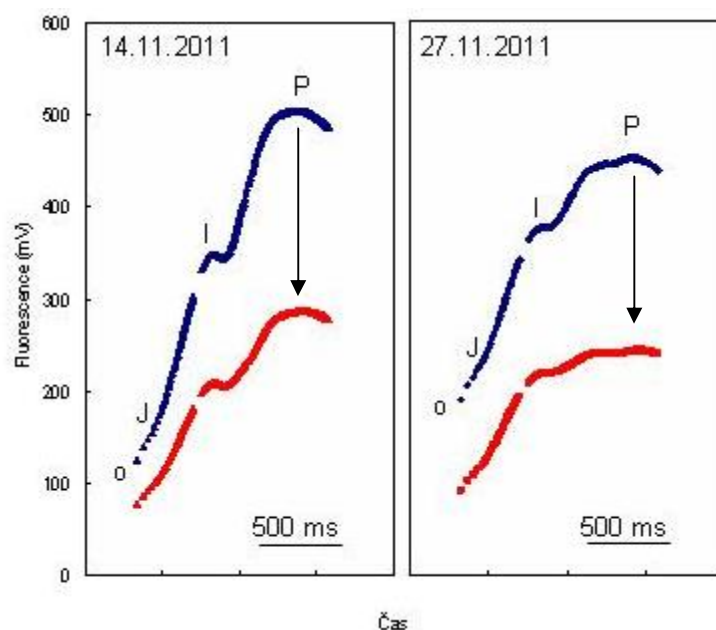
Tabulka 2. Základní parametry fluorescence chlorofylu odvozené z rychlé indukční kinetiky (OJIP). Vyznačení jednotlivých úrovní fluorescence chlorofylu: O, J, I, P (viz Obr. 2). Další (specializované) parametry odvozené z OJIP křivky lze nalézt např. v práci (Strasser et al. 2004, Stirbet et Govindjee 2011), zde neuvedeno.

F_0	základní (pozadí) fluorescence chlorofylu na úrovni O (počátek křivky)
F_J	fluorescence chlorofylu na úrovni J (obvykle na 2 ms)
F_I	fluorescence chlorofylu na úrovni I (typicky na 300 ms)
F_P	fluorescence chlorofylu na úrovni P (peak)
F_V	variabilní fluorescence chlorofylu, $F_V = F_P - F_0$ (nebo $F_V = F_M - F_0$ jako maximum)
$t_{1/2}$	čas, kdy je dosaženo poloviny F_P (nebo F_M)
t_P	čas, kdy (nebo F_M) F_P je dosaženo
F_0 / F_P	poměr základní a maximální úrovně fluorescence chlorofylu
F_V / F_P	poměr variabilní a maximální úrovně fluorescence chlorofylu,
V_J	relativní fluorescence chlorofylu na úrovni J, $V_J = (F_J - F_0) / (F_M - F_0)$
V_I	relativní fluorescence chlorofylu na úrovni I, $V_I = (F_I - F_0) / (F_M - F_0)$
Plocha	plocha nad kinetikou fluorescence chlorofylu vymezena vodorovnou čarou v místě F_P a vertikální čarou v místě F_0

Rychlé indukční kinetiky fluorescence chlorofylu se ve studiích zaměřených na detekci stresu u rostlin pěstovaných *in vitro* dosud využívají v omezeném rozsahu, i když první aplikace této metody se datuje již do devadesátých let minulého století. Romano et al. (1996) analyzovali pomocí křivek OJIP úspěšnost přemístění rostlinek *Quercus suber* z *in vitro* do *ex vitro* podmínek v závislosti na jejich předchozí *in vitro* inokulaci mykorhizními houbami. Zjistili, že mykorhiza zvyšuje kvantový výtěžek fotochemických procesů fotosyntézy, stejně jako elektronový transport a metabolismus fotosyntézy. V posledních letech podobně Swain et al. (2010) pomocí této metody sledovali úspěšnost aklimace rostlin *Solanum nigrum* po přenosu z *in vitro* do *ex vitro*. V naší laboratoři využíváme křivky OJIP pro detekci stresu ve fotosyntetickém aparátu *Potinara* hybr. způsobeného kultivační ozářeností v *in vitro* podmínkách a působením krátkodobého radiačního stresu (fotoinhibice) – viz. Obr. 2

Fluorescenční emisní spektra

Spektrální fluorescenční emisní křivka je definována jako emise fluorescence z fotosyntetizujícího objektu měřeného ve spektrální oblasti 640-800 nm. Změny průběhu spektrálních křivek, zejména hodnot fluorescence, příslušející jednotlivým fotosystémům zjištěné ve specifických vlnových délkách (690 nm: PS II, 740 nm: PS I), jsou považovány za citlivý indikátor působení stresu ve fotosyntetickém aparátu rostlin (např. Pedrós et al 2008). Fluorescence je indukovaná silným světlem z různých zdrojů (lampy s různým emisním spektrem). V poslední době se často uplatňuje i přístup laserem indukované fluorescence chlorofylu. Pomocí této metody například Muñoz-Muñoz et al. (2007) sledovali u *in vitro* pěstovaných rostlin *Saintpaulia ionantha* změny ve fotosyntetickém aparátu vyvolané indukcí organogeneze a v jejím dalším průběhu.

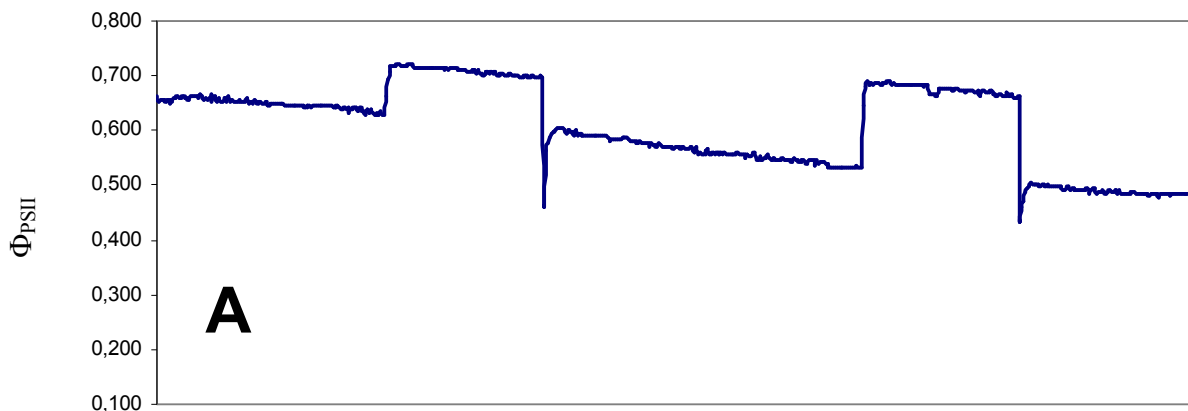


Obr. 2. Průběh rychlých indukčních křivek OJIP na protokormech *Potinara* hybr. měřený ve 14-denním intervalu v průběhu *in vitro* kultivace. Kontrolní rostliny (modrá čára) byly krátkodobě vystaveny silnému fotoinhibičnímu stresu ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 30 min.). Fotoinhibice se projevuje jako pokles (viz šipky) hodnot fluorescence chlorofylu (červená čára) a změna odvozených parametrů, například $(F_P - F_O)/F_P$ - Róth, Barták, Dubová, Rotkovská (nepublikovaná data). Změny ve fotosyntetickém aparátu v průběhu *in vitro* kultivace jsou zřejmé při porovnání mezi levým (14.11.2011) a pravým panelem (27.11.2011).

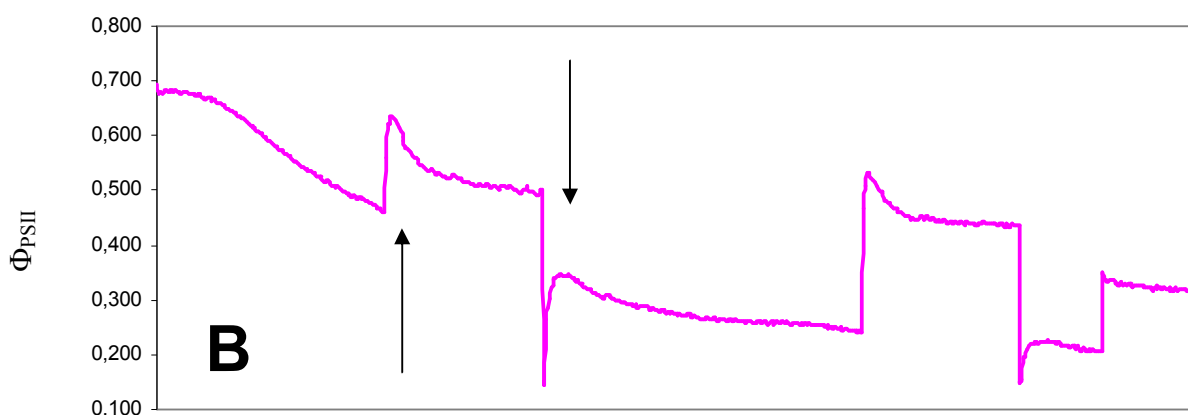
Zjištění stresu v průběhu *in vitro* kultivace

Měření parametrů fluorescence chlorofylu v průběhu *in vitro* kultivace naráží na jistá omezení. Pouze u nevelkého počtu specializovaných aparatur vyrobených zpravidla na zakázku je sonda fluorometru umístěna přímo v kultivační nádobě. Proto se většina experimentů omezuje na fluorometrická měření uskutečněná přes stěnu kultivační nádoby, tj. sonda fluorometru obsahující detektor fluorescenčního záření je umístěna vně nádoby. Toto uspořádání přináší metodické problémy, neboť je třeba vzít v úvahu optické vlastnosti materiálu stěny komory (absorpci, propustnost pro vlnové délky viditelného záření a fluorescenčního signálu), možné interakce záření jak se stěnou nádoby, tak s kondenzačními kapkami vody na vnitřních stěnách nádoby (mnohonásobné odrazy). Proto se zpravidla fluorometrické parametry zjišťují v průběhu opakovaného otevření kultivační nádoby ve sterilním prostředí, především při pravidelné výměně media (viz níže: opakovaná měření s různým časovým krokem).

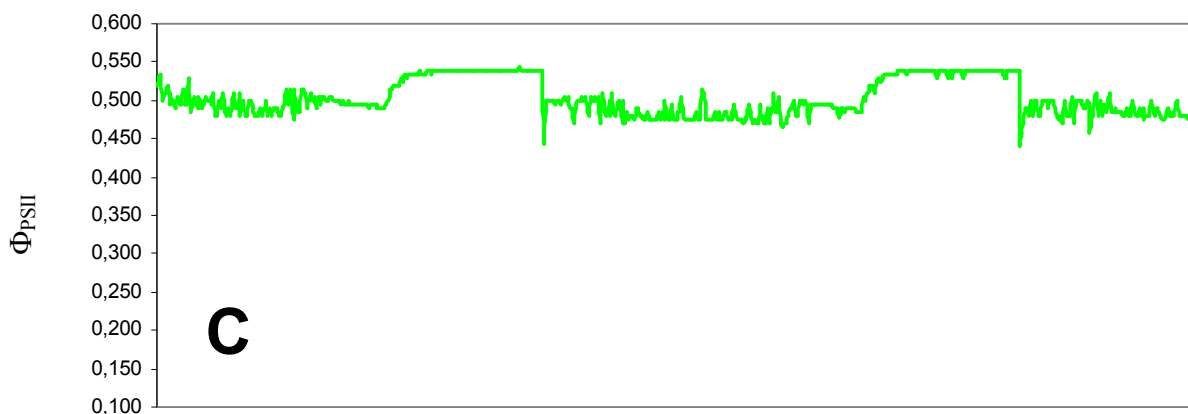
Metody můžeme rozdělit do dvou základních skupin: (1) kontinuální měření vycházející z automatické registrace fluorescence chlorofylu pomocí řídicí a záznamové jednotky fluorometru – např. Róth et al. (2010) a (2) opakovaná měření s různým časovým krokem (zpravidla jednotky dnů nebo týdnů) – např. Zanandrea et al. (2006). Příkladem prvního přístupu je využití přístroje Moni-PAM (H. Walz, Germany) pro měření změn (aklimační reakce) kvantového výtěžku fotosyntetických procesů ve fotosystému II (Φ_{PSII}) během dlouhodobé kultivace po převodu rostlin namnožených *in vitro* na agarem ztuženém médiu do bioreaktoru s tekutým médiem pracujícího na principu dočasně zaplavovaných kultur (Obr. 3).



Kultivační období (27.10.-30.10.2009)



Kultivační období (27.10.-30.10.2009)



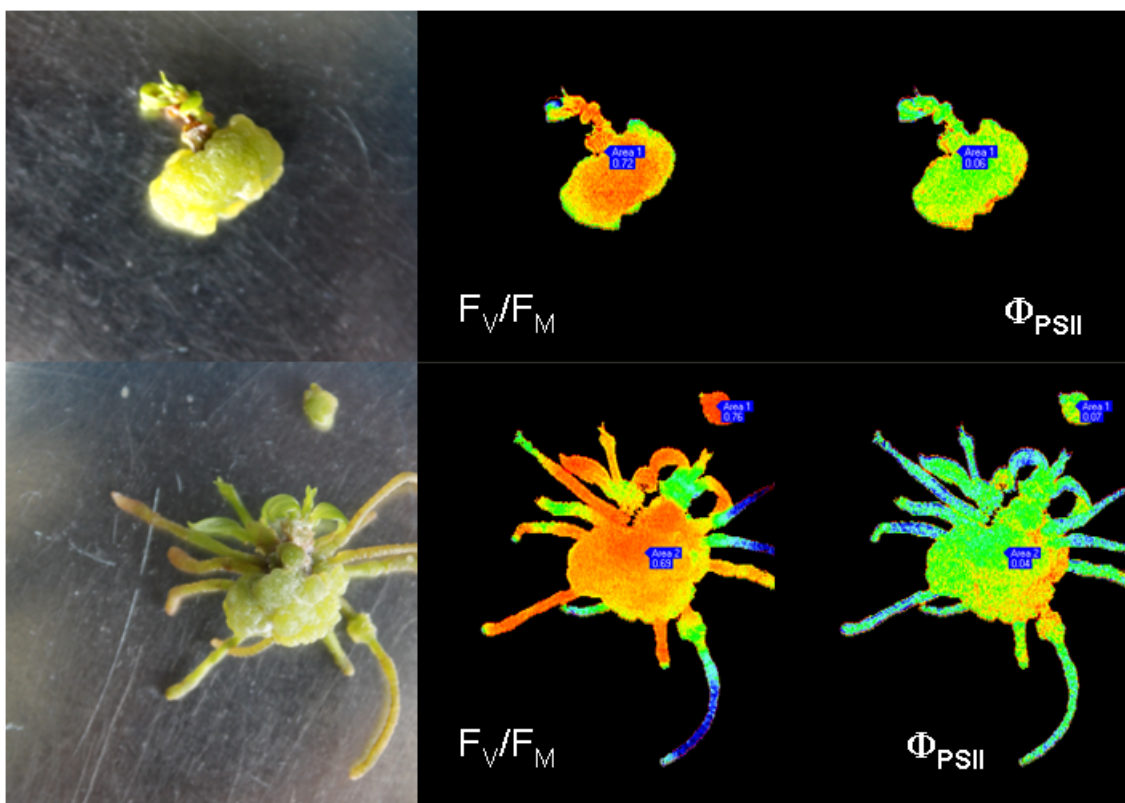
Kultivační období (27.10.-30.10.2009)

Obr. 3. Denní chody hodnot kvantového výtěžku fotochemických procesů ve fotosystému II (Φ_{PSII}) pro experimentální druh *Dionaea muscipula* (A), *Nephrolepis exaltata* (B) a orchidej *Potinara* hybr. (C) pěstovaných v kultivačních boxech s řízeným režimem den/noc. U druhů *Dionaea muscipula* a *Nephrolepis exaltata* je jasně patrná postupná aklimace na kultivační ozářenost (trvalý trend mírně klesajících hodnot, zatímco orchidej *Potinara* je velmi dobře přizpůsobena kultivačnímu záření od počátku kultivace v bioreaktorech RITA®. Kapradinu ledviník (*Nephrolepis exaltata*) můžeme na základě dat charakterizovat jako senzitivní vůči fotoinhibici, neboť v křivkách jsou patrné výrazné krátkodobé aklimační reakce hodnot kvantového výtěžku PS II na přechody světlo/tma a tma/světlo (viz šipka). Vysoký stupeň senzitivity vůči fotoinhibici potvrzují rovněž velmi malé hodnoty kvantového výtěžku (pod 0,2) na konci zobrazeného období (30.10.2009). – Dubová (2010)

Druhý přístup závisí na délce časového kroku, ve kterém jsou fluorometrická měření uskutečňována. Může jít jak o relativně často opakovaná měření v několikadenních odstupech (Genoud et al. 1999), tak o měření prováděná v několikátýdenním intervalu – např. Serret et al. (2001b) u *Gardenia jasminoides*. Délka časového intervalu opakovaných měření se zpravidla řídí četností pasážování. Během pasážování lze uskutečnit i detailní fluorometrická měření využívající pomalou Kautského kinetiku fluorescence chlorofylu doplněnou o analýzu zhášecích mechanismů fluorescence chlorofylu. Tento přístup umožňuje přesnou kauzální analýzu procesů probíhajících v *in vitro* kultivovaných rostlinách, neboť poskytuje širokou sadu fluorescenčních parametrů: F_0 , F_v/F_M , qP , qN , NPQ , R_{df} - blíže viz *Principy metody fluorescence chlorofylu a postupy měření* (Tabulka 2). Pomocí této metody Zanandrea et al. (2006) zjistili, že fotoochranné mechanismy fotosyntézy jsou aktivovány u *in vitro* kultivovaných rostlin *Malus domestica* při aplikaci doplňkového, krátkodobého záření.

Chlorophyll fluorescence imaging

Rozvoj měřicí a záznamové přístrojové techniky, který je zvláště zřetelný v posledních dvou desetiletích, umožňuje uplatnit metodu dvou i třírozměrného zobrazení fluorescence chlorofylu (*chlorophyll fluorescence imaging*) ve fotosyntetizujících organismech (Roháček et al. 2008). Podstatou této metody je zobrazení fotosyntetizujícího objektu, například listu, který buď v odstínech šedí nebo v nepravých barvách zobrazuje pro jednotlivý grafický pixel jak hodnotu fluorescenčních signálů (např. F_0 , F_M , F_S – blíže viz Principy), tak hodnotu jednotlivých parametrů fluorescence chlorofylu, které mají přesný fyziologický význam (například F_v/F_M , Φ_{PSII} , NPQ). Díky technickým omezením souvisejícím s dlouhodobým umístěním *in vitro* pěstovaných rostlin ve sterilizovaných uzavřených nádobkách a nutností umístit kinetickou CCD kameru co nejbližší měřeným objektům se tato technika využívá v experimentech zaměřených na rostliny pěstované *in vitro* méně často než u celých, volně pěstovaných rostlin. Poprvé byla metoda *chlorophyll fluorescence imaging* využita v devadesátých letech minulého století (Smith 1995). První studie využívaly zejména změny parametru F_v/F_M v průběhu kultivace, např. Omasa (1996) měřil postupný rozvoj fotosyntetické aktivity v rostoucích kalusech mrkve (*Daucus carota*). V současné době se tato metoda využívá zejména v experimentech zaměřených na zhodnocení vlivu sacharózy v mediu na snížení rychlosti fotosyntetických procesů různě starých lístků (Ibaraki 2006, *Solanum tuberosum*). Měřenými parametry jsou F_v/F_M nebo Φ_{PSII} , často souběžně s dalšími biofyzikálními indikátory stresu, například PRI – *Plant Reflectance Index*, jak tomu bylo ve studii Ibaraki et Gupta (2010) zaměřené na zhodnocení účinků krátkodobého radiačního stresu. V poslední době se *in vitro* kultury používají i jako modelový objekt pro zjištění časoprostorové heterogenity působení toxických látek na funkci fotosyntetického aparátu. Váňová et al. (2009) měřila účinky fluorantenu, polycyklického aromatického uhlovodíku, na fluorometrické parametry hrachu (*Pisum sativum*). Při aplikaci fluoranthenu byl zjištěn nárůst F_0 a pokles hodnot F_v/F_M a Φ_{PSII} – všechny tyto parametry indikovaly stres ve fotosyntetickém aparátu.



Obr. 4. Kalusy *Mandevilla splendens* s různě starými rozvíjejícími se prýty a kořeny (vlevo) a vizualizace heterogenity fotosyntetických procesů pomocí metody *chlorophyll fluorescence imaging* uvedená v nepravých barvách spektra. Vysoké hodnoty jednotlivých parametrů jsou představovány oranžovou a červenou barvou, nízké hodnoty pak zelenou, modrou až tmavě modrou. Potenciální fotosyntetické procesy jsou zobrazeny ve středním panelu pomocí parametru F_v/F_m , aktuální fotosyntetické procesy v pravém panelu pomocí kvantového výtěžku fotosyntetických procesů v PS II (Φ_{PSII}). Je zřejmé, že fotosyntetické procesy jsou nejvíce stimulovány v kalusech, respektive jejich částech.

Studium vlivu patogenů a mykorrhizních hub

Využití metody indukované fluorescence chlorofylu pro studium vlivu patogenů či mykorrhizních hub na fotosyntetické procesy *in vitro* pěstovaných rostlin se zatím omezuje na specializované práce, nicméně podíl těchto prací v posledních letech narůstá. Jako příklad lze uvést práci Christov et al. (2007), ve které byla sledována odezva rostlin révy vinné (*Vitis vinifera*) na inokulaci virovým patogenem svinutky (GLRaV-3). Byl zjištěn nárůst hodnot nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (qN), který bývá spojován s aktivací ochranných protistresových mechanismů v pletivech infikované rostliny. Výhodou této metody je fakt, že lze indikovat časné fáze působení stresu na fotosyntetický aparát, i když nejsou ještě viditelné jakékoliv makroskopické příznaky poškození listu. Další skupinu prací, které využívají metodu fluorescence chlorofylu v *in vitro* pěstovaných a inokulovaných rostlinách, lze charakterizovat jako řízenou kolonizaci mykorrhizní houbou, tedy dodání mykorrhizního partnera do *in vitro* kultivačního prostředí. Pomocí fluorescence chlorofylu je zjišťován vliv kolonizace mykorrhizní houbou na fotosyntetické procesy. Tento přístup využívá inokulaci houbou *Glomus* sp. a byl uplatňován například u rostlin *Fragaria vesca* (Hernández-Sebastiá et al. 1999) a *Prunus persica* Borkowska et al. (2008).

Přenos rostlin z in vitro do ex vitro podmínek

Změna fyzikálně-chemického prostředí při přenosu rostlin z *in vitro* do *ex vitro* podmínek je natolik závažná, že většina rostlin omezuje svůj růst, dokud se nepřizpůsobí novým podmínkám, zejména snížené vlhkosti vzduchu a zvýšeným hodnotám fotosynteticky aktivního záření. Tento pokles růstu, respektive rychlosti fyziologických procesů, které se na něm podílejí, lze dokumentovat poklesem fotosyntetické aktivity v asimilačních orgánech. Vhodným měřeným parametrem je základní fluorescenční poměr F_V/F_M , který klesá v důsledku stresu způsobeného změnou růstového prostředí. Míra a délka trvání tohoto poklesu oproti hodnotám získaných u *in vitro* rostlin je druhově závislá. Zpravidla je zaznamenán pokles trvající jednotky dnů až týdnů (např. Matysiak 2004). Hsu (2007) uvádí, že tento pokles trvá 1-2 týdny a u vitálních rostlin se F_V/F_M zcela navrací k původním hodnotám naměřeným v období před vylahvováním až po 3 týdnech. Rostliny, u kterých je zaznamenán rychlý návrat hodnot F_V/F_M , pak v následném období pěstování v *ex vitro* podmínkách vykazují zpravidla vyšší rychlost růstu a produkce biomasy. Rychlost aklimace na *ex vitro* podmínky se ještě zvýší, jsou-li experimentální rostliny několik dní před přenesením z *in vitro* do *ex vitro* ovlivněny mírně zvýšenou hodnotou ozáření a doplňkem sacharózy (Kadleček et al. 2001, Van Huylbroeck, J.M., Debergh 1996, Serret et al. 2001a). I když přídavek sacharózy zvyšuje vitalitu a zlepšuje jejich aklimaci na *ex vitro* podmínky, přináší zpravidla pokles primárních fotosyntetických procesů (F_V/F_M) – Fuentes et al. 2005, Cassana et al. 2010. Aklimaci v *ex vitro* podmínkách urychluje rovněž exogenní aplikace některých látek, například antirespirantů. Tento přístup byl uplatněn v práci Pospíšilová et al. (2009). Aplikace ABA bezprostředně po převodu z *in vitro* do *ex vitro* podmínek vedla k nárůstu hodnot fotochemického zhášení (qP). Rovněž pro sledování reakce na tato ovlivnění může posloužit dlouhodobé měření základního fluorescenčního poměru F_V/F_M před přenosem do *ex vitro* podmínek a bezprostředně po něm. Bezprostředně po přenosu do *ex vitro* podmínek se mohou na asimilačních orgánech projevit příznaky fotoinhibice fotosyntézy. Kromě poklesu hodnot F_V/F_M je takový stav charakterizován i poklesem kvantového výtěžku fotochemických procesů ve fotosystému – Φ_{PSII} a nárůstem nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu - qN (Carvalho et al. 2001). Změny hodnot různých parametrů fluorescence chlorofylu mohou dostatečně citlivě indikovat vliv některých faktorů, které zvyšují úspěšnost přenosu z *in vitro* do *ex vitro* podmínek. Počítáme mezi ně například ovlivnění zvýšenou koncentrací CO_2 (Pospíšilová et al. 1999) v *ex vitro* podmínkách nebo zvýšením ozáření v období bezprostředně před přenosem z *in vitro* do *ex vitro* podmínek (Semorádová et al. 2002).

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Borkowska B., Balla I., Szucs E., Michalczuk B. (2008): Evaluation of the response of micropropagated peach rootstock 'Cadaman' and cv. 'Cresthaven' to mycorrhization using chlorophyll *a* fluorescence method. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16: 243-260.
- Cassana F.F., Falqueto A.R., Braga E.J.B., Peters J.A., Bacarin M.A. (2010): Chlorophyll *a* fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22: 167-170.
- Carvalho L.C., Osório M.L., Chaves M.M., Amâncio S. (2001): Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 271-280.

- Dubová J. (2010): Inovace kultivace rostlinných explantátů ve výuce předmětu Bi6120 Rostlinné explantáty a návazných předmětů. Závěrečná zpráva projektu FRVŠ 2362/2009. Masarykova univerzita, 8 s.
- Farquhar G.D., Caemmerer S., Berry J.A. (1980): A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149: 78-90.
- Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A.: (2001): Models of Photosynthesis. *Plant Physiology*, 125: 42-45.
- Fila G., Badeck F.W., Meyer S., Cerovic Z., Ghashghaie J. (2006): Relationships between leaf conductance to CO₂ diffusion and photosynthesis in micropropagated grapevine plants, before and after *ex vitro* acclimatization. *J. Exp. Bot.*, 57: 2687-95.
- Fuentes G., Talavera C., Oropeza C., Desjardins Y., Santamaria J.M. (2005): Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 41: 69-76.
- Genoud C., Coudret A., Amalric C., Sallanon H. (1999): Effects of micropropagation conditions of rose shootlets on chlorophyll fluorescence. *Photosynthetica*, 36: 243-251.
- Hernández-Sebastià C., Piché Y., Desjardins Y. (1999): Water relations of whole strawberry plantlets *in vitro* inoculated with *Glomus intraradices* in a tripartite culture system. *Plant Science*, 143: 81-91.
- Hsu B.-D. (2007): On the possibility of using a chlorophyll fluorescence parameter as an indirect indicator for the growth of *Phalaenopsis* seedlings. *Plant Science*, 172: 604-608.
- Huang L.C., Weng J.-H., Wang C.-H., Kuo C.-I., Shieh Y.-J. (2003): Photosynthetic potentials of *in vitro*-grown juvenile, adult, and rejuvenated *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. Shoots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 44: 31-35.
- Christov I., Stefanov D., Velinov T., Goltsev V., Georgieva K., Abracheva P., Genova Y., Christov N. (2007): The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown *in vitro* plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1124-1133.
- Ibaraki, (2006): Evaluation of photosynthetic capacity in micropropagated plants by image analysis. *In: S.D. Gupta, Y. Ibaraki (eds.): Plant Tissue Culture Engineering*. Springer, Dordrecht, the Netherlands, 15-29.
- Ibaraki Y., Gupta S.D. (2010): Nondestructive evaluation of the photosynthetic properties of micropropagated plantlets by imaging photochemical reflectance index under low light intensity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 46: 530-536.
- Kadleček P., Tichá I., Haisel D., Čapková V., Schäfer C. (2001): Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science*, 161: 695-701.
- Lazár D. (2009): Modelling of light-induced chlorophyll a fluorescence rise (O-J-I-P transient) and changes in 820 nm-transmittance signal of photosynthesis. *Photosynthetica*, 47: 483-498.
- Matysiak B. (2004): Effect of light intensity on growth and chlorophyll fluorescence of *Rhododendron* microcuttings during acclimatisation. *Folia Horticulturae*, 16: 107-114.
- Maxwell K., Johnson N.G. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 20: 659-668.
- Millan-Almaraz J.R., Guevara-Gonzalez R.G., Romero-Troncoso R.J., Osornio-Rios R.A., Torres-Pacheco I (2009): Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: A review. *African Journal of Biotechnology*, 8: 7340-7349.
- Muñoz-Muñoz A.C., Gutiérrez-Pulido H., Rodríguez-Domínguez J-R., Gutiérrez-Mora A., Rodríguez-Garay B., Cervantes-Martínez J.(2007): Analysis of laser-induced fluorescence spectra of *in vitro* plant tissue cultures. *Applied Optics*, 46: 2138-2142.
- Omasa K. (1996) Image diagnosis of photosynthesis in cultured tissues. *Acta Hort.* 319: 653-658.
- Pedrés R., Moya I., Goulasb Y., Jacquemoud S. (2008): Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 7: 498-502.
- Pospíšilová J., Synková H., Haisel D., Čatský J., Wilhelmová N., Šrámek F. (1999): Effect of elevated CO₂ concentration on acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Journal of Experimental Botany*, 50:119-126.
- Pospíšilová et al. (2009): Effect of abscisic acid on photosynthetic parameters during *ex vitro* transfer of micropropagated tobacco plantlets. *Biologia Plantarum*, 53: 11-20.

- Roháček K., Barták M. (1999): Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica*, 37: 339-363.
- Roháček K., Soukupová J., Barták M. (2008): Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In: B. Schefs (ed.): *Plant Cell Compartments – Selected Topics*. Research Signpost, Kerala Publishers, India, p. 41-104.
- Romano A., Strasser R.J., Eggenberg P., Martins-Loução M.A. (1996): Mycorrhization of cork oak micropropagated plantlets: its vitality during acclimatization measured with fast fluorescence techniques. In: C. Azkon-Aguilar, J.M. Barea (eds.): *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development: proceedings of the fourth European Symposium on Mycorrhizas*. Brussels; Luxemburg.
- Róth M., Dubová J., Barták M., Rotkowská J. (2010): Zkušenosti s kultivací explantátů v bioreaktorech RITA®. In: M. Barták, J. Hájek, J. Dubová (eds.): *Workshop: Rostlinné biotechnologie - Současné trendy ve výuce a výzkumu. Sborník příspěvků*. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno, ISBN 978-80-210-5382-3, s. 29-33.
- Semorádová Š., Synková H., Pospíšilová J. (2002): Responses of tobacco plantlets to change of irradiance during transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica*, 40: 605-614.
- Serret M.D., Trillas M.I., Matas J., Araus J.L. (2001a): The effect of *in vitro* culture conditions on the pattern of photoinhibition during acclimation of *Gardenia* plantlets to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica*, 39: 67-73.
- Serret M.D., Trillas M.I., Matas J., Araus J.L. (2001b): The effect of photoautotrophy on photosynthesis and photoinhibition of *Gardenia* plantlets during micropropagation. *Photosynthetica*, 39: 245-255.
- Smith M.A.L. (1995): Image analysis for plant tissue culture and micropropagation. In: J. Aitken Christie, T. Kozai, M.A.L. Smith (eds): *Automation and environmental control in plant tissue cultures*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 145–163.
- Stirbet A., Govindjee (2011): On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104: 236-257.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004): Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: G.C. Papageorgiou, Govindjee (eds.): *Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis*, Springer, Dordrecht, 321-362.
- Swain S.S., Tripathy T., Pradipta K., Mohapatra P.K., Chand P.K. (2010): Photosynthetic and transpiration responses of *in vitro*-regenerated *Solanum nigrum* L. plants to *ex vitro* adaptation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 46: 134-141.
- Van Huylenbroeck J.M., Debergh P.C. (1996): Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiologia Plantarum*, 96: 298–304.
- Váňová M., Kummerová M., Klemš M., Zezulka S. (2009): Fluoranthene influences endogenous abscisic acid level and primary photosynthetic processes in pea (*Pisum sativum* L.) plants *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 57: 39–47.
- Zanandrea I., Bacarin M.A., Schmitz D.D., Braga E.J., Peters J.A. (2006): Chlorophyll fluorescence in *in vitro* cultivated apple. *Rev. Bras. Agrociencia – Pelotas*, 12: 305-308.