



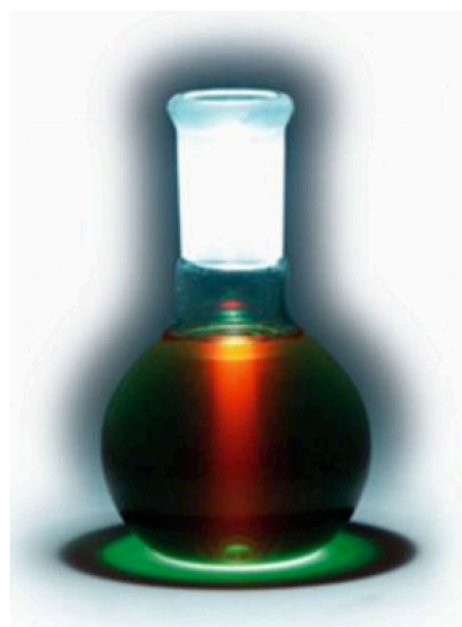
## Možnosti využití zobrazovací fluorescence chlorofylu *a*

Chlorofyl *a* je unikátní pigment rostlin, který oddělením náboje zahajuje přeměnu energie absorbovaných fotonů v chemicky vázanou energii ve fotosyntéze. Větší část pohlcené energie je však přeměněna v teplo a menší podíl je vyzáren v podobě fluorescence (obrázek 1). Protože intenzita fluorescence fotosyntetického aparátu je nepřímo úměrná fotosyntézou využitému světlu, představuje měření fluorescence slibný nástroj nejen ve výzkumu fotosyntézy. S teoretickou podstatou fluorescence chlorofylu *a* a jejím měřením máte možnost se seznámit v úloze 7 – Měření fotosyntézy pomocí chlorofylové fluorescence. V této úloze si ukážeme možnosti využití zobrazovací fluorescence, tedy fluorescence s plošným rozlišením.

### I. úkoly

1/ Změřte a interpretujte propustnost kutikuly listů pro herbicid DCMU (Diuron) pomocí zobrazovací fluorescence chlorofylu *a*. Porovnejte listy dvou druhů rostlin a určete, jak se liší propustnost jejich kutikul.

2/ Pozorujte chloroplasty v lístku mechoroštu pomocí fluorescenčního mikroskopu (díky fluorescenci chlorofylu v chloroplastech). Lze pozorovat pohyb chloroplastů vlivem ozáření listu?



**Obrázek 1. Fluorescence izolovaného chlorofylu.**

Zatímco roztok chlorofylu pohlcuje světlo různých vlnových délek (nejvíce modré a červené), září jasně červeně (vlnová délka přibližně 690 nm). V roztoku chlorofylu je podíl fluorescence vzhledem k pohlcenému množství světla značný. V živých buňkách je mnohem menší (3–7 % pohlcených fotonů), protože významnou část energie fotonů využívá fotosyntéza a část je řízeně převedena na teplo. Převzato z <http://plantsinaction.science.uq.edu.au>



## II. postup

- A / Odeberte listy ze dvou druhů rostlin s předpokládanou odlišnou propustností kutikuly.
- B/ Pomocí korkovrtu vyříznete asi 2cm terčíky ve třech opakováních (v případě zájmu můžete odebrat vzorky zvláště pro svrchní a spodní stranu listu).
- C/ Terčíky umístěte na vlhkou buničitou vatu do Petriho misky.
- D/ Na střed terčků vytvořte mikropipetou 60  $\mu$ l kapky vody (kontrola) nebo  $10^{-3}$  M roztoku DCMU.
- E/ Umístěte Petriho misku do zobrazovacího fluorimetru FluorCam a podle pokynů vedoucího úlohy měřte v pravidelných intervalech fluorescenci chlorofylu.
- F/ V mezičasech pozorujte fluorescenci jednotlivých chloroplastů v lístcích mechorostru měříku (*Plagiomnium* sp.) pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX 61. Pokuste se vytvořit fotografie fluoreskujících chloroplastů v různý čas od osvětlení. Je vidět změna polohy chloroplastů v buňce při intenzivním osvětlení?
- G/ Vytvořte protokol, který bude interpretovat 1/ propustnost kutikuly a 2/ pozorování chloroplastů. Vedoucí úlohy – pokud o to projevíte zájem – vám bude rád k dispozici.
- H/ Pokud jste „vyvolená skupina“, vytvořte prezentaci a pokuste se ji úspěšně prezentovat na závěrečném semináři.

## III. otázky k zamyšlení před úlohou

(Pokud se zamýšlet nechcete, nemohu vás nutit. O otázkách si s vámi na začátku pohovořím. Pokud ale budete jevit zájem a kreativitu, bude naše spolupráce jistě radostnější ☺).

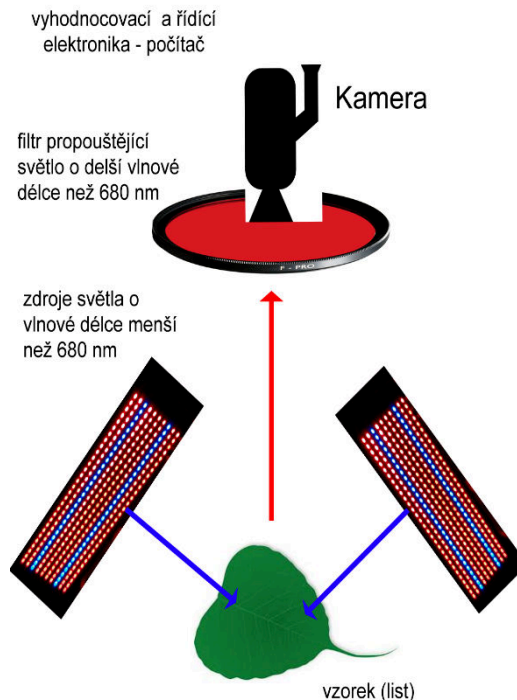
- a/ Proč vidíme fluorescenci chlorofylu v roztoku na obrázku 1, když není použit žádný filtr?
- b/ Dovedete vysvětlit, proč vlnová délka fluorescence je (krom více-fotonové absorpce) delší, než vlnová délka excitace, tedy záření, které fluorescenci vyvolalo? Pokud budete někde hledat, jako dobré heslo vám poslouží „Stokesův posun“.
- c/ Znáte jinou látku/objekt, než chlorofyl, který jeví fluorescenci?
- d/ Máte představu jak tlustá je a z čeho se skládá kutikula rostlin? Na kterých rostlinných částech kutikulu najdeme?
- e/ Proč voda (DCMU) na povrchu listu neproteče přes průduchy do listu?
- f/ Kolik navážíte DCMU pro přípravu 100 ml  $10^{-3}$  M roztoku? Lze tuto otázku řešit bez dalších informací?
- g/ Při pozorování chloroplastů ve fluorescenčním mikroskopu si můžete všimnout, že červená fluorescence není po povrchu chloroplastu rozmístěna rovnoměrně. Víte proč? Jak se nazývají ultrastukturní součásti chloroplastů?
- h/ Pravděpodobně jste slyšeli, že chloroplasty se v buňce pohybují. Proč to dělají a jaký je mechanismus jejich pohybu?

KONTAKT: Jiří Kubásek, [jirkak79@gmail.com](mailto:jirkak79@gmail.com), 723 027 301.



## IV. zobrazovací (2D) fluorescenční měření (FluorCam)

Měření fluorescence chlorofylu u rostlin má dlouhou historii. My začneme v době, kdy technika dosáhla vyspělosti, která umožnila pozorovat časoprostorovou variabilitu fluorescence v ploše. Zní to složitě, ale základní princip je jednoduchý: **Videokamera** je schopna zobrazovat plošné rozlišení jasu objektů, jak všichni víme. Pokud před kameru předřadíme **filtr**, který k citlivému prvku (CCD či CMOS senzor) pustí pouze vlnové délky, které produkuje fluorescence ( $\lambda > 680\text{nm}$ ), můžeme snadno mapovat fluorescenci s plošným a časovým rozlišením, jak ukazuje obrázek 2. Je vhodné, pokud excitační zdroj nevyzařuje záření, které má spektrální překryv s fluorescencí. Není to však zcela nutné. Pulzně modulovaným měřením (PAM) dokážeme celkem úspěšně oddělit požadovou ozářenost od fluorescence i v případě překryvu. Tento popis je velmi zjednodušený. O dalších předpokladech a způsobech měření fluorescence si řekneme osobně. Pro zvědavější doporučuji shlédnout a pročíst legendu obrázku 5.



**Obrázek 2. Schématické znázornění plošného měření fluorescence chlorofylu.** Kamera zaznamenává v pravidelných intervalech fluorescenci chlorofylu (ca 680 – 730 nm), která je vybuzena LED panely o kratší vlnové délce. Filtr předřazený před objektiv kamery brání vstupu excitačního záření ke snímacímu prvku kamery. Součástí je řídicí elektronika jak kamery, tak světelných panelů a vyhodnocovací počítač.

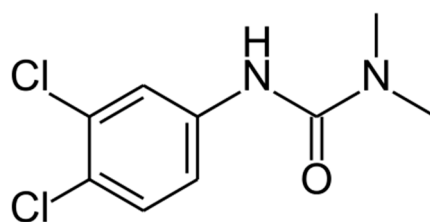
### IV.I. Měření propustnosti rostlinné kutikuly pro fotosyntetický herbicid DCMU

**Kutikula rostlin** je složena z voduodpuzejících látek (kutin, vosky) a má také velmi malou propustnost pro plyny a vodní páru. Představuje tak významnou bariéru, která chrání list před vyschnutím. Zároveň ale kutikula brání vstupu  $\text{CO}_2$  do listu, který je potřebný pro fotosyntézu a růst. Proto jsou v pokožce listu běžně uzavíratelné otvůrky – **průduchy**. Jejich okraj je tvořen dvěma **svěracími buňkami**, které změnou vnitrobuněčného tlaku (turgoru) mění tvar a průduch se otevírá (při vzrůstu tlaku) nebo uzavírá (při poklesu). Propustnost kutikuly pro vodu a jiné látky je často určující pro přežití rostlin v suchozemském prostředí, protože při zcela zavřených průduších stále prochází nenulové množství vody právě kutikulou. Propustnost pro minerální živiny a jiné látky je zase důležitá v zemědělství (hnojení na list, aplikace herbicidů). Měření propustnosti kutikuly je nesnadné například proto, že většinou nevíme, jaký podíl toku (např. vody) se uskutečňuje přes průduchy (a jen někdy máme k dispozici kutikulu bez průduchů). Elegantní metodou je měření prostupu netěkavé látky, která inhibuje fotosyntézu a zvyšuje tak fluorescenci. Takový je právě námi použitý fotosyntetický herbicid DCMU. Kapky vody na listu díky svému **povrchovému napětí** a hydrofobnosti kutikuly nejsou schopny „protéci“ přes průduchy směrem do listu (list je takto evolučně vybaven, protože kapky stojící na listech jsou v přírodě běžné). Ve vodě rozpuštěná DCMU difunduje jen přes kutikulu, se kterou jsou kapky v kontaktu.

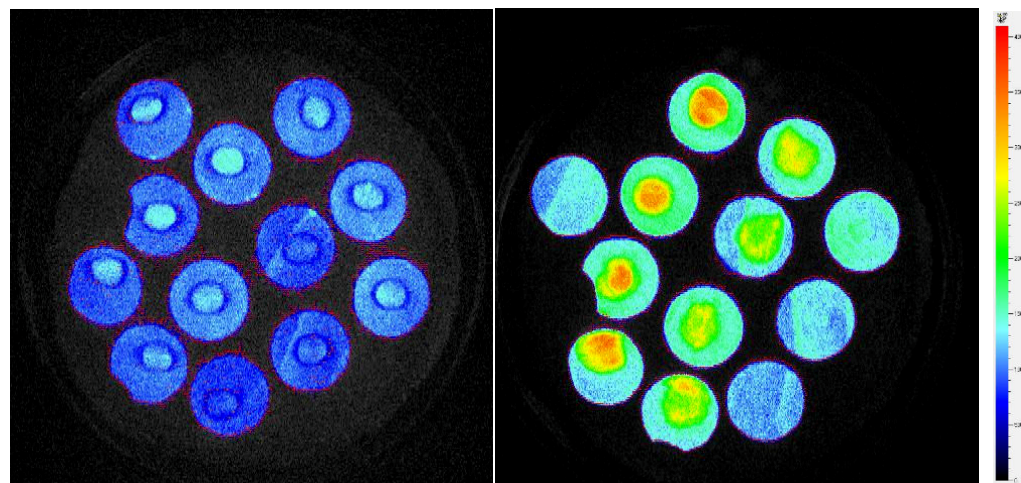


**DCMU (3-3,4-dichlorophenyl-1,1-dimethylmočovina)** blokuje fotosystém II, který pak není schopen předávat redukované přenašeče na fotosystém I. Důsledkem je **zvýšená intenzita fluorescence chlorofylu**, jako alternativní cesty disipace (přeměny) energie.

Přepočít rychlosti změny fluorescence na skutečnou propustnost kutikuly je nesnadný a časově i matematicky přesahuje rámec úlohy. Záleží na mnoha faktorech, jako je rozpustnost DCMU v kutikulárních voscích/vodě, tloušťce listu, obsahu a rozmístění chloroplastů v listu, koncentraci DCMU, při které v chloroplastech zcela ustává fotosyntéza a dalších. My si proto znázorníme jen relativní porovnání propustnosti různých listů či stran listu pro DCMU. Relativní rychlost inhibice fotosyntézy následně vyneseme do grafu.



**Obrázek 3.** Kapky vody nebo roztoku herbicidu o objemu ca. 60  $\mu\text{l}$  nanosené na listové terčíky citrusovníku (*Citrus* sp.). List je otočen spodní stranou nahoru (spodní dvě řady terčků) nebo svrchní stranou nahoru (horní dvě řady). Na čtveřici terčků v prostředních řadách je aplikován herbicid DCMU v koncentraci  $10^{-3}$  mol  $\text{l}^{-1}$ . Na okrajové řady je aplikována čistá voda jako kontrola. Vpravo je strukturní vzorec DCMU.

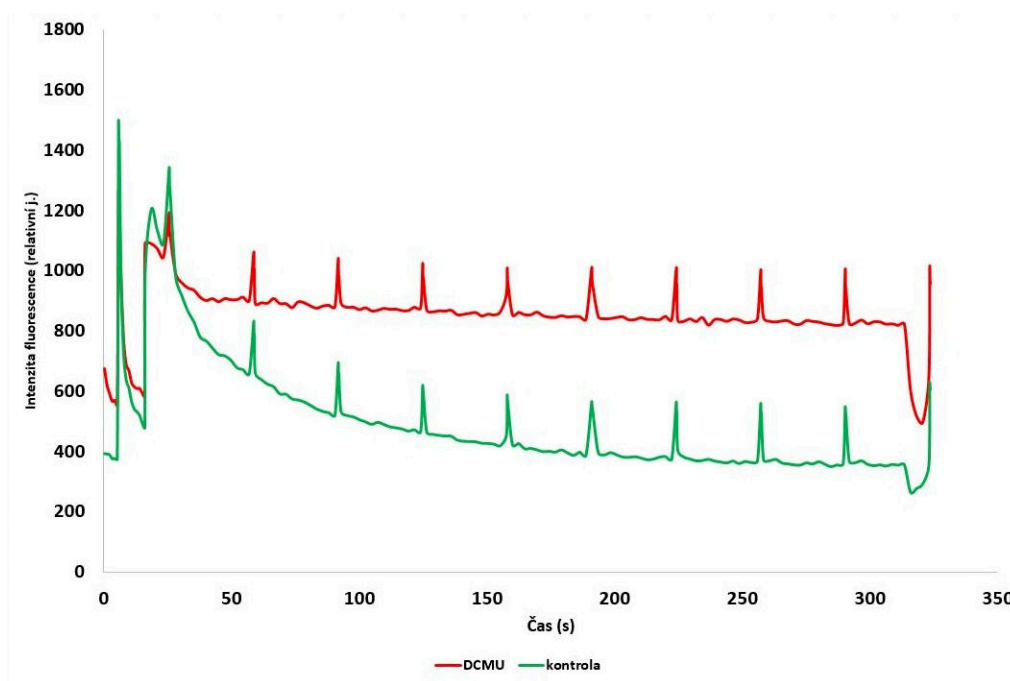


**Obrázek 4.** Fluorescence chlorofylu listových terčků z obrázku 3 ve falešných barvách (viz barevná škála). Vlevo těsně po nanesení kapek, vpravo druhý den. Vidíme, že na čtveřicích terčků v prostředních řadách došlo k výraznému nárůstu fluorescence z důvodu zablokování fotosyntézy herbicidem. Drobné zvýšení jasu na levém obrázku je z důvodu efektu čočky vodních kapek.



## IV.II. vyhodnocování fluorescenčního měření

Změna fluorescence je nepřímo úměrná změně (blokování) fotosyntézy. Zatímco u zdravého listu klesá fluorescence během souvislého osvětlení (obrázek 5 od času 20 s, zelená křivka) u části listové čepele, kde je fotosyntéza zablokována, zůstává fluorescence stálá (červená křivka). Většinou nehodnotíme přímo fluorescenci, nýbrž tzv. **Fluorescenční parametry**. Tyto jsou poměrem intenzit pro daný vzorek (a různé osvětlení) a mají tedy relativní povahu. Tím dokážeme odfiltrovat nežádoucí změny fluorescence například vlivem rozdílného obsahu chlorofylu ve vzorku a hodnoty jsou pak mnohem **robustnější**. Zájemce o hlubší pochopení měření fluorescence opět odkazují k návodu k **úloze 7 - Měření fotosyntézy pomocí chlorofylové fluorescence**. Jeden z možných protokolů pro měření změny fluorescence listu na světle je na obrázku 5.

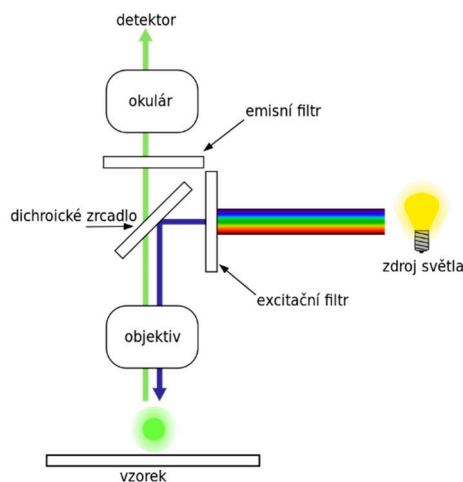


**Obrázek 5. Indukce fluorescence v části listové čepele s fotosyntézou inhibovanou DCMU (červeně) a kontrolního listu (zeleně).** V čase nula na list svítí slabé „měřící světlo“, které vyvolává jen slabou fotosyntézu. Nízká je tedy i fluorescence, protože fotosyntéza je schopná zpracovat relativně nejvíce fotonů. V čase ca. 5 s je na list aplikován 1 sekundu trvající saturační záblesk o intenzitě vyšší, než plné sluneční světlo. Protože fotosyntéza není schopna takto intenzivní světlo využít, relativně více fotonů převádí svou energii v teplo. Proto naroste skokově i fluorescence (první vysoký pík). Další skokový nárůst fluorescence zaznamenáváme v našem případě v čase 20 s, kdy je rozsvíceno tzv. „aktinické světlo“. To pohání fotosyntézu, kterou však plně nenasycuje. Aktinické světlo svítí až do času 320 s, kdy je zhasnuto. Během tohoto času jsou aplikovány v pravidelných intervalech saturační záblesky (menší píky na křivce). Právě během těchto 300 sekund vidíme nejlépe odlišné chování listů. U kontrolního listu po ozáření roste fotosyntéza a fluorescence proto rychle klesá. Naproti tomu u listu s DCMU výrazný pokles nevidíme, což je důkazem, že herbicid téměř kompletně zablokoval fotosyntézu a nahromaděná energie se vyzáří zpět fluorescencí.



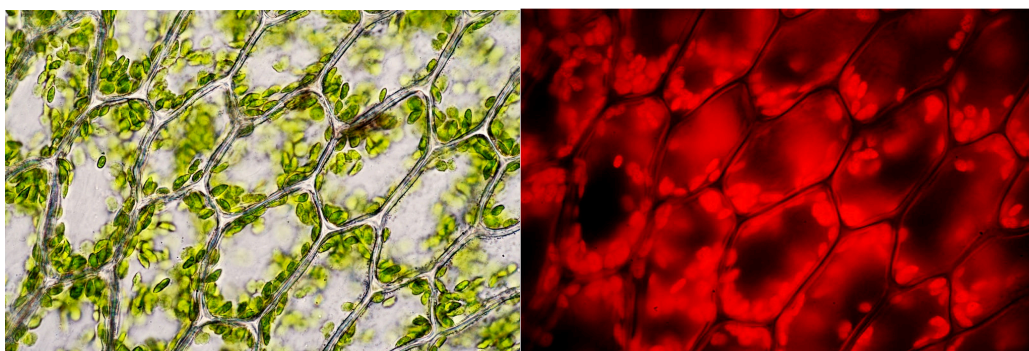
## V. sledování fluorescence chlorofylu na mikroskopické úrovni (fluorescenční mikroskop Olympus BX61)

Pro fluorescenční mikroskopii vlastně platí stejný základní princip jako pro předchozí metodu, jen na menší prostorové škále. Následující odstavec proto, částečně jinými slovy, popisuje jen drobné odlišnosti. Fluorescenční mikroskop (obrázek 6) je zařízení značně univerzální. Umožňuje volit různé vlnové délky excitace jak ve viditelném, tak ultrafialovém oboru záření a podobně i různá spektra emise. Pozorování fluorescence chlorofylu zdaleka není „hlavním proudem“ fluorescenční mikroskopie. V našem případě pozorujeme fluorescenci chlorofylu v oblasti červeného světla o vlnové délce ca. 680 až 730 nm. Excitační světlo proto musí mít kratší vlnovou délku, aby 1/ vybudilo chlorofyl a 2/ nepronikalo k našemu oku (či detektoru). Budeme používat modré nebo zelené světlo. Zajímavé je, že excitační světlo prochází v našem uspořádání (Olympus BX61) skrze objektiv směrem ke vzorku a emitované světlo opačným směrem. Tuto odlišnost od klasické mikroskopie v procházejícím světle uvidíme snadno při našem pozorování. Zelené světlo intenzivně ozařuje vzorek na sklíčku, ale přes okulár k našemu oku neproniká. Naš fluorescenční mikroskop ovšem není fluorimetrem, takže nám neumožňuje intenzitu fluorescence měřit a vyhodnocovat. Chloroplasty a jejich červenou fluorescenci vidíme na obrázku 7.



**Obrázek 6. Princip fluorescenčního mikroskopu.**

Excitační filtr vybere ze spektra světelného zdroje požadovanou vlnovou délku, které se nepřekrývá ze spektrem fluorescence. Dichroické zrcadlo odráží excitační záření přes objektiv směrem ke vzorku. Vzorkem produkovaná fluorescence postupuje opačným směrem. Pro fluorescenční obor však nejvíce významnou odrazivost a propouští fluorescenci směrem k lidskému oku/detektoru kamery. Emisní filtr slouží k ještě efektivnějšímu odfiltrování excitačního záření. To je až o několik řádů intenzivnější než fluorescence, a pokud by pronikalo k detektoru, bránilo by pozorování fluorescence. Zdroj: <https://cs.wikipedia.org>.



**Obrázek 7. Lístek měřičku *Plagiomnium* sp. pozorované v procházejícím bílém světle (vlevo) a jako červená fluorescence chlorofylu *a* (vpravo).** V případě fluorescenčního snímku bylo použito zelené excitační světlo, které nevstupuje do zorného pole díky použití dolnoproputného filtru. Pozorování a fotografování tedy probíhá jen ve spektru, které produkuje fluorescence chlorofylu.