

Úloha č. 4

Návod na praktikum z fyziologie rostlin

Spekrofotometrické stanovení obsahu chlorofylu a karotenoidů v listech

Úvod

Veškeré fotosyntetické organismy obsahují pigmenty, které zachycují světelnou energii nezbytnou pro fotosyntézu. U vyšších rostlin a zelených řas tuto funkci zastávají chlorofyl *a*, chlorofyl *b* (dále **Chl a** a **b**) a karotenoidy (dále **Car**). Jejich obsah i složení je důležitým ukazatelem stavu fotosyntetického aparátu, závisí na druhu rostliny, stáří asimilačních orgánů (listů), minerální výživě či podmínkách růstu (rostliny slunné, stinné). Obsah chlorofylu se často také používá jako míra, na kterou se vztahují jiné fotosyntetické i nefotosyntetické charakteristiky (aktivita fotosystémů, enzymatických reakcí, obsah proteinů, apod.).

Nejjednodušší formou stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů je stanovení spektofotometrické, tj. měřením absorbance směsi pigmentů při různých vlnových délkách, většinou volených tak, aby odpovídaly absorpčním maximům spekter jednotlivých složek. Použití této metody pro směsi pigmentů je ovšem omezeno na pigmenty, které se spektrálně výrazně liší. Nemůžeme například určit obsahy jednotlivých složek ve směsi Chl *a* a jeho defytylované formy-chlorofylidu, nebo obsahy jednotlivých Car v jejich směsi, protože jejich spektra se z velké části překrývají (viz. obr. 2). Běžně se však tato metoda používá pro stanovení obsahu Chl *a* a Chl *b* a celkového obsahu Car.

Pigmenty se extrahují z fotosyntetických tkání organickými rozpouštědly, jako jsou aceton, metanol, etanol, dimetylsulfoxid (DMSO), dimetylformamid (DMFO) a další. Obsah fotosyntetických pigmentů se vztahuje na sušinu, čerstvou hmotu, nebo plochu listu. V této úloze budete určovat obsah Chl *a* a *b* v 80% acetonovém extraktu z listů dvou rozdílných rostlin a rozdílného stáří. Obsah pigmentů budete vztahovat na čerstvou hmotu a plochu listů.

Pracovní postup

Pracujte při tlumeném světle, je tím zpomalena fotodegradace chlorofylu. Vzorky uchovávejte uzavřené na ledu, aby nedocházelo k výparu rozpouštědla. **Při práci používejte ochranné rukavice!**

1) Na dvou druzích rostlin vyberte z každé dva listy rozdílného stáří (např. korunní a spodní část rostliny) a odeberte přibližně dva gramy rostlinné hmoty pro každou variantu. Části listů rozkrájejte kruhovými vykrajovacími noži o definovaném průměru a výkrojky zvažte. Do protokolu uveďte celkovou plochu [cm²] a váhu [g] u každého vzorku.

2) Do třecí misky připravte na „špičku špachtle“ korundového prášku, oxidu hořečnatého (MgO) a vložte výkrojky listů. Přidejte 5 ml 80% acetonu a směs důkladně rozetřete.

Pozn.: MgO neutralizuje kyseliny a tím brání **přeměně Chl na feofytin**. Feofytin je Chl bez centrálního atomu.

3) Homogenát zcentrifugujte v uzavřených polyethylenových flakonách, 3 min při 3 000xg a 4°C.

4) Získaný extrakt přelijte do odměrné baňky a doplňte na definovaný objem 80% acetonem a promíchejte. Objem extraktu uveďte v protokolu.

5) Odpipetujte 2 ml extraktu do zkumavky „ependorf“ a centrifugujte 1 min při 13 400 rpm.

6) Stočený supernatant změřte ve skleněné kyvetě (označena zelenými čtverečky=použitelná pro aceton) při vlnových délkách uvedených níže (zvolené vlnové délky porovnejte s absorpčními spektry-příloha návodu str. 5):

750,0 nm-reference

663,2 nm-„červené“ maximum Chl *a*

646,8 nm- „červené“ maximum Chl *b*

470,0 nm- Car

V případě, že hodnoty absorpance v červené oblasti přesáhnou interval 0,2-0,8; upravte ředění, abyste se do intervalu vešli a ředění uveďte v protokolu. Změřená hodnota při 750 nm (viz. obr. přílohy) odpovídá absorpanci pozadí a odečítá se od zbývajících třech hodnot před zprůměrováním.

7) Pro každý vzorek opakujte měření třikrát. Pro výpočet koncentrace jednotlivých pigmentů použijte průměr z naměřených hodnot absorbancí pro danou vlnovou délku po odečtu referenčních hodnot. Koncentrace Chl a Car ve skleněné kyvetě vypočtete podle následujících vzorců (v jednotkách $\mu\text{g/ml}$):

$$C_a = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$C_b = 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$$

$$C_{a+b} = 7.15 A_{663.2} + 18.71 A_{646.8}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 1.82 C_a - 85.02 C_b) / 198$$

8) Ze zjištěných koncentrací vypočtete celková množství vyizolovaných pigmentů v extraktu a tyto hodnoty vztáhněte na čerstvou hmotu [mg/g] a plochu listu [$\mu\text{g/cm}^2$].

Dále vypočtete poměry mezi Chla a Chlb (Chla/b) a mezi celkovým Chl($a+b$) a Car ($\text{Chl}(a+b)/\text{Car}$), obě veličiny uveďte ve výsledcích a diskutujte v závěru protokolu.

Kontrolní otázky

- 1) Pomocí obrázků v příloze vysvětlíte volbu vlnových délek použitých při měření (470; 646; 663; a 750nm).
- 2) Jakou roli hraje MgO při extrakci pigmentů organickými rozpouštědly a proč se extrakce provádí při tlumeném světle?
- 3) Uveďte alespoň tři organická rozpouštědla používaná při extrakci pigmentů.
- 4) Proč listy na podzim žloutnou/červenají?
- 5) Jak naředíte vzorek, byla-li jeho absorbance v červeném maximu Chla rovna 2,35 a jak byla-li 0,15; aby splňoval podmínky pro měření dle návodu?

Pokyny pro zpracování protokolu

Textová část:

- vaše jméno a datum experimentu
- název úlohy
- cíl práce
- materiál a metodika
- tabulky naměřených hodnot a výsledků
- závěr, porovnání a zhodnocení výsledných dat

Tabulky:

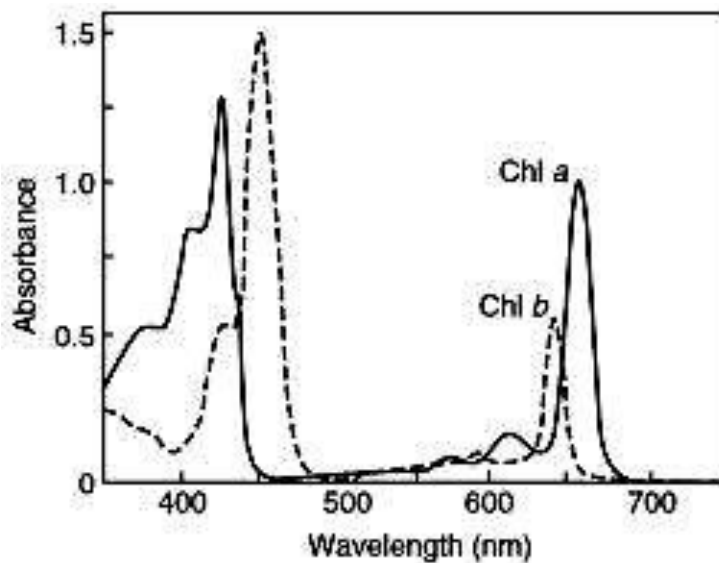
- název vzorku
- výchozí navážka [g], plocha listu [cm²]
- objem neředěného extraktu [ml]
- ředění!!
- naměřené absorbance (u všech vlnových délek) + průměry (po odečtu kontrolní absorbance u 710 nm)
- vypočtené koncentrace chlorofylů ($a + b$) a karotenoidů v [μg/ml]
- celková množství pigmentů [mg]
- celková množství pigmentů vztažená na 1g čerstvé hmoty [mg/g] a 1 cm² plochy listu [mg/cm²]
- poměry Chl a/b a Chl($a+b$)/ Car

Protokol zašlete na e-mailovou adresu: wiesnerova@umbr.cas.cz

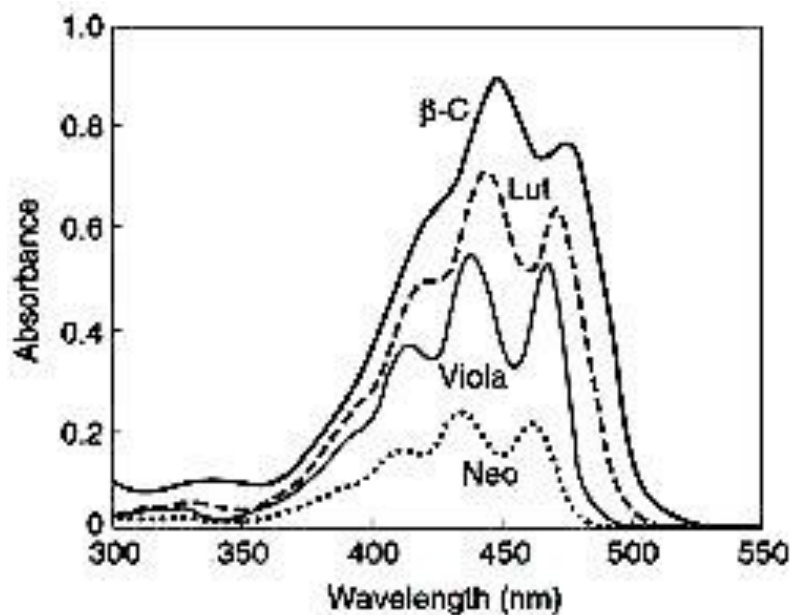
(do předmětu zprávy uveďte "kebr protokol 4").

Příloha: Absorpční spektra chlorofylů a karotenoidů

Obr.1



Obr.2



Absorpční spektra: chlorofylů *a* a *b* (obr.1) a karotenoidů (neoxanthin, violaxanthin, lutein a β-karoten) izolovaných ze zelených listů vyšších rostlin a rozpuštěných v éteru (obr.2).
Current protocols in Food Analytical Chemistry (2001) F4.3.1.-F.4.3.8.