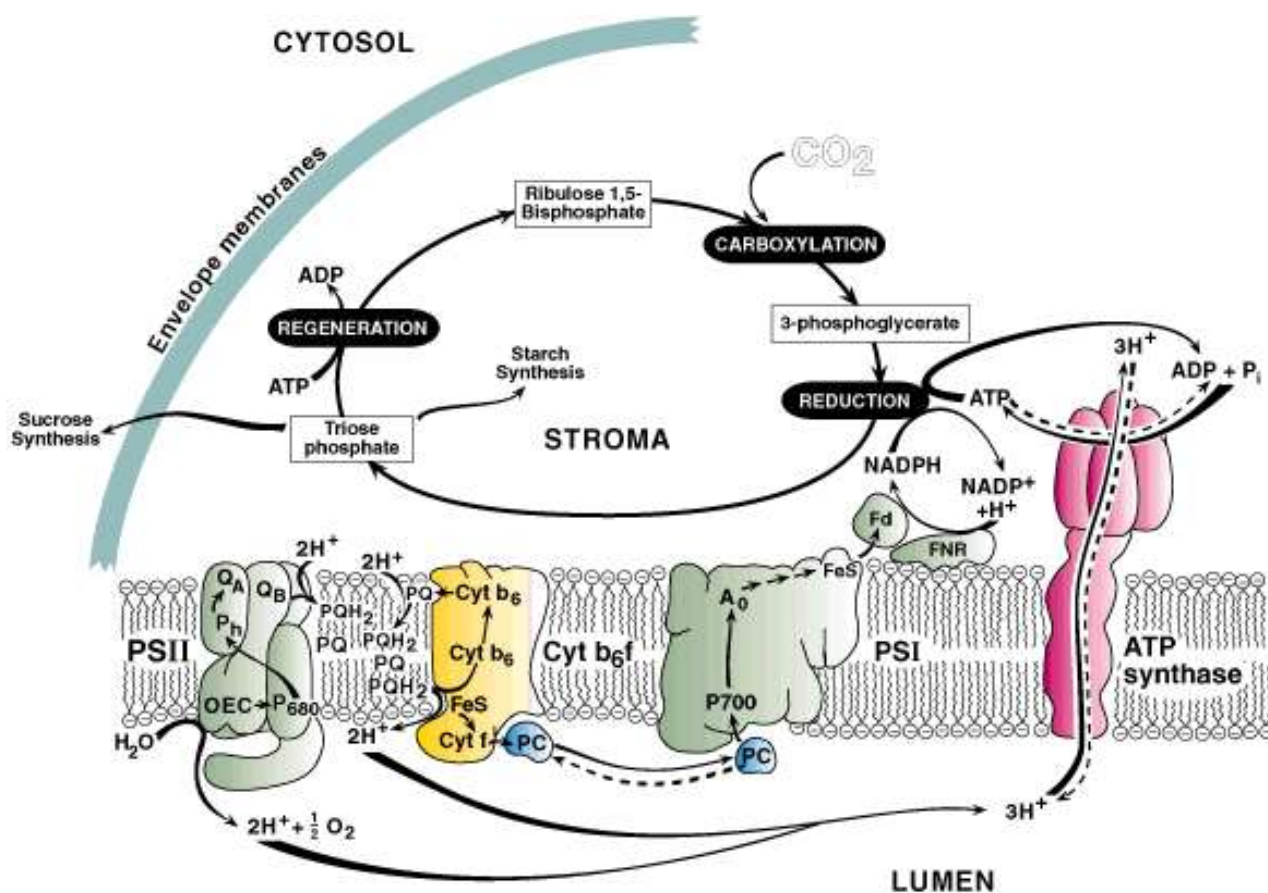


Měření fotosyntézy rostlin pomocí chlorofylové fluorescence

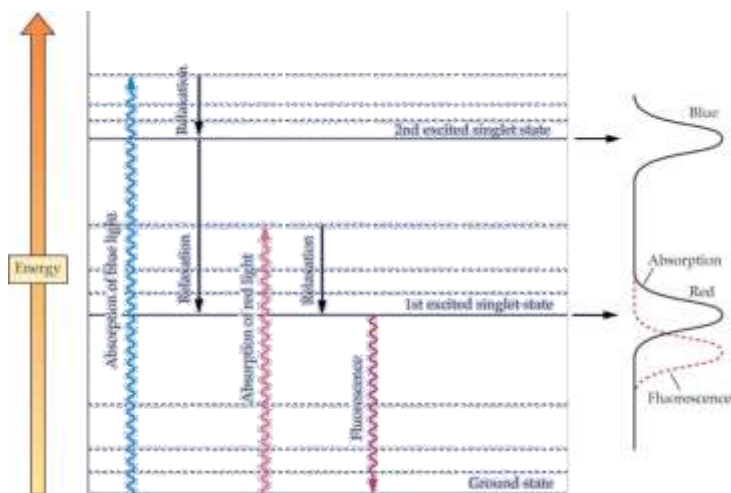
Všechny děje spjaté s primárními reakcemi fotosyntézy se odehrávají na matrici tylakoidálních váčků, které v sobě uzavírají vodní fázi - tylakoidální lumen. Světelná energie zachycená trans-tylakoidálními proteinovými komplexy je přeměněna na energii chemickou ve formě ATP a NADPH, zároveň je oxidována voda a uvolňuje se kyslík. Bezprostřední produkty světelných reakcí fotosyntézy (ATP a NADPH) jsou využity v tylakoidálním stroma při fixaci CO₂, pohání kaskádu reakcí zvaných Benson-Calvinův cyklus (Calvin-Benson-Bassham), kam CO₂ vstupuje ústřední reakcí s ribulózoubisfosfátem (RuBP) katalyzovanou enzymem RuBISCO. Konečným produktem Benson-Calvinova cyklu je molekula glukózy a regenerovaná molekula RuBP.



Obrázek 1. Schéma fotosyntetických reakcí v chloroplastu rostlin. D. R. Ort.

Fluorescence chlorofylu

Světlo se často používá ke zkoumání specifických procesů uvnitř buňky - různé molekuly se tu liší svými absorpčními vlastnostmi, rozptylem, stejně jako emisí fluorescence a luminiscence. Měření fluorescence chlorofylu v rostlinách ale přináší informace nejen o tom, kde a v jaké koncentraci jsou molekuly chlorofylu, ale také o dynamických změnách výtěžku fotochemických reakcí.



Fluorescence je proces, při kterém molekula absorbující energii (např. ve formě elektromagnetického záření) zpětně vyžárí světelná kvanta. Vyzařované fotony nesou energii nižší, než ty které molekulu původně excitovaly. Při pokojové teplotě je fluorescence chlorofylu fotosystému II tvořena z 80 % fotony s vlnovou délkou kratší než 700 nm. Chlorofylová fluorescence fotosystému II také z poloviny přispívá k fotonům vyzařovaných nad 700 nm. Ostatní fotony pocházejí z fotosystému I a z chlorofylů vázaných anténními systémy.

Obrázek 2. Jablonského schéma

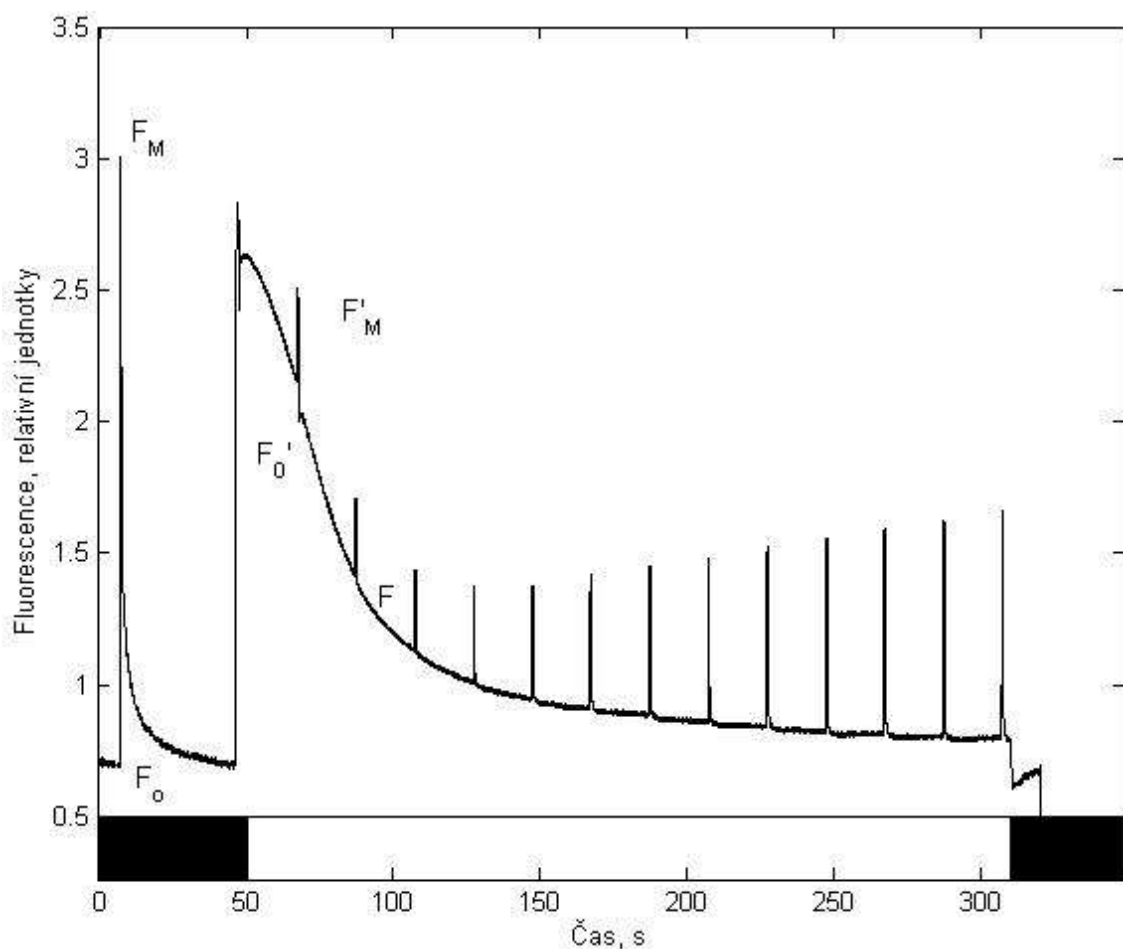
Ve fotosystému II (viz obrázek 1.) který účinně absorboval foton světla je dosahováno jeho fotochemické přeměny (rozdělení a stabilizace náboje) s vysokou účinností. Jen asi 3-8% energie absorbované anténou je znovu vyzařováno ve formě fluorescenční emise na červeném konci viditelného spektra světla. Zbytek energie je ztraceno ve formě tepla. Alternativní cesta de-excitace excitovaných stavů (luminiscence nebo mezisystémový přechod) je obvykle v intaktních rostlinách zanedbatelná. Ve fotosyntetických anténách a reakčních centrech takto soutěží ztrátová fluorescence o energii excitovaných chlorofylů s užitečnou fotochemickou přeměnou: čím efektivnější fotochemie, tím méně fluorescenční emise a naopak. Tento jednoduchý vztah je základem rozšířeného používání neinvazivních fluorescenčních technik ve výzkumu rostlinné fyziologie. Nejvýznamnější aplikace jsou zaměřeny na fluorescenci emitované z fotosystému II, kde je vazba mezi fotochemií a fluorescencí nejsilnější.

Více než 50 % změn kvantového výtěžku fluorescence PSII je řízeno redoxním stavem elektronového donoru Q_A v mechanismu fotochemického zhášení. Otevřené reakční centrum PSII s oxidovaným akceptorem Q_A je schopno stabilního rozdělení náboje a kvantový výtěžek fluorescence PSII je minimální (F_0), zatímco fotochemická účinnost PSII je maximální. Uzavřené reakční centrum s redukováným Q_A není schopno vykonávat primární rozdělení náboje, fotochemická účinnost PSII je nulová a kvantový výtěžek fluorescence PSII je maximální (F_M). Za předpokladu, že pravděpodobnost ostatních de-excitačních cest (např. tepla) je konstantní jak v otevřených tak uzavřených reakčních centrech, lze tedy předpokládat, že fluorescenční výtěžek PSII je nepřímo úměrný maximálnímu kvantovému výtěžku fotochemie: $\Phi_{PSII} = (F_M - F_0) / F_M = F_V / F_M$

Kromě fotochemické kontroly redoxního stavu Q_A může být fluorescenční výtěžek PSII ovlivněn i jinými mechanismy, které jsou společně označovány jako nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu. Mezi procesy, které zasahují do fluorescenčního výtěžku PSII nejvíce patří především reorganizace světlosběrných antén vedoucí k přednostní excitaci PSII nebo PSI, de-epoxidace xanthofylů vedoucí k přeměnování excitační energie na teplo, redoxní stav primárního donoru $P680^+$, primárního akceptoru $Pheo^-$ a kyslík vyvíjejícího komplexu a také množství dostupných molekul plastochinonu a jejich prostupnost tylakoidní membránou. Proto můžeme využít měření emise fluorescence ke studiu některého z těchto procesů, ale současně, díky množství procesů, které ovlivňují výtěžek fluorescence je interpretace těchto experimentů náročná. Je tedy třeba použít sofistikovaných protokolů, nástrojů a experimentálních podmínek, ve kterých je jen několik z těchto procesů účinných.

Úkol

Pomocí naměřených a vypočítaných fluorescenčních parametrů zjistěte, které z listů tabáku (*Nicotiana tabacum*) jsou fotosynteticky nejvíce a nejméně aktivní.



Obrázek 3. Indukční křivka chlorofylové fluorescence listu tabáku (*Nicotiana tabacum*)

Princip

Listy zdravých rostlin adaptované na tmu vyzařují při náhlém ozáření viditelným světlem chlorofylovou fluorescenci, která má typický průběh (obrázek 3). Na počátku je fluorescence nízká (F_0), při silném osvětlení však rychle (během několika desítek až stovek milisekund) dosáhne maxima (F_M). Během krátké temnotní fáze fluorescence opět klesá až k minimální hodnotě (F_0). Poté je rostlina opět ozářena světlem a časový průběh fluorescence chlorofylu získává typický tvar indukční křivky. Průběh této takzvané fluorescenční indukce a následného zhášení vypovídá o aktuálním stavu PSII, redoxním stavu plastochinolových molekul obklopující PSII i kapacitě dalších komponent fotosyntetického elektron transportního řetězce přijímat a přenášet elektrony. Lokální minima a maxima intenzity fluorescence chlorofylu vypovídají o existenci přechodných rovnovážných stavů, které se ustavují ve fotosyntetickém aparátu adaptovaném na tmu během jeho přechodu do stavu adaptovaného na světlo. Fluorescenční indukční křivka tedy může sloužit jako neinvazivní způsob zjištění celkového fyziologického stavu listů, přestože neposkytuje specifické informace o průběhu jednoho konkrétního procesu. Během této indukce je rostlina opakovaně ozářena silnými pulzy světla tak jako na počátku měření. Fluorescence však vystoupá jen k maximální úrovni na světlo adaptovaného listu (F_M'). Tento parametr nám dovolí vypočítat efektivní kvantový výtěžek PSII: $Y(II) = (F_M' - F) / (F_M' - F_0')$ který odpovídá fotochemickému využití absorbovaných světelných kvant listem adaptovaným na světlo.

Při rozsvícení infračerveného světla aktivujícím PSI a současném krátkém zatemnění lze změřit i minimální fluorescenci (F_0') na světlo adaptovaného listu a tím i spočítat koeficient fotochemického zhášení chlorofylové fluorescence $q_P = (F_M' - F) / (F_M' - F_0')$, který dovolí odhadnout frakci otevřených reakčních center v listech vystavených světlu a vypovídá tak o jejich fotochemické aktivitě. Koeficient nefotochemického zhášení chlorofylové fluorescence $q_N = 1 - (F_M' - F_0') / (F_M - F_0)$ vypovídá o aktivaci procesů zhášení chlorofylové fluorescence díky změnám v pH napříč tylakoidní membránou, změnami v organizaci antén, ale také vratným i nevratným změnám vzniklým při poškození PSII silným světlem.

Postup

Pomocí systému pro měření chlorofylové fluorescence PAM-2500 změřte parametry chlorofylové fluorescence na listech tabáku různého stáří. Vypočítejte a porovnejte Φ_{PSII} , $Y(II)$, q_P a q_N a učiňte závěry ohledně fotosyntetické aktivity jednotlivých listů.

Nejprve přineste rostlinu tabáku ze skleníkové kóje do temné místnosti, rozsviňte zelené stropní světlo a ponechte rostlinu ve tmě nejméně půl hodiny. Zapněte zařízení, spusťte ovládací program „PAMWIN_3“ a spusťte měření. Program samočinně vyhodnotí průběh měření a nakreslí graf

závislosti intenzity chlorofylové fluorescence listu na čase. Vyexportujte naměřená data, změřené parametry a měření opakujte s mladším listem. Naměřte alespoň 5 listů, v rámci jednoho listu proveďte dostatečný počet měření a data statisticky vyhodnoťte.

List # 1	F_o	F_M	F_o'	F_M'	F	Φ_{PSII}	$Y(II)$	q_P	q_N
A									
B									
C									
D									
E									

List # 2	F_o	F_M	F_o'	F_M'	F	Φ_{PSII}	$Y(II)$	q_P	q_N
A									
B									
C									
D									
E									

List # 3	F_o	F_M	F_o'	F_M'	F	Φ_{PSII}	$Y(II)$	q_P	q_N
A									
B									
C									
D									
E									

List # 4	F_o	F_M	F_o'	F_M'	F	Φ_{PSII}	$Y(II)$	q_P	q_N
A									
B									
C									
D									
E									

List # 5	F_o	F_M	F_o'	F_M'	F	Φ_{PSII}	$Y(II)$	q_P	q_N
A									
B									
C									
D									
E									

Kontakt:

David Kaftan
 Telefon: 387772342
 E-mail: dkaftan@jcu.cz