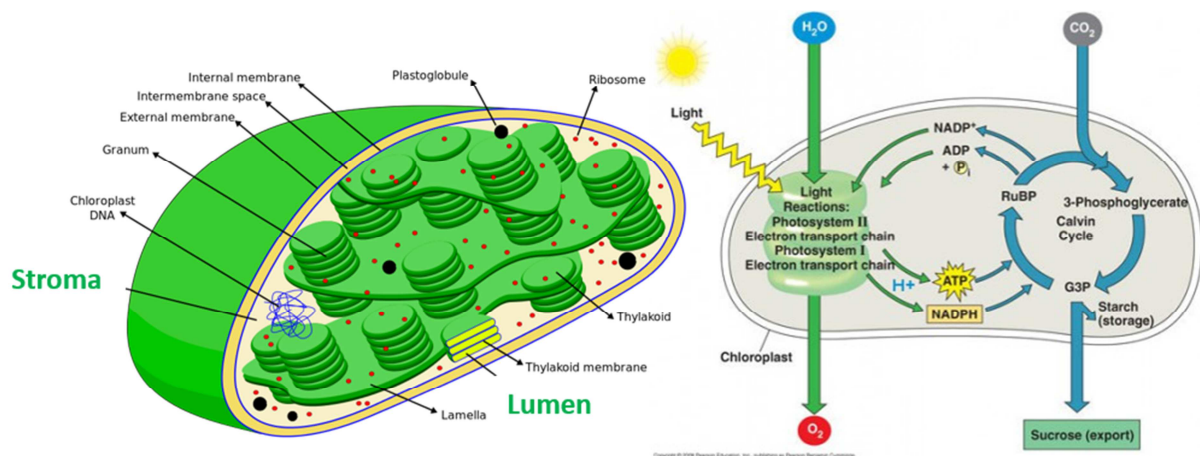


# Měření fotosyntézy rostlin pomocí chlorofylové fluorescence

## *aneb Fluorescence chlorofylu jako indikátor stresu*

### Fotosyntéza:

Fotosyntéza je proces, ve kterém je světelná energie zachycena světlosběrnými anténami (proteinové komplexy obsahující pigmenty), přenesena na reakční centra fotosystému a sledem redoxních reakcí je následně přeměněna na energii chemických vazeb ve formě ATP a NADPH; tyto jsou dále využity při fixaci  $\text{CO}_2$  v Calvinově cyklu, jak můžete vidět na obrázku 1. My se v tomto úkolu zaměříme na studium fotosyntézy pomocí měření tzv. variabilní fluorescence chlorofylu.



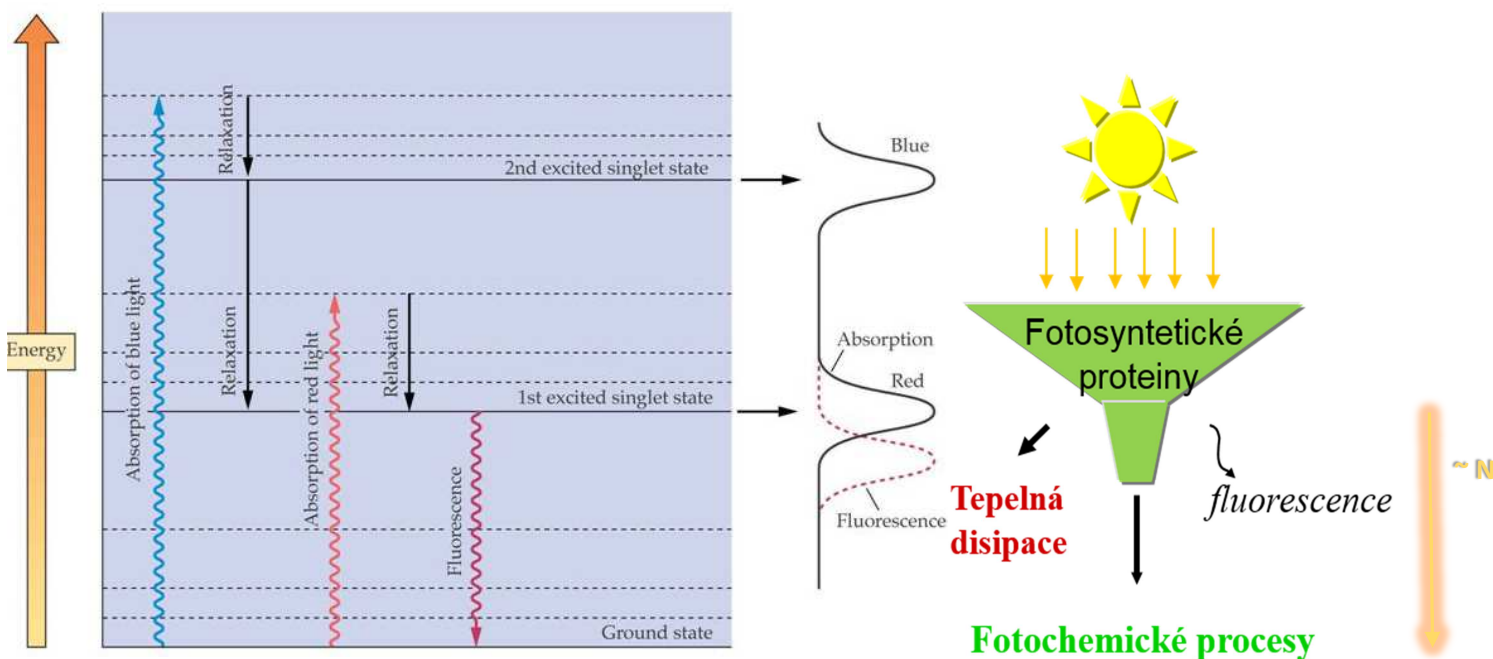
Obrázek 1: Vlevo: Anatomie chloroplastu, vpravo: zjednodušené schéma fotosyntézy

Obecně lze fotosyntetické reakce rozdělit do následujících pěti úrovní: primární procesy absorpce světla na úrovni pigmentů, tzv. nábojová separace (primární světelná reakce kdy zachycená energie světla se využije k redukci elektronového přenašeče), elektronový transport v tylakoidní membráně, enzymatické reakce Calvinova cyklu ve stromatu a pomalé regulační zpětnovazebné procesy. Variabilní fluorescence chlorofylu je ovlivněna především primárními procesy ve fotosystému II (komplex proteinů a pigmentů kde dochází k nábojové separaci) ale odráží také všechny následné reakce, neboť fluorescence chlorofylu je doplňková k alternativním cestám využití absorbovaného světla, kterými jsou primární fotochemie a tepelná disipace. Platí tedy, že fluorescence chlorofylu je nejvyšší, když je výtěžek fotochemických procesů (tedy fotosyntézy, převážně aktivity fotosystému II) a tepelné disipace nejnižší a naopak. Z tohoto důvodu lze využít změny ve fluorescenci chlorofylu k měření fotochemických procesů ve fotosystému II (a částečně i následných

procesů, např. rychlost elektronového transportu). Z pohledu variabilní fluorescence chlorofylu odráží tyto děje fotochemické zhášení, tedy pokles intenzity fluorescence. Současně lze fluorescenci chlorofylu využít ke studiu fotoprotektivního mechanismu disipace absorbovaného světla na teplo, tzv. nefotochemického zhášení fluorescence.

### Fluorescence chlorofylu a nefotochemické zhášení:

Fluorescence chlorofylu představuje emisi světla (o vyšší vlnové délce), která je spojena s absorpcí světelné energie dopadajícího záření (o nižší vlnové délce) molekulami chlorofylu. Fluorescence chlorofylu je vyzařována v různých oblastech spektra, avšak většina měřících metod používá fluorescenci chlorofylu v rozsahu 690-710 nm. Intenzita fluorescence chlorofylu umožňuje získat informace o využití světelné energie primárních reakcí fotosyntézy a částečně odráží i následné biochemické procesy fixace uhlíku v Calvinově cyklu. Měřením fluorescence chlorofylu lze tedy velmi přesně stanovit rychlost transportu elektronů v membráně tylakoidu a její následné spotřebování při fixaci CO<sub>2</sub>. Navíc lze pomocí fluorescence chlorofylu určit poměr absorbované energie, která je přeměněna (disipována) na teplo anebo využita ve fotochemicky reakcích.



Obrázek 2: Fluorescence chlorofylu, Vlevo: Jablonského diagram znázornující primární procesy po absorpci světla chlorofylem, uprostřed a je absorpční a fluorescenční emisní spektrum chlorofylu, Vpravo: 3 způsoby využití absorbované světelné energie. Proces nefotochemického zhášení

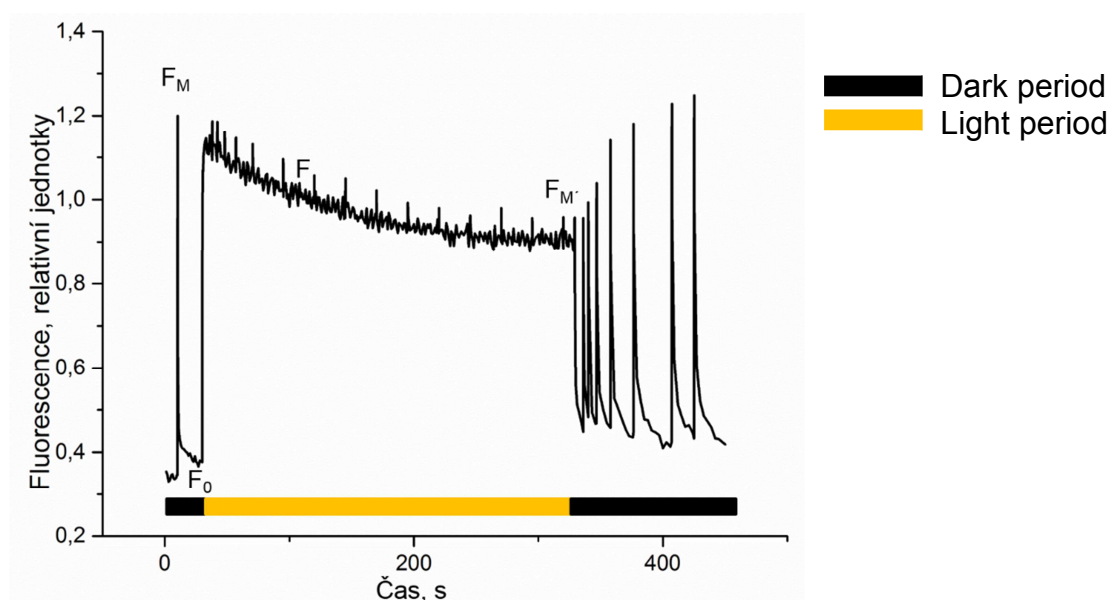
představuje přechod z prvního excitovaného stavu ( $1^{st}$  excited state), do základního stavu chlorofylu (Ground state) – energie excitovaného stavu se disipuje tak přeměňuje na teplo.

### Nefotochemické zhášení:

Jedním z procesů zabráňujících poškození fotosyntetických komplexů v době vysoké ozáření je nefotochemické zhášení (z anglického Nonphotochemical quenching, NPQ). Je to obranný mechanismus, díky kterému je nadbytečná excitační energie (která nemůže být využita fotochemicky, ale naopak může poškodit fotosyntetické komplexy) vyzářena do okolí ve formě tepla. V následující experimentální části se soustředíme na studium právě nefotochemického zhášení.

### Princip experimentu:

Zaměříme-li se na fluorescenční emisi, můžeme rozlišit dva typy soupeřících procesů deexcitace: fotochemickou konverzi energie v reakčních centrech fotosystému II a nefotochemickou ztrátu excitační energie ve formě tepla. Oba tyto mechanismy vedou ke zhášení fluorescence chlorofylu (tedy jejímu poklesu), proto se také rozlišuje fotochemické (qP) a nefotochemické (qN) zhášení fluorescence chlorofylu. Oba koeficienty qP a qN lze určit pomocí jednoduchého měření. Typický výsledek takového měření je možné vidět na



obrázku 3.

Obrázek 3: Zhášecí analýza listu špenátu získaná pomocí přístroje PAM 2500.  $F_M$  – hodnota maximální fluorescence pro na tmu adaptovaný vzorek (všechna reakční centra jsou otevřená, proces NPQ je inaktivní);  $F_0$  – hodnota minimální fluorescence pro na tmu adaptovaný vzorek;  $F_{M'}$  – hodnota

*maximální fluorescence pro vzorek adaptovaný na dané světlo (proces NPQ je aktivován),  $F$  – hodnota tzv. ustálené fluorescence pro danou intenzitu světla.*

Hodnota fluorescenčního výtěžku nám podá informaci o celkové změně v efektivitě fotochemických reakcí a tepelné disipace, ale nerozliší nám podíl obou složek zhášení. Pro tyto účely je třeba použít speciální měřící tzv. zhášecí analýzu pomocí fluorimetrů PAM. Při této analýze rozlišíme fotochemické a nefotochemické zhášení tak, že fotochemické zhášení zablokujeme pomocí saturačního pulsu (který zastaví fotochemickou aktivitu fotosystému II díky jeho totální redukci) a tím nám experiment ukáže pouze vliv nefotochemického zhášení na náš modelový systém.

Z měření podobných tomu na obr. 3 můžeme spočítat hned několik velmi důležitých parametrů:

**$F_V/F_M$ :** Základní fluorescenční poměr  $F_V/F_M$  se definuje jako podíl variabilní ( $F_V$ ) a maximální fluorescence ( $F_M$ ) – odráží maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II. Variabilní fluorescenci rozumíme rozdíl mezi okamžitou hodnotou fluorescence a minimální hodnotou fluorescence ( $F_0$ ), která detekuje otevřená reakční centra fotosystému II ve tmě. Pro výpočet používáme hodnotu okamžité maximální fluorescence dosaženou silným světelným ozářením na tmě adaptované rostliny ( $F_M$ ), tento záblesk způsobí uzavření všech reakčních center fotosystému II. Variabilní fluorescence se stanoví jako rozdíl  $F_M - F_0$  a základní fluorescenční poměr podle vzorce:  $F_V/F_M = (F_M - F_0) / F_M$ . Minimální fluorescence  $F_0$  se zjišťuje ozářením předzatemněné rostliny velmi nízkou hodnotou použitého záření, při které dochází k excitaci molekul chlorofylu fotosystému II, avšak tato intenzita neuzavírá reakční centrum neboť je dostatečně efektivně fotochemicky využita k redukci přenašečů tylakoidní membrány.  $F_0$  proto představuje minimální fluorescenci závislou pouze na počtu pigmentů (chlorofylů) a je neovlivněna rychlostí přenosu elektronů v tylakoidní membráně. Fluorescenční poměr variabilní ku maximální fluorescenci ( $F_V/F_M$ ) je obecným indikátorem snížení funkce nebo poškození reakčních center (RC) fotosystému II. U zdravých, nepoškozených ani jinak negativně ovlivněných rostlin může  $F_V/F_M$  dosáhnout maximální hodnoty 0,83. Pokud je fotosyntetický aparát rostlin nebo celá rostlina vystavena působení některého stresu, dochází k negativnímu ovlivnění fotochemické funkce fotosystému II, což se projeví ve snížení hodnoty  $F_V/F_M$ . Dobře prostudovaným stresem, jehož důsledkem je snížení hodnoty  $F_V/F_M$ , je například stres tepelný, které nevratně poškozuje fotosystém II.

**NPQ:**  $NPQ = (F_M - F_M') / F_M'$  je vyjádření koeficientu nefotochemického zhášení a představuje indikátor tepelné disipace nevyužité (fotochemicky nadbytečné) excitační energie.

### **Postup experimentu:**

- K měření použijte čerstvé listy špenátu (*Spinacia oleracea*) a listy stresované inkubací ve vodní lázni o teplotě 40°C po dobu 5 min.
- Před měřením nechte listy aklimovat na tmou asi 30 min.
- Zapněte přístroj PAM 2500, spusťte program PAMWIN\_3 a začněte s měřením. Program sám nakreslí graf závislosti intenzity fluorescence chlorofylu na čase. Vyexportujte výsledek měření a sledujte parametry  $F_0$ ,  $F_M$ ,  $F_M'$ , NPQ u nejméně 3 listů za obou podmínek
- Porovnejte naměřené fluorescenční hodnoty u kontrolních a stresovaných listů
- Vysvětlete a prodiskutujte získané výsledky

kontakt: Eliška Trsková, email: [eliska.trskova@centrum.cz](mailto:eliska.trskova@centrum.cz)

---

### Reference:

- Hlízová, E (2008) Využití fluorescence chlorofylu ke sledování fyziologického stavu vegetace Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra fyziologie rostlin, Bakalářská práce
- <https://edu.glogster.com/glog/chloroplast/2cavi3k1ch6>
- <http://www.botanika-puchnerova.estranky.cz/fotoalbum/fotosynteza/fotosynteza.jpg-- .html>

- Skripta Fyziologie rostlin, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno  
<http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/>
- Hájek T, Šantrůček J, skripta Malá fyziologie rostlin, 2012, Přírodovědecká fakulta, JČU
- Ruban A (2013) The Photosynthetic Membrane. Molecular Mechanisms and Biophysics of Light Harvesting. John Wiley & Sons, Ltd., United Kingdom