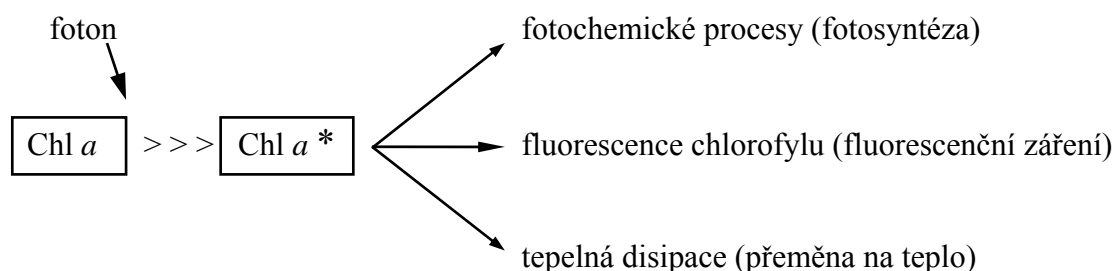


FLUORESCENCE CHLOROFYLU JAKO INDIKÁTOR STRESU

TEORIE

Fluorescence chlorofylu je jev, který je vyvolán absorpcí energie dopadajícího záření molekulami chlorofylu *a* rostlin a následnou emisí (vyzářením) části této energie zpět do okolí rostliny v podobě záření o poněkud větší vlnové délce, avšak stále ještě ve viditelné oblasti spektra. Fluorescence chlorofylu je měřitelná v různých oblastech spektra, avšak většina měřících metod používá fluorescenci chlorofylu ve vlnové délce 690 nm.

Intenzita a charakter fluorescence chlorofylu při přesně definované expozici rostlin k záření umožňují získat informace o absorpci energie dopadajícího záření a jejího využití v biochemických procesech fotosyntézy. Měřením fluorescence chlorofylu lze tedy velmi přesně stanovit rychlost toku energie v membráně thylakoidu a jejího spotřebování při fixaci CO₂. Metody měření fluorescence chlorofylu proto představují vhodný doplněk k metodám gazometrickým. Navíc lze pomocí fluorescence chlorofylu určit tu část absorbované energie, která je přeměněna na teplo anebo využita v biochemických reakcích zabraňujících poškození struktury membrány thylakoidu a jejích částí.



Obr.1. Zjednodušené schema deexcitačních mechanismů. Je-li chlorofyl *a* vystaven záření (toku fotonů), dojde k excitaci chlorofylu do stavu Chl *a**. Excitační energie je z molekuly chlorofylu buď odvedena systémem přenašečů a využita v fotosyntéze nebo vyzářena jako fluorescenční záření nebo přeměněna na teplo.

Metoda saturačních pulzů záření se používá pro stanovení maximální a aktuální rychlosti přenosu energie redoxními systémy membrány thylakoidu. Tato metoda ovšem mohla být zavedena až teprve nedávno, po značném zdokonalení měřící techniky (fluorometry s amplitudově modulovanými pulzy a s vysokou citlivostí i selektivitou detektoru). Při této metodě se využívá skutečnosti, že u listů trvale vystavených záření existuje v každém okamžiku jistá rovnováha mezi fotochemickou a nefotochemickou cestou disipace excitační energie. Pokud odvod energie fotochemickou cestou na okamžik zastavíme, zhášení fluorescence bude způsobeno pouze tepelnou disipací. Stavíme zde na předpokladu, že reakce tepelného deexcitačního kanálu na náhlou změnu jsou pomalejší než reakce zbývajících dvou cest deexcitace (fotochemie a fluorescence). Potlačení fotochemické cesty lze dosáhnout krátkým, ale dostatečně intenzivním zábleskem (pulzem fotosynteticky aktivního záření) z vhodného umělého zdroje, a to i u listu trvale vystavenému běžnému

dennímu světlu. Krátké saturační ozáření způsobí úplnou redukci chinonu Q_A , a tím i dočasné zastavení transportu elektronů ve fotosystému II. Aplikaci pulzů lze automaticky opakovat ve vhodných intervalech a tím získávat informace o změnách v podílu fotochemických a nefotochemických procesů v listu na zhášení fluorescence chlorofylu v průběhu dne. Vlastní měřicí postup a způsob vyhodnocení je pochopitelně složitější než zde naznačený základní princip.

Zadání úlohy:

Stanovení základního fluorescenčního poměru (F_V/F_M) jako indikátoru tepelného stresu

Základní fluorescenční poměr F_V/F_M se definuje jako podíl variabilní (F_V) a maximální fluorescence (F_M). Variabilní fluorescenci rozumíme okamžitou hodnotu fluorescence zmenšenou o základní fluorescenci (F_0). Pro výpočet používáme hodnotu okamžité fluorescence dosaženou krátce po náhlém ozáření předzatemněné rostliny (F_M) dostatečně silným světelným pulzem, který způsobí uzavření všech RC PS II, zahlcení fotochemické deexcitační cesty (veškerý plastochinon v redukovaném stavu), a tudíž prudký nárůst fluorescence na maximální hodnotu F_M . V tomto stavu jsou všechna RC PS II „uzavřena“ a nepřijímají další excitační energii. Variabilní fluorescence se stanoví jako $F_M - F_0$ a základní fluorescenční poměr podle vzorce:

$$F_V/F_M = (F_M - F_0) / F_M$$

Základní fluorescence F_0 se zjišťuje ozářením předzatemněné rostliny velmi nízkou hodnotou záření, při které dochází k excitaci molekul chlorofylu PS II, avšak neuskutečňuje se přenos této energie na Q_A , a tedy ani necyklický transport elektronů. F_0 proto představuje základní fluorescenci neovlivněnou kapacitou ostatních elektronových přenašečů v thylakoidní 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 funkce PS II, což se projeví ve snížení hodnoty F_V/F_M . Dobře prostudovaným stresem, jehož důsledkem je snížení hodnoty F_V/F_M , je působení tepelného stresu na rostliny.

Rostlinný materiál:

ptačí zob (*Ligustrum vulgare* L.)

smetánka lékařská (*Taraxacum officinale* (L.) Weber)

jitrocel střední (*Plantago media* L.)

Postup měření:

- (1) Zapněte fluorometr PAM-210 a počkejte na ukončení úvodních testů (cca 30s).
- (2) V nabídce na displeji fluorometru nastavte intenzity použitých typů světla (opakovaným mačkáním tlačítka „I“ na klávesnici fluorometru:
ML - měřící světlo, AL - aktinické světlo, FR - vzdálené červené záření, SP - saturační pulz
ML = 3, AL = *nenastavuje se*, FR = *nenastavuje se*, SP = 10 (tj. maximální hodnota)
- (3) Na displeji fluorometru poté zmizí symbol „L“ za symbolem g v závorce, tj. „g ()“.
- (4) Vložte experimentální list na měřící bod přístroje a přiložte z vrchu magnetickou krytku.
- (5) Ponechte experimentální list takto po dobu 5 minut (zatemnění).
- (6) Po uplynutí doby vymáčkněte na klávesnici fluorometru tlačítko ML, po 3s tlačítko SP
- (7) Na displeji přístroje odečtete hodnotu F_0 , F_M , F_V/F_M (viz. Obr.2) a zanepte do tabulky (viz. Tab 1.).

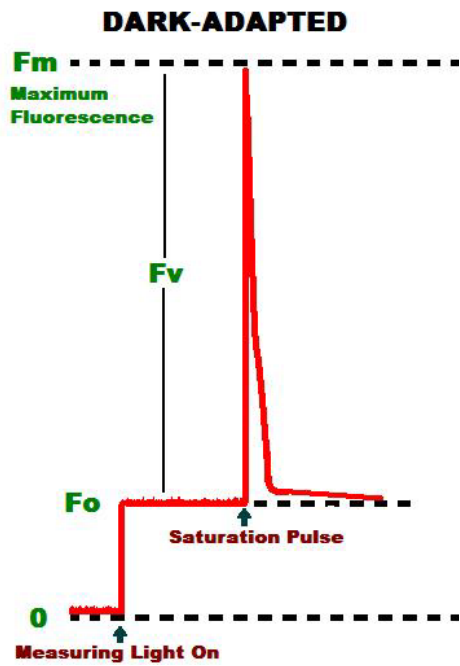
F_V/F_M		
F0431	Y.79	0000
g (L)	0429	2040
F_0		F_M

Obr.2

- (8) Experimentální list vložte do vysoušecí pícky a vystavte po dobu 10 min teplotě 30/35 °C.
- (9) Experimentální list vyjměte a opakujte měření v krocích 4-7.
- (10) Opakovaně vložte list do vysoušecí pícky a vystavte po dobu 10 min teplotě 30/35 °C.
- (11) Experimentální list vyjměte a opakujte měření v krocích 4-7.
- (12) Vytvořte sloupcový graf F_0 , F_M , F_V/F_M (v jednom grafu) pro kontrolní měření, pro první a druhé tepelné ovlivnění.
- (13) Formulujte závěr o vlivu tepelného stresu na parametry fluorescence chlorofylu, porovnejte hodnoty získané po 1. a 2. ovlivnění vysokou teplotou (30/35 °C) a proveďte také mezidruhové srovnání.

TAB 1:

Rostlinný materiál	F_0	F_M	F_V/F_M
kontrolní měření			
po 1. tepelném ovlivnění			
po 2. tepelném ovlivnění			



Maximální fluorescence F_M měřená na předzatemněném vzorku

Variabilní fluorescence F_V

Základní fluorescence F_0 měřená na předzatemněném vzorku

Obr. 3.



Obr. 4. Fluorometr PAM-210



Obr. 5. Vysoušecí pícka