

Měření fluorescence chlorofylu hedery helix



V rámci cvičení blokového semináře PV225 Laboratoř systémové biologie

Jan Kotrs, 2010

Cíl projektu

Cílem laboratorní části bylo porovnání fotosyntetických schopností starého a nového listu rostliny *hedera helix* za využití metody saturačních pulzů a rychlých světelných křivek (RLC).

Zvolené metody

Saturační pulzy

Metoda saturačních pulzů vychází z poznání funkce fotosyntetického aparátu PSII, který přeměňuje energii slunečního záření (fotony) v energii chemickou (ATP, NADPH), kterou následně rostlina dokáže využít ke svému životu. Dopad fotonů na *chlorofyl a* způsobí jeho excitaci a ten poté svou energii využije pro fotosyntézu nebo ji vyzáří v podobě tepla nebo světla o jiné vlnové délce (fluorescence). Pokud je tento aparát vystaven neúměrně vysokému ozáření, dojde k zahlcení běžných de-excitačních drah a veškerý excitovaný chlorofyl energii vyzáří zpět. To nám umožňuje změřit maximální kapacitu fluorescence rostliny v jejím současném stavu. Podmínkou je přibližně pokojová teplota, díky které můžeme předpokládat, že většina fluorescence pochází z PSII (v extrémně nízkých teplotách má na fluorescenci totiž větší podíl PSI).

V průběhu měření měníme aktinické (PPFD) světlo, abychom sledovali reaktivnost rostliny na změny zátěže. Maximální kvantový výtěžek by se měl se zvyšováním PPFD zmenšovat.

Rychlé světelné křivky

Metoda rychlých světelných křivek využívá též saturačních pulzů a aktinického ozáření, ale v kratších intervalech. Zatímco pulzy zůstávají stejné, vždy po zvolené době (např. 30s) se hladina aktinického ozáření zvýší. Sledujeme opět kvantový výtěžek pro každou krokovou změnu PPFD.

Postup měření pomocí saturačních pulzů

1. Nejprve jsme na stojan vedle rostliny umístili zdroj aktinického ozáření a upevnili světlovodič (a zdroj saturačních pulzů) měřicího přístroje fluorescence nad list tak, aby nestínil aktinickému záření v přibližné vzdálenosti 10 mm od listu.
2. Vystavili jsme list rostliny *hedera helix* nízkému aktinickému záření o hodnotě $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 5 minut. Intenzitu ozáření jsme měřili v blízkosti povrchu horní strany listu.
3. Vystavili jsme list saturačnímu pulzu a přečetli spočtený kvantový výtěžek z měřicího přístroje.
4. Kroky (2) a (3) jsme opakovali se zvyšováním aktinického záření v každém kroku na hodnoty 160, 310, 450, 610, 752, 1050, 1497 a $1950 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nebo dokud byl kvantový výtěžek nenulový (u starého listu).
5. Celý postup jsme opakovali pro starý a nový list.

Postup měření pomocí RLC

1. Podobně jako v předchozím měření jsme umístili na stojan vedle rostliny zdroj aktinického záření a světlovodič PAM přístroje.
2. Nastavili jsme hodnotu PPDF na počáteční hodnotu a spustili software na připojeném laptopu.
3. PAM vysílal 10 pulzů ve stejných časových intervalech a zaznamenával kvantové výtěžky vždy po navýšení aktinického záření.
4. Měření jsme provedli pro starý i nový list.

Výsledky měření pomocí saturačních pulzů

Měřili jsme kvantové výtěžky fotosystému PSII (Φ_2) starého a nového listu při postupně zvyšujícím se aktinickém osvětlení (PPFD). Vzhledem k předpokladu, že většina rostlin absorbuje přibližně 84% dopadajícího záření a k faktu, že výtěžek představuje hodnotu pro oba fotosystémy (I a II), můžeme využít vzorce pro výpočet parametru ETR (elektron transport rate) podle vzorce:

$$ETR = \Phi_2 * PAR * 0,84 * 0,5$$

starý list			nový list		
PPFD	Φ_2	ETR	PPFD	Φ_2	ETR
15	0,586	3,69	19	0,806	6,43
160	0,541	36,35	155	0,633	41,2
310	0,450	58,59	315	0,480	63,5
450	0,411	77,67	455	0,364	69,56
610	0,407*	104,27	615	0,289	74,64
752	0,404	127,59	800	0	0
1050	0,356	156,99	-	-	-
1497	0,403**	253,38	-	-	-
1950	0,478**	391,48	-	-	-

* aritmetický průměr předchozí a následující hodnoty (měření bylo pro toto PPFD chybné)

**pravděpodobně chybné měření (posunutí vzdálenosti světlovodiče od listu)

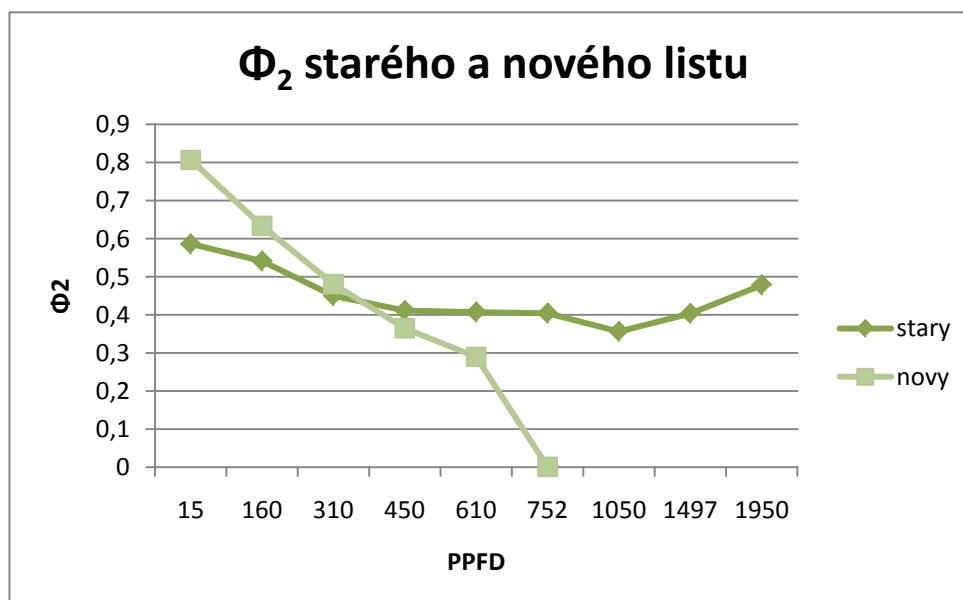
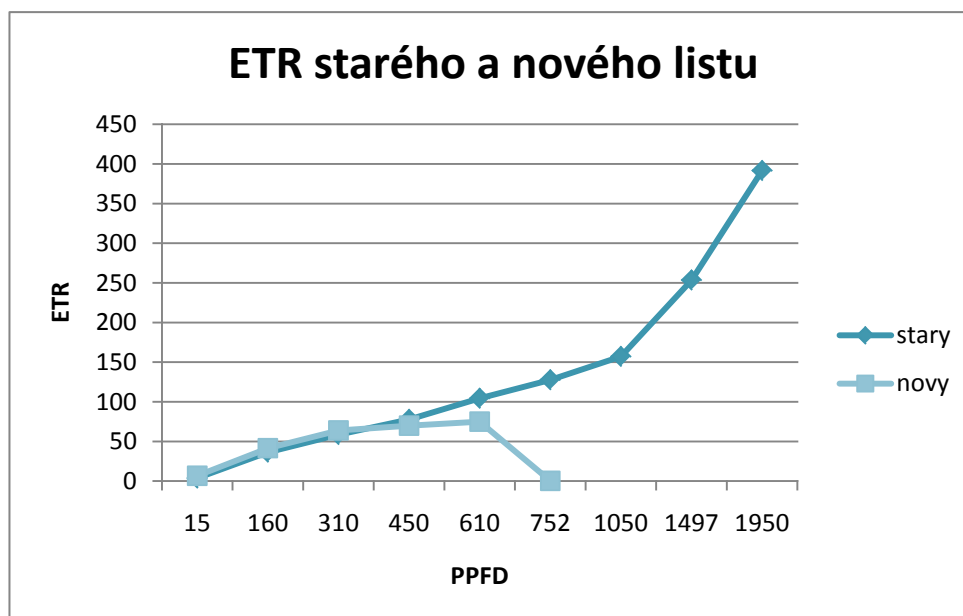
Výsledky měření pomocí RLC

starý list Φ_2	mladý list Φ_2
0,25	0,57
0,29	0,19
0,28	0,22
0,22	0,18
0,16	0,10
0,10	0,07
0,06	0,04
0,02	0,02
0,01	0
0	0

K naměřeným kvantovým výtěžkům PSII jsme si nezaznamenali hodnoty PPDF. Tabulka je alespoň orientační.

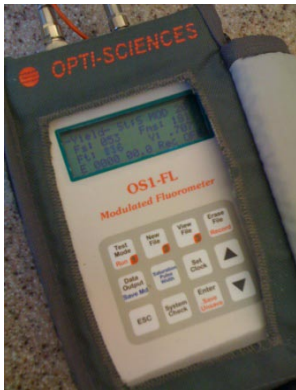
Diskuze

Předpokládali jsme, že ETR se bude při zvětšujícím se aktinickém osvětlení zvyšovat, což se také potvrdilo. Navíc jsme zjistili, že kvantové výtěžky mladšího listu jsou při nižší zátěži větší než u listu staršího, ale s přibývajícím zátěží se jeho schopnost zužitkovat dopadající záření dramaticky snižuje.



Použité přístroje a jiné vybavení

Opti-Sciences OS1-FL



Měření fluorescence, výpočet kvantového výtěžku a zdroj saturačních pulzů (mj.).

Chott KL 2500 LCD



Zdroj aktinického záření až do intenzity $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

LI-COR Biosciences LI-1400 DataLogger



Měření intenzity aktinického záření na úrovni listu.

Waltz PAM-2000



Využití pro RLC (generování pulzů, záznam dat) + externí zařízení pro zpracování dat (laptop s potřebným software).

UTEE Světelný zdroj



Pro vysoké hodnoty aktinického ozáření ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).