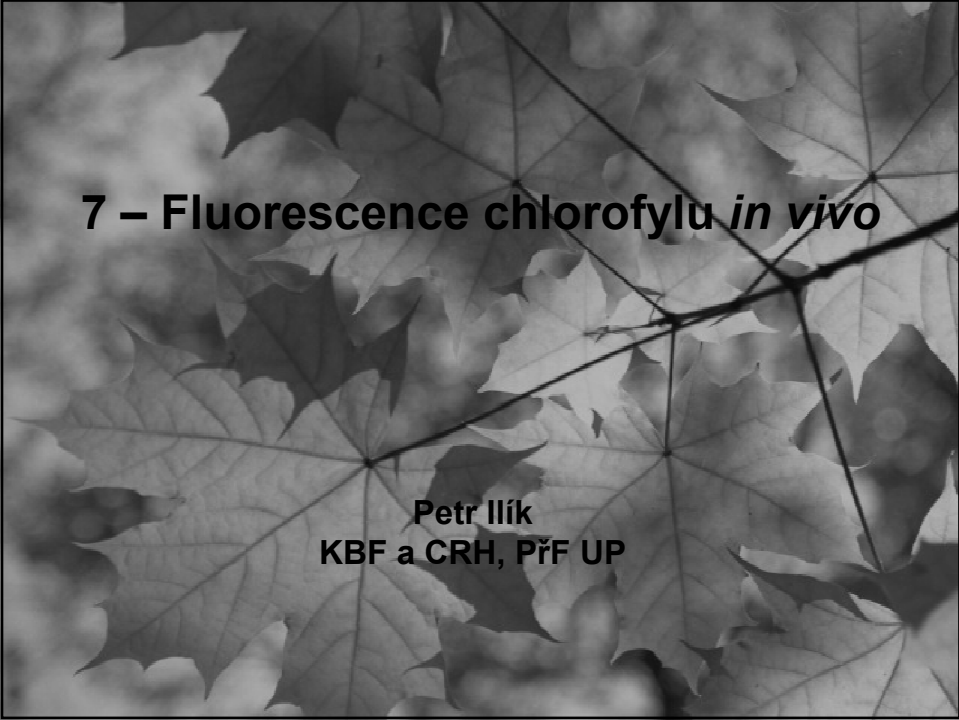




7 – Fluorescence chlorofylu *in vivo*

Petr Ilík
KBF a CRH, PřF UP

Fluorescence chlorofylu *in vivo*

- fluorescence *in vivo* – z chlorofylu a (ostatní přídavné pigmenty – přenos energie na chl a)
- indikátor neschopnosti využít absorbovanou energii pro fotochemické děje v thylakoidech
- umožňuje nepřímo sledovat funkční stav složek fotosyntetického transportu elektronů
- výpovědní hodnotu mají zejména:
 - kinetika (časová závislost) – kinetika dohasínání při předchozí excitaci pulzem (ps)
(přenos energie mezi anténami a RC)
 - spektrum (emisní, excitační) – přenos energie mezi anténami a mezi přídavnými pigmenty a chl a
 - kvantový výtěžek fluorescence chl a - změny v intenzitě při konstantní excitaci
(fluorescenční indukční jev – přenos elektronu v thylakoidní membráně po adaptaci na tmu)
- fosforescence chlorofylu a a zpožděná emise jsou o 1 – 2 řády až slabší (fosforescence: λ ~ 960 nm)

Využití energie absorbované chlorofylem a

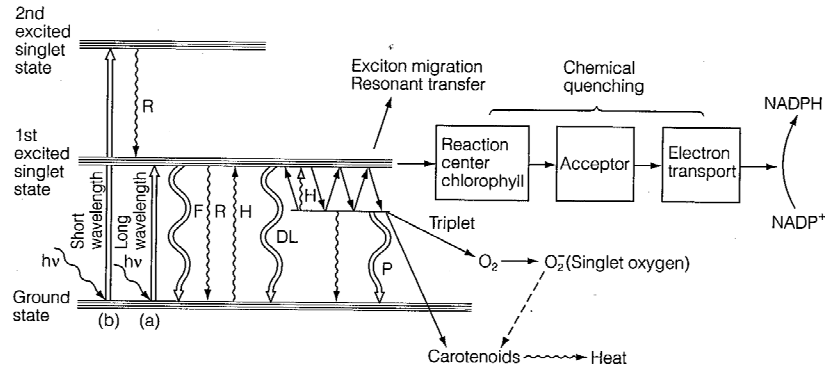
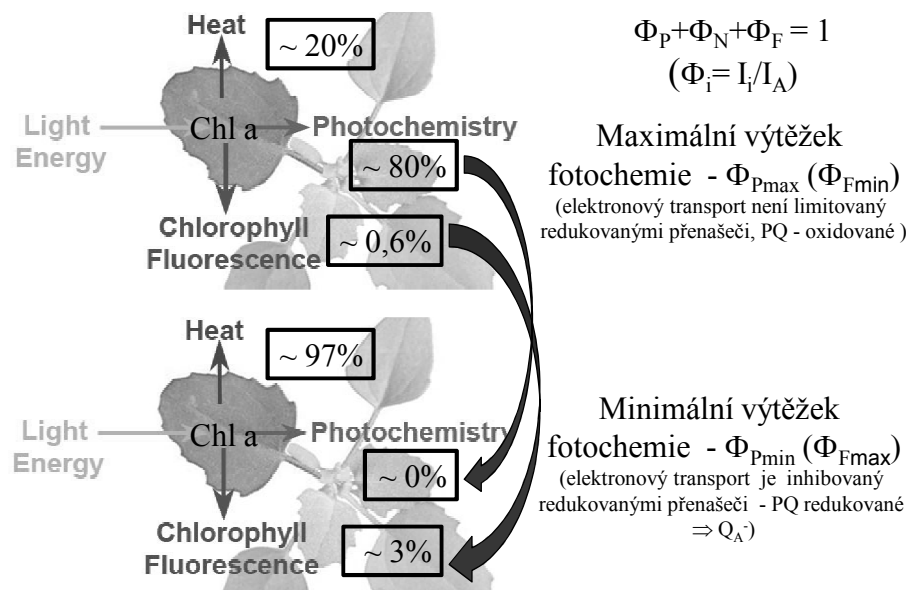
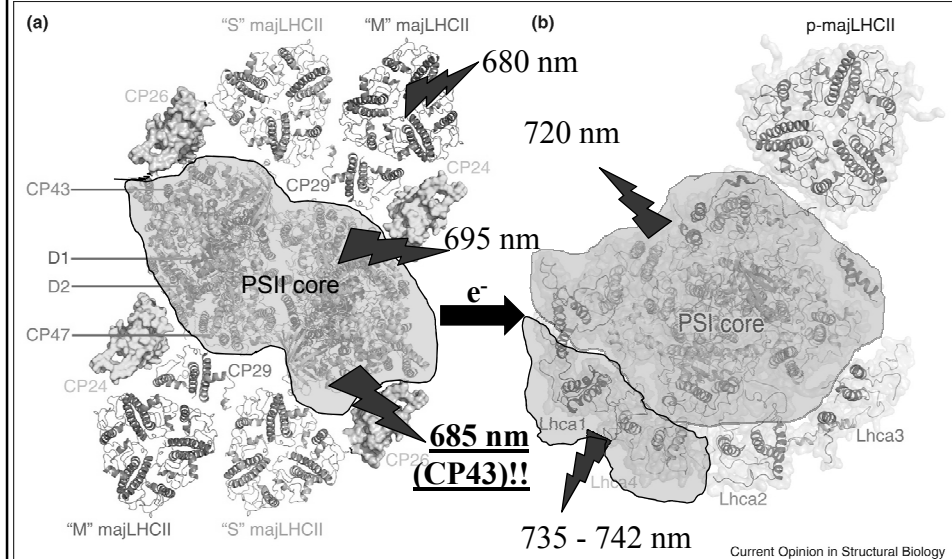


Figure 2.1. Concept of absorption of photons ($h\nu$) by an atom, energizing an electron to an excited state (a) and its subsequent decay with release of energy. Capture of a more energetic photon (b) results in higher energy level orbitals being filled and then decay by radiationless transition (R). Heat (H) may also raise an electron to higher energy level and the energy is emitted when the electron drops back to the ground state. The main energy-dissipating processes are by radiationless transition (R), prompt fluorescence (F), delayed light emission (DL), phosphorescence (P), and by transfer of excitation linked to chemical reactions. In photosynthetic organisms these include assimilation of CO_2 , and transfer of triplet energy to oxygen or carotenoids or of excitation energy to other chlorophyll and pigment molecules

Využití energie absorbované chlorofylem a

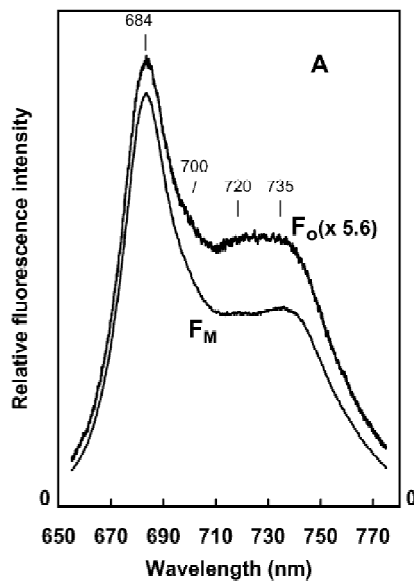


Původ fluorescence chlorofylu *in vivo*



Pan a kol. 2013 Current Opinion in Structural Biology 23, 515-525

Původ fluorescence chlorofylu *in vivo*



Franck a kol. 2002 Biochim. Biophys. Acta 1556, 239-246

- Fluorescenční emisní spektrum za podmínek F_M a F_0 je téměř stejné a podobá se emisnímu spektru granálních membrán (membrány obohacené o PSII, max. 685 nm) $\Rightarrow$ **chlorofylová fluorescence *in vivo* pochází zejména z CP43 PSII** (fluorescence se zvyšuje s redukcí PQ díky zvýšení Φ_F)
- Pro $\lambda > 700$ nm překryv emise PSI s vibračním satelitem emise PSII (podíl emise z PSI pro $\lambda > 700$ nm až 30%), PSI nemá proměnnou fluorescenci $\Rightarrow$ příspěvek stejný bez ohledu na redoxní stav PQ.
- **změna intenzity fluorescence chl a *in vivo* – indikátor redox. stavu PQ**

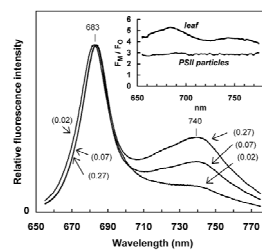
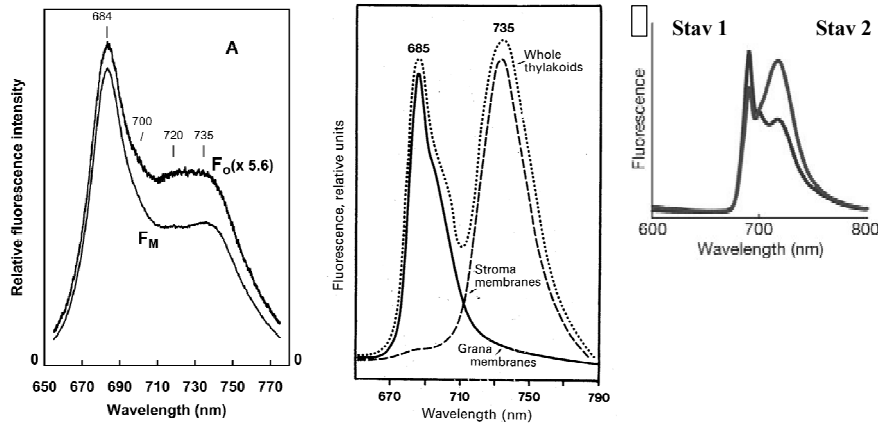


Fig. 3. Room temperature fluorescence emission spectra of increasingly concentrated suspensions of isolated PSII particles (Chl concentrations: 0.02, 0.07 and 0.27 mg ml⁻¹) measured at the F_0 state. The spectra

Emisní spektra chl a *in vivo* při 77K

- pokles teploty z 25°C na -196°C(77K) roste emise z PSI (Lhca1,4) a objeví se pás F695 (CP47 z PSII)
- příčina nárůst emise F735 při nízké teplotě: při 25°C – teplo uvolněné při tepelné deaktivaci chl a (abs. max. 705 nm) z Lhca1,4 k „up-hill“ přenosu excitací do P700, při ochlazení se přenos zruší
- při měření na listech (husté suspenzi chlp) – reabsorpce fluorescence (F685 a F695 podobná intenzita)
- Použití např. přechod stav 1- stav 2, zelenání etiolovaných rostlin



Fluorescenční indukční jev - historie

- průběh intenzity fluorescence chl a *in vivo* po předchozím zatemnění (15 min. stačí na reoxidaci PQ)
- Kautsky a Hirsch 1931: vizuální hodnocení průběhu pomalého indukčního jevu – nárůst, pokles, ustálení – pomalý indukční jev (minuty), vymizení při 0°C a při použití HCN
- McAlister a Myers 1940: antiparalelní průběh fluorescenční indukce s fixací CO₂

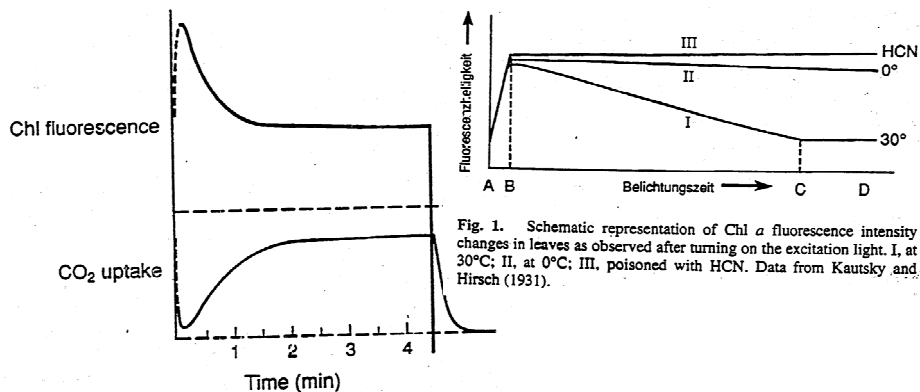
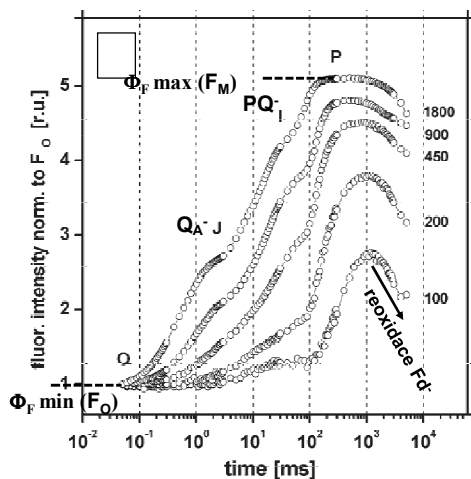


Fig. 3. Simultaneous recording of Chl *a* fluorescence intensity (top curve) and rate of photosynthesis (measured as CO₂ uptake, bottom curve) in a wheat leaf up to 4 min. Note the antiparallel relationship. Atmosphere: 0.03% CO₂ in N₂. Data from McAlister and Myers (1940).

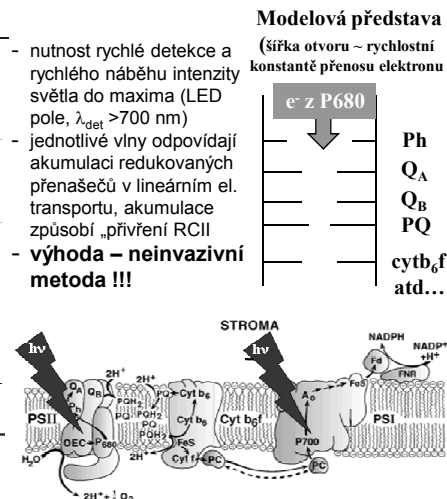
Fig. 1. Schematic representation of Chl *a* fluorescence intensity changes in leaves as observed after turning on the excitation light. I, at 30°C; II, at 0°C; III, poisoned with HCN. Data from Kautsky and Hirsch (1931).

Rychlý fluorescenční indukční jev

- typický nárůst int. fluorescence u vyšších rostlin při nízké a vysoké intenzitě excitace (ozáření):
- nízká ozáření (desítky až stovky $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$): O-I-P, vysoká ozáření (tisíce $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$): O-J-I-P ($P=F_M$)



Ilík a kol. 2006 Biochim. Biophys. Acta 1757, 12-20



Fluorescenční indukční jev – parametr F_V/F_M

$$\Phi_P + \Phi_N + \Phi_F = 1$$

- Při podmínkách F_M : $\Phi_P = 0$, $\Phi_F = \Phi_{F_{\max}}$, $\Phi_N = \Phi_{N_{\max}}$
- Při obecných podmínkách F : $\Phi_N / \Phi_F = \Phi_{N_{\max}} / \Phi_{F_{\max}}$

$$\begin{aligned} \Phi_P &= 1 - \Phi_F - \Phi_N = 1 - \Phi_F - \Phi_{N_{\max}} * \Phi_F / \Phi_{F_{\max}} = \\ &= 1 - \Phi_F - (1 - \Phi_{F_{\max}}) * \Phi_F / \Phi_{F_{\max}} = \\ &= (\Phi_{F_{\max}} - \Phi_F * \Phi_{F_{\max}} - (1 - \Phi_{F_{\max}}) \Phi_F) / \Phi_{F_{\max}} = \\ &= (\Phi_{F_{\max}} - \Phi_F) / \Phi_{F_{\max}} = \Delta\Phi_F / \Phi_{F_{\max}} = \Delta F / F_M \\ &\text{aktuální kv. výtěžek fotochemie PSII (Gentyho parametr)} \end{aligned}$$

- Při podmínkách F_0 : $\Phi_P = \Phi_{P_{\max}}$, $\Phi_{F_{\min}} \sim F_0$, $\Phi_{P_{\max}} = (F_M - F_0) / F_M = F_V / F_M$

F_0 – minimální fluorescence, F_M – maximální fluorescence, F_V – variabilní fluorescence

maximální kv. výtěžek fotochemie PSII: $F_V/F_M = 0,8$

pro $F_V/F_M < 0,8$ – poškození PSII

komerční přístroje, stresy Dr. Špundová