**Praktikum experimentálních metod fyziologie rostlin - KBF/PEMFR**

# **Stanovení obsahu chlorofylů v rostlinách**

## ZADÁNÍ

1. Seznamte se podrobně s principem činnosti, ovládáním a měřením pomocí přístroje SPAD-502.
2. Stanovte obsah chlorofylů různě zelených listů spektrofotometricky a pomocí chlorofylmetru a vypracujte kalibrační křivku pro SPAD-502.
3. Proměřte gradient obsahu chlorofylů v listech senescentních rostlin.

## SEZNAM POMŮCEK

* Chlorofylmetr SPAD 502DL,
* skalpel, řezací podložka, milimetrový papír, folie, lihová fixa
* 80% aceton, MgCO3, třecí misky s tloučky, mikrozkumavky, zkumavky se stupnicí, centrifuga, stojánek
* spektrofotometr, skleněné kyvety

Rostlinný materiál:

* modelové rostliny ječmene jarního pěstované hydroponicky ve fytokomoře (v Knopově roztoku nebo deionizované vodě)

## TEORIE

Rostliny stresované nedostatkem živin (zejména dusíku) nebo fotosynteticky aktivního záření mají zpravidla menší obsah chlorofylů v listech. Úkolem bude stanovit obsah chlorofylů v listech ječmene jarního pěstovaného za standardních a stresových podmínek pomocí chlorofylmetru SPAD-502 a pomocí spektrofotometrického stanovení. Oba typy měření budou provedeny na stejných listech a ze získaných hodnot bude sestrojena kalibrační křivka. Protože obsah chlorofylů závisí mimo jiné také na stáří listů, měření chlorofylmetrem by mělo probíhat vždy na listech stejného stáří (postavení na rostlině) a pokud možno ve stejné části listů (např. ve středu čepele).

Metody stanovení obsahu chlorofylů lze dělit na destruktivní (chemické) a nedestruktivní (fyzikální).

**Destruktivní metody**

Klasické metody stanovení obsahu chlorofylů jsou založeny na extrakci pigmentů z pletiva a na spektrofotometrickém stanovení jejich obsahu (Arnon 1949, Lichtenthaler 1987, Porra et al. 1989). Extrakt fotosyntetických pigmentů ze zelených částí vyšších rostlin obsahuje zejména chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a směs karotenoidů (-karoten a xantofyly). Absorpční spektra chlorofylu *a* a *b* v 80 % acetonu izolovaných z listů ječmene jarního jsou uvedena na obr. 1. Podrobnější složení obsahu pigmentů včetně rozlišení jednotlivých karotenoidů lze zjistit pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Pro zjištění obsahu chlorofylu *a* a *b* v acetonovém extraktu se používá měření absorbance ve vybraných vlnových délkách v jednocentimetrové kyvetě. Jako příklad uvádíme postup podle Lichtenthalera (1987), jenž pro výpočet celkového obsahu chlorofylu *a* a *b* v extraktu udává rovnici:

**Chl (*a*+*b*) = 7,15 × (A663,2 – A 750) + 18,71 × (A646,8 – A750) [μg . ml-1]**,

kde A663,2; A646,8; A750 jsou hodnoty absorbance pigmentového extraktu v příslušných vlnových délkách (663,2 nm; 646,8 nm a 750 nm). Obsah chlorofylů v listech je možné uvádět v jednotkách množství (mol) nebo hmotnosti (kg, g, mg) vztažených na jednotku plochy listu, jednotku čerstvé hmotnosti nebo sušiny, případně i na jinou vztažnou veličinu (např. celkový obsah proteinů, objem listu).

Obr. 1. Absorpční spektra chlorofylu *a* a *b* v 80 % acetonu, normalizovaná naabsorpční maximum.

**Nedestruktivní metody**

Nedestruktivní metody využívají měření optických spektrálních vlastností listů (lze měřit difúzní propustnost, difúzní odrazivost, fluorescenci chlorofylu). Zajímavý postup je např. využití efektu reabsorpce fluorescence chlorofylu v listu, kdy poměr pásů v emisním spektru odráží obsah chlorofylů (např. Hák a kol. 1990).

V tomto praktiku se seznámíte s metodou využívající difúzní propustnost listu.

Chlorofylmetr SPAD-502

Chlorofylmetr SPAD-502 umožňuje velmi rychlé a nedestruktivní určení relativního obsahu chlorofylu v listech rostlin bez nutnosti extrakce pigmentů. Byl vyvinut především za účelem optimalizace dodávání dusíku zemědělských plodinám. Hodnoty měřené chlorofylmetrem SPAD-502 jsou počítány z propustnosti listu pro dvě různé vlnové délky – 650 nm (velká absorbance chlorofylů) a 940 nm (minimální absorbance chlorofylů).

Popis přístroje

****

**15. připojení k**

**počítači**

**14. zelená kontrolka**

1. **vypínač**
2. **měřicí hlava**
3. **značka indikující střed měřené plochy**
4. **posuvná zarážka umožňující nastavit stejnou vzdálenost měřené plochy od okraje listu**
5. **LCD panel**
6. **tlačítko ALL DATA CLEAR: vymaže všechna hodnoty v paměti**
7. **tlačítko AVERAGE: spočítá průměr ze všech hodnot v paměti**
8. **tlačítko DATA RECALL: zobrazí předcházející naměřenou hodnotu**
9. **tlačítko 1 DATA DELETE: vymaže poslední naměřenou (resp. zobrazenou) hodnotu**
10. **uzávěr prostoru na baterie**
11. **očko na závěsnou šňůru**
12. **prostor pro vkládání měřeného listu**
13. **místo pro stlačení měřicí hlavy**

Osvětlovací/měřicí systém

Osvětlovací systém tvoří červená a infračervená LED (luminiscenční diody). LED jsou zabudovány do měřicí hlavy a emitují sekvenci pulsů po uzavření měřicí hlavy. Záření prochází listem a dopadá na detekční okénko s křemíkovou fotodiodou. Detektor převádí optický signál na elektrický signál, který je zesílen zesilovačem a převeden na digitální signál A/D převodníkem. Mikroprocesor vypočítá z digitálního signálu hodnotu (M), která je zobrazena na displeji a ukládána do paměti přístroje. Hodnota M odrážející obsah chlorofylů v listu je vypočítána srovnáním poměru intenzit detekovaného záření o vlnových délkách 650 a 940 nm při měření bez vzorku a se vzorkem:

M = log [(I´940/I940)/ (I´650/I650)] = log [(I´940 × I650)/ (I´650 × I940)], kde:

I650, I940 … el. proud na fotodiodě vyvolaný dopadem záření o vlnové délce 650 a 940 nm (bez vzorku)

I´650, I´940 … el. proud na fotodiodě vyvolaný dopadem záření o vlnové délce 650 a 940 nm po průchodu vzorkem (listem)

Pro daný typ rostliny rostoucí v určitých podmínkách je nutné nejprve určit kalibrační křivku závislosti mezi hodnotami měřenými chlorofylmetrem SPAD-502 a skutečnou koncentrací chlorofylů v listech. V literatuře jsou pro vyjádření zmíněné závislosti udávány různé funkce. Např. Markwell a kol. (1995) použily exponenciální závislost, která dobře vystihuje i závislost naměřenou na našem oddělení na listech ječmene jarního (viz obr. 2).



Obr. 2. Závislost mezi hodnotami měřenými chlorofylmetrem SPAD-502 a skutečným obsahem chlorofylu (určeným spektrofotometricky) v listech ječmene jarního. Rovnice kalibrační křivky: **y = - 11,42 + 14,2 • e 0,025 x** (R2 = 0,91).

Kalibrace fotodiody (stanovení I605 a I940 na fotodiodě u přístroje bez vzorku)

Kalibrace se provádí vždy po zapnutí přístroje.

1. zapnout přístroj (ON) (na displeji se objeví „CAL“)
2. uzavřít měřicí hlavu (bez vzorku!), držet uzavřenou, dokud nepípne a na displeji se neobjeví „---„
3. kalibrace fotodiody je tímto provedena
* pokud nepřestane přístroj pípat a na displeji bliká „CAL“, kalibrace neproběhla správně (nebyla dostatečně uzavřena měřicí hlava nebo byla otevřena před skončením kalibrace). Pokud k tomu dojde, opakovat bod 2.
* pokud nepřestane přístroj pípat, na displeji bliká „CAL“ a v horní části displeje se objeví „EU“, pravděpodobně je znečištěné emisní nebo detekční okénko v měřicí hlavě. Po vyčištění okének opakovat bod 2.

Měření

1. provedení kalibrace fotodiody
2. vložení listu do prostoru pro měření vzorku
* list musí zcela pokrývat detekční okénko
* neměřit v místech listu s tlustými žilkami
* pokud je měřen list s mnoha žilkami, doporučuje se provést několik měření v různých částech listu a vypočítat průměrnou hodnotu
* pokud není emisní nebo detekční okénko čisté nebo je na nich voda, měření je nepřesné. Je nutné okénka před měřením vyčistit.
* pokud je přístroj používán na přímém slunečním světle, je vhodné ho zastínit (např. tělem), aby měření nebylo ovlivněno.
1. zavřít měřicí hlavu, nechat ji zavřenou, dokud nezazní pípnutí – naměřená hodnota se zobrazí na displeji. Hodnota se automaticky uloží do paměti.
* pokud zní pípání a na displeji bliká „---„, měření nebylo provedeno správně (měřicí hlava nebyla zcela uzavřena, měřicí hlava byla otevřena před skončením měření, měřený list je příliš tlustý, tenký nebo má obsah chlorofylu pod detekční mezí chlorofylmetru). Opakovat body 2 a 3.
* pokud je naměřená hodnota větší než 50.0, desetinná tečka bliká – což indikuje, že chyba měření může být větší než ± 1 SPAD. Totéž platí pro hodnoty ≥ 100 (desetinná tečka se nezobrazuje).

Paměťové funkce

Naměřené hodnoty jsou automaticky ukládány do paměti. Operační paměť přístroje umožňuje uložit 30 hodnot. Když je paměť plná, první naměřená hodnota se smaže, zbývající hodnoty (2-30) se posunou na pozice 1-29, a poslední naměřená hodnota se uloží jako 30. Po vypnutí přístroje se data z operační paměti přístroje automaticky vymažou a nelze je již zobrazit na displeji. Všechna naměřená data (max. 4 096) však zůstávají uložena v dataloggeru, který je součástí chlorofylmetru, a lze je přetáhnout do počítače k další analýze.

###### Gradient obsahu chlorofylů v listech senescentních rostlin

Typickým znakem stárnutí rostliny je degradace chlorofylů, která se projevuje postupným žloutnutím listů. V rámci rostliny začínají jako první stárnout zpravidla nejníže položené listy, z nichž jsou přesouvány živiny a voda do jiných částí rostliny (např. do mladších listů nebo do květů a plodů, příp. do zásobních orgánů). Lze tedy pozorovat gradient obsahu chlorofylů v rámci rostliny – spodní (starší) listy mají menší obsah chlorofylu než horní (mladší) listy. Tento gradient se zpravidla zvětšuje při působení stresových faktorů – rostlina „obětuje“ spodní listy za účelem udržení funkčních mladších částí (důležitých např. pro reprodukci).

Gradient můžeme definovat jako:

 **G [%] = (cmax - cmin)/cmax × 100**,

kde cmax je maximální obsah chlorofylu a cmin je minimální obsah chlorofylu naměřený u listů různého stáří na rostlině.

Úkolem bude zjistit, zda u starších rostlin ječmene jarního vznikne gradient obsahu chlorofylů v rámci rostliny, příp. jak bude tento gradient ovlivněn vybraným stresovým faktorem.

## POSTUP

### Kalibrace chlorofylmetru SPAD-502 spektrofotometrickým stanovením

1. Provedeme kalibraci fotodiody.
2. Provedeme měření obsahu chlorofylů na různě zelených listech a to 10x v různých místech plochy listu přibližně v polovině jeho délky.
3. Z 10 hodnot získaných pro každý list (celkem 9-10 listů) vypočtěte průměr a směrodatnou odchylku pro daný list.

Spektrofotometrické stanovení

1. Z listů ječmene oddělíme plošku proměřenou chlorofylmetrem (tj. 1,5 cm od špičky, délka segmentu 3 cm), segment obkreslíme fixou na folii a pomocí milimetrového papíru určíme plochu segmentu.
2. ze segmentu připravíme acetonový extrakt:
* segment vložíme do třecí misky, přidáme malé množství 80% acetonu a špetku MgCO3 (váže buněčné kyseliny a zabraňuje přeměně chlorofylů na feofytiny), důkladně rozetřeme tloučkem, opakovaně vypláchneme 80% acetonem a slijeme do popsané mikrozkumavky (celkové množství acetonu: 1 – 2 ml)
* mikrozkumavky vložíme do stolní centrifugy,
* centrifugujeme při 6000 g po dobu 10 minut (při 4°C),
* po centrifugaci slijeme supernatant do skleněných zkumavek se stupnicí a na spektrofotometru změříme jeho absorbanci při vlnových délkách 646,8; 663,2 a 750 nm v jednocentimetrové kyvetě
* supernatant případně zředíme tak, aby absorbance při vlnové délce 663,2 nm byla v rozmezí 0,4 – 0,8
* zapíšeme si přesný objem supernatantu
* příprava extraktu musí probíhat ve tmě (resp. při velmi slabém zeleném světle)

z naměřených hodnot absorbancí (A) vypočítáme podle následující rovnice obsah chlorofylů *a* a *b* v extraktu podle Lichtenthalera (1987):

**Chl (*a*+*b*) = 7,15 × (A663,2 – A 750) + 18,71 × (A646,8 – A750) [μg . ml-1]**

kde A663,2; A646,8; A750 jsou hodnoty absorbance pigmentového extraktu v příslušných vlnových délkách (663,2 nm; 646,8 nm a 750 nm).

1. získanou hodnotu [μg.ml-1] vynásobíme celkovým objemem extraktu [ml] a podělíme hodnotou listové plochy [cm2] – dostaneme hodnotu obsahu chlorofylu na plochu v jednotlivých listových segmentech [μg . cm-2].

Sestrojení kalibrační křivky

1. Z hodnot získaných pomocí chlorofylmetru a spektrofotometrického stanovení všech měřených listů sestrojíme kalibrační křivku: průměrné hodnotě (z 10 hodnot naměřených na plošce jednoho listu) získané chlorofylmetrem vždy přiřadíme příslušnou hodnotu obsahu chlorofylů *a* a *b* [μg . cm-2] zjištěnou spektrofotometricky, body vyneseme do grafu a proložíme vhodnou křivkou.
2. Porovnejte vámi získanou kalibrační křivku s kalibrační křivkou viz Obr. 2. a odůvodněte rozdíly.

### Vliv stresových podmínek na obsah chlorofylu a gradient obsahu chlorofylu

1. Provedeme měření obsahu chlorofylů na prvních, druhých a třetích listech rostlin ječmene pěstovaných ve fytokomoře při standardních a stresujících podmínkách. Z každé varianty změříme 5 rostlin.
2. Naměřené hodnoty zapisujeme.
3. Z rovnice kalibrační křivky námi získané nebo z kalibrační křivky uvedené v obr. 2 vypočítáme skutečný obsah chlorofylů na plochu listu u jednotlivých listů.
4. Srovnáme obsah chlorofylů v listech jednotlivých variant a zhodnotíme vliv nedostatku výživy a světla.
5. Pro jednotlivé rostliny vypočítáme G podle výše uvedeného vztahu a ze získaných hodnot G vypočítáme průměr a směrodatnou odchylku pro standardní a stresované rostliny.
6. Srovnáme gradienty obsahu chlorofylů v listech standardních a stresovaných rostlin a zhodnotíme vliv stresového faktoru.

### Zhodnocení měření

1. Srovnáme výsledky obou typů měření obsahu chlorofylu, posoudíme výhody a nevýhody obou metod a jejich přesnost.
2. Srovnáme obsah chlorofylu v listech jednotlivých variant rostlin a zhodnotíme vliv nedostatku výživy a světla.

## LITERATURA

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24, 1-15.

Hák, R., Lichtenthaler, H.K., Reinderle, U. (1990) Decrease of the chlrophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves. radiat. Environ. Biophys. 29:329-336.

##### Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids. Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148, 350-382.

Markwell J, Osterman JC, Mitchell JL (1995) Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. Photosynthesis Research 46, 467-472.

# Porra RJ, Thompson WA, Kreidemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta 975, 384-394.

manuál k přístroji SPAD-502 DL, Konica Minolta Sensing, Japonsko.