

# Cvičení z fyziologie rostlin



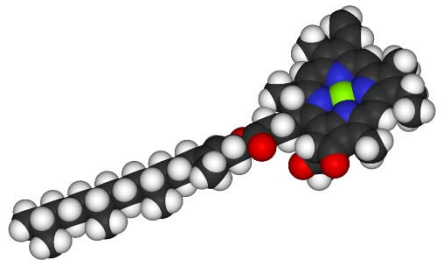
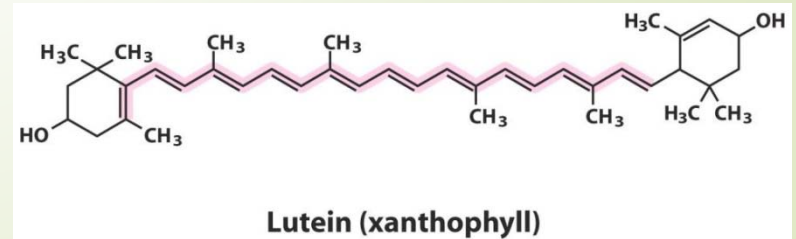
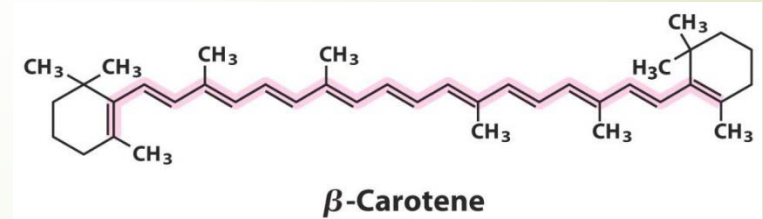
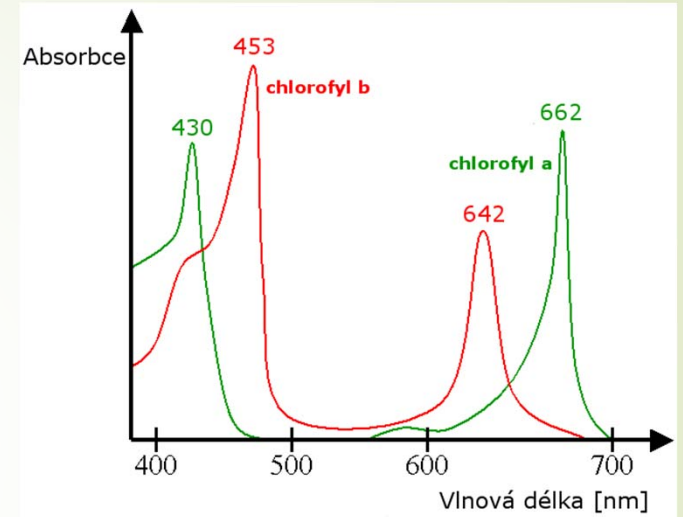
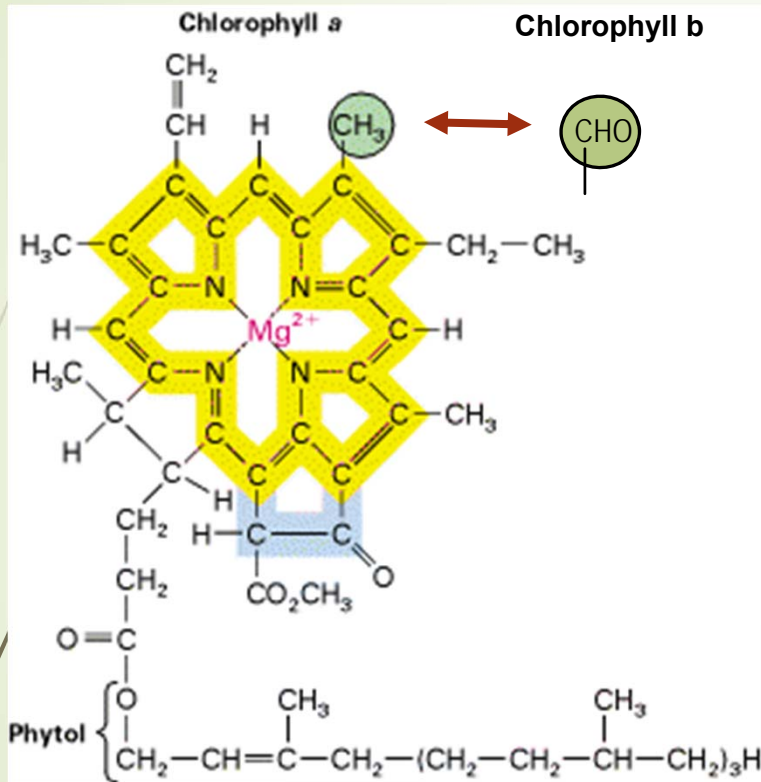
## 8. Fotosyntetické pigmenty

# Rostlinné pigmenty

- Rozpustné ve vodě („hydrochromy“):
  - Flavonoidy: antokyany, flavonoly, flavony
  - Lokalizované ve vakuolách („vakuolární barviva“),
  - Barvy – fialová, modrá, růžová, načervenalá (antokyany)  
- bělavá, nažloutlá (flavony a flavonoly)
  - reakce na pH (antokyany), barevnost květů, plodů, stonků a dalších částí rostlin, ochrana před UV zářením
- Rozpustné v tucích („lipochromy“):
  - Cyklické tetrapyroly (chlorofyly), karotenoidy
  - Lokalizované v plastidech („plastidová barviva“)
  - Barvy – zelená, modrozelená, žlutozelená (chlorofyly)  
- žlutá, oranžová, červená (karotenoidy)
  - fotosyntéza (zachytávání energie fotonů, excitace elektronů), barevnost zelených částí rostlin (chlorofyly), květů, plodů, zásobních orgánů (karotenoidy)

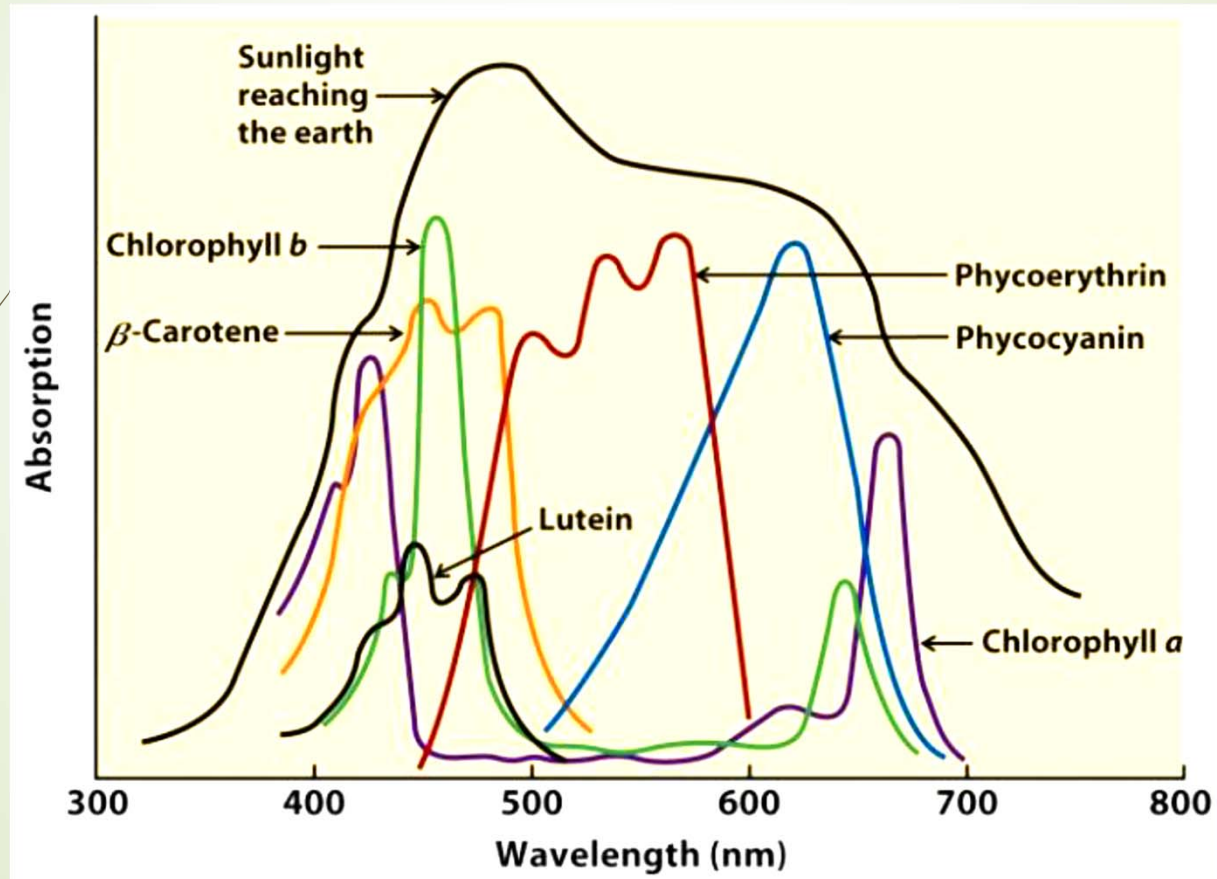


# Fotosyntetické pigmenty



# Fotosyntetické pigmenty

- Absorbují viditelné záření v modré a červené oblasti



# Fotosyntetické pigmenty

## ■ Chlorofyly:

- Chl *a*, chl *b* – vyšší rostliny, další formy u řas, sinic a bakterií
- Zachycení energie fotonu, excitace elektronu
- Chl *b* → chl *a* → chl *a* (P680) v reakčním jádru fotosystému II (a P700 v reakčním jádru fotosystému I)

## ■ Karotenoidy:

- Přidatné pigmenty, zachycení energie fotonu a předávání na chlorofyly
- Ochranná funkce – disipace nadbytečné excitační energie v xantofylovém cyklu

## ■ Obsah pigmentů a vzájemné poměry ve vyšších rostlinách

- Obvykle Chl *a* : chl *b* – 3:1, Chl (*a*+*b*): karotenoidy – 5:1 a více
- Změna při stresu (vliv toxické látky, nedostatek živin, dostupnost světla...), často pokles obsahu chl *a*, nebo zvýšení obsahu karotenoidů

# Metody stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů

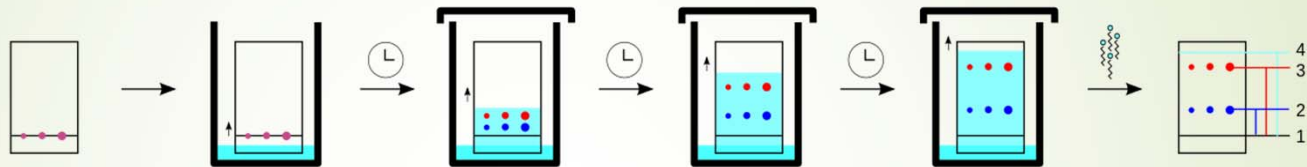
- ▶ Přímé – přesné, destrukční, nutná extrakce pigmentů z biomasy
  - ▶ Extrakt v nepolárním rozpouštědle (methanol, ethanol, aceton, DMSO ...)
  - ▶ Chromatografická analýza – dělení a kvantifikace separovaných složek  
např. tenkovrstevná chromatografie (TLC), kapalinová chromatografie (HPLC)
  - ▶ Spektrofotometrická analýza – kvantifikace ve směsi podle optické absorbance extraktu
- ▶ Nepřímé – méně přesné, jen pro některé pigmenty, možná detekce pigmentů in vivo bez extrakce
  - ▶ Optické metody na základě reflektance nebo fluorescence



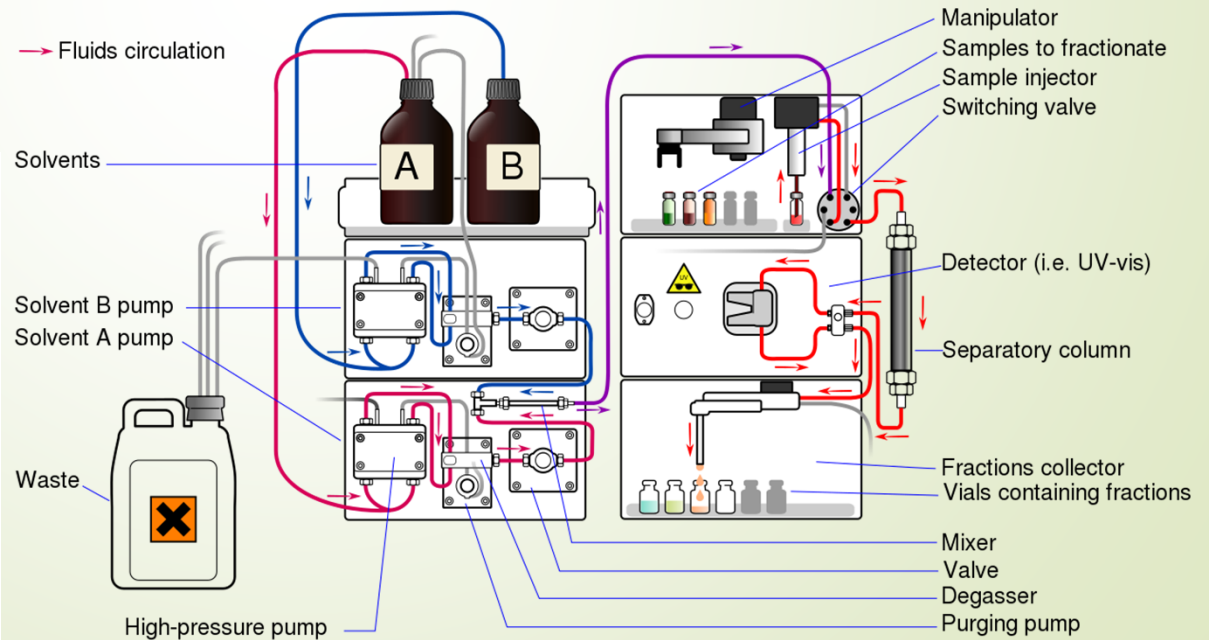
# Přímé metody stanovení pigmentů

➤ Nutná extrakce do nepolárního rozpouštědla

➤ TLC

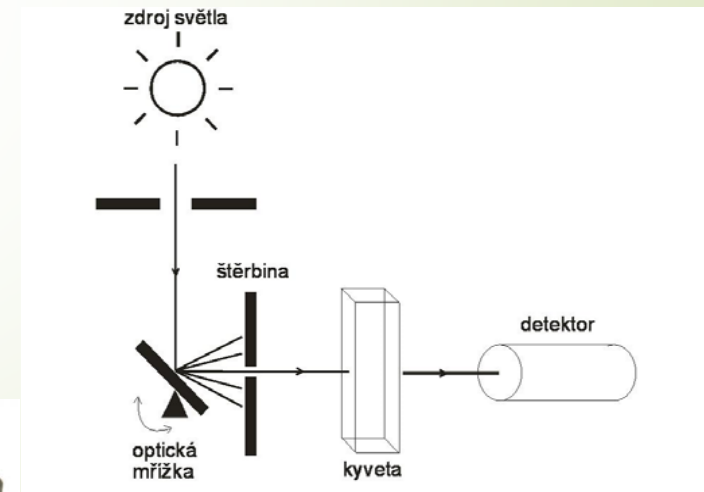


➤ (HP)LC



# Přímé metody stanovení pigmentů

- ▶ Nutná extrakce do nepolárního rozpouštědla
- ▶ (Spektr)ofotometrické stanovení absorbance
  - ▶ Měření absorbance při specifických vlnových délkách, přepočet obsahu jednotlivých složek pomocí multikomponentní analýzy absorpčního spektra (nutné znát extinkční koeficienty a absorpční maxima složek)





# Nepřímé metody stanovení pigmentů

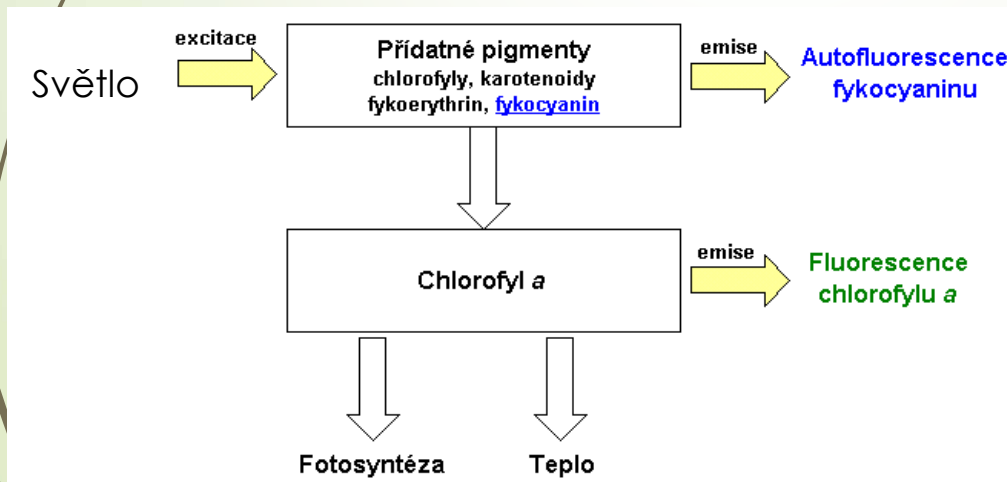
- Bez extrakce, měření *in vivo*, stanovení relativního obsahu pigmentů
- Reflektanční měření:
  - Photochemical Reflectance Index (PRI) – karotenoidy, porovnání reflektance při vlnových délkách okolo 500 až 600 nm
  - Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) – chlorofyly, porovnání reflektance při vlnových délkách viditelné a blízké infračervené (NIR) části spektra
- Fluorescenční měření:
  - Nitrogen-Flavonol Index (NFI) a relativní obsahy chlorofylu, karotenoidů, a antokyanů



# Nepřímé metody stanovení pigmentů

## Fluorescenční měření:

- Vhodné také pro detekci řas a sinic ve vodě (fytoplankton, fytoobentos) na základě přítomnosti chlorofylu *a* (u sinic i na základě přítomnosti fykocyaninu)
- Excitace chl *a* energií zachycenou přídatnými pigmenty (chl *b*, karotenoidy, fykobiliny)
- Kvantifikace podle kalibrace
- Ukazatel čistoty koupacích vod !!!



# Proč měříme obsah pigmentů?

- Celkový obsah chlorofylů, poměr chlorofylu *a* a *b*
  - Dostatek chlorofylů = efektivní fotosyntéza, nedostatek = důkaz nedostatku živin, malý výkon fotosyntézy, slabý růst
  - Poměr chl *a*/chl *b* – obvykle 3:1, změna při změně podmínek (dostupnost světla, vliv stresu)
- Obsah karotenoidů
  - Zvýšený obsah – možný vliv stresu
- Stanovení dynamických změn v reakci na podněty (např. stres)



# Praktické návody

# Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů

## Úloha:

Vliv deficienci vybraných makroživin (N, P, Fe) na obsah fotosyntetických pigmentů v listech rostlin kukuřice

- Materiál: listy rostlin kukuřice pěstovaných v živném roztoku bez vybraných makroživin (N, P, Fe)
- Úkoly: Spektrofotometricky stanovte obsah chl a, chl b a karotenoidů a jejich vzájemné poměry v listech nedostatkem živin ovlivněných rostlin.
- Hypotéza: Obsahy a poměry pigmentů v listech deficientních rostlin se budou lišit v závislosti na významu konkrétní živiny pro růst a na rozsahu poškození způsobeném jejím nedostatkem.

# Stanovení obsahu pigmentů

## ► Pomůcky a potřeby:

- Rostlinný materiál: rostliny kukuřice (*Zea mays*) pěstované za nedostatku živin (bez N, P, Fe)
- Potřeby: sestava pro filtraci (stojan, nálevky), odměrné válce a baňky (25 mL), filtrační papír, třecí misky s tloučky, nůžky, tyčinka, ubrousky, spektrofotometrické kyvety
- Chemikálie: mořský písek,  $MgCO_3$ , aceton (100%)
- Přístroje: váhy, spektrofotometr





# Stanovení obsahu pigmentů

## Provedení: Extrakce pigmentů

- Označit si třecí misky a odměrné sklo podle variant
- Odebrat vzorek listu a rozstříhat jej na malé kousky
- Odvážit přibližně 250 mg, zaznamenat si přesnou hmotnost
- Kousky listu přesypat do třecí misky, přidat malé množství mořského písku a  $MgCO_3$ .



# Stanovení obsahu pigmentů

## Provedení: Extrakce pigmentů

- ▶ Za přikapávání acetonu kousky listů pomocí tluččku rozetřít na jemnou kaši
- ▶ Připravit si filtrační soupravu (stojan, nálevka, filtr zvlhčený acetonem, odměrný válec)
- ▶ Extrakt zfiltrovat – tekutinu z misky opatrně přelít po tyčince do filtru
- ▶ Do misky znovu přidat malý objem acetonu, promíchat a slít na filtr
- ▶ Postup opakovat do úplného odbarvení hmoty v misce



# Stanovení obsahu pigmentů

*Provedení:*

Extrakce pigmentů

- Spláchnout zbytky barviv z okrajů filtru
- Extrakt přelit z odměrného válce do baňky
- Objem upravit na finální hodnotu (25 mL)
- Vzorek dobře promíchat a uzavřít zátkou
  
- Extrakci zopakovat pro každou zkoumanou variantu





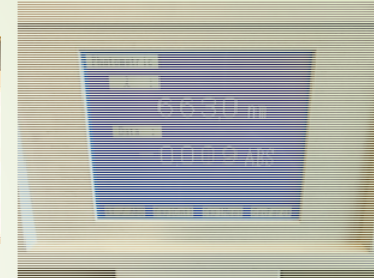
# Stanovení obsahu pigmentů



Měření:

Příprava spektrofotometru

- Po spuštění spektrofotometru nastavit první vlnovou délku pro měření absorbance (stisknout „GOTO WL“, zadat čísla vlnovou délku, potvrdit „ENTER“)
- U dvoupráskového spektrofotometru dát do zadní pozice kyvetu s acetonem (blank)
- Pro vynulování dát do přední pozice také kyvetu s acetonem a stisknout „AUTO ZERO“



# Stanovení obsahu pigmentů

Měření:

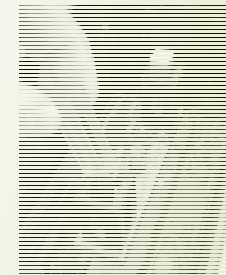
Měření absorbance

- Po nastavení spektrofotometru nalít do přední kyvety vzorek extraktu, kyvetu otřít a vložit zpět do přístroje



- Zavřít kryt přístroje a zaznamenat si hodnotu absorbance.

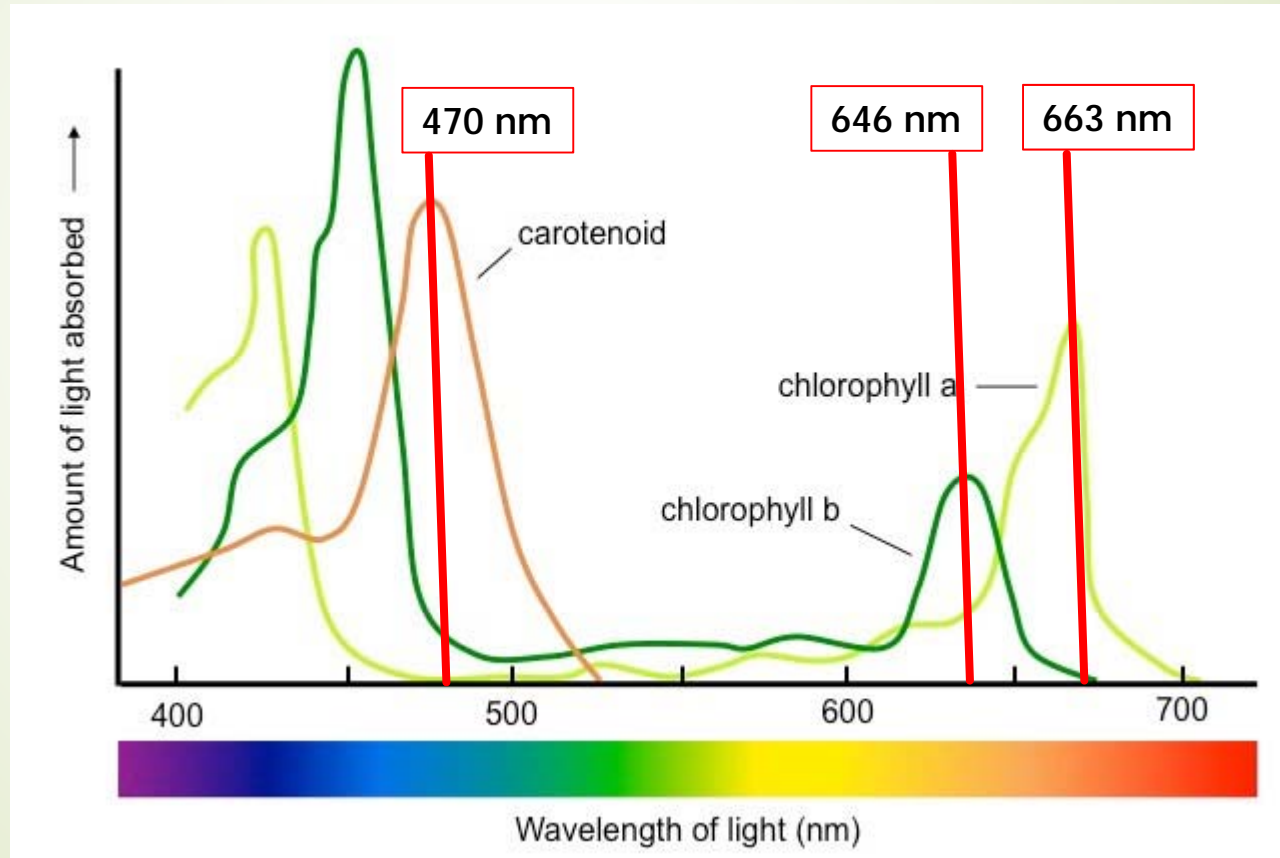
Hodnota absorbance by se měla pohybovat optimálně v rozmezí 0.2 až 0.8 (max. 1.0).  
Vzorky s vyšší absorbancí je nutno zředit přesným objemem acetonu a změnu celkového objemu vzorku si poznamenat.



- Měření při nastavené vlnové délce provést pro všechny vzorky.  
Poté změnit vlnovou délku, provést vynulování a opět pokračovat v měření celé sady vzorků.



# Princip spektrofotometrické detekce pigmentů v extraktu





# Stanovení obsahu pigmentů

## ► Vyhodnocení

► Pro každý vzorek je třeba zaznamenat:

- Navážku použitou pro extrakci
- Celkový extrakční objem (včetně případného ředění)
- Absorbanci při 663, 646 a 470 nm.

## ► Výpočet obsahu pigmentů:

1) přepočítání absorbance na koncentraci pigmentů v extraktu pomocí rovnic multikomponentní analýzy:

$$C(\text{chl a}) = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646} \quad [\mu\text{g/mL}]$$

$$C(\text{chl b}) = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663} \quad [\mu\text{g/mL}]$$

$$C(\text{c+x}) = (1000 \times A_{470} - 3,27 \times C(\text{chl a}) - 104 \times C(\text{chl b})) / 198 \quad [\mu\text{g/mL}]$$

Podle Wellburn A.R. (1994), J. Plant Physiol. 144: 307-313,  
pro 100% aceton a 1 cm kyvety

# Stanovení obsahu pigmentů

- Výpočet obsahu pigmentů  
2) přepočítání koncentrací na extrakční objem a navážku

Získané koncentrace Chl a, Chl b a karotenoidů vynásobit extrakčním objemem a s pomocí hodnoty navážky vyjádřit obsah v mg na 1 gram čerstvé hmotnosti listu (mg/g č.hm.).

- Pokud bylo měřeno více vzorků téže varianty, výsledné hodnoty zprůměrovat.
- Pokud je známá plocha části listu použité pro extrakci, lze obsah pigmentů vyjádřit i jako obsah na listovou plochu, např. mg/cm<sup>2</sup>.



# Stanovení obsahu pigmentů

## Úkoly:

- Ze zadaných dat vypočítejte obsah pigmentů na gram čerstvé hmotnosti listu.
- Porovnejte průměrné hodnoty – jak se liší v obsahu chlorofylů a karotenoidů jednotlivé varianty kukuřice?
- Z průměrných hodnot vypočítejte poměr obsahu chlorofylu a ku chlorofylu b ( $\text{chl a} / \text{chl b}$ ) a poměr obsahu chlorofylů ku karotenoidům ( $\text{chl a} + \text{chl b} / \text{car}$ ) – jak se hodnoty liší u jednotlivých variant? Blíží se poměr  $\text{chl a} / \text{chl b}$  teoreticky udávané hodnotě 3:1?