



UNIVERSITETI POLITEKNIK I TIRANËS
FAKULTETI I INXHINIERISË MATEMATIKE & INXHINIERISË FIZIKE
DEPARTAMENTI I INXHINJERISË FIZIKE

DISERTACION

PËR KËRKIMIN E GRADËS SHKENCORE

DOKTOR

**FOTOSINTEZA DHE FLUORESHENCA KLOOROFILË a –
BAZA TEORIKE DHE APLIKIME PRAKTIKE NË STUDIMIN
E BIMËVE**

Paraqitur nga:

MSc. Emilia Lluka Çaçi

Udhëheqës shkencor:

Prof. Dr. Fatos Klosi

Tiranë, 2019



UNIVERSITETI POLITEKNIK I TIRANËS
FAKULTETI I INXHINIERISË MATEMATIKE & INXHINIERISË FIZIKE
DEPARTAMENTI I INXHINJERISË FIZIKE

DISERTACION

Për kërkimin e gradës shkencore

DOKTOR

Paraqitur nga **MSc.Emilia Lluka Çaçi**

**FOTOSINTEZA DHE FLUORESHENCA KLOOROFIL a –
BAZA TEORIKE DHE APLIKIME PRAKTIKE NË STUDIMIN
E BIMËVE**

Udhëheqës shkencor: Prof. Dr. Fatos Klosi

Mbrohet më datë 17.12.2019 para jurisë:

- 1. Prof. Dr. Partizan Malkaj – Kryetar komisioni**
- 2. Prof. Asoc. Dr. Dhurata Kuqi – Anëtar (Oponent i brendshëm)**
- 3. Prof. Asoc. Dr. Adhurim Hoxha – Anëtar**
- 4. Prof. Asoc. Dr. Polikron Dhoqina – Anëtar (Oponent i jashtëm)**
- 5. Prof. Asoc. Dr. Alma Ahmeti – Anëtar**

Takova një proces biologjik brilant - fotosinteza, për njohjen dhe perceptimin e të cilës më kishin “munguar shqisa”. Fillimi ishte biologji, kimi pafund. Pasi tejkalova pragun, mora të kërkoj pikat e kontaktit dhe të vendos lidhjet me fizikën. Konstatova se sinorët ... janë shumë të gjerë, fluidë dhe kalimet pothuaj të pandjeshme. Për mua horizonti fizik u zgjerua e thellua, dhe u kthjellua kuptimi e të ndjerët e fizikës, pozicioni fundamental i saj në mozaikun e madh të shkencave, që kërkojnë në Njohjen e Gjithësisë.

E.ÇAÇI

*Puna eksperimentale e këtij disertacioni është kryer gjatë viteve 2015 – 2016 në mjediset e laboratorit e Katedra e Biofizikës dhe Radiobiologjisë, Fakulteti i Biologjisë, Universiteti "St. Kliment Ohridski" Sofie, nën mbikqyrjen e **Prof. Dr. Vasilii N. Goltsev**, i cili përkrahu idenë, konsultoi dhe mbështeti procesin.*

DEKLARATË ORIGINALITETI

Deklaroj, se disertacioni me temë “ *Fotosinteza dhe fluoreshenca klorofile a – baza teorike dhe aplikime praktike ne studimin e bimeve*”, paraqitur në lidhje me procedurë për kërkimin e gradës shkencore "Doktor" në Universitetin Politeknik të Tiranës është puna ime dhe në zhvillimin e saj nuk janë përdorur publikime dhe vepra të huaja në kundërshtim me të drejtat e tyre të autorit.

Citimet e gjithë burimeve të informacionit, tekst, ilustrime, tabela, imazhe e të tjera janë shënuar sipas standardeve.

Rezultatet dhe kontributet e studimit disertacional të kryer janë origjinale dhe nuk janë huazuar nga studimet dhe botimet, në të cilat unë nuk kam marrë pjesë.

KONTRIBUTE TË AUTORIT

Konceptoi dhe hartoi drejtimin e punës kërkuese - biofizika e fotosintezës. Përzgjodhi akcentet e teoritë fizike esenciale për kuptimin e procesit të fotosintezës. Konceptoi dhe hartoi eksperimentet, kreu eksperimentet; analizoi të dhënat dhe shkroi këtë punimin.

E. ÇAÇI

PËRMBAJTJE

Deklaratë origjinaliteti	V
Përmbajtje	VI
Përmbledhje	X
Abstract	XII
Aktualiteti i temës dhe motivimi	XIV
Qëllime dhe detyra të punës së disertacionit	XVI
Listë e figurave	XVII
Listë e tabelave	XXI
Terma të përdorur, shkurtime dhe konvencione	XXII
 PJESA I: BAZA TEORIKE	1
KREU 1: VËSHTRIM MBI FOTOSINTEZËN	1
1.1 PARIMET THEMELORE TË RUAJTJES SË ENERGJISË FOTOSINTETIKE	1.
1.1.1 Çfarë është fotosinteza	1
1.1.2 Fotosinteza është një proces i ruajtjes të energjisë diellore	2
1.1.3 Ku realizohet fotosinteza	3
1.1.4 Katër fazat e ruajtjes së energjisë në fotosintezë	4
1.2 ORGANIZMAT FOTOSINTETIKE	8
1.3 FOTOSINTEZA.....	10
1.3.1 Karakteristika të përgjithshme të fotosintezës	10
1.3.2 Struktura dhe komponentët e aparatit fotosintetik	11
1.3.2.1 Kompleksi antenë i fotosistem 2	13
1.3.2.2 Pigmente fotosintetike në bimë të larta	14
1.3.2.3 Photosystemi 2	15
1.3.2.4. Kompleksi citokrom	16
1.3.2.5. Photosystemi 1	16
1.3.2.6 ATP synthase	17
1.3.3 Proceset e fazës së ndritshme të fotosintezës	18
1.3.3.1 Përthithja e rrezatimit fotosintetik aktiv	18
1.3.3.2 Transporti elektronik dhe photophosphorylation jo-ciklike	18
1.3.3.3. Transporti elektronik ciklik dhe photophosphorylation ciklike	22
1.3.3.4. Transporti elektronik pseudo-ciklik dhe fotofosforilimi pseudo-ciklik	23
1.4 Përfundime	24
 KREU 2: FENOMENE, KONCEPTE DHE TEORI BIOFIZIKE	25
2.1 HISTORIA DHE ZHVILLIMI I HERSHËM I FOTOSINTEZËS	25
2.1.1 Hyrje	25
2.1.2 Ekuacioni i fotosintezës	25
2.1.3 Ide të hershme mekaniciste të fotosintezës	26
2.1.4 Eksperimentet Emerson dhe Arnold	27
2.1.5 Polemika mbi kërkesën kuantike të fotosintezës	28
2.1.6 Rënia e kuqe dhe efekti Emerson i forcimit.....	30
2.1.7 Efektet antagoniste	31
2.1.8 Formulime të hershme të Z skemës për fotosintezën	32
2.1.9 Formimi i ATP dhe fiksimi i karbonit	33

2.2 MEKANIZMA TË TRANSFERIMIT TË ELEKTRONEVE NË BIOSTRUKTURA ...	35
Përmbledhje	35
2.2.1 Hyrje	35
2.2.2 Transporti në një sistem me dy nivele	38
2.2.3 Efekti tunel	40
2.2.4 Tranzicioni në një sistem me dy nivele në prani të proceseve dissipative	42
2.2.5 Bashkëveprimet elektron-vibracionale në molekula	43
2.2.6 Rasti i lidhjes së fortë dhe të dobët elektron-vibrational	48
2.2.7 Përfundime	51
2.3 MEKANIZMI FIZIK PËR TRANSFERIMIN E ENERGJISË NË ANTENA FOTOSINTETIKE – teoria Forster	53
Përmbledhje	53
2.3.1 Hyrje	53
2.3.2 Diskutim	54
2.3.3 Lidhje Exciton	56
2.3.4 Marrëdhënia e transferimit Forster me lidhjen exciton	57
2.3.4 Modele kapje – lidhje e antenave në një qendër reaksioni	57
2.3.5 Përfundime	59
2.4 TEORIA E FLUKSEVE TË ENERGJISË NË BIOMEMBRANA NË ANALIZA E TRANSFERIMEVE TË FLUORESHENCËS KLOOROFIL A – sipas Strasser.....	60
Përmbledhje	60
2.4.1 Hyrje	60
2.4.2 Sfondi teorik	61
A Teoria e flukseve të energjisë në biomembranat, bazat	61
B Flukse energjie në njësinë fotosintetike	64
1 Influkset e energjisë kur gjithë qendrat e reaksionit janë të hapura ose të mbyllura	64
2 Influkset e energjisë për çdo fraksion të qendrave të reaksionit të hapur ose të mbyllur....	68
C Nga parametrat biofizikë në eksperimentale	69
1 Sinjale fluoreshence	70
2 Eksperimenti kundrejt zgjidhjes teorike	71
3 Rendimente dhe probabilitete.....	72
4 Rendimenti kuantik i fotokimisë fillestare	72
2.4.3 Tranzitime polifazike fluoreshente in vivo	73
2.4.4 Përfundime	74
PJESA II: APLIKIME PRAKTIKE NË STUDIMIN E BIMËVE – METODA E FLUORESHENCËS KLOOROFIL A	76
KREU 3: METODA E FLUORESHENCËS KLOOROFIL A NË STUDIMIN E APARATIT FOTOSINTETIK NË BIMË	76
3.1. FLUORESHENCA KLOOROFIL A	76
3.1.1 Fluoreshenca klorofila a si indikator i funksionit të PhS 2	77
3.1.2 Kurba e induksionit e fluoreshencës klorofila a	79
3.1.3 Parametrat e fluoreshencës klorofila a, madhësitë e tyre dhe kuptimi fiziologjik.....	81
Përfundime	86
3.2. JIP (OJIP) TEST	87
3.2.1. Ide të përgjithshme mbi testin	87
3.2.2. Parametrat e përdorur në Jip (OJIP) test	89

3.2.3. Të dhënat e përftuara nga matjet e drejtpërdrejta të fluoreshencës	89
3.2.4. Parametrat fluoreshencës, llogaritur nga të dhënat e matura	90
3.2.5. Flukse specifike energjie nëpër qendrën e reaksionit QA-reduktues të PhS 2	91
3.2.6. Rendimente kuantike, apo raporte fluksesh	92
3.2.7. Flukse energjie fenomenologjike, në njësi të sipërfaqes së objektit fotosintetik	93
3.2.8. Indeksi i prodhueshmërisë në $t = 0$ e densiteti i qendrave aktive të reaks. të PhS 2	93
3.2.9. Forcat lëvizëse (indeksi logaritmik i prodhueshmërisë PI në $t=0$)	94
3.2.10. Probabiliteti i përgjithshëm i qendrave të grupuara të reaksionit	94
3.2.11. Tregues të strukturës dhe funksionit	95
Përfundime	96
 3.3. FLUORESHENCA E VONUAR NË ORGANIZMAT FOTOSINTEZUES	97
3.3.1. Ide të përgjithshme mbi fluoreshencën e vonuar	97
3.3.1.1. Mekanizmi i gjenerimit të fluoreshencës së vonuar	97
3.3.1.2. Kinetika e shuarjes e fluoreshencës së vonuar	100
3.3.1.3. Kinetika e induksionit e fluoreshencës së vonuar	101
3.3.2. Analiza e lidhjes midis fluoreshencës së vonuar dhe të shpejtë të klorofilit a	103
Përfundime	104
 3.4. MATJE E SHPËRNDARJES SË DRITËS ME GJATËSI VALE 820 nm	106
3.4.1 Ide të përgjithshme mbi MR820	106
3.4.2 Kurba e induksionit e sinjalit MR820 ...	106
Përfundime	108
 KREU 4: APLIKIME PRAKTIKE NË STUDIMIN E BIMËVE	110
4.1 MATERIALI DHE TEKNIKA E REGJISTRIMIT TE SINJALIT	110
4.1.1. Materiali bimor.....	110
4.1.1.1 Matoda analitike dhe teknika bashkëkohore për monitorimin e bimëve	111
4.1.2 Metodat e matjes të fluoreshences klorofile	112
4.1.2.1 Regjistrimi i drejtpërdrejtë i fluoreshencës klorofile	113
4.1.2.2 Fluoreshenca klorofile a e modular	114
4.1.2.3 Matja e fluoreshencës klorofile a	117
4.1.2.4 Matjet e njëkohshme të fotosintezës dhe intensitetit të fluoreshencës klorofile a.....	118
4.1.2.5 Avantazhet dhe disavantazhet e metodave fluorimetrike	118
4.1.3 Metoda për regjistrimin e fluoreshencës së vonuar	119
4.1.4 Metoda për regjistrimin e shpërndarjes së dritës me gjatësi vale 820 nm	121
4.1.5 m-PEA, instrument shumë – sinjalesh	121
4.1.6 Regjistrimi i fluoreshencës klorofile të shpejtë dhe të vonuar dhe shpërndarja ne 820 nm. Përpunimi i të dhënave	122
4.1.7 Zhvillimi i eksperimenteve / Protokolle	125
 4.2 EFEKTI I TEMPERATURËS NË BIMËT E ULLIRIT STUDJUAR ME MATJET E NJËKOHSHME TË KINETIKAVE TË FLUORESHENCËS SË SHPEJTË, TË VONUAR DHE REFLEKTIMIT TË MODULUAR NË 820 nm.....	132
4.2.1 Hyrje	132
4.2.2 Materiali dhe metoda	133
4.2.3 Rezultate dhe diskutim	135
4.2.4 Përfundime	145

4.3. NDIKIMI I INTENSITETIT TË DRITËS AKTINIKE GJATË INDUKSIONIT MBI PhSA NË GJETHE ULLIRI	147
4.3.1.Hyrje	147
4.3.2.Materiali, metoda dhe protokolle	148
4.3.3 Rezultate dhe diskutime	150
4.3.4 Përfundime	158
4.4. Efekti i kohës së inkubacionit në 40°C mbi PhSA në gjethe ulliri	160
 KREU 5: SHENIME PERMBYLLESE	163
5.1 Përfundime, Perspektiva	163
5.2 Kontribute, Rekomandime	169
 LISTA E PUBLIKIMEVE TË LIDHURA ME TEMËN E DISERTACIONIT	172
 LITERATURË E PËRDORUR	174

PËRMBLEDHJE

Ky punim është një hyrje në konceptet themelore që rrinë përfund procesit të fotosintezës, si dhe një përshkrim i të kuptuarit aktual e perspektivës së çështjes. Punimi lejon një kuptim të gjerë të fotosintezës, duke përfshirë bashkë të dhëna eksperimentale, si dhe trajtim teorik të proceseve të ndryshme të fotosintezës - koncepte dhe teori bazë nga spektri shkencor. Ilustrohet gjëndja bashkëkohore në hulumtimin e çështjeve të fotosintezës në nivele të ndryshme të organizimit të materies: molekulare, qelizore dhe organizmi.

Vështrimi teorik është një studim cilësor i proceseve dinamike në fiziologjinë e fotosintezës. Në këtë paraqitje të koncepteve kryesore, ne kombinojmë bashkë pamjen globale me detajin. Fotosinteza është një proces biologjik, i cili është sa kompleks aq edhe fundamental, ajo është ndoshta shembulli më i mirë i mundshëm i një fushe shkencore që në thelb është ndërdisiplinore. Në punim trajtohen konceptet kryesore biofizike dhe karakteristikat e përgjithshme të fotosintezës. Fushëpamja plotësohet nga teori më të thelluara e zgjeruara nga shkenca e fizikës (nga termodinamika, kinetika dhe mekanika kuantike) dhe biofizikës, si teoria mbi mekanizmat e transferimit të elektronit në biostruktura – trajtim i analizës teorike të reaksioneve të transferimit të elektronit në biostruktura. Këto reaksione janë me rëndësi të pazëvendësueshme për shumë transformime biologjike - nga fotosinteza te frymëmarrja aerobe. Ne interesohemi për mënyrën, në të cilën gjatë tranzitimit elektronik- përfshi transferimin e elektroneve ose migrimin e energjisë së rritur elektronike, ndodh ndërveprimi me gradët e lirisë vibracionale. Ky paraqitet si mjet për adresimin e mekanizmit të ndërveprimeve elektron-konformacionit, ku bazohet funksionimi i biomakromolekulave. Përshkrimi i fluoreshencës klorofile, të zgjedhur si metodë studimi në këtë punim, kërkon përfaqesim të saktë të fazave të transportit të elektroneve në procesin e fotosintezës. Mekanizmi fizik për transferimin e energjisë së antenave fotosintetike – teoria Forster bashkë me këndveshtrimin exciton janë thelbësore për të kuptuar kompleksin e antenave fotosintetike. Teoria e flukseve të energjisë në biomembrana në analiza e transitimit të fluoreshencës klorofile a – sipas Strasser, jep lidhjen mes biofizikës së sistemit dhe sinjalit të fluoreshencës. Përshkruhen bashkëveprimet pigment-proteina dhe proceset femtosekondë të ndarjes së ngarkesës në qendrat e reaksionit, aktiviteti funksional i këtyre qendrave të reaksionit dhe mekanizmat e transferimit transmembranor të ngarkesës, mekanizmat fotombrojtës (photoprotective) të shpërndarjes së energjisë (energy dissipation) nga aparati fotosintetik.

Fotosinteza është një proces shumë efikas fotokimik. Megjithatë, bimët emetojnë si kuantë drite pjesë nga energjia e absorbuar. Emisioni i dritës nga bimët është disa llojesh, ndër të cilat fluoreshenca klorofile a, e cila, megjithëse përfaqëson një pjesë shumë të vogël të energjisë së shpërndarë nga aparati fotosintetik, është jashtëzakonisht informative në njohjen e strukturës dhe funksionimit të aparatit fotosintetik. Matja dhe analiza e fluoreshencës është një nga metodat më të fuqishme për studimin e sistemeve fotosintetike, është një metodë e lehtë matje, jo-invasive dhe e shpejtë (në varësi të synimeve të eksperimentit matjet zgjatën nga disa sekonda në disa minuta). Shumë nga parametrat e matur dhe të llogaritur janë biomarkera të mirë ose tregues të tolerancës së bimëve ndaj stresorëve të ndryshëm abiotikë dhe biotikë.

Shumë teknika eksperimentale janë në dispozicion sot për vrojtimin e sjelljes energjetike të një sistemi fotosintetik. Në punën tone ne kemi zgjedhur m-PEA (multifunctional Plant Efficiency Analyzer) developed by Hansatech Instruments Ltd (Kings Lynn, UK). Analizatori bën regjistrimin e njëkohshëm të karakteristikave kinetike të emisionit të fluoreshencës klorofile të shpejtë, fluoreshencës klorofile të vonuar dhe reflektimin e moduluar të dritës në 820 nm.

Ne kemi aplikuar matjen dhe analizën e parametrave të fluoreshencës klorofile a për ekzaminimin (screening) e vlerësimit të gjendjes fiziologjike, dhe përcaktimin e efikasitetit të aparatit fotosintetik në bimën e ullirit. Kemi aplikuar metodën për studimin e reagimeve të aparatit fotosintetik nën stres dhe për vlerësim të ndikimit të faktorëve të mjedisit, konkretisht: - ndjekje të efektit të temperaturave të larta dhe të ulëta mbi aparatin fotosintetik të gjetheve të bimës së ullirit; - ndjekje të influencës së intensitetit të dritës aktinike gjatë kohës së induksionit mbi aparatin fotosintetik të gjetheve të bimës së ullirit; të dy faktorët ekologjikë janë aplikuar më vete dhe të kombinuar. Përparësia e punës me shumë parametra është mundësi për një vlerësim kompleks të proceseve në studim.

Bimët, si sistem termodinamik i hapur, ekzistojnë në kushtet e një mjedisi që ndryshon vazhdimisht. Gjatë ditës temperaturat e mjedisit dhe cilësia e sasia e rrezatimit aktiv fotosintetik ndryshojnë shumë, dhe bimët përpiqen të gjejnë ekuilibrin midis energjisë së rrezatimit të absorbuar dhe aparatit fotosintetik. Forca e influencës së jashtme përcakton në masë të madhe dhe efektin përfundimtar mbi organizmin bimore. Influenca të forta të faktorëve biotik dhe abiotik të mjedisit janë të aftë të shkaktojnë ndryshime sinjifikative në strukturë dhe fiziologji ose dëmtime të bimëve. Ndërkaq faktorët me intensitet të ulët modifikojnë karakteristikat funksionale variabël të qelizës bimore, duke siguruar efikasitet maksimal të proceseve që rrjedhin në orgnizma.

Temperaturat në diapazonin nga 0 deri në 50 °C janë të zakonshme për vegjetimin e kulturave bimore në Shqipëri, dhe bima e ullirit është e aftë të rezistojë ndikimeve afatshkurtëra. Ndryshim i menjëhershëm në temperaturë shkakton reagim të komplikuar në PhSA të bimëve, me synim adaptimin e qelizave të bimëve ndaj kushteve të reja të funksionimit.

Rritja dhe kultivimi i bimëve në dritë të fortë ndihmon bimën e ullirit të përshtatet me tepriçë energji dritore dhe të zhvillojnë mekanizma të ndryshëm aklimatizimi për përshtatje, që shërbejnë kryesisht për mbrojtjen e aparatit fotosintetik. Në kushtet e intensitetit të ulët të dritës pjesa më e madhe e energjisë dritore të përthithur mund të përdoret në procesin e fotosintezës, në sajë të efektivitetit të lartë të aparatit fotosintetik. Rezulton se reaksionet e varura nga drita janë më efektive gjatë ndriçimit $300 \mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, intensitet ky që bie brenda normave ekologjike të kultivimit të bimës së ullirit.

Fjalëkyçe: photosynthesis, fluorescence, chlorophyll, photosystem, electron transfer reaction, dissipative processes, biostructures, prompt fluorescence, delayed fluorescence, modulated 820 nm reflection.

ABSTRACT

This thesis is an introduction to the basic concept of the processes of photosynthesis, as well as a description of the present understanding of its perspective. The thesis allows a large understanding of photosynthesis, including experimental data as well as theoretical treatment of the different processes of photosynthesis – concepts and basic theories from scientific spectra. The nowadays present status of is illustrated in different levels of the organization of the matter: molecular, cellular and organism.

The theoretical observation is a qualitative study of dynamic processes in physiological of photosynthesis. In presenting we combine both the global point of view and the detail. The photosynthesis is a biological process, which being as complex as basic, it is probably the best possible example of a scientific field which in its nature is multidisciplinary. In the thesis are treated the basic biophysical concepts and the general characteristics of photosynthesis. The visual field is completed by more fundamental theories of the physics' field (thermodynamics, kinetics, quantum mechanics) and the biophysics, as well as the theory transferring of electrons mechanism in biostructures - presentation of theoretical analysis of electron transfer reactions in biostructures is here introduced. This reactions are of irreplaceable importance for many biological transformations—from photosynthesis to aerobic respiration. Here, the mechanisms of electronic transition, including the electron transfer or the migration of electron bulging energy is of great interest as the interaction with vibrational degrees of freedom occurs. It is a means to address the mechanism of electron-conformational interactions underlying the functioning of biomacromolecules. The description of chlorophyll fluorescence, chosen as a study method, requires exact/ precise representation of the fazave of the transport of electron in the process of photosynthesis. The Foster energy transfer physics mechanism in photosynthetic antenna both with the exciton views are essential to understand photosynthetic antenna complex. The theory of biomembrane energy fluxes in chlorophyll fluorescence transit analysis a - according to Strasser, provides the link between system biophysics and fluorescence signal. There are pigment-proteines interactions and femtosecond charge-sharing processes in reaction centers, the functional activity of these reaction centers, and transmembrane charge transfer mechanisms, the photoprotective mechanisms of energy dissipation by the photosynthetic apparatus.

Photosynthesis is a very efficient photochemical process. However, plants emit light quantities of part of the absorbed energy. Light emission from plants is of several types, including chlorophyll fluorescence a, which, although representing a very small fraction of the energy dissipated by the photosynthetic apparatus, is extremely informative in recognizing the structure and function of the photosynthetic apparatus. Fluorescence measurement and analysis is one of the most powerful methods for studying photosynthetic systems, it is an easy measurement method, non-invasive and fast (depending on the aims of the experiment the measurements last from a few seconds to a few minutes). Many of the measured and calculated parameters are good biomarkers or indicators of plant tolerance to various abiotic and biotic stressors.

Many experimental techniques are available today for observing the energy behavior of a photosynthetic system. In our work we have selected m-PEA (multifunctional Plant Efficiency Analyzer) developed by Hansatech Instruments Ltd (Kings Lynn, UK). The

analyzer simultaneously records the kinetic characteristics of fast chlorophyll fluorescence emission, delayed chlorophyll fluorescence, and modulated light reflection at 820 nm.

We have applied the measurement and analysis of chlorophyll a fluorescence parameters for examination (screening) and evaluation of the physiological state, and determining the efficiency of the photosynthetic apparatus in the olive plant. We have applied the method for studying photosynthetic apparatus reactions under stress and for assessing the influence of environmental factors, positively: - monitoring the effect of high and low temperatures on the photosynthetic apparatus of olive plant leaves; - tracking the influence of actinic light intensity during induction on the photosynthetic apparatus of olive plant leaves; the two ecological factors have been applied separately and combined. The advantage of multi-parameter work is the opportunity for a complex evaluation of the processes under study.

The plants, as an open thermodynamic system, exist in the conditions of an environment that changes continuously. During the day the temperatures and the quality and quantity of the active photosynthetic emission change a lot, and the plant and the plants strive to find the balance between the energy of emission and the energy of absorption and the PhSA. The force of the outside influence defines in the highest degree the final effect in the plant. Strong influences of the biotic and abiotic factors of environment are capable to destruct significant differences of the structure and physiology of the plants. Meanwhile the factors of low intensity modulate the functional characteristics of the plants' cells, while reassuring a maximal efficiency of the processes in the organism.

The temperature between 0-50 °C are extraordinary for the plants in Albania, and the olive plant is capable to resist the short-term impacts. An acute change in the temperatures causes a complicated reaction in the PhSA of the plants in order to adapt the cells of the plants towards the new conditions of functioning.

Growth and cultivation of plants in strong light helps the olive plant to adapt to excess light energy and develop various acclimatization mechanisms for adaptation, which serve primarily to protect the photosynthetic apparatus. At low light intensity most of the light energy absorbed can be used in the process of photosynthesis, thanks to the high effectiveness of the photosynthetic apparatus. It turns out that light-dependent reactions are most effective during $300 \mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ illumination, an intensity that falls within the ecological norms of olive plant cultivation.

Keywords: photosynthesis, fluorescence, chlorophyll, photosystem, electron transfer reaction, dissipative processes, biostructures, prompt fluorescence, delayed fluorescence, modulated 820 nm reflection.

AKTUALITETI I TEMËS DHE MOTIVIMI

Frederic Joliot – Curie, thënia e tij e çuditshme: *“Megjithëse besoj në të ardhmen e energjisë atomike dhe i bindur në rëndësinë e këtij zbulimi, por besoj, që revolucion i vërtetë në energjetikë do të vijë vetëm atëhere, kur ne të realizojmë sintezë masive molekulare, analogjike me klorofilin”*.

Fotosinteza paraqet interes si nga pikpamja aplikative ashtu edhe nga ajo shkencore e pastër. Motivimi për studimin teorik dhe eksperimental të fotosintezës janë podemi në biologji vitet e fundit, “Biologjia – shkenca e shekullit XXI”, e, duke qenë se fotosinteza është padyshim procesi më i rëndësishëm biologjik në Tokë, natyrshëm tërheq vemendjen e shkencëtarëve.

Tradicionalisht fotosinteza trajtohet nga biologë e kimistë, e pak nga fizikanë e matematicienë. Specifika e punimit “Fotosinteza dhe Fluoreshenca Klorofile a – Baza Teorike dhe Aplikime Praktike në Studimin e Bimëve” është, se ai paraqet vështrim të fizikanit për një proces fundamental biologjik

Pse studjojmë fotosintezën

Për shkak se cilësia e jetës sonë, dhe në të vërtetë ekzistenca jonë, varet nga fotosinteza, është thelbësore që ta kuptojmë atë. Përmes të kuptuarit, ne mund të shmangim ndikimet e pafavorshme mbi procesin dhe precipitimin e katastrofave mjedisore ose ekologjike; gjithashtu mund të mësohemi të kontrollojmë fotosintezën, duke rritur kështu prodhimin e ushqimit, fibrave dhe energjisë, të përdorim kiminë dhe fizikën e fotosintezës për qëllime të tjera, siç është shndërimi i energjisë diellore, projektimi i qarqeve elektronike dhe zhvillimi i mjekësisë dhe medikamenteve.

Fotosinteza dhe bujqësia: Kërkimet synojnë plotësimin e kërkesave gjithnjë në rritje të njeriut për ushqim dhe produkte të tjera bujqësore. Hulumtimi i fotosintezës mund të na tregojë se si të prodhojmë lloje të reja të kulturave që do të përdorin më mirë dritën e diellit të absorbuar. Nëse mund t'i kuptojmë plotësisht proceset, bimë më efikase mund të dizajnohen. Megjithëse varietetet e reja të bimëve janë zhvilluar për shekuj me anë të shtimit selektiv, teknikat e biologjisë moderne molekulare e kanë përshpejtuar procesin në mënyrë të jashtëzakonshme.

Fotosinteza dhe prodhimi i energjisë: Shumica e nevojave të tanishme për energji plotësohen nga fotosinteza, e lashtë ose moderne. Rritja e efikasitetit të fotosintezës natyrore mund të rrisë prodhimin e etanolit dhe karburanteve të tjera që derivojnë nga bujqësia. Sidoqoftë, njohuritë e fituara nga kërkimet e fotosintezës mund të përdoren gjithashtu për të rritur prodhimin e energjisë në një mënyrë shumë më të drejtpërdrejtë. Edhe pse procesi i përgjithshëm i fotosintezës është relativisht "joefikas" hapat e hershëm të konvertimit të dritës diellore në energji kimike janë mjaft efikase. “Le të kuptojmë kiminë dhe fizikën e fotosintezës dhe të përdorim të njëjtat këto parime për të ndërtuar pajisje për mbledhjen e energjisë diellore” - Kjo ka qenë një ëndërr e kimistëve për vite, por tani është afër të bëhet realitet. Në laborator, shkencëtarët tani mund të sintetizojnë qendra reaksioni fotosintetike artificiale, të cilat rivalizojnë ato natyrore në aspektin e sasisë së dritës diellore të ruajtur si energji kimike apo elektrike. Më shumë kërkime do të çojnë në zhvillimin e teknologjive të reja, efikase të mbledhjes së energjisë diellore, bazuar në procesin natyror.

Roli i fotosintezës në kontrollin e mjedisit: Se si fotosinteza ndikon në pyjet e brezit të mesëm dhe tropikale dhe në det, në sasinë e gazeve të efektit serë, kjo është një çështje e rëndësishme dhe e diskutueshme sot. Siç dihet, fotosinteza e bimëve heq dioksidin e karbonit nga atmosfera dhe e zëvendëson me oksigjen. Kështu, do të kishte tendencë për të përmirësuar efektet e dioksidit të karbonit, të dale nga djegja e lëndëve djegëse fosile. Megjithatë, çështja komplikohet nga fakti se vet bimët reagojnë ndaj sasisë së dioksidit të karbonit në atmosferë. Kuptimi i efektit të gazeve serë kërkon një njohje shumë më të mirë të bashkëveprimit të bimëve me dioksidin e karbonit nga sa kemi sot. Qendrat artificiale të reaksionit fotosintetik, prodhojnë energji pa lëshuar ndonjë nënprodukt tjetër, përveç nxehtësisë. Ato i qëndrojnë idesë për prodhimin e energjisë së pastër në formën e energjisë elektrike ose karburantit të hidrogjenit pa ndotje. Implementimi i pajisjeve të tilla të mbledhjes së energjisë diellore do të parandalonte ndotjen në burim, gjë që sigurisht është qasja më e efektshme për kontroll.

Fotosinteza dhe elektronika: Qëllimi i hulumtimeve moderne në elektronikë është të bëjnë tranzistorë dhe komponente të tjerë të qarkut aq të vogla sa të jetë e mundur. Shumë hulumtues sot po hetojnë mundësinë për të bërë komponente elektronike nga një molekulë e vetme ose nga grupe të vogla molekulash. Një tjetër fushë shumë aktive e hulumtimit janë kompjuterat që përdorin dritë, në vend të elektroneve, si medium për bartjen e informacionit. Në parim, kompjuterët me bazë drite kanë disa avantazhe mbi dizajnet tradicionale, dhe vërtet shumë nga rrjetet tona të transmetimit tashmë veprojnë nëpërmjet fibrave optike. Çfarë lidhet kjo me fotosintezën? Rezulton se qendrat e reaksionit fotosintetik janë çelësa fotokimike natyral të dimensioneve molekulare. Duke kuptuar se si bimët absorbojnë dritën, kontrollojnë lëvizjen e energjisë së grumbulluar në qendrat e reaksionit dhe konvertojnë energjinë e dritës në elektrike e në fund kimike, mund të kuptojmë se si të bëjmë kompjutera në shkallë molekulare. Në fakt, në literaturën shkencore janë raportuar tashmë disa elemente të logjikës molekulare elektronike të bazuara në qendrat artificiale të reaksionit fotosintetik.

Fotosinteza dhe mjekësia: Drita ka një përmbajtje shumë të lartë energjie dhe kur absorbohet nga një substancë kjo energji transformohet në formë të tjera. Kur energjia përfundon në vendin e gabuar, mund të shkaktojë dëme serioze në organizmat e gjallë. Ndërkaq, bimët dhe llojet e tjera fotosintetike kanë zhvilluar mekanizma fotoprotektive për të kufizuar dëmtimin nga drita. Studimi i shkaqeve të dëmtimit të indeve, të shkaktuara nga drita dhe detajet e mekanizmave natyrorë të fotoprotektimit mund të ndihmojnë të gjejmë mënyra për të përshtatur këto procese në të mire të njerëzimit. Përshembull, mekanizmi me të cilin drita diellore, e absorbuar nga klorofile fotosintetike, shkakton dëme të indeve në bimë, është shfrytëzuar për qëllime mjekësore, diagnostike.

Shembujt e mësipërm ilustrojnë rëndësinë e fotosintezës si një proces natyror dhe ndikimin që ajo ka në të gjithë jetën tonë. Hulumtimi në natyrën e fotosintezës është vendimtar, sepse vetëm duke kuptuar fotosintezën mund ta kontrollojmë atë dhe të shfrytëzojmë parimet e saj në dobi të njerëzimit. Shkenca ka zhvilluar vetëm kohët e fundit mjetet bazë dhe teknikat e nevojshme për të investiguar detajet e komplikuar të fotosintezës. Tani është koha për t'i zbatuar këto mjete dhe teknika dhe për të vjelë përfitimet e këtij hulumtimi.

QËLLIME DHE DETYRA TË PUNËS SË DISERTACIONIT

Fotosinteza është procesi biologjik më i rëndësishëm, i cili siguron themelin për thelbin e gjithë jetës dhe ka mbi kohën gjeologjike ndryshime të thella të vet Tokës. Ai siguron gjithë ushqimin tonë dhe shumicën e burimeve tona energjetike.

Në kushte reale produktiviteti i kulturave bujqësore përcaktohet kryesisht nga aftësia e organizmit të pershtatet në kushte të pafavorshme të mjedisit. Nëse njihet gjendja e përgjithshme fiziologjike e bimëve mund të merren masat përkatëse dhe të neutralizohet ose të reduktohet impakti negativ. Kështu, në mirërritjen e kulturave ka vlerë praktike mbajtja nën kontroll e stresit, gjë që lehtësohet nga vlerësimi në kohë i gjendjes fiziologjike të organizmave, përpara shfaqjes së shenjave morfologjike.

Qëllimi i kësaj pune disertacioni është:

- studimi i koncepteve dhe teorive bazë biofizike që rrinë përfund procesit të fotosintezës, përshkrimi i të kuptuarit aktual e perspektivës së çështjes,
- paraqitja dhe aplikimi i metodave fluoreshente për studimin dhe vlerësimin e gjendjes fiziologjike në aparatin fotosintetik.

.

Për arritjen e qëllimit janë **definuar detyrat** e mëposhtme:

1. Studimi e interpretimi i Mekanizmave fizikë të proceseve të transformimit të energjisë së elektroneve në biostrukturat. Reaksionet e transferimit të elektroneve janë të një rëndësie të veçantë për shumë transformime biologjike - nga fotosinteza në frymëmarrjen aerobe. Materiali përdor bazë të gjerë fizike me aplikime të fizikës kuantike në makromolekula.
2. Analizë dhe ballafaqim Teoria Forster për mekanizmin fizik të migrimit të energjisë në antena fotosintetike.
3. Analizë e Teoria e flukseve të energjise ne biomembrana në analiza e transferimeve të fluoreshencës klorofile a– sipas Strasser. Kjo është një teori – metodologji, që bën lidhjen mes sinjalit të fluoreshencës dhe biofizikës së sistemit.
4. Të aplikohet fluoreshenca klorofile a si metodë për vlerësimin e gjendjes së përgjithshme bioenergjetike të bimëve. Përdorimi i aparatit m-PEA, i cili mbi një objekt mund të vëzhgojë njëkohesisht disa karakteristika lumineshente dhe optike.
6. Ndjekja e ndikimit të intensitetit të drites aktinike gjatë induksionit mbi PhSA në gjethe të ullirit.
7. Vlerësimi i influencës së temperaturave të larta e të ulta mbi PhSA në gjethe ulliri.
8. Efekti i kohës së inkubacionit në 40°C mbi PhSA në gjethe ulliri

LISTË E FIGURAVE

Fig. 1.1.1: Spektrat e rrezatimit diellor dhe spektra absorbues të organizmave fotosintetike (Robert E.Blankenship)	3
Fig. 1.1.2 Skemë e përgjithshme e transferimit të elektroneve në qendrat e reaksionit fotosintetik (Robert E.Blankenship)	6
Fig. 1.3.1 Dy faza të fotosintezës dhe bashkeveprimi i tyre në kornizë të kloroplastit (Modifikuar nga http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/psoverview.gif)	10
Fig. 1.3.2 Ndertimi i kloroplasteve të bimëve të larta (modifikuar http://www.plantandsoil.unl.edu)	12
Fig. 1.3.3 Skema e shpërndarjes johomogjene të komplekseve të proteinave në membranën tilakoide (modifikuar nga Steffen, 2003)	13
Fig. 1.3.4 Skema e thjeshtuar e absorbimit dhe transferimit të energjisë në antenë që i përket PhS 2 dhe transferimi i elektroneve në qendrën e reaksionit (modifikuar nga Szweykowska, 1997)	14
Fig. 1.3.5 Spectra të absorbimit të pigmenteve fotosintetike në zonën e dukshme (modifikuar Szweykowska,1997)	15
Fig. 1.3.6 Struktura e fotosistemit 2 (PhS 2) (modifikuar nga Steffen, 2003)	16
Fig. 1.3.7 Struktura e formës së oksiduar dhe të reduktuar e plastoquinone (http://en.wikipedia.org/wiki/Plastoquinone , 2008)	16
Fig. 1.3.8 Ndërtimi i PhS 1 (modifikuar nga http://www.absoluteastronomy.com/topics/Photosystem)	17
Fig. 1.3.9 Instrumenti ATP-sintazë (modifikuar sipas Boyer, 1997)	17
Fig. 1.3.10 Ilustrim skematik i oksidimit të kompleksit mangan në procesin e fotosintetik të oksidimit të ujit (ndryshimi i gjendjes S nga oksidimi i kompleksit mangan, çlirimi i H ⁺ dhe ndarja e O ₂) (Modifikuar http://en.wikipedia.org/wiki/Oxygen-evolving_complex)	20
Fig. 1.3.11 Z-skema përshkruan transportin fotosintetik të elektroneve (modifikuar sipas http://www.life.uiuc.edu/govindjee/textzsch.htm)	21
Fig. 1.3.12 Mënyrat e transformimit të energjisë, absorbuar nga rrezatimi fotosintetik aktiv (PAR) në kloroplaste (modifikuar: Qala and Loboda, 2010)	23
Fig. 2.1.1 Eksperimenti i Emerson, përshtatur Emerson dhe Arnold (1932a)	27
Fig. 2.1.2 Eksperimenti i Emerson dhe Arnold, përshtatur Emerson dhe Arnold (1932b)	28
Fig. 2.1.3 Spektri i absorbimit të kloroplasteve, spektri i veprimit për fotosintezën, rendimentin kuantik të fotosintezës (Emerson et al., 1957)	30
Fig. 2.1.4 Efekti i forcimit Emerson	31

Fig. 2.1.5 Efektet antagoniste në oksidimin e citokromit përshtatur Duysens et al.,	32
Fig. 2.1.6 Formulimi origjinal i Hill dhe Bendall i Z skemës për fotosintezën	33
Fig. 2.2.1 Depërtimi i një elektroni nën barrierë potenciale (Rubin, 2004)	40
Fig. 2.2.2 Tunelim elektroni nga gjendja fillestare në një nivel metastabël të gjendjes përfundimtare	43
Fig. 2.2.3 Bashkëveprime elektron - vibracionale në tunelimin elektronik (sipas Marcus)... ..	45
Fig.2.2.4 Sipërfaqet potenciale të gjendjeve fillestare dhe finale në rastin e lidhjes së dobët (I) dhe të fortë (II) elektron-vibracionale (Rubin 2004)	49
Fig.2.2.4a Mbivendosja e funksioneve valore bërthamore të gjendjeve fillestare dhe përfundimtare (Dutton 1992)	50
Fig. 2.3.1 Figurë skematike e faktorit të mbivendosjes J në teorinë e Förster	55
Fig. 2.3.2 Diagramë e nivelit të energjisë, spektra exciton të dy pigmenteve në orientime të ndryshme (nga Förster)	56
Fig. 2.4.1 Tranzitim tipik i fluoreshencës Chl a (kurba Kautsky)	61
Figure 2.4.2 Model tripjesesh i aparatit fotosintetik, me kompleksitet më të lartë, më të ulët (nga Butler dhe Strasser, 1977a; Strasser, 1986)	65
Fig. 2.4.3 Një rritje tipike polyphasic O-J-I-P e fluoreshencës Chl (nga Tsimilli-Michael et al., 2000)	74
Fig. 3.1.1 Mënyrat e përdorimit të energjisë së dritës së pranuar nga gjethet (modifikuar nga (Vidaver et al., 1991))	78
Fig. 3.1.2 Ndryshimi në nivelin e energjisë në molekulën e klorofilit gjatë absorbimit të dritës dhe kthimit në gjendjen fillestare (e modifikuar nga http://en.wikipedia.org/wiki/Image)	78
Fig. 3.1.3 Spektrat fluoreshent të klorofilit (me ndryshime sipas Krause dhe Weis, 1984) ...	79
Fig. 3.1.4 Forma tipike e kurbës së induksionit të fluoreshencës së klorofilit (nga Murkowski, 2002)	80
Fig. 3.2.1 Restaurim i akceptorit quinones në anën e PhS 2 në momente të ndryshme të induksionit (OJIP) (me modifikime nga Strasser et al. 2005)	88
Fig. 3.2.2 Kurba e induksionit të fluoreshencës variable në klorofil a, matur në ndriçim me dritë të kuqe me intensitet $3000 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gjatë 1 s. (me modifikime sipas Strasser et al. 2005)	89
Fig. 3.2.3 Flukse energjie në një qendër reaksioni dhe derivatet e tyre (me ndryshime sipas Strasser et al, 2005 ; Strasser et al, 2010)	91
Fig. 3.2.4 Diagrama merimangë tregon shmangien relative të JIP – parametrat e objektit në gjendje stresi (Hermans et al., 2001)	96
Fig. 3.3.1 Skemë e thjeshtuar e reaksioneve të fotoinduktura në RC të PhS 2, që çojnë në emetimin e fluoreshencës së shpejtë e të vonuar (nga V. N. Goltsev)	99

Fig. 3.3.2 Skema e energjetike e reaksioneve të oksido-reduktimit në RC të PhS 2, çon në formimin e gjendjeve rishtas të ngacmuara të P680 (nga V. N. Goltsev)	100
Fig. 3.3.3 Kinetika e shuarjes së DF (Lavorel, 1975; Goltsev et al, 2009b; Kalaji et al, 2012.)	101
Fig. 3.3.4 Kinetika microsec. tipike e induksionit e DF (sipas Goltsev et al.)	102
Fig.3.3.5 Ndikimi i intensitetit të dritës ngacmuese mbi formën e kinetikave microsec. të induksionit DF (modifikuar nga Kalaji et al., 2012)	103
Fig. 3.4.1 Tranzicionet induktive të PF, DF, MR820 të regjistruara njëkohësisht në gjethe të përshtatura në errësire me fluorimetër M-PEA- 2	107
Fig. 3.4.2 Dinamika e tranzicionit të fotoinducionit të fluoreshcencës relative variabile (Vt) dhe ndryshimi relativ në shpërndarjen e dritës me $\lambda = 820$ nm (MP820)	108
Fig. 4.1.1 Diagrama e kokës matëse të fluorometrit Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., UK)	113
Fig. 4.1.2 Skema përfaqëson sinjalet e dritës të regjistruara në detektor në regjime pune të ndryshme (Hansatech Instruments Ltd., UK)	115
Fig. 4.1.3 Paraqitje skematike e një eksperimenti tipik, për të përcaktuar efikasitetin e fotosntezezës, në matjen e fluoreshcencës së moduluar (modifikuar nga Murkowski, 2002) ..	116
Fig. 4.1.4 Kurba e induksionit të fluoreshcencës së shpejtë (F(t)) regjistruar nga aparati m-PEA në ndriçim 1s me dritë ngopëse (sipas Govindjee)	123
Fig. 4.1.5 Paraqitje grafike e regjistrimit të njëkohshëm të PF dhe DF me aparatën m-PEA	124
Fig 4.1.6: Vizualizim i IC të PF marrë nga Protokoll 1.	129
Fig 4.1.7: Vizualizim i IC e PF dhe MR820 marrë nga Protokoll 1.	129
Fig 4.1.8: DF të marra nga Protokoll 2. DF multi mode, matur në 4 intervale kohe	130
Fig 4.1.9: Vizualizim i IC të PF e marrë nga Protokoll 3. Koha totale e matjes 180 s.	130
Fig. 4.1.10: Vizualizim i kurbave të DF marrë nga Protokoll 3. Koha totale e matjes 180 s.	131
Fig. 4.2.1: Vizualizim nga m-PEA-data-analyzer V.5.5 i kinetikave të ndryshimeve të	136
Fig. 4.2.2: Efekti i temperaturës mbi fluoreshcencën klorofile në fidanë ulliri.....	138
Fig. 4.2.3: Efekt i temperaturës mbi MR820 në gjethe të ullirit. Kushtet	141
Fig. 4.2.4: Kurbat e induksionit të DF të regjistruara në intervalin 10-100 μ s pas.....	142
Fig.4.2.5: Vizualizim nga m-PEA-data-analyzer V.5.5 i kinetikave të DF në interval	143
Fig. 4.3.1: Paraqitje skematike formula dhe fjalor i termave të përdorur nga JIP-test	147
Fig.4.3.2: Visualizim me m-PEA-data-analyzer V.5. Paraqitet pamje e drejtpërdrejtë e IC e PF.....	149

Fig.4.3.3: Visualizim me m-PEA-data-analyzer V.5. Paraqitet pamje e drejtpërdrejtë e kurbave DF	150
Fig. 4.3.4: Efekti i intensitetit të dritës në PhSA në gjethe ulliri. Të përshtatura	151
Fig. 4.4.1 Dinamika e stresit të temperaturës në gjethe ulliri në 40°C. Periodat e inkubimit	160
Fig. 4.4.2 Dinamika e stresit të temperaturës në PhSA në gjethet e ullirit në 40 °C.	162
Fig. 5.1 Skema sqaron formimin e K-pik (band) si pasojë e ndryshimevetë induct.....	168
Fig. 5.2: Varësia e V_t nga numri relativ i RC-ve të mbyllura në nivele të ndryshme grupimi	168

LISTË E TABELAVE

Tabele 2.1 Efikasiteti i fotosintezës	29
Tabele 2.4.1 Pesë sasi bazë që i referohen një sistem pigmenti 'i', si definohet në Teorinë e Flukseve të Energjisë në Biomembrana	63
Tabele 3.1.1 Lidhja ndërmjet vlerave të matura të parametrave fluoreshencës klorofile a: shuarja fotokimike (qP) dhe jo-fotokimike (qN), gjendja e PhS 2 dhe koncentrimet të ndryshme proton në të dy anët e membranës tilakoide (Rosenqvist dhe Kooten, 2003)	86
Tabele 4.1.1 Protokoll kohor i regjistrimit të PF, DF e MR820 me m-PEA me kohë induksioni	125
Tabele 4.2.1 Parametra JIP-test	139
Tabele 4.2.2 Rate ox, Rate red	139
Tabele 4.3.1 Parametrat e marrë për PF, nga protokoll 1	152
Tabele 4.3.2 JIP Parametrat nga protokoll 1	153
Tabele 4.3.3 Shpejtësia e oksidimit të P700 (Vox) dhe reduktimit të P700 ⁺ (Vred)	154

TERMA TË PËRDORUR, SHKURTIME DHE KONVENCIONE

Fl – Fluoreshenca (eng. Fluorescence),

Chl – Klorofili (eng. Chlorophyll),

LHC – Kompleksi Dritë-Mbledhës (eng. Light Harvesting Complex),

PhSA – Aparati Fotosintetik (eng. Photosynthetic Apparatus),

PhS – Fotosistemi (eng. Photosystem),

OEC – Kompleksi i Zhvillimit të Oksigjenit (eng. Oxygen Evolving Complex),

ET – Transferimi i Elektroneve (eng. Electron Transport)

ETC – Zinxhiri i Transferimit të Elektroneve (eng. Electron Transfer Chain)

ATP – Adenozinë Trifosfate (eng. Adenosine Triphosphate),

ADP – Adenozinë Difosfate (eng. Adenosine Diphosphate),

PQ – Plastokinon (eng. Plastoquinone),

RC – Qendër Reaksioni (eng. Reaction Center),

RCsi – Qendra Reaksioni të Fjetura (eng. Silent Reaction Center),

PC – Plastocianin (eng. Plastocyanin),

Fd – Ferredoxin (eng. Ferredoxin),

NADPh – Nikotinamid Adeninë Fosfat Dinukleotidi (eng. Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate),

FNR– Ferredoxin-NADP Reduktazë (eng. Ferredoxin - NADP Reductase),

PC - Plastocianin

IC – Kurba e Induksionit (eng. Induction Curve),

PF – Fluoreshenca e Shpejtë (eng. Prompt Fluorescence),

DF – Fluoreshenca e Vonuar (eng. Delayed Fluorescence),

MR820 – Reflektimi i moduluar në 820 nm (eng. Modulated 820 nm Reflection),

PPhR – Reaksioni Fillestar Fotokimik (eng. Primary Photochemical Reaction),

CTE – Transporti Ciklik i Elektroneve (eng. Cyclic Transport of Electrons),

TM – Membrana Tilakoide (eng. *Thylakoid Membrane*),

DCMU – (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea),

P680 – Qendër Reaksioni e PhS 2,

P700 – Qendër Reaksioni e PhS 1,

RuBisCO – Enzimë Ribulose–1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO),

PAR– Rrezatim Fotokimikisht Aktiv (eng. Photosynthetically Active Radiation),

Pheo – Pheophytin,

ABS – Fluksi i fotoneve, të perthithur nga molekulat e pigmentit në antenë,

AL – Drita Aktinike (eng. Actinic Light), doza e dritës, e cila shkakton ndryshime fotokimike,

CS – Njësi e syprinës së sipërfaqës (eng. Cross Section), të ngacmuar të objektit fotosintetik,

ETR – Shpejtësi e Transportit të Elektroneve (eng. ElectronTransportRate),

LED –Light-Emitting Diode,

ML – Rrezatim i Moduluar (eng. Modulated Light),

PAM – Impuls me Modulim në Amplitudë (eng. Pulse Amplitude Modulation), fluorimetër me modulim të impulsit të amplitudës së dritës së ngacmimit,

PPFD – Densiteti i Fluksit të Fotoneve Fotosintetikut Aktive (eng. Photosynthetic Photon Flux Density),

SP – Impuls Ngopës (eng. Saturating Pulse).

PJESA E I: BAZA TEORIKE

Fotosinteza është një proces biologjik në të cilin energjia e dritës konvertohet në energji kimike. Për të trajtuar funksionimin e fotosintezës në nivel molekular, janë të nevojshme disa prej teorive themelore kimike dhe fizike, të cilat përfshijnë koncepte nga termodinamika, kinetika, elektrokimi, fotokimi, spektroskopi dhe natyra e dritës. Kjo Pjesë e I është trajtuar duke kombinuar pamjen globale me detajin, mënyrë kjo e zgjedhur për arësye të kompleksitetit të procesit. Teoritë e përparuara shkencore, të përzgjedhura nga këndvështrimi i fizikanit, janë paraqitur në Kreu 2, disa koncepte të tjera futen në kapitujt, ku ato janë të nevojshme.

KREU 1: VËSHTRIM MBI FOTOSINTEZËN

1.1 PARIMET THEMELORE TË RUAJTJES SË ENERGJISË FOTOSINTETIKE – TË PERGJITHSHME

1.1.1 Çfarë është fotosinteza?

Fotosinteza është një proces biologjik ku energjia e Diellit kapet dhe ruhet nga një sërë ngjarjesh që konvertojnë energjinë e pastër të dritës në energji biokimike, të nevojshme për të ushqyer jetën. Ky proces i jashtëzakonshëm siguron themelin për thelbin e gjithë jetës dhe ka mbi kohën gjeologjike ndryshime të thella të vet Tokës. Ai siguron gjithë ushqimin tonë dhe shumicën e burimeve tona energjetike.

Fotosinteza është një proces në të cilin energjia e dritës kapet dhe ruhet nga një organizëm, dhe energjia e ruajtur përdoret për të drejtuar procese qelizore.

Ky përkufizim është relativisht i gjerë dhe përfshin formën e njohur të fotosintezës të bazuar në pigmentin klorofil, e cila është objekt i këtij punimi, por gjithashtu përfshin forma shumë të ndryshme të fotosintezës, e cila kryhet nga disa baktere, që përdorin proteinën bakteriorhodopsin, si dhe mekanizma të tjerë, gjatë të cilave një organizëm nxjerr nga drita pjesë nga energjia e vet qelizore. Procese sinjalizimi të drejtuara nga drita, të tilla si shikimi ose veprim phytochrome, ku drita transmeton informacion në vend të energjisë, përjashtohen nga definimi ynë i fotosintezës, si dhe të gjitha proceset që normalisht nuk zhvillohen në organizmat e gjallë.

Në vijim, definojmë si organizëm fotosintetik çdo organizëm, të aftë të nxjerrë nga drita pjesë nga energjia e vet qelizore.

Bimët e larta, organizma fotosintetike, derivojnë në thelb gjithë energjinë e tyre qelizore nga drita. Megjithatë, ka shumë organizma që përdorin dritën si burim për vetëm një pjesë të energjisë së tyre, dhe në kushte të caktuara, ata nuk mund të nxjerrin aspak energji nga drita. Miratimi i këtij definimi të gjerë, bëhet pasi njerezimi interesohet kryesisht nga të kuptuarit e vet procesit të ruajtjes së energjisë. Organizmat, që përdorin fotosintezën vetëm për një pjesë të kohës, mund të kenë ende gjëra të rëndësishme, për të cilat njerezimi interesohet, rreth asaj se si funksionon procesi dhe, për këtë, meriton vëmendje, edhe pse një klasifikim purist nuk mund t'i trajtojë ato si organizma të vërtetë fotosintetikë.

Forma më shpesh e takuar e fotosintezës përfshin pigmente të tipit klorofile, dhe vepron duke përdorur procese të transferimit të elektroneve të drejtuara nga drita. Organizmat që do të trajtojmë janë bimët e larta. Të gjithë këto organizma konsiderohen që kryejnë "*fotosintezë me bazë klorofil*".

Ne këtë punim ne interesohemi për fotosintezën, e cila shoqërohet me *çlirim oksigjeni*.

Forma bakteriale me bazë rhodopsinë e fotosintezës, megjithëse kualifikohet në përkufizimin përgjithshëm, të dhenë më sipër, është mekanikisht shumë ndryshe nga fotosinteza me bazë klorofil. Proteobakteret që përmbajnë proteorhodopsine janë shpërndarë gjerësisht në oqeanet e botës, kështu që forma e fotosintezës me bazë rhodopsine mund të jetë e një rëndësie të konsiderueshme për njerëzimin, i cili në kosmos kërkon jetë në botë të tjera, andaj, së paku, duhet të njihen format e jetës, të cilat mund të jenë shumë të ndryshme nga ajo në Tokë. Jeta gjithmonë ka nevojë për burim energjie, prandaj është e arsyeshme të pritet që një formë e fotosintezës (duke përdorur përkufizimin e përgjithshëm) do të gjendet në shumicën apo ndoshta të gjitha botët që bartin jetë. Fotosinteza në një botë të tillë nuk duhet domosdoshmërisht të përmbajë klorofil dhe të kryejë transferim të elektroneve. Ajo mund të bazohet ndoshta në ndonjë proces tjetër të drejtuar nga drita, të cilin nuk mund ta imagjinojmë ende.

1.1.2. Fotosinteza është një proces i ruajtjes të energjisë diellore

Fotosinteza përdor dritën nga Dielli për të drejtuar një seri reaksione kimike. Dielli prodhon një spektër të gjerë drite. Produkti diellor tregohet në figure 1.1.1, së bashku me spektrin absorbues të disa organizmave fotosintetike. Gjithë diapazoni i dritës së dukshme, me gjatësi vale 400 deri 700 nm, dhe disa gjatësi vale në infrared të afërt (700 deri në 1000 nm) janë shumë aktivë në drejtimin e fotosintezës në organizma të caktuar, ndonëse organizmat më të njohur që përmbajnë klorofil nuk mund të përdorin dritë më të gjatë se 700 nm. Rajoni spektral nga 400 në 700 nm quhet rrezatim fotosintetikisht aktiv (PAR) (eng. Photosynthetically Active Radiation), edhe pse kjo është e vertetë e plotë vetëm për organizmat që përmbajnë klorofil a.

Drita diellore që arrin në sipërfaqen e Tokës reduktohet nga shpërndarja dhe absorbimi i molekulave të atmosferës. Avujt e ujit dhe molekulat e tjera si dioksidi i karbonit absorbojnë fuqishëm në rajonin infra të kuqe dhe ozoni absorbon në rajonin ultraviolet. Drita ultraviolet është një fraksion relativisht i vogël i prodhimit të përgjithshëm diellor, përbehet nga fotone me energji të lartë, por pjesa më e demshme e saj reflektohet nga shtresa e ozonit në atmosferën e sipërme dhe nuk arrin sipërfaqen e Tokës. Gjatësi vale më të vogla se 400 nm llogariten vetëm për rreth 8% të rrezatimit total diellor, ndërsa gjatësitë e valëve më të vogla se 700 nm llogariten për 47% të rrezatimit diellor (Thekaekara, 1973).

Rajoni i gjatësisë së valëve infra të kuqe përfshin një sasi të madhe të energjisë dhe duket të jetë një burim i mirë i fotoneve për drejtimin e fotosintezës. Sidoqoftë, nuk njihet asnjë organizëm, i cili mund të përdorë dritë me gjatësi vale më të gjatë se rreth 1000 nm për fotosintezë (drita me gjatësi vale 1000 nm e më të mëdha përbën 30% të rrezatimit diellor). Drita infrared përbehet nga fotone me energji shumë të ulët, kështu që për të drejtuar reaksionet kimike të fotosintezës do të duhej të përdorej një numër i lartë nga këto fotone.

Asnjë organizëm i njohur nuk ka evoluar një mekanizëm të tillë, i cili në thelb do të ishte një motor ngrohës i gjallë.

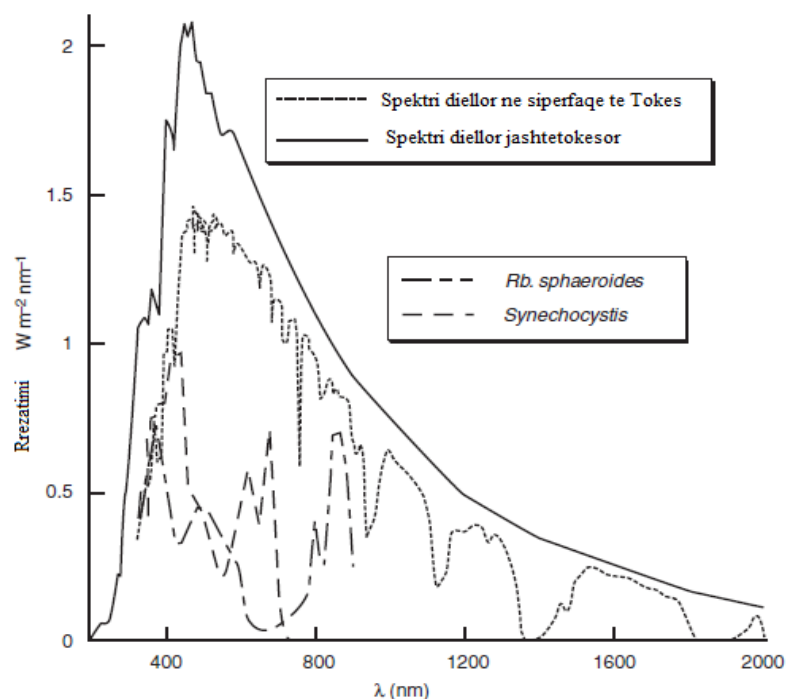


Fig. 1.1.1: Spektrat e rrezatimit diellor dhe spektra absorbues të organizmave fotosintetike. Kurba vije-plote, profili i intensitetit të spektrit jashtetokësor të Diellit; vijë me pika, profili i intensitetit të spektrit të dritës diellore në sipërfaqen e Tokës; linja dash-dot, spektri absorbues i *Rhodobacter sphaeroides*, një baktere anoksigenike fotosintetike purple; dashed line, spektri absorbues i *Synechocystis* PCC 6803, një cyanobacterium oksigjenike. Spektrat e organizmave janë në njësi të absorbimit (shkalla nuk është treguar) (Robert E. Blankenship).

Në sistemet ujore, intensiteti i dritës zvogëlohet me shpejtësi me rritjen e thellësisë në kolonën e ujit, për shkak të disa faktorëve. Kjo rënie nuk është uniforme për të gjitha gjatësitë e valës. Uji absorbon dobët dritë në pjesën e kuqe të spektrit, kështu që, fotonet e kuqe që janë më efikas në drejtimin e fotosintezës, varferohen shpejt. Uji gjithashtu shpërndan dritë, kryesisht për shkak të efekteve të grimcave të suspenduara. Ky efekt i shpërndarjes është më i përhapur në rajonin blu të spektrit, sepse shpërndarja është proporcionale me frekuencën në fuqinë e katërt. Qielli është blu për shkak të këtij efekti të shpërndarjes në varësi të frekuencës. Asnjë nga llojet e klorofileve nuk absorbon dritën e gjelbër shumë mirë. Megjithatë, pigmente të tjera fotosintetike, në veçanti disa karotenoide, kanë absorbim intensiv në këtë rajon të spektrit dhe janë të pranishme në sasi të mëdha në shumë organizma ujore fotosintetike. Në thellësitë e ujit më të mëdha se rreth 100 metra, intensiteti i dritës është shumë i dobët për të drejtuar fotosintezë.

1.1.3 Ku realizohet fotosinteza?

Fotosinteza kryhet nga një shumice organizmash. Në të gjitha rastet, membranat dyshtresore lipide janë kritike për fazat e hershme të ruajtjes së energjisë, kështu që fotosinteza trajtohet si një proces, zemra e të cilit është membrana. Proceset e hershme të fotosintezës kryhen nga proteinat me përmbajtje pigmenti, të cilat janë të integruara në membranë. Fazat e

mëvonshme të procesit janë të ndërmjetësuara nga proteina që difundojnë lirisht në fazën ujore.

Në qelizat e avancuara fotosintetike eukaryote fotosinteza lokalizohet në struktura subqelizore, kloroplaste. Kloroplasti përmban gjithë pigmentet klorofile dhe, në shumicën e organizmave; në të realizohen gjithë fazat kryesore të procesit të fotosintezës.

Brenda kloroplastit gjendet një sistem i gjerë membranash, dhe gjithë klorofilet dhe pigmentet e tjera lidhen me këto membrana, të cilat njihen si thylakoide. Në kloroplastet e bimeve të larta tipike, shumica e tilakoideve janë të lidhura ngushtë në steka, dhe njihen si membrana granale tilakoide, ndërsa ato që nuk janë të paketuara njihen si membranat stromale thylakoide. Membranat thylakoide janë vendet e absorbimit të dritës dhe të reaksioneve fillestare, të cilat fillimisht transformojnë energjinë e dritës në energji kimike. Mjedisi ujor jomembranor i kloroplastit njihet si stroma. Stroma përmban enzima të tretshme dhe është vendi i reaksioneve të metabolizmit të karbonit, të cilat japin produkte që mund të eksportohen nga kloroplasti dhe përdoren diku tjetër në bimë për të mbështetur procese të tjera qelizore.

1.1.4 Katër fazat e ruajtjes së energjisë në fotosintezë

Është e përshtatshme për të ndarë fotosintezën në katër faza të dallueshme, të cilat së bashku përbëjnë procesin e plotë, duke filluar me absorbimin e fotonit dhe duke përfunduar me eksportin e produkteve të qëndrueshme të karbonit nga kloroplasti. Katër fazat janë: (1) absorbimi i dritës dhe transferimi i energjisë nëpërmjet sistemeve antenë, (2) transferimi i elektronit primar (fillestar) në qendrat e reaksionit, (3) stabilizimi i energjisë nga proceset sekondare, dhe (4) sinteza dhe eksporti i produkteve të qëndrueshme.

Tre fazat e para, përbëjnë reaksionet në dritë dhe e katërta përfshin reaksionet në të errët. Megjithatë të gjitha reaksionet në fund të fundit drejtohen nga drita, në fakt hapi i vetëm, që strikt varet nga drita, është absorbimi i fotonit.

Antenat dhe proceset e transferimit të energjisë

Që energjia e dritës të ruhet nga fotosinteza, ajo duhet fillimisht të absorbohet nga një prej pigmenteve, të lidhur me aparatin fotosintetik. Absorbimi i fotonit krijon një gjendje të ngacmuar që eventualisht çon në ndarje të ngarkesës në qendrën e reaksionit. Jo çdo pigment kryen fotokimi; shumica e tyre funksionojnë si antena, mbledhin dritën dhe pastaj dërgojnë energji në qendrën e reaksionit ku bëhet fotokimia

Sistemi antenë nuk bën asnjë kimi; ai funksionon nga një proces i transferimit të energjisë që përfshin migrimin e gjendjeve elektronike të ngacmuara nga një molekulë në tjetrën. Ky është një proces i pastër fizik, i cili varet nga një bashkim i dobët energjik i pigmenteve të antenës. Në pothuajse të gjitha rastet, pigmentet lidhen me proteina në grupime shumë specifike. Si shtesë undrejte klorofileve, pigmentet e antenës përfshijnë edhe karotenoide.

Sistemet antenë zakonisht inkorporojnë një mekanizëm energjetik dhe konik (hinke) hapësinor, në të cilin pigmentet që ndodhen në periferi të kompleksit absorbojnë në gjatësi vale më të shkurtëra dhe, si rrjedhim, energji ngacmimi më të lartë se ato në zemër. Meqë

bëhet transferim energjie, energjia e ngacmimit lëviz nga pigmentet me energji më të lartë në më të ulët, duke u drejtuar njëkohësisht për në qendrën e reaksionit.

Sistemet antenë rrisin konsiderueshem sasinë e energjisë, që mund të absorbohet krahasuar me një pigment të vetëm. Në përgjithësi, ky është avantazh, pasi drita e Diellit është një burim energjie relativisht i holluar. Megjithatë, ka raste, veçanërisht nëse organizmi i nënshtrohet një forme tjetër stresi –mund të absorbohet më shumë energji drite nga sa mund të përdoret produktivisht nga sistemi. Nëse është e pakontrolluar, kjo mund të çojë në dëmtime të rënda për afate të shkurtëra kohe. Madje edhe në kushte normale, sistemi inaktivohet shpejt, nëse nuk egziston ndonjë lloj mekanizmi fotombrojtës. Prandaj sistemet antenë (si dhe qendrat e reaksionit) për pasojë kanë mekanizma të gjerë dhe multifunksional, rregullues, mbrojtës dhe riparues.

Transferimi i elektronit fillestar në qendrat e reaksionit

Transformimi nga energji e pastër e gjendjeve të ngacmuara në ndryshime kimike në molekula realizohet në qendrën e reaksionit. Qendra e reaksionit është një kompleks proteine me shumë subnjësi, e cila gjendet në membranën fotosintetike. Ajo është një kompleks pigment-proteina, që përfshin bashkë klorofilët dhe kofaktorë të tjerë për transferim të elektroneve, si quinones ose qendrat e hekur - squfurit, së bashku me peptidet ekstremisht hidrofobe.

Qendra e reaksionit përmban një dimer special të pigmenteve që është donori primar i elektronit për kaskadën e transferimit të elektroneve. Këto pigmente janë kimikisht identike (ose pothuajse) me klorofilët që janë pigmente të antenave, por mjedisi i tyre në proteinën e qendrës së reaksionit u jep atyre veti unike. Hapi përfundimtar në sistemin antenë është transferimi i energjisë në këtë dimer, duke krijuar një dimer të ngacmuar elektronikisht.

Procesi bazë, që ndodh në të gjitha qendrat e reaksionit është përshkruar skematikisht në figure 1.1.2a. Një pigment (P) i ngjashëm me klorofilin stimulohet deri në një gjendje elektronike të ngacmuar, ose nëpërmjet absorbimit direkt të fotonit ose, më shpesh, nga transferim energjie nga sistemi antenë. Pigmenti i ngacmuar është reduktues jashtëzakonisht i fortë. Ai shpejt humbet një elektron në një molekulë të afert akceptore (A) elektronesh, duke gjeneruar një gjendje çift - jonik P^+A^- . Ky është reaksioni primar i fotosintezës. Energjia është transformuar nga ngacmimi elektronik në energji redox kimike. Sistemi tashmë është në një pozicion shumë delikat (të epshëm) në lidhje me humbjen e energjisë së ruajtur. Nëse elektroni thjesht transferohet mbrapa në P^+ nga A^- , rezultati neto është që energjia konvertohet në nxehtësi dhe humbet, dhe nuk është e aftë të kryej ndonjë punë. Kjo është plotësisht mundur, pasi P^+ fortë oksiduese janë të pozicionuara fizikisht drejtpërdrejt pranë (A) shumë reduktuese.

Sistemi shmang rastin e humbjeve nga rekombinimi nëpërmjet një sërë reaksione sekondare ekstremisht të shpejta që konkurojnë me sukses me rekombinimin. Këto reaksione, të cilat janë më të efektshme në anën akceptore të çiftit të joneve, ndajnë në hapësirë ngarkesat pozitive dhe negative. Kjo ndarje fizike redukton shpejtësinë e rekombinimit sipas rradhës së madhësisë.

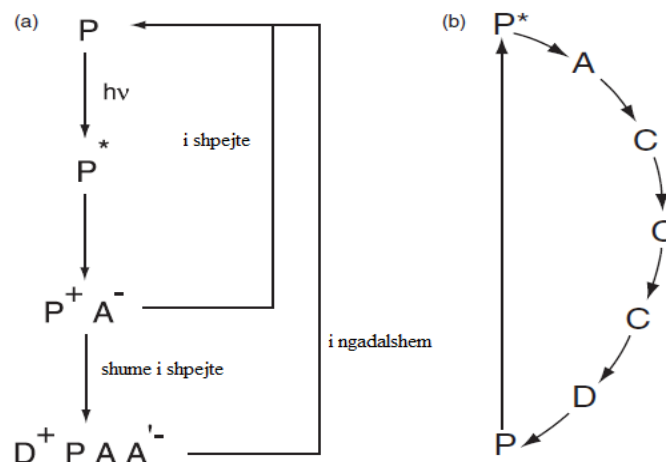


Fig. 1.1.2: Skemë e përgjithshme e transferimit të elektroneve në qendrat e reaksionit fotosintetik. Ngacmimi i dritës kalon një pigment (P) në një gjendje të ngacmuar (P^*), ku ai humbet një elektron në një molekulë akceptore (A) për të formuar një gjendje çift - jonik P^+A^- . Reaksionet sekondare ndajnë ngarkesat, duke transferuar një elektron nga një donor elektroni (D) dhe nga akseptori fillestar A në një akseptor sekondar (A'). Kjo ndarje hapësinore parandalon reaksionin e rekombinimit. (b) Diagramë skematike e rrugës ciklike të transferimit të elektroneve, gjetur në shumë baktere anoksigjenike fotosintetike. Shigjeta vertikale nënkupton absorbimin e fotonit: P përfaqëson donorin primar të elektronit; D , A dhe C përfaqësojnë donorët, akceptorët dhe bartesit sekondar të elektroneve (Robert E. Blankenship).

Rezultati final është që brenda një kohe shumë të shkurtër (më pak se një nanosekonde) llojet e oksiduara dhe të reduktuara janë ndarë në distancë afërsisht sa trashësia e membranës biologjike ($\sim 30\text{\AA}$). Proceset më të ngadalshme pas kesaj mundet më tej të stabilizojnë ruajtjen e energjisë dhe ta konvertojnë atë në forma më të lehta për tu përdorur. Sistemi funksionon në mënyrë kaq fine, që në shumicën e rasteve rendimenti kuantik i produkteve, formuar për foton të absorbuar është gati 1.0. Natyrisht, njëfarë energjie humbet nga çdo foton, por kjo nuk e bën rezultatin më pak mbresëlënës.

Stabilizim nga reaksione sekondare

Thelbi i magazinimit të energjisë fotosintetike është transferimi i një elektroni nga një pigment i ngacmuar tip - klorofil në një molekulë akceptore të një kompleksi pigment-proteine, e quajtur qendër e reaksionit. Ngjarja fillestare e transferimit të elektronit pasohet me ndarjen e ngarkesave pozitive dhe negative nga një seri shumë e shpejtë reaksione kimike sekondare.

Në disa organizma, një transferim elektroni i drejtuar nga drita dhe stabilizim është i mjaftueshëm për të përfunduar një zinxhir transferimi ciklik të elektronit. Kjo është treguar skematikisht në figure 1.1.2b, në të cilën shigjeta vertikale paraqet energjinë që hyn në sistem, e startuar nga absorbimi i fotonit, dhe shigjetat e lakuara përfaqësojnë proceset spontane të transferimit elektronik, që pasojnë, dhe eventualisht, e kthejnë elektronin te donori primar i elektronit. Ky proces i transferimit ciklik elektronik në vetvete nuk është produktiv, nëse një pjesë e energjisë së fotonit nuk mund të ruhet. Kjo ndodh nëpërmjet lidhjes së lëvizjes së protonit nëpër membranë me transferimin e elektronit, kështu që rezultati neto është një

diference pH e drejtuar nga drita, ose gradient elektrokimik, në të dy anët e membranës. Ky gradient elektrokimik i pH përdoret për të drejtuar sintezën e ATP.

Organizma më të njohur fotosintetike që zhvillojnë oksigjen kanë këtë model të transferimit të elektroneve. Ata kanë dy komplekse fotokimike qendër reaksioni, që punojnë së bashku në një zinxhir transferimi jodiclik elektroni. Dy komplekset e qendrës së reaksionit njihen si PhS 1 dhe PhS 2. Elektrone nxirren nga uji prej PhS 2, duke e oksiduar atë në oksigjen molekular, i cili çlirohet si produkt mbetje. Elektronet e nxjerra nga uji i dhurohen PhS 1 dhe, pas një hap sekondar të drejtuar nga drita transferim elektroni, përfundimisht redukton një akceptor të ndërmjetëm elektroni, NADPH. Protonet gjithashtu transportohen nëpër membranën dhe në lumenin tilakoideve gjatë procesit jodiclik të transferimit elektronik, duke krijuar një diference pH. Energjia në këtë gradient pH përdoret për të bërë ATP.

Sinteza dhe eksporti i produkteve të qëndrueshme

Faza përfundimtare e ruajtjes së energjisë fotosintetike përfshin prodhimin e molekulave stabile me energji të lartë dhe shfrytëzimin e tyre për të ushqyer (venë në levizje) një llojshmëri procese qelizore. Kjo fazë përdor komponimin NADPH të ndërmjetëm të reduktuar, gjeneruar nga PhS 1, së bashku me energjinë e lidhjes fosfate të ATP për reduktimin e dioksidit të karbonit në sheqerna. Në organizmat fotosintetike eukariote, sheqernat e fosforilizuar eksportohen nga kloroplasti. Reaksionet e asimilimit dhe reduktimit të karbonit janë procese enzime - katalizim, që realizohen në stromën e kloroplastit.

1.2 ORGANIZMAT FOTOSINTETIKË

E gjelbër është gjithshka rreth nesh. Ngjyra dalluese e klorofilit njofton praninë e organizmave fotosintetike, përfshi pemë, shkurre, barin, mykun, kaktusin dhe shumë lloje të tjera të bimësisë. Por kjo është vetëm maja e ajsbergut të jetës fotosintetike. Veç këtyre organizmave më të dukshme, ka një llojshmëri të konsiderueshme të jetës mikroskopike fotosintetike, përfshi shumë lloje alga e bakteve fotosintetike. Shumë nga këto organizma nuk janë me ngjyrë të gjelbër, por ende kryejnë fotosintezë.

Në nivele qelizore dhe madje edhe molekulare organizimi uniteti i jetës është lehtësisht i dukshëm. (Alberts et al., 1994). Të gjitha organizmat janë të organizuara në mënyrë të njëjtë fundamentale. Qelizat rrethohen nga membranat, të cilat funksionojnë si barriera përshkueshmërie dhe gjithashtu kryejnë shumë funksione të rëndësishme. Membranat përbëhen nga lipide, të cilat janë molekula amfipatike me një grup kokë polare dhe bisht jo polar. Lipidet janë të renditura në strukturë dyshtresore, me grupet kokë polare të drejtuara nga ana e jashtme dhe e brendshme e qelizës, dhe bishtat jopolar janë të drejtuar në qendër të shtresës dyfishe. Lloji më i zakonshëm i lipideve në kloroplaste janë glikolipidet. Bishtat jopolarë janë zinxhira të gjatë acide yndyrore. Ata pothuajse gjithmonë përmbajnë një ose më shumë lidhje dyfishe, të cilët rrisin fluiditetin e membranave, në të cilat ndodhen përbërësit kryesorë. Membrana të tjera gjenden në organizmat fotosintetike: në veçanti, membrana thylakoide, e cila është vendi i fotosintezës në kloroplastet dhe cianobakteret.

Membranat gjithashtu përmbajnë proteina: proteinat integrale të membranës, të cilat përshkojnë shtresën dyfishe lipide, proteinat periferike të membranës, të cilat janë të lidhura me njëren ose tjetrën anë të membranës, por nuk përshkojnë shtresën e dyfishtë. Shumë nga proteinat e domosdoshme për fotosintezën janë proteina membranore. Gjithë qelizat përmbajnë gjithashtu shumë llojshmëri karbohidrate ose sheqerna, si dhe lipide dhe shumë molekula të tjera të vogla që janë thelbësore për funksionin e duhur qelizor. E parë në këtë mënyrë, ngjashmëritë mes klasave të ndryshme të jetës tejkalojnë dallimet. Përkundër ngjashmërive themelore të theksuara, jeta, megjithatë, vjen në një larmi të shquar të formave dhe madhësive. Këto dallime përbëjnë bazën e mekanizmave të klasifikimit të gjallesave.

Bimët

Bimët janë më komplekset nga gjithë organizmat fotosintetike (Taiz and Zeiger, 1998). Bimët më të thjeshta janë bryophytes, përfshi myshqet, likenet dhe hornworts. Ato janë të ngjashme me algat, dhe nuk kanë rrënjë apo gjethe të vërteta, ose një sistem vaskular. Ato nuk prodhojnë inde të forta për mbështetje. Bimët vaskulare përfshijnë fernet dhe bimët e farës. Fernat riprodhohen me anë të sporeve, dhe kanë rrënjë, gjethe dhe inde vaskulare, si dhe inde drusore për mbështetje mekanike. Bimët me farë riprodhohen me anë të farave dhe gjithashtu përmbajnë rrënjë dhe gjethe, si dhe inde vaskulare dhe drusore. Bimët e farës ndahen në dy grupe, gymnosperms dhe angiosperms. Gymnosperms janë grupi më primitiv dhe përfshijnë pemë halore. Angiosperms, të njohur edhe si bimë me lule, përbëjnë shumicën dërrmuese të llojeve të bimëve rreth nesh.

Struktura bazë e membranës fotosintetike dhe mekanizmi i fotosintezës janë përgjithësisht të ngjashme në të gjitha organizmat oksigjenik fotosintetikë. Pikerisht, nga studimi i

fotosintezës, qe realizohet në të tillë organizma, interesohemi në këtë punim. Disa qeliza përfshijnë komplekse antena të një lloji të ri, dhe mekanizma rregullues të caktuar janë qartë më të sofistikuar, kur kalohet nga cianobakteret në bimë më të larta. Megjithatë, të njëjtat parime bazë dhe komplekse gjenden në gjithë këtë gamë të gjerë të organizmave. Duket se Natyra përsosi aftësinë për të kryer fotosintezë disa bilion vjet më parë dhe nuk ka bërë ndryshime të mëdha që nga ajo kohë. Edhe bakteret anoksigjenike fotosintetike, edhe pse qartë shumë më primitive se format oksigjenike, kryejnë fotosintezë duke përdorur të njëjtat parime themelore fizike.

Në këtë punim ne interesohemi nga bima e ullirit.

1.3 FOTOSINTEZA – MEKANIZMI

Hyrje

Në vijim fotosinteza trajtohet nga pikëpamja e strukturës dhe komponentëve të aparatit fotosintetik dhe funksionit të tij. Në bimë, fotosinteza kryhet në kloroplaste, në membranat tilakoide gjenden pigmentet fotosintetike, të cilat absorbojnë dritën, dhe proteinat, që formojnë aparatit fotosintetik. Bëhet përshkrim i shkurtër biologjik dhe kimik, strukturor dhe konformacional i pesë komplekseve të proteinave, përbërëse të aparatit fotosintetik – PhS 1, PhS 2, LHC 2, Cyt b₆f, ATP sintaze. Katër fazat e fotosintezës, të cilat së bashku përshkruajnë anën funksionale të procesit të plotë, janë prezantuar.

Mënyra e prezantimit këtu është në funksion të aplikimeve praktike për studimin e bimëve, trajtuar në *Pjesa e dyte* – Aplikime praktike në studimin e bimëve.

1.3.1 Karakteristika të përgjithshme të fotosintezës

Fotosinteza është procesi më i rëndësishëm bioenergjetik në Tokë, falë të cilit është e mundur ekzistenca e jetës dhe funksionimi i biosferës. Duke përdorur energjinë diellore, organizmat fotosintezues prodhojnë karbohidrate dhe komponime të tjera organike nga CO₂ dhe uji. Fotosinteza zhvillohet në bimë, alga dhe disa baktere, duke përfshirë algat blu-jeshile. Në bimë, ky proces ndodh në kloroplastet, brenda të cilave ka stroma dhe thylakoids. Në membranat tilakoide ndodh faza e ndritshme e fotosintezës, ndërsa stroma përmban enzimat e nevojshme për fazën e errët të fotosintezës (cikli Calvin-Benson) (figure 1.3.1).

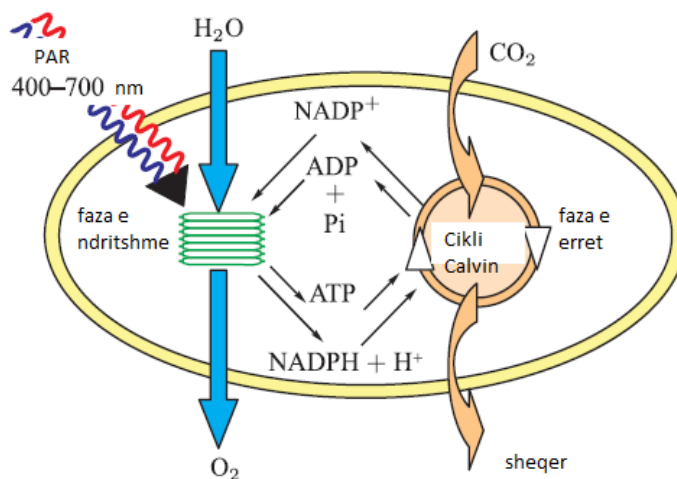


Fig. 1.3.1: Dy faza të fotosintezës dhe bashkeveprimi i tyre në kornizë të kloroplastit. Faza, që varet nga drita (faza e ndritshme), ndodh në tilakoide, në to formohen komponime që kanë fuqi asimilimi (NADPH dhe ATP), të cilat përdoren në fazën e errët, të pavarur nga faza e ndritshme (cikli Calvin-Benson). Gjatë fazës së errët në stroma ndodh reduktimi i CO₂ deri në komponime organike.

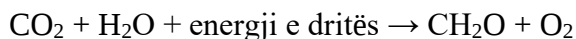
(Modifikuar

nga

<http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/psoverview.gif>)

Si rezultat i një procesi jashtëzakonisht kompleks, shumëfazësh, një pjesë e energjisë së fotonit të absorbuar ruhet për metabolizmin energjetik të qelizës në formën e energjisë kimike

të qëndrueshme të komponimeve organike. Në përgjithësi, procesi i fotosintezës mund të përshkruhet nga formula pasuese e thjeshtuar:



Përthithja, transformimi dhe ruajtja e energjisë në procesin e fotosintezës përfshijnë katër faza kryesore.

1. Absorbimi i dritës dhe transferimi i energjisë nga antenna pigment në qendrat aktive.
2. Transporti i elektroneve (ndarja fillestare e ngarkesës në qendrat aktive dhe transferimi i elektronit nga pigmenti i ngacmuar i qendrës së reaksionit tek akseptori, për shembull, pheofitin).
3. Stabilizimi i energjisë së ngacmimit të elektroneve me ndihmën e redox reaksioneve (transporti elektronik fotosintetik) dhe sintezë e ATP (Adenosine Triphosphate) e NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate).
4. Sinteza dhe eksporti i produkteve të qëndrueshme të fotosintezës.

Rrezatimi aktiv, i përthithur në procesin e fotosintezës, PAR, përdoret për sintezën e ATP dhe NADPH. Të dy produktet prodhohen në fazën e ndritshme dhe përdoren për sintezën e sheqernave nga CO₂ dhe H₂O në fazën e errët, faza biokimike.

Në fazën pasuese biokimike, ndodh fiksimi i dioksidit të karbonit dhe reduktimi i tij në sheqer duke përdorur ATP dhe NADPH, të formuar në fazën e mëparshme. Reaksionet kyç të lidhjes së dioksidit të karbonit katalizojnë enzimë Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO), që ndodhet në stromë. Ajo punon shumë ngadalë, për sekondë, molekula e enzimës lidh vetëm tre molekula substrati, dhe, rrjedhimisht, çdo bimë ka nevojë për sasi të madhe të kësaj enzime. Rubisco përfaqëson rreth 50% të gjithë proteinës së tretur në kloroplaste. Reaksioni i karboxylamit përfaqëson në vetvehte lidhje të molekulave të CO₂ dhe ribuloza-1,5-bisfosfat (pesë-molekula karboni - pentose), si rezultat formohet molekulë e ndërmjetme gjashtë-karbon, e cila shpejtë hidrolizon deri në dy molekula trioz të 3-Phosphoglyceric acid (PGA, chemical formula C₃H₇O₇P). Më pas PGA reduktohet deri në triozë sheqeri - 3 – phospho-glyceraldehyde (PG, chemical formula C₃H₆O₃), dhe dihidroksiacetone fosfat. Ekziston edhe rigjenerim i ribulozës 1,5-bisfosfat (përgatitja e molekulës pasuese që lidh CO₂). Gjatë këtyre tre fazave (karboksilimi, rikuperimi dhe rigjenerimi) nga tre molekula dioksid karboni dhe tre molekula të ribulose-1,5-bisfosfat formohet një molekulë glyceraldehyde 3- phosphate dhe rikuperohen tre molekula ribulozo- 1,5-bisphosphate. Gjithë cikli, i cili përfshin tre reaksionet e përshkruara, quhet cikli Calvin-Benson. Sheqeri i prodhuar në cikël mund të përdoret për sintezë të saharezës, niseshtesë dhe shumë komponimeve të tjera organike.

1.3.2 Struktura dhe komponentët e aparatit fotosintetik

Kloroplastet e bimëve të larta janë të mbështjella nga një membranë e dyfishtë lipoproteinë (guaskë e kloroplastit). Përmbajtja e brendshme është një tretesirë proteinash (stroma), në të është vendosur një sistem i nderlikuar membrana të sheshta (thylakoids), të grupuara në grana dhe membranat që i lidhin ato. Në membranat e tilakoide gjenden pigmentet fotosintetike, të cilat absorbojnë dritën, dhe proteinat, që formojnë aparatit fotosintetik (komplekset klorofil-proteinë që formojnë antenat e PhS 1 dhe PhS2). Faza e ndritshme e fotosintezës ndodh në

tilakoide, ndërsa në stroma - faza e errët. Stroma e kloroplastit përmban gjithashtu dhe molekula ADN dhe ARN (figure 1.3.2).

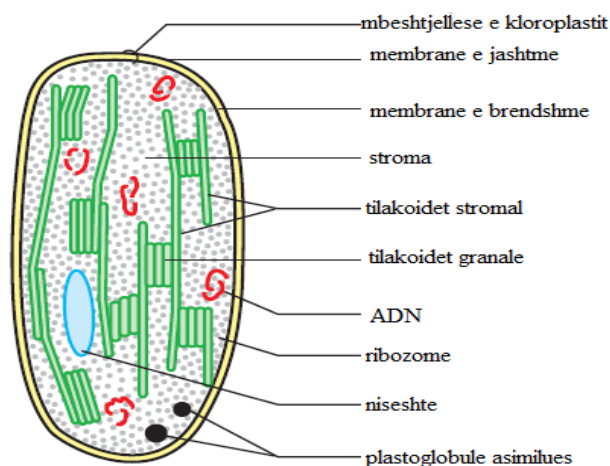


Fig. 1.3.2: Ndërtimi i kloroplasteve të bimëve të larta (modifikuar nga <http://www.plantandsoil.unl.edu>)

Pjesë përbërëse e membranës thylakoide janë proteinat hidrofobe ose amfipatike (te tilla, që përmbajnë zona hidrofile dhe hidrofobe), dhe në sipërfaqe të vendosura proteinat hidrofile si plastocyanin (proteinë që përmban bakër) dhe ferredoxin (proteinë, që përmbajnë hekur dhe squfur jo-hemo). Membranat e kloroplasteve përmbajnë sasi të mëdha të acideve yndyrore të pangopura dhe gjurmë sterole, që do të thotë se ato janë më likidet nga membranat e njohura biologjike, të cilat nga ana e tyre lehtësojnë lëvizjen laterale të proteinave në planin e membranës.

Duysens dhe bashkëpunëtorë (1961) treguan se faza e ndritshme e fotosintezës kryhet me pjesëmarrjen e dy strukturave të specializuara - PhS 1 dhe PhS 2, që përmbajnë pigmente dhe proteina të ndryshme. Ato, së bashku me kompleksin citokrom, janë komponentet kryesore të zinxhirit fotosintetik të transferimit të elektroneve. Komplexet e ndryshme të aparatit fotosintetik në bimët e larta shpërndahen në mënyrë heterogjene në membranën tilakoide (figure 1.3.3). PhS 2 me sistemin e vet antenë të mbledhjes së dritës në PhS 2 (LHC II – eng. Light Harvesting Complex), ndodhet në zonat granale të membranës tilakoide, me përjashtim të zonave anësore. PhS 1 dhe kompleksi ATP - synthase janë në zonat e membranave tilakoide, që kanë kontakt të drejtpërdrejtë me stroma dhe kompleksi citokrom b_6 (cyt b_6f) është i shpërndarë në gjithë pjesët e membranës. Komponent i rëndësishëm i PhS 2 është kompleksi i çlirimit të oksigjenit (OEC, eng. Oxygen Evolving Complex). Organizimi strukturor i kloroplasteve dhe aktiviteti i komplekseve të tyre varet nga shumë faktorë (Garstka, 2007 ;. Garstka et al, 2007), si dhe nga tipi i fotosintezës (Romanowska et al, 2006a.).

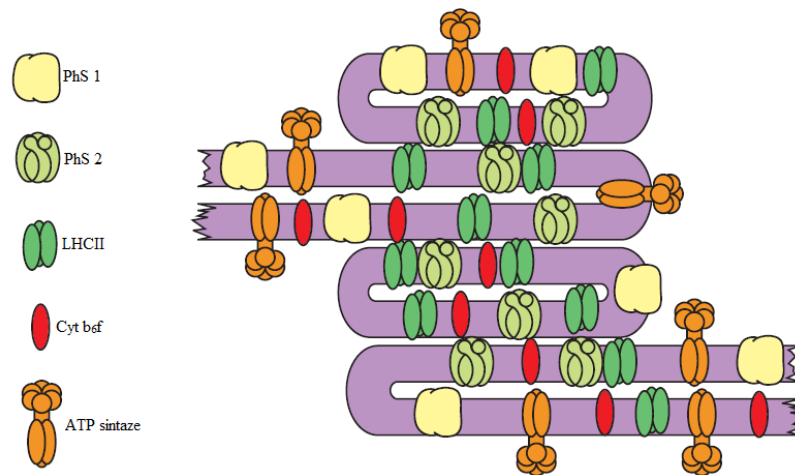


Fig. 1.3.3: Skema e shpërndarjes johomogjene të komplekseve të proteinave në membranën tilakoide. PhS 1 dhe ATP synthase janë të vendosura në membranat e tilakoide, të cilat janë në kontakt të drejtpërdrejtë me stromën; PhS 2 në membranat tilakoide që nuk kontaktojnë me stromën, dhe cyt b₆f gjendet në të gjitha pjesët e tilakoides (modifikuar nga Steffen, 2003).

1.3.2.1. Kompleksi antenë i fotosistem 2

Përthithja e rrezatimit diellor në diapazonin PAR (400-700 nm) kryhet nga molekulat e pigmenteve fotosintetike (klorofile dhe karotenoide) në komplekset antenë që ndodhen në membranat tilakoide (Hall and Rao, 1999; Lawlor, 2001, Strzałka, 2002). Komplekset antenë përbëhen nga një numër i madh molekula klorofile dhe karotenoide të lidhura me proteinë (figure 1.3.4). Sipas veprimit (Ghanotakis, et.al, 1999, Hall and Rao, 1999), komplekset antenë të PhS 2 mund të ndahen në tre pjesë kryesore:

- 1) antenë e brendshme e përberë nga komplekset klorofil - proteinë, dhe pikërisht proteinat CP43 dhe CP47, që përmbajnë molekula klorofili a dhe β -karotinë;
- 2) trimere nga antenna dritëmbledhese të jashtme LHC II, që përbëhen nga komplekset pigment-proteinë dhe përmbajnë klorofil a, klorofil b, xanthophylls;
- 3) proteina monomere CP29, CP26, CP24, molekula lidhëse të klorofil a, b dhe molekula xanthofili.

Komplekset pigment-proteinë LHC II kanë formë trimere, ndërsa monomeret e tyre janë të përbërë nga zinxhir polypeptid, që përmban 232 mbetje aminoacide, nga tetë molekula të klorofil a, gjashtë – klorofil b dhe katër molekula carotenoids (Garstka, 2007). Këto komplekse janë në gjendje të migrojnë në mënyrë laterale nëpër membranën thylakoide, rakorduar me gjendjen e fosforilimit të tyre. Komplekset në formë jo të fosforiluar mund të transferojnë energji ngacmimi në qendren e reaksionit të PhS 2, dhe të fosforiluarat - PhS 1. Kështu rregullohet transferimi i energjisë së absorbuar në qendrat e reaksionit të fotosistemeve të veçanta (Hall and Rao, 1999).

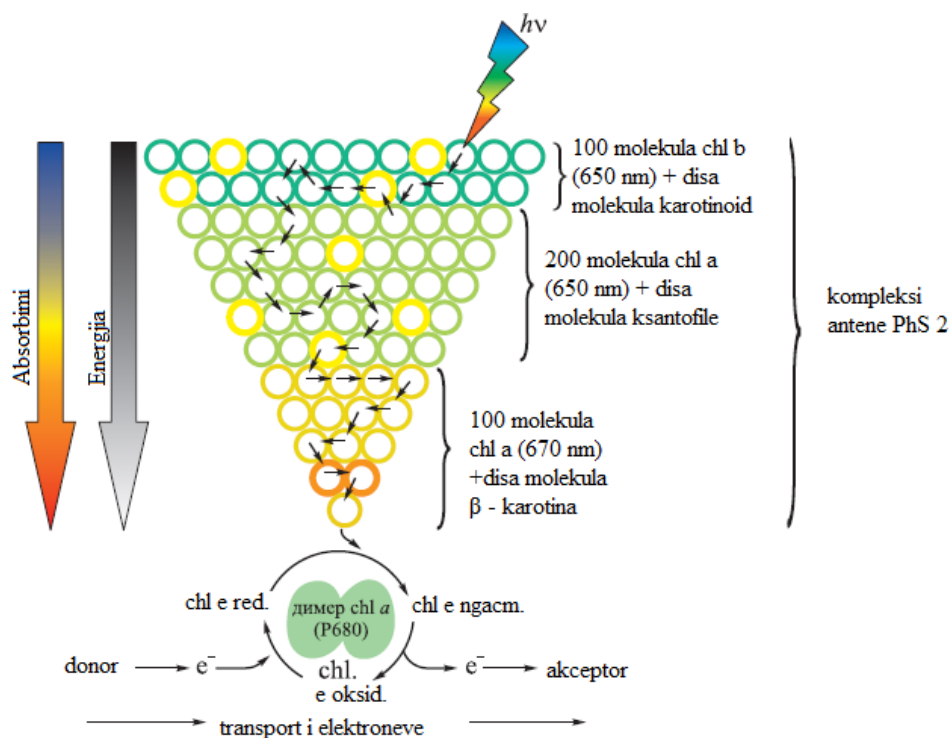


Fig. 1.3.4: Skema e thjeshtuar e absorbimit dhe transferimit të energjisë në antenë që i përket PhS 2 dhe transferimi i elektroneve në qendrën e reaksionit (modifikuar nga Szweykowska, 1997). Reaksioni i ndarjes së ngarkesave elektrike lidhet me efektin e tunel të elektroneve.

1.3.2.2 Pigmente fotosintetike në bimët e larta

Pigmentet kryesore fotosintetike janë klorofilet, të cilat i japin ngjyrën e gjelbër bimëve. Bimët e gjelbra përmbajnë dy lloje klorofili: klorofil a, i cili gjendet në të gjitha organizmat fotosintetike që prodhojnë oksigjen dhe klorofil b, i cili përmbahet në bimët dhe algat e gjelbra (Hall and Rao, 1999). Molekula e klorofilit përbëhet nga bërthama porfirinë, në të cilën atomet e azotit të katër unazave pirrole janë të lidhura me lidhje të koordinuar me atomin qendror të magnezit dhe unazën e pestë shtesë, kurse pjesa e mbetur perfaqëson në vetvete alkol 20- karboni- phytol. Vijimësia e lidhjeve dyshe dhe njëshe në unazë quhet sistem i lidhjeve të konjuguara, që merr pjesë në absorbimin e energjisë së dritës. Zinxhiri i fitolit nuk thith rrezatim, roli i tij është të integrojë molekulën klorofile në membranën tilakoide dhe të sigurojë orientimin e saj normal.

Diferenca në strukturën kimike të këtyre ngjyruessve ndikon në ndryshimet në spektrin e absorbimit. Gjithë klorofilet thithin rrezatim në diapazonin e gjatësisë së valës 400-700 nm dhe kanë dy banda kryesore absorbuese: në zonën me gjatësi vale të dritës blu (ngacmim me energji më të lartë) dhe në diapazonin e gjatësisë së valës të kuqe (nivel më të ulët ngacmimi). Në tretësirat organike, klorofili a ka maksimum absorbimi në rreth 420 nm dhe 660 nm, dhe klorofili b - në 435 nm dhe 642 nm (figure 1.3.5). Në komplekset pigment - proteinë, të cilat ndodhen në kloroplaste, maksimumi i absorbimit të klorofilit zhvendoset drejt gjatësive më të mëdha të valëve.

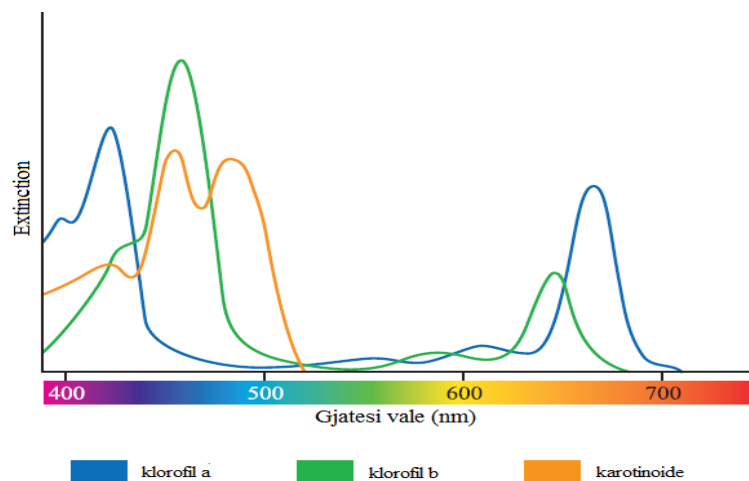


Fig. 1.3.5: Spectra të absorbimit të pigmenteve fotosintetike në zonen e dukshëm (modifikuar Szweykowska,1997)

Në membranat thylakoide, në rradhë me klorofilin, gjenden edhe pigmente të tjera ndihmëse, të afta të absorbojnë energjinë e fotonit dhe t'ua transferojnë atë molekulave klorofile në qendrat e reaksionit. Në bimë të larta janë të pranishme karotenoidet. Karotenoidet derivojnë nga izoprene dhe ndahen në karotene portokalli dhe xanthofile të verdhë-portokalli. Këta ngjyruer absorbojnë rrezatim në gjatësi vale të ndryshme nga klorofili (vetëm në spektrin vjollcë dhe blu, figure 1.3.5), por puna e tyre rrit efikasitetin e përthithjes së dritës. Ata kanë tre maxime përthithje, të cilat (në varësi të llojit të karotenoideve) ndodhen në rajonet spektrale 420-425 nm, 440-450 nm dhe 470-480 nm. Funkcioni i dytë kryesor është mbrojtja nga foto-oksidimi i lipideve në kloroplaste (oksidimi nën ndikimin e dritës). Karotenoidet mund të kapin energjinë e tepërt të molekulave të ngacmuara të klorofilit dhe termikisht ta deaktivizojnë atë, gjë që parandalon formimin e oksigjenit singlet - formë aktive e oksigjenit.

1.3.2.3 Photosystemi 2

Në chloroplaste, PhS 2 është i pranishëm në një sasi më të madhe se PhS 1; raporti stoichiometric PhS 2 / PhS 1 është rreth 1.5, por kjo mund të variojë në varësi të kushteve të mjedisit (Taiz and Zeiger, 2002; Allakhverdiev, 2011). PhS 2 lokalizohet kryesisht në thylakoidet e graneve, në vende, ku ata nuk kontaktojnë me stromën (figure 1.3.6). PhS 2 përfshin në vetvete antenë të brendshme - CP43 dhe CP47, antenë të jashtme (LHCII), qendër reaksioni, të përbërë nga dy molekula klorofili a me maksimum absorbimi në 680 nm (P680), pheophytin, D1-proteine (Q_B – pjesa që lidh plastoquinone) dhe D2-proteinë, në të cilën ndodhet plastoquinone i lidhur, i quajtur Q_A , (figure 1.3.7).

PhS 2 gjithashtu përmban një kompleks enzyme, që realizon disocimin e ujit dhe çlirimin e oksigjenit (eng. OEC- Oxygen-Evolving Complex). Ai është i vendosur në sipërfaqen e brendshme të membranës thylakoide. Kompleksi përbëhet nga mbetje aminoacide e tirozines në proteinën D1, katër atome mangani dhe proteinë sipërfaqësore PsbO (që stabilizon klasterin mangan), PsbP dhe PsbQ. Në fazën e ndritshme të fotosintezës në kompleks disociohet molekula e ujit, pason nga ndarja e protonit, elektronit dhe oksigjenit molekular.

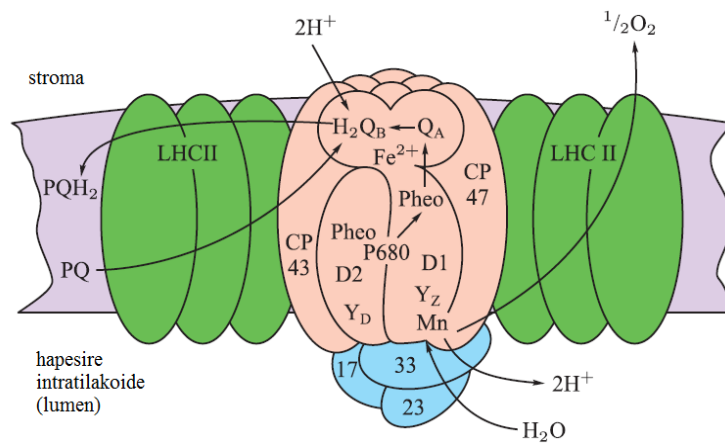


Fig. 1.3.6: Struktura e PhS 2. LHC II - komplekset klorofil- proteinë dritëmbledhëse, CP43, CP47 komplekset klorofil-proteinë, të cilat janë antena qendrore të PhS 2; Pheo - feofitinë, 17, 23 dhe 33 - polipeptide të kompleksit të zhvillimit të oksigjenit; P680 - dimer klorofili (qendra e reaksionit PhS 2); D1 dhe D2 - polipeptide, që lidhin klorofil P680 dhe pheofitin; QA - plastocyanin (akceptori i parë quinone PhS 2); H₂Q_B - plastoquinone i reduktuar, i lidhur me Q_B; Y_D, Y_Z - grupe funksionale të mbetjeve të tirozines në proteinat D2- dhe D1-, përkatësisht (modifikuar nga Steffen, 2003).

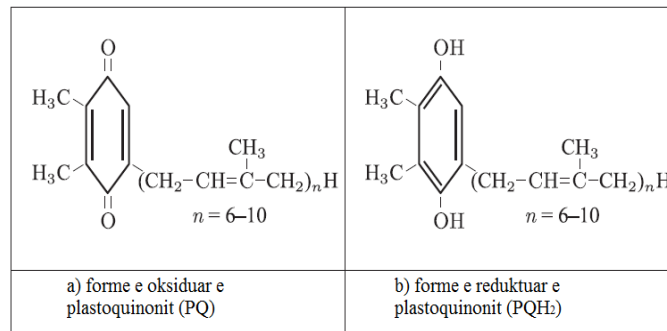


Fig. 1.3.7: Struktura e formës së oksiduar (a) dhe të reduktuar (b) e plastoquinone

<http://en.wikipedia.org/wiki/Plastoquinone>, 2008)

1.3.2.4 Kompleksi citokrom

Kompleksi citokrom b6f përmban qendra me hekur-squfur Riski, formë citokromi me potencial të ulët dhe formë citokromi me potencial të lartë, citokrom f dhe subnjësi polipeptide IV (PetD).

Duke vepruar si molekulë oksidoreduktaze e plastoquinonit të reduktuar - plastohinoli (PQH₂) - bashkë me plastocianin (PC), kompleksi b6f funksionon si pompë protonesh- transferon jonet e hidrogjenit nga stroma në tolakoide.

1.3.2.5 Photosystemi 1

Photosystemi 1 është i pozicionuar në tilakoidet stromale dhe në tilakoidet granale, të cilat janë në kontakt të drejtpërdrejtë me stromen.

Pjesë e PhS 1 është një kompleks antenë LHC I, që përmban klorofil a dhe b (në raport 4: 1), karotenoide, polypeptide Lhca dhe polypeptide të tjera (nga A në N). PhS 1 përbëhet nga një qendër reaksioni, e formuar nga dy molekula klorofili, me maksimum absorbimi në 700 nm

(P700), dhe një zinxhir të transportit të elektroneve (ETC eng. Electron Transfer Chain), që përfshin phyloquinone (vitaminë K1), proteinat hekur-squfur, plastocyanin (PC) dhe ferredoxin (Fd), i cili është akseptori fundor i elektroneve të ngacmuara. Në anën e jashtme të membranës thylakoide pranë Fd është enzimë ferredoksin reduktazë ($\text{NADP}^+ \text{--FNR}$), e cila katalizon transferimin e elektroneve nga Fd në NADP^+ (figure 1.3.8). Si rezultat i marrjes së dy elektroneve dhe absorbimit të dy protoneve nga molekula NADP^+ formohet kompleksi NADPH, i cili është reduktues i forte.

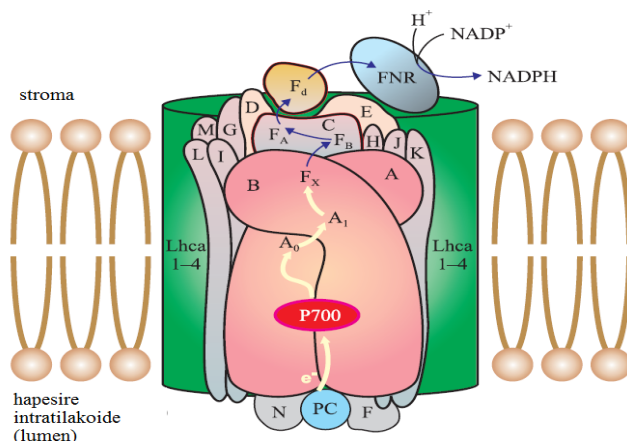


Fig. 1.3.8: Ndertimi i fotosistemit 1. LHC I - kompleks dritëmbledhës klorofil- protein (paraqitur me ngjyrë jeshile), i cili përmban polipeptide Lhca 1-4, polipeptide, A, B, ... N; P700 - dimer klorofili (qendra e reaksionit PhS I); A_0 – molekula monomere e klorofilit; A_1 - phyloquinone (vitamina K_1); qendrat e hekur-squfurit F_x , F_A dhe F_B ; PC - plastocianin; Fd - ferredoksin; FNR-ferredoxin- NADP^+ - oxidoreductase (modifikuar nga <http://www.absoluteastronomy.com/topics/Photosystem>).

1.3.2.6 ATP synthase

ATP sintaza është një kompleks i përbërë nga një pjesë hidrofobe (CF_0), e lokalizuar në membranën tilakoide dhe e lidhur me të pjesë hidrofile (CF_1), lokalizuar në anën e jashtme të membranës tilakoide në kontakt me stroma dhe që përmban qendër katalitike. CF_1 përbëhet nga tre α - dhe tre β - subnjësi dhe një subnjësi rregullatore: γ , δ dhe ϵ (figure 1.3.9). Sinteza e ATP realizohet në nën-njësinë β . CF_0 përfshin një proteinë që përmban dy kanale jonike. Kompleksi ATP synthase realizon reaksionin endergonik të fosforilimit të ADP në ATP. Sinteza e ATP nga ADP dhe fosfati inorganik quhet photophosphorylation (fotofosforilim) dhe është një nga reaksionet më të rëndësishme të fazës së ndritshme të fotosintezës.

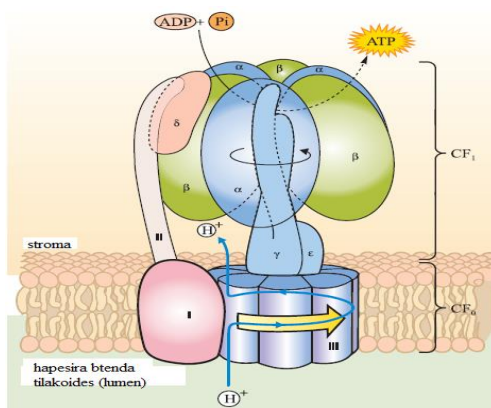


Fig. 1.3.9: Instrumenti ATP-sintase. CF_0 - pjesë e kompleksit lidhur me membranën, CF_1 - qendra katalitike (modifikuar sipas Boyer, 1997). Shkronjat dhe shifrat tregojnë nën-njësitë, që formojnë enzime.

1.3.3 Proceset e fazës së ndritshme të fotosintezës

1.3.3.1 Përthithja e rrezatimit fotosintetik aktiv

Kur një molekulë klorofili, e cila ndodhet në kompleksin antenë dritëmbledhese LHC II, përthith foton PAR, ndodh ngacmimi i saj. Elektroni i valencës në molekulën e ngjyruarit kalon nga niveli energjetik fillestar në një më të lartë. Molekula e ngacmuar e klorofilit (X_1), me anë të rezonancës, transmeton energjinë e ngacmimit në molekulën klorofile fqinje (X_2) dhe kthehet në gjendjen bazë. Kusht i nevojshëm i një mekanizmi të tillë, të transferimit të energjisë së ngacmimit, është vendndodhja e maksimumit të spektrit të absorbimit të molekulës X_2 në zonën e spektrit me valë më të gjata, krahasuar me maksimumin për X_1 . Ky transferim shoqërohet gjithmonë me humbje energjie (Hall dhe Rao, 1999). Sa më e vogël të jetë distanca ndërmjet molekulave të pigmentit, midis të cilave ndodh procesi i transmetimit të energjisë së ngacmimit, aq më i lartë është probabiliteti i transportit. Efikasiteti i transferimit të energjisë së ngacmimit mes molekulave të klorofilit është afërsisht 100% (Hall and Rao, 1999). Duke migruar nëpër antenë, energjia transferohet në molekulën e klorofilit në qendrën e reaksionit fotosintetik P680, dhe elektroni i ngacmuar nga klorofili kalon në akceptorin - pheofitinë (Pheo). Pas ndarjes fillestare të ngarkesave, formohet çifti radikal ($P680^+ - Pheo^-$).

Elektroni me energji të lartë nga Pheo i reduktuar, shumë shpejt (për rreth 0.4 ns) kalon në plastoquinone Q_A ($P680^+ - Pheo^- + Q_A \rightarrow P680^+Pheo + Q_A^-$). Plastoquinone Q_A , i vendosur në proteinën D_2 , është akceptor i parë i qendrueshëm i elektronit në PhS 2 (Hankamer et al., 1997). Pas kësaj, molekulë e klorofilit e oksiduar $P680^+$ neutralizohet nga elektroni i marrë nga tyrosina (Tyr_Z), e lokalizuar në kompleksin e disociimit të ujit në anën donore të PhS 2 ($Tyr_Z - P680^+ \rightarrow Tyr_Z^+ + P680$). $P680$ e oksiduar ($P680^+$) është agjent oksidimi më i fortë biologjik i njohur. Kjo bën të mundur oksidimin e ujit gjatë fotosintezës oksigjenike.

Transportuesit e qendrueshëm të elektroneve në anët akceptore dhe donore të PhS 2 janë pozicionuar larg njëri nga tjetri, gjë që shmang mundësinë e rikombinimit të ngarkesave të ndara, dhe ky është kusht i nevojshëm për përdorim efektiv të energjisë së ngacmimit të elektronit, që ruhet në PhS 2, në etapat pasuese të fotosintezës (Jones and Fyfe, 2001) (figure 1.3.11).

1.3.3.2 Transporti elektronik dhe fotofosforilimi jo-ciklik

Filluar në këtë mënyrë, seria e reaksioneve oksido - reduktuese çon në transferimin e elektroneve sipas bartësve të tyre të mëtejshëm me redox potencial në rritje. Transmetimi i elektroneve me energji të lartë sipas një zinxhiri special bartësish, të vendosur në komplekset e PhS 2 dhe PhS 1, quhet transport jociklik i elektroneve.

Reduktimi i akceptorit Q_A^- parandalon ndarjen e mëtejshme të ngarkesës në qendrën e reaksionit PhS 2 dhe kështu rritet probabiliteti i fluoreshencës (F1) klorofile në këtë photosystem. Një qendër e tillë quhet "e mbyllur" (eng. Closed center). Hapja e saj si rezultat i transferimit të elektroneve nga quinone Q_A në quinone Q_B , të lokalizuara në proteinën D_1 ,

zvogëlon probabilitetin e Fl klorofile ($Q_A^-Q_B \rightarrow Q_AQ_B^-$). Me reduktimin pasues Q_B^- nga elektroni, i transmetuar nga Q_A^- , formon jon Q_B^{2-} ($Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$). Kur përthithen dy protone nga stroma ($Q_B^{2-} + 2H^+ \rightarrow QH_2$) formohet molekulë plastohinoli QH_2 , e cila ndahet nga D1-proteina dhe hyn në pool plastoquinone. (Hankamer et al, 1997; .. Ott et al, 1999) (figure 1.3.11 dhe figure 1.3.12).

Në vendin e liruar në D₁ bashkangjitet një molekulë tjetër Q nga pool i plastoquinoneve, që janë gjendje. Plastohinol lëviz në anën tjetër (donore) të membranës tilakoide dhe oksidohet deri në Q, duke dhënë një pas një dy elektrone - një kompleksi citokrom b₆f, dhe të dytin për reduktimin e qendrës së hekur-sulfurit, si rezultat i të cilës plastohinol jep dy protone, të cilat transmetohen në hapësirën intratilakoid (lumen). Kështu, kompleksi Cyt b₆f dhe pool plastoquinone veprojnë si një pompë protonesh. Rezultati i veprimit të tyre të përbashket është acidifikimi i hapësirës së brendshme të thylakoideve.

Veprimi i pompës rrit gradientin e përqendrimit të protonit të membranës thylakoide, e cila është forca lëvizëse e procesit të sintezës së ATP (Kramer et al., 2004). Qendra e reduktuar e hekur-sulfurit transferon elektronet në plastocionin (PC), proteinë e lëvizshme që përmban bakër. Jonet e bakrit ndryshojnë shkallën e oksidimit të tyre, dhe kjo lejon që PC të transferojë elektrone në qendrën e oksiduar të reaksionit P700⁺ pas çdo ngacmimi të PhS 1. P700⁺ reduktohet nga plastocianin për rreth 20-200 msec (Haehnel et al., 1980; Bottin and Mathis, 1985).

Në PhS 2, një rol shumë të rëndësishëm luan kompleksi i disociimit të ujit, i lokalizuar në anën e brendshme (donore) të sipërfaqes së membranës tilakoide. Kompleksi formohet nga katër atome mangan dhe 161-tyrosinë D1- proteinë (figure 1.3.10), si dhe proteina të jashtme: 33 PsbO, 23 PsbP dhe 17 PsbQ. Gjatë këtij procesi, kompleksi mangan jep katër elektrone, të cilat (për shkak të ndarjes së ngarkesave nga qendra P680⁺) drejtohen në anën akceptore të PhS 2. Kjo ndodh në katër faza. Në fillim, nga kompleksi në gjendjen S₀ ndahet një elektron, i cili shoqërohet nga oksidimi i manganit dhe shfaqja e një ekuivalenti pozitiv (+1), dhe kompleksi hyn në gjendjen S₁.

Elektronet e çliruar nga uji reduktojnë jonet mangan dhe kthejnë kompleksin mangan në gjendjen fillestare S₀. Protonet e çliruara mbeten brenda tilakoideve, duke rritur gradientin e përqendrimit të tyre në membranën thylakoide, që është forcë lëvizëse për sintezën e ATP. Oksigjeni i çliruar nga fotosinteza difuzion nga kloroplasti dhe realizohet nga bima në atmosferë (Jones and FYFE, 2001).

Kështu, organizmat fotosintetike mund përdorin ujin si burim të elektroneve dhe joneve të hidrogjenit (H⁺ - gradient i nevojshëm për sintezën e ATP), të cilat janë të nevojshme për procesin e asimilimit në të errët të CO₂.

Në fazën e ndritshme të fotosintezës PhS 2 bashkëvepron me PhS 1.

Fotonet në rajonin PAR absorbohen nga antena dritëmbledhëse, e lidhur me PhS 1, duke shkaktuar ngacmim të molekulave të pigmenteve fotosintetike. Ngacmimi transferohet nga molekula në molekulë në drejtim, që korrespondon me zvogëlim në energjinë e ngacmimit të elektroneve analogjikisht me migrimin e energjisë në LHC II. Ngacmimi i P700 shkakton reaksionin primar fotokimik, i cili çon në ndarjen e ngarkesës në qendrën e reaksionit PhS 1

dhe formimin e $P700^+$ të oksiduar dhe elektron të ngacmuar, është agjenti biologjik reduktues më i forë. Për rreth 15 ps elektroni transmetohet në akseptorin fillestar (A_0), duke e kthyer në A_0^- , dhe molekula klorofile $P700^+$ e oksiduar, merr një elektron nga PC^- e reduktuar (Brettel and Leibl, 2001). Kështu, krijohet stabilizim i ngarksave në PhS 1. Elektroni me energji të lartë nga A_0^- për rreth 50 ps transferohet në A_1 (phylloquinone, vitaminë K1), dhe pastaj - në proteinat hekur-sqfur (F_X , F_A , F_B), dhe, në fund, redukton ferredoxin - akseptori fundor, i pozicionuar në anën e jashtme të membranave tilakoide. (Hecks et al., 1994).

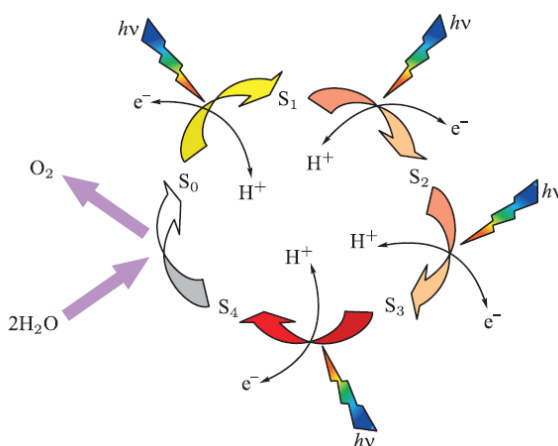
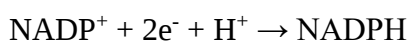


Fig. 1.3.10: Ilustrim skematik i oksidimit të kompleksit mangan në procesin fotosintetik të oksidimit të ujit (ndryshimi i gjendjes S nga oksidimi i kompleksit mangan, çlirimi i H^+ dhe ndarja e O_2). S_0 , S_1 ... S_4 – gjendje të ndryshme sipas rritjes së oksidimit të kompleksit mangan nga 0 deri në 4 (Modifikuar http://en.wikipedia.org/wiki/Oxygen-evolving_complex)

Pozicionimi në afërsi i enzimës ferredoxin-NADP reductase (FNR) katalizon transferim të elektronit nga Fd^- në molekulën e oksiduar nikotinamid adeninë dinukleotidi fosfat - $NADP^+$. Pas marrjes së njëpasnjëshme të dy elektroneve nga Fd^- , dhe shtimi i një protoni në $NADP^+$ formohet reduktori i fortë NADPH. Koha e transferimit të elektronit të energjisë së lartë nga $P700$ në Fd është rreth 100 ms (Setif and Bottin, 1994, 1995). Reaksioni i plotë i reduktimit të $NADP^+$ mund të shkruhet si:



Si rezultat i transportit linear të elektroneve të energjisë së lartë ndodh energjetizimi i membranës thylakoide për shkak të formimit të një gradienti protonik transmembranor. Njëkohësisht me transferimin e elektroneve midis fotosistemeve brenda tilakoideve futen protone nga stroma përreth, dhe bashkë me H^+ , të formuara gjatë disociimit të ujit, ato çojnë në acidifikim të fazës së brendshme thylakoide, madje edhe për pH relativisht të lartë të stromës.

Sipas teorisë hemiosmotike, propozuar nga Mitchell, transferimi i protoneve nëpër ATP synthase nga hapësira e brendshme e tilakoideve (ku përqendrimi i tyre është i lartë) jashtë, në stroma, aktivizon reaksionin e ATP sintezës (Mitchell, 1979). Gradienti i protonit midis hapësirës së brendshme të tilakoidit dhe stromës është proporcional me intensitetin dhe shpejtësinë e transferimit të elektroneve.

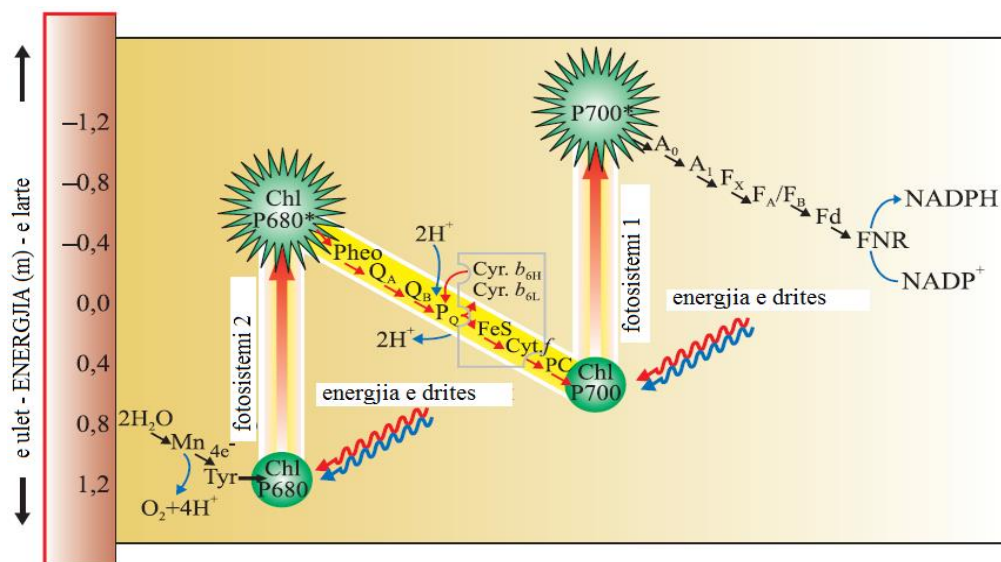


Fig. 1.3.11: Z-skema përshkruan transportin fotosintetik të elektroneve (modifikuar sipas <http://www.life.uiuc.edu/govindjee/textzsch.htm>). Tyr - mbetje tirozine; Chl P680 dhe P700 - qendrat e reaksionit të fotosistemit 2 dhe 1, respektivisht; Chl P680* dhe P700* - qendrat e reaksionit të ngacmuara të dy fotosistemeve; Pheo-pheophytin, QA dhe QB - molekula plastoquinone të lidhura; PQ - pool i plastoquinone të lirë; cyt f - citokrom f; cyt b_{6L} dhe cyt b_{6H} - forma me potenciale të ulëta dhe të larta të citokromi b; PC - plastocianin; A₀ - molekula monomer klorofili; A₁ - filokinon, vitaminë K; F_X, F_A dhe F_B - qendra hekur-squfuri; Fd - ferredoksin; FNR - ferredoxin-NADP⁺ reduktaza.

Përshkrimi i fluoreshencës klorofile kërkon përfaqësim të saktë të fazave të transportit të elektroneve në procesin e fotosintezës prandaj, ne do të trajtojmë të ashtuquajturën Z-skema, që përshkruan transportin e elektroneve nga uji në NADP⁺ (figure 1.3.11).

Transporti i elektroneve kryhet midis bartësve sipas redox - gradientit dhe për ngacmim të qendrës së reaksionit të PhS 1 dhe PhS 2 nevojitet energjia e dritës. Boshti i ordinatës tregon shkallën e potencialit oksido - reduktues të bartësve të elektroneve.

Në skemë, transferimi spontan i elektroneve përshkruhet si transferim i tyre nga bartës, të pozicionuar në anën e majtë në anën e djathtë të diagramës, ku bartësi pasues reduktohet. Për shkak të ndryshimeve në potencialet redox, elektronet transmetohen më lehtë nga bartësit e përshkruar në diagramën më sipër të ata të pozicionuar më poshtë (në mënyrë spontane reaksioni zhvillohet "nga lart poshtë"), dhe transferimi i elektroneve "lart" kërkon hyrje sasi të mëdha energjie nga jashtë. Elektrone me energji të lartë gjenerohen në qendrat e reaksionit të fotosistemeve kur ato ngacmohen nga energjia e dritës. Shigjetat e gjata vertikale përfaqësojnë reaksione fotokimike në qendrat e reaksionit të ngacmuara P680 dhe P700 (figure 1.3.11).

Përshkrim i hollësishëm i skemës: 4Mn - kompleks mangani, i përbërë nga katër atome mangani. Në dritë kompleksi mangan oksidohet, duke kaluar nëpër shkallë të ndryshme oksidimi nga S₀ në S₄, duke zbërthyer njëkohësisht dy molekula uji dhe izolimin e 4 protoneve (4H⁺), 4 elektrone (4e⁻) dhe formohet një molekulë oksigjeni (O₂). Tyr - amino acid "tyrosine" është donori kryesor i elektroneve për P680⁺, tyrosine, gjithashtu shënohet si Y_Z ose Z. Chl P680 – klorofil dimer, i pozicionuar në qendrën e reaksionit - përthith energjinë e photonit, transmeton elektronin në pheofitinë dhe kthehet në oksidant të fortë, i

afër të shkepusë elektron nga molekulat e ujit. Feo - molekulë pheophytin, akseptori primar i elektroneve, i ngjashëm me molekulën klorofile, por ka dy atome hidrogjeni në vend të jonit qendror magnez Mg^{2+} . QA^- plastoquinone i vendosur në zonën e QA të proteinës D_2 . Plastoquinone QA transferon vetëm nga një elektron dhe është akseptori fillestar i qëndrueshëm i elektroneve në PhS 2. QB - molekulë plastoquinone e pozicionuar në zonën e QB të proteinës D_1 . Ajo merr 2 elektrone nga QA , pas së cilës i nënshtrohet protonizimit, duke marrë $2H^+$ nga stroma e kloroplastit dhe pastaj del nga qendra lidhëse në fazën lipide të membranës. Vendi i saj zihet nga një tjetër molekulë plastoquinone e oksiduar nga pool në membranë. PQ - molekula plastochinone të lira të lëvizshme, të lokalizuara në qendër të pjesëve hidrofobe të membranës tilakoide. Molekulat e plastokinonit transferojnë elektronet nga PhS 2 në kompleksin citokrom (cyt b_6f), në të cilin zhvillohen disa reaksione oksido-reduktimi. Si rezultat, elektronet transferohen në plastocanin (PC), bartës i lëvizshëm elektronesh. Cyt b_{6L} - qendër aktive e molekulave të citokromit b_6 me potencial të ulët redoksi. Cyt b_{6H} - qendër aktive e molekulës së citokromit b_6 me potencial të lartë redox. FeS - qendra e hekur-sqfurit e tipit Fe_2S_2 proteinë. Cyt f - citokrom f, PC - plastocyanin, proteina të lëvizshme me përmbajtje të lartë bakri (proteinë periferike me masë molekulare rreth 10.5 kDa), të vendosura në anën e brendshme të membranës thylakoide dhe transferojnë elektrone nga citokromi f i reduktuar në qendrën e reaksionit PhS 1. Chl P700 - qendra e reaksionit të PhS 1, e cila përfaqëson në vetvehte dy molekula klorofili (dimer). Chl P700* - gjendje e ngacmuar (pas absorbimit të një fotoni) e qendrës së reaksionit të PhS 1, është donatori primar i elektronit në PhS 1, pas së cilës mund të marrë një elektron nga plastocionin. A_0 - molekulë klorofili, akseptori i parë i elektronit në PhS 1. A_1 - molekulë e vitaminës K_1 (phylloquinone). F_X , F_A dhe F_B - proteina hekur-sqfur të tipit Fe_4S_4 (qendra të palëvizshme). Fd - ferredoksin, proteinë hekur-sqfur, e cila ndodhet në sipërfaqen e jashtme të membranës thylakoide. FNR – ferredoxin - $NADP^+$ oxidoreductase. $NADP^+$ - forma e oksiduar e nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat. NADPH - nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat në formë të reduktuar. ATP - adenosine triphosphate.

1.3.3.3 Transporti elektronik ciklik dhe fotofosforilimi ciklik

Alternativë e rrugës lineare të transportit të elektroneve është transporti ciklik dhe i lidhur me të fosforilimi ciklik. Kjo ndodh, kur sasia e disponueshme e $NADP^+$ për elektrone të energjisë së lartë është e pamjaftueshme, përshembull, nëse drita është tepër e fortë në rajonin PAR (dmth, në stres drite).

Rruga alternative e transportit të elektroneve që përdoret në këtë proces përfshin PhS 1 dhe transportuesit e elektroneve, të tilla si ferredoxin, plastoquinone, citokrom b_6f -kompleksi dhe plastocyanin. Në këtë rast, aktivitetet fotokimik shfaq vetëm PhS 1, dhe elektronet me energji të lartë transferohen nga Fd në kompleksin citokrom b_6f , i cili lejon transferimin e protoneve nga stroma në thylakoide, dhe elektroni nëpër PC kthehet në qendrën e reaksionit të oksiduar $P700^+$. Me ngacmimet e mëtejshme të PhS 1, procesi i përshkruar mund të përsëritet, në çdo cikël, si rezultat i veprimit të pompës proton, rritet gradienti protonik midis lumenit intratilakoid dhe stroma. Kjo lejon sintezën e ATP nga kompleksi ATP synthase. Proces i quhet fotofosforilim ciklik. Në rastin e transportit jo-ciklik të elektroneve, sintetizohen NADPH dhe ATP. Si rezultat transporti ciklik të elektroneve, produkti i vetëm është ATP, që lejon rregullimin dhe mbajtjen e raportit të nevojshëm të NADPH dhe ATP (figure 1.3.12).

1.3.3.4 Transporti pseudo - ciklik i elektroneve dhe fotofosforilimi pseudo - ciklik

Fotofosforilimi pseudo-ciklik dhe transporti elektronik pseudo-ciklik realizohen kur elektronet transferohen nga molekulat e ujit PhS 2 në molekulën e oksigjenit, në vend në NADP^+ . Kjo çon në formimin e anionit superoksid $\text{O}_2^{\bullet-}$, dhe në etapë pasuese - H_2O_2 (Allen, 2003).

Transporti pseudo-ciklik i elektroneve parandalon fotoinhibimin dhe rregullon procesin e asimilimit të CO_2 (Hall and Rao, 1999). Gjatë këtij lloj transporti të elektroneve, gradienti i protonit që formohet midis fazës së brendshme të tilakoidit dhe stromës është i mjaftueshëm për sintezën e ATP (figure 1.3.12). Gjithë kompleksi i reaksioneve në fazën e ndritshme të fotosintezës dhe veçoritë e procesit të transformimit të energjisë së absorbuar të PAR në kloroplaste, si dhe mënyra të ndryshme të mundshme të transportit të elektroneve në membranat tilakoide janë treguar në figure 1.3.12.

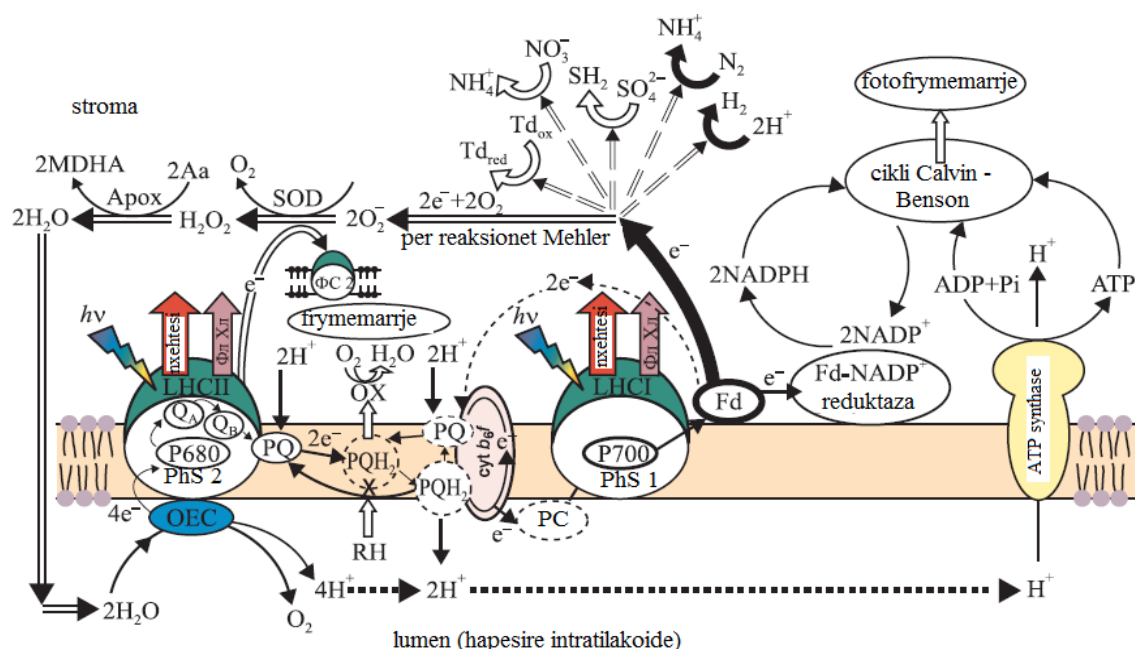


Fig. 1.3.12: Mënyrat e transformimit të energjisë, absorbuar nga PAR në kloroplaste. PhS 2 dhe PhS 1, P680 dhe P700 - qendrat e reaksionit të PhS 2 dhe PhS 1, OEC; QA dhe QB - plastoquinone, lokalizuar në vendet e lidhjeve me proteinat D2 (QA) dhe zona në proteine D1 (QB); PQ dhe PQH2 - plastoquinone dhe plastoquinol (plastoquinone i reduktuar); Pc - plastocianin; Fd - feredoksin; Td_{ox} dhe Td_{red} - forme tioredoxine e oksiduar dhe e reduktuar; LHC II dhe LHC I - komplekse drite-mbledhese pigment - proteine në PhS 2 dhe PhS 1; SOD - superoksid dismutaza; Aa - acid askorbik; Apox - peroksidaze askorbate; MDHA - monodehydroascorbate; Fl Chl a; RH - reduktues i brendshëm; OX-n-propyl-gallate oksidazë e ndjeshme; SH2 - sulfid. Shigjetat e panderprera - transporti jo-ciklik elektronik, shigjetat me pika - transporti ciklik elektronik, shigjeta të dyfishta (të vazhdueshme dhe të pikezuara) - rrugë alternative të transportit elektronik (modifikuar: Qala and Loboda, 2010).

Përfundime

Fotosinteza definohet si një proces në të cilin energjia e dritës kapet dhe ruhet nga një organizem, dhe energjia e ruajtur përdoret për të drejtuar procese qelizore. Në këtë punim interesohemi nga:

- fotosinteza e bazuar në pigmentin klorofil,
- fotosinteza, e cila shoqërohet me zhvillim oksigjeni,
- fotosinteza që realizohet në membranat tilakoide brenda kloroplasteve në organizmat eukaryote fotosintetike - bimët.

Struktura dhe komponentet e aparatit fotosintetik, komplekset dhe sistemet, që e përbëjnë dhe funksioni i tyre trajtohen paralelisht me katër fazat e procesit të fotosintezës:

* absorbimi i dritës dhe transferimi i energjisë nga pigment antena në qendrat aktive; * transporti i elektroneve; * stabilizimi i energjisë të ngacmimit të elektroneve me ndihmën e redox reaksioneve dhe sintezë e ATP e NADPH; * sinteza dhe eksporti i produkteve të qendrueshme të fotosintezës.

KREU 2: FENOMENE, KONCEPTE DHE TEORI BIOFIZIKE

Kreu ndërtohet nga katër seksione.

Në historia e zhvillimit të hershëm të fotosintezës jepen disa nga zhvillimet e shënuara - kronologjia e zbulimeve krijon komoditet në punën me këtë materie.

Mekanizmat e transferimit të elektroneve në biostruktura janë analizuar, si të një rëndësie të veçantë për shumë transformime biologjike - nga fotosinteza në frymëmarrjen aerobe. Materiali ka bazë të gjerë fizike dhe aplikime të fizikës kuantike në makromolekula.

Mekanizmat fizikë për transferimin (migrimin) e energjisë në antena fotosintetike shikohen nga teoria Förster. Dy pikëpamjet ajo Förster dhe exciton janë thelbësore në interpretimin e kompleksit antenë fotosintetike.

Teoria e fluksit energjetik në membranat thylakoide (Strasser 1978, 1981) lejon të krijohen ekuacione të thjeshta algjebrike, që shprehin ekuilibrin midis energjisë në hyrje dhe dalje për sistemet e analizuar të pigmenteve fotosintetike dhe jep informacion në lidhje me fatin e mundshëm të energjisë së absorbuar (Goltsev). Këtu sinjalet e fluoreshencës klorofile a dhe tranzitimet e fluoreshencës, të shfaqura nga organizmat fotosintetike në kushte të ndryshme, analizohen për të dhënë informacion të detajuar rreth strukturës, konformacionit dhe funksionimit të aparatit fotosintetik. Ajo çka realisht është e rëndësishme është të bëhet lidhje mes sinjalit të fluoreshencës dhe biofizikës së sistemit, për të cilën një teori / metodologji është prezantuar.

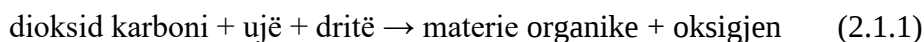
2.1 HISTORIA DHE ZHVILLIMI I HERSHËM I FOTOSINTEZËS

2.1.1 Hyrje

Kuptimi ynë i procesit kompleks të fotosintezës është produkt i përpjekjeve disa shekullore nga ana e shkencëtarëve të panumërt në mbarë botën. Do të evidentojmë disa nga zhvillimet e shënuara, që formojnë bazat e pamjes aktuale – si zhvillimet, që çuan në përcaktimin e ekuacionit kimik të fotosintezës, më pas disa eksperimente kyç që kanë çuar në kuptimin aktual mekanicist të fotosintezës (Rabinowitch, 1945); paraqitje kjo më shume eklektike sesa shteruese, me akcent çeshtjet fizike.

2.1.2 Ekuacioni i fotosintezës

Për ndërtimin e ekuacionit kimik bazë të fotosintezës u punua gjatë viteve 1771 dhe 1804, e më 1804 ai mund të shkruhej si:



Ky nuk ishte një ekuacion i balancuar, pasi natyra e lëndës organike nuk ishte precizuar, dhe madje as formula e vërtetë kimike për ujin nuk ishte ndërtuar ende! Koncepti i atomeve që kombinohen për të formuar molekula u formulua nga John Dalton nga fundi i kësaj periudhe, por formulat kimike të qarta nuk u ndërtuan për akoma pesëdhjetë vjet. Sqarimi i barazimit të fotosintezës ishte një vepër e mahnitshme.

Ekuacioni i përgjithshëm i balancuar fotosintetik është:



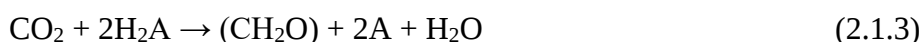
ku glukoza, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, është përfaqësues i një karbohidrati.

2.1.3 Ide të hershme mekaniciste të fotosintezës

Kur reaksioni i përgjithshëm i fotosintezës u ndërtua, vëmendja u kthye drejt sqarimit të detajeve të mekanizmit të procesit.

Van Niel dhe natyra redox e fotosintezës

Gurthemeli në kuptimin tonë të tanishëm të fotosintezës është, se ajo është një *proces kimik reduktues-oksidues (redox)* i induktuar nga drita. Ky parim u shpall qartë për herë të parë më 1930 nga Cornelis van Niel. Van Niel kreu një seri eksperimentesh mbi karakteristikat metabolike të baktereve fotosintetike, që nuk zhvillonin oksigjen (anoksigjenike) (van Niel, 1941). Kontributi frytdhënës i Van Niel ishte njohja se ekuacioni i përgjithshëm i fotosintezës mund të riformulohet në një mënyrë më të përgjithshme, si:



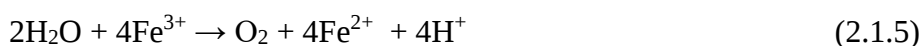
Forma e fotosintezës me zhvillim oksigjeni më pas mund të shihet si një rast special i këtij formulimi më të përgjithshëm, në të cilin H_2O zëvendësohet me H_2A dhe O_2 me 2A . E paraqitur në këtë mënyrë, natyra redox e fotosintezës është më e dukshme.:



Kjo ndarje në reaksione oksidimi dhe reduktimi çon në një numër parashikimesh të rëndësishme. Së pari, ajo sugjeron, që të dy proceset mund të ndahen fizikisht ose në kohë. Një parashikim i dytë është, se oksigjeni i prodhuar nga fotosinteza, që zhvillon oksigjen, vjen nga H_2O dhe jo nga CO_2 . Van Niel imagjinonte saktë se reaksionet e oksidimit dhe reduktimit, Eqs. 2.1.4a e 2.1.4b, nuk ishin proceset primare të kryera nga drita, por ishin, më tepër, rezultati i një oksiduesi primar dhe i reduktuesi, gjeneruar në dritë, të cilët vazhdojnë të reagojnë me substratet për të formuar produktet.

Reaksioni Hill: ndarja e reaksioneve të oksidimit dhe reduktimit

Më 1930, Robert (Robin) Hill, kur po përpiqej të përcaktonte nëse një kloroplast i izoluar ishte i aftë për procesin e plotë të fotosintezës, tregoi se ishte e mundur të rivendosen shpejtësi të larta të zhvillimit të oksigjenit në suspensione kloroplasti, nëse këto të fundit pajisen me ndonjë akceptor artificial të elektroneve (Hill, 1939). Reduktimi i akceptoreve artificialë me prodhimin e njëkohshëm të O_2 njihet sot si reaksioni Hill, një shembull jepet në Eq. 2.1.5:



Hill mati O_2 në një mënyrë gjeniale, pavarësisht instrumentave primitivë. Hill bëri një zbulim fundamental: pikërisht, që ishte e mundur të zëvendësohet reduktimi i CO_2 me reduktimin e akceptoreve artificiale të elektroneve, duke rivendosur kështu shpejtësi të larta të prodhimit të O_2 . Komponimi fiziologjik që vepron si akceptor i drejtuar me dritë i elektronit, që lehtëson prodhimin e CO_2 , është $NADP^+$. Forma e reduktuar e këtij komponimi, NADPH, më pas shërben si reduktues për asimilimin e CO_2 .

2.1.4 Eksperimentet Emerson dhe Arnold

Robert Emerson dhe William Arnold ishin shkencëtarët e parë, që shfrytëzuan përdorimin e flasheve shumë të shkurtra të dritës për të studjuar fotosintezën. Në atë kohë (1932) kjo ishte jashtëzakonisht e vështirë teknikisht. Emerson dhe Arnold ndërtuan aparatin e tyre dhe matën evolucionin e oksigjenit duke përdorur manometra. Me këtë pajisje, ata ishin të aftë të merrnin kohëzgjatje të flashit të shkurtër sa $10\mu s$.

Në serinë e parë të eksperimenteve (Emerson and Arnold, 1932a), ata ndryshuan kohën midis flasheve dhe gjetën se, nëse kishte një kohë të gjatë midis flasheve, atëherë rendimenti i O_2 për flash ishte i pavarur nga koha midis flasheve dhe nuk varet nga temperatura në intervalin 1 deri $25^\circ C$ (figure 2.1.1). Për kohë më të shkurtra midis flasheve, rendimenti ra në mënyrë dramatike në temperaturë më të ulët, por nuk ndryshoi në temperaturë më të lartë. Ky rezultat u interpretua në mënyrë elegante si *dëshmi se fotosinteza përfshinte bashkë një fazë të ndriçuar dhe një fazë të errët*. Faza e ndritshme, të cilës tani i referohemi si një reaksion fotokimik, mund të ndodhë ekstremisht shpejt dhe nuk varet nga temperatura. Faza e errët, e cila tani njihet si një seri reaksione enzimatike, është më e ngadalshme dhe, ashtu si shumica e reaksioneve kimike, varet nga temperatura për të vazhduar.

Për serinë e dytë të eksperimenteve, Emerson dhe Arnold ndryshuan intensitetin e dritës së flasheve, duke përdorur një interval mes flasheve, të cilin ata e njihnin nga seria e parë e eksperimenteve, ishte mjaftueshëm i gjatë, që reaksionet enzimatike në të errët të vazhdojnë dhe përfundojnë. Ky protokoll eksperimental ju dha mundësi atyre të izolojnë reaksionin fotokimik dhe të studiojnë atë pa ndërhyrje (interferenca) nga hapat e mëvonshëm. Në intensitete shumë të ulta rendimenti i O_2 për flash ishte i ulët dhe varej linearisht nga energjia e flashit (dritës). Megjithatë, në intensitete më të larta, kurba arrinte ngopje, kështu që energjia shtesë e flashit nuk dha O_2 shtesë (figure 2.1.2).

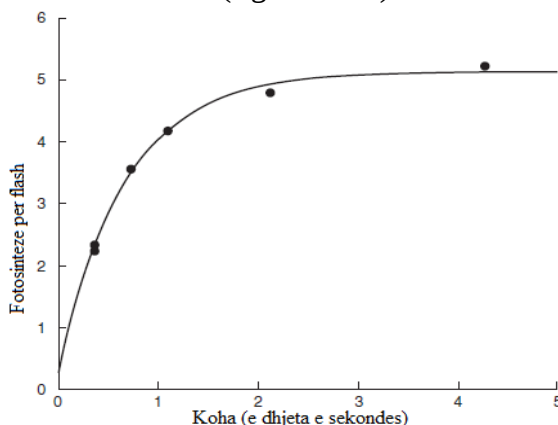


Fig. 2.1.1 Eksperimenti Emerson dhe Arnold, krijon një fazë të ndritshme dhe një fazë në të errët të fotosintezës. Pershtatur nga Emerson and Arnold (1932a).

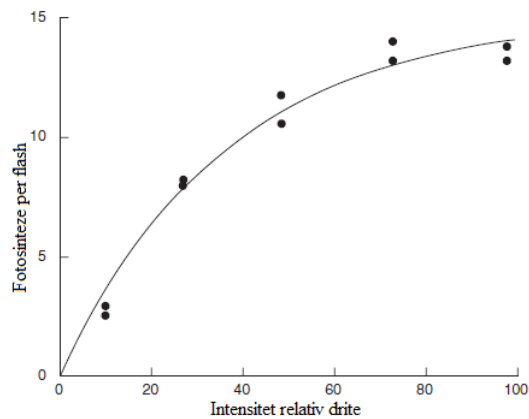


Fig. 2.1.2 Eksperimenti Emerson dhe Arnold, krijohet kurba e ngopjes së dritës për fotosintezën në flashing light. Pershtatur nga Emerson and Arnold (1932b).

Bukuria e eksperimentit qëndron në faktin se Emerson dhe Arnold bënë përpjekje të mëdha për të marrë një masë sasiore për atë se sa O_2 u prodhuan për klorofil në mostër. Në atë kohë, vetitë sasiore absorbuese të klorofilit nuk ishin të njohura mirë, kështu Emerson dhe Arnold duhej ta determinonin këtë, për të ditur se sa molekula klorofili ishin në mostrën e tyre. Matja e sasisë së O_2 të prodhuar ishte më e lehtë, duke shfrytëzuar volumin e përfutur dhe vetitë e njohura të gazeve.

Rezultati final ishte surprizues. **Vetëm një O_2 ishte prodhuar për çdo 2500 molekula klorofili**, shumë më pak se një për klorofil, siç pritej! Gjetjet e tyre ishin të vështira për t'u pajtuar me mendimin e përbashkët, në kohën, kur çdo molekulë klorofili direkt redukton CO_2 . Pas shumë vite rëndësia e vërtetë e këtij eksperimenti u vlerësua. Tani dihet, se **pjesa më e madhe e molekulave të klorofilit veprojnë si antenë** dhe funksionojnë vetëm për të mbledhur dritën, duke transferuar energjinë në një molekulë speciale klorofili (e cila është pjesë e një kompleksi proteine të njohur si qendra e reaksionit), që në fakt bën fotokiminë.

2.1.5 Polemika mbi kërkesën kuantike të fotosintezës

Në vitet 1940 e 1950, në fushën e fotosintezës konstatohet një polemikë mbi kërkesën minimale kuantike për të. **Kërkesa kuantike është numri i fotoneve, që duhet të absorbohen, për të kryer një proces fotokimik.** Kjo është reciproke me rendimentin kuantik. Otto Warburg mbështeste idenë se kërkesa minimale kuantike për fotosintezë ishte 3-4 fotone për O_2 të evoluuar. Në parim, gjithë të tjerët, marrin vlera shumë më të larta, në diapazonin e 8-10 fotone për O_2 të prodhuar.

Rezultati i kësaj mosmarrëveshje ishte thelbësor për zhvillimin e një kuptimi më të thellë të mekanizmit bazë kimik të fotosintezës. Diskutimi reduktohet në problem energjetik. Përmbajtja e energjisë e tre fotoneve që Warburg mendonte se ishin gjithçka që nevojitej, është mezi e mjaftueshme për t'u kalkuluar diferenca e energjisë së lirë midis reagentëve dhe produkteve (tabele 2.1). Ky rezultat përkonte me pikëpamjen e tij romantike të shekullit të nëntëmbëdhjetë per natyrën: "Në një botë perfekte fotosinteza duhet të jetë perfekte." Ideja e Emerson ishte më praktike dhe mijëra matje të mëvonshme në shumë laboratorë mbështetën numrin e tij më të lartë për kërkesën kuantike për fotosintezë. Procesi është, për pasojë, jo

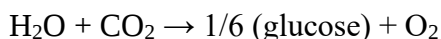
perfekt termodinamikisht, *por arrin të ruajë vetëm rreth 40% të energjisë së fotonit si energji kimike në formën e sheqernave dhe oksigjenit*. Kjo është ende një efikasitet jashtëzakonisht i lartë i ruajtjes së energjisë për një sistem fotokimik.

Tabele 2.1 Efikasiteti i fotosintezës

Cili është efikasiteti i konvertimit të energjisë fotosintetike? Përgjigja varet nga - saktësisht çfarë lloji të efikasitetit kemi parasysh. Nëse ai është efektiviteti kuantik në intensitete drite të ulëta deri në të mesme, atëherë përgjigja është pothuajse 100%, pasi gati çdo foton i absorbuar drejton fotokimi. Nëse ai është fraksioni i energjisë diellore, që arrin Tokën, që konvertohet në biomasë, atëherë numri është vetëm 0.2% (Hall and Rao, 1999). Ndoshta llogaritja më informative ka të bëjë me përqindjen e energjisë së absorbuar nga një organizëm fotosintetik, që vepron në kushte ideale, e cila ruhet si karbohidrate dhe oksigjen. Për të bërë këtë llogaritje, është e nevojshme të dihet si energjia, e ruajtur si energji kimike, ashtu edhe energjia e dhënë si energji e fotonit. Për të llogaritur sasinë e parë, përdorim ekuacionin:

$$\Delta G^0 = \Sigma(\Delta G^0_{\text{f products}} - \Delta G^0_{\text{f reactants}})$$

dhe energjitë e lira të formimit të disa komponimeve kimike të rëndësishme në fotosintezë, të tabeluara. Duhet të përdoret ekuacioni i balancuar kimik i fotosintezës. Këtu do të shkruajmë këtë ekuacion në terma të prodhimit të një molekule O_2 , pasi në këtë mënyrë tradicionalisht llogariten matjet e kërkesës kuantike.



Pra, gjendja standarde e energjisë së lirë të ruajtur është:

$$\Delta G^0 = 1/6 \Delta G_r^0 \text{ (glucose)} + \Delta G_r^0 (O_2) - \Delta G_r^0 (H_2O) - \Delta G_r^0 (CO_2)$$

$$\Delta G^0 = 1/6 (-914.54) + (0) - (-237.19) - (-394.38)$$

$$\Delta G^0 = + 479.1 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Kjo duhet të krahasohet me hyrjen (input) e energjisë nga drita. Warburg mati kërkesat kuantike për prodhimin e O_2 deri në 3. Përmbajtja e energjisë së dritës mund të llogaritet nga një version pak i modifikuar i Eq. A3, $E=hc / \lambda$:

$$E = (Q_R) (hc/\lambda) N_A$$

ku Q_R është kërkesa kuantike dhe N_A është numri i Avogadros, $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$. Nevojitet të shumezohet me numrin e Avogadros, sepse llogaritja termodinamike është bërë për një mol të molekulave, ndërsa Eq. A3 aplikohet në një foton të vetëm të dritës, i marrë për këtë llogaritje të jetë në 680 nm. Duke zëvendësuar vlerat e parametrave, marrim një input energjie prej $528.5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Efikasiteti, rrjedhimisht, është $(479.1/528.5) \times 100$, ose afërsisht 91%.

Vlerat konsensuale bashkëkohore për kërkesën kuantike të fotosintezës oksigjenike janë 9-10. Duke përdorur 10 për llogaritjen, merret një kontribut energjetik prej $1761.4 \text{ kJ mol}^{-1}$, i cili jep një efikasitet të ruajtjes së energjisë prej 27 %. Per vlerën 27 % mund të krijojmë një mendim, duke e krahasuar atë me efikasitetin e konvertimit të energjisë së qelizave gjysmëpërçuese diellore, të cilat rrallë tejkalojnë 10 %. Në të vërtetë, 27 % përfaqëson një efikasitet maksimal të dritës monokromatike të absorbuar në kushte ideale. Kur efikasiteti, që mund të pritet në kushte të fushës, llogaritet duke përdorur spektrin e ploteë diellor të rrezatimit, dhe përfshihen humbje të ndryshme, efektiviteti i vlerësuar bie në rreth 5 % (Bolton and Hall, 1979).

Mendohet se, rezultatet kanë të bëjnë me bashkëveprime të fotosintezës dhe frymëmarrjes (respirimi). ***Matja tregon vetëm prodhimin neto të oksigjenit; për të marrë shpejtësinë e fotosintezës është e nevojshme të korrigjohet me shpejtësinë e frymëmarrjes.*** Nëse shpejtësia e frymëmarrjes është e pandryshuar midis dritës dhe errësirës, ky korrigjim do të jetë i saktë; por nëse fotosinteza inhibon frymëmarrjen (siç sugjerojnë disa prova moderne), korrigjimi do të çojë në vlera të ulta për kërkesën kuantike.

Në procesin e ekzaminimit tërësor të kushteve të nevojshme për matjen e kërkesës kuantike për fotosintezë, u bënë disa zbulime të reja të rëndësishme, të cilat çuan në një kuptim shumë më të thellë. Kryesori mes tyre ishin fenomenet e njohura si "rënia e kuqe" dhe forcimi ("red drop" and "enhancement").

2.1.6 Rënia e kuqe dhe efekti Emerson i forcimit

Emerson e bashkëpunëtorë bënë matje të kujdesshme të kërkesave kuantike për fotosintezë si funksion i gjatësisë së valës. Ndërsa gjatësia e valës së dritës, e përdorur për eksperiment, u afrua në kufirin e kuq të absorbimit të klorofilit, kërkesa kuantike u rrit në mënyrë dramatike. Spektri i veprimit për fotosintezë është i ngjashëm me spektrin absorbues përgjatë pjesës më të madhe të diapazonit të dukshëm të gjatësisë së valës, por bie më shpejt në këtë farred rajon (figure 2.1.3). Një spektër veprimi është një grafik i efikasitetit të dritës, që shkakton një efekt të dhënë, në këtë rast evolucionin e oksigjenit, kundrejt gjatësisë së valës së dritës. Kjo ulje në rendimentin kuantik (reciprok i kërkesës kuantike) në gjatësi vale të mëdha u bë e njohur si "rënia e kuqe". Interpretimi i rënies së kuqe është - ato molekula të klorofilit që absorbojnë dritën në skajin ekstrem të kuq të bandës absorbuese nuk bëjnë fotosintezë kaq efikase sa klorofilet që absorbojnë dritën e gjatësive më të vogla të valës. Klorofilet me gjatësi vale të madhe silleshin disi ndryshe.

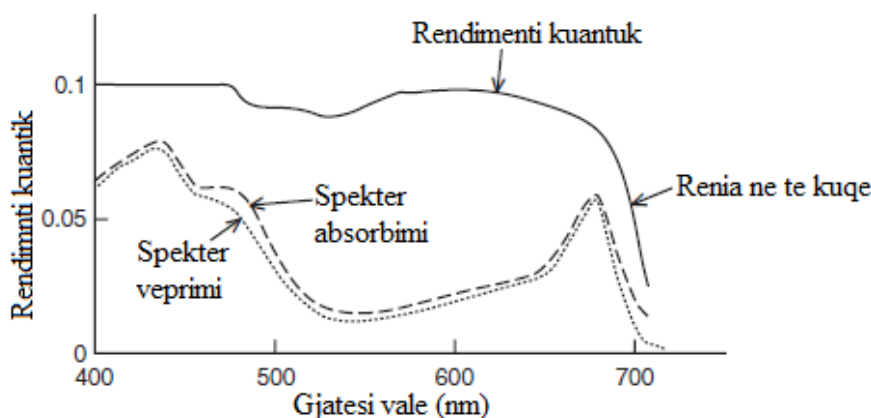


Fig. 2.1.3 Spektri i absorbimit të kloroplasteve (linjë e ndërprerë) dhe spektri i veprimit për fotosintezën (linjë me pika). Rënia e kuqe në rendimentin kuantik të fotosintezës (linjë solide).

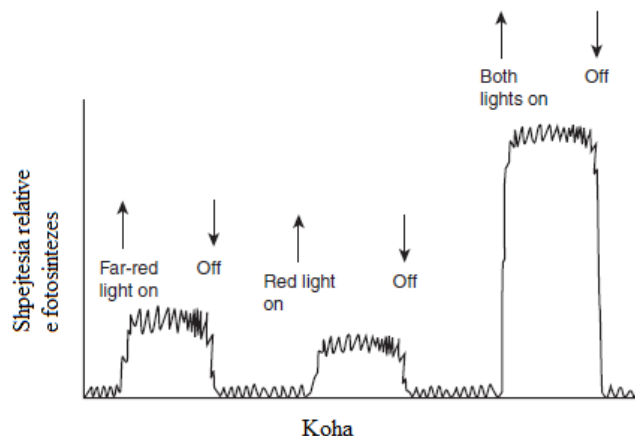


Fig. 2.1.4 Efekti Emerson i rritjes. Shpejtësia e fotosintezës, kur bashkë drita red dhe far-red ndriçojnë provën është më e madhe se shumica e shpejtësive kur secila aplikohet në mënyrë individuale.

Një tjetër eksperiment nga Emerson dhe kolegë ishte edhe më i çuditshëm (Emerson et al., 1957): ai gjeti se, nëse drita e paefektshme me gjatësi vale të madhe plotësohej me dritë me gjatësi vale më të shkurtër, ajo papritmas bëhet e aftë të drejtojë fotosintezë me shpejtësi të mirë. Eksperimenti u realizua siç tregohet në figure 2.1.4. Një mostër e algave u ndriçua me dritë të kuqe dhe intensiteti u rregullua për të dhënë një shpejtësi të caktuar të prodhimit të O_2 , e matur si gjithmonë duke përdorur një manometër. Kjo dritë më pas u fik, dhe në provë u drejtua një burim i dytë drite, këtë herë dritë inefficente far-red. Intensiteti i kësaj drite u rregullua për të dhënë një shpejtësi të prodhimit të O_2 të krahasueshme me atë të dritës së kuqe. Kjo kërkonte që intensiteti i dritës far-red të rritet konsiderueshëm, siç pritej nga eksperimentet e hershme që kishin treguar efekt të dobët të saj. Rezultati surprizues ishte se, kur të dy rrezet e dritës u drejtuan në mostër në të njëjtën kohë, shpejtësia e prodhimit të O_2 u rrit konsiderueshëm dhe ishte shumë më e lartë se shumica e dy shpejtësive individuale! Ky rezultat u bë i njohur si “enhancement effect” (efekti i rritjes). Eksperimente plotësuese nga Jack Myers and Stacey French (1960) treguan se enhancement funksiononte edhe kur dy rrezet e dritës nuk ishin prezente në të njëjtën kohë.

2.1.7 Efektet antagonistë

Një eksperiment final, i cili piketoi mendimin për ekzistencën e dy sistemeve të veçanta fotokimike, që punonin në seri në organizmat fotosintetikë, u krye nga Louis Duysens dhe kolegë (Duysens et al., 1961). Duysens ishte pionier në zhvillimin e metodave sensitive spektrofotometrike për monitorimin e sistemeve fotosintetike. Eksperimenti bëhej për të matur gjendjen e oksidim - reduktimit të citokromit f në provën nën ndriçim, duke përdorur gjatësi vale të ndryshme të dritës. Kur citokromi reduktohet, spektri i absorbimit ndryshon, duke lejuar matje sasiore të gjendjes së tij redox. (figure 2.1.5). Duysens zbuloi se drita far red shkaktoi oksidim të citokromit, ndërsa drita me gjatësi vale më të shkurtër shkaktoi reduktim të tij. Dy ngjyrat e dritës kishin efekte të kundërta, ose antagonistë.

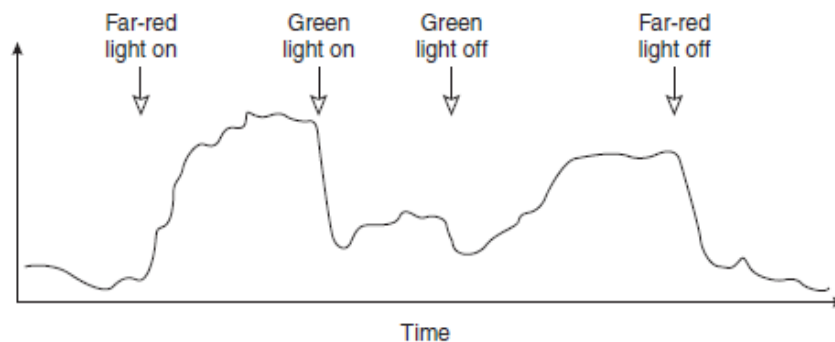


Fig. 2.1.5 Efektet antagoniste në oksidimin e citokromit. Rrezatimi me dritë njëngjyrëshe bën që citokromi të bëhet më i oksiduar, ndërkohë që rrezatimi me dritë me ngjyrë të ndryshme shkakton reduktimin e tij. Përshtatur nga Duysens et al., 1961.

Ky eksperiment ishte prova më e qartë e hershme për dy sisteme fotokimike të lidhura në seri në organizmat oksigjenik fotosintetik.

2.1.8 Formulime të hershme të Z skemës për fotosintezën

Gjithë këto eksperimente e shumë të tjera u kristalizuan në një formulim të qëndrueshëm për fotosintezën rreth vitit 1960. Robin Hill and Fay Bendall propozuan konceptin e dy sistemeve të njëpasnjëshme fotokimike të rregulluara kështu që produktet e një sistemi të jenë substrate të sistemit tjetër (Hill and Bendall, 1960). Formulimi i tyre bazohej kryesisht në vëzhgimin, se redox potencialet për dy citokrome, të gjendura në kloroplaste, ishin të ndërmjetme midis potencialeve si të reduktantit (H_2O), ashtu dhe oksidantit ($NADP^+$), të përfshirë në fotosintezë. Që ata të jenë pjesëmarrës në fluksin elektronik të drejtuar nga drita, ishte e nevojshme të propozohen dy procese fotokimike dhe një hap energjitikisht zbritës i ndërmjetëm. Skema e tyre origjinale është paraqitur në figure 2.1.6. Ajo njihet si **Z skema e fotosintezës**.

Publikimi pak më vonë nga Duysens dhe bashkëpunëtorë siguroi dëshmi të qënësishme eksperimentale për këtë propozim, në formën e efekteve antagoniste, të përshkruara më sipër. Një reaksion fotokimik, i njohur tani si fotosistemi 2, oksidon ujin dhe redukton citokromin f , ndërsa tjetri, i njohur aktualisht si fotosistemi 1, oksidon citokromin f dhe redukton $NADP^+$ (Duysens et al., 1961, Duysens, 1989).

Rezultatet e efektit të rënies së kuqe dhe forcimit shpjegohen lehtë me këtë formulim të dy reaksioneve fotokimike, të lidhura në seri, nëse spektrat e absorbimit të pigmenteve, që sigurojnë energji për to, nuk janë të njëjtë. Klorofilet me gjatësi vale më të shkurtër preferencialisht drejtojnë PhS 2, ndërsa pigmentet me gjatësi vale më të gjatë, preferencialisht drejtojnë PhS 1. Shpejtesitë optimale të fotosintezës vërehen, kur ka gjatësi vale të shkurtëra dhe të gjata, siç gjendet në eksperimentet e forcimit. Drita e absorbuar nga pigmentet me gjatësi vale të gjatë nuk ka energji të mjaftueshme për të drejtuar PhS 2, kështu që gjithë sistemi ndalon nëse përdoret vetëm drita far-red, duke shpjeguar kështu fenomenin e rënies së kuqe.

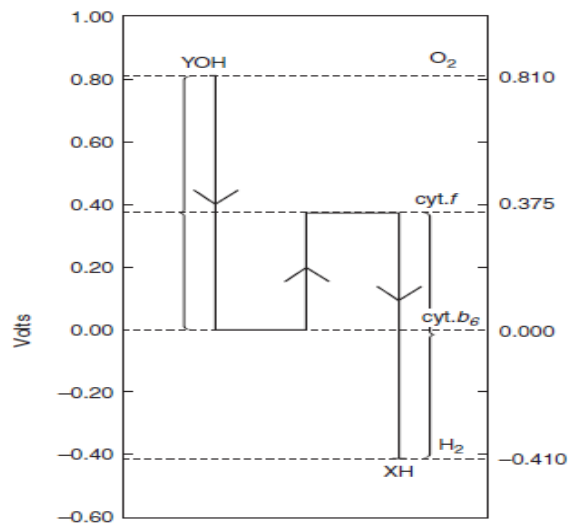


Fig. 2.1.6 Formulimi origjinal i Hill dhe Bendall i Z skemës për fotosintezën.

Të dy fotosistemet janë të ndarë, biokimikisht të pastruar dhe strukturat e tyre janë të përcaktuara. Proteinat, që i përbëjnë ato, janë identifikuar, dhe gjenet, që kodifikojnë ato, janë identifikuar dhe renditur. Ndërkaq, mbeten shumë çështje rreth se si bashkëveprojnë të dy fotosistemet dhe se si është rregulluar bashkë inputi i energjisë në to nga antenat dhe fluksi elektronik midis tyre. Z skema është një tipar esencial i të kuptuarit modern të fotosintezës. Natyrisht, ekzistojnë disa lloje organizmash fotosintetike, që përmbajnë pigmente klorofile dhe shfaqin rritje (zhvillim) të varur nga drita, por nuk zhvillojnë oksigjen. Kemi përmendur më parë formulimin e van Niel për redox natyrën e fotosintezës. Këto organizma nuk shfaqin asnjë nga efektet e forcimit ose rënies së kuqe të përshkruar më sipër, të cilat çuan në zbulimin e dy fotosistemeve në organizmat që zhvillojnë oksigjen, gjë që sugjeron se ato kanë një lloj të vetëm fotosistemi. Studimet biokimike dhe gjenetike konfirmojnë se këto organizma, të cilat janë të gjitha baktere, në të vërtetë kanë vetëm një lloj të vetëm fotosistemi. Këto organizma fotosintetike më primitive kanë qenë esenciale në studimin e mekanizmave bazë kimikë të fotosintezës dhe gjithashtu janë gjurmë si mund të ketë lindur dhe evoluar versioni me dy-fotosisteme i fotosintezës, që gjendet në organizma më të avancuar.

2.1.9 Formimi i ATP dhe fiksimi i karbonit

Deri këtu, u fokusuam së pari në procesin e përgjithshëm të fotosintezës dhe më pas në zbulimet që çojnë deri në zbulimin e transportit të elektroneve në organizmat fotosintetike që zhvillojnë oksigjen, me rezultat reduktimin e NADP^+ në NADPH . Formimi i ATP dhe proceset pasuese të përdorimit të këtyre dy produkteve për reduktim të CO_2 deri në karbohidrate janë zbuluar paralelisht me zbulimet e proceseve të transferimit të elektroneve.

Zbulimi se kloroplastet mund ta bënin ATP në një mënyrë të varur nga drita u bë në vitin 1954 nga Daniel Arnon dhe bashkëpunëtorë në Universitetin e Kalifornisë, Berkeley (Arnon et al., 1954). Ideja që kloroplastet mund ta bënin ATP, në një proces të quajtur fotofosforilim, fillimisht u takua me rezistencë, sepse dihej mirë se mitohondria prodhonte sasi të mëdha ATP (Arnon, 1984). Një zbulim analog i formimit të ATP të drejtuar nga drita në purple

bacteria që nuk evolon oksigjen ishte bërë nga Howard Gest and Martin Kamen në vitin 1948. Hipoteza kimiosmotike, kuadri teorik për mekanizmin se si energjia e fotonit ruhet në ATP, u sigurua nga analiza e Peter Mitchell në vitet 1960 dhe 1970.

Në të njëjtën kohë afërsisht kur Arnoni demonstroi fotofosforilimin, Melvin Calvin e bashkëpunëtorë po punonin për të detektuar detajet e procesit të asimilimit të karbonit. Ata sqaruan reaksionet enzimatiske që konvertojnë CO_2 dhe fuqinë asimiluese në karbohidrate. Ky kompleks reaksionesh janë bërë të njohura si **cikli Calvin**. Sqarimi brilant i këtij grupi kompleks reaksionesh u bë me metodën e zhvilluar rishtaz të gjurmuesve radioaktivë, duke injektuar alga me $^{14}\text{CO}_2$ dhe pastaj duke ndjekur rrugën e radioaktivitetit në produktet.

2.2. MEKANIZMAT E TRANSFERIMIT TE ELEKTRONIT NË BIOSTRUKTURA

Përmbledhje

Një trajtim i shkurtër dhe i thjeshtuar i analizës teorike të reaksioneve të transferimit të elektroneve në biostruktura paraqitet në vijim. Reaksionet e transferimit të elektroneve janë me rëndësi të pazëvendësueshme për shumë transformime biologjike - nga fotosinteza te frymëmarrja aerobe. Proceset dinamike në fiziologjinë e fotosintezës, me akcent në mekanizmat molekularë të fotosintezës, janë investiguar këtu. Materiali është paraqitur duke kombinuar pamjen e përgjithshme me elementët specifik, detajin. Fillohet me disa parime të përgjithshme fizike, më tej, kuadri teorik zgjerohet me detaje nga struktura e kompleksit, që lidhet me rrugën dhe kinetikat e proceseve të transferimit të elektroneve. Dihet se sistemi bërthamor i makromolekulave karakterizohet nga një spektër i gjerë i llojeve të ndryshme të lëvizjes intramolekulare. Në këtë trajtim ne interesohemi për mënyrën, në të cilën gjatë tranzitimit elektronik - përfshi transferimin e elektroneve ose migrimin e energjisë së rritur elektronike, ndodh ndërveprimi me gradët e lirisë vibracionale. Ky paraqitet si mjet për adresimin e mekanizmit të ndërveprimeve elektron-konformacionit, ku bazohet funksionimi i biomakromolekulave.

2.2.1.Hyrje

Teoria e reaksionit të transferimit elektronik (ET) lidhet me fizikën kimike dhe biologjike, ndërkohë reaksionet biologjike të transferimit elektronik kanë qenë subjekt i një analize të gjerë eksperimentale e teorike në një spekter të gjerë sistemesh (Marcus and Sutin 1985; Moser et al., 1992; Bendall 1996; Gray and Winkler, 1996), nga fotosinteza në frymëmarrjen aerobe.

Fotosinteza është një proces biologjik, në të cilin energjia e Diellit kapet dhe ruhet nga një seri ngjarjesh, që konvertojnë energjinë e pastër të dritës në energjinë biokimike, të nevojshme për të ushqyer jetën, ATP (Adenosine Triphosphate) (Blankenship 2014). Sistemet antenë dritë-mbledhëse funksionojnë të absorbojnë dritën dhe të transferojnë energjinë e dritës në një kurth, i cili shuan apo çaktivizon gjendjen e ngacmuar (Blankenship 2014). Kurthi është vet qendra e reaksionit dhe, në shumicën e rasteve, gjendja e ngacmuar shuhet nga fotokimija me ruajtje energjie. Në disa raste, shuarja bëhet nga proces tjetër, siç është konversioni i brendshëm ose fluoreshenca.

Duke migruar nëpër antenë, energjia transferohet në molekulën e klorofilit në qendrën e reaksionit fotosintetik P680, dhe elektroni i ngacmuar nga klorofili kalon tek akseptori - pheophytin (FeO). Njëherë të ndodh ndarja fillestare e ngarkesave, një çift radikal ($P680^{+}-FeO^{-}$) mund të krijohet.

Komplekse të qendrës së reaksionit janë pigment-proteina integrale të membranës, të cilat përshkojnë membranën në mënyrë vektoriale. Këto komplekse janë bërthama e fotosintezës. Gjithë qendrat e reaksionit të komplekseve fotosintetike kryejnë reaksione dritë-drejtuese të transferimit të elektroneve (ET), që shpie në ndarje ngarkese nëpër membranë. Me tej, disa

qendra reaksioni, gjithashtu, pompojnë protonet, të cilat lidhen me reaksionet e transferimit elektronik.

Vetitë kimike të një molekule të ngacmuar mund të jenë shumë të ndryshme nga ato të së njëjtës molekulë në gjendje bazë. Në veçanti, potenciali oksido-reduktues për elektronet, qoftë kur i shtohet molekulës ose i hiqet asaj, është shumë i ndryshëm në gjendjen e ngacmuar, krahasuar me gjendjen bazë. Rezultati është se molekula e ngacmuar është një agjent jashtëzakonisht i fortë reduktimi, i cili lehtë i jep një elektron molekulës së afërt akceptor elektronesh. Kjo gjendje e ngacmuar e procesit ET është procesi i parë fotokimik i fotosintezës dhe energjia e dritës shndërrohet në energji kimike.

Në fund, mund të merret një dimer i oksiduar i klorofilëve dhe një molekulë e reduktuar - akceptor elektroni. Gjendja e çiftit jonik fillestar përbehet nga dimeri i oksiduar, tani i ngarkuar pozitivisht dhe akceptor i reduktuar, tani i ngarkuar negativisht. Ky, megjithatë, është një sistem shumë i paqendrueshëm dhe energjia humbet lehtësisht nëse nuk stabilizohet nga procese sekondare pasuese. Pasi ndodh procesi i transferimit fillestar elektronik, sistemi mund të ndodhet në një moment kritik. Donori primar i oksiduar i elektronit pozicionohet pranë akceptorit të reduktuar. Bazuar në ligjet e termodinamikës, elektroni mund thjeshtë të kthehet mbrapa tek donori. Ky proces rikombinimi çon në konvertimin e gjithë energjisë së fotonit në nxehtësi, pa ndonjë mundësi që të ruhet. Seritë ultrafast të reaksioneve dytësore të elektroneve ndajnë llojet e oksiduara dhe të reduktuara duke lejuar ruajtjen e energjisë. Si rezultat ngarkesat pozitive dhe negative ndahen nga njëri-tjetra, dhe shanset për rekombinim pakësohen konsiderueshëm. Nëse reaksionet sekondare të stabilizimit janë shumë më të shpejta se procesi i rekombinimit, shumica e komplekseve do të shmangin rekombinimin dhe mund të përftoheshin produkte të qëndrueshme. Prandaj, fokusi është në disa reaksionet e para pas ngacmimit të çiftit special.

Pas ngacmimit të çiftit special, gjendja e ngacmuar e P870 ka një jetëgjatësi (lifetime) prej rreth 3 ps në temperaturë dhomë, duke u zvogëluar në rreth 1 ps në temperatura kriogjenike. Kjo gjendje e ngacmuar (P870*), një reduktues shumë i fortë, monitorohet në mënyrë të përshtatshme duke matur emisionin e stimuluar në rajonin 900 nm. Ajo zbërthehet fillimisht duke humbur një elektron, për tu bërë radikal i kationit $P870^+$. Sa herë që një pigment është ngacmuar ose fiton a humbet një elektron, bandat e tij të absorbimit në gjendjen bazë zbehen. Banda të reja absorbimi, karakteristikë e llojeve të ngacmuara, të oksiduara ose të reduktuara, do të shfaqen njëkohësisht me zbehjen e bandave në gjendjen bazë. ***Analiza e këtyre ndryshimeve spektrale ndihmon në sqarimin e rrugës së transferimit të elektroneve.***

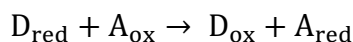
Qendra e reaksionit kryen fotokimi dhe disa reaksione fillestare stabilizimi, por procese plotësuese duhet të kryhen përpara ruajtjes afatgjatë të energjisë. Këtu, zinxhiri i transportit të elektroneve do të ishte i një rëndësie primare. Transportuesit e qëndrueshëm të elektroneve në anët akceptore dhe donore të PhS 2 janë larg njeri-tjetrit, gjë që pengon mundësinë e rekombinimit të ngarkesave të ndara, dhe ky është kusht për përdorimin efektiv të energjisë së ngacmimit elektronik, që ruhet nga PhS 2 në statet pasuese të fotosintezës (Jones and Fyfe 2001).

Kështu, sekuenca fillestare e reaksioneve redoks çon në transferimin e elektroneve nëpërmjet bartësve të tyre të mëtejshëm me një potencial redoksi në rritje.

Puna e pompës rrit gradientin paraprak të përqendrimit të protonit mbi membranën tilakoide, e cila është forca lëvizëse e procesit të sintezës së ATP (Kramer *et al.*, 2004).

Tranzitimet e elektroneve janë një klasë e rëndësishme e reaksioneve kimike dhe biologjike. Përshkrimi teorik i ET biologjike është rritur nga puna pioniere e Marcus (1965) and Marcus and Sutin (1985). Marcus (1965) raportoi rreth teorisë për trajtimin e shpejtësive në reaksionet e transferimit të elektroneve të sferës së jashtme. Këtu, ai derivoi disa shprehje shumë të dobishme, njëra prej të cilave njihet si ekuacioni Marcus. Veç kësaj, u aplikua teoria e transferimit të elektroneve dhe ai vendosi që faktorët e ndryshëm, në veçanti, madhesi të tilla si energjia standarde e lirë e reaksionit, energjia e riorganizimit për ndryshime vibracionale dhe tretësire, distanca e ndarjes r , dhe kushtet e veprimit (p.sh., ndërveprimet kuloniale) ndikojnë në shpejtësinë e reaksioneve të transferimit elektronik, Marcus (1965).

Procesi ET mund të shihet si një proces relaksimi joradiativ nga një gjendje fillestare me donor elektroni (D) të reduktuar dhe akceptor (A) të oksiduar në një gjendje përfundimtare me donor të oksiduar dhe akceptor të reduktuar, sipas:



Formulimi teorik për transferimin e energjisë, i cili është pastër i zbatueshëm për pigmente të lidhura dobët të sistemeve fotosintetike, është mekanizmi Förster. Ky mekanizëm Förster i transferimit të energjisë është një proces joradiativ rezonance transferimi. Procesi i transferimit të energjisë bëhet një nga proceset e shumta të mundshme (probabilitare) të shuarjes.

Në reaksionet e transferimit të elektroneve, rregulli i artë Fermi përshkruan konstanten e shpejtësisë të rendit të parë në procesin e transferimit të elektroneve. Rezultati në shumë aspekte është i ngjashëm me teorinë Förster të transferimit të energjisë (Blankenship, 2014). Një gjendje fillestare ku elektroni (ose ngacmimi) është lokalizuar bën një tranzicion joradiativ në një gjendje përfundimtare në të cilën elektroni (ose ngacmimi) është zhvendosur në një molekulë tjetër. Mund të plotësohet diferenca midis varësisë eksponenciale të distancës së transferimit të elektroneve dhe distancës në fuqi të gjashtë inverse varet nga procesi i transferimit të energjisë Förster. Kjo diferencë ndodh për shkak se transferimi i elektronit ndërmjetësohet nga lidhja, që pasqyron mbivendosjen e funksioneve valore të llojeve reaguese, të cilat në mënyrë karakteristike bien eksponencialisht, ndërsa procesi Förster ndërmjetësohet nga një bashkëveprim i lidhjes dipol-dipol.

Transporti i elektroneve mund të ndodhë në distanca relativisht të mëdha, pavarësisht lëvizjes translative të molekulave donore dhe akceptore të elektronit. Rrjedhimisht, këto procese mund të dallohen nga reaksionet e oksido-reduktimit në tretësirë. Ndërkohë, koncepti i gjysmëpërçuesit nuk është konfirmuar në sistemet biologjike (megjithatë, ka disa modifikime të këtij modeli). Aktualisht, ka interes të madh tunelimi elektronik midis molekulave të veçanta proteinë – vektorë të ndarë nga njeri tjetri nga barrierat energjetike. Një nga karakteristikat e kalimit tunel është realizimi i tij në distancë midis D dhe A të rendit 0,5 nm. Veçoria më e rëndësishme e transportit mbi barrierat të elektronit nëpërmjet mekanizmave tunel takohet edhe në temperatura të ulëta (temperaturë e azotit të lëngët 77K). Në këto kushte lëvizja translative e molekulave të mëdha proteinike ngadalësohet. Rrjedhimisht, mekanizmat e zakonshëm fiziko-kimik të reaksioneve në tretësira të llojit të

pjesëve që përplasen, të cilat posedojnë energji të tepërt kinetike, janë të paarrtshme në shpejtesi të lartë. Kështu, mekanizmi tunel mund të sigurojë transferim të elektroneve në kushte kur reaksionet Arrhenius të reaksion-aktivizimit "nuk punojnë", e cila eliminon tunelimin efektiv të elektroneve dhe në temperatura normale, konkuron me sukses me reaksionet e zakonshme të "aktivizimit".

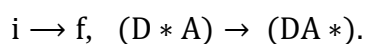
Transferimi tunel i një elektroni nuk kërkon zhvendosje mashtabe të molekulave të tëra, por shoqërohet me ndryshim në konfiguracionin e energjisë së ekuilibrit të sistemit për shkak të ndryshimeve në ngarkesat e gjendjes së molekulave dhe tranzitimin e sistemit në një tjetër sipërfaqe potenciale energjie. Në RC fotosintetike ky manifestohet në formën e varësisë së natyrës së transferimit në gjendjen konformacionale të komponenteve proteina të RC. Ky transferim lidhet gjithashtu me ndryshime konformacionale në komponentet e proteinave.

Sistemi bërthamor i makromolekulave karakterizohet nga varietet i gjerë i llojeve të ndryshme të lëvizjes intramolekulare. Interes të madh paraqesin mekanizmat e tranzitimit elektronik, përfshi transferim të elektroneve apo migrim të energjisë së elektronit të ngacmuar, bashkëveprim me gradët e lirisë vibracionale.

Proceset intramolekulare, të shoqëruara nga tranzicione të elektroneve, për përshkrimin e vet kërkojnë aparat të mekanikës kuantike (Rubin, 2004).

2.2.2. Transporti në një sistem me dy nivele

Konsiderojmë gjendjen fillestare të donorit dhe akceptorit, në sistemin DA, si elektro neutrale dhe në gjendje bazë elektronike. Për shkak të ngacmimeve, molekula donore ose elektroni i aneksuar në të nga sistemi i jashtëm, rezulton në gjendje jostacionare. Ndërkohë, për shkak të ndërveprimit midis donorit dhe akceptorit, ndodh tranzicioni midis gjendjeve fillestare (i) dhe finale (f) sipas skemës së mëposhtme:



Tranzicionet $i \rightarrow f$ mund të shoqërohen me ristrukturimin e konfigurimit të ekuilibrit bërthamor në sistemin (DA).

Këtu studjohet varësia e probabilitetit të tranzicionit nga karakteristikat e bashkëveprimit, parametrat e sistemit dhe kushtet e jashtme (temperatura).

Le të jenë D dhe A dy atome të njëjtë me dy nivele energjie, dhe gjendjet donore e akceptore përshkruhen nga funksionet valore φ_D dhe φ_A në gjendjen më të ulët të pangacmuar, respektivisht. Gjendjeve të sipërme u korrespondojnë funksionet φ'_D dhe φ'_A . Pranojmë se në momentin fillestar $t = 0$ sistemi ndodhet në gjendjen D'A me funksion valor $\psi_i = \varphi'_D \varphi_A$. Për shkak të ndërveprimit midis donorit D dhe akceptorit A, mund të ndodh një tranzicion në një gjendje afërsisht të përshkruar nga funksioni valor $\psi_f = \varphi_D \varphi'_A$.

Sipas principit të superpozimit në përafrimin me dy nivele, funksioni valor i plotë i sistemit DA ka formën:

$$\psi = C_i(t) \psi_i + C_f(t) \psi_f$$

këtu, koeficientët $C_i(t)$ dhe $C_f(t)$ varen nga koha, dhe katrori i modulit të tyre përcakton probabilitetin e gjetjes në gjendjet përkatëse i dhe f .

Gjendja fillestare e sistemit në mungesë të bashkëveprimit midis D dhe A përshkruhet me anë të funksioneve valore ψ_i dhe ψ_f :

$$\psi_i = \psi_i^0 \exp\left(-i \frac{E_i}{\hbar} t\right) = \psi_i^0 \exp(-i\omega_i t) \quad (2.2.1)$$

$$\psi_f = \psi_f^0 \exp\left(-i \frac{E_f}{\hbar} t\right) = \psi_f^0 \exp(-i\omega_f t)$$

Për të gjetur koeficientët $C_i(t)$ dhe $C_f(t)$ në prani të bashkëveprimit, duhet të zgjidhim ekuacionin jostacionar të Schrödinger:

$$i\hbar \frac{\partial \psi}{\partial t} = (\hat{H}_0 + \hat{U})\psi \quad (2.2.2)$$

dhe mund të merren dy ekuacione për gjetjen e koeficientëve $C_i(t)$ dhe $C_f(t)$. Supozojmë $\omega_i = \omega_f$:

$$i\hbar \frac{\partial C_i}{\partial t} = V_{if} C_f, \quad i\hbar \frac{\partial C_f}{\partial t} = V_{if} C_i \quad (2.2.3)$$

$$V_{if} = \int \psi_i^* \hat{U} \psi_f dt \quad (2.2.4)$$

këtu, V_{if} element i matricës bashkëvepruese.

Zgjidhja e ekuacionit (2) lejon të përcaktohen $|C_i|^2$ dhe $|C_f|^2$, d.m.th., probabiliteti që sistemi të ndodhet në gjendjet ψ_i dhe ψ_f për kushte fillestare $C_i(0) = 1$ dhe $C_f(0) = 0$:

$$|C_i(t)|^2 = \cos^2\left(\frac{|V_{if}|t}{\hbar}\right) \quad (2.2.5)$$

$$|C_f(t)|^2 = \sin^2\left(\frac{|V_{if}|t}{\hbar}\right)$$

Qartë, në një sistem dy - nivelesh me nivele resonance, ndodhin oshilacione kuantomekanike midis gjendjeve i dhe f ose shkëmbimi elektronik midis D dhe A me frekuencë $2\frac{|V_{if}|}{\hbar}$. Zgjidhja e problemit më të përgjithshëm për $\omega_i \neq \omega_f$ çon në një rezultat të ngjashëm, dhe amplituda e lëkundjeve mbetet e rendit të njësisë, nëse është kënaqur kushti:

$$|\omega_i - \omega_f| \leq \frac{|V_{if}|}{\hbar}$$

Kjo do të thotë se gjendja e rezonancës ruhet nëse nivelet e energjisë të gjendjeve fillestare dhe finale $E_i = \hbar\omega_i$ dhe $E_f = \hbar\omega_f$ përkojnë me saktësi me energjinë e bashkëveprimit, që shkakton tranzicionin. Nëse

$$|\omega_i - \omega_f| \gg \frac{|V_{if}|}{\hbar}$$

atëherë amplituda e oshilimit $|C_f|^2$ bëhet e rendit

$$|V_{if}|^2/\hbar^2(\omega_i - \omega_f) \ll 1$$

dhe tranzicioni $i \rightarrow f$ praktikisht nuk ndodh.

Në sistemin me dy nivele diskrete, madje edhe në prezencë të rezonancës nuk mund të realizohet ET ose energji e pakthyeshme. Këtu, midis gjendjeve i dhe f lindin goditje kuantike-mekanike, të cilat nuk lejojnë fiksime të pastër në akceptor të energjisë së ngacmimit apo elektronik. Për të garantuar pakthyeshmëri të transferimit nevojitet të përfshihen disa procese dissipative (të shpërndarjes), gjatë të cilave një pjesë e energjisë së ngacmimit (elektroni) shpërndahet ndërkohë në akceptor. Nëse kjo çon në një "detunim" (çregjistrim) frekuence larg nga një gjendje rezonance të niveleve të rezonancës në akceptor dhe donor për një kohë, më të vogël se $\hbar/2 |V_{if}|$, atëherë transferimi i kundërt nga akceptor në molekulën donore bëhet praktikisht i pamundur; prandaj, pakthyeshmëria e tranzicionit është për shkak të lidhjes midis sistemeve dinamike (elektronik) dhe dissipative, të konsideruar.

2.2.3. Efekti tunel

3.1 Mekanizmi

Prezantimet fizike, lidhur me problemin e tunelimit të elektroneve ose bërthamave janë të rëndësishme për trajtimin e mëtejshëm. Tunelimi është procesi, i mundshëm në mekanikën kuantike, nëpërmjet të cilit një grimcë mund të zhduket nga një anë e një barriere potenciale energjie dhe të shfaqet në anën tjetër pa patur energji të mjaftueshme kinetike për të kaluar barrierën. Kjo mund të konsiderohet si shfaqje e natyrës valore të grimcave. Elektronet, duke qenë shumë të lehta, krahasuar me atomet, kanë gjatësi vale të mëdha ose më të mëdha se atome në energji të gjetura në shtresën e valencës të molekulave (De Vault, 1980).

Elektroni në rajonin I (figure 2.2.1, majtas) ka energji E , më të vogël se energjia e barrierës potenciale U_0 , e cila ndan zonat I dhe II. Sipas fizikës klasike, probabiliteti që një elektron të kalojë në zonën II nëpërmjet barrierës potenciale, është zero. Në mekanikën kuantike, lëvizja e një elektroni përshkruhet nga një funksion vale $\psi(x,t)$, e cila, si një valë plane bie në barrierën potenciale U_0 , në pikën x_0 , nga ku pjesërisht reflektohet nga barrira e pjesërisht kalon nëpër të.

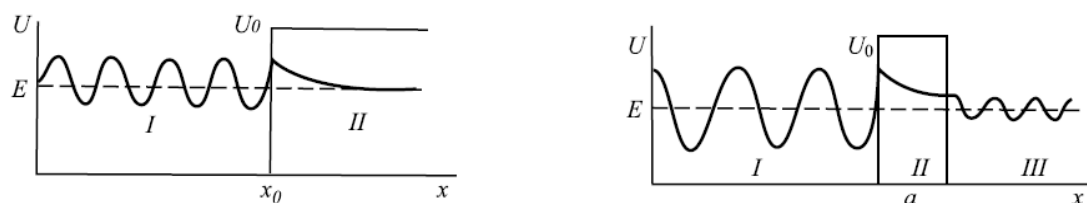


Fig. 2.2.1: (majtas) Depërtim i një elektroni nën një barrierë potenciale me lartësi U_0 nga zona I në zonën II; (djathtas) Tunelimi i një elektroni nëpër një barrierë të fundme potenciale U_0 nga zona I në zonën III.

Ekuacioni stacionar i Shredingerit për zonat I e II:

$$\frac{d^2\psi_1(x)}{dx^2} + k_1^2\psi_1(x) = 0 \quad (2.2.6)$$

$$\frac{d^2\psi_2(x)}{dx^2} + k_2^2\psi_2(x) = 0$$

Funksioni valor i sistemit dhe derivati i tij i parë duhet të jenë të vazhdueshëm në gjithë rajonin e lëvizjes. Për zonën I:

$$\psi_1(x) = A_1 \exp(ik_1x) + B_1 \exp(-ik_1x) \quad (2.2.7)$$

ku $\exp(ik_1x)$ i korrespondon një vale që përhapet përgjatë boshtit x drejt barrierës nga e majta në të djathtë, dhe $\exp(-ik_1x)$ përshkruan valën e pasqyruar nga barrierë.

Në zonat II, për $(E - U_0) < 0$, koeficienti $k_2 = ik$, ku

$$k = \sqrt{2m(U_0 - E)}/\hbar$$

Zgjidhja e ekuacionit të Schrödinger për zonën II merr formën:

$$\psi_2(x) = A_2 \exp(-ik_2x) + B_2 \exp(ik_2x) = B_2 \exp(ik_2x) = B_2 \exp(-kx) \quad (2.2.8)$$

këtu për një gjerësi të mjaftueshme të barrierës, për shkak të kushteve kufitare, mund të neglizhojmë eksponentin rritës $A_2 \exp(kx)$. Probabiliteti që grimca të ndodhet në një pikë x të rajonit II klasikisht të paarrtshme, është i barabartë me:

$$|\psi_2|^2 = B_2^2 \exp(-2kx) = B_2^2 \exp[-2x\sqrt{2m(U_0 - E)}/\hbar] \quad (2.2.9)$$

Në rastet, kur zonat klasikisht të lejuara për një elektron ndahen nga një barrierë (figure 2.2.1, djathtas), zona III është e pafundme dhe ndahet nga zona I me një barrierë me gjerësi e lartësi të fundme, është e mundur të përcaktohet probabiliteti T, që elektroni të gjendet në rajonin III, i cili është proporcional me $|\psi_a|^2$ dhe, për $ka \gg 1$, është:

$$T = \exp(-2ka) = \exp[-2a\sqrt{2m(U_0 - E)}/\hbar] \quad (2.2.10)$$

Madhësia T përcakton transparencën e barrierës. Nëse një elektron kryen lëvizje oshiluese në një gropë potenciale, duke u goditur në muret e saj me frekuencë të caktuar (ω), atëherë probabiliteti i daljes së tij nga gropa për njësi të kohës, është: $W_0 = vT$ ose

$$W_0 = v \exp[-2a\sqrt{2m(U_0 - E)}/\hbar] \quad (2.2.11)$$

3.2 Gjendje që shuhen

Varësia kohore e funksionit valor të gjendjes stacionare të elektronit në gropë përcaktohet si:

$$\psi(x, t) = \psi(x) \exp\left(-i\frac{E}{\hbar}t\right) = \psi(x) \exp(-i\omega t) \quad (2.2.12)$$

Kur konsiderohen proceset e shuarjes, probabiliteti i gjetjes së një elektroni në gropë duhet të bjerë eksponencialisht me kohën, dmth. funksioni valor në këtë rast duhet të ketë formën

$$\psi_1(x, t) = \psi_1(x) \exp\left(-i \frac{E}{\hbar} t\right) \cdot \exp\left(-\frac{W_0}{2} t\right) \quad (2.2.13)$$

$$\text{ose, } |\psi_1(x, t)|^2 \sim \exp(-W_0 t) \quad (2.2.14)$$

Sipas parimit të papërcaktueshmërisë për gjërësi natyrale të energjisë së nivelit energjetik Γ i elektronit në gropë lidhet me lifetime të tij në të ($\tau = 1/W_0$) si: $\tau\Gamma \sim \hbar$.

Kështu, gjendja kuazi-stacionare e një elektroni ka një energji mesatare E_0 në gjerësinë e nivelit të përcaktuar nga shpejtësia e shuarjes (decay) W_0 .

Shprehjes (2.2.13) mund ti jepet një formë, e cila formalisht korrespondon me gjendjen stacionare duke futur një energji komplekse $\tilde{E}$, pjesa imagjinare e së cilës karakterizon shpejtësinë e shuarjes, ose nivelin e turbullirës (blur) rreth vlerës mesatare E_0 : $\tilde{E} = E_0 - i \hbar W_0 / 2 = E_0 - i\Gamma / 2$.

$$\tilde{E} = E_0 - i\hbar \frac{W_0}{2} = E_0 - i \frac{\Gamma}{2} \quad (2.2.15)$$

Ne kemi:
$$\psi(x, t) = \psi(x) \exp\left(-i \frac{\tilde{E}}{\hbar} t\right) \quad (2.2.16)$$

Përdorimi i energjisë komplekse $\tilde{E}$ në vend të energjisë së nivelit E_0 lejon që automatikisht të konsiderohet gjendja kuazi-stacionare ose prania e proceseve disipative në llogaritjen e probabiliteteve të tranzicionit. Në rastin e proceseve disipative, një nivel diskret me energji E_0 zbërthehet në një zonë, që karakterizohet nga një funksion me densitet shpërndarje të nivelit në gjendjen kuazi-stacionare $\rho(E)$. Densiteti i niveleve $\rho(E)$ lidhet drejtpërdrejt me ligjin për shuarjen (decay) e gjendjes. Në rastin e shuarjes eksponenciale, $\rho(E)$ është shpërndarja Lorentz me gjerësi proporcionale me shpejtësinë e shuarjes (decay):

$$\rho(E) = \frac{\Gamma/(2\pi)}{(E-E_0)^2 + \Gamma^2/4} = \frac{W_0/(2\pi)}{(\omega-\omega_0)^2 + W_0^2/4} \quad (2.2.17)$$

2.2.4 Tranzicione në një sistem me dy nivele në prani të proceseve disipative

Në procesin e transferimit mes dy gjendjeve të ndara nga një barrierë potenciale, në një sistem të tillë, në mungesë të proceseve disipative, ndodhin oshilime kuantiko-mekanike midis dy gjendjeve Ψ_i dhe Ψ_f . Megjithatë, nëse gjendja finale është kuazi-stacionare për shkak të disa proceseve disipative dhe karakterizohet nga energjia komplekse $\tilde{E}_f = \omega_f - i\Gamma_f / 2$, atëherë zgjidhja e sistemit të ekuacioneve tregon, se procesi i kalimit nga gjendja fillestare në gjendjen finale është i pakthyeshem. Kjo do të thotë se mund të futet probabiliteti i tranzicionit në njësi të kohës W_{if} , i cili përcaktohet nga formula (rregulli i artë Fermi, që përshkruan konstanten e shpejtësisë të rendit të parë për ET procesin):

$$W_{if} = 2\pi |V_{if}|^2 \rho_f(E_i) / \hbar \quad (2.2.18)$$

Probabiliteti i kalimit midis gjendjeve Ψ_i dhe Ψ_f është proporcional me katrorin e modulit të elementit matricor

$$V_{if} = \langle \psi_i | \hat{V} | \psi_f \rangle = \int \psi_i^* \hat{V} \psi_f d\tau \quad (2.2.19)$$

dhe densiteti i nivelit në gjendjen finale ρ_f , për një energji, të barabartë me E_i . Madhësia $\rho_f(E_i)$ në rastin e një gjendje kuazi-stacionare përcaktohet nga (2.2.17), ku në vend të E_0 është e nevojshme të merret $\hbar\omega_f$, dhe Γ_f në vend të Γ .

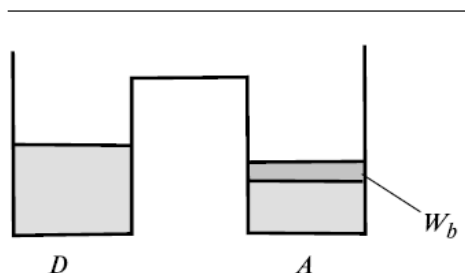


Fig. 2.2.2. Tunelimi i një elektroni nga gjendja fillestar në një nivel metastable të gjendjes finale.

Në rastin e tunelimit të një elektroni midis D dhe A pasuar nga rënia e të gjithë sistemit në një gjendje finale Ψ_f , të shoqëruar nga një shpërndarje e pakthyeshme e një pjese të energjisë ose nga dalja e sistemit nga gjendja Ψ_f me shpejtësinë W_b (figure 2.2.2), gjerësia e nivelit të gjendjes finale është $\Gamma_f \sim \hbar W_b$. Zgjerimi i nivelit mund të ndodh për shkak të proceseve të mëtejshëm të tunelimit të elektroneve nëpër muret e barrierës në mjedisin më të afërt të akceptorit. Proceset e tjera, që çojnë në zgjerim të nivelit E, lidhen me influencën e mjedisit, që bashkëvepron me elektronet, i cili çon në një "jitter" (dridhje) në nivelin e energjisë dhe humbje të koherencës me gjendjen e funksionit valor $\Psi_1(x,t) = \Psi(x) \exp(-i\omega t)$, për shkak të fazës së vet të lëkundjeve (oshilimeve). Zgjerimi i niveleve elektronike në molekulat komplekse mund të arrihet për shkak të lëvizjes së bërthamës dhe bashkëveprimit elektron-vibracion, duke çuar në një humbje, pjesë e energjisë së elektronit në gradët vibracionale të lirisë. Gjerësia totale e nivelit definohet si:

$$\Gamma_f \sim 1/(2T_1) + 1/T_2 \quad (2.2.20)$$

këtu, T_1 është koha karakteristike për tunelimin e mëtejshëm elektronik nga akseptori ose koha e relaksimit të energjisë së elektronit; T_2 është koha fazore e refuzimit (failure) për shkak të lëvizjes së bërthamës. Si rregull, $T_1 \ll T_2$, prandaj probabiliteti W_b është kryesisht i lidhur me bashkëveprimet elektron-vibracion në relaksimin vibracional në akceptor.

2.2.5. Bashkëveprime elektron-vibracionale në molekula

5.1. Roli i lëvizjes së bërthamës

Deri tani, tunelimi elektronik është parë për vlera konstante të niveleve të energjisë E_i dhe E_f . Në molekula reale, është e nevojshme të konsiderohet gjendja e bërthamave, gjatë lëvizjes së të cilave nivelet e energjisë së elektroneve ndryshojnë. Ide moderne teorike mbi mekanizmat e bashkëveprimit elektrono-vibracionale mund të gjenden (Levich and Dogonadze 1961; Marcus 1965; Jortner 1976). Lëvizja e bërthamave në lidhje me lëvizjen e elektronit ka karakterin e kushteve të jashtme që ndryshojnë ngadalë, në të cilat elektroni ka kohë të "përshtatet" për një kohë shumë më të shkurtër se koha karakteristike e lëvizjes së bërthamave. Në përafrimin e parë, dinamika e sistemit molekular mund të shihet si lëvizje e elektroneve në fushën rezultante Coulomb të bërthamave, pozicionet e të cilave janë strikt të

fiksuar në hapësirë. Në këtë rast, energjia U e elektronit dhe funksioni valor janë parametrikisht të varura nga distancat R internucleare. Ekuacioni i Schrödingerit për elektronet ka formën:

$$\tilde{H}_e \varphi_k(r, R) = U_k(R) \varphi_k(r, R) \quad (2.2.21)$$

Zgjidhja e tij çon në një grup funksione valore stacionare (r -koordinatat e elektroneve)

$$\Phi_k = \Phi_k(r, R) \quad (2.2.22)$$

dhe vlera vetiake korresponduese $U_k(R)$. Energjia e molekulës në këtë përafrim, $U_k(R)$ përfshin energjinë kinetike të gjithë elektroneve T_r , energjinë potenciale të bashkëveprimit Coulomb të elektroneve me njëri-tjetrin (U_{rr}), me bërthamat (U_{rR}) dhe bërthamat me njëra-tjetren (U_{RR}).

Konfiguracionet e ndryshme bërthamore korrespondojnë me energjitë e ndryshme elektronike $U_k(R)$ për një numër të dhënë kuantik elektronik k . Rrjedhimisht, funksionet $U_k(R)$ kanë kuptimin e energjisë potenciale për lëvizjen e bërthamave në një kusht të dhënë elektronik.

Ekuacioni Schrodinger për përcaktimin e energjisë së gjithë molekulës dhe funksionet valore të bërthamave që lëvizin në fushën $U_k(R)$ ka formën:

$$[\hat{T}_R + \hat{U}_k(R)]\chi_{k,n}(R) = E_{k,n}\chi_{k,n}(R) \quad (2.2.23)$$

Nga (2.2.23) pason, se energjia e plotë e molekulës $E_{k,n}$ varet nga numri elektronik kuantik k dhe nga numri kuantik vibracional n . Ajo përfshin energjinë potenciale (elektronike) të molekulës $U_k(R)$ dhe energjinë kinetike të bërthamave T_R . Funksioni valor $\chi_{k,n}(R)$ përshkruan vibracionet e bërthamave për një indeks (k) elektronik të dhënë, $U_k(R)$, dhe varet, respektivisht, nga numrat kuantik, që përcaktojnë bashkë gjendjet elektronike edhe bërthamore të molekulës.

Funksioni i përgjithshëm valor i molekulës në përafrimin Born-Oppenheimer për ndarjen e funksioneve valore nukleare dhe elektronike, të konsideruar këtu, ka formën:

$$\Psi_{k,n}(r, R) = \Phi(r, R)\chi_{k,n}(R) \quad (2.2.24)$$

5.2. Tranzitime elektronike

Midis gjendjes fillestare, Ψ_i , dhe finale Ψ_f të sistemit molekular DA, të karakterizuar nga funksionet valore të tipit (2.2.24), tranzicionet elektronike duhen konsideruar me tolerancë për gradët e lirisë së bërthamave.

Një trajtim cilësor pamja e tranzicionit paraqitet (figure 2.2.3) si:

$$\Psi_{k,n}(r, R) \rightarrow \Psi_{k',n'}(r, R) \quad (2.2.25)$$

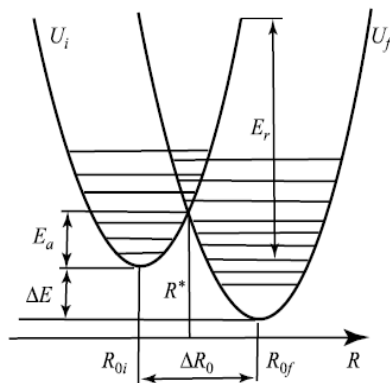


Fig.2.2.3: Ndërveprime elektron-vibracion në tunelimin elektronik (sipas Marcus): E_0 është energjia e aktivizimit. Energjia e riorganizimit, ΔE është efekti termik i procesit të tunelimit. ΔR_0 është zhvendosja e pozicionit të ekuilibrit të bërthamave në kalimin nga gjendja elektronike i në gjendjen f.

Supozojmë se sipërfaqet U_i dhe U_f janë parabola, që u korrespondojnë oshilatorëve harmonik me frekuencë të njëjtë ω , d.m.th., ne pranojmë se gjatë tranzicionit $\Psi_i \rightarrow \Psi_f$, nuk ndryshon frekuenca e lëkundjeve të bërthamave, ndryshon vetëm konfiguracioni i tyre i ekuilibrit $R_{0i} \rightarrow R_{0f}$. Vlera e zhvendosjes ΔR_0 karakterizon lidhjen (mbimbullimin) midis gradëve të lirisë elektronike dhe nukleare. Në rastin e lidhjes së fortë raporti $\Delta = \Delta R_0/a_0 \gg 1$, kënaqet, ku a_0 është amplituda e lëkundjeve në pikën zero. Nëse sistemi, për shkak të lëvizjes së bërthamave, arrin pikën R^* të ndërprerjes së termave U_i dhe U_f , ku energjitë e elektroneve të gjendjeve fillestare dhe finale janë të barabarta.

$$U_{k,n}(R^*) \simeq U_{k,n'}(R^*) \quad (2.2.26)$$

atëherë një tranzicion rezonance elektronik është i mundur për shkak të bashkëveprimit të përcaktuar nga elementi matricor elektronik V_{if} . Në këtë tranzicion energjia e sistemit nuk ndryshon, d.m.th afër R^* pa energji shtesë, mund të ristrukturohet një funksion valor elektronik, i cili ndryshon me kercim nga $\varphi_{(i)k}(r,R)$ në $\varphi_{(f)k}(r,R)$. Probabiliteti i një kalimi të elektronit në gjendjen përfundimtare në njësi kohe për $R \approx R^*$ është proporcionale me vlerën e $V_{if}/\hbar$.

Gjithmonë kur një molekulë duke absorbuar një foton bën një kërcim nga gjendja elektronike bazë në një gjendje të ngacmuar, ose duke emetuar një foton bën një tranzicion në rënie, shpërndarja e elektroneve ndryshon menjëherë. Bërthamat nuk i rregullojnë pozicionet e tyre në moment ndaj këtij funksioni të ri të energjisë potenciale, ato lëvizin ngadalë. Ekziston një ndryshim në mashtabet kohore të lëvizjes, tranzicioni përshkruhet si "vertikal" me ndryshimin elektronik, që kryhet, ndërkaq bërthama është "e ngrirë" gjatë tranzicionit. Gjendja vibracionale e populluar nga absorbimi, zakonisht nuk është niveli energjetik më i ulët vibracional i gjendjes së ngacmuar, për shkak të zhvendosjes horizontale të dy gjendjeve elektronike dhe karakterit vertikal të tranzicionit elektronik. Në një grumbullim të molekulave do të ketë një shpërndarje të popullimeve të gjendjeve finale lëkundëse, që në thelb reflekton probabilitetin e ndodhjes së bërthamës në këtë pozicion. Për shkak se tranzicioni përfshin ndryshime si të gjendjeve vibracionale edhe elektronike të molekulës, ajo shpesh quhet tranzicion vibronik. Probabilitetet e kalimit në secilën gjendje vibracionale të gjendjes së ngacmuar quhen faktorë Franck–Condon. Ky term përfshin efektet e temperaturës dhe ndryshimin e energjisë së lirë të reaksionit dhe është e vështirë të llogaritet, edhe pse mund të bëhen thjeshtime (përafrime). Një mënyrë e dobishme për të përshkruar faktorin Franck–Condon është me anë të energjisë së riorganizimit, E_r (Blankenship 2014).

Parimi Franck–Condon është një rregull në spektroskopi, i cili shpjegon intensitetin e tranzicioneve vibronike, të cilat janë ndryshimet e njëkohshme në nivelet energjetike elektronike dhe vibracionale të një molekule për shkak të absorbimit ose emisionit të një fotoni me energji të përshtatshme. Klasikisht, parimi Franck–Condon është përafrimi - një tranzicion elektronik është më i mundshëm të ndodh pa ndryshime në pozicionet e bërthamave të vet molekulës dhe në mjedisin e saj. Sipas parimit koordinatat dhe vektorët e shpejtësisë bërthamore nuk kanë kohë të ndryshojnë dukshëm gjatë tranzicionit elektronik. Gjendja që rezulton quhet gjendje Franck–Condon, dhe tranzicioni (kalimi) i përfshirë, një tranzicion vertikal. Formulimi kuantomekanik i këtij parimi është - intensiteti i një tranzicioni vibronik është proporcional me katrorin e integralit të mbivendosjes (mbivendosjes) midis funksioneve valore vibracionale të dy gjendjeve, që përfshihen në tranzicion (Franck–Condon) (Condon 1926; Franck Condon 1928).

Bazuar në parimin Franck – Condon, probabiliteti i tranzicionit të sistemit elektron – bërthamë nga gjendjet elektronike fillestare (k, n) në finale (k', n') duhet të varet nga shkalla e afërsisë së bërthamave me pikën R^* , nga funksionet valore të bërthamave $\chi_{kn}(R)$ dhe $\chi_{k'n'}(R)$. Nëse pika R^* është në një zonë që klasikisht është e paarrtshme nga bërthama, atëherë ajo mund të arrihet vetëm nëpërmjet tunelimit të vet bërthamave. Tunelimi bërthamor varet nga shkalla e mbivendosjes së funksioneve valore bërthamore të gjendjeve fillestare $\chi_{kn}(R)$ dhe përfundimtare $\chi_{k'n'}(R)$, e cila përcaktohet nga integrali i mbivendosjes, faktori Franck – Condon:

$$F_{n,n'}^{k,k'} = \left| \int \chi_{k,n} \chi_{k',n'} dR \right|^2 \quad (2.2.27)$$

dhe probabiliteti i tranzitimit (2.2.18) është proporcional me vlerën:

$$W_{i,n,f,n'} \sim \frac{V_{ij}}{h} F_{n,n'}^{i,f} \rho_{f,n'}(E_i, n) \quad (2.2.28)$$

Në shprehjen (2.2.28), faktori Franck-Condon $F_{n,n'}^{i,f}$ konsideron efektet që lidhen me ristrukturimin e konfigurimit bërthamor. Pasi termi final arrin subnivelele $n' = n + p$, një shpërndarje e energjisë vibracionale të tepërt ndodh me një kalim në subnivelele më të ulëta vibracionale të gjendjes përfundimtare, brenda 10^{-12} s. Kjo do të thotë se në (2.2.28) densiteti i gjendjeve finale $\rho_{f,n'}(E)$ përcaktohet nga funksioni Lorentz me një gjerësi që varet nga shpejtësia vibracionale e relaksimit të nivelit f, n' në një energji E , të barabartë me energjinë e gjendjes fillestare E_{in} . Nëse energjia e tepërt ΔE , ose efekti termik i reaksionit, shkon kryesisht në ngacmimin e modeve vibracionale R , atëherë këto të fundit quhen mode pranuese. Ndryshimi në gjendjen elektronike në tranzicion $D \xrightarrow{e} A$ shkakton deformim molekular dhe një zhvendosje në koordinatë $R_{0i} \rightarrow R_{0f}$.

Siç tregohet në figure 2.2.3, në rastin $\Delta = \Delta R_0/a_0 \gg 1$, kur numri n i subnivelele vibracionale të gjendjes fillestare rritet, gjërësia e barrierës për tunelimin e bërthamave zvogëlohet. Në të njëjtën kohë, lartësia e barrierës gjithashtu reduktohet, e barabartë me diferencën në energjinë e termave në pikën R^* dhe subnivelele përkatës vibracionale të termit fillestar. Kështu, me rritjen e numrave të subnivelele vibracionale në gjendjen i , rritet probabiliteti i tranzicionit dhe zvogëlohet popullimi i tyre (Rubin 2004; Blankenship 2014).

5.3. Konstante e shpejtësisë së transferimit

Kjo gjendet duke shtuar produktet e vlerave të pjesshme të shpejtësive të tranzicionit nga secili subnivel në probabilitetet e popullimeve të tyre në një temperaturë të dhënë T. Shpejtësia mesatare e tranzicionit përkufizohet si:

$$W_{if} = \frac{W_0 + W_1 \exp\left(-\frac{\hbar\omega}{k_B T}\right) + W_2 \exp\left(-\frac{2\hbar\omega}{k_B T}\right) + \dots}{1 + \exp\left(-\frac{\hbar\omega}{k_B T}\right) + \exp\left(-\frac{2\hbar\omega}{k_B T}\right) + \dots} \quad (2.2.29)$$

Në rastin e lidhjes së forte ($\Delta \gg 1$) $W_1 \gg W_0$; është i dukshëm, shkaku cilësor fizik i varësisë dyfazore të temperaturës së tunelimit të elektronit në rastin e lidhjes së fortë elektron-vibracionale. Në temperatura të larta mbizotërojnë kalime nga subnivele të lartë vibracionale W_1 , dhe në temperatura të ulëta, tunelimi i elektronit lidhet me tunelimin e bërthamave nga subnivele kryesor (baze) vibracionale. Përafërsisht mund të konsiderohet:

$$W_{if} = W_0 + W_1 \exp\left(-\frac{\hbar\omega}{k_B T}\right) \quad (2.2.30)$$

Në rastin e një termi njëdimensionale parabolik dhe frekuencës konstante oshiluese, pamja eksplicite e varësisë së faktorit Franck - Condon nga n dhe $n + p$ jepet me formulën e saktë

$$F_{n,n'} = n! (n + p)! S^p \exp(-S) \left[\sum_{i=0}^n \frac{(-S)^i}{i! (n-i)! (p+i)!} \right]^2; n' - n = p \quad (2.2.31)$$

ku parametri

$$S = \frac{\Delta^2}{2} = \frac{M(\Delta R)^2 \omega}{2\hbar} \quad (2.2.32)$$

është konstantja elektron-vibracionale e lidhjes. Ajo pasqyron madhësinë e deformimit relativ të molekulës sipas koordinatës R të modit akceptor ω kur gjendja elektronike e sistemit ndryshon si pasojë e transferimit të energjisë. Segmenti E_r është energjia e riorganizimit të sistemit. Ajo korrespondon me punën, që do duhej për të zhvendosur koordinatat e bërthamave nga gjendja fillestare e ekuilibrit në vlerat e ekuilibrit të koordinatave të gjendjes finale, me kusht që sistemi të mbetet në termin fillestar, dhe nuk kryhet transferim energjie.

$$E_r = k (\Delta R_0)^2 / 2 \quad (2.2.33)$$

ku k - konstante e elasticitetit, $k = M\omega^2$ dhe $E_r = \hbar\omega S$, dmth. energjia e riorganizimit gjithashtu karakterizon riorganizimet që ndodhin në sistem gjatë ET.

Energjia e aktivizimit:

$$E_a = \frac{kR^2}{2} = \frac{k(\Delta R_0 - R_{0i})^2}{2} + \Delta E \quad (2.2.34)$$

$$E_a = \frac{(E_r - \Delta E)}{4E_r} = \frac{(S\hbar\omega - \Delta E)^2}{4S\hbar\omega} \quad (2.2.35)$$

Nëse frekuencat e lekundjeve të bërthamave në tranzicionin elektronik ende supozohen të jenë të pandryshuara, atëherë në përafrimin harmonik ne mund të shkruajmë formulën praktikisht të saktë për konstanten e shpejtësisë së tranzicionit:

$$W_{if} = \frac{|V_{if}|^2}{\hbar^2} \exp(-G) \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{-i\frac{\Delta E}{\hbar}t + G_+(t) + G_-(t)\right\} dt \quad (2.2.36)$$

këtu:

$$G_+(t) = \sum_j \frac{\Delta_j^2}{2} (\bar{n}_j + 1) \exp(i\omega_j t)$$

$$G_-(t) = \sum_j \frac{\Delta_j^2}{2} \bar{n}_j \exp(i\omega_j t) \quad (2.2.37)$$

G_+ lidhet me ngacmimin e kuantëve vibracionale me frekuenca ω , j numëron lekundjet normale të sistemit; G_- është për shkak të absorbimit të kuantit vibracional gjatë tranzicionit elektronik; $\bar{n}_j$ është popullimi mesatar i oshilatorit me frekuencë ω_j , në ekuilibër termik, i barabartë me $(\exp[\hbar\omega_j/(k_B T)] - 1)^{-1}$ dhe $G = G_+(0) + G_-(0)$ (Rubin 2004).

2.2.6 Rasti i bashkimit të fortë dhe të dobët elektron-vibrational

Formula (2.2.36) jep një rakordim të mirë me të dhënat eksperimentale mbi varësinë e temperaturës të konstante së shpejtësisë. Ne konsiderojmë në mënyrë më speciale rastet limite të lidhjes së fortë ($S \gg 1$) dhe të lidhjes së dobët ($S \ll 1$) (2.2.32).

6.1 Lidhje e dobët elektron-vibracionale

Ky rast është realizuar për procese relaksimi elektron-vibracionale intramolekulare në molekulat e mëdha aromatike që nuk shoqërohen me ndarje të ngarkesës. Për $S \ll 1$, llogaritja e integralit (2.2.36) çon në formulën:

$$W_{if} = \sqrt{\frac{2\pi}{\gamma \Delta E_0 \hbar \omega}} \frac{V_{if}^2}{\hbar} \exp\left(-\frac{\gamma \Delta E_0}{\hbar \omega}\right) \quad (2.2.38)$$

këtu $\gamma = \ln \left[\frac{\Delta E_0}{S \hbar \omega (n+1)} \right] - 1$

Nga (2.2.38) shihet se probabiliteti i një tranzicioni joradiativ në rastin e një lidhje të dobët zvogëlohet në mënyrë eksponenciale me rritjen e numrit të kuantëve të ngacmuar $\Delta E/\hbar\omega$. Rrjedhimisht, roli i modit pranues luhet nga lëkundjet me frekuencën më të lartë.

Rasti i lidhjes së dobët paraqitet grafikisht në figure 2.2.4(I). Analiza e shprehjes (2.2.38) tregon, se në këtë rast W_{if} varet pak nga temperatura; kjo është e kuptueshme, pasi në rastin e një lidhjeje të dobët, $W_1 < W_0$.

6.2 Lidhje e fortë electron-vibracionale ($S \gg 1$)

Ky rast përshkruhet në figure 2.2.3. Mund të tregohet se në rastin e një modi akceptor ($S \gg 1$)

$$W_{if} = \frac{2\pi V_{if}}{\hbar^2 \omega} \left(\frac{(\bar{n}+1)}{\bar{n}} \right)^{\frac{q_0}{2}} I_{q_0} \{ 2S[(\bar{n}+1)\bar{n}]^{1/2} \} \exp[-(2\bar{n}+1)S] \quad (2.2.39)$$

këtu q_0 - numër i plotë afër $\Delta E_0/\hbar\omega$, $I_{q_0}(z)$ është funksioni i modifikuar Bessel:

$$I_n(z) = \frac{1}{\pi} \int_0^\pi \exp(z \cos \theta) \cos(n\theta) d\theta \quad (2.2.40)$$

Varësia nga temperatura e konstantes W_{if} përcaktohet nga ndryshimi në popullimin mesatar të niveleve vibracionale

$$\bar{n} = [\exp(\hbar\omega/k_B T) - 1]^{-1} = \begin{cases} \exp(-\hbar\omega/k_B T) k_B T \ll \hbar\omega \\ \frac{k_B T}{\hbar\omega} k_B T \gg \hbar\omega \end{cases} \quad (2.2.41)$$

Në temperatura të ulta, kur $k_B T \ll \hbar\omega$, $n \rightarrow 0$, ka një aktivizim – free ose tunelim në bërthamat, zonë

$$W_{if} = \frac{2\pi}{\hbar} |V_{if}|^2 \exp(-S) S^{q_0} \frac{1}{q_0!} \quad (2.2.42)$$

Në të kundërt, në rajonin e temperaturës së lartë, ku $k_B T \gg \hbar\omega$, varësia e Arrhenius është e zakonshme në formë, megjithëse ET është ende si tunel:

$$W_{if} = \frac{2\pi V_{if}}{\hbar} \sqrt{\frac{\pi}{S k_B T \hbar \omega}} e^{-E_a/(k_B T)} \quad (2.2.43)$$

Vlera e parametrave të sistemit, për shembull, për oksidimin e citokromit c në bakteret fotosintetike, mund të merret nga varësia eksperimentale e shpejtësisë së reaksionit nga temperatura.

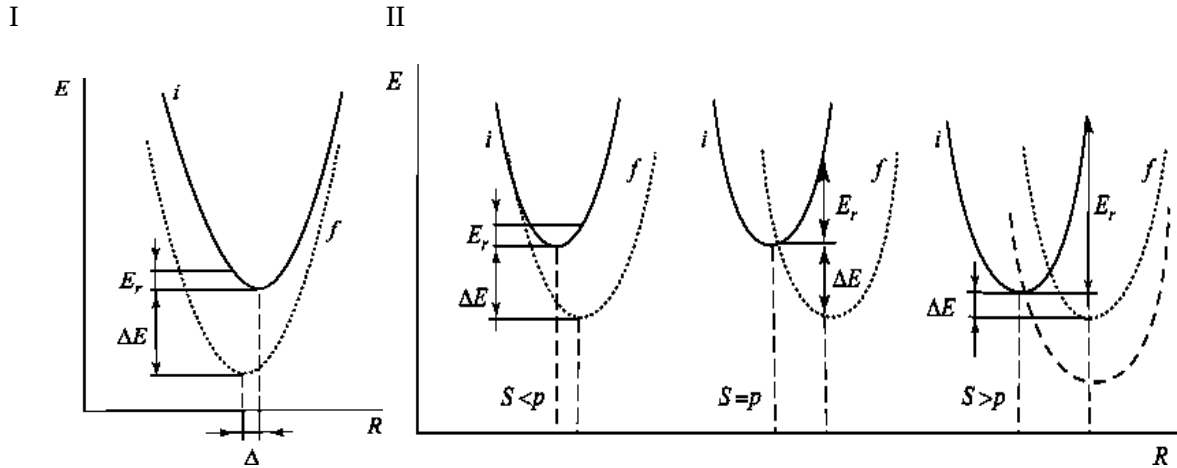


Fig.2.2.4. Sipërfaqet potenciale të gjendjeve fillestare dhe finale në rastin e lidhjes së dobët (I) dhe të fortë (II) elektron-vibracionale (Rubin 2004).

Figure 2.2.4 përshkruan efektin paradoksal të reaksionit ET të përshpejtuar, që ndodh kur ulet temperatura. Procesi mund të vërehet në zinxhirin e proceseve fillestare të fotosintezës. Për një sistem të termave elektronik për $S > p$, procesi i transportit kërkon një energji aktivizuese relativisht të vogël. Ulja e temperaturës mund të shkaktojë deformim të tillë të strukturës së çiftit donor-akceptor, si rezultat i të cilit, pozicionet e ekuilibrit të termave elektronik të

zhvendosen disi, kështu që ndërprerja e ngushtë e kushteve (termave) të gjendjeve i dhe f mund ti afrohen kulmit të parabolës i (kurba me pika në figure 2.2.4 (II) për $S > p$). Në këtë rast, procesi i transferimit inaktivizohet, dhe si rezultat, shpejtësia e ET rritet me rënien e temperaturës (Rubin 2004).

Në figure 2.2.4a, mbivendosja e funksioneve valore bërthamore të gjendjeve fillestare (i) dhe finale (f) të kompleksit donor-akceptor paraqitet me të zezë.

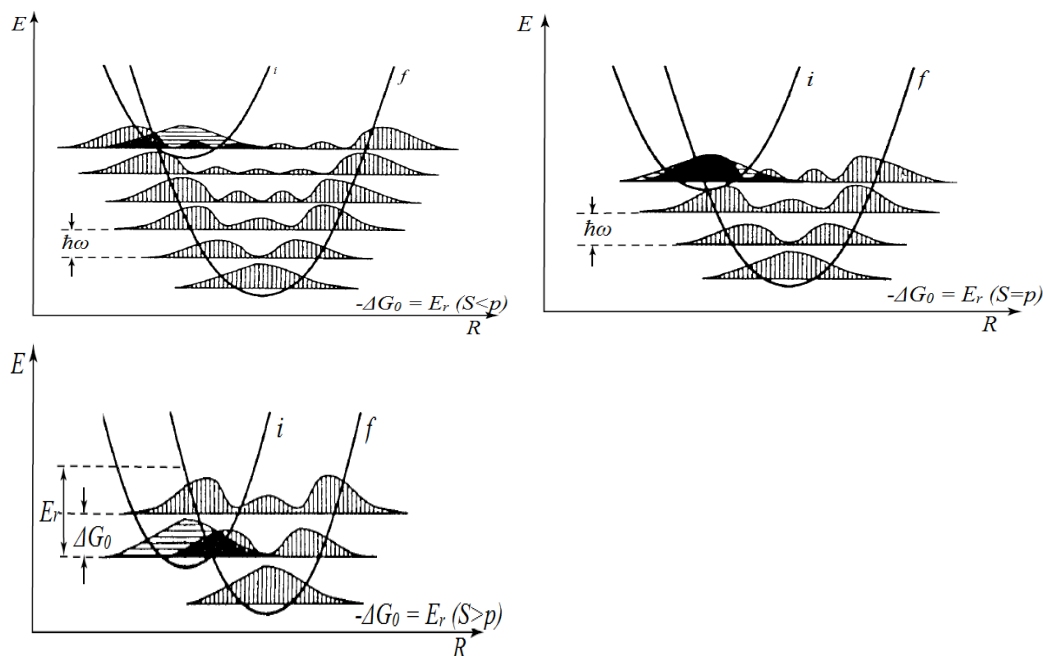


Fig.2.2.4a: Mbivendosje e funksioneve valore bërthamore të gjendjeve fillestare dhe përfundimtare (Dutton 1992)

Shkalla e mbivendosjes korrespondon me vlerën e faktorit Franck - Condon (2.2.27). Siç mund të shihet, ai arrin vlerat më të larta në $S = p$, kur energjia e riorganizimit E_r është e barabartë me efektin termik të reaksionit ($-\Delta G_0 = \Delta E$). Blankenship (2014) provoi teorinë Marcus - për një vlerë të dhënë të E_r , me një rritje në efektin termik ($-\Delta G_0 = \Delta E$), shpejtësia ET fillimisht rritet ($S < p$), arrin një maksimum në $-\Delta G_0 = E_r$ ($S = p$) dhe pas kësaj zvogëlohet, ΔG_0 bëhet më e madhe se energjia e riorganizimit ($S > p$).

6.3 Transferimi i një elektroni mbi një zinxhir proteinik

Përçueshmëria e proteinave

Mekanizmi tunel siguron një akt elementar të transferimit të elektroneve midis grupeve donor - akceptor në proteinë, lokalizuar në një distancë rreth 0.5-1.0 nm nga njëra-tjetra. Sidoqoftë, ka shumë shembuj ku një elektron transportohet në proteinë për distanca shumë më të gjata. Është e rëndësishme që në këtë rast, transferimi ndodh jo vetëm brenda të njëjtës molekulë proteine, por gjithashtu mund të përfshijë ndërveprimin e molekulave të ndryshme proteinë. Kështu, në reaksionin e transferimit të elektroneve midis disa llojeve citokrome, proteinat ndërvepruese ishin më shumë se 2.5 nm. Në tërësi, rezultoi se për shumicën e proteinave, përçueshmëria realizohet si rezultat i kërcimit të elektroneve midis gjendjeve të lokalizuar donore dhe akceptore të ndara nga dhjetëra nanometra. Etapa kufizuese në procesin e

transportit nuk është lëvizja e ngarkesës mbi gjendjet korente, por proceset e relaksimit në donor dhe akceptor.

2.2.7 Përfundime

Struktura tre-dimensionale (konformacioni) autoktone është krijuar nga veprimi i disa faktorëve elektrikë dhe entropikë. Ndryshimi në gjendjen konformacionale të molekulës proteinike për shkak të influencave të ndryshme të jashtme (PH, temperatura, kompozimi jonik), gjithashtu ndikon në funksionalitetin e saj. Njohja e reaksioneve të transferimit të elektroneve dhe proceseve të transferimit të energjisë është me rëndësi për të kuptuar stabilitetin e strukturës së proteinës në vet procesin e funksionimit të saj. Veç kësaj, ajo nuk pëson ndryshim, drejtpërdrejt të lidhur me drejtimin e reaksionit, në të cilin molekula proteinë merr pjesë, mobiliteti karakteristik konformacional i strukturës së biopolimereve, natyra e saj dhe rëndësia funksionale. Problemi është me rëndësi të madhe për mekanizmat e ndjeshëm molekular të aktivitetit funksional të biomakromolekulave dhe pjesëmarrja e proceseve të tyre fundamentale biologjike.

Reaksionet e transferimit të elektroneve në sistemet biologjike ndodhin për shkak të: i) distanca midis donorit dhe akceptorit, ii) ndryshimi standart i gjendjes së energjisë së lirë, iii) parametri Marcus ose energjia e riorganizimit, e cila mund të konsiderohet si sasia e energjisë, së nevojshme për të shtrembëruar gjeometrinë e reagentëve në atë të produkteve pa transferim real të elektroneve; iv) lloji i proteinave dhe struktura e tyre; v) kushtet e mjedisit dhe shumë faktorë të tjerë, të cilët nuk po i konsiderojmë këtu.

Në shumë raste është e dobishme një tablo e thjeshtuar e procesit të transferimit të elektroneve.

Shpejtësia e procesit të transferimit të elektroneve paraqitet si kryesisht e varur nga distanca midis donorit dhe akceptorit. Ky formalizëm supozon, që ndryshimi i energjisë së lirë të reaksionit dhe parametri Marcus janë të barabarta, kështu që procesi është optimal dhe diferencat e vërtuara të shpejtësisë reflektojnë vetëm distancën mes dy llojeve reaguese. Shpesh vërehet se rasti është i këtillë, ose mund të bëhen korektime, që të meren parasysh diferencat. Kjo pikëpamje supozon se shumica e proteinave janë mjaft të ngjashme në vetitë dielektrike, që të sillen në mënyrë të njëjtë, dhe detajet e strukturës së proteinave janë mesatarizuar, kështu që shpejtësia është një funksion vetëm i distancës midis donorit të elektronit dhe akceptorit.

Një pamje alternative thekson strukturën e detajuar të proteinave për transferim të elektroneve dhe analizon rrugët potenciale, të cilat elektroni mund të ndjekë nga donori në akceptor. Modeli i rrugës mund të përfshijë efekte interference midis rrugëve të ndryshme, për të cilat konsiderohet se janë të rëndësishme në procesin e transferimit elektronik nga QA në QB.

Të dy qasjet kanë avantazhe dhe disavantazhe dhe mënyra më e përshtatshme zgjidhet duke precizuar pyetjet e bëra, dhe sistemi në shqyrtim.

Për transfer të një elektroni nëpër një zinxhir proteinash, mekanizmi tunel siguron një akt elementar të ET midis grupeve donor-akceptor, të lokalizuara në rreth 0.5-1.0 deri në dhjetëra nanometër nga njëra - tjetra dhe mund të përfshijnë bashkëveprimin e molekulave të ndryshme të proteinave.

Një veçori karakteristike e këtyre reaksioneve është se ato mund të aktivizohen në temperatura të larta dhe të bien në vlera thuajse konstante në temperatura të ulëta. Shqyrtimi i efekteve të mjedisit mbi reaksionet e transferimit të elektroneve në sisteme komplekse

dinamike, është me interes të veçantë. Varësia nga temperatura e shpejtesive të reaksionit fillestar të transferimit elektronik mund të pasqyrojë një shpërndarje të qendrave të reaksionit që kanë diferenca në faktorë të tillë si distancat ose orientimet ndërmjet kofaktorëve.

Përkundër simetrisë strukturore, RC është funksionalisht shumë asimetrike. Procesi i ndarjes fillestare të ngarkesës në qendrat e reaksionit (RCs) është me një drejtim. Këtu janë të mundshme dy mënyra simetrike të transferimit të elektroneve, duke filluar nga donori i përbashkët i elektronit.

Faza kufizuese në procesin e transportit nuk është lëvizja e ngarkesës mbi gjendjet korente, por proceset e relaksimit në donor dhe akceptor.

Për sqarimin e mekanizmave të reaksioneve të transferimit të elektroneve në sistemet biologjike, variacionet konformacionale duhet të përfshihen në model, si dhe cili është ndikimi i variacioneve konformacionale të sistemit mbi tunelimin kuantik të elektroneve në sistemet biologjike.

2.3 MEKANIZMI FIZIK PËR TRANSFERIMIN E ENERGJISË TË ANTENAVE FOTOSINTETIKE – teori Forster

Përmbledhje

Koncepti bazë i antenave fotosintetike është se drita e absorbuar nga një pigment mund të transferohet më pas tek pigmente të tjera. Një mënyrë e përshtatshme për të vëzhguar këtë proces të transferimit të energjisë është të rrezatohet një provë me dritë që absorbohet në mënyrë selektive nga një grup pigmentesh dhe pastaj të monitorohet fluoreshenca me origjinë një grup tjetër pigmentesh.

Në këtë trajtim, ne do të diskutojmë mbi mekanizmat fizikë të transferimit të energjisë.

Mekanizmi, që aplikohet për pigmentet e lidhura dobët, mekanizmi Forster i transferimit të energjisë, është një proces transferimi joradiativ rezonance. Ndërkohë, procesi i transferimit elektroneve mund të shihet si një proces joradiativ relaksimi nga një gjendje fillestare me donor elektroni të reduktuar në një gjendje finale me akceptor të oksiduar. Kur pigmentet janë fizikisht shumë afër, e cila për klorofilet shpesh është më pak se 10 Å, bashkëveprimi midis tyre manifestohet në një mënyrë cilësisht të ndryshme, të njohur si lidhje exciton. Të dyja bashkë, teoria standarde Forster dhe formalizmi exciton janë esenciale për kuptimin e kompleksit antenë fotosintetike.

2.3.1 Hyrje

Këtu do të trajtojmë disa koncepte të përgjithshme për sistemet antenë, me akcent mbi strukturën e antenave dhe dinamikën e transferimit dhe kapjes së energjisë.

Emerson dhe Arnold gjetën se një molekulë O₂ prodhohet vetëm për çdo 2500 molekula klorofili pas një flash të shkurtër të ngopur drite. Gaffron dhe Wohl (1936) menduan se energjia transferohet nga një pigment në tjetrin. Kjo njësi fotosintetike përbëhej nga një shumicë pigmente, mes të cilave energjia e ngacmimit mund të luhatet, përpara se të kapet ose stabilizohet. Megjithatë, asnjë mekanizëm fizik nuk ishte i njohur në atë kohë, që mund të shkaktonte transferim të kësaj energjie nga një klorofil në një tjetër.

Spektrat e ngacmimit fluoreshent janë dëshmi direkte për transferimin e energjisë. Koncepti bazë i antenave fotosintetike është, se drita, e absorbuar nga një pigment, më pas mund të transferohet në pigmente të tjera. Një mënyrë e komode për vërtetimin e këtij procesi të transferimit të energjisë është të rrezatohet një mostër me dritë, e cila selektivisht absorbohet nga një grup pigmentash e më pas të vërtetohet fluoreshenca, me origjinë nga një grup i ndryshëm pigmentesh. Një grafik i intensitetit të emisionit fluoreshent në një gjatësi vale të fiksuar kundrejt gjatësisë së valës ngacmuese, quhet një spektër i ngacmimit fluoreshent. Ai është një spektër veprimi për emisionin fluoreshent. Nëse drita absorbohet nga një grup pigmentesh dhe emetohet nga një grup tjetër, midis dy grupeve të pigmenteve duhet të ketë ndodhur transferim energjie. Ky tip eksperimenti i ngacmimit fluoreshent mund të përdoret gjithashtu për matje sasiore të efikasitetit të transferimit të energjisë nga një grup pigmentash në një tjetër.

Formulimi teorik për transferimin e energjisë, i cili është qartë i aplikueshëm në pigmentet e lidhura dobët të sistemeve fotosintetike është mekanizmi Förster, i cili u propozua për herë të parë nga Thomas Förster në vitet 1940 (Förster, 1965) dhe këtu do të shikojmë mekanizmat fizikë për transferimin e energjisë.

Ky mekanizëm Förster i transferimit të energjisë është një proces transferimi joradiativ rezonance. Ai mund të vizualizohet në një mënyrë të ngjashme me transferimin e energjisë

midis të dy tuning forks (kamerton). Çdo tuning forks ka një frekuencë karakteristike. Nëse goditet një pirun, ai fillon të vibrojë. Në rrethana të caktuara, energjia mund të transferohet në një tuning forks tjetër. Që të realizohet ky transferim, dy forks duhet të kenë një lloj lidhje mes tyre. Ajo gjithashtu varet nga distanca dhe orientimi relativ i tyre.

2.3.2 Diskutim

Nëse dy pigmente janë ndarë nga më shumë se disa Ångstrom dhe tranzitimet janë të lejuara, transferimi midis donorit dhe akceptorit të energjisë realizohet kryesisht nga një mekanizëm (dipole - dipol) Coulombi, me konstante shpejtësie të dhënë nga Eq.1

$$k_e = k_f(R_0/R)^6 \quad (2.3.1)$$

ku k_e është konstantja e shpejtësisë e rendit të parë për transferimin e energjisë nga donori te akceptor, k_f është konstantja e shpejtësisë për fluoreshencën e donorit të energjisë, R është distanca midis donorit dhe akceptorit të energjisë, dhe R_0 është "distanca kritike" në të cilën transferimi i energjisë është 50% efikas. R_0 jepet nga Eq. 2 (in units of Å) (Cantor and Schimmel, 1980):

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-5} J k^2 n^{-4} \text{Å} \quad (2.3.2)$$

Në Eq.2.3.2 J është një faktor energjie i mbivendosjes i dhënë nga Eq. 3, n është indeksi i thyerjes, dhe k^2 është një faktor orientimi, i përcaktuar nga Eq. 2.3.5 më poshtë.

$$J = \int e(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.3.3)$$

Në Eq. 2.3.3, $e(\lambda)$ është koeficienti molar i shuarjes i akceptorit të energjisë në një shkallë të gjatësisë së valës (absorbimi molar), dhe $F_D(\lambda)$ është spektri i normalizuar i emisionit të donorit të energjisë. Parametri i mbivendosjes J ilustruhet skematikisht në figure 2.3.1. Baza fizike në themel të parametrin të mbivendosjes është ajo që molekulat donore dhe akceptore duhet të kenë një gjendje energjetike të përbashkët, pasi kur ngacmimi kërcen nga donori në akceptor, ruajtja e energjisë kërkon që energjia totale e sistemit pikërisht përpara transferimit të jetë e njëjtë me energjinë totale pas transferimit. Kjo mund të jetë kështu vetëm nëse dy molekulat kanë një gjendje të përbashkët energjie dhe për pasojë tranzicionet spektrale në të njëjtën gjatësi vale.

Për krahasim paraqesim elementin matricor lidhes elektronik, eksperimentalisht varet para së gjithash nga distanca dhe orientimi i llojeve reaguese. Shumë prova tregojnë se ky parametër varet eksponencialisht nga distanca midis grupeve reaguese, siç përshkruhet nga Eq. 2.3.4.

$$\tilde{V}e^2 = \tilde{V}e^{o2} \exp(-\beta d) \quad (2.3.4)$$

Ndryshimi vihet re në diferencën midis varësisë eksponenciale të distancës së transferimit të elektronit dhe varësisë inverse në fuqi të gjashtë të distancës së energjisë të procesit Förster të transferimit të energjisë. Kjo diferencë lind sepse procesi Förster është ndërmjetësuar nga bashkëveprimi i lidhjes dipol-dipol, ndërsa transferimi i elektronit ndërmjetësohet nga lidhja që pasqyron mbivendosjen e funksioneve valore të llojeve reaguese, të cilat në mënyrë karakteristike bien eksponencialisht. Kërkesa për mbivendosjen e spektrit të emisionit të fluoreshencës së donorit me spektrin e absorbimit të akceptorit nganjëherë çon në përshtypjen

e gabuar se procesi Förster i transferimit të energjisë fitohet nga emisioni i një fotoni nga donori, pasuar nga absorbimi i një fotoni nga akseptori. Ky nuk është rasti. Transferimi Förster është një proces joradiativ, që do të thotë se nuk përfshihet emision apo absorbim fotoni. Prosesi i transferimit të energjisë bëhet një nga proceset e mundshme të shumta të shuarjes nga gjendja e ngacmuar.

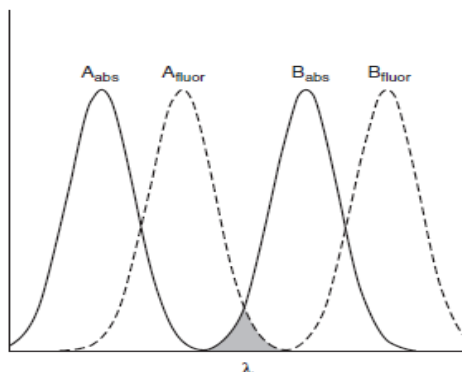


Fig. 2.3.1: Figurë skematike e faktorit të mbivendosjes J në teorinë Förster. Zona me hije tregon nivelet e energjisë, të përbashkëta për donorët dhe akceptorët.

Nëse, siç është shpesh rasti, ai është procesi dominues i shuarjes, lifetime i gjendjes së ngacmuar të donorit të energjisë shkurtohet dramatikisht në krahasim me atë që do të ishte në mungesë të transferimit të energjisë. Prosesi radiativ i emisionit – reabsorbimit të përshkruar më sipër nuk do të kishte efekt në lifetime të gjendjes së ngacmuar të donorit.

Faktori i orientimit k përcaktohet nga:

$$k^2 = (\cos \alpha - 3 \cos \beta_1 \cos \beta_2)^2 \quad (2.3.5)$$

ku α është këndi midis dy dipoleve të tranzicionit dhe β_s janë këndet midis secilit dipol dhe vijës që bashkon ata. Vlerat e k^2 mund të variojnë nga 0 në 4. Për një orientim të rastësishëm të dipoleve të tranzicionit, vlera mesatare e k^2 është 2/3.

R_0 varet nga vetitë e të dyve - donorit dhe akseptorit të energjisë, kështu që të dy duhet të specifikohen që të mund të merret një vlerë. Transferimi i ngacmimit është në thelb një proces me veprim në distancë më të gjatë se transferimi i elektronit. Kjo është për shkak të natyrës së efektit dipol-dipol të lidhjes kuloniane, e cila nuk kërkon mbivendosje të drejtpërdrejtë të funksioneve valore molekulare si në transferimin e elektroneve. Në fakt, strukturat e komplekseve antenë janë precizuar nga evolucioni për të minimizuar gjendjet e ngacmuara në proceset e transferimit të elektroneve. Kjo arrihet duke ndarë pigmentet në një distancë, që është shumë e madhe për të lejuar transferimin e shpejtë të elektronit, dhe njëkohësisht duke i mbajtur ata mjaftueshëm afër për të transferuar në mënyrë efikase energjinë dhe në fund ta dorëzojnë atë në qendrën e reaksionit.

Nëse pigmentet janë shumë afër njeri-tjetrit, atëherë tabloja e thjeshtë e përshkruar më sipër, bie. Kushtet e shkëmbimit të elektroneve mund të kontribuojnë në procesin e transferimit të energjisë. Ky mendohet të jetë rasti i shuarjes së gjendjeve triplete të klorofilit nga karotenoidet, ku përfshihen tranzicione të ndaluara. Në këtë rast kushtet Coulomb janë afër zeros. Gjithësesi, nuk mendohet që lidhja e shkëmbimit të jetë përfshirë në funksionin e antenës

$$k_{et} = \frac{2\pi}{h} \left| \langle \psi_i | \hat{V} | \psi_f \rangle \right|^2 \delta(E_i - E_f) \quad (2.3.6)$$

Në reaksionet e transferimit të elektronit, rregulli i artë Fermi përshkruan konstanten e shpejtësisë të rendit të parë për procesin e transferimit të elektronit, sipas Eq. 2.3.6. Ky ekuacion nga shumë anë është i ngjashëm me atë të teorisë Förster për transferim të energjisë. Një gjendje fillestare, në të cilën një elektron (ose një excitation) lokalizohet, bën një kalim joradiativ në një gjendje finale, në të cilën elektroni (ose excitation) është zhvendosur në një molekulë tjetër.

2.1 Lidhje Exciton

Kur pigmentet janë fizikisht shumë afër, që për klorofile është shpesh më pak se 10 Å, bashkëveprimi midis tyre manifestohet në një mënyrë cilësisht të ndryshme, të njohur si lidhje exciton (van Armerongen et al., 2000). Këtu do të shikojmë vetëm një dimer të pigmenteve bashkëvepruese, por trajtimi mund të zgjerohet në një numër më të madh pigmentesh bashkëvepruese. Spektrat e absorbimit të pigmenteve janë të ndarë dhe zakonisht vërehet një spektër rrethor dihroizëm. Nivelet e energjisë të monomerit dhe dimerit exciton-i ndarë tregohen në figure 2.3.2a. Madhësia e ndarjes dhe intensiteti i dy kalimeve varen nga distanca midis pigmenteve, si dhe orientimi relativ i momenteve dipole të kalimit, siç tregohet për disa shembuj në figure 2.3.2b. Ndarja e absorbimit është shpesh shumë e vogël për t'u zgjidhur në spektrin e absorbimit, por mund të vërehet në spektrin cirkular të dikroizmit (CD), ku dy bandat exciton kanë madhësi të njëjta dhe shenja të kundërta. Ky spektër tipik CD me derivat - formë me karakteristika të njëjta dhe të kundërta pozitive dhe negative, quhet spektër konservativ.

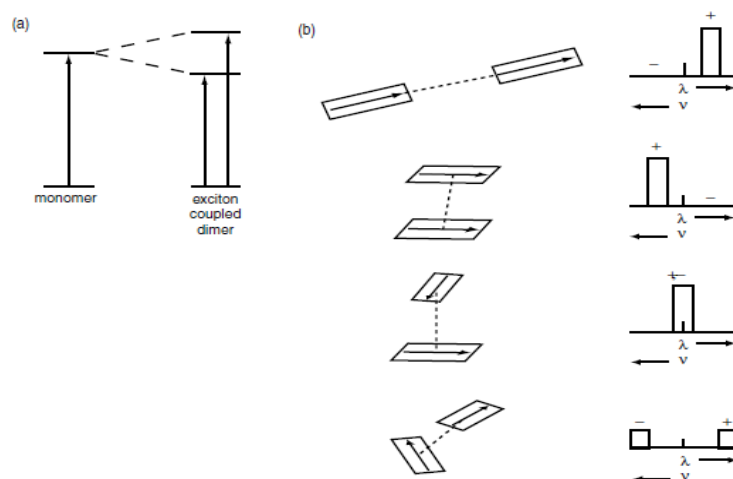


Fig. 2.3.2: (a) Diagramë niveli të energjisë të një monomeri dhe një dimeri exciton- i ndarë. (b) Spektrat exciton të dy pigmenteve në orientime të ndryshme.

Dimeri exciton-coupled (lidhje – exciton) shihet në mënyrë më produktive si një supermolekulë me kalime elektronike të delokalizuar, dhe jo si një koleksion molekulash individuale me tranzicione të lokalizuara. Funksionet valore molekulare për këtë supermolekulë jepen nga Eq. 2.3.7:

$$\begin{aligned} \Psi^+ &= (1/\sqrt{2})(\psi_1 + \psi_2) \\ \Psi^- &= (1/\sqrt{2})(\psi_1 - \psi_2) \end{aligned} \quad (2.3.7)$$

ku ψ^+ dhe ψ^- janë funksionet valore të dimerit të ngacmuar, dhe ψ_1 e ψ_2 janë funksionet valore për dy pigmentet monomere.

Energjitë e dy gjendjeve exciton jepen nga Eq. 2.3.8:

$$\begin{aligned} E^+ &= \frac{1}{2} (E_1 + E_2) + V_{12} \\ E^- &= \frac{1}{2} (E_1 + E_2) - V_{12} \end{aligned} \quad (2.3.8)$$

ku E^+ dhe E^- janë energjitë e gjendjes exciton, E_1 dhe E_2 janë energjitë e pigmenteve monomere, dhe V_{12} është energjia lidhëse midis tyre (figure 2.3.2).

2.2 Marrëdhënia e transferimit Forster me bashkimin exciton

Kemi dy tablo të bashkëveprimeve të pigmenteve: tabloja Förster, e aplikueshme në distanca të gjata e bashkëveprime të dobëta, dhe tabloja e exciton, e aplikueshme në distanca të shkurtra e bashkëveprime të forta. Mundet të bëhet një kalim gradual midis këtyre dy pikëpamjeve, në pamje të parë kontradiktore, të bashkëveprimeve pigment-pigment. Një trajtim më i sofistikuar zbulon se të dy kendveshtrimet janë vërtetë vetëm dy anë të së njëjtës monedhë dhe se nuk ekziston diferencë fundamentale mes tyre (Knox and Gülen, 1993). Megjithatë, lidhja manifestohet në mënyra disi të ndryshme në të dy rastet ekstreme. Të dy pikëpamjet - Förster dhe exciton janë esenciale për të kuptuar komplekset antenë fotosintetike.

2.3 Modele kapje – lidhje e antenave në një qendër reaksioni

Një hap kritik në procesin e ruajtjes së energjisë është lidhja e qendrës së reaksionit me antenën (Pearlstein, 1996). Disa modele të ndryshme janë të mundshme. A mundet fotokimia ta shuajë në mënyrë të pakthyeshme gjendjen e ngacmuar çdo herë, që ajo transferohet brenda qendrës së reaksionit, apo a vizitojnë eksitimet qendrën e reaksionit në mënyrë të shumfishtë, duke kërcyer brenda dhe jashtë shumë herë para se fotokimia përfundimisht të shuaj gjendjen e ngacmuar? I pari nga keto dy ekstreme shpesh quhet kurth i thellë, ndërsa i dyti njihet si një kurth i cekët. Një mundësi e tretë është, që kurthi është kaq i cekët sa madje pasi fotokimia ka shuar gjendjen e ngacmuar, transferim i kundërt i elektroneve mund të ndodh dhe të rikrijohet gjendja e ngacmuar e klorofilit të qendrës së reaksionit, dhe gjendja e ngacmuar mund të dal mbrapsht për tek sistemi antenë. Interesante është, që secili nga këto tre raste kufizuese duket se zbatohet në sisteme të veçanta fotosintetike. Të kuptuarit se si janë të lidhura qendrat e reaksionit dhe antenat ka marrë një kohë të gjatë për tu zhvilluar dhe ka kërkuar të dhëna nga studime strukturore, studime kinetike spektroskopike e teori. Në disa sisteme, proceset janë relativisht mirë të kuptuara, ndërsa në të tjera, studimet janë ende në fazë shumë të hershme për të deshifruar mënyren, se si punojnë.

Lifetimes e gjendjeve të ngacmuara në shumicë antenave integrale të membranave fotosintetike, të lidhura me qendrat e reaksionit, janë të rendit disa dhjetra deri qindra pikosekonda. Këto duhet të krahasohen me lifetimes deri në disa nanosekonda për komplekset antenë të izoluara. Megjithatë, vetëm matja e lifetime nuk zbulon natyrën e proceseve të kapjes. Në trajtimet e hershme të kësaj çështjeje, përpara përdorimit të spektroskopisë ultra të

shpejtë kinetike dhe informacionit strukturor, shpesh supozohej se eksitimi lëvizte drejt qendrës së reaksionit me një seri hapash nga një pigment në tjetrin, ku çdo hap merrte disa picoseconds. Lifetime e përgjithshme e gjendjes së ngacmuar shihej si një proces difuzioni i limituar, me ngacmim që lëviz progresivisht më afër qendrës së reaksionit, deri sa në fund kapet. Sot, kjo pikëpamje nuk konsiderohet e zbatueshme në çdo sistem. Tabloja aktuale bazohet në një lëvizje shumë më të shpejtë të ngacmimit nga një pigment në tjetrin brenda sistemit antenë, me kohë transferimi ndër-pigment, zakonisht të rendit kohor subpikosekonda.

Nëse probabiliteti që energjia e ngacmimit të dalë nga kurthi është relativisht i vogël, e tillë që njeherë eksitimi të lokalizohet në pigmentet në zemër të qendrës së reaksionit, kjo pothuaj gjithmonë çon në fotokimi stabile, sistemi përshkruhet si me kurth të thellë. Kjo ndodh, kur konstantja e shpejtësisë për fotokimi është shumë më e madhe se konstantja e shpejtësisë për shkëputje nga kurthi. Spektri i ngacmimit i fluorescencës dhe lifetime e vërtetuar e gjendjes së ngacmuar varen fuqimisht nga gjatësia e valës së ngacmimit. Nëse ngacmimi është në sistemin antenë, procesi final i transferimit në zemrën e qendrës së reaksionit dominon lifetime të gjendjes së ngacmuar. Nëse ngacmimi është në pigmentet zemer të qendrës së reaksionit, atëherë fotokimija shpejt shuan ngacmimin, dhe lifetime i gjendjes së ngacmuar në masë të madhe pasqyron këtë proces. Bakteret fotosintetike purple përshkruhen relativisht mirë nga ky model.

Nëse kurthi është i cekët, probabiliteti i shuarjes së gjendjes së ngacmuar nga fotokimia është shumë më i ulët se probabiliteti i largimit të ngacmimit mbrapa në masivin e antenës. Kjo ndodh kur konstantja e shpejtësisë së largimit të ngacmimit mbrapa në antenë është shumë më e madhe se konstantja e shpejtësisë së brendshme për fotokiminë. Ngacmimi zakonisht do të bëjë atëherë një shumicë vizita në qendrën e reaksionit, duke kërcyer brenda dhe jashtë derisa në fund fotokimia ndërpret procesin. Kjo njihet si kinetikat kurth - limituar. Në këtë rast, lifetime i vërtetuar i gjendjes së ngacmuar pasqyron, bashkë, madhësinë dhe shpërndarjen spektrale të sistemit antenë dhe konstanten e brendshme të shpejtësisë për fotokimi kur ngacmimi lokalizohet në qendrën e reaksionit. Një sistem, që përshkruhet nga kinetikat strikt kapje- limituar do të ketë një spektër ngacmimi për fotokimi ose fluoreshencë, identik me spektrin e absorbimit, dhe një lifetime të gjendjes së ngacmuar të pavarur nga gjatësia e valës së ngacmimit. Kjo, për shkak se ngacmimi në çdo pigment, madje edhe pigmente, që janë pjesë e zinxhirit kryesor të transferimit të elektroneve, do të çojë në një probabilitet të lartë të largimit nga kurthi dhe ripopullimit të sistemit antenë, kështu që bën pak diferencë se cili pigment është ngacmuar fillimisht. Shumica e të dhënave aktuale tregojnë, se fotosistemi I punon në këtë mënyrë (van Grondelle et al., 1994).

Rasti i fundit i kinetikave të kapjes ndodh kur kurthi është jashtëzakonisht i cekët. Edhe pasi fotokimija më në fund kap ngacmimin, egziston një probabilitet relativisht i lartë që ky proces të kthehet me transferim mbrapa elektroni. Kjo rikrijon gjendjen e ngacmuar të bërthamës së pigmentit në qendrën e reaksionit, dhe ngacmimi pastaj kthehet mbrapa në sistemin antenë. Kjo njihet si ekuilibri i çiftit-radikal. Modeli i ekuilibrit të çiftit-radikal është vërtetë një rast special i kinetikave të kapjes - të limituara, në të cilat fotokimija është më lehtë e kthyeshme (reversibel). Mendohet se fotosistemi 2 ndjek këtë sjellje (Schatz et al., 1988; van Grondelle et al., 1994).

Kompleksi LHC2 është kështu një shembull i shkëlqyer i një rasti, në të cilin disa nga pigmentet janë të lidhura dobët bashkë dhe mund të përshkruhen duke përdorur teorinë

standarde Förster (pigmentet B800), ndërsa të tjera (pigmentet B850) përshkruhen më mirë duke përdorur formalizmin exciton.

2.3.3 Përfundime

Mekanizmi, që aplikohet për pigmentet e lidhura dobët, mekanizmi Forster i transferimit të energjisë, është një proces transferimi joradiativ rezonance. Ndërkohë, procesi i transferimit elektroneve mund të shihet si një proces joradiativ relaksimi nga një gjendje fillestare me donor elektroni të reduktuar në një gjendje finale me akceptor të oksiduar. Kur pigmentet janë fizikisht shumë afër, e cila për klorofile shpesh është më pak se 10 Å, bashkëveprimi midis tyre manifestohet në një mënyrë cilësisht të ndryshme, të njohur si lidhje exciton. Të dyja bashke, teoria standarde Forster dhe formalizmi exciton janë esenciale për kuptimin e kompleksit antenë fotosintetike.

2.4 TEORIA E FLUKSEVE TË ENERGJISË NË BIOMEMBRANA NË ANALIZA E TRANSITIMIT TË FLUORESHENCËS KLOOROFILE a – sipas STRASSER

Përmbledhje

Sinjalet e fluoreshencës klorofile (CHL) a janë trajtuar dhe kurbat Kautsky janë analizuar për informacion rreth strukturës, konformacionit dhe funksionimit të aparatit fotosintetik, veçanërisht, PhS 2. Formulimi analitik i biofizikës së aparatit fotosintetik, sipas modeleve me kompleksitet të ndryshëm sa i përket arkitekturës së njësive fotosintetike dhe mënyrave të komunikimit energjetik mes grupeve të pigmenteve, si dhe lidhjet e tyre me sinjalet eksperimentale fluoreshente janë derivuar, bazuar në ‘Teoria e Flukseve të Energjisë në Biomembrana’(Strasser, 1978, 1981) dhe mbi konceptin bazë, se rendimenti fluoreshent i PhS 2 përcaktohet nga gjendja – e hapur apo e mbyllur - e qendrës së reaksionit (RC) . Derivimi i formulave të thjeshta matematike, që shprehin komunikimin energjetik mes njësive të PhS 2, të quajtur në literaturë si ‘grupim’, është paraqitur dhe është definuar ‘probabiliteti i përgjithshëm i grupimit’, i cili merr parasysh gjithë rrugët e mundshme të komunikimit.

2.4.1 Hyrje

Për investigimin e sjelljes energjike të një sistemi fotosintetik sot përdoren shumë teknika eksperimentale. Fluoreshenca klorofile (CHL) a, pranohet gjerësisht për të kuptuar strukturën dhe funksionimin e aparatit fotosintetik. Ekziston një marrëveshje e përgjithshme, që në temperaturën e dhomës, fluoreshenca CHL a emetohet kryesisht nga PhS 2 dhe, për këtë arsye, mund të shërbejë si një sondë e brendshme e gjendjes së energjisë së ngacmimit të tij. Në lidhje me kinetikën, fluorimetritat e përdorur janë dy tipe bazë, njëri regjistron sinjalet e fluoreshencës induktuar nga një ngacmim i vazhdueshëm dhe tjeri nga ngacmim i moduluar. Secila metode ka avantazhet dhe disavantazhet e veta.

Ajo çka realisht është e rëndësishme është të bëhet lidhje mes sinjalit të fluoreshencës dhe biofizikës së sistemit.

Janë prezente disa nomenklatura, nuk ka një të tillë të unifikuar. Këtu akcentohet puna e bërë nga R. J. S. e bashkëpunëtorët e tij. Modele me kompleksitet të ndryshëm jepen në lidhje me komunikimin energjetik brenda një njësie PhS 2 si dhe midis njësive PhS 2 (të trajtuara si grupime).

Për analizën e transients, të fluoreshencës CHL a, dogma se gjendja e RC të PhS 2 është definuar vetëm nëpërmjet gjendjes redox të akceptorit quinone primar të PhS 2, bazuar në teorinë e Duysens and Sweers (1963) dhe të pranuar nga shumica e studjuesëve, do të pranohet si një përafrim i parë. Në dogmën aktuale: kur Q_A në një RC është në gjendje të reduktuar (Q_A^-), RC është e mbyllur dhe fluoreshenca CHL e antenës është e lartë, ndërsa kur Q_A është në gjendje të oksiduar, RC është e hapur dhe fluoreshenca e antenës shuhet, dmth, Q_A e oksiduar shuan fluoreshencën.

Në këtë paraqitje konsiderohen vetëm sinjalet direkte të fluoreshencës. Pas raportit origjinal të transient Kautsky (Kautsky and Hirsch, 1931) të njëjtat O-P-S transient u regjistruan me një rezolucion kohe të lartë dhe, kur u paraqitën në shkallë logaritmike kohore (figure 2.4.1),

u shfaq një formë me shumë faza, e pasur në informacion për gjendjen e sistemit in vivo (Strasser and Govindjee, 1992a, 1992b).

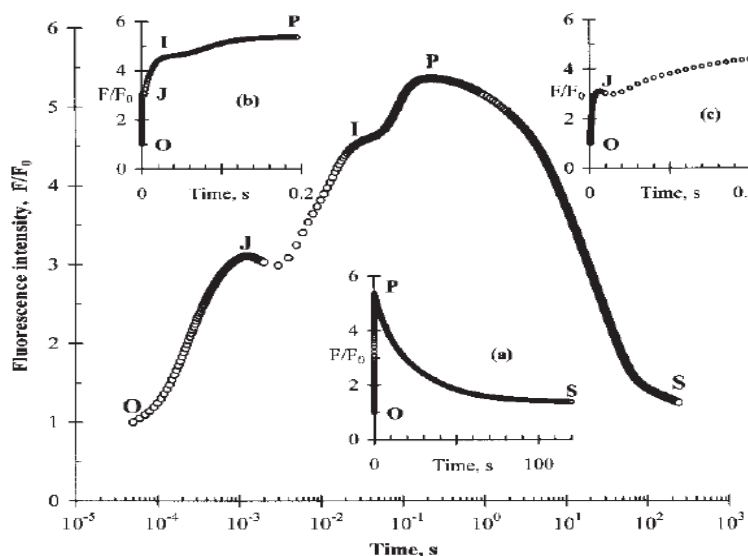


Fig. 2.4.1: Transient tipik i fluoreshencës Chl a (kurba Kautsky), të shfaqur gjatë ndricimit, të një gjethe bizele të përshtatur në errësirë, me dritë të kuqe ngopëse (pik 650 nm), vendosur në shkallë logaritmike kohe. Vlerat fluoreshente shprehen si F/F_0 . Drita aktinike fokusohet në sipërfaqen e mostrës për të siguruar një rrezatim homogjen të zonës së ekspozuar (4 mm diametër); është përdorur intensiteti maksimal i burimit të dritës (600 W m^{-2} , ose $3200 \mu\text{mol fotone m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Rritja e fluoreshencës OJIP (figure 2.4.3) pasohet me një rënie në gjendje stacionare S. Plotesimet tregojnë të njëjtin transient në shkallë të ndryshme lineare kohore: (a - qendër) deri 120 s, (b - lart majtas) deri në 200 ms dhe (c - lart djathtas) deri në 20 ms. (Strasser and Govindjee, 1992a, 1992b). Sipas nomenklaturës Strasser et al. (1995), për paraqitjen e kinetikave rritëse nga O në P përdoret terminologjia O-J-I-P. Përdorimi i DCMU (3-(3,4-diklorofenil) -1,1-dimetilurea), për bllokimin e fluksit elektronik përtej Q_A , dhe në temperaturë të ulët (77 K), për bllokimin e gjithë transferimeve sekondare të elektroneve; lehtëson studimet e aparatit fotosintetik, pasi reduktojnë kompleksitetin e sistemit in vivo dhe lejojnë që komponentet të studjohen më thjeshtë. Megjithatë ky i fundit është gjithashtu një disavantazh, studimet në prani të DCMU dhe në temperaturë të ulët ishin shumë të dobishme për avancimin e njohurive dhe kuptimin e biofizikës së mekanizmit fotosintetik.

Shënimi i mësipërm është vendosur për vlerën që ka në trajtimet teorike dhe eksperimentet e thelluara. Ky punim nuk pretendon ta trajtojë këtë çështje. Në punën tonë teorike e eksperimentale (të prezantuar ne vijim) nuk kemi përdorur DCMU dhe as temperatura të tilla (77 K) të ulta.

2.4.2 Sfondi teorik

A. Teoria e flukseve të energjisë në biomembrana

Bazat

Një koncept energjetik dhe një teori / metodologji e përgjithshme e aplikueshme janë përdorur për përshkrimin e modeleve të propozuara. Pas kësaj, parashikohet sjellja e sistemit sipas modelit dhe parashikimet krahasohen me funksionet e sistemit fotosintetik të matura eksperimentalisht (Strasser, 1986).

'Teoria e Flukseve të Energjisë në Biomembranat' është formuluar në mënyrë të përgjithshme, kështu që ajo mund të aplikohet në çdo asambel pigmentesh të çdo lloj biomembrane. Kuadri metodologjik i teorisë lejon përcaktim rigoroz të gjithë termave, që shpesh përdoren në analizën e shpërndarjes së energjisë në aparatin fotosintetik (fluksi, rendimenti, probabiliteti dhe konstantet e shpejtësisë të transferimit të energjisë së ngacmimit). Teoria paraqet dhe përcakton pesë sasi bazë dhe të dallueshme të lidhura me çdo sistem pigmentesh 'i' (tabele 2.4.1) dhe postulon se, për çdo aranzhement të mundur kompleksesh të sistemeve të ndërlidhura të pigmenteve, komunikimi i tyre energjik mund të shprehet me ekuacione të thjeshta, që zgjidhen lehtë analitikisht, në lidhje me pesë sasi të bazë.

Flukse të energjisë (E): Flukset e energjisë për një sistem pigmentesh të dhene 'i' janë të ndara në influxes dhe outfluxes energjike. Influxi total i energjisë, E_i , në një sistem pigmenti 'i' (ose shpejtësia e ngacmimit e 'i') jepet si shuma e gjithë influkseve:

$$E_i = J_i + \sum E_{hi} \quad (2.4.1)$$

ku, J_i është fluksi i dritës së absorbuar nga sistem pigmenti 'i' dhe E_{hi} fluksi i energjisë së transferuar nga një sistem pigmenti 'h' në sistem pigmenti 'i'. Meqenëse influkset dhe outfluxes me shpejtësi ekuilibrohen në një sistem pigmenti 'i', outfluxi total (ose shpejtësia totale e de-excitation e 'i') është e barabartë me influxin total; ajo gjithashtu shënohet si E_i . Energjia e outflux nga sistem pigmenti 'i' (ose shpejtësi e de-excitation e 'i') përfshin transferimet e energjisë ose transduksione në një vend ose formë tjetër, 'j'. Outfluxi total jepet si:

$$E_i = \sum E_{ij} \quad (2.4.2)$$

të cilat mund të shprehen si:

$$E_i = \sum E_{im} + E_{iP} + E_{iD} = \sum E_{im} + E_{iP} + E_{iD} + E_{iH} + E_{iF} \quad (2.4.2')$$

ku, E_{im} është fluksi i transferimit të energjisë nga sistem pigmenti 'i' në një sistem pigmenti 'm', E_{iP} outflux i energjisë, që konvertohet në energji fotokimike dhe E_{iD} fluksi i energjisë disipative nga sistem pigmenti 'i', që përfshin fluksin e nxehtësisë disipative E_{iH} dhe fluksin e fluoreshencës E_{iF} (matur eksperimentalisht si F_i).

Konstante të shpejtësisë (k): Çdo outflux individual i energjisë (ose shpejtësi e de-excitation) nga 'i' në 'j' karakterizohet nga një konstante shpejtësie de-eksitimi k_{ij} . Në vijim supozojmë se të gjitha de-excitations janë të rendit të parë.

Lifetime (τ): Lifetime e gjendjes së ngacmuar të sistem pigmentit 'i', τ_i , jepet si:

$$\tau_i = 1 / \sum k_{ij} \quad (2.4.3)$$

Probabilitete (p): Probabiliteti p_{ij} që një exciton të transferohet / transduktohet nga sistem pigmenti 'i' në një vend / formë 'j' shprehet ose në lidhje me outfluxes e energjisë ose në terma të konstanteve të shpejtësisë së de-excitation si:

$$p_{ij} = \frac{E_{ij}}{\sum E_{ij}} = \frac{E_{ij}}{E_i} \quad (2.4.4)$$

dhe,

$$p_{ij} = \frac{k_{ij}}{\sum k_{ij}} = k_{ij}\tau_i \quad (2.4.5)$$

Densiteti exciton (P^):* Densiteti i exciton ose përqendrimi P_i^* i pigmenteve të ngacmuara 'i' (ose përmbajtja e energjisë e sistem pigmentit të ngacmuar 'i') jepet si:

$$P_i^* = E_i\tau_i \quad (2.4.6)$$

Nga definimet e mësipërme të pesë sasive bazë (tabele 2.4.1) dhe ndërlidhjet e tyre të shprehura nga Eqs. 2.4.1- 2.4.6, kuptohet se çdo outflux nga sistem pigmenti 'i' në çdo destinacion 'j' mund të shprehet në mënyrë ekuivalente si:

$$E_{ij} = E_i p_{ij} + E_i(\tau_i k_{ij}) = (E_i\tau_i) k_{ij} = P_i^* k_{ij} \quad (2.4.7)$$

Tabele 2.4.1: Pesë sasi bazë që i referohen një sistem pigmenti 'i', sipas definimit në Teorinë e Flukseve të Energjisë në Biomembrana

<i>Flukse energjie</i>	
<i>Influkse energjie (konstante ngacmimi)</i>	
J_i	fluksi i dritës, absorbuar nga sistem pigmenti 'i'
E_{hi}	fluksi i energjisë së transferuar nga një system pigment 'h' në system pigmentin 'i'
E_i	influx total energjie në system pigmenti 'i'
<i>Outfluxes energjie (shpejtësia de-excitation)</i>	
E_{ij}	outflux energjie nga system pigmenti 'i' transferuar/transformuar në një vend/formë 'j'
E_{iP}	outflux energjie nga system pigmenti 'i' transformuar në energji fotokimike
E_{iD}	fluks energji disipative nga system pigmenti 'i'
E_{iH}	fluks nxehtësi disipative nga system pigmenti 'i'
E_{iF}	fluks fluoreshence nga system pigmenti 'i'
E_i	outflux total energjie nga system pigmenti 'i'
<i>Konstantet e shpejtësisë së de-excitation</i>	
k_{ij}	konstante shpejtësie të fluksit të energjisë nga system pigmenti 'i' në një vend/formë 'j'
<i>Lifetimes</i>	
τ_i	lifetime e gjendjes së ngacmuar të system pigmenti 'i'

<i>Probabilitete</i>
p_{ij} probabiliteti i ngacmimit transferuar/transformuar nga system pigmenti 'i' në një vend/formë 'j'
<i>Densitete ngacmimi</i>
P_i^* koncentrimi i pigmenteve të ngacmuar 'i' ose përmbajtje e energjisë së ngacmimit të system pigmenti 'i'

B. Flukse energjie në njësinë fotosintetike

Aparatin fotosintetik mund të përshkruhet nga modele me kompleksitet të ndryshëm. Deferencat e tyre mund t'i referohen strukturës dhe / ose konformacionit. Do quajmë 'strukturë' përbërjen kimike dhe arkitekturën e grupimit të pigmenteve, dhe i atribuojmë termin 'conformation' grupimit të konstanteve të shpejtësisë së de-excitation.

Në modelet e paraqitura skematikisht në figure 2.4.2, struktura simbolizohet nga kuadrate për pools pigmente dhe qarqe për RCs, ndërsa shigjetat simbolizojnë flukset e energjisë E_{ij} dhe, prej këtej, indirekt për të demonstruar konformacionin, dmth konstantet e shpejtësisë k_{ij} (nga $E_{ij} = P_i^* k_{ij}$ siç shprehet në Eq. 2.4.7). Gjithë modelet në figure 2.4.2 supozohen të jenë identike në lidhje me strukturën, kompleksiteti i të cilave është reduktuar nga shumë grupime pigmenti deri në tre, si në modelin origjinal tripjesësh Warren Butler (Butler and Strasser, 1977a; Strasser, 1986), në përputhje me kufizimin e matjeve të fluoreshences CHL a për të zbuluar heterogjenitet plotësues. Këto modele tripjesësh supozojnë dy pools pigmente antenë në PhS 2, dmth grupi antenë i distancuar (të vogla e të mëdha) ose kompleksi drite mbledhes LHC 2 - PhS 2 a / b (shënuar '3') dhe grupimi i antenës berthamë (shënuar '2'), duke kanalizuar më në fund energjinë e ngacmimit në qendrën e reaksionit PhS 2 (shënuar 'b'), ndërsa sistemet pigment PhS 1 kanalizojnë energjinë e ngacmimit në qendrën e reaksionit të PhS 1 (shënuar 'a'), janë konsideruar si një site (shënuar '1'). Për thjeshtësi, modelet e PhS 1 nuk janë paraqitur në figure 2.4.2, por vetëm indirekt janë treguar me shigjeta, që korrespondojnë me flukset e migrimit të energjisë.

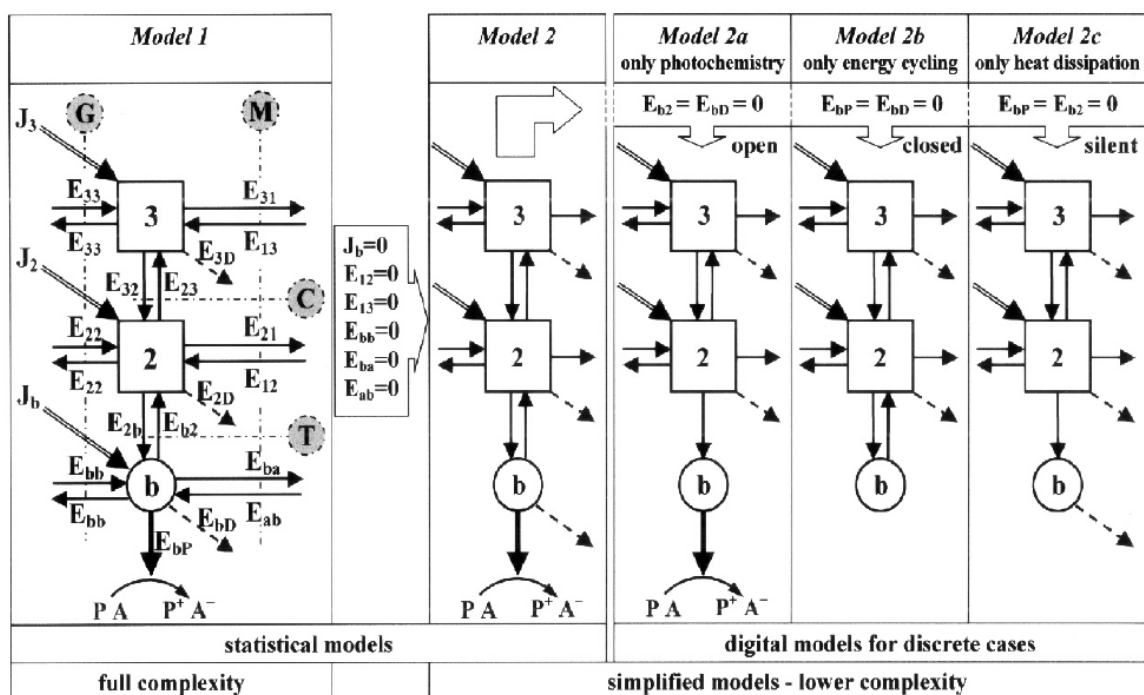


Figure 2.4.2: Model tripjesësh i aparatit fotosintetik, me kompleksitet më të lartë (Model 1) ose më të ulët (Model 2). Kuadratet dhe qarqet përfaqësojnë pools (pishina) pigmenti dhe qendra reaksioni (RCs) respektivisht, ndërsa shigjetat tregojnë flukse energjie. Modelet presupozojnë dy pishina antenë pigmenti në PhS 2 (LHC 2, shenuar si '3' dhe antena zemër, shenuar si '2'), kanalizojnë energjinë e ngacmimit në qendrën e reaksionit të PhS 2 (shenuar si 'b'), dhe pools antena pigment e PhS 1 (treguar vetëm nga shigjetat, demonstroi flukse të migrimit të energjisë) kanalizojnë energjinë e ngacmimit në qendrën e reaksionit të PhS 1 (shenuar si 'a') konsiderohen si një vend (shenuar si '1'). Model 1 presupozon shpërndarjen e energjisë E_{iD} , bashkë si nxehtësi dhe fluoreshencë ($E_{iD} = E_{iH} + E_{iF}$) nga gjithë vendet e PhS 2, komunikim variabël energjetik ndërmjet antenës zemër dhe RC brenda një njësie PhS 2 (kurthi T: E_{2b} dhe E_{b2}) antenës zemer dhe LHC 2 brenda një njësie PhS 2 (bashkimi C: E_{23} dhe E_{32}), midis vendeve të ngjashme të njësive fqinje PhS 2 (grupimi G: E_{33} , E_{22} dhe E_{bb}) dhe midis vendeve PhS 2 dhe PhS 1 (migrimi M: E_{31} , E_{13} , E_{21} , E_{12} , E_{ba} dhe E_{ab}). Model 2 ka një kompleksitet më të ulët në lidhje me komunikimin e energjisë, si specifikohet me vendosjen e disa flukseve të energjisë të barabartë me zero dhe eliminimin e shigjetave përkatëse. Modele 1 dhe 2 janë modele statistikore, mbledhin bashkë njësitë PhS 2 me RCs të tre konformacioneve të ndryshme; model 2 është i thjeshtuar më tej në modele dixhitale, nga një për çdo konformacion: Model 2a: RC e hapur (vetëm fotokimi primare $PA \rightarrow P^+A^-$; Model 2b: RC e mbyllur (vetëm ciklim energjie); Model 2c: RC e heshtur (RCs) (vetëm shpërndarje nxehtësie) (nga Butler and Strasser, 1977a; Strasser, 1986).

Në parim, një pool i pigmentit antenë PhS 2 i ngacmuar ('2' ose '3') mund të kryej gjithë llojet e çëksitimit, me probabilitete të përcaktuara nga konformacioni i saj, me përjashtim të fotokimisë primare. Në të kundërtën, një RC e ngacmuar ('b') mund të kryej çdo lloj çëksitimi duke përfshirë ruajtjen e energjisë në fotokiminë fillestare $PA \rightarrow P^+A^-$ (P në vend të P680, dmth qendër e reaksionit të PhS 2, dhe A akceptori elektronik primar i PhS 2). Megjithatë, ajo kryen vetëm atë që është përcaktuar nga konformacioni i saj aktual (shih p.sh., modelet dixhitale 2a, 2b, 2c). Modelet 1 dhe 2 janë modele statistikore, në kuptimin që ata bashkojnë njësi me RCs me konformitet të ndryshëm.

Modeli 1 mban kompleksitetin e plotë të sistemit, supozon: (1) Absorbimi i dritës, si dhe shpërndarja e energjisë (me E_{id} - për shpërndarje totale, dmth nxehtësi (H) dhe fluoreshencë (F), $E_{id} = E_{iH} + E_{iF}$ nga gjithë objektet e PhS 2. (2) Komunikimi energjetik variabël midis: (a) antenës zemer dhe RC brenda një njësie PhS 2 (kuantifikuar nga produkti i kapur T); (b) antenës zemër dhe LHC 2 brenda një njësie PhS 2 (kuantifikuar nga produkti bashkues C); (c) objekte të ngjashme (RC - RC, antenë zemër - antenna zemër dhe LHC 2 - LHC 2) të njësive fqinje PhS 2 (grupimi G, një term i futur nga Strasser (1978, 1981) për lidhje të ndryshueshme dhe të kuantifikuar nga probabiliteti i përgjithshëm i grupimit p_{2G} nga zero në një); dhe (d) objektet PhS 2 dhe PhS 1 (migrim M).

Termat e produktit të kapur $T = p_{2b}P_{b2}$ dhe produkt bashkimi $C = p_{23}P_{32}$ (ku P_{ij} është probabiliteti i transferimit të energjisë nga 'i' në 'j') u futën nga Strasser (1978, 1981), me termin 'produkt' që kupton se në të dy rastet krijohet një cirkulim energjie midis dy system-pigmenteve të përfshirë.

Modeli 2 është me kompleksitet më të ulët se modeli 1, duke pranuar absorbimin e dritës dhe emisionin e fluoreshencës nga RC si të papërfillshme dhe miratimin e thjeshtimeve të mëposhtme në lidhje me konformacionin: Asnjë grupim i RC-ve ($k_{bb} = 0$), nuk ka migrim midis qendrave të reaksionit të PhS 2 dhe PhS 1 ($k_{ba} = k_{ab} = 0$), ose nga PhS 1 në pigment pools të PhS 2 ($k_{13} = k_{12} = 0$). Me këto thjeshtime, një RC, pasi kap një exciton, mund të çeksitohet në tre rrugë të ndryshme, dmth fotokimi fillestare $PA \rightarrow P^+A^-$, ose cirkulim energjie, si transferim prapa në pool të pigment antenës '2', ose shpërndahet në formë nxehtësie. Figure 2.4.2 tregon deconvolution të modelit statistikor 2 në modele dixhitale për këto tre raste diskrete, të cilat korrespondojnë me konformacione të ndryshme të RC:

Modeli 2a: RC të hapura (indeksi 'op', only primary photochemistry), përshkruar nga

$$k_{b2}^{op} = k_{bD}^{op} = 0 \Rightarrow p_{bP}^{op} = 1 \text{ dhe } T^{op} = 0.$$

Modeli 2b: RC të mbyllura (indeksi 'cl', only energy cycling), përshkruar nga

$$k_{bP}^{cl} = k_{bD}^{cl} = 0 \Rightarrow p_{b2}^{cl} = 1 \text{ dhe } T^{cl} = p_{2b}$$

Modeli 2c: RC e heshtur, dmth një RC që shpërndan gjithë energjinë e saj të ngacmimit (indeksi 'si', only heat dissipation), përshkruar nga $k_{bP} = k_{b2} = 0 \Rightarrow p_{bD}^{si} = 1$ dhe $T^{si} = 0$.

Teoria fluksit të energjisë aplikohet për të formuluar secilin nga modelet e treguara në figure 2.4.2. Megjithatë, sinjalet e fluoreshencës CHL a nuk japin informacion, i cili të na lejoj të bëjmë dallimin midis modeleve 1 e 2 (Lavergne and Trissl, 1995; Trissl and Lavergne, 1995). Fluoreshenca variabile CHL a pasqyron plotësisht diferencën mes RC-ve që ruajnë energji në fotokiminë fillestare (të hapur), ose energji ciklike kthim mbrapa në antenën zemer (të mbyllur).

Këtu, po tregojmë në mënyrë analitike se si teoria e fluksit të energjisë aplikohet në të dy gjendjet diskrete, të hapura dhe të mbyllura, të modelit të thjeshtuar 2, duke shënuar si B fraksionin e RCs të mbyllura.

Shkrimi Eq. 2.4.1 për dy pools antenë pigmenti ($i = 2$ ose 3) dhe RC e PhS 2 ($i = b$), jep sistemin e mëposhtem të ekuacioneve për influksat totale ose shpejtësitë e ngacmimit, ku çdo probabilitet përcaktohet nga konstantet e shpejtësisë (figure 2.4.2 dhe eq.2.4.5):

$$E_3^{op} = J_3 + (1 - B)E_3^{op}p_{33} + BE_3^{cl}p_{33} + E_2^{op}p_{33} \quad (2.4.8)$$

$$E_3^{cl} = J_3 + (1 - B)E_3^{op}p_{33} + BE_3^{cl}p_{33} + E_2^{cl}p_{23} \quad (2.4.9)$$

$$E_2^{op} = J_2 + (1 - B)E_2^{op}p_{22} + BE_2^{cl}p_{22} + E_2^{op}p_{32} \quad (2.4.10)$$

$$E_2^{cl} = J_2 + (1 - B)E_2^{op}p_{22} + BE_2^{cl}p_{22} + E_b^{cl}p_{b2}^{cl} + E_3^{cl}p_{32} \quad (2.4.11)$$

$$E_b^{op} = E_2^{op}p_{2b} \quad (2.4.12)$$

$$E_b^{cl} = E_2^{cl}p_{2b} \quad (2.4.13)$$

Sistemi i Eqs. 2.4.8 -2.4.13, të cilat janë ekuacione të thjeshta algjebrike, mund të zgjidhet lehtë për të dhënë shprehje për influksat totale të energjisë për secilin nga tre sitet e PhS 2 ('3', '2' dhe 'b').

Në vijim fokusi vihet në influksat e energjisë në antenën zemër ('2'). Trajtohen raste ekstreme, kur të gjithë RCs janë të hapura ($B = 0$) ose të mbyllura ($B = 1$, vlera maksimale), jepen shprehjet për influksat e energjisë, shenuar si $E_{2,0}^{op}$ dhe $E_{2,M}^{cl}$ respektivisht. Vazhdohet me rastin e përgjithshëm, duke derivuar shprehjet e përgjithshme për E_2^{op} , dhe E_2^{cl} , influksat e energjisë për njësi në gjendjen e hapur dhe të mbyllur respektivisht, të vlefshme për çdo pjesë të RC-ve të hapura e të mbyllura.

1. Influkset e snergjisë kur gjithë qendrat e reaksionit janë të hapura ose të mbyllura

Flukset $E_{2,0}^{op}$ (gjithë RCs - të hapura), dhe $E_{2,M}^{cl}$ (gjithë RCs - të mbyllura) jepen nga shprehjet e mëposhtme, të nxjerra duke zgjidhur sistemin e Eqs. 2.4.8-2.4.11, ku vlera perkatëse e fraksionit të RCs mbyllura, $B = 0$ ose $B = 1$, është zëvendësuar:

$$E_{2,0}^{op} = \frac{J_2 + J_3p_{32}/(1-p_{33})}{1-p_{22}-C/(1-p_{33})} \quad (2.4.14a)$$

$$E_{2,M}^{cl} = \frac{J_2 + J_3p_{32}/(1-p_{33})}{1-p_{22}-T-C/(1-p_{33})} \quad (2.4.14b)$$

Shënojmë se në eq. 2.4.14b, T vendoset për T^{cl} , i cili, sipas modelit (figure 2.4.2), është i vetmi produkt i kapur i ndryshëm nga zero: $T = p_{2b}p_{b2}^{cl} = p_{2b}$

Shprehjet për influxes e energjisë në LHC 2 (pool antenë pigmenti '3') ose RC ('b') mund të nxirren, duke zëvendësuar Eqs. 2.4.14a dhe 2.4.14b në Eqs. 2.4.8 dhe 2.4.9, ose në Eqs.2.4.12 dhe 2.4.13, respektivisht.

2. Influkset e energjisë për çdo fraksion të qendrave të reaksionit të hapura ose të mbyllura

Shprehjet e përgjithshme, të vlefshme për çdo fraksion RCs të hapur dhe të mbyllur, për influkset e energjisë E_2^{op} dhe E_2^{cl} dhe, njëkohësisht, për influkset totale në gjithë njësitë e hapura, $E_{2,tot}^{op}$, dhe gjithë të mbyllura, $E_{2,tot}^{cl}$, nxirren duke zgjidhur sistemin e Eqs. 2.4.8 – 2.4.11 dhe me një riorganizim të përshtatshëm të zgjidhjeve të përdorura Eqs. 2.4.14a dhe 2.4.14b. Shprehjet e përgjithshme janë:

$$E_2^{op} = E_{2,0}^{op} \left(\frac{1 + C_{HYP}}{1 + C_{HYP}(1 - B)} \right) \Leftrightarrow \quad (2.4.15a)$$

$$E_{2,tot}^{op} = E_{2,0}^{op} \left(\frac{1 + C_{HYP}}{1 + C_{HYP}(1 - B)} \right) (1 - B)$$

$$E_2^{cl} = E_{2,M}^{cl} \left(\frac{1}{1 + C_{HYP}(1 - B)} \right) \Leftrightarrow \quad (2.4.16a)$$

$$E_{2,tot}^{cl} = E_{2,M}^{cl} \left(\frac{1}{1 + C_{HYP}(1 - B)} \right) B$$

ku C_{HYP} është i barabartë me:

$$C_{HYP} = \left(\frac{E_{2,M}^{cl}}{E_{2,0}^{op}} - 1 \right) \left(\frac{1}{1 - C} \left(p_{22} + C \frac{p_{33}}{1 - p_{33}} \right) \right) \quad (2.4.17)$$

Shprehjet për influkset e energjisë në LHC 2 ('3') ose RC ('b') mund të nxirren, duke zëvendësuar Eqs.2.4.15a dhe 2.4.16a në Eqs.2.4.8 dhe 2.4. 9, ose në Eqs.2.4.12 dhe 2.4.13, respektivisht.

Ekuacionet 15a dhe 16a shprehin hiperbola dhe shkruhen në mënyrë që të zbulohet konstantja e kurbaturës C_{HYP} (emërtuar nga Strasser 1978, 1981), si një sasi e veçantë. Shprehja e C_{HYP} në eq. 2.4.17 është vendosur si produkt i dy termave të veçanta, i pari i përcaktuar vetëm nga influkset e energjisë në dy ekstremet (dmth, gjithë RCs të hapura ose të mbyllura) dhe e dyta përmban vetëm probabilitetet që u referohen gjithë llojeve të komunikimeve energjetike midis pools pigmenti PhS 2; prandaj ky i fundit u quajt 'probabilitet i përgjithshëm grupimi' për pool antenë pigmenti '2' (Strasser, 1978, 1981) dhe simboli p_{2G} :

$$p_{2G} = \frac{1}{1 - C} \left(p_{22} + C \frac{p_{33}}{1 - p_{33}} \right) \quad (2.4.18)$$

prandaj:

$$C_{HYP} = \left(\frac{E_{2,M}^{cl}}{E_{2,0}^{op}} - 1 \right) p_{2G} \quad (2.4.17')$$

C. Nga parametrat biofizikë në eksperimentale

1. Sinjale fluoreshence

Shikojmë shprehjet për outfluxet e fluoreshencës nga antenna zemër dhe LHC 2, bashkë për gjendjen e hapur dhe të mbyllur, dmth $E_{2F,tot}^{op}$, $E_{3F,tot}^{op}$, $E_{2F,tot}^{cl}$ dhe $E_{3F,tot}^{cl}$ janë derivuar drejtpërdrejt duke aplikuar Eq. 2.4.7, dmth duke shumëzuar me probabilitetin respektiv (p_{2F} ose p_{3F}). Në vijim supozojmë se sinjalet eksperimentale të fluoreshencës dalin vetëm nga pool antenë pigmenti '2'. Edhe pse vetëm një pjesë e outfluxeve të fluoreshencës arrijnë detektorin e dritës, fraksioni mund të merret si i barabartë me 1, meqë intensitetet e fluoreshencës janë në njësi arbitrare. Për këtë arsye, dhe, duke neglizhuar për momentin influencat e mundshme nga ana donore ose shuarjen nga plastoquinone i oksiduar, $P680^+$, sinjalet e fluoreshencës nga njesitë e hapura (F^{op}) dhe të mbyllura (F^{cl}), shkruhen respektivisht si:

$$F^{op} = E_{2F,tot}^{op} = E_{2,tot}^{op} p_{2F} \quad (2.4.19a)$$

dhe

$$F^{cl} = E_{2F,tot}^{cl} = E_{2,tot}^{cl} p_{2F} \quad (2.4.19b)$$

a. Sinjale fluoreshence kur gjithë qendrat e reaksionit janë të hapura ose të mbyllura

Sipas Eqs. të përgjithshme 2.4.19a dhe 2.4.19b, fluoreshenca e emetuar kur gjithë RCs janë të hapura (shënuar si F_0) ose të mbyllura (shënuar si F_M), janë shkruar respektivisht si:

$$F_0 = E_{2,0}^{op} p_{2F} \quad (2.4.20a)$$

dhe

$$F_M = E_{2,M}^{cl} p_{2F} \quad (2.4.20b)$$

Duke përdorur Eqs. 2.4.14a dhe 2.4.14b, shprehjet e F_0 dhe F_M janë nxjerrë, në lidhje me konstanten e shpejtësisë së çeksitimit (figure 2.4.2):

$$F_0 = \frac{Jk_{2F}}{k_{2b} + \frac{k_{23}(k_{3D} + k_{31})}{k_{32} + k_{31} + k_{3D}} + k_{21} + k_{2D}} \quad (2.4.21a)$$

dhe

$$F_M = \frac{Jk_{2F}}{\frac{k_{23}(k_{3D} + k_{31})}{k_{32} + k_{31} + k_{3D}} + k_{21} + k_{2D}} \quad (2.4.21b)$$

ku, J është influksi drejt pool antenë pigmenti '2' që i detyrohet vetëm energjisë së absorbuar (direkt nga '2' dhe gjithashtu nëpërmjet '3'):

$$J + J_2 + J_3 \frac{p_{32}}{1 - p_{33}} = J_2 + J_3 \frac{k_{32}}{k_{32} + k_{31} + k_{3D}} \quad (2.4.22)$$

Termat në emëruesin e Eq. 2.4.21a mund të klasifikohen në dy kategori: (a) Konstatja e shpejtësisë k_{2b} e cila, nga $p_{bp}^{op} = 1$, përcakton fotokiminë fillestare të PhS 2 dhe rrjedhimisht mund të shkruhet si k_{2P} . (b) Termat që përcaktojnë outfluxet neto nga antena kryesore, si shpërndarje $k_{2D} + k_{23}k_{3D}/(k_{32} + k_{31} + k_{3D})$ dhe migrim $k_{21} + k_{23}k_{31}/(k_{32} + k_{31} + k_{3D})$, dmth outfluxes nuk përdoren për fotokimi të PhS 2; shuma e tyre mund të zëvendësohet nga një konstante shpejtësie e përgjithshme k_{2N} . Kështu Eqs. 2.4.21a dhe 2.4.21b mund të shkruhen si:

$$F_0 = J \frac{k_{2F}}{k_{2P} + k_{2N}} \quad (2.4.21a')$$

dhe

$$F_M = J \frac{k_{2F}}{k_{2N}} \quad (2.4.21b')$$

b. Sinjale fluoreshencë për çdo fraksion të qendrave të reaksionit të hapura dhe të mbyllura

Duke aplikuar Eqs. e përgjithshme 2.4.19a dhe 2.4.19b për çdo fraksion të RCs të hapura dhe të mbyllura, për të cilat influkset totale të energjisë jepen nga Eqs. 2.4.15a dhe 2.4.16a, janë marrë shprehjet për fluoreshencën F^{op} të gjithë njësitë e hapura dhe F^{cl} të gjithë njësitë e mbyllura dhe, njëkohësisht, për fluoreshencën totale, F , të gjithë provës së ndriçuar (Strasser, 1978, 1981):

$$F^{op} = F_0 \frac{(1-B)(1+C_{HYP})}{1+C_{HYP}(1-B)} \quad (2.4.23a)$$

$$F^{cl} = F_M \frac{B}{1+C_{HYP}(1-B)} \quad (2.4.23b)$$

dhe,

$$F = F^{op} + F^{cl} = \frac{F_0(1+C_{HYP})(1-B) + F_M B}{1+C_{HYP}(1-B)} = F_0 + (F_M - F_0) \frac{B}{1+C_{HYP}(1-B)} \quad (2.4.24)$$

Vërehet se sinjalet e fluoreshencës F^{op} dhe F^{cl} , dhe njëkohësisht F , janë funksione të B , i cili është një funksion i kohës t .

Termi i dytë në Eq. 2.4.24 është fluoreshenca e çastit variabile F_v :

$$F_v \equiv F - F_0 = (F_M - F_0) \frac{B}{1+C_{HYP}(1-B)} \quad (2.4.25)$$

Prandaj, fluoreshenca relative variabile V , përcaktohet si raporti i fluoreshencës variabile me fluoreshencën maksimale variabile F_v , dmth,

$$V \equiv \frac{F_v}{F_M} \equiv \frac{(F - F_0)}{(F_M - F_0)} \quad (2.4.26)$$

është shprehur në terma të B , fraksioni i RCs të mbyllura, nga funksioni:

$$V = \frac{B}{1+C_{HYP}(1-B)} \quad (2.4.27)$$

që është një hiperbolë me asimptotë vertikale. Derivimi dhe formulimi i paraqitur këtu është raportuar nga Strasser (1978, 1981) dhe Strasser and Greppin (1981); megjithatë, Joliot and Joliot (1964) ishin të parët që vrojtuan lidhjen hiperbolike mes fluoreshencës dhe fraksionit të qendrave të mbyllura, e cila u lejoi atyre të propozojnë ekzistencën e lidhjes energjetike të njësive PhS 2.

Duke përdorur Eqs. 2.4.17', 2.4.20a dhe 2.4.20b, konstantja e kurbaturës, C_{HYP} , shkruhet si:

$$C_{HYP} = \left(\frac{F_M}{F_0} - 1 \right) p_{2G} = \frac{F_V}{F_0} p_{2G} \quad (2.4.28)$$

Duke përdorur Eq. 2.4.27, mund të rishkruhen Eqs. 2.4.15a, 2.4.16a, 2.4.23a, 2.4.23b dhe 2.4.24, si më poshtë:

$$E_{2,tot}^{op} = E_{2,0}^{op}(1 - V) \quad (2.4.15a')$$

$$E_{2,tot}^{cl} = E_{2,M}^{cl}V \quad (2.4.16a')$$

$$F^{op} = F_0(1 - V) \quad (2.4.23a')$$

$$F^{cl} = F_MV \quad (2.4.23b')$$

$$F = F_0 + VF_V \quad (2.4.24')$$

Ekuacionet më sipër janë të dobishme për zbërthimin e kinetikave të fluoreshencës në kinetika fluoreshence të njësive të hapura dhe të mbyllura (Strasser, 1978, 1981).

2. Eksperimenti kundrejt zgjidhjes teorike

Ekuacionet e mësipërme janë derivuar (Strasser 1978, 1981) bazuar në modelin 2 (vetëm për RCs të hapura dhe të mbyllura) në figure 2.4.2. Megjithatë, Eq. 2.4.27 dhe ndarja e C_{HYP} në dy shprehje (Eq. 2.4.17' dhe Eq. 2.4.28) janë të vlefshme për gjithë nivelet e mundshme të kompleksitetit, madje edhe për nivele më të lartë se ato të modelit tripjesësh 1 nga figure 2.4.2, dmth, për çdo model shumëpjesësh me çdo numër të komplekseve pigment dhe mode të ndryshme të komunikimit energjik midis gjithë atyre.

Këto ekuacione janë ekuivalente me ekuacionet e publikuara nga autorë të tjerë. Diferencat në pamje janë për shkak të konsideratave të kohës.

Ndërkaq, zgjidhja eksperimentale është shumë më e kufizuar se zgjidhja teorike. Për studime më të zakonshme, dmth të provave fotosintetike të rritura në temperaturë të dhomës, sinjalet fluoreshente nuk japin informacion në lidhje me shpërndarjen e energjisë së absorbuar (J_2 dhe J_3) në dy komplekset pigment antenë. Nuk është e mundur të bëhet dallimi midis fluoreshencës së emetuar nga antena zemër dhe LHC 2, as midis shpërndarjes së energjisë së tyre apo migrimit, përveç se kur kryhen edhe matje të lifetime të fluoreshencës (Gilmire). Aktualisht, informacioni i siguruar nga kinetikat e fluoreshencës çon vetëm në dallimin midis njësive me rendiment të ulët dhe të lartë të fluoreshencës, të cilat janë përkthyer në njësi me RCs të hapura dhe të mbyllura, respektivisht. Megjithatë, konsensusi i mëtejshëm se një RC është e mbyllur, dmth ajo nuk bën fotokimi, kur akceptor i primar quinone Q_A është i

reduktuar, ngelet ende një dogmë, pasi nuk është mbështetur plotësisht nga dëshmi eksperimentale; psh nuk ka zgjidhje eksperimentale që të dallohet nëse kjo është gjendje redox e Q_A apo e akceptorit primar Pheo, që përcakton një RC të mbyllur apo të hapur (Vredenberg). Duke pranuar këtë pasiguri, modeli i prezantuar është formuluar në një mënyrë më të përgjithshme, duke shënuar akceptorin primar me A (figure 2.4.2) dhe duke shmangur deri tani çdo referencë për gjendjen redox të Q_A ; kështu, formulat e derivuara kanë një vlefshmëri më të gjerë.

Pyetja ngelet e hapur për tu diskutuar, dhe në këtë punim ne do ta marrim të mirëqenë dhe do ta aplikojmë në praktikë, pranojmë në analizën tonë ekuivalencën 'hapur $\Leftrightarrow Q_A$ ' dhe 'mbyllur $\Leftrightarrow Q_A^-$ ', që do të thotë se $B = [Q_A^-]/[Q_A^{tot}]$, ku $[Q_A^{tot}]$ përqendrimi total i quinone të lidhura dhe të reduktueshëm.

3. Rendimente dhe probabilitete

Termi 'rendiment' i referohet një outfluxi të caktuar të pjesshëm E_{ix} nga një sistem pigmenti 'i' dhe shpesh konsiderohet si sinonim i efijçenses. Për këtë arsye, rendimenti definohet si raporti i outflux E_{ix} ndaj influksit total të energjisë E_i , ky i fundit supozuar si i barabartë me fluksin e energjisë J_i të absorbuar nga sistemi. Megjithatë, siç teoria e fluksit të energjisë qartë postulon, E_i është përgjithësisht më i madh se J_i , për shkak të komunikimit energjetik të grupimeve të pigmenteve të ndryshme. Prandaj, rendimenti $\phi_{ix} = E_{ix}/J_i$ duhet të dallohet nga probabiliteti $p_{ix} = E_{ix}/E_i$.

4. Rendimenti kuantik i fotokimisë fillestare

Rendimenti kuantik i fotokimisë primare, ϕ_{Px} (indeksi 'x' këtu u referohet kushteve, për shembull në një kohë të dhënë në kursin e ndriçimit, ose intensiteti i dritës aktinike, ose kushtet e përshtatjes) definohet si raport i fluksit total të energjisë $(1 - B_x) E_{2,0}^{op} p_{2b}^{op} p_{bP}^{op} = E_{2,tot,x}^{op} p_{2b}^{op} p_{bP}^{op}$ të kapur nga RCs të hapura dhe që përdoret për fotokimi fillestare, ndaj influksit J_2 . Duke marrë parasysh se $p_{bP}^{op} = 1$ (model 2, figure 2.4. 2) dhe duke risjellë Eq. 2.4.15a' marrim:

$$\phi_{Px} = E_{2,tot,x}^{op} p_{2b}/J_2 = (E_{2,0}^{op} p_{2b}/J_2)(1 - V_x) \quad (2.4.29)$$

Kur gjithë RCs janë të hapura, $V = 0$; siç tregohet nga Eq. 2.4.29, rendimenti kuantik ϕ_{Px} arrin atëherë vlerën e tij maksimale, $E_{2,0}^{op} p_{2b}/J_2$, shënohet si ϕ_{Po} . Prandaj, Eq. 2.4.29 shkruhet si:

$$\phi_{Px} = (\phi_{Po})(1 - V_x) \quad (2.4.29')$$

Duke supozuar një model dypjesësh, Eq. 2.4.14a bëhet:

$$E_{2,0}^{op} = \frac{J_2}{1-p_{22}} \quad (2.4.14a'')$$

Shprehja për rendimentin kuantik maksimal në fotokimi primare në lidhje me konstantet e shpejtësisë së çeksitimit, derivon si:

$$\phi_{Po} = \frac{E_{2,0}^{op} p_{2b}}{J_2} = \frac{p_{2b}}{1-p_{22}} = \frac{k_{2b}}{k_{2b}+k_{21}+k_{2D}} = \frac{k_{2P}}{k_{2P}+k_{2N}} = 1 - \frac{k_{2N}}{k_{2P}+k_{2N}} \quad (2.4.30)$$

Duke perdorur Eqs. 2.4.21a' and 2.4.21b', Eq. 2.4.30 shkruhet si:

$$\varphi_{Po} = 1 - \frac{F_0}{F_M} = \frac{F_V}{F_M} \quad (2.4.30')$$

dhe Eq. 2.4.29' rishkruhet si

$$\varphi_{Px} = (\varphi_{Po})(1 - V_x) = \left(\frac{F_V}{F_M}\right) \left(1 - \frac{F_x - F_0}{F_M - F_0}\right) \quad (2.4.31)$$

$$\varphi_{Px} = 1 - \frac{F_x}{F_M} \quad (2.4.32)$$

2.4.3 Transientë polifazik fluoreshente in vivo

Matjet e fluoreshencës japin informacione rreth shpërndarjes së energjisë në mostrën fotosintetike. Ky informacion përshkruan një gjendje statike, gjendjen e mostrës pikërisht përpara se ajo të ekspozohet ndaj trajtimit. Për të hyrë në dinamikën e një kampioni, studimet e fluoreshencës duhet të bëhen in vivo; ndryshimet, që mostra pëson nën ndriçim, pasqyrohen në kinetikën e fluoreshencës që emeton, të cilat përmbajnë gjithë informacionin për sjelljen e saj energjetike.

Kurba e induksionit të fluoreshencës in vivo, paraqet një rritje fillestare O-P, me kohëzgjatje më pak se 1s deri në disa sekonda në varësi të intensitetit të dritës aktinike, pasuar nga rënie, shënuar si P-S, që ndodh në intervalin kohor nga sekonda në minuta me disa hapa të ndërmjetëm (figure 2.4.1). Pjesa O-P e transientit përgjithësisht pranohet që pasqyron RCs të mbyllur (pranuar si ekuivalente me Q_A të reduktuar); nuk ka ndryshim konformacional, dmth., nuk ndryshojnë konstantet e shpejtësisë së de-eksitimit të pools të pigment antenës ose RC pranohen që shfaqen në këtë kohë të shkurtër. Pjesa P-S e transientit reflekton bashkë ndryshime konformacionale dhe ndryshime të fraksionit të RC-ve të mbyllura. Ndryshimet konformacionale të shkaktuara nga faktorë të ndryshëm, si ndryshime në përqendrimin e brendshëm protonik, gjendje me energji të lartë, interkonversioni i pigmenteve specifike xanthofile, migrim, fosforilim i LHC 2 (Krause and Weiss, 1991, Horton et al, 1996, Müller et al., 2001), induktuar nga zgjatja e ndriçimit dhe që prek një ose disa konstante të shpejtësisë së de-eksitimit.

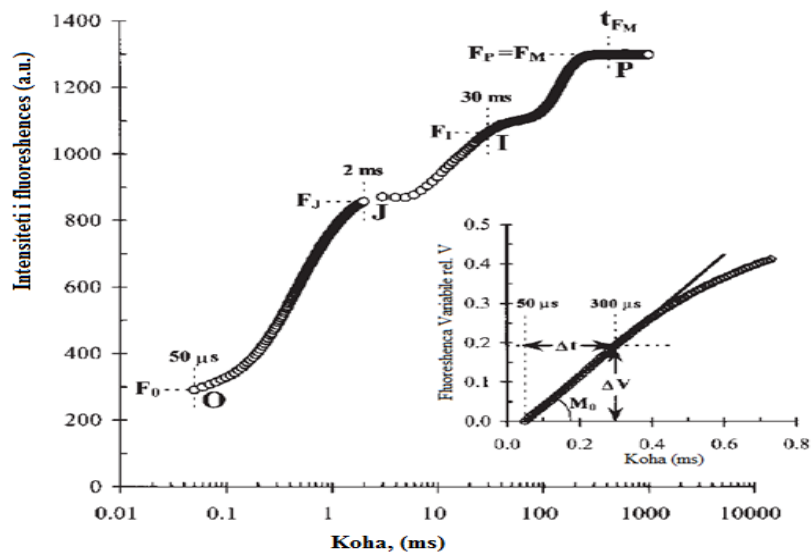


Fig. 2.4.3: Një rritje tipike polyphasike O-J-I-P e fluoreshencës Chl , shfaqur nga bimët e larta (për detaje eksperimentale shih legjendën e figure 2.4.1).

Transienti është paraqitur në shkallë kohore logaritmike nga 50 μ s në 1 s. Markimet i referohen të dhënave të zgjedhura të fluoreshencës të përdorura nga JIP - testi për llogaritjen e parametrave strukturorë dhe funksionalë. Sinjalet janë: intensiteti i fluoreshencës F_0 (në 50 μ s); intensiteti i fluoreshencës F_J (në 2 ms) dhe F_I (në 30 ms); intensiteti maksimal i fluoreshencës, $F_P = F_M$ (në kohën e shënuar si t_{FM}). Shtesa paraqet transient të shprehur si fluoreshencë variabël relative $V = (F - F_0) / (F_M - F_0)$ vs. kohë, nga 50 μ s në 1 ms në një shkallë lineare kohore, demonstroi se si pjerrësia fillestare, gjithashtu e përdorur nga JIP-test, llogaritet: $M_0 = (\Delta V / \Delta t)_0 = (V_{300\mu s}) / (0.25 \text{ ms})$. (Nga Tsimilli-Michael et al., 2000).

O-P rritja e fluoreshencës nuk është monofazike, paraqiten një - dy supe mes O dhe P (Munday and Govindjee, 1969, Neubauer and Schreiber, 1987, Papageorgiou, 1975, 1996, Krause and Weis, 1991). Forma e detajuar e transientit polifazik të fluoreshencës u zbulua vetëm kur sinjalet e fluoreshencës, të regjistruara me një instrument me rezolucion të lartë kohor, u ndërtuan në një shkallë kohore logaritmike; instrumenti i përdorur ishte PEA - fluorimetër (Plant Efficiency Analyser, built by Hansatech Instruments Ltd. King's Lynn Norfolk, PE 304NE, UK), i cili siguroi nivel shumë të ulët zhurme në marrjen e të dhënave në çdo 10 μ s për 2 ms-të para dhe çdo 1 ms më pas (Strasser dhe Govindjee, 1992a, b; Strasser et al., 1995). Nën dritë aktinike të kuqe të vazhdueshme (pik në 650 nm) me intensitet të lartë (mbi 300 W m⁻², ekuivalent me 1600 μ mol fotone m⁻² s⁻¹), rritja e fluoreshencës zakonisht paraqet hapat J (në 2 ms) dhe I (në 30 ms) midis fillimit O (F_0) dhe maksimumit P (F_P), si pasojë të shënuar si OJIP (figure 2.4.3). Hapa plotësues gjithashtu u vrojtuan në raste të caktuara dhe janë shënuar sipas rendit alfabetik, si hapi K, hapat H dhe G (Tsimilli-Michael et al., 1998, 1999). Potencialisht çdo hap mund të pasohet nga një rënie e përkohshme e fluoreshencës.

2.4.4 Përfundime

JIP testi, siç përshkruhet analitikisht më sipër, çon në një kuantifikim të arkitekturës së PhS 2 dhe mënyrës së sjelljes. Simulimet numerike vërtetojnë se formulat e JIP-testit, megjithëse të nxjerra me disa kompromise teorike, japin përafrim të mirë të parametrave. Këta parametra

përshkruajnë arkitekturën mesatare / sjelljen e mostrës të testuar, por gjithashtu sigurojnë mjete për detektimin, karakterizimin dhe kuantifikimin e heterogjenitetit të mostrës në nivele të caktuara. Gjithë llogaritjet dhe paraqitjet grafike të rezultateve të JIP-testit mund të transmetohen direkt nga transientët e regjistruar të fluoreshencës me programin BIOLYZER (RM Rodriguez, Bioenergetics Laboratory, Universiteti i Gjenevës, në dispozicion në: <http://www.Unige.ch/sciences/biologie/BIOEN>).

Lehtësia e matjes, në cfaredo kushte dhe në një kohë të shkurtër, qindra tranzitime të PF dhe përpunimi automatik i të dhënave e bëjnë JIP-testin një mjet të fuqishëm për skring të shpejtë të 'vitalitetit' të bimëve, për më tepër që investigimet në fushë kryhen me saktësi të lartë laboratorike. Zgjerimi në të ardhmen i këtij hulumtimi do të përmirësojë më tej aftësitë diagnostikuese.

Analiza e O-J-I-P e transientit të fluoreshencës, jep një informacion të pasur mbi PhS 2. Për të ardhmen, shkencetarët planifikojnë analiza të mëtejshme të transientëve, duke synuar avancim në dy drejtime: analizë biofizike për të arritur një kuptim më të mirë të strukturës dhe funksionimit të aparatit fotosintetik, dhe zgjerimi i JIP-test për skring të shpejtë të 'vitalitetit' të bimëve.

Për momentin, vetëm simulimet numerike përdorin të gjithë O-J-I-P transientet, i cili është shumë i pasur në informacion, ndërsa JIP-testi përdor shumë pak pika të të dhënave të tranzitimit. Qëllimi është që të inkorporohet në testin rutinë të vitalitetit një analizë e detajuar e gjithë kinetikave të dixhitalizuara të fluoreshencës, p.sh. normalizime të ndryshme, llogaritje e diferencave apo raporteve kinetike, si dhe derivatet kohore.

Investigimet e mëtejshme të transientëve të fluoreshencës, të matura njëkohësisht dhe oksidimi i P700 do të sigurojnë një kuptim më të mirë të të dy fotosistemeve dhe zinxhirit të transportit elektronik midis sistemeve, si dhe të sinjaleve të fluoreshencës, që do të përdoren për teste rutinë të vitalitetit dhe për simulime numerike.

Simulimet në proces provojnë të integrojnë fluoreshencën e vonuar (Tyystjärvi and Vass), në mënyrë që të sigurojnë njohje të rekombinimit specifik të ngarkesës dhe reaksionet mbrapsht nga ana akceptore në donore të PS 2.

Pas trajtimeve të mësipërme teorike, ne përqendrohemi në metodat eksperimentale, që sigurojnë informacione adekuate për strukturën, konformacionin dhe funksionimin e aparatit fotosintetik në çdo moment dhe, në përgjithësi, në çdo gjendje, të shkaktuar nga ndonjë stress.

PJESA E II: APLIKIME PRAKTIKE NË STUDIMIN E BIMËVE – METODA E FLUORESHENCËS KLOOROFILE a

Aplikime praktike në studimin e bimëve përfshin kapitujt 3 - 5. Këtu përdoret metoda e fluoreshencës klorofile si një metodë shumë e ndjeshme, e cila lejon të vlerësohen ndryshimet në gjëndjen e përgjithshme bioenergjetike të bimëve. Matja dhe analiza e parametrave të fluoreshencës klorofile a paraqitet si instrument për studimin e efektivitetit të aparatit fotosintetik, vlerësimin e gjëndjes fiziologjike të organizmave fotosintetik (bimë te larta - ulliri), reagimeve të aparatit fotosintetik nën stres dhe për vlerësimin e ndikimit të faktorëve të mjedisit në bimë.

KREU 3: METODA E FLUORESHENCËS KLOOROFILE a NË STUDIMIN E APARATIT FOTOSINTETIK NË BIMË

Kreu ndërtohet nga 4 seksione: fluoreshenca klorofile a, fluoreshenca e shpejtë; vijon me JIP – test; fluoreshenca e vonuar – kuptimi, përdorimi i saj dhe kurba e induksionit e sinjalit MR820.

3.1. FLUORESHENCA KLOOROFILE

Hyrje

Matja e fluoreshencës klorofile përdoret për përcaktimin e efikasitetit të aparatit fotosintetik dhe vlerësimin e gjëndjes fiziologjike të gjithë organizmave fotosintetikë. Ajo gjithashtu lejon vlerësim të tërthortë të përmbajtjes së klorofilit në objekte fotosintetike. Është një metodë e lehtë matje, jo-invasive dhe e shpejtë (në varësi të synimeve të eksperimentit matjet zgjatin nga disa sekonda në disa minuta). Analiza e kurbës së induksionit të fluoreshencës klorofile lejon të vlerësohet bashkëveprimi i reaksioneve fotokimike në fazën e ndriçuar të fotosintezës dhe efektiviteti i reaksioneve biokimike gjatë fazës së errët. Marrëdhënia e proceseve dhe mundësia për të kontrolluar shpejtesitë e reaksioneve janë parakushte për efikasitet të lartë të fotosintezës (Murkowski, 2002; van der Tol et al, 2009). Metoda e fluoreshencës klorofile është një metodë shumë e ndjeshme, e cila lejon të vlerësohen ndryshimet në gjëndjen e përgjithshme bioenergjetike të bimëve (Kalaji et al., 2014). Ajo është direkt ose indirekt e lidhur me të gjitha etapat e fazës së ndritshme të procesit të fotosintezës: fotoliza ujit, transferimi i elektroneve, gjenerimi i gradientit pH në membranat tilakoide dhe sinteza e ATP.

Matja dhe analiza e parametrave të fluoreshencës klorofile a mund të përdoret gjithashtu si një instrument shumë i saktë për studimin e reagimeve të aparatit fotosintetik nën stres dhe për vlerësimin e ndikimit të faktorëve të mjedisit në bimë (Kuckenberg et al, 2009 ;. Kalaji et al, 2012). Përdorimi i metodave fluorimetrike të zgjedhura me kujdes, bën të mundur studimin e reagimit të bimëve ndaj temperaturave të larta dhe të ulëta, cilësisë dhe intensitetit të dritës, thatësisë, stres kripe, metalet e rënda, herbicide inhibitore të fotosintezës, efektet fitotoksike të ndotësve të gaztë dhe efekteve të tjera negative (Fracheboud and Leipner, 2003; Dai et al., 2009). Studime të tilla mund të kryhen si mbi bimë të veçanta dhe në gjithë ekosistemin, duke i vlerësuar ato në lidhje me tolerancën ndaj gjithë bashkësisë së faktorëve stresues dhe produktivitetit potencial (Strasser et al., 2000; Murkowski, 2002).

Matjet e fluoreshencës klorofile janë përdorur në bujqësi (Shannon, 1998; Murkowski, 2002; Kalaji and Pietkiewicz 2004, Massacci, 2008.) (Flexas et al, 2002b), kopështari, pylltari (Mohammed et al, 1995.), për vlerësimin e farës (Jalink et al, 1998.), studimet e mjedisit rrethues (Skórska, 2000), në prodhimin e kulturave bimore, në ruajtjen e produkteve ushqimore dhe përpunimin e perimeve e frutave (Nedbal et al, 2001 ;. Kuckenberg et al 2008 ;. Kosson, 2003)

Ato janë gjithashtu të dobishme për përcaktimin e shkallës së pjekurisë dhe freskinë e frutave, perimeve dhe luleve. Bazuar në këtë informacion, mund të përcaktojmë kohën e saktë për shitjen e produkteve (Merz et al., 1996). Metodën fluorometrike janë përdorur për vlerësimin e organizmave që jetojnë në ujë (Romanowska-Duda et al., 2005) dhe kontrollin e efektit allelopatik në metabolizmin e bimëve (Devi and Prasad, 1996). Fluoreshenca klorofile përdoret edhe për të parashikuar të ardhurat në kushte të ndryshme mjedisore (Kalaji and Pietkiewicz, 2004). Gjatë viteve të fundit, parametrat e fluoreshencës klorofile përdoren me cilesinë e kriterëve për seleksionimin e bimëve në programet e përzgjedhjes (Kalaji and Guo, 2008; Rodenburg et al, 2008).

3.1.1 Fluoreshenca klorofile a si indikator i funksionit të PhS 2

Energjia diellore (drita) duke arritur sipërfaqen e gjethëve në formë fluksi ftonesh absorbohet nga molekulat e pigmenteve fotosintetike kryesisht në formën e komplekseve klorofile dritëmbledhëse. Në këto komplekse energjia, e thithur në formë të ngacmimit elektronik të molekulës së ngjyruarit, mund të transmetohet në qendrat e reaksionit të PhS 2 dhe PhS 1 dhe përdoret për lëshimin e reaksioneve fotokimike. Jo e gjithë energjia e përthithur përdoret për fotosintezë, pjesë e konsiderueshme e energjisë së ngacmimit, përhapur nga antena, nuk arrijnë qendrën e reaksionit, dhe humbet si nxehtësi ose emetohet në formën e fluoreshencës klorofile (figure 3.1.1).

Fluoreshenca e klorofile a përfaqëson në vetvehte rrezatim dytësor të energjisë së dritës, absorbuar nga molekulë klorofili. Pjesë nga energjia e absorbuar, e cila humbet në procesin e fotosintezës në formën e fluoreshencës, është e vogël dhe, megjithëse përfaqëson vetëm 3% deri 5%, paraqitet për ne një burim informacioni i rëndësishëm (figure 3.1.1). Fluoreshenca klorofile a gjatë fotosintezës është masë e energjisë së përthithur të ftoneve të dritës të cilat nuk përdoren në procesin e fotosintezës, dhe nuk shpërndahen si nxehtësi (Kalaji et al., 2004). Në funksionimin normal dhe efikas të reaksioneve fotosintetike fluoreshenca (Fl) e klorofil (Chl) a mbetet e ulët, dhe çdo prishje e procesit të fotosintezës, ul efektivitetin e saj, gjë që çon në rritje të konsiderueshme në Fl (Lichtenthaler and Rinderle, 1988).

Energjia e përthithur PAR = fotokimi + nxehtësi + fluoreshencë

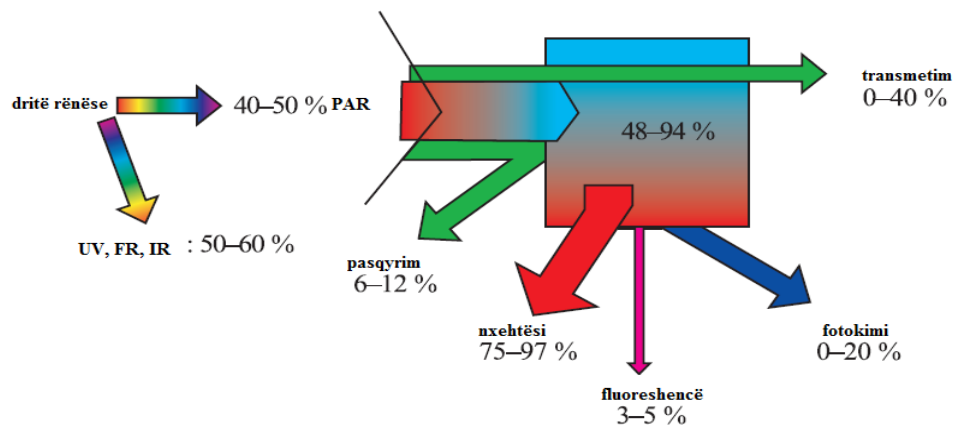


Fig. 3.1.1: Mënyrat e përdorimit të energjisë së dritës së pranuar nga gjethet. PAR - photosynthetically active radiation, UV - ultraviolet radiation, FR - far-red light, near infrared, IR - infrared radiation (modifikuar nga (Vidaver et al., 1991)).

Pas përthithjes së fotonit, elektroni i valencës në molekulën e klorofilit lëviz në nivel më të lartë energjetik. Në përthithjen e një fotoni të rrezatimit violet ose blu energjia e nivelit singlet është më e lartë se sa në rastin e ngacmimit me dritë të kuqe. Këto tranzicione ndodhin gjatë një kohe të rendit femtosekondë (10^{-15} sekonda), e për kohën rreth 10^{-13} s molekula shpërndan (difundon) pjesë nga energjia e tepërt në formën e nxehtësisë, dhe kalon në nivel më të ulët të energjisë së ngacmimit elektronik (figure 3.1.2). Qëndrimi në gjendjen elektronike më të ulët të ngacmimit nuk zgjat shumë, pasi molekulat e ngacmuara klorofile kanë tendencë shpejt (për rreth 10^{-9} s) të kthehen në gjendjen bazë, dhe energjia mund të humbas si rezultat i këmbimit të nxehtësisë ose fotoneve fluoreshente ($\lambda_{\max} = 685$ nm). Energjia e mbetur përdoret për transportin fotosintetik të elektronit, i cili fillon kur ngacmimi, që migron nëpër antenë, arrin molekulë klorofili, që ndodhet në qendrën e reaksionit të PhS 2 dhe PhS1.

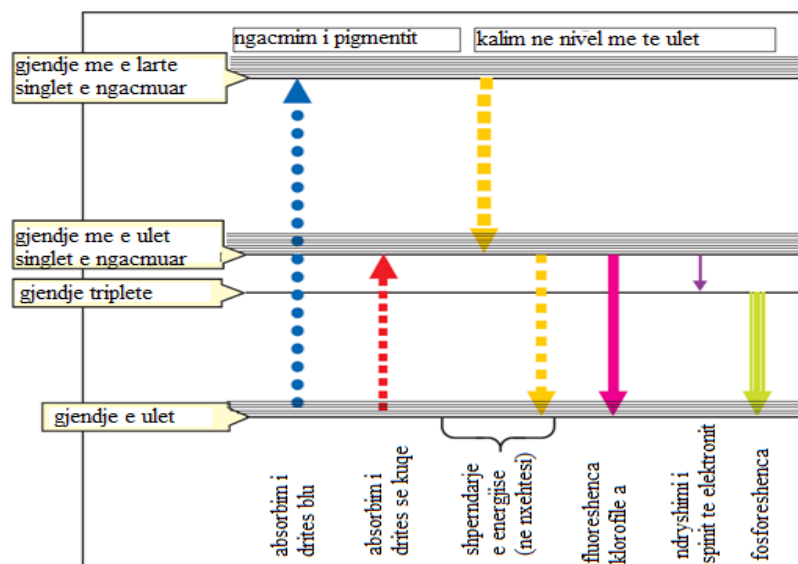


Fig. 3.1.2: Ndryshimi në nivelin e energjisë në molekulën e klorofilit gjatë absorbimit të dritës dhe kthimit në gjendjen fillestare (e modifikuar nga <http://en.wikipedia.org/wiki/Image>)

Fluoreshenca klorofile ndodh gjithmonë në gjendjen më të ulët të ngacmimit dhe rrjedhimisht, rrezatohet vetëm drita e kuqe megjithëse klorofili thith rrezatim në diapazone më të mëdha se valët e shkurtëra, duke arritur kështu gjendje me ngacmim energjetik më të lartë të molekulave. Maksimumi i rrezatimit të Fl klorofile a ndodhet në zonën me gjatësi vale më të mëdha të spektrit se maksimumi absorbues i klorofilit (figure 3.1.3). Në gjethe maksimumi i fluoreshencës në temperaturë dhome vërohet në rreth 685 nm (Hall dhe Rao, 1999) ndërsa spektri i fluoreshencës shtrihet deri në 800 nm (Krause and Weis, 1984).

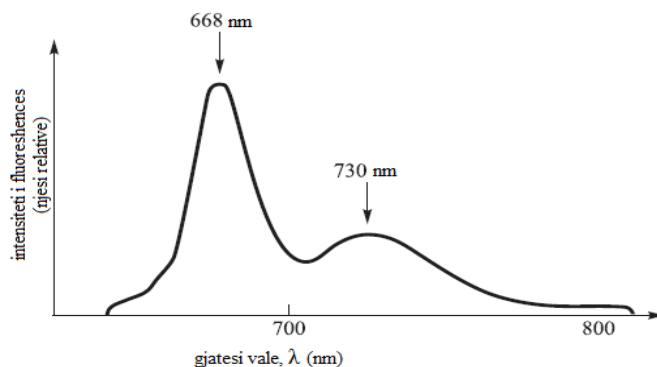


Fig. 3.1.3: Spektrat fluoreshent të klorofilit (me ndryshime sipas Krause and Weis, 1984)

Kautsky dhe Hirsch (Kautsky and Hirsch, 1931) përshkruan lidhjen midis aktivitetit të fluoreshencës klorofile dhe aparatit fotosintetik (për humbje nxehtësie të fiksuara). Ata konstatuan se raporti i tyre jep mundësi të përdoren të dhënat nga parametrat e matur të Fl klorofile, për të përshkruar reaksionet e fotosintezës dhe, në veçanti, efikasitetin fotokimik të PhS 2. Një nga metodat fluorimetrike të përhapura konsiston në përcaktimin e pjesës së energjisë, të përdorur në proceset fotokimike (shuarje fotokimike) dhe energjisë e cila humbet në formën e nxehtësisë (shuarje jo-fotokimike), dhe mbi këtë bazë të vlerësohet efektiviteti i transformimit energjetik të procesit të PAR në reaksionet e fazës së ndritshme të fotosintezës.

Intensiteti i fluoreshencës (F) është proporcional me intensitetin e dritës së përthithur (I_a):

$$F = \phi_F I_a$$

ku rendimenti i Fl klorofile (ϕ_F) përcaktohet si raport i numrit të fotoneve të emetuara nga fluoreshenca me numrin e përgjithshëm të kuantëve PAR të absorbuara. Kjo mund të llogaritet nga formula e mëposhtme:

$$\phi_F = k_f / (k_f + k_d + k_p),$$

ku ϕ_F – rendimenti kuantik i fluoreshencës; k_f , k_d dhe k_p - konstante të shpejtësisë së fotoneve të rrezatimit fluoreshent, konversioni i brendshëm i energjisë së ngacmimit në nxehtësi, dhe reaksionet fotokimike, respektivisht.

3.1.2 Kurba e induksionit e fluoreshencës klorofile a

Induksioni i fluoreshencës klorofile ndodh kur pas errësimit të objektit fotosintetik për rreth 30 minuta, objekti ndriçohet (rrezatohet në diapazonin PAR). Vërohet rritje e menjëhershme e Fl klorofile a, dhe pas kësaj rënie e ngadaltë e intensitetit të fluoreshencës. Ky fenomen quhet "efekti i Kautsky". Kurba e induksionit të fluoreshencës përfaqëson

ndryshime të emisioneve të Fl klorofile në objektet fotosintezuese. Ajo mund të ndahet në fazën e shpejtë (rreth 1s), e cila përfshin në vetvehte reaksionet e fazës së ndritshme të fotosintezës, dhe fazën e ngadaltë (që vazhdon disa minuta), në të cilën dominojnë procese, që lidhen me rregullimin e reaksioneve enzimatike për sintezën e ATP dhe NADPH, të nevojshme për asimilimin e CO₂ në kloroplastet e stromës (figure 3.1.4) (Schreiber et al., 1994).

Në errësirë gjithë qendrat e reaksioneve fotosintetike janë "të hapura" dhe mund të jenë të ngacmuara, dhe të gjithë bartesit e elektroneve të PhS 2 janë në gjendje të oksiduar. Në momentin e përfshirjes së ndriçimit aktinik fotokimik (AL – eng. actinic light – doza e dritës, e cila shkakton ndryshime fotokimike) fillon faza e shpejtë e induksionit fluoreshent. Intensiteti i AL, zakonisht vlerësohet në nivelin 200 deri 500 $\mu\text{mol hv m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Madje për disa nanosekonda, mundet të regjistrohet rritje e shpejtë e intensitetit të FL klorofile. Matjet e vlerave Fl klorofile në pikën e parë të induksionit duhet të përfundojnë për jo më shumë se 40 microsekonda (në kurbën e induksionit pika O). Kjo vlerë quhet fluoreshenca fillestare (F_O), e cila lidhet kryesisht me humbjen e energjisë gjatë transportit mes pigment antenës në qendrën e reaksionit të PhS 2 (Murkowski, 2002). Rritja Fl klorofile nga F_O në F_P kalon nëpër disa etapa dhe varet nga funksionimi i drejtë i akceptorëve dhe donorëve në transportin e elektroneve në PhS 2 dhe efikasiteti i bashkëveprimit midis njësive fotosintetike, gjë që përcakton mundësinë e transferimit të energjisë së ngacmimit midis qendrave fqinje të reaksionit (Murkowski, 2002; Finazz and Forti 1995; Allakhverdiev et al, 1994).

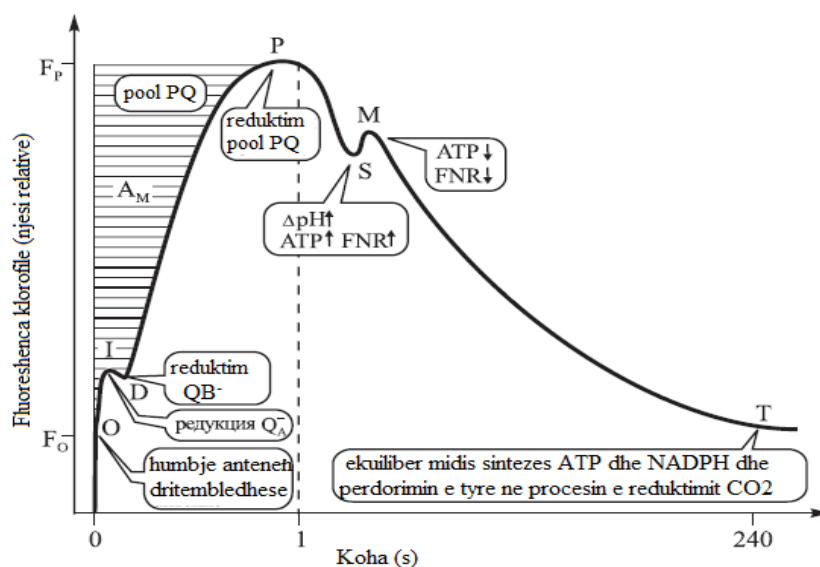


Fig. 3.1.4: Forma tipike e kurbës së induksionit të fluoreshencës së klorofilit. Fazat e njëpasnjëshme të induksionit të fluoreshencës klorofile tregohen me shkronja pranë kurbës O, I, D, P, S, M dhe T (nga Murkowski, 2002).

Si rezultat i ndarjes së ngarkesës në qendrën e ngacmuar të reaksionit PhS 2, elektrone me energji të lartë reduktojnë pheophytin (Pheo⁻), në akceptorin fillestar të PhS 2. Nga Pheo⁻ elektroni transferohet në QA (plastoquinon i lidhur me D₂ - proteinë në pjesën e QA) – akceptorin e parë të qëndrueshëm të PhS 2. Pas 2 ÷ 5 ms ndriçim të objektit në studim reduktimi i akceptorit përfundon (bëhet QA⁻), dhe intensiteti fluoreshencës rritet deri në nivel në

pikën I. Rënia afatshkurtër e intensitetit të fluoreshencës nga I në pikën D, pasqyron re-oksidiimin e QA^- nga QB (më tej - pjesa e mbetur e zinxhirit të transportit të elektroneve), e cila i jep mundësi qendrës së ngacmuar të PhS 2 të dhurojë elektronin pasues në FeO dhe QA (figure 3.1.4). Gjatë kohës së reduktimitit gradual akseptori pasues në zinxhirin e transportit të elektroneve (PQ^- plastoquinone i levizshëm, kompleksi citokromit b6f- dhe akseptori i PhS 1) intensiteti i FL klorofile rritet nga D në P, ky proces merr 0,5 deri në 1 sekondë.

Fluoreshenca arrin maksimumin e saj (F_P) në pikën P, e cila korrespondon (për një intensitet të caktuar AL) me maksimumin e reduktimit të akseptoreve të PhS 2 dhe rendiment më të ulët të reaksioneve fotokimike (figure 3.1.4). Zona mbi kurbën e fazës së shpejtë të induksionit të Fl klorofile (pjesa e vijëzuar në figure 3.1.4, A_M) tregon sasinë e akseptorëve elektronik në dispozicion (gjendje) në PhS 2 (Krause and Weis, 1991). Në fazën ndërmjet pikave P dhe S vrojtohen disa rënie të fluoreshencës, të cilat lidhen me transferimin e përshpejtuar të energjisë së ngacmimit nga PhS 2 në PhS 1 dhe rritjen e përqendrimit të protoneve në hapësirën e brendshme të tilakoideve (lumen) dhe formimin e një gradienti protonesh (ΔpH) midis lumenit dhe kloroplasteve të stromës. Kjo kontribuon në intensifikimin e procesit të fotofosforilimit dhe fillimin e fazës së errët të fotosintezës. Disa sekonda nga fillimi i ndriçimit (5 deri 9s), intensiteti i fluoreshencës rritet përsëri (midis pikave S dhe M), për shkak të konsumimit të stokut (gjendje) fillestar të FNR (ferredoxin-NADP + reductase) dhe duke ngadalësuar shpejtësinë e reduktimit të $NADP^+$. Pas disa sekondave të tjera (3 deri 5 s), rritja e prodhimit të ATP dhe FNR dhe i lidhur me to prodhimi i NADPH, sërish çon në zvogëlimin e Fl klorofile, e cila shtrihet nga 100 deri 240s, deri sa të arrijë gjendjen e saj stacionare pika T (eng.- terminal fluorescence level). Koha e nevojshme për të arritur këtë nivel, varet fort nga gjendja fiziologjike e bimës dhe stadi i zhvillimit të saj (Murkowski, 2002). Arritja e nivelit të gjendjes stacionare të rrezatimit të Fl klorofile tregon, se është arritur ekuilibri midis prodhimit të komponimeve, që zotërojnë energji të lirë të lartë (ATP dhe NADPH) në reaksionet fotokimike të fazës së ndritshme, dhe shfrytëzimit të këtyre produkteve në reaksionet biokimike të fazës së errët (figure 3.1.4).

3.1.3 Parametrat e fluoreshencës klorofile a, madhësitë e tyre dhe kuptimi fiziologjik

Në analizën e fluoreshencës klorofile a përdoren një sërë karakteristika të ndryshme.

F_0 - fluoreshenca fillestare e objektit të përshtatur në errësirë. Parametri F_0 paraqitet si indikator i humbjes së energjisë gjatë transmetimit të energjisë së ngacmimit nga antena në qendrën e reaksionit të PhS 2 (Murkowski, 2002, Baker and Rosenquist, 2004). Ajo karakterizon fluoreshencën e rrezatuar nga molekulat e ngacmuara klorofile a në antenën e PhS 2, kur akseptori QA (molekulë plastoquinone) është i oksiduar tërësisht, të gjitha qendrat e reaksionit të PhS 2 janë plotësisht të hapura (të afta të pranojnë energjinë e ngacmimit dhe në mënyrë të pakthyeshme të realizojnë reaksionin fillestar fotokimik), si dhe nuk ka shuarje jo-fotokimike (q_N). Plotësimi i këtyre kushteve kërkon përshtatjen paraprake në të errët të objekteve fotosintetike (Hansatech, 2008).

Vlerat e larta F_0 tregojnë transferim më pak efektiv të energjisë së ngacmimit midis molekulave të pigmentit në antenën dritëmbledhëse të PhS 2, përshembull, gjatë stresit termik, kur ka dëmtime në tilakoide dhe inaktivim të PhS 2 (Murkowski, 2002). Rritja e F_0

gjithashtu mund të jetë e lidhur me një rënie në efektivitetin e transferimit të energjisë në qendrën e reaksionit të PhS 2, të shkaktuar nga disocimi i LHC 2 nga bërthama e PhS 2 (Havaux, 1993).

F_M - fluoreshenca maksimale. Përcaktohet pas përshtatjes në errësirë, me ndihmën e një impulsi ngopës drite (i cili mund të ngop reaksionet fotokimike në qendrat e reaksionit të PhS 2) që zgjat 0.8 deri në 2 sekonda. Intensiteti maksimal i fluoreshencës (F_M), mund të merret nga rregullimi i fuqisë së impulsit ngopës në mënyrë që vlera PPFD (PPFD – Photosynthetic Photon Flux Density) të ndodhet në diapazonin nga 3500 deri 10 000 $\mu\text{mol hv m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Në këto kushte, gjithë molekulat plastoquinone të PhS 2 janë reduktuar, të gjitha qendrat e reaksionit të PhS 2 janë përkohësisht të mbyllura dhe nuk mund pranojnë elektrone shtesë. Veç kësaj, për përcaktimin e saktë të parametrin duhet të plotësohet mungesa e shuarjes jo-fotokimike (qN). Madje, edhe në impuls të ngopur F_M varet edhe nga përmbajtja e klorofilit në indet e studiuara. Zvogëlimi i F_M tregon se objekti fotosintetik në studim ndodhet në gjëndje stresi, kurse kjo do të thotë se jo të gjithë akceptorët e elektroneve në PhS 2 mund të reduktohen plotësisht. Pas arritjes së intensitetit maksimal të fluoreshencës, F_M, efektiviteti i fluoreshencës klorofile a zvogëlohet shpejt deri në nivelin F_T, të afërt me vlerën F_O.

T_{FM} - koha për arritjen e nivelit maksimal të fluoreshencës klorofile F_M. Parametri T_{FM} përcakton kohën nga fillimi i matjes, për të cilën Fl klorofile arrin nivelin maksimal (F_M), shpesh për vetëm 500-800 ms (Lichtenthaler et al., 2004). Matja e T_{FM} është një metodë alternative për përcaktimin e madhësisë së baseinit të plastoquinon të oksiduar. Nën ndikimin e faktorëve stresant që ngadalësojnë transportin e elektroneve me energji të lartë nga qendra e reaksionit tek plastoquinoni, ky parametër rritet konsiderueshëm (Reigosa and Weiss, 2001).

F_V = F_M - F_O - fluoreshenca e ndryshueshme (variabile). Parametri F_V (ose F variable) përfaqëson diferencën midis vlerave të Fl klorofile F_M dhe F_O (matur pas përshtatjes në të errët). F_V varet nga rendimenti maksimal kuantik i PhS 2. Vlera e ulët e këtij parametri tregon ulje të aktivitetit të PhS dhe difuzion të energjisë së ngacmimit si nxehtësi. Vlera F_V ulet nën ndikimin e faktorëve stresant të mjedisit (temperatura të ulëta ose të larta, ngrirje etj.) që shkaktojnë dëmtimin e tilakoides (Reigosa and Weiss, 2001).

F_V / F_O = k_p / k_n - raporti i konstanteve të shpejtësisë së reaksioneve fotokimike dhe dezaktivim jofotokimik i ngacmimit të PhS 2. Përcaktohet pas përshtatjes në të errët dhe pasqyron efektivitetin e energjisë së ngacmimit të PhS 2, është i barabartë me raportin e konstanteve të shpejtësisë të reaksioneve fillestare fotokimike (k_p), dhe shpejtësia e përgjithshme e humbjeve jofotokimike (k_n) (Strasser et al., 2010). Nën veprimin e stresit, modifikohet kompleksi i zhvillimit të oksigjenit, rriten humbjet jofotokimike, si rregull, të lidhura me formimin e gjëndjeve të shuarjes së fluoreshencës së pigmentit RC, P680⁺. Në këtë rast, parametri karakterizon ndryshimin në efikasitet të disociimit të ujit (çlirim i oksigjenit) në PhS 2.

F_V / F_M - efikasiteti maksimal fotokimik i PhS 2. I matur në bimë të përshtatura në errësirë, pasqyron efikasitetin potencial kuantik të PhS 2 dhe mund të përdoret si një indikator i besueshëm i aktivitetit fotokimik të aparatit fotosintetik. Për shumicën e bimëve me zhvillim të plotë në kushtet e mungesës së stresit, vlera maksimale e këtij parametri është 0,83

(Bjorkman and Demmig, 1987; Angelini et al, 2001). Zvogëlimi do të thotë se para matjes bima ka qenë objekt i stresit, i cili ka dëmtuar funksionet e PhS, që shpie në uljen e efikasitet të transferimit të elektroneve. Kjo shpesh vrojtohet në bimë që ekspozohen ndaj faktorëve të ndryshëm stresant, si ekspozimi ndaj dritës së fortë. Ndryshimi në vlerën e parametrin F_V / F_M konsiderohet si indikator më i ndjeshëm, karakterizues i efektit të fotoinhibimit (Ne et al., 1996).

A_M – zona mbi kurbën e induksionit të fluoreshencës klorofile. Vlera e parametrin A_M (S_M , apo sipërfaqja mbi kurbën e induksionit Fl) është proporcionale me madhësinë e pool i akceptorëve të elektroneve në PhS 2. Matja e A_M është me rëndësi për kërkime të aplikuara. Sa më e shpejtë të jete rritja e Fl F_M , aq më e vogël është sipërfaqja mbi kurbën e induksionit të Fl klorofile. Në rast bllokimi të transferimit të elektroneve nga qendrat e reaksionit në pool plastoquinone (nën stres), vlera e A_M zvogëlohet (Hansatech, 2008).

F_T - fluoreshenca stacionare. Parametri F_T është intensiteti i fluoreshencës klorofile, që emetohet nga objektet fotosintetike, në kushtet e ndriçimit stacionar. Pas përshtatjes në errësirë për të arritur gjendje stacionare në kurbën e induksionit të Fl klorofile (niveli F_T) duhen rreth 3-5 minuta. Kështu vendoset ekuilibri mes forcave prodhuese asimiluese në reaksionet fotokimike (molekulat e ATP dhe NADPH) dhe reaksioneve enzimatiske, që përdorin këto molekula në fazën e errët. Çdo prishje e reaksioneve fotosintetike (p.sh., nën ndikimin e faktorëve stresant) vonon arritjen e gjendjes së qëndrueshëm (stacionare) (F_T). Vlera e F_T varet nga efikasiteti i procesit të fotosintezës dhe gjendja fiziologjike e objekteve fotosintetike të studiuar, të cilat, nga ana e vet, përcaktohen nga faktorë të jashtëm të mjedisit, të tillë si intensiteti i dritës aktinike.

F_T / F_0 - raporti i fluoreshencave stacionare dhe zero. Parametri korrelohet negativisht me shuarjen jo-fotokimike, kurse në intensitete të larta të dritës shfaq korrelacion negativ me shpejtësinë e transferimit të elektroneve, me asimilimin e dioksidit të karbonit, si dhe me përçueshmërinë e gojëzave (stomatale).

F'_M - Fluoreshenca maksimale e klorofilit a në gjethe, përshtatur në dritë. Ky parametër përcaktohet me ndihmën e flasheve të ngopura në sfond të ndriçuar të dritës fotosintetike aktive. F'_M është nën maksimumin e Fl klorofile a, regjistruar pas përshtatjes në errësirë (F_M), sepse në këtë rast akceptorët e PhS 2 janë pjesërisht të reduktuar.

Ndryshimi $F'_M - F_T = \Delta F$ është pjesë e Fl klorofile, shuar si rezultat i reaksioneve fotokimike;

Ndryshimi $F_M - F'_M = \Delta E$ - shuarje e Fl klorofile a shkaktuar nga mekanizmat me natyrë jo-fotokimike (Maxwell dhe Johnson 2000).

F'_0 – fluoreshenca zero në sfond të ndriçuar. Ky parametër zakonisht matet pas ndriçimit plotësues me impuls drite të kuqe të largët, $\lambda \approx 735$ nm (njëkohësisht me dritë vepruese të rrezatimit aktiv fotosintetik), e cila shkakton oksidim të akceptorëve të elektroneve në PhS 2. Në kushte të tilla, ngacmohet me përparësi PhS 1, i cili krijon mundësi të tërhiqen elektrone nga PhS 2 dhe të kalojë shumicën e qendrave të reaksionit në gjendje të hapur. F'_0 paraqitet si një masë e fluoreshencës gjatë oksidimit të plotë të akceptorit QA, në prani të shuarjeve jo-fotokimike.

$F'_v = F'_M - F'_0$ – fluoreshenca e ndryshueshme në gjethet e pershtatura në dritë. Parametri F'_v është proporcional me rendimentin faktik kuantik të PhS 2 në dritë.

$Rfd = (F_M - F_T) / F_T$ – koeficient vitaliteti i PhS 2. Parametri Rfd (koeficienti i zvogëlimit relativ të fluoreshencës, eng. *Relative fluorescence decrease*) tregon ndërveprimin e reaksioneve të varura nga drita, që përdorin PAR, me reaksionet e fazës së errët. Vlera e këtij parametri zvogëlohet kur prishet ekuilibri midis reaksioneve fotokimike në tilakoide dhe shpejtësitë e reaksioneve enzimatishe, që ndodhin në kloroplastet e stromës (Croxdale and Omasa, 1990a, b).

Si rezultat i veprimit të streseve të ndryshme, zakonisht, vërohet rritje e F_T , madhësia e F_M është relativisht konstante, kështu zvogëlohet diferenca $F_M - F_T$, dhe zvogëlohet vlera e Rfd (Lichtenthaler et al, 2004).

$Ap = 1 - (1 + Rfd_{730}) / (1 + Rfd_{690})$ – koeficient i përshtatjes ndaj faktorëve stresant. Ky parameter është i lartë në gjethet të reja të shëndetshme, të cilat kanë aktivitete të lartë fotosintetike, ndërsa vlerat e Ap nga 0.1 deri në 0.2 nënkuptojnë, se bimët ndodhen nën ndikimin e faktorëve stresant (Lichtenthaler and Rinderle, 1988, Strasser, 1988).

- **Parametra të shuarjes fotokimike të fluoreshencës.**

Rënia e sinjalit të fluoreshencës klorofile a quhet shuarje. Rënia e mprehtë në intensitetin e F_l klorofile a, shoqëruar me rritjen e energjisë së ngacmimit të përdorur në reaksionet fotosintetike, quhet shuarje fotokimike. Nëse vërohet ulje e sinjalit fluoreshent si rezultat i shpërndarjes së energjisë së ngacmimit në formën e nxehtësisë, kjo quhet shuarje jo-fotokimike. Parametrat fotokimik të shuarjes tregojnë, se ç'pjesë e energjisë së dritës absorbohet nga bima, e cila mund të përdoret në reaksionet fotokimike të fotosintezës (Maxwell and Johnson, 2000).

$\Phi_{PhS2} = (F'_M - F_T) / F'_M = \Delta F / F'_M$ – rendimenti kuantik (parametri Genty Φ_{PhS2}) lejon të vlerësohet rendimenti kuantik i reaksioneve fotokimike në PhS 2. Ky është parametri më popullor dhe më i rëndësishëm, që përfaqëson vet raportin e numrit të kuantëve, të përdorura në transformimet fotokimike, ndaj numrit të përgjithshëm të fotoneve të absorbuara PAR (Genty et al., 1989). Në kushte laboratorike, është gjetur një varesi lineare midis vlerave të parametrave Genty dhe shpejtësisë me të cilën fiksohet dyoksidi i karbonit në procesin e fotosintezës. Mospërputhje mes këtyre parametrave mund të lindin në kushte stresi për shkak të ndryshimeve në efektivitetin e karboksilimit gjatë aktivizimit të fotorespirimit ose shfaqje pseudo-ciklike të transferimit të elektroneve (Fryer et al., 1998). Si rregull, kur ka thatësi, mbyllet gojëzat dhe ullet efektiviteti i reaksioneve të asimilimit të CO_2 , dhe, rrjedhimisht, reduktohet konsumi i ATP dhe NADPH. Kjo jep efekt në ngadalësimin e transferimit të elektroneve në të dy fotosystemet dhe do të duhet të çojë në ulje të vlerës së parametrave Genty. Procesi i aktivizimit të fotorespirimit dhe përsheptimi i reaksioneve Meller mund të çojnë, megjithatë, edhe drejt normalizimit të transportit të elektroneve, që funksionon në bimë, të rritura në kushte të mungës së stresit.

Gjatë stresit të shkaktuar nga temperatura të ulta, ndodh rënie e parametrave të prodhimit, pasi në temperatura të ulta zvogëlohet aktiviteti i reaksioneve cikli Calvin-Benson, për realizimin e

të cilave nevojitet ATP dhe NADPH, dhe, si pasojë, ngadalësohet transferimi i elektroneve në fazën e ndritshme të fotosintezës (Andrews et al., 1995).

ETR = $\Phi_{\text{PhS2}} \times 0,84 \times 0,50 \times \text{PPFD}$ – fluksi i elektroneve nëpër fotosistem.

qP = $(F_M' - F_T') / (F_M' - F_0)$ - shuarje fotokimike. Parametri qP është pjesa e energjisë së dritës e përdorur në qendrat e hapura në reaksionet fotosintetike, nga sasia e përgjithshme e energjisë së absorbuar nga PhS 2. Ndryshimet në qP shkaktohen nga mbyllja e qendrave të reaksionit për llogari të ngopjes së fotosintezës me dritë aktive. Parametri qP saktëson pjesën e hapur, kurse shprehja $1 - qP$ - të mbyllur të qendrave të reaksionit të PhS 2 (Maxwell and Johnson, 2000).

$F_V' / F_M' = (F_M' - F_0) / F_M'$ - efektiviteti i qendrave të reaksionit të hapura të PhS 2 në dritë.

- ***Parametra të shuarjes jo-fotokimike të fluoreshencës.***

Shuarja jo-fotokimike (qN, NPQ) lidhet me proceset, përgjegjëse për transformimin në nxehtësi të një pjese të energjisë, së përdorur gjatë fazës së ndritshme të fotosintezës (Maxwell and Johnson, 2000). Të tilla procese aktivizohen, kur gjethet shumë intensivisht absorbojnë (përthithin) dritën (në këtë rast lind fotoinhibimi), ose në bimë, të dëmtuara nga veprimi i faktorëve të tjerë stresant. Në këto raste, shpejtësia e dëmtimit të PhS 2 rrit shpejtësinë e riparimit të tij.

qN = $(F_M - F_M') / (F_M - F_0) = (F_M - F_M') / F_V$ -shuarje jo-fotokimike. Vlerat e qN mund të variojnë nga 0 deri në 1 (Fracheboud and Leipner, 2003). Härtel et al. (1996) besojnë, se ndryshimet strukturore, të shkaktuara nga prania e ciklit xanthophyll, shfaqen si shkaku kryesor i shuarjes jo-fotokimike. Madhësia e raportit rregullohet nga ndryshime të vogla të pH në të dy anët e membranës tilakoide (Fracheboud, 2000, Weiss and Reigosa, 2003).

Rosenqvist and Kooten (2003) kane gjetur se madhësia e parametrave të matur të fluoreshencës klorofile, shuarja fotokimike (qP) dhe jo-fotokimike (qN), varen nga gjendja e PhS 2 dhe ndryshimi i përqendrimit të protoneve në të dy anët e membranës tilakoide (tabele 3.1.1).

NPQ = $(F_M - F_M') / F_M'$ – shuarje jo-fotokimike – NPQ shfaqet si parametër alternativ i qN.

Tabele 3.1.1: Lidhja ndërmjet vlerave të matura të parametrave të fluoreshencës klorofile a: shuarja fotokimike (qP) dhe jo-fotokimike (qN), gjendja e PhS 2 dhe koncentrimet e ndryshme protonesh në të dy anët e membranës tilakoide (Rosenqvist and Kooten, 2003)

Parameter	Qender reaksioni PhS 2	ΔpH	qP	qN
F ₀	të gjitha të hapura	mungon	1	0
F' ₀	të hapura	i ulët	1	$0 < q_N \leq 1$
F _M	të gjitha të mbyllura	mungon	0	0
F' _M	të gjitha të mbyllura	i ulët	0	$0 < q_N \leq 1$
F _V	të mbyllura gjatë kohës së ngopjes së impulsit pas përshtatjes në të errët	-	1→0	0
F' _V	të mbyllura gjatë kohës së ngopjes së impulsit në sfond të ndriçuar	-	X→0	$0 < q_N \leq 1$
F _T	disa të mbyllura	i ulët	$0 \leq q_p \leq 1$	$0 < q_N \leq 1$

Përfundime

Fluoreshenca klorofile a përfaqëson në vetvehte rrezatim dytësor të energjisë së dritës, të absorbuar nga molekulë klorofili. Pjesë nga energjia e absorbuar, e cila humbet në procesin e fotosintezës në formën e fluoreshencës, është e vogël dhe, megjithëse përfaqëson vetëm 3 deri 5%, paraqitet për ne një burim informacioni i rëndësishëm. Fluoreshenca klorofile a gjatë fotosintezës është masë e energjisë së përthithur të fotoneve të dritës të cilat nuk janë përdorur në procesin e fotosintezës, dhe nuk janë shpërndarë si nxehtësi (Kalaji et al., 2004).

Kurba e induksioni të fluoreshencës përfaqëson ndryshime të emisioneve të F_I klorofile në objektet fotosintezuese. Induksioni i fluoreshencës klorofile ndodh kur pas errësimit të objektit fotosintetik ai rrezatohet në diapazonin PAR.

Në analizën e fluoreshencës klorofile a përdoren një sërë karakteristika të ndryshme. Jepen parametrat e fluoreshencës klorofile a, madhësitë e tyre dhe kuptimi fiziologjik. Megjithë përpjekjet e përsëritura për të sistematizuar terminologjinë, i njëjti parametër shpesh paraqitet në mënyra të ndryshme.

3.2 FLUORESHENCA KLOOROFILIT A E SHPEJTË - JIP (OJIP) TEST

3.2.1 Ide të përgjithshme mbi testin

Këtu, përshkruajme lidhjen ndërmjet reaksioneve fotosintezuese dhe parametrave të Jip-testit - karakteristikat sasiore, të marra në bazë të sinjalit të fluoreshencës klorofile a, si dhe mundësinë e përdorimit të këtyre parametrave në praktikë. Baza teorike: Teoria e fluksit energjetik në membranat tilakoide (Strasser 1978, 1981).

JIP-testi merret në matjen e Fl së shpejtë (PF, Prompt Fluorescence) klorofile a dhe analizën e sinjaleve, të cilat përdoren për të marrë informacion të detajuar në lidhje me strukturën dhe funksionin e aparatit fotosintetik (kryesisht PhS 2).

Vlerësimi i gjendjes fiziologjike të aparatit fotosintetike këtu bëhet me anë të analizës së disa grupe parametrash biofizikë, të matur dhe të llogaritura në mënyra të ndryshme:

flukse energjie fenomenologjike, të llogaritura për njësi të sipërfaqes së objektit fotosintetik (psh, suprina e sipërfaqes së ndriçuar të gjethes);

flukse specifike të energjisë, të cilat i përkasin një qendre reaksioni punuese të PhS 2;

rendimente kuantike, që pasqyrojnë raportin e sasisë së elektroneve, të transferuara në një etapë të caktuar të fazës së ndritshme të fotosintezës, me numrin e kuantëve të dritës të absorbuar nga PhS 2;

efektiviteti, pasqyron probabilitetin e transportit të elektroneve nëpër një segment të dhënë të zinxhirit të transportit të elektroneve;

produktiviteti i punës së aparatit fotosintetik, përfaqëson produkte potencialesh të pjesshme në etapat e njëpasnjëshme të konvertimit të energjisë;

pjesa e qendrave të reaksionit, e cila lejon vlerësimin e raporteve relative të këtyre qendrave të reaksionit në pool e përbashkët të klorofilit, të cilat mund apo nuk mund të reduktojnë akceptorin fillestar të PhS 2 (Q_A). Këto të fundit quhen "*qendra të fjetura*", (eng. silent reaction center – RCsi), të cilat janë qendra reaksioni, që nuk reduktojnë Q_A , por edhe nuk kthejnë mbrapa energjinë e ngacmimit në antenën dritë-mbledhëse. Strukturat përkatëse të PhS 2 nuk kontribuojnë në formimin e fluoreshencës variable, ndërkaq kanë prurje shumë të ulët të Fl, të tillë si në qendrat e hapura të reaksionit të PhS 2. Këto qendra mund të aktivizohen pas daljes së bimëve nga stresi, i cili shkakton inaktivimin e tyre.

OJIP ka marrë emërtimin nga pikat e veçanta në kurbën e induksionit, që pasqyron ndryshimin e sinjalit të fluoreshencës gjatë kohës së ndriçimit të objektit fotosintetik (figure 3.2.1, figure 3.2.2). Gjatë fazës O-J gradualisht reduktohet Q_A , akceptorin fillestar i elektroneve në PhS2, dhe në piken J vendoset ekuilibri dinamik (gjendje kuazi-stacionare) mes proceseve të reduktimit dhe oksidimit të Q_A . Faza J-I pasqyron rritjen e Fl klorofile a, e cila është e lidhur me zhvendosjen e gjendjes kuazi-stacionare të quinone primar në drejtim të reduktimit, si rezultat i reduktimit nga drita e induktuar e pool plastoquinon. Rritja e mëtejshme e Fl klorofile a në fazën I-P pasqyron zvogëlim gradual të akceptorëve pauses të PhS 1 dhe reduktim të plotë të PQ - pool.

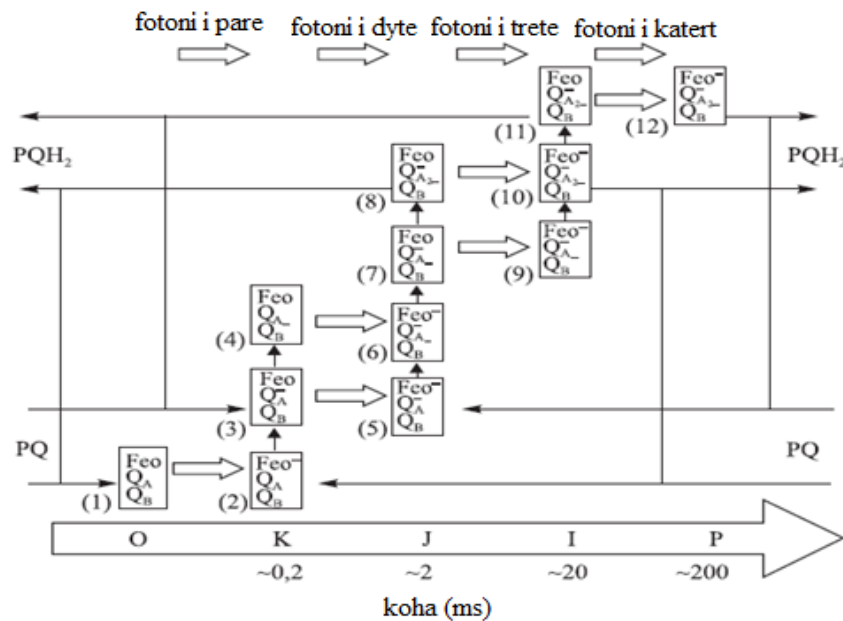


Fig. 3.2.1: Restaurim i akceptorit quinine në anën e PhS 2 në momente të ndryshme të induksionit (OJIP) (me modifikime nga Strasser et al. 2005)

Analiza OJIP lejon të kuptohet më mirë lidhja midis strukturës dhe funksionit të aparatit fotosintetik dhe shpejt të vlerësohet vitaliteti i bimës (Strasser et al, 2000 ;. Strasser et al, 2004).

Për zhvillimin e testit është e nevojshme të matet sinjali i fluoreshencës klorofile a në intervale kohe të shkurtra, duke filluar me 40-50 μ s dhe duke përfunduar me 1s. Ka shumë rëndësi që Fl të regjistrohet në momente të caktuara: 50 μ s, 100 μ s, 300 μ s, 2 ms, 30 ms, 1 s, dhe nga këto vlera mund të llogariten një sërë parametra të JIP- testit, të tilla si ABS / CS, TR / CS, ET / CS, RC / CS dhe DI / CS, të cilat përdoren në vlerësimimin e funksionimit të PhS 2. Shpejtësia e transferimit të elektroneve në PhS 2 varet nga nevojat për elektrone të energjisë së lartë në reaksionet e fazës së ndritshme të fotosintezës, si dhe nga shpejtësia e shpenzimit nga bima të produkteve të fotosintezës. Kjo, nga ana tjetër, varet nga gjendja e bimëve dhe nga ndikimi i faktorëve të ndryshëm të jashtëm, përfshi faktorët e stresit.

Nën kushte të caktuara të stresit (temperaturë e lartë, rrezatim me intensitet të lartë, etj.) frenohet procesi i disociimit të ujit dhe bllokohet transferimi i elektroneve midis qendrës aktive të OEC dhe tyrosine (Strasser et al., 2005). Në këtë rast, në kurbën e induksionit të klorofilit a në zonen e 200-300 μ s shfaqet një fazë specifike (maksimum lokal), i quajtur K-pik (pika K), e cila flet për prishje në procesin e disociimit të ujit (figure 3.2.2).

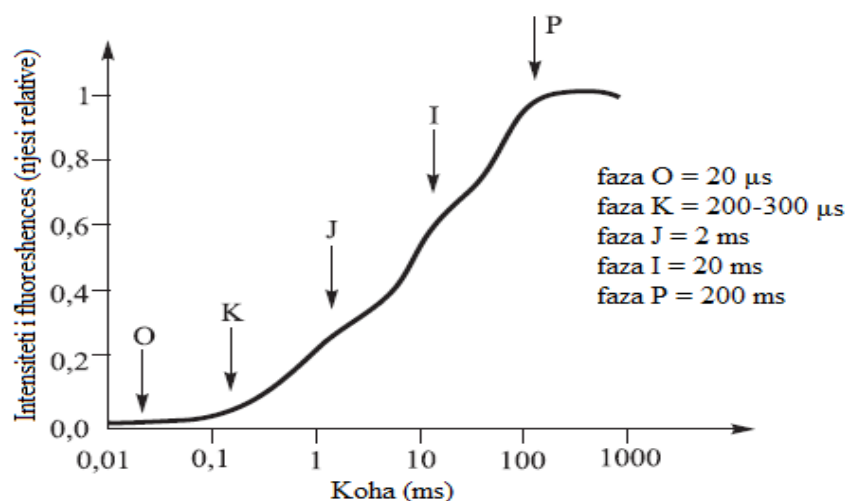


Fig. 3.2.2: Kurba e induksionit të fluoreshencës klorofile a variable, matur në ndriçim me dritë të kuqe me intensitet $3000 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gjatë 1 s. (me modifikime sipas Strasser et al. 2005). Shigjetat përshkruajnë pikat karakteristike OJIP – fazat.

3.2.2 Parametrat e përdorur në Jip (OJIP) test

Parametrat që karakterizojnë absorbimin e energjisë PAR dhe transportin e elektroneve quhen *specifike*, kur ata paraqiten për një qendër reaksioni (RC), ose *fenomenologjik*, nëse ata llogariten për njësi të sipërfaqes së ngacmuar (CS, eng.- Cross Section) të objektit fotosintetik. Për të kuptuar marrëdhënie kyç, të përdorura, paraqiten shkurtimet e mëposhtme:

RC – qendër active fotokimike reaksioni e PhS 2, që mund të reduktojë QA;

CS – njësi e sipërfaqes së suprinës të ngacmuar (CS) të objektit fotosintetik;

O dhe M (ose P) – indekse, tregojnë vlerat ekstreme të F1 klorofile a (F0 dhe FM (FP), respektivisht);

ABS - fluks i fotoneve, i absorbuar nga molekulat e pigment antenës.

3.2.3 Të dhënat e përftuara nga matjet e drejtpërdrejta të fluoreshencës (Strasser et al. 2000)

Ft – fluoreshenca, e emetuar në momentin e kohës t, nga momenti i kyçjes së dritës active (AL active light);

F50 μs ose F20 μs – sinjali minimal i fluoreshencës (korrespondon me vlerën F0), regjistruar në 50 μs apo 20 μs ;

F100 μs – fluoreshenca pas 100 μs ;

F300 μs - fluoreshenca pas 300 μs ;

FJ $\equiv$ F2ms - fluoreshenca në 2 ms gjatë fazës J;

$FI \equiv F_{30ms}$ – fluoreshenca e matur në 30 ms pas fillimit të ndriçimit - gjatë fazës I;

FP ($FP \cong FM$) - fluoreshenca maksimale gjatë fazës P.

3.2.4 Parametrat e fluoreshencës, llogaritur nga të dhënat e matura

F_0 - fluoreshenca minimale, e regjistruar, kur të gjitha qendrat e reaksionit të PhS 2 janë të hapura;

FM (FP) - fluoreshenca maksimale, e emetuar nga objekti, në të cilin gjithë qendrat e reaksionit të PhS 2 janë të mbyllura;

$F_v = F_t - F_0$ – fluoreshenca variable në momentin e kohës t ;

F_v / F_0 - pasqyron raportin midis konstanteve të shpejtësisë së reaksioneve fotokimike dhe jo-fotokimike që përdorin energjinë e ngacmimit të qendrës së reaksionit;

$V_t = (F_t - F_0) / (FM - F_0)$ – vlera relative e fluoreshencës variable në momentin e kohës t ;

$V_J = (F_J - F_0) / (FM - F_0)$ - vlera relative e fluoreshencës variable në fazën J (2 ms pas ndriçimit); përfaqëson sasinë e RC të mbyllura në lidhje me numrin total të RC, të cilat mund të jenë të mbyllura;

$V_I = (F_I - F_0) / (FM - F_0)$ - vlera relative e fluoreshencës së ndryshueshme në fazën I (30 ms), lidhur me gjendjen stacionare të ndërmjetme të reduktimit të pool plastoquinones; pasqyron aftësinë e PhS 1 dhe akceptorëve të saj të oksidojnë PQ H₂;

$WO_J = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ - fluoreshenca relative variable, normalizuar në amplitudë faze J ($F_J - F_0$);

$WO_K = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$ – fluoreshenca variable relative, normuar në amplitudë faze K ($F_K - F_0$);

$W_{E,100 \mu s} = 1 - (1 - W_{300 \mu s}) \times 1/5$ - vlera e W në momentin 100 μs , e cila simulon (modelon) rritjen eksponenciale të fluoreshencës në provë, në mungesë të lidhjes midis njësive të veçanta fotosintetike të PhS 2;

$M_0 = (\Delta V / \Delta T) = 4 (F_{300 \mu s} - F_{50 \mu s}) / (FM - F_0) = TR_0 / RC - E_{t0} / RC$ – vlera fillestare mesatare e pjerrësisë (në ms^{-1}) variabli relativ i fluoreshencës klorofile a, $V = f(t)$; ky parametër pasqyron shpejtësinë e mbylljes së qendrave të reaksionit të PhS 2; parametri përfaqëson shpejtësinë maksimale të restaurimit të QA, meqë si pasojë molekulat transportuese të reduktuara mundet sërish të oksidohen nga zona pasuese e zinxhirit të transportit të elektroneve pas QA;

$SM = (AM) / (FM - F_0)$ – sipërfaqja e përgjithshme e normalizuar mbi kurbën OJIP (pasqyron kapacitetin e pool të akceptorëve të elektroneve për reduktim të plotë të QA);

$SS = UJ / M0$ - sipërfaqja e përgjithshme mbi kurbën OJ e normalizuar (pasqyron një akt të vetëm restaurimi të QA), kurse minimalja SS vrojtohet kur çdo QA reduktohet vetëm me një electron;

$N = (SM / SS) = SMM0 (1 / VJ)$ - numri i cikleve, dmth sa akte të reduktimit të QA ndodhin gjatë kohës së induksionit nga 0 deri T_{FM} ; N - numri i elektroneve, të nevojshme për reduktimin e plotë të të gjithë akceptorëve pas QA;

$V_{av} = 1 - (SM / T_{FM})$ - fluoreshenca mesatare variable për kohën 0 deri në T_{FM} ;

SM / T_{FM} - masë e energjisë mesatare për ngacmimin e qendrave të hapura të reaksionit gjatë kohës nga 0 në T_{FM} , dmth koha, e nevojshme për mbylljen e plotë të tyre (Strasser et al, 2000).

3.2.5 Flukse specifike energjie nëpër QA-reduktues i qendrës së reaksionit të PhS-2

$ABS / RC = MO (1 / VJ) (1 / \phi Po)$ – fluks energjie, i absorbuar nga një qendër reaksioni aktive (RC); pasqyron raportin midis numrit të molekulave klorofile a në komplekset antenë, që emeton fluoreshencë, dhe në qendrat aktive të reaksionit (figure 3.2.3)

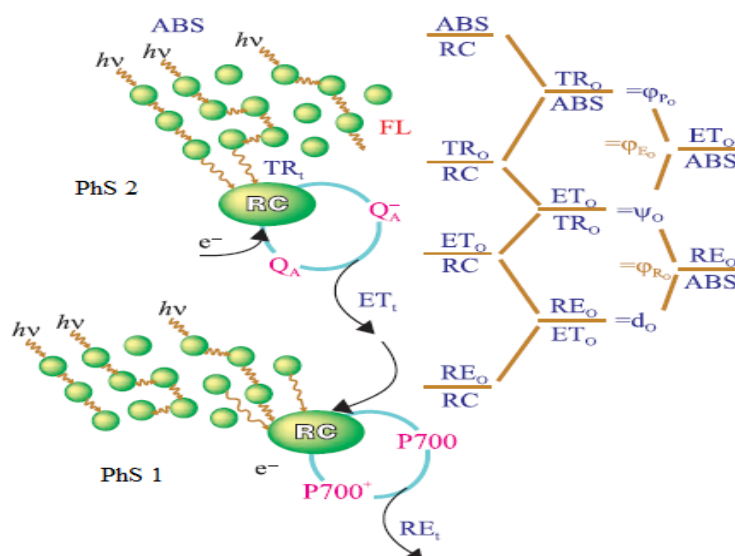


Fig. 3.2.3: Flukse energjie në një qendër reaksioni (ABS / RC , $TR0 / RC$, $ET0 / RC$, $RE0 / RC$) dhe derivatet e tyre $TR0 / ABS$, $ET0 / TR0$, $ET0 / ABS$, $RE0 / ET0$, dhe $RE0 / ABS$ (me ndryshime sipas Strasser et al, 2005 ;. Strasser et al, 2010).

$RC / ABS = ChlRC / (1 - ChlRC)$ – tregues i efikasitetit, shprehur si përqendrim i qendrave të reaksionit (RC) në pool e përbashket të klorofilit (Chl) (Strasser et al, 2000; Strasser et al, 2004 ..).

$TR0 / RC = M0 (1 / VJ)$ – fluks i energjisë së ngacmimit, kapur nga një qendër aktive reaksioni (RC) në momentin fillestar të ndriçimit të objektit, përshtatur në të erret, dmth, në $t = 0$;

$ET0 / RC = M0 (1 / VJ) \psi0$ - fluks i elektroneve, transportuar nga një qendër aktive reaksioni (RC), në $t = 0$;

$REO / RC = M0 (1 / VJ) (1 - VI)$ - fluks i elektroneve, transportuar nga një qendër active reaksioni (Rc) dhe redukton akceptorët fundorë në anën akceptore të PhS 1, në $t = 0$;

$DI0 / RC = (ABS / RC) - (TR0 / RC)$ – sasia e përgjithshme e energjisë, e shpërndarë nga një qendër reaksioni (RC) në formë nxehtsie, fluoreshence apo transfer në photosystem tjetër, në $t = 0$.

3.2.6 Rendimente kuantike, apo raporte fluksesh

$\phi Po \equiv TRO / ABS = [1 - (FO / FM)] = FV / FM$ – rendimenti maksimal kuantik i reaksioneve fotokimike fillestare ($t = 0$), i cili tregon probabilitetin e kapjes së energjisë së fotoneve të absorbuar (ose ngacmimin që migron nëpër antenë) nga qendrat e reaksionit PhS 2. Në rastin e gjendjes së stresit, shkaktuar nga drita e fortë ose nxehja e objektit, ϕPo si rregull, ulet.

$\phi Po / (1 - \phi Po) = FV / Fo$ - tregues i efektivitetit të reaksioneve fotokimike fillestare (transfer i elektroneve deri në QA^-);

$\phi Eo = ETO / ABS = [1 - (FO / FM)] \psi 0 = \phi Po \psi 0$ - efikasiteti kuantik i transferimit të elektroneve nga QA^- (në $t = 0$);

$\psi 0 \equiv ETO / TRO = (1 - VJ)$ - probabiliteti i transportit të elektroneve përtej QA^- ($t = 0$), dmth, efektiviteti, me të cilin ngacmimi, i kapur nga RC, lëviz elektronin përgjatë zinxhirit pas QA;

$\psi O / (1 - \psi O) = ETO / (TRO - ETO) = \psi$, definohet si ET / TR dhe, rrjedhimisht, $\psi O / (1 - \psi O) = ET / (TR - ET)$, ndërsa $(TR - ET)$ - numri i elektroneve që hyjnë dhe grumbullohen në QA^- , dmth shprehja $\psi O / (1 - \psi O)$ përfaqëson në vetvehte lidhje të elektroneve, të prodhuara nga sistemi, ndaj elektroneve që grumbullohen në system; pikërisht ky akumulim (shpejtësia dQA^- / dt ose akumulimi i pastër QA^-) përgjigjet për rritjen e sinjalit të fluoreshenceës; ky parametër përshkruan mundësinë e transportit të elektroneve nga ana tjetër e QA^- .

$\delta Ro = REO / ETO - (1 - VI) / (1 - VJ)$ – probabiliteti, me të cilin elektroni nga transportuesit midis dy fotosystemeve redukton akceptorët fundorë të elektroneve në anën akceptore të PhS 1 (RE);

$\phi Ro = \phi Po \phi Eo \delta Ro = REO / ABS = \phi Po (1 - VI)$ – rendimenti kuantik i reduktimit të akceptorit fundor të elektroneve në anën akceptore të PhS 1 (RE);

$\gamma RC = ChIRC / ChI_{total} = RC / (ABS + RC)$ - probabiliteti, që një molekulë e dhënë e klorofilit të funksionojë si RC PhS 2;

$\phi Do \equiv 1 - \phi Po = (FO / FM)$ – efektiviteti kuantik i shpërndarjes së energjisë (në $t = 0$);

$\phi Pav = \phi PO = (1 - Vav) = \phi Po (Sm / T_{FM})$ – prodhimi kuantik mesatar i reaksioneve fotokimike fillestare (koha nga 0 në T_{FM}).

3.2.7 Flukse energjie fenomenologjike, në njësi të sipërfaqes së objektit fotosintetik

ABS/CS_x – energjia e absorbuar për njësi të suprinës së sipërfaqes së objektit fotosintetik (CS) dhe sasia e klorofilit (Chl) në momentin 0 të kohës (t=0) ose në momentin kur arrihet fluoreshenca maksimale FM – kjo sasi energjie e fotoneve absorbuar nga antena, i përket qendrave aktive dhe joaktive të reaksionit të PhS 2. Kjo sasi varet nga përqendrimi i klorofilit në provën që testohet, kështu që për shpejtësi të ekuilibruar të absorbimit të energjisë (ABS) nga molekulat e antenës barazohet me shumën e konstanteve të shpejtësisë për konsumin e energjisë së ngacmimit sipas gjithë rrugëve të mundshme të shuarjes, shumëzuar me përqendrimin e klorofilit, dmth:

$ABS = (k_n + k_p) \times (Chl)$ (Krüger et al., 1997; Strasser et al., 2000), ku k_p - konstantja e shpejtësisë së reaksioneve fotokimike; k_n - konstantja e shpejtësisë të reaksioneve jofotokimike të përdorimit të energjisë së ngacmimit;

ABS / CSChl – energjia e ngacmimit e absorbuar, e dhënë për njësi të sipërfaqes së objektit fotosintetik (CS) dhe për sasi të klorofilit a, të përcaktuar nëpërmjet matjes së pasqyrimin (parametri Chl/CS);

$ABS / CS_0 \approx F_0$ – energjia, e absorbuar nga njësia e sipërfaqes së objektit fotosintetik (CS) në momentin fillestar të matjes (t=0), p.sh. e barabartë me F_0 ;

$ABS / CSM \approx FM$ - energjia, e absorbuar nga njësia e sipërfaqes së objektit fotosintetik (CS) në momentin kur arrihet maksimumi i fluoreshencës ($t = T_{FM}$), p.sh. e barabartë me FM;

$TR_0 / CS_x = \varphi P_0 \times (ABS / CS_x)$ – fluksi i energjisë së ngacmimit, i kapur nga qendrat e reaksionit të PhS 2, në njësi të sipërfaqes së objektit fotosintetik (CS) në t=0;

$ET_0 / CS_x = \varphi E_0 \times (ABS / CS_x)$ – fluksi i elektroneve nëpër PhS 2 në njësi të sipërfaqes së objektit fotosintetik (CS) në t=0;

$DI_0 / CS_x = (ABS / CS_x) - (TR_0 / CS_x)$ – shpërndarja e energjisë termike në PhS 2 në njësi të sipërfaqes së objektit fotosintetik (CS) në t=0.

3.2.8 Indeksi i produktivitetit në t = 0 dhe densiteti i qendrave aktive të reaksionit të PhS 2

$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \times \frac{\varphi P_0}{1 - \varphi P_0} \times \frac{\psi_0}{1 - \psi_0} \times \frac{\gamma}{1 - \gamma} \times \frac{\varphi P_0}{1 - \varphi P_0} \times \frac{\psi_0}{1 - \psi_0}$ - indeksi i produktivitetit, - tregues i aktivitetit funksional të PhS 2, lidhur me energjinë e thithur;

$PI_{CS} = PI_{ABS} \times \frac{ABS}{CS_x} = \frac{RC}{CS_x} \times \frac{\varphi P_0}{1 - \varphi P_0} \times \frac{\psi_0}{1 - \psi_0}$ - indeks produktiviteti, tregues i aktivitetit funksional të PhS 2, lidhur me njësinë e sipërfaqes së suprinës të ndriçuar;

$PI_{total} = PI_{ABS} \times \frac{\delta R_0}{1 - \delta R_0}$ - indeksi i përgjithshëm i produktivitetit – tregues i aktivitetit funksional të PhS 2, PhS 1 dhe zinxhirit të transportit të elektroneve midis tyre;

$RC / CS_x = \phi_{P0} (V_J / M_0) (ABS / CS_x)$ - densiteti i qendrave të reaksionit, të afta të reduktojnë QA.

3.2.9 Forcat levizëse (indeksi logaritmik i prodhueshmërisë PI në $t = 0$)

$DF_{ABS} = \log(PI_{ABS}) = \log \left(\frac{RC}{ABS} \right) + \log \left(\frac{\phi_{P0}}{1 - \phi_{P0}} \right) + \log \left(\frac{\psi_0}{1 - \psi_0} \right)$ - tregues, që karakterizon forcat levizëse në PhS 2 në raport me absorbimin. Termat e përfshirë në ekuacion pasqyrojnë kontributin e forcave levizëse, të lidhura me përqendrimin e qendrave aktive të reaksionit në PhS 2, reaksionet fillestare fotokimike dhe reaksionet e oksido reduktimit të quinonit QA⁻, respektivisht:

$$DF_{ABS} = DF_{RC} + DF_{reaksione\ drite} + DF_{reaksione\ errësire}$$

ku:

$$DF_{RC} = \log (RC / ABS),$$

$$DF_{reaksione\ drite} = \log (\phi_{P0} / (1 - \phi_{P0})) = \log FV / FO,$$

$$DF_{reaksione\ errësire} = \log (\psi_0 / (1 - \psi_0)) = \log ((1 - V_J) / V_J).$$

$$DF_{CS} = \log (PI_{CS}) = \log (ABS/CS_x) + \log(RC/ABS) + \log(\phi_{P0}/(1 - \phi_{P0})) + \log(\psi_0/ (1 - \psi_0)) -$$

tregues, që karakterizon forcat levizëse në PhS 2, kundrejt sipërfaqes së matur të objektit fotosintetik, CS.

3.2.10 Probabiliteti i përgjithshëm i qendrave të grupuara të reaksionit

Siç kemi përmendur më herët, energjia e kuantëve të dritës, e përthithur nga molekulat e klorofilit të kompleksit antenë PhS 2, me probabilitet të larte transferohet në qendrën e reaksionit. Energjia e kapur në RC të hapura përdoret për reaksione fotokimike, kurse RC të mbyllura e rrezatojnë në formë nxehtësie ose fluoreshence. Kur objekti i studjuar përfaqëson në vetvehte përzierje midis RC të hapura dhe të mbyllura, atëhere efektiviteti i reaksioneve fotosintetike (dhe të lidhura me to intensiteti i fluoreshencës variable) do të varet nga mundësia e transferimit të energjisë së ngacmimit nga RC të mbyllura të komplekseve antenë drejt qendrave të hapura. Bashkëveprimi mes njësive fotosintetike pasqyrohet në formën e kurbës së induksionit të Fl. Numerikisht bashkëveprimi i qendrave të PhS 2 në nivel kompleks antene mund të shprehet me ndihmën e koeficientit p_{2G}, i quajtur “probabilitet grupimi”. Vlera e tij mund të llogaritet nga parametrat e kurbës së Fl në fazën fillestare të induksionit:

$$P_{2G} = \frac{(W_{E,100\mu s} - W_{100\mu s}) F_0}{W_{100\mu s} (1 - W_{E,100\mu s} V_J) V_J F_V}$$

ku

$$W_{E,100\mu s} = 1 - (1 - W_{100\mu s}) \times 1/5,$$

$$W_{100\mu s} = \frac{F_{100\mu s} - F_{50\mu s}}{F_{2ms} - F_{50\mu s}},$$

$$W_{300\mu s} = \frac{F_{300\mu s} - F_{50\mu s}}{F_{2ms} - F_{50\mu s}}.$$

Probabiliteti i përgjithshëm i grupimit merr parasysh gjithë mënyrat e mundshme të transferimit të energjisë mes komplekseve fqinje antenë të PhS 2 dhe tregon probabilitetin për përdorimin e energjisë së absorbuar në reaksionet fotokimike.

3.2.11 Tregues të strukturës dhe funksionit

$$SFIP0(ABS) = (ChlRC / Chltot) * \phi P0 * \psi 0$$

Indeksi siguron informacionin strukturor dhe funksional për forcën e ndikimit të faktorëve të brendshëm, të cilët lehtësojnë realizimin e reaksioneve në PhS 2.

Parametri i anasjelltë SFIN0(ABS), pasqyron proceset, e lidhura me inhibimin e reaksioneve në PhS 2:

$$SFIN0(ABS) = (1 - ChlRC / Chltot) * (1 - \phi P0) * (1 - \psi 0),$$

Chltot - përmbajtja totale e klorofilit a, Chltot = Chlantena + ChlRC.

Parametrat e parë të JIP –testit mund ti ndajmë në dy grupe. Parametra të tillë si F0/ FM, V100μs, M0 dhe VJ, japin informacion për akte të veçanta të restaurimit të QA, ndërkaq parametra si VI, S_M dhe T_{FM} pasqyrojnë procese që përfshijnë akte të shumta reduktimi.

Parametrat bazë të fluoreshencës klorofile (parametra JIP testi), matur me fluorimetrin e firmes Hansatech Instruments Ltd. mund të llogariten dhe të paraqiten në formë grafike me ndihmën e softwerit BIOLYZER (të drejtat e autorit i përkasin laboratorit bioenergjetik në Universitetin e Gjenevës, Zvicër). Disa mënyra, modele përdoren për paraqitjen grafike.

Në këtë punim ne kemi përdorur – diagramën merimangë (spider plot, figure 3.2.4).

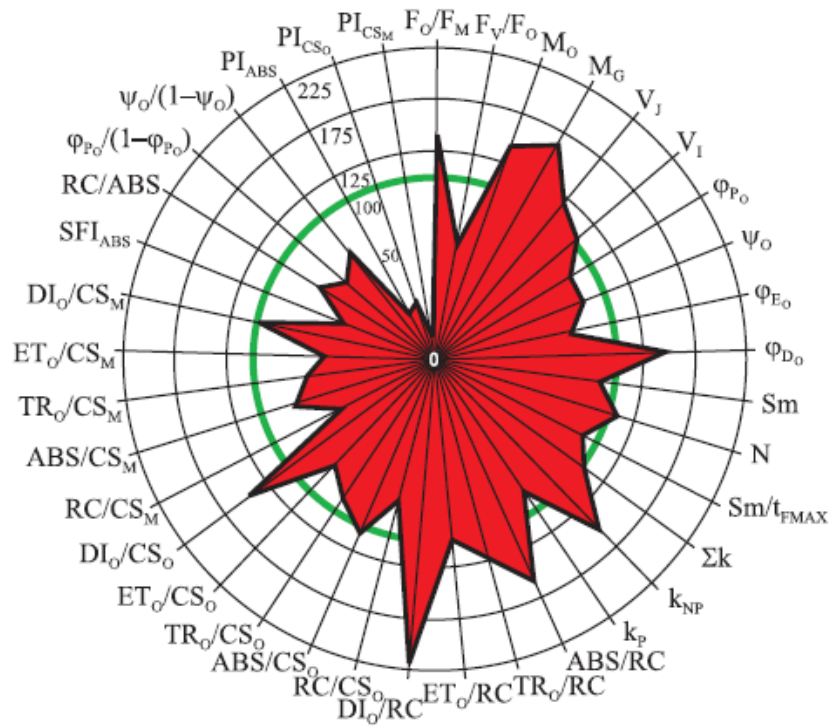


Fig.3.2.4: Diagrama merimangë tregon shmangien relative të JIP – parametrave të objektit të studjuar, i cili ndodhet në gjendje stresi (bima e panxhar sheqerit, rritur në defiçit magnezi në mjedisin e kultivuar), nga madhësitë e kontrollit (kontrolli – rreth jeshil me vlerat e gjithë parametrave 100%). Parametrat janë grupuar si më poshtë: shpejtësia e fluksit të energjisë, produktiviteti dhe efikasiteti kuantik, fluksi specifik i energjisë dhe flukset relative fenomenologjike, si dhe treguesit funksional të PhS 2 (Hermans et al., 2001).

Përfundime

JIP-testi zhvillohet në matjen e PF klorofile a dhe analizën e sinjaleve, të cilat përdoren për të marrë informacion të detajuar në lidhje me strukturën dhe funksionimin e aparatit fotosintetik (kryesisht PhS 2). Vlerësimi i gjendjes fiziologjike të aparatit fotosintetik bëhet këtu me anë të analizës së disa grupe parametrash biofizikë. Analiza OJIP lejon të kuptohet më mirë lidhja midis strukturës dhe funksionit të aparatit fotosintetik dhe shpejt të vlerësohet vitaliteti i bimës. Për zhvillimin e testit është e nevojshme të matet sinjali i fluoreshencës klorofile a në intervale kohe të shkurtra, duke filluar me 40-50 μ s dhe duke përfunduar me 1s. Paraqiten parametrat bazë të fluoreshencës klorofile (parametra të JIP testit), të cilët të matur me fluorimetritin e firmes Hansatech Instruments Ltd. llogariten dhe paraqiten në formë grafike me ndihmën e softwerit BIOLYZER.

3.3 FLUORESHENCA E VONUAR NË ORGANIZMAT FOTOSINTEZUES

3.3.1. Ide të përgjithshme mbi fluoreshencën e vonuar

Gjendjet e ngacmuara të molekulave klorofile relaksojnë shpejt, molekula klorofile kalon në gjendje bazë të pangacmuar, dhe energjia e ngacmimit shpërndahet si nxehtësi ose rrezatohet si kuant drite - fluoreshencë (Jursinic, 1986; Krause and Weis, 1991). Organizmat fotosintetike janë në gjendje, megjithatë, të emetojnë dritë për një kohë më të gjatë - ns, μ s, ms, s apo edhe minuta pas çkycjes së dritës ngacmuese (Lavorel, 1975; Goltsev et al, 2009b.). Rrezatimi i kuantëve të drites nga molekulat klorofile a singlet – të ngacmuara, më gjatë se FL, quhet fluoreshencë e vonuar (DF – eng. Delayed Fluorescence).

Me shfaqjen e pajisjeve për regjistrim shifror të sinjalit të DF u bë e mundur të kapen karakteristikat kinetike të një sinjali shumë-komponentësh (Goltsev et al, 2003 ;. Zaharieva and Goltsev, 2003 ;. Goltsev et al, 2005;. Goltsev et al, 2009b). Në vitin 2008, Hansatech Instrument Ltd. prodhoi versionin e parë komercial të aparatit për regjistrimin e DF, m-PEA, i cili lejon regjistrimin e njëkohshëm mbi një objekt të tre sinjaleve - PF, DF, dhe shpërndarjen e moduluar të dritës me gjatësi vale 820 nm (MR 820 - eng. Modulated 820 nm Reflection). Krijimi i një njësie të tillë të unifikuar lejon jo vetëm krahasimin e rezultateve të studimeve, të kryera në laboratorë të ndryshëm, por edhe të kuptohet më mirë mekanizmi i kuantizimit dhe lidhja e sinjalit DF me reaksionet e fotosintezës.

Këtu trajtojmë marrëdhënien ndërmjet proceseve fotosintetike dhe reaksioneve, që çojnë në emetimin e kuantit klorofil DF, si dhe karakteristikat sasiore të marra nga sinjali DF, përshkruajmë mundësinë e përdorimit të këtyre parametrave për të vlerësuar gjendjen fiziologjike të bimëve.

3.3.1.1. Mekanizmi i gjenerimit të fluoreshencës së vonuar

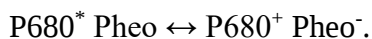
DF emetohet nga gjendjet e ngacmuara të molekulave klorofile a të komplekseve antenë të PhS 2 (Jursinic, 1986). Spektrat e emisionit të DF janë të ngjashëm me spektrat e PF (Sonneveld et al, 1980 ;. Grabolle and Dau, 2005), duke dëshmuar, se në të dy rastet emetimi i kuantit ndodh si rezultat i dezaktivimit rrezatues të gjendjes së parë singlete të ngacmuar të molekulave klorofile a, që i përkasin komplekseve antenë të PhS 2 (Krause and Weis, 1991, Lang and Lichtenthaler, 1991). Gjendja e ngacmuar e klorofilit shuhet për kohë të rendit disa pikosekonda deri në nanosekonda dhe konsiderohet se për 5-10 ns pas lëshimit të dritës, fluoreshenca klorofile a zhduket plotësisht (Jursinic, 1986; Krause and Weis, 1991). Pavarësisht nga kjo, klorofili në bime vazhdon të rrezatojë dritë, e cila zbehet shumë më ngadalë se fluoreshenca - në intervale kohe nanosekundë (Christen et al, 2000), mikrosekundë (Jursinic and Govindjee, 1977; Jursinic et al, 1978; Wong et al, 1978; .. Christen et al, 1998 ;. Mimuro et al, 2007; .. Buchta et al, 2008), milisekundë (Hipkins and Barber, 1974, Barber and Neumann, 1974, Zahareva and Goltsev 2003 ;. Goltsev et al, 2005; Buchta et al, 2007), sekondë (Rutherford and Inoue, 1984 ;. Hideg et al, 1991; .. Katsumata et al, 2008) dhe madje edhe minuta dhe orë pas ndërprerjes së ndriçimit të objekteve fotosintezuese (Hideg et al, 1990). Kështu, rrezatimi i vazhdueshëm i dritës nga bimët në zonat spektrale të fluoreshencës klorofile a përfaqëson në vetvehte fluoreshencë të vonuar dhe është rezultat, jo

i absorbimit të drejtpërdrejtë të fotoneve të dritës, por i formimit të gjendjeve të ngacmuara rishtaz të molekulave klorofile.

Nga ana tjetër, ngacmim dytësor i molekulave të klorofilit ndodh si rezultat i transportit mbropa të elektroneve, rekombinimi i ngarkesave në qendrën e reaksionit të PhS2 dhe transferimi pasues i energjisë nga qendra e reaksionit të klorofilit të ngacmuar P680* në klorofilet e antenës (Arthur and Strehler, 1957).

Mundësia teorike e formimit të gjendjeve të ngacmuara rishtaz CHL* dhe rrezatimi i kuantëve DF është e lidhur me kthyeshmërinë e reaksioneve të transportit të elektroneve në fazën e ndritshme të fotosintezës.

Në qendrën e reaksionit të PhS 2, dipoli $P680^+Pheo^-$, i formuar si rezultat i reaksionit primar fotokimik, është në ekuilibër me gjendjen fillestare, singlet - të ngacmuar të RC - $P680^+Pheo$ (Dau and Sauer 1996, Grabolle and Dau 2005):



Reaksionet e mëvonshme për stabilizimin e ngarkesave të ndara (reoksidimi i $Pheo^-$ nga QA dhe reduktimi i $P680^+$ donor Z) gjithashtu janë të kthyeshme, dmth, mund të krijohet proces, i quajtur rekombinim - elektroni nga QA^- kthehet në pheophytin ($QA^- \rightarrow Pheo$), dhe më pas - tek klorofili i RC. Nëse në këtë rast P680 mbetet në gjendjen bazë, dhe energjia shtesë e elektronit të "ngacmuar" shpërndahet si nxehtësi, atëherë ky proces quhet rekombinim jo-rrezatues i ngarkesave. Në raste të rralla, rekombinimi mund të çojë në formimin e gjendjes së ngacmuar P680*, dhe ajo, nga ana e vet, - transferon energji ngacmimi në komplekset antenë, e cila çon në emetimin e një kuantit DF. Një proces i tillë zakonisht quhet "rekombinim radiativ i ngarkesave". Skematikisht, proceset dhe reaksionet në PhS 2, të cilat çojnë ose në përdorimin e energjisë së kuantit për reaksionet fotosintetike, ose në emetimin e dritës në formë PF klorofile a (dy komponentë - F_O dhe F_M), apo DF, paraqiten në figure 3.3.1.

Reaksionet e transferimit të elektroneve përgjatë zinxhirit, të lidhura me stabilizimin e ngarkesave të ndara, rrjedhin spontanisht, me uljen e energjisë së elektronit dhe të gjithë sistemit në çdo hap të transferimit (diagramë në figure 3.3.2). Ndërkohë, energjia "e humbur" nga elektronet shpërndahet në formën e nxehtësisë. Si rezultat i transportit elektronik, distanca midis ngarkesave, të ndara në reaksionet fotokimike, rritet, gjë që zvogëlon në mënyrë të konsiderueshme mundësinë e bashkëveprimit mes këtyre ngarkesave (rekombinimit), megjithatë, edhe kur elektroni është në QA, dhe ngarkesa pozitive - në Z, probabiliteti i rekombinimit të tyre është mjaft i madh. Më shpesh në këtë proces ndodh ngacmim vibracional i molekulave të klorofilit, i cili shpejt shpërndahet si nxehtësi (rekombinim jo-rrezatues). Nëse transferimi prapa i elektronit do të çojë në ngacmim të P680, një reaksion rekombinim rrezatues, ky është çelësi për formimin e kuantëve DF.

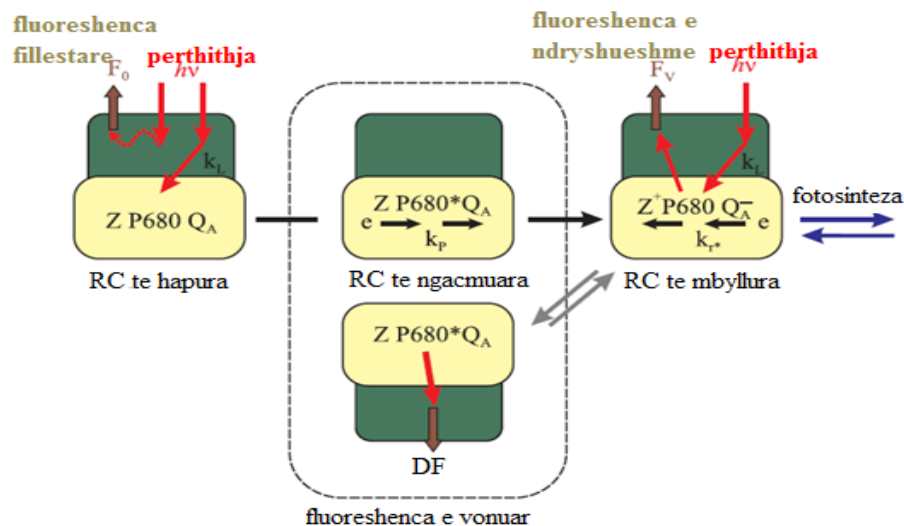


Fig. 3.3.1: Skemë e thjeshtuar e reaksioneve të fotoinduktura në RC të PhS 2, që çojnë në emetimin e PF (F_0 ose F_V) dhe DF. Kuadratet e verdha përfaqësojnë kompleks qendër reaksioni (Z P680 Q_A), që përfshin molekulë klorofile fotokimikisht aktive (P680), akceptor sekondar elektroni (molekulë quinone Q_A) dhe mbetje redoks-aktive tyrosine (Tyr161, D1), që funksionon si donor elektroni (Z). Elipsat e gjelbër përfaqësojnë komplekse antenë PhS 2. Absorbimi i dritës ($h\nu$) në RC të hapura (RC me Q_A të oksiduar) çon në:

a) emision të shpejtë fluoreshent (shigjeta e kuqe e errët), i cili përbën pjesë konstante të sinjalit fluoreshent komponent i pjesës së vazhdueshme të sinjalit fluoreshent (shënuar si F_0);

b) kapje e energjisë së ngacmimit nga qendrat e reaksionit, formimi i P680* (reaksioni rrjedh gjatë konstantes së shpejtësisë, k_L). Pas ndarjes së ngarkesës në një reaksion fotokimik (rrjedh sipas konstantes së shpejtësisë, k_p) ngarkesat e ndara stabilizohen nga reaksionet redox të anës donore dhe akceptore të PhS 2. Në këtë formohen të quajturat RC "të mbyllura", ku molekula Q_A është reduktuar dhe reaksioni pasues i ndarjes së ngarkesës bëhet i pamundur. Nëse antenat e fotosistemit në gjendjet e "mbyllura" absorbojnë fotone drite, energjia e tyre nuk mund të përdoret për fotosintezë dhe për lifetime të gjendjes së ngacmuar të klorofilit, ajo rrezatohet në formën e nxehtësisë ose fluoreshence shtesë (shënuar si fluoreshencë e ndryshueshme, F_V).

c) formimi i çiftit të ngarkesave të ndara Q_A^- dhe Z^+ në RC "të mbyllura". Këto ngarkesa në anën donore dhe akceptore të PhS 2 mund të rikombinohen (i ashtuquajtur "rekombinim rrezues (radiativ)" me konstante të shpejtësisë k_r^*), që do të çojë P680 sërish në gjendje të ngacmuar. Pas migrimit të ngacmimit të komplekseve antenë klorofile ndodh emetimi i kuantëve, që janë fluoreshencë e vonuar DF.

Me linjë të ndërprerë janë qarkuar gjendjet e ndërmjetme jetëshkurtera RC të PhS 2 (nga V. N. Goltsev).

Rekombinimi radiativ i nevojshëm për formimin e DF mund të krijohet si rezultat i aktivizimit termik të elektroneve për llogari të energjisë së molekulave të mjedisit. Kjo përcakton dhe varësinë e DF nga temperatura (Tyystjarvi and Vass, 2004; Goltsev et al., 2009b):

$$L = c\phi f [Z^+P680Q_A^-] e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}},$$

ku L - intensiteti i DF; ϕ_{fl} - rendimenti kuantik i dezaktivimit radiativ të gjendjes singlet - të ngacmuar të klorofilit a; $[Z^+P680QA^-]$ - përqendrimi i gjendjeve të RC të PhS 2 me ngarkesa të ndara - paraardhës i DF; ΔG - energjia e lirë e nevojshme formimin e gjendjes së ngacmuar rishtas të CHL (energjia e aktivizimit); k_b - konstantja Boltzmann; T - temperatura absolute; c - koeficienti i proporcionalitetit që varet nga përqendrimi i RC aktive në provë (mostër) dhe konstante e pajisjes së përdorur për të matur DF (e cila lidh sinjalin elektrik të regjistruar në volt me numrin real të kuantëve të emetuara DF).

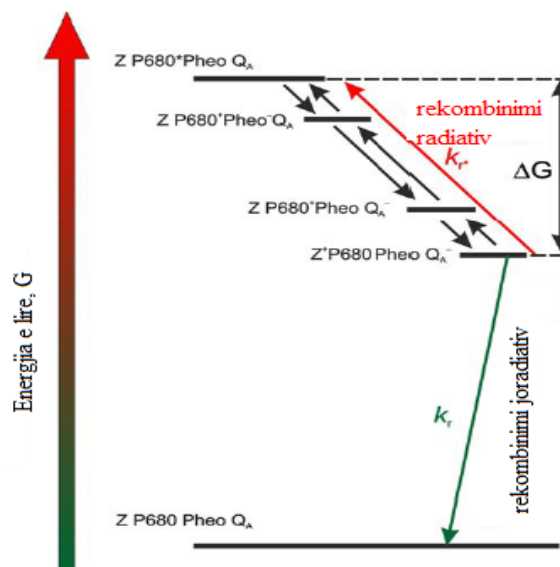


Fig. 3.3.2: Skema e energjetike e reaksioneve të oksido-reduktimit në RC të PhS 2, që çon në formimin e gjendjeve të ngacmuara rishtas të P680, të cilat janë pararendëset e DF. Shigjetat e zeza tregojnë reaksionet redox të drejtpërdrejta (poshtë) dhe të kundërta (lart). Shigjetat me ngjyrë pasqyrojnë reaksionet e rekombinimit të ngarkesave të ndara - radiative (të kuqe) dhe joradiative (gjelbër). ΔG është diferenca midis energjive të lira të gjendjeve RC $Z P680^* Pheo Q_A$ dhe $Z^+P680 Pheo Q_A^-$. (nga V. N. Goltsev).

3.3.1.2. Kinetika e shuarjes e fluoreshencës së vonuar

Kur bimët ndriçohen me dritë të vazhdueshme, çdo RC funksionon pavarësisht nga të tjerat. Në një moment të dhenë kohe objekti fotosintetik do të përfaqësohet nga një sërë njësisish fotosintetike me qendra reaksioni të PhS 2 në gjendje të ndryshme redox të bartësve të elektronit. Drita e rrezatuar nga një provë e tillë do të përfaqësojë kombinim të kuantëve, të lidhur me paraardhës të ndryshëm të lumineshencës. Secili prej paraardhesve ka sjellje të vet të caktuar kinetike, e cila përcakton karakterin kompleks të kinetikave të DF, në përgjithësi.

Në errësirë objekti fotosintetik paraprakisht i ndriçuar rrezaton DF, intensiteti i të cilës zvogëlohet për një kohë të gjatë sipas kurbës komplekse shumëkomponentëshe (figure 3.3.3), e cila në shumicën e rasteve mund të përshkruhet si një funksion polieksponeencial (Lavorel, 1975; Goltsev et al, 2009b.):

$$L(t) = \sum_i L_i e^{-t/\tau_i},$$

ku $L(t)$ - intensitet i emetuar DF në një moment kohe të caktuar (t) pas çkyçjes (ndërprerjes) së dritës ngacmuese; L_i - amplituda e komponentit të i -të të shkelqimit (lumineshencë), dhe τ_i – (lifetime) koha karakteristike e jetës së saj.

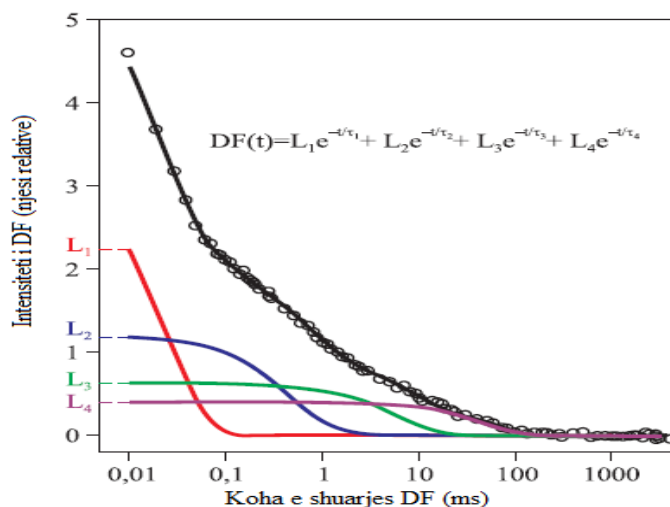


Fig. 3.3.3: Kinetika e shuarjes së DF në gjethe të domates, e regjistruar pas 1 sekondë ndriçim. Rrathët e zinj përfaqësojnë pika eksperimentale, dhe kurba përfaqëson aproksimacion (përafrim) me ndihmë të modelit të 4-t eksponencial sipas barazimit $DF(t) = L_1 e^{-t/\tau_1} + L_2 e^{-t/\tau_2} + L_3 e^{-t/\tau_3} + L_4 e^{-t/\tau_4}$. Linjat e ngjyrosura përfaqësojnë komponentet e veçanta kinetike të shuarjes së DF.

Dallohen tre grupe të proceseve që përcaktojnë kinetikën e shuarjes DF (Lavorel, 1975; Goltsev et al, 2009b; Kalaji et al, 2012.):

1. Reaksione të tipit "rrjedhje" (eng. leakage): rënie e lidhur me zhdukjen e paraardhësve të DF, si rezultat i reaksioneve direkte të oksido-reduktimit me një nga ngarkesat e çiftit. Reaksionet e këtij tipi mund të përshkruajnë shuarjen e DF në diapazonet kohore mikro dhe submilisekondë.

2. Reaksione të tipit "dezaktivim" (eng. deactivation): paraardhës të DF zhduken si rezultat i redox reaksioneve në kufijtë e çifteve të ngarkesave të ndara (p.sh., në RC gjendjen $Z^+P680QA^-$ - transferimi i kundërt elektronik nga QA^- në Z^+). Reaksione inverse të transferimit elektroneve në gjendjet e RC - paraardhës përcaktojnë komponentet më të ngadalshme DF - milisekonda ose sekonda.

Në dy rastet e përshkruara, kinetika e shuarjes DF përcaktohet nga kinetika e zhdukjes së paraardhësve DF, dmth zhdukja e çifteve të ngarkesave të ndara.

3. Reaksione të tipit çenergjetizim (de-energization). Disa procese mund të ndikojnë në shpejtësinë e shuarjes së lumineshencës, duke ndryshuar konstanten e shpejtësisë së rikombinimit radiativ të ngarkesave dhe, kështu, rendimentit kuantik të lumineshencës. Këto procese janë të ngadalta dhe mund të lidhen me shuarjen e DF në intervale kohe decisekondë (relaksim $\Delta\psi$), në sekondë (çaktivizimi i S_3) dhe në minuta (Goltsev et al., 1980a).

3.3.1.3. Kinetika e induksionit e fluoreshencës së vonuar

Ashtu si fluoreshenca e shpejtë e klorofilit a, (PF), dhe fluoreshenca e vonuar në mënyrë karakteristike ndryshon intensitetin e saj gjatë ndriçimit me dritë të vazhdueshme të objekteve fotosintetike, paraprakisht të përshtatura në errësirë. Kurba e induksionit e DF reflekton ndryshimet, që ndodhin në PhSA gjatë kohës së tranzicionit errësirë - dritë. Për të regjistruar IC të DF, nevojitet të përdoret ndriçim periodik - cikle alternative dritë - errësirë. Gjatë ndriçimit, mund të matet intensiteti i PF (Zaharieva and Goltsev, 2003), dhe kur çkyçet drita, DF fillon të matet pas një intervali të shkurtër kohor (10 μ s - 1 ms, në varësi të pajisjes që përdoret), në mënyrë që të shmanget mbivendosja e PF në DF detektorin.

Kinetika e induksionit e DF përfaqëson në vetvete një funksion kohe shumë të komplikuar multi-fazë, që kalon nëpër disa maksimume dhe minimume të njëpasnjëshme dhe pas 2-3 minuta ndriçim me dritë FAR arrin nivel stacionar (Veselovskii and Veselova 1990; Radenović et al 1994).

Faktorët bazë, që përcaktojnë formën e IC të DF janë: 1) tiparet gjenetike të mostrës (taksonomia e bimës); 2) statusi strukturor i objektit (bimë e tërë, suspension kloroplaste të izoluar, pjesëza membrane); 3) gjendja fiziologjike (varet nga faktorët fizikë dhe kimikë të mjedisit); 4) kushtet e matjes (kohëzgjatja e përshtatjes në të errët, intensiteti i dritës ngacmuese, intervali i errët i regjistrimit të sinjalit DF), të cilat paracaktojnë çfarë komponente kinetike e DF regjistrohet (Zaharieva and Goltsev 2003).

Ende nuk ka nomenklaturë të pranuar gjithësisht për përshkrimin e pikave karakteristike të DF gjatë kohës së tranzitimit të induktuar, dhe nuk ka interpretim unik të mekanizmave të formimit të maksimumeve në IC. Në punimin tonë i kemi përmbajtur nomenklaturës së propozuar nga Goltsev et al. (Goltsev and Yordanov, 1997; Goltsev et al, 1998; .. Goltsev et al, 2005; Goltsev et al, 2009b ;. Strasser et al 2010 ;. Kalaji et al, 2012).

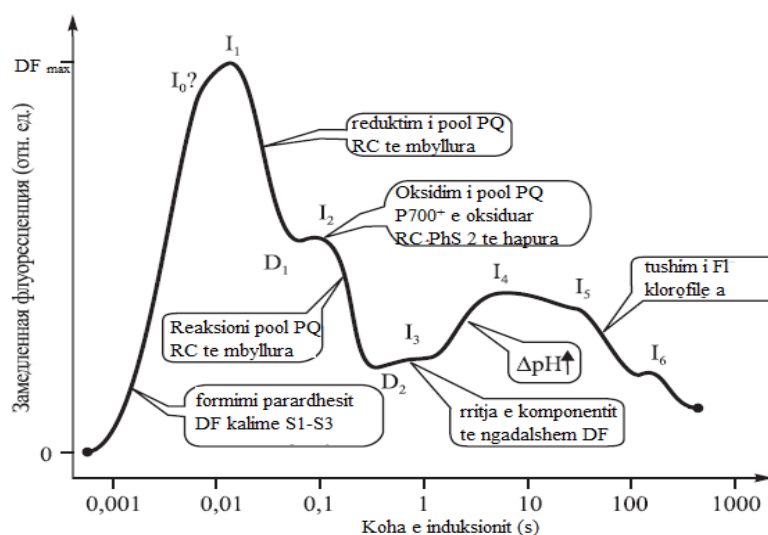


Fig. 3.3.4: Kinetika microsec. tipike e induksionit të DF në gjethe fasule, regjistruar me ndihmë të aparatit M-PEA-2 në intensitet të dritës ngacmuese 1000 μ mol $h\nu \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Etiketat me mbishkrim përshkruajnë proceset e supozuara, të cilat përcaktojnë ndryshimin në intensitetin e DF në momentin e dhënë, (sipas Goltsev et al).

Në IC të DF vrojtohen dy faza: e shpejtë dhe e ngadalshme (Itoh et al., 1971; Itoh and Murata, 1973; Malkin and Barber, 1978), që zgjasin 200 ms dhe disa minuta, respektivisht (Malkin and Barber 1978). Në fazën e shpejtë vihet re rritje nga niveli fillestar, shënuar me O, deri në maksimum I_1 , pas të cilit DF bie në një D_2 minimum. Në fazën e ngadalte sërish vërehet rritje nga D_2 në një maksimum të dytë I_4 dhe rënie deri në nivelin stacionar S.

Forma IC e DF varet fort nga intensiteti i dritës ngacmuese që përdoret për regjistrimin e DF (figure 3.3.5). Secila fazë e IC e DF ka një varësi të ndryshme nga intensiteti i dritës ngacmuese, e cila lidhet me kontributin e komponenteve të saj të shpejta dhe të ngadalta në formimin e maksimumeve individuale IC. Komponentet e shpejta rriten pothuajse në mënyrë lineare me rritjen e intensitetit të dritës, ndëkaq më të ngadalshmet (subsec., sec.) janë të ngopura tashmë në intensitete relativisht të ulta. Si rezultat i kësaj, në intensitet të lartë ngacmimi, IC paraqet një maksimum të theksuar në I_1 , pas së cilit intensiteti luminescencës bie në nivel relativisht të ulët. Në dritë të dobët në kurbat luminescente të induksionit, maksimumet e mëvonshme $I_2, I_4 \dots$ S përfaqësohen fortë. Prandaj, për vëzhgim të hollësishëm dhe analizë të I_2 dhe strukturës së fazave të ngadalshme IC të DF janë të nevojshme të maten në intensitet të dritës ngacmuese të rendit $1000 \text{ mikromol } hv \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

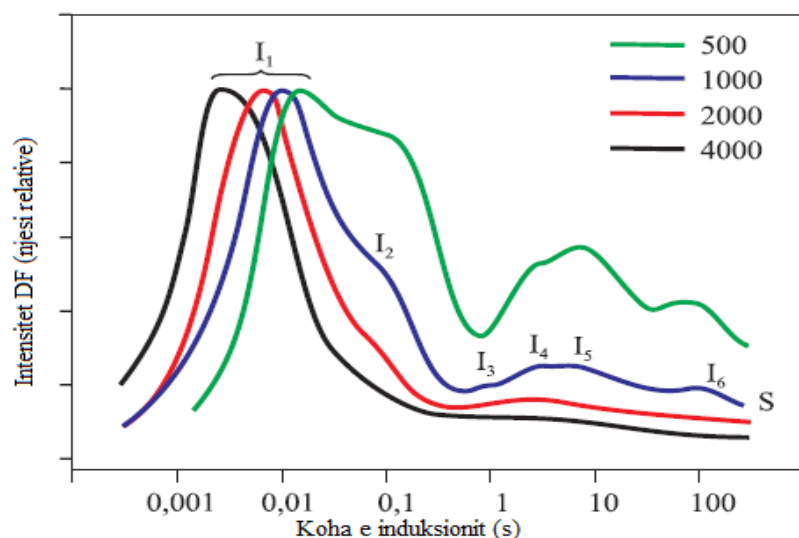


Fig. 3.3.5: Ndikimi i intensitetit të dritës ngacmuese mbi formën e konetikave mikrosek. të induksionit DF në gjethe fasule, të regjistruara nga aparati M-PEA 2. Intensiteti i dritës ngacmuese tregohet në $\mu\text{mol } hv \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ rreth linjave me ngjyrë përkatëse. Të dhënat për çdo kurbë normalizohen ndaj vlerës së saj maksimale (modifikuar nga Kalaji et al., 2012).

Goltsev and Yordanov, 1997; Goltsev et al, 1998; .. Goltsev et al, 2005; Goltsev et al, 2009b ;. Strasser et al 2010 ;. Kalaji et al, 2012; Schansker et al., 2011; Kalaji et al., 2012; Zaharieva et al. 1999, 2001; Gaevski and Morgun, 1993; Rottenberg, 1977; Grigoryev et al., 1982 kanë analizuar gjithë maksimumet dhe minimumet e kurbave të induksionit të DF, duke bërë parashikime për lidhjen e tyre me biofizikën e sistemit. Në diskutimet tona ato përmenden kur është e nevojshme.

3.3.2. Analiza e lidhjes midis fluoreshencës së vonuar dhe të shpejtë të klorofilit a

Regjistrimi i njëkohshëm i fluoreshencës së shpejtë dhe të vonuar bën të mundur të krahasohet ndryshimi midis të dy sinjaleve gjatë tranzicionit të induktuar dhe të kuptohen më thellë lidhjet e këtyre ndryshimeve me proceset e fazës së ndritshme të fotosintezës që ndodhin gjatë kalimit të PhSA nga errësira në gjendjen e përshtatjes në dritë (Govindjee and Papageorgiou, 1971, Krause and Weis, 1991, Malkin et al, 1994).

Vështirësia kryesore kur krahasohen kinetikat e tranzicionit PF dhe DF lidhet me faktin se sinjali i matur i DF, në parim, përfaqëson në vetvehte kombinim kompleks nga komponente kinetike të mbivendosura të shpejta dhe të ngadalta, të cilat kanë sjellje të ndryshme gjatë induksionit (Mar et al., 1975).

Komponentët milisekonde DF në temperatura të ulëta dhe të dhomës lidhen drejtpërdrejtë me nivelin redox të P680 dhe QA (Itoh, 1980). Për më tepër, nëse pjesa variable e PF rritet në reduktimin e photoinduktuar të QA (kjo çon në mbylljen e RC të PhS 2 derisa nuk bëhet reoxidimi nga bartësi pasues - QB), atëherë komponentet milisekondë të DF, në të kundërt, shtypen kur qendrat janë të mbyllura. Kështu, mbyllja e fotoinduktuar e qendrave të reaksionit në zonen e milisekonde të kurbës së induksionit çon në ndryshim antiparalel të PF dhe DF - rritje e PF dhe rënie e DF. Përfundim bëjnë periudhat fillestare të induksionit (10 ms e para të ndriçimit).

Përfundime

Rrezatimi i kuantëve të dritës për kohë më të gjatë se FL, quhet fluoreshencë e vonuar. Fluoreshenca e vonuar emetohet nga gjendjet e ngacmuara të molekulave klorofile a të komplekseve antenë të PhS 2 (Jursinic, 1986). Spektrat e emisionit të DF janë të ngjashëm me spektrat e PF klorofile a, duke dëshmuar, se në të dy rastet, emetimi i kuantit ndodh si rezultat i çaktivizimit rrezatues të gjendjes së parë singlete të ngacmuar të molekulave klorofile a, që i përkasin komplekseve antenë të PhS 2.

Rrezatimi i vazhdueshëm i dritës nga bimët në zonat spektrale të fluoreshencës klorofile a përfaqëson në vetvehte fluoreshencë të vonuar dhe është rezultat, jo i absorbimit të drejtpërdrejtë të fotoneve të dritës, por i formimit të gjendjeve të ngacmuara rishtaz të molekulave klorofile.

Nga ana tjetër, ngacmim dytësor i molekulave të klorofilit ndodh si rezultat i transportit të kundërt (mbrapa) të elektroneve, rekombinimit të ngarkesave në qendrën e reaksionit të PhS 2 dhe transferimin pasues të energjisë nga qendra e reaksionit të klorofilit të ngacmuar P680* në klorofile të antenës (Arthur and Strehler, 1957).

Mundësia teorike e formimit të gjendjeve të ngacmuara rishtaz CHL* dhe rrezatimi i kuantëve DF është e lidhur me kthyeshmërinë e reaksioneve të transportit të elektroneve në fazën e ndritshme të fotosintezës.

Në errësirë objekti fotosintetik paraprakisht i ndriçuar rrezaton DF, intensiteti i të cilës zvogëlohet për një kohë të gjatë sipas kurbës komplekse shumëkomponenteshe, e cila në shumicën e rasteve mund të përshkruhet si një funksion polieksponeencial.

Ashtu si PF e klorofilit a dhe DF në mënyrë karakteristike ndryshon intensitetin e saj gjatë ndriçimit me dritë të vazhdueshme të objekteve fotosintetike, paraprakisht të përshtatura në errësirë.

Kinetika e induksionit e DF përfaqëson në vetvehte një funksion kohe shumë të komplikuar poli - fazor, që kalon nëpër disa maxime dhe minime të njëpasnjëshme dhe pas 2-3 minuta ndriçim me dritë FAR arrijn nivel stacionar.

Ende nuk ka nomenklaturë të pranuar gjithësisht për përshkrimin e pikave karakteristike të DF gjatë kohës së tranzitimit të induktuar, dhe nuk ka interpretim unik të mekanizmave të formimit të maximeve në IC.

Në punimin tonë i kemi përmbajtur nomenklaturës së propozuar nga Goltsev et al.

Regjistrimi i njëkohshëm i fluoreshencës së shpejtë dhe të vonuar bën të mundur të krahasohet ndryshimi midis të dy sinjaleve gjatë tranzicionit të induktuar dhe të kuptohen më thellë lidhjet e këtyre ndryshimeve me proceset e fazës së ndritshme të fotosintezës që ndodhin gjatë kalimit të PhSA nga errësira në gjendjen e përshtatjes në dritë.

3.4. MATJE E SHPËRNDARJES SË DRITËS ME GJATËSI VALE 820 nm

3.4.1 Ide të përgjithshme mbi MR820

Kur ndriqohen objekte fotosintetike të përshtatura në errësirë reaksionet fotokimike në RC fotosintetike çojnë në formimin e formave të oksiduara të klorofileve të qendrave të reaksionit $P700^+$ në PhS 1 dhe $P680^+$ në PhS 2. Molekula e oksiduar $P680^+$ ka reaktivitet të lartë dhe në kushte native reduktohet shpejtë nga donori sekondar i elektronit në PhS 2 (bartësi Z-161 - mbetje tirozine e proteinës D1 të RC). Shpejtësia e reduktimit të $P700^+$ është relativisht e ulët, për rezultat mund të krijohen përqendrime të konsiderueshme të formave të oksiduara të klorofilit në RC PhS 1. Oksidimi i klorofilit çon në zbehje të bandave në rajonin e 700 nm, dhe në rritje të absorbimit të dritës në zonen infra të kuqe të spektrit dhe shfaqje në spektrin diferencial të shiritave (banda) të gjera pozitive rreth 820 nm (Hiyama and Ke, 1972, Ke, 1973; Klughammer and Schreiber, 1991; Hoch, 1977). Në indet e gjetheve zbehja e klorofilit rreth 700 nm është në sfondin e absorbimit të fortë në këtë zonë të masës së mbetur të pigmentit, gjë që vështirëson regjistrimin e sinjalit diferencial. Rritja e përthithjes në zonat e 820 nm regjistrohet më lehtë, e cila paracakton mundësinë e përdorimit të sinjalit $\Delta 820$ nm për vrojtim të reaksioneve oksido-reduktuese në PhS 1 në objektet fotosintetike in vivo (Oja et al., 2004; Schansker et al., 2005). Teknikisht, sinjali regjistrohet në gjethe duke matur dritën e transmetuar nëpërmjet objektit ose të reflektuar nga objekti. Në të dy rastet, formimi i transportuesve të oksiduar të elektroneve në PhS 1 çon në një rritje të absorbimit dhe zvogëlim të fraksionit të dritës së shpërndarë ose të transmetuar nga objekti.

Në fluorimetrimin M-PEA-2 analiza e sinjalit të fluoreshencës së shpejtë dhe të vonuar të klorofilit a kombinohet me matjen e ndryshimeve të fotoindukuara në shpërndarjen e dritës në $\lambda = 820$ nm. Për rritjen e ndjeshmërisë së sinjalit dhe përmirësimin e raportit "sinjal / zhurmë", një rreze e dritës matëse me $\lambda = 820$ nm modulohet. Rreze difuze e moduluar drite (MR820) paraqitet në raport me nivelin fillestar të dispersionit [MR820 (0)], e cila korrespondon me intensitetin e sinjalit të shpërndarë në momentin fillestar të ndriçimit të objektit me dritë aktive (~ 0.7 ms nga startimi i regjistrimit).

3.4.2 Kurba e induksionit e sinjalit MR820

Në figure 3.4.1 paraqiten tranzitimet induktive të tre sinjaleve. Për rreth 0.5 ms pas fillimit të ndriçimit të objektit me dritë aktive, efikasiteti i reflektimit të dritës infra të kuqe zvogëlohet, për shkak të rritjes së absorbimit të kësaj drite nga indet e gjetheve, shkak për të cilin është shfaqja e formave të oksiduara të plastocianin (PC) dhe P700 në PhS 1 (Oja et al, 2004 ;. Schansker et al., 2005; Strasser et al., 2010). Kinetika e rënies së sinjalit të fotoinduktuar MR820 në 15-20 ms e para pasqyron procesin e oksidimit të donorëve të elektroneve në PhS 1. Në periudhën fillestare të ndriçimit të objektit fotosintetik të dy fotosystemet ngacmohen nga drita aktive e kuqe dhe kryejnë reaksione fotokimike në qendrat e reaksionit. Si rezultat i punës së PhS 2 reduktohen transportuesit në zinxhirin e transportit të elektroneve (QA, QB, PQ) dhe klorofili i oksiduar ($P680^+$) reduktohet me shpejtësi për shkak të oksidimit të molekulave të ujit. Nëse dhurimi i elektroneve të klorofilit të oksiduar nuk është i limituar, përqendrimi stacionar ($P680^+$) në dritë do të jetë jashtëzakonisht i ulët, dhe kjo nuk reflektohet në nivelin e absorbimit të dritës në 820 nm nga objekti. Në PhS 1, situata është disi e

ndryshme, sepse pas një përshtatje mjaft të gjatë të objektit në të errët, pool i transportuesve mes sistemeve (PQ) është kryesisht i oksiduar dhe nuk ka burime të elektroneve për reduktim të transportuesve PC^+ dhe $P700^+$. Prandaj, gjatë disa milisekondave ndriçim do të ndodhë rritje në përqendrimin relativ të bartësve në PhS 1 në gjendjet e oksiduara, që do ndikojë në zvogëlimin e sinjalit të MR820 (figure 3.4.2). 10-20 ms pas reaksionit fillestar fotokimik (PhK) në RC të PhS 2, elektron i transferuar në zinxhirin e transferimit arrin në PC^+ dhe $P700^+$. Kjo çon në rënie të shpejtësisë së zvogelimit MR820 dhe, në 15 - 20 ms ndriçim, kurba e induksionit arrin vlerën minimale, pas të cilës shpërndarja rritet, duke arritur për rreth 200 ms afërsisht nivelin fillestar në të errët. Kështu, gjatë 200 ms-ve të para sinjali i MR820 kalon nëpër dy faza ndryshimi - rënie fillestare (0-20 ms), e lidhur me oksidim të fotoinduktuar të P700 dhe rritjen e mëvonshme (20-200 ms), që pasqyron reduktimin e fotoinduktuar, $P700^+$. Krahasimi i dinamikave të sinjaleve të fluoreshencës klorofile a dhe MR820 tregon, se faza e parë përfundon (minimumi) kur ndodh mbushje e pool të plastoquinones (tranzicioni J-I i fluoreshencës së shpejtë) afërsisht përgjysëm. Faza e rritjes MR820 ndodh njëkohësisht me fazën e tranzicionit të PF, I-P, dhe kjo pasqyron reduktim sekondar për shkak të elektroneve që vijnë nga PhS 2 përmes pool PC (Schansker et al, 2003 ;. Strasser et al, 2010).

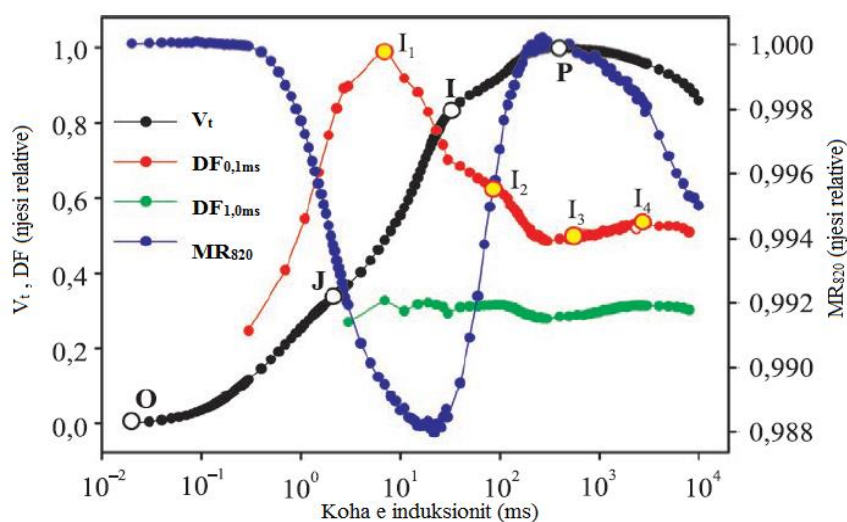


Fig. 3.4.1: Tranzicionet induktive të fluoreshencës variabile relative (V_t , ● paraqitur në shkallën majtë), fluoreshencë e vonuar, matur në dy intervale - nga 20 deri në 90 μs . ($DF_{0,1\ ms}$ ●) dhe nga 0.1 deri 0.9 ms ($DF_{1,0\ ms}$, ●, paraqitur në shkallën e majtë), dhe ndryshimi relativ në shpërndarjen e dritës me $\lambda = 820\ nm$ (MR820, ●, paraqitur në shkallën e djathtë), të regjistruara njëkohësisht në gjethet e fasule të përshtatura në errësirë me anë të fluorimetër M-PEA- 2. Intensiteti i dritës së kuqe ngacmuese është $4000\ \mu moles\ hv \cdot m^{-2}s^{-1}$. Simbolet e zmadhuara tregojnë pikat karakteristike në IC të fluoreshencës së shpejtë dhe të vonuar.

Duke analizuar dinamikën e ndryshimeve të fotoinduktuar në sinjalin MR820, mund të vlerësohet shpejtësia e reaksioneve të oksidimit fillestar të P700 pasuar nga reduktimi i $P700^+$, për të studiuar aktivitetin e PhS1 në mënyrë të pavarur dhe në lidhje me PhS2.

Në figure 3.4.2 kinetika e ndryshimeve në sinjalet e F1 dhe MR janë krahasuar në një shkallë lineare kohore në dy intervale kohe. Në anën e majtë të figurës (në sfond të bardhë) tregohet variacioni i sinjalit MR, lidhur me oksidimin e P700, dhe anën e djathtë në sfond gri - tranzicioni, reflekton reduktim të $P700^+$. Përqendrimi relativ i formave të reduktuara të P700

mund të llogaritet me supozimin se përpara ndriçimit në objektin e përshtatur në të errët të gjithë RC të PhS 1 janë në gjendje të reduktuar, dhe kur arrihet një minimum relativ sinjali MR (15-20 ms ndriçim me dritë të kuqe) - të oksiduar. Me keto supozime, çdo nivel i shpërndarjes së dritës infra të kuqe do të korrespondojë me një raport të caktuar të përqendrimeve P700 në gjendjet e reduktuara dhe të oksiduara. Kjo do të thotë, se sinjali për kinetiken MR820 mund të interpretohet si dinamika e oksidimit të P700 (e para, faza e shpejtë), dhe reduktimi i P700⁺ (e dyta, faza e ngadalshme), figure 3.4.2.

Duke përdorur kendin e pjerrësisë të pjesës fillestare lineare mund të llogaritet shpejtësia maksimale e oksidimit të P700, e cila pasqyron shpejtësinë e reaksionit fillestar fotokimik në RC të PhS 1. Sipas të dhënave të paraqitura në figure 3.4.2, në objektin e ekzaminuar (gjethe fasule) shpejtësia maksimale e oksidimit të P700 - $V_{ox} = 317 \text{ s}^{-1}$. Kjo vlerë reflekton fluksin e ngacmimit, dërguar nga pigmentet e antenës dhe të kapur nga RC, vlerë e ngjashme me TRo/RC në PhS 2. Për krahasim, e llogaritur nga pjerrësia fillestare e kurbës së fluoreshencës, shpejtësia maksimale e rritjes së Fl në PhS 2, barazohet me 445 s^{-1} , që pasqyron përmasa më të mëdha të pigment antenës në PhS 2, se sa në PhS 1.

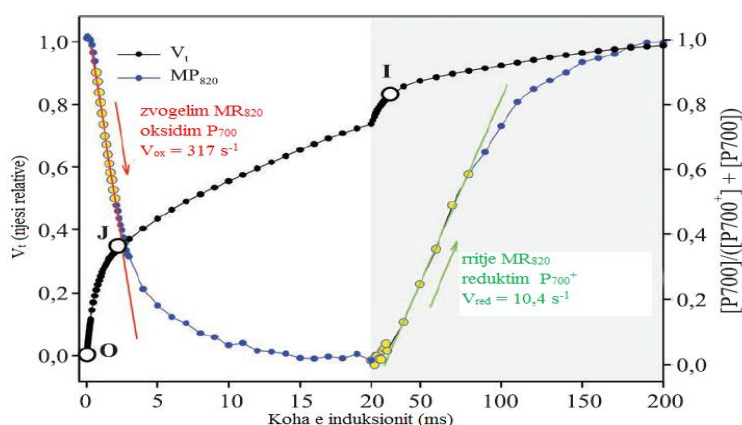


Fig. 7.2: Dinamika e tranzicionit të fotoinduksionit të fluoreshencës relative variabile (V_t , ●) dhe ndryshimi relativ në shpërndarjen e dritës me $\lambda = 820 \text{ nm}$ (MP_{820} , ●), paraqitur në shkallë lineare kohore. Gjysma e majtë dhe e djathtë e grafikut kanë shkallë të ndryshme kohore. Të dhënat - si në figure 3.4.1.

Reduktimi i P700⁺ ndodh, kur shpejtësia e transferimit elektronik nga PhS 2 nëpërmjet PC pool në PhS 1 rrit fluksin e elektroneve përmes PhS 1. Shpejtësia maksimale e reduktimit V_{red} mund të llogaritet nga pjerrësia e pjesës lineare të kurbës së induksionit në fillim të rritjes së saj (shih figure 3.4.2, ana e djathtë). Vlëra e përfutur përcaktohet jo vetëm (dhe jo aq) nga aktiviteti i PhS 1, sa varet nga aktiviteti i PhS 2 dhe zinxhiri i transferimit midis fotosistemeve.

Përfundime

Tre llojet e sinjaleve tregojnë ndryshime karakteristike gjatë ndriçimit të objektit me dritë aktive fotosintetike, të cilat pasqyrojnë proceset dhe reaksionet e fotoinduktuar që rrjedhin në qelizën e bimëve. Krahasimi i dinamikës së tre sinjaleve lejon një interpretim më të besueshëm të të dhënave. Matjet e njëkohshme in vivo të PF, DF dhe MR lejojnë grumbullimin dhe korrelacionin e informacionit plotësues për të tre domenet e transportit

elektronik fotosintetik - ana donore e elektroneve PhS 2, transporti i elektroneve midis PhS 2 dhe PhS 1, dhe ana akceptore e elektroneve PhS 1.

Përparësia më e rëndësishme e aparatit m-PEA është aftësia në një objekt të vëzhgojë njëkohësisht disa karakteristika lumineshente dhe optike: intensitetin e fluoreshencës së shpejtë klorofile, intensiteti i fluoreshencës së vonuar, të regjistruara në kohë të ndryshme relaksimi në errësirë, dhe ndryshime të fotoinduktura në shpërndarjen e dritës së moduluar me $\lambda = 820$ nm.

KREU 4: APLIKIME PRAKTIKE NË STUDIMIN E BIMËVE

Hyrje

Studimi i efektivitetit të aparatit fotosintetik, vlerësimi i gjëndjes fiziologjike të organizmave fotosintetik (bimë të larta - ulliri), reagime të aparatit fotosintetik nën stress, vlerësimi i ndikimit të faktorëve të mjedisit në bimë është bërë në 4 seksione.

Materiali dhe metoda. Materiali – fidanë *Olea Europaea L. Sativa*, “Kalinjot” dhe “Ulliri i hollë i Himarës”, bimë native, kultivarë autoktonë, rritur në natyrë janë marrë nga Instituti i Transferimit të Teknologjive Bujqësore Vlorë dhe janë transferuar në laboratorët e “Biophysics and Radiobiology” department, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Bulgaria, ku janë studjuar. Është prezantuar metoda e matjes së fluoreshencës së shpejtë, të vonuar dhe MR820. Matjet janë realizuar me m-PEA, instrument shumë – sinjalesh. Prezantohet fluorimetri, teknikat dhe kushtet e matjes, përpunimi i të dhënave zhvillimi i eksperimenteve / Protokollet e punës eksperimentale.

Në vijim bëhet vlerësim i gjëndjes fiziologjike të bimës me metodat fluoreshente.

Është bërë karakterizimi i aparatit fotosintetik në gjethe të ullirit, nëpërmjet tranzitimeve të induktuara të PF, DF e MR820 në gjethe të ullirit in-vivo.

Kreu vazhdon me Analizë e reagimit të aparatit fotosintetik në bimët e larta ndaj temperaturës së lartë dhe të ulët, duke përdorur matje të njëkohshme in vivo të fluoreshencës klorofile të shpejtë, fluoreshencës së vonuar dhe reflektim të moduluar në 820 nm. Temperatura është një nga faktorët më të rëndësishëm mjedisor që përcakton funksionimin e bimëve.

Vijon ndikimi i intensitetit të dritës aktinike gjatë induksionit mbi PhSA në gjethe ulliri. Drita është një nga faktorët fizikë kryesorë ekologjikë, që përcakton jo vetëm mundësinë për ekzistencën e bimëve, por edhe gjendjen fiziologjike të aparatit të tyre fotosintetik.

Efekti i kohës së inkubacionit në 40°C mbi PhSA në gjethe ulliri është treguar .

4.1 MATERIALI DHE TEKNIKA E REGJISTRIMIT TË SINJALIT

4.1.1. Materiali bimor

Bima e ullirit, *Olea Europaea*, e studjuar në këtë punim, është një pemë apo shkurre me gjelbërim të përhershëm që rritet në basejin Mesdhetar. Dëshmitë fosile tregojnë se pema e ullirit ka origjinën e saj rreth 20-40 milionë vjet më parë në rajonin oligocen që korrespondon me Italinë dhe pellgun lindor të Mesdheut [20] [21]. Bima e ullirit më vonë u kultivua së pari rreth 7,000 vjet më parë në rajonet e Mesdheut. [20] [22]. Në botë llogariten rreth 865 milionë pemë ulliri (viti 2005) dhe shumica e tyre gjenden në vendet e Mesdheut.

“Origjina dhe ullinjët e vjetër të Shqipërisë - histori e shkurtër Ilirio-Epircote e ullirit:

“Në Epir ose Iliri ulliri ka qenë dhe mbetet... Nje Themel Natyral... Për të gjithë kohrat... Element Peisazhi Pema më e mirë që jep ...Vaj të mirë.... Që lind dhe rrit njerëz të fuqishëm dhe bujar””.

Në Shqipëri ka rreth 4 – 5 milion pemë ulliri produktive, mbi 100 nga të cilat janë në moshë rreth 1000 vjet, ndërkaq shumë drurë të vlerësuar në moshë 1500-3000 vjet, janë të evidentuar.

Pemët e ullirit mund të jetojnë për disa shekuj duke mbetur produktive. Përcaktimi i moshës së ullirit është e vështirë, ajo mund të vlerësohet bazuar në tregues indirekt biometrik si: perimetri në bazën e trungut, koeficienti i rritjes dinamike vjetore, të cilët i afrohen moshës reale. Në gjendje natyrale, ulliri nuk vdes nga mosha, ai ripërtëritet, dëmtohet nga ngricat, lagështia e tokës, luftërat, urbanizimi dhe zjarret.

Ulliri rritet në çdo tokë të ndriçuar mire, toleron mirë thatësinë, pëlqen motin e nxehtë dhe pozicionet me diell, ndërsa temperaturat nën -10 °C mund të dëmtojnë edhe një pemë të pjekur.

Disa karakteristika të bimës së ullirit janë:

- Jetëgjatësia - mosha mesatare 400 vjet,
- Kurora gjelbëron gjatë katër stinëve të vitit – gjethet ndërrohen gradualisht në çdo tre vjet.
- Gjethet janë në pozicion të përkundrejtë, dyshe, ovale të zgjatur, të lidhura fort pas degëzës me një bisht të shkurtër. Ngjyra e gjethëve është e gjelbër e mbyllur në faqen e sipërme dhe e gjelbër e hapur në të argjendtë në faqen e poshtme. Gjethet nga ana e sipërme janë të mbuluara me dyll për zvogelimin e avullimit të ujit në temperatura të larta.

Këtu ne kemi punuar mbi fidanë ulliri të rritur në kushte natyrale në Shqipëri.

Ulliri i hollë i Himarës - është bimë autoktone e krahinës së bregdetit dhe nuk është e përhapur në rajone të tjera. Bima e fuqishme, përshtatet në kushte të vështira. Tip i ngjashëm rritet në Kretë, ku ka disa ekzemplarë në moshë 3 – 5 mijë vjet, të cilët japin produkt, ndërkaq, në mashtab global, ky lloj kultivari është unikal – me kokrra të vogla e të zgjatura, dhe jep cilësi të lartë vaji.

Ulliri Kalinjot - i quajtur edhe si ‘Mbreti i gjithë llojeve të bimës së ullirit dhe të vajit të ullirit’ është autokton në Shqipërinë jugore, kultivari kryesor vendas, zëe mbi 40% të strukturës së mbjelljeve në nivel kombëtar. Në rajonin Sarandë, Vlorë, Fier, Mallakastër zë mbi 80% të strukturës së mbjelljeve. Është kultivar i qëndrueshëm ndaj temperaturave të larta dhe ka qëndrueshmëri mesatare ndaj të ftohtit.

Fidane *Olea Europaea L. Sativa*, “Kalinjot” dhe “Ulliri i hollë i Himarës”, bimë native, kultivarë autoktonë, të rritur në natyrë janë marrë nga Agricultural Technologies Transfer, Vlorë dhe janë transferuar në laboratorët e “Biophysics and Radiobiology” department, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Bulgaria, ku kanë vazhduar rriten dhe të ruhen në temperaturë të ajrit 22-25 °C, ditë/natë mode 12: 12h dhe ndriçim lumineshent me intensitet 250 $\mu\text{mol hv. m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

4.1.1.1 Metoda analitike dhe teknika bashkëkohore për monitorimin e bimëve

Në kushte natyrore bimët janë vazhdimisht të ekspozuar ndaj faktorëve të mjedisit, dhe ndodh që këta faktorë bëhen të pafavorshëm dhe shpesh vlerat jo-optimale kanë të bëjnë jo vetëm me një, por një kombinim të dy e më shumë faktorëve. Produktiviteti i kulturave bimë në kushte reale përcaktohet jo aq nga potenciali i aparatit fotosintetik, se sa nga aftësia e bimës të funksionojë në mënyrë efektive dhe të mbijetojë në kushte të pafavorshme të mjedisit, dhe pikërisht, aftësia e tyre për t’ju përshtatur kushteve të jashtme. Për menaxhimin efektiv të

kulturave, pemtarisë, pyjeve dhe bimësisë natyrore nevojiten mënyra të ndryshme vlerësimi të gjendjes fiziologjike të bimëve, vitalitetin e tyre, si dhe prezenca e forcave për përballimin e stresit. Një aspekt i rëndësishëm në krijimin e bimëve me rezistencë të lartë ndaj kushteve të vështira të mjedisit shfaqen teknikat eksperimentale, që japin mundësi në kushte in vivo të monitorohet gjendja fiziologjike e bimëve dhe të vrojtohet përgjigja e tyre ndaj stresit, si dhe të bëjë vlerësimin e potencialit të tyre për të mbijetuar në këto kushte të pafavorshme.

Aktualisht, egzistojnë një varg testesh fiziologjike për vlerësimin e aktivitetit funksional të bimëve. Këto teste janë përpunuar për qëllime shkencore, por ato janë të aplikueshme në fushën e bujqësisë dhe pylltarisë, si dhe për biomonitorimin e bimësisë në zonat natyrore urbane.

Egzistojnë metoda të ndryshme analitike dhe teknika bashkëkohore për monitorimin e bimëve:

- Imazhe RGB (Berger et al, 2010; Rajendran et al, 2009;): analiza e reflektimit spektral në zonën e dukshme lejon të vlerësohet akumulimi i biomasës dhe shpejtësia e rritjes, ndryshime në përbërjen e pigmenteve.

- Imazhi termal: Thermography në infra të kuqe jep informacion të integruar mbi nivelin e thatësisë në bimë, statusin e tyre ujqor dhe potencialin ujqor.

- Analizë hiperspektrale (Ferreiro-Arman et al, 2006): Bashkëveprimi i rrezatimit diellor në zonën spektrale të dukshme dhe të kuqe të afërt (NIR – Near InfraRed) me strukturën e objektit bimor paraqitet si bazë e analizës në distancë e nivelit të stresit në bimë (eng. *remote sensing*).

- Imazhi NIR (Seelig et al, 2009): Analizë e sinjaleve të reflektuara në zonën infra të kuqe të afërt bazohet në absorbimin e kuantëve infra të kuqe, nga molekulat e ujërave në gjethë.

- Fluoreshenca e klorofil a (Tsimilli-Michael and Strasser, 2008; Strasser et al, 2010; Goltsev et al, 2012 ..): Dinamika e sinjalit të fotoinduktuar është e lidhur drejtpërdrejtë me reaksionet e oksido - reduktimit jo vetëm në PhS 2, por me gjithë zinxhirin fotosintetik të transportit të elektroneve .

Fluoreshenca klorofile a shfaqet një nga metodat diagnostikuese me informacion të lartë, e të shpejtë dhe jo-destruktive për zbulimin dhe vlerësimin sasiqor të dëmtimeve të aparatit fotosintetik si rezultat i stresit ekologjik në bimë (Strasser et al, 2004;. Strasser et al, 2010). Fluoreshenca klorofile a përdoret për të vlerësuar gjendjen e PhS 2 nën veprimin e stresit dritor (Luttge, 2000), të ftohtit (Krause, 1994; Koscielniak and Biesaga-Koscielniak, 1999), temperaturës së lartë (Georgieva and Yordanov, 1993; Srivastava and Strasser, 1997; Bukhov and Carpentier, 2000).

4.1.2 Metodat e matjes të fluoreshencës klorofile

Përthithja e energjisë gjatë ndriçimit të bimëve me dritë ngacmuese shkakton reaksione fotokimike të fotosintezës dhe shoqëruesen e tyre fluoreshencë klorofile në aparatit fotosintetik, ndërsa pjesa e papërthithur e dritës pasqyrohet nga sipërfaqja e gjethes ose shpërndahet në strukturat e brendshme. Matja e FI klorofile kërkon ndarjen e saj nga drita e

shpërndare nga objekti. Për matjen e fluoreshencës klorofile përdoren spektrofleurimetra, në të cilët parimi i matjes bazohet në spektroskopinë e emisioneve. Janë përpunuar disa metoda për matjen e Fl dhe një gamë e gjerë fluorimetra. Metoda matjeje praktike dhe të përdorura shpesh janë regjistrimi i drejtpërdrejtë i Fl dhe fluoreshenca e modular.

4.1.2.1 Regjistrimi i drejtpërdrejtë i fluoreshencës klorofile

Matja kryhet pas përshtatjes së objektit fotosintetik në errësirë (për rreth 20-30 minuta), e cila përcakton "shuarje" të proceseve të fazës së ndritshme të fotosintezës. Si rregull, në errësirë transportuesit e elektroneve në zinxhirin e transportit të elektroneve oksidohen. Më pas prova ndriçohet me dritë të vazhdueshme me gjatësi vale më të shkurtër se 670 nm (e cila arrihet duke përdorur filtra optike ose dioda speciale ose lazera diode). Me futjen e dritës ngacmuese fotodetektor regjistron dritë fluoreshence klorofile në diapazonin e gjatësisë së valeve nga rreth 680 nm deri 760 nm. Nga natyra e kurbës së induksionit të fluoreshencës mund të vlerësohen disa karakteristika të aparatit fotosintetik të provës dhe dinamika e rrjedhjes së reaksioneve fotosintetike (Murkowski, 2002). Në fund të fazës së induksionit të Fl klorofile me ndriçim të pandërprerë të provës, fluorometri mat intensitetin stacionar të fluoreshencës klorofile (F_T) (figure 4.1.1).

Sistemi tipik, i përshkruar më sipër, i matjes së Fl klorofile, quhet sistem me ngacmim të vazhdueshëm (eng. - continuous excitation type chlorophyll fluorescence system) (foto 4.1.1). Ai përbëhet nga një burim i dritës ngacmuese rreth 3500 $\mu\text{mol fotone m}^{-2} \text{s}^{-1}$ me gjatësi vale 650 nm dhe detektori me filtër që lejon të regjistrohet vetëm rrezatimi me $\lambda > 700 \text{ nm}$ (figure 4.1.1). Detektori, regjistruar i Fl klorofile, i transmeton sinjalin përforcuesit, më pas sinjali dixhitalizohet dhe jepet në një mikroprocesor për llogaritjen e parametrave të nevojshme të fluoreshencës.

Metoda e përshkruar përdoret në fluorimetra, të cilët vlerësojnë nivelin e stresit në bimë. Këta fluorometra mund të regjistrojnë dhe analizojnë kurbat e induksionit të fluoreshencës klorofie për një kohë të shkurtër të ekspozimit në dritë, dhe si rregull - deri në 10 sekonda, por matja duhet të kryhet pas përshtatjes në të errët të bimëve (në varësi të natyrës së studimit nga 20 minuta deri në disa orë).

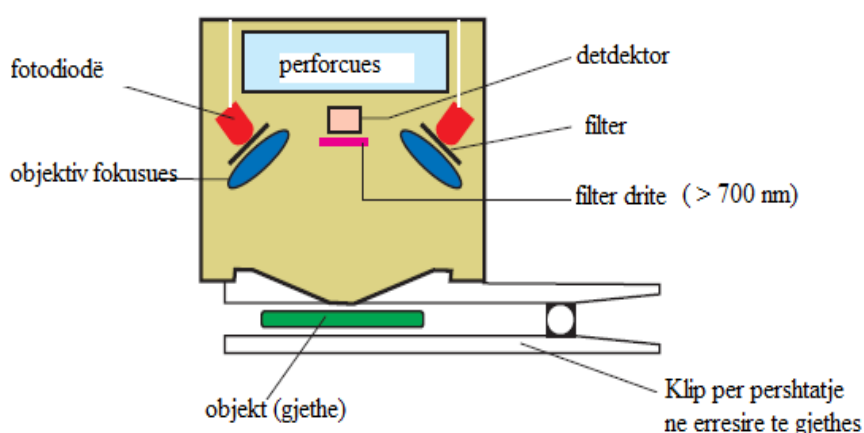


Fig. 4.1.1: Diagramë e kokës matëse të fluorometrit Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., Mbretëria e Bashkuar)



Foto 4.1.1: Fluorimetër (Handy PEA), i cili kryen matje të drejtpërdrejta të fluorescencës klorofile a në kushte natyrore (fushë) (<http://hansatechinstruments.com/products/introduction-to-chlorophyll-fluorescence/continuous-excitationchlorophyll-fluorescence/handy-pea/>).

Gjatë përdorimit të kësaj metode, përkufizohen këta parametra:

- F_0 – fluoreshenca fillestare (zero);
- F_M – fluoreshenca maksimale;
- $F_V = F_M - F_0$ – fluoreshenca e ndryshueshme;
- F_V / F_M – efektiviteti maksimal i PhS 2;
- T_{FM} - koha për arritjen e F_M ;
- PI - Indeksi i produktivitetit të aparatit fotosintetik;
- A_M – sipërfaqja e syprinës mbi kurbën e induksionit të fluoreshences klorofile.

Fluorimetrat bashkëkohorë mund të regjistrojnë parametrat bazë të Fl, të përcaktuara sipas formës së fazës fillestare të kurbës Kautsky. Aparatet e pajisur me burim drite me intensitet të lartë (mbi $2500 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{s}^{-1}$) dhe një fotodetektor me mikroprocesor, të cilët sigurojnë matje të shpejta dhe të sakta (me rezolucion kohor $10 \mu\text{s}$), lejojnë të matet intensiteti i fluoreshencës në kohë të shkurtër, përfshi fazën fillestare të induksionit. Prandaj, fluoreshenca mund të vrojtohet gjatë kohës së reaksioneve fillestare fotosintetike. Një analizë e detajuar e sinjalit të matur (JIP-testi) mund të vlerësojë ndikimin e një sërë faktorësh stresi në bimë (Strasser et al., 2000).

4.1.2.2 Fluoreshenca klorofile a e moduluar

Përdorimi i sistemeve matëse të moduluara të fluoreshencës klorofile PAM (eng. - Pulse Amplitude Modulation) – çoi në revolucion në studimin e këtij fenomeni (Quick and Horton, 1984; Schreiber, 1986). Në këtë sistem për ngacmimin e Fl klorofile përdoret burim, që emeton dritë të moduluar, e cila kyçet dhe çkyçet në intervale kohe të rregullta, dhe detektor, që regjistron vetëm komponenten e ndryshueshme të fluoreshencës së induktuar në provë (figure 4.1.2). Kështu Fl klorofile mund të matet në prani të një burimi aktiv drite shtesë me përbërje spektrale të ngjashme me dritën e Diellit.

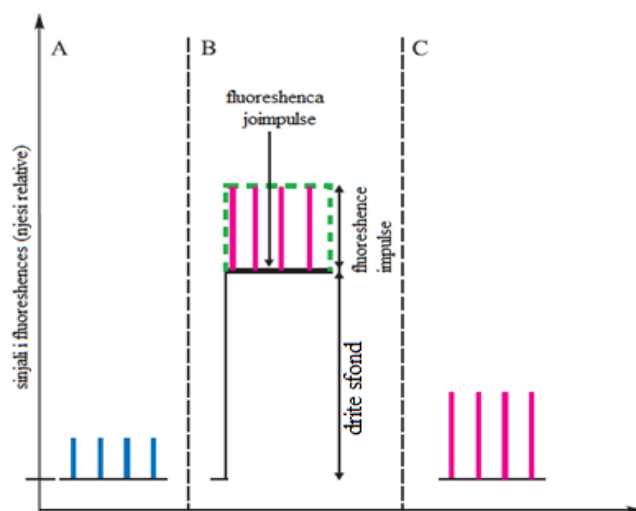


Fig. 4.1.2: Skema përfaqëson sinjalet e drites të regjistruara në detektor në regjime pune të ndryshme: A - sinjal fluoreshent, i regjistruar duke përdorur vetëm dritën e moduluar; B - gjatë ndriçimit të njëkohshëm me dritë aktive dhe të moduluar; C - pas filtrimit të komponentes konstante të dritës aktive - vetëm fluoreshenca, që shoqëron reaksionet fotokimike të klorofilit (Hansatech Instruments Ltd., UK)

Në këtë sistem matje, drita lëshohet për një kohë të shkurtër (1-3 ms), ky interval kohe është i mjaftueshëm për përcaktimin e impulsit të Fl klorofile. Në detektorin e kësaj pajisje bien tre lloje sinjale drite (figure 4.1.2):

- 1) e shpërndarë nga sipërfaqja e objektit dritë aktive (ndriçim i pandërprerë);
- 2) sinjali i fluoreshencës të objektit, dritë e induktuar aktive (sinjal i vazhdueshëm);
- 3) sinjal fluoreshence impuls-induktuar, dritë e moduluar e ngacmuar; pikërisht ky sinjal fluoreshence përforcohet në rrugë elektronike, dhe të tjerat, sinjale jo-impulse, neglizhohen.

Matjet mund të kryhen në gjethe të tëra ose pjesë të tyre, përshtatur në errësirë apo në dritë.

Teknika me përdorimin e PAM-teknologji ofron matje të besueshme të nivelit fillestar të fluoreshencës F_0 , pasi rrezja e dritës që matet ka një intensitet të tillë të ulët që nuk inicion reaksion fotokimik. Në përdorimin e sistemit PAM matja fillon duke përfshirë rreze me impuls shumë të dobët rrezatimi të moduluar, ML (eng. - Modulated Light), i cili shkakton fluoreshencën klorofile (figure 4.1.2). Burimi ML janë dioda dritë - emetuese (LED), të cilat lëshojnë rrezatim në zonën spektrale të kuqe (zakonisht, $\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$). Ky rrezatim është shumë i dobët dhe nuk shkakton procese induksioni në gjethe, kurse ngacmimi i Fl klorofile ndodh kryesisht nga humbjet e energjisë gjatë migrimit të saj nëpër antenë, dhe, rrjedhimisht, kuptimi i tij mund të merret si F_0 (figure 4.1.3). Pas kësaj futet impuls ngopës SP (eng. - Saturating Pulse). Ky është i shkurtër (p.sh., 0.8 sekonda) dhe shumë i fuqishëm, impuls drite, intensiteti i të cilit mund të arrijë deri në $16.000 \mu\text{mol hv} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LED, $\lambda_{\max} = 665 \text{ nm}$). Nën ndikimin e reduktimit gjithë akceptorët në PhS 2 përkohësisht bllokojnë reaksionet fotokimike, rezultat i së cilës është rritja e menjëhershme (shpejtë) e prodhimit të Fl. Intensiteti i fluoreshencës në objektin, paraprakisht përshtatur në errësirë, arrin vlerën maksimale (F_M). Pas zvogelimit të Fl deri në vlerën fillestare të errësirës F_0 , futet drita aktive e vazhdueshme, AL (Aktinich Light), me densitet të caktuar të fluksit fotone fotosintetike

aktive, PFD, (eng. - Photon Flux Density), si rregull - nga 200 deri 500 $\mu\text{mol fotone m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LED, $\lambda_{\text{max}} = 665 \text{ nm}$). Njëkohësisht ka rritje në prodhimin e Fl, e cila arrin vlerën maksimale F_P , karakteristike e intensitetit AL. Gjate disa minutave pasuese, efektiviteti i Fl ulet, duke arritur nivelin stacionar F_T (Murkowski, 2002).

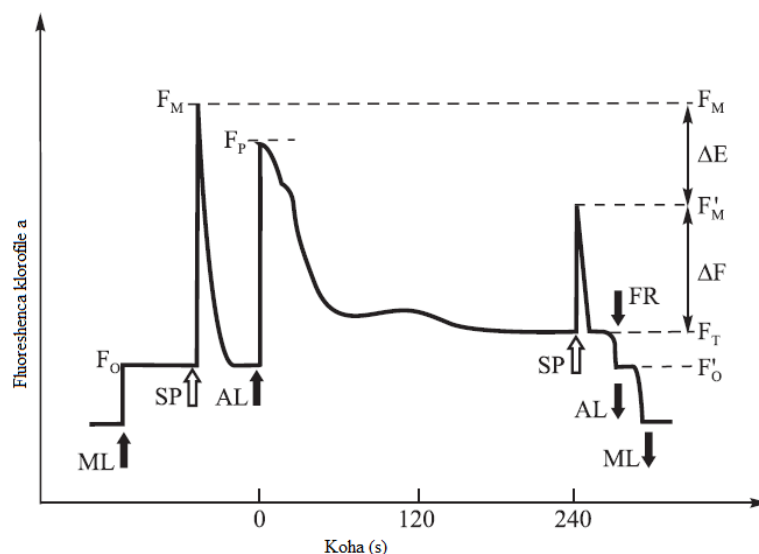


Fig. 4.1.3: Paraqitje skematike e një eksperimenti tipik, për të përcaktuar efikasitetin e fotosntezes, në matjen e fluoreshencës së moduluar (modifikuar nga Murkowski, 2002).

ML –dritë matëse e moduluar;

SP – impuls ngopje;

AL – dritë aktive;

FR – dritë infra e kuqe e afërt

F_0 – fluoreshenca minimale klorofile a në objekte të përshtatura në errësirë;

F_M – fluoreshenca maksimale klorofile a në objekte të përshtatura në errësirë;

F_P – fluoreshenca maksimale klorofile a në dritë aktive ngacmuese;

F'_M – fluoreshente maksimale klorofil a në objekte përshtatur në dritë;

F_T – nivel stacionar i fluoreshencës klorofile a në objekte përshtatur në dritë;

F'_0 – fluoreshenca minimale klorofile a në objekte përshtatur në dritë;

$$\Delta E = F_M - F'_M;$$

$$\Delta F = F'_M - F_T.$$

240 sekonda nga momenti i kycjes së dritës AL futet impuls i dytë ngopës SP, i cili redukton akceptorin e elektroneve të PhS 2 dhe përkohësisht bllokohen reaksionet fotokimike. Nën ndikimin e këtij pulsing vërohet rritje e nivelit të Fl, e cila është më e ulët

se F_M . Diferenca mes F_M dhe F'_M është e lidhur me shuarjen jo-fotokimike të fluoreshencës (Maxwell and Johnson, 2000). Matjet e FI klorofile a, duke përdorur PAM fluorometra sigurojnë vlerësim të shpejtë të efektivitetit të transformimeve energjetike të fotoneve PAR në energji kimike në procesin e fotosintezës në objektet në studim dhe përcaktimin e një varg parametrash të rëndësishëm:

- F'_O – fluoreshenca fillestare, e matur në objekte përshtatur në dritë;
- F'_M – fluoreshenca maksimale;
- $F'_V / F'_M = (F'_M - F'_O) / F'_M$ – efektiviteti maksimal i reaksioneve fillestare fotokimike, në objekte përshtatur në dritën;
- $F_{PhS2} = (F'_M - F'_T) / F'_M$ - rendimenti kuantik i vlefshëm në reaksionet fotokimike në PhS 2 në dritë;
- $q_P = (F'_M - F'_T) / (F'_M - F'_O)$ – shuarje fotokimike;
- $q_N = (F_M - F'_M) / (F_M - F_O)$ – shuarje jofotokimike;
- $ETR = F_{PhS2} \times 0,50 \times PPFD_a = 0,84 \times 0,50 \times PPFD_a$ – shpejtësi e transportit linear të elektroneve (këtu $PPFD_a$ do kuptohet si shpejtësia e absorbimit të dritës nga prova, e shprehur në $\mu\text{mol hv m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4.1.2.3 Matja e fluoreshencës klorofile a

Fluorometrat për matjen e fluoreshencës klorofile a janë dy lloje.

1. Të tillë që punojnë në bazë të ngacmimit të vazhdueshëm të objektit.

Këta fluorimetra lejojnë të maten parametrat kryesorë të fluoreshencës klorofile a (F_O , F_M , T_{FM} , A_M , PI) dhe prodhueshmëria maksimale e aparatit fotosintetik të bimëve (F_V / F_M). Në mjedise pune të errësuar, e përshtatshme është përdorimi i llambave që rrezatojnë dritë të gjelbër. Shikimi i njeriut është më i ndjeshëm në të gjelbër, ndërkaj drita e gjelbër nuk aktivizon procesin e fotosintezës në bimë.

2. Fluorimetra që punojnë sipas sistemit i cili mat dritë impulsive të moduluar. Këta fluorimetra lejojnë matjen e fluoreshencës klorofile a, si në rastin e parë, pas përshtatjes në të errët të bimëve, ndërkaj jepet mundësi edhe për matje në dritë (pa përshtatje paraprake të bimëve në errësirë). Në këtë rast, përcaktohen parametra shtesë të fluoreshencës klorofile a, të tilla si F_S , F'_M , F'_O , ϕ_{PhS2} , $\Delta F / F'_M$ (rendimenti kuantik), q_P , q_{NP} , NPQ , ETR , PAR dhe temperatura.

Fluorimetrat që tregëtohen mundësojnë matjen e fluoreshencës klorofile të objekteve fotosintetike në kushte natyrore dhe laboratorike.



Foto 4.1.3: Sistemet M-PEA-1 dhe M-PEA-2 lejojnë matjen e njëkohshme të fluoreshencës së klorofilit a të PhS 2, aktivitetit të P700. M-PEA-2 gjithashtu bën të mundur matjen e fluoreshencës së vonuar dhe sasinë relative të klorofilit (<http://www.hansatech-instruments.com>)

Në gjeneratën e fundit të fluorimetrave, përshembull M-PEA-2 (Hansatech Instruments, UK, foto 4.1.3), bëhet matja e sinjalit të fluoreshencës klorofile a, emetuar nga PhS 2, në kombinim me përcaktimin e aktivitetit të P700 (me ndihmën e dritës së moduluar në gjatësi vale 820 nm) dhe fluoreshencës së vonuar e madje edhe përmbajtja relative e klorofilit (Goltsev et al., 2009b; Strasser et al., 2010).

4.1.2.4 Matjet e njëkohshme të fotosintezës dhe intensitetit të fluoreshencës klorofile a

Aparate më të avancuara bëjnë matjet e njëkohshme të fotosintezës dhe intensitetit të fluoreshencës klorofile a, në të cilat përcaktimi i shpejtësisë së fotosintezës (bazuar në matjen e përqendrimit të oksigjenit apo të dioksidit të karbonit) kombinohet me aparatet për matjen e fluoreshencës klorofile a. Kjo jep mundësi për një përshkrim më të plotë të procesit të fotosintezës, ku matja e shpejtësisë së fiksimit të dioksidit të karbonit në një cikël të Calvin-Benson (ose shpejtësi e çlirimit të oksigjenit) kryhet në të njëjtën kohë me regjistrimin e parametrave të Fl klorofile. Matja e asimilimit të CO₂ jep informacion në lidhje me reaksionet dhe proceset në fazën e errët dhe të ndriçuar të fotosintezës, ndërsa evolucioni i oksigjenit është i lidhur vetëm me fazën e ndritshme, rrjedhimisht, edhe në këtë rast është e mundur të krahasohen rezultatet e analizës gazometrike me efektivitetin e reaksioneve fotokimike në fazën e ndritshme të fotosintezës (Hunt, 2003).

Në punimin tonë nuk kemi përdorur aparat të tillë dhe nuk është realizuar matje e fotosintezës.

4.1.2.5 Avantazhet dhe disavantazhet e metodave fluorimetrike

Studimi i karakteristikave strukturore dhe funksionale të objekteve fotosintetike, bazuar në matjen e fluorescencës së klorofilit a, ka disa avantazhe ndaj metodave të tjera biokimike ose fizike.

1. Matjet mund të kryhen në kushte natyrore, ato nuk kanë një efekt shkatërrues në strukturën e objektit.
2. Mundësohet kryerja e hulumtimeve në terren, sera ose laboratorë.
3. Aftësia për të kryer kërkime mbi gjethe dhe pjesë të tjera të gjelbra të bimës (kercell, lekure, vesh dhe fara të papjekura), në inde e kultura qelizore.
4. Kohëzgjatja relativisht e shkurtër e matjes (nga disa sekonda në disa minuta).
5. Kostoja relativisht e ulët e matjeve dhe disponueshmëria e llojeve të ndryshme të instrumenteve.
6. Mundësia për të kombinuar disa teknika në një instrument për matjen e njëkohshme të karakteristikave të ndryshme në një objekt bimor.
7. Metoda jashtëzakonisht e lartë informative.

Megjithatë, duhet të kihet parasysh se procesi, nga i cili varet kinetika e fluoreshencës klorofile a, kryesisht kufizohet në reaksionet e vrojtura në fazën e ndritshme. Kështu, parametrat e marra nuk pasqyrojnë plotësisht efikasitetin e fotosintezës, si një e tërë dhe rezultatet duhet të analizohen në lidhje me të dhënat e tjera, si matjet e shpejtësisë së evolucionit të oksigjenit apo asimilimit të dioksidit të karbonit (Krause and Weis, 1991; Reigosa, 1997). Matja e fluoreshencës klorofile a mund të përdoret për të vlerësuar efektivitetin e proceseve fotokimike, por nuk zëvendësojnë matjen e intensitetit të procesit të fotosintezës.

Korrelacionet ndërmjet intensitetit të transportit të elektroneve në PhS 2 (vlerësuar në bazë të matjes së Fl klorofile) dhe fiksimit të CO₂ në kushte të caktuara eksperimentale nuk janë gjithmonë të kënaqshme, ndonjëherë ekzistojnë disa dallime në mes tyre (Genty et al, 1989; Edwards and Baker, 1993; Fryer et al .1998; Maxwell and Johnson, 2000). Kjo është për shkak të marrëdhënies konkurruese midis procesit të asimilimit CO₂ dhe proceseve të tjera si fotorespirimi, metabolizmi i azotit dhe transporti i elektroneve të energjisë së lartë të oksigjenit (reaksioni Meller).

Proceset e ndryshme fiziologjike në bimë dhe strukturat anatomike të lidhura me to kanë shkallë të ndryshme ndjeshmërie ndaj stresit. Aparati fotosintetik, në veçanti struktura e PhS 2, konsiderohet jashtëzakonisht e ndjeshme ndaj streseve të ndryshme. Duke përdorur metodat e matjes së klorofilit a, është e mundur të regjistrohen ndryshimet e hershme të reaksioneve që ndodhin në aparatin PhS nën ndikimin e stresit, përpara se simptomat e tjera të bëhen të dukshme.

4.1.3 Metoda për regjistrimin e fluoreshencës së vonuar

Në vitin 2008, Hansatech Instrument Ltd. prodhoi versionin e parë komercial të aparatit për regjistrimin e DF, m-PEA, i cili lejon regjistrimin e njëkohshëm mbi një objekt të tre sinjaleve - PF, DF dhe MR 820.

Për të regjistruar IC të DF, nevojitet të përdoret ndriçim periodik cikle alternative dritë - errësirë. Gjatë ndriçimit, mund të matet intensiteti i PF (Zaharieva and Goltsev, 2003), dhe

kur çkyçet drita, DF fillon të matet pas një intervali të shkurtër kohe (10 μ s - 1 ms, në varësi të pajisjes që përdoret), në mënyrë që të shmanget mbivendosja e PF në detektorin DF.

Vështirësia kryesore në regjistrimin e DF lidhet me intensitetin jashtëzakonisht të ulët të saj. Ndërkaq për të ngacmuar DF, objekti fotosintetik duhet të ndriçohet me dritë me intensitet të lartë. Në një rast të tillë, drita e shpërndarë nga objekti mund të shmanget nga sinjali i regjistruar me anë të filtrave. Por njëkohësisht me DF objekti rrezaton PF klorofile a, intensiteti i të cilës është disa rreth më i lartë nga i lumineshencës dhe spektrat e të dy llojeve të luminescencës janë pothuajse identike (Amesz and van Gorkom, 1978; Grabolle and Dau, 2005). Rrjedhimisht, që të mund të ndahen fotonet DF, është e nevojshme të përdoret ndarja në kohë e sinjaleve.

Ndarja në kohë mund të realizohet sipas dy mënyrave:

a) matje e kurbave të shuarjes të luminescencës në të errët, të ngacmuara nga ndriçimi paraprak; në këtë rast, analizohen komponentët kinetike të DF, të lidhura me reaksionet e transferimit të ngarkesës në zinxhirin e transferimit fotosintetik të elektroneve;

b) regjistrimi i IC të DF - ndryshimi në intensitetin e lumineshencës gjatë kohës së kalimit të objekteve fotosintetike nga gjendja e përshtatjes në të errët në gjendjen e përshtatjes në dritë.

Gjatë regjistrimit të kurbave të shuarjes objekti ndriçohet nga një flash i shkurtër (kohëzgjatje e rendit nga nanosekondë deri në mikrosekondë) dritë ngopëse (eng. single turnover flash) dhe regjistrohet rënie e luminescencës në intervalin kohor nanosec. - microsec.-milisec. (Christen et al, 2000; Zaharieva et al. , 2011). Ndriçimi pulsues është shumë komod për studimin e vetive të S- gjendjeve në OEC dhe rolin e tyre në gjenerimin e lumineshencës (Zaharieva et al, 2011 ;. Buchta et al, 2007 ;. Goltsev et al, 1980.). Ndriçim më i vazhdueshëm paraprak i objektit (sec. ose min.) përdoret në regjistrimin e shuarjes së ngadaltë të DF (Hideg et al, 1991 ;. Katsumata et al 2008 ;. Berden-Zrimec et al, 2008). Në këtë rast, ndriçimi i vazhduar siguron "përzierje" të S - gjendjeve OEC, akumulim të "paraardhësve" të ndryshëm të DF dhe energjetizim të membranave tilakoide, dhe kinetika e relaksimit në të errët e DF pasqyron dinamikën e zhdukjes së "paraardhësve" në reaksione të drejtpërdrejta dhe të kundërta (reverse) të transportit elektronik, relaksim të S-gjendjeve shumë të oksiduara dhe shpërndarje e gjendjeve të energjetizuara të membranave tilakoide.

Vëzhgimi i drejtpërdrejtë i kurbave të induksionit të DF është i pamundur për shkak të rendimentit jashtëzakonisht të ulët të tij krahasuar me PF. Regjistrimi i ndryshimeve DF gjatë induksionit bëhet kur objekti fotosintetik rrezatohet me dritë të ndërprerë (intermittent light), në të cilën periudhat e ndriçimit alternohen me intervale errësire; një ndriçim i tillë është kuazi-stacionar. Gjatë periudhës së ndriçuar, drita PAR e absorbuar nga objekti indukon në të procese, që çojnë në tranzicion të PhSA nga gjendja e përshtatjes në të errët në gjendjen e përshtatjes në dritë. Në këtë rast kompleksat antenë PhS 2 rrezatojnë si PF dhe DF, por intensiteti i DF është disa rreth më i ulët, dhe mund të supozohet, se sinjali i matur në periudhën e ndriçuar përfaqëson ekskluzivisht Fl klorofile a. Gjatë periudhës së errët, PF bie shpejt nën nivelin e DF, dhe pas disa dhjetëra nanosekonda pas çkyçjes së ndriçimit, rrezatimi i regjistruar është DF. Intensiteti i sinjaleve të regjistruara PF dhe DF varet nga

kohëzgjatja e ndriçimit të tyre (kurba induksioni), por shpejtësia e rrezatimit të kuanteve DF ulet në mënyrë eksponenciale në periudhën e errët.

Me daljen e M-pea-2 u bë e mundur të krahasohen rezultatet e eksperimenteve në bazë të matjes së DF, kryer në laboratorë të ndryshëm.

4.1.4 Metoda për regjistrimin e shpërndarjes së dritës me gjatësi vale 820 nm

Kur ndriçohen objekte fotosintetike të përshtatura në errësirë reaksionet fotokimike në RC fotosintetike çojnë në formimin e formave të oksiduara të klorofileve në qendrat e reaksionit P700⁺ në PhS 1 dhe P680⁺ në PhS 2. Në indet e gjetheve zbehja e klorofilit në rreth 700 nm është në sfondin e absorbimit të fortë në këto zona të masës së mbetur të pigmentit, gjë që vështirëson regjistrimin e sinjalit diferencial, dhe regjistrohet më lehtë rritja e përrthithjes në zonat e 820 nm, e cila paracakton mundësinë e përdorimit të sinjalit $\Delta 820$ nm për vërtetim të reaksioneve oksido-reduktuese në fotosistemin 1 në objektet fotosintetike in vivo (Oja et al., 2004; Schansker et al., 2005).

Teknikisht, sinjali regjistrohet në gjethe duke matur dritën e transmetuar nëpërmjet objektit ose të reflektuar nga objekti. Në të dyja rastet, formimi i transportuesve (bartësve) të oksiduar të elektroneve në PhS 1 çon në një rritje të absorbimit dhe zvogelim të fraksionit të dritës së shpërndarë ose të transmetuar nga objekti.

4.1.5 m-PEA, instrument shumë – sinjalesh

Përparësia më e rëndësishme e aparatit m-PEA është aftësia në një objekt të vëzhgojë në të njëjtën kohë disa karakteristika lumineshente dhe optike: intensitetin e fluoreshencës së shpejtë klorofile, intensiteti i fluoreshencës së vonuar, të regjistruara në kohë të ndryshme relaksimi në errësirë, dhe ndryshime të fotoinduktura në shpërndarjen e dritës së moduluar me $\lambda = 820$ nm. Tre llojet e sinjaleve tregojnë ndryshime karakteristike gjatë ndriçimit të objektit me dritë aktive fotosintetike, e cila pasqyron proceset dhe reaksionet e fotoinduktura që rrjedhin në qelizën e bimëve. Krahasimi i dinamikës së tre sinjaleve lejon një interpretim më të besueshëm të të dhënave. Matjet e njëkohshme in vivo të PF, DF dhe MR820 lejojnë grumbullimin dhe korrelacionin e informacionit plotësues për të tre domenet e transportit elektronik fotosintetik - ana donore e elektroneve PhS 2, transporti i elektroneve midis PhS 2 dhe PhS 1, dhe ana akceptore e elektroneve PhS 1.

Matjet e fluoreshencës së klorofilit nuk janë absolute. Fluorescenca varet nga intensiteti i dritës dhe reagimi i bimës në kushtet e reja të ndriçimit. Shumë nga parametrat fluoreshent që shpesh përdoren për krahasim, janë raporte. Prandaj është e rëndësishme që matjet të bëhen në rrethana vërtet të krahasueshme, nëse të dhënat do të përdoren për krahasim. Përdorimi i një fluorometri për të bërë matje është vetëm një aspekt i dizajnit dhe procedurës së mirë eksperimentale.

Nëse Fo dhe Fm nuk përcaktohen me saktësi, të gjitha vlerat e llogaritura do të jenë të pasakta. Përcaktimi i saktë i Fo varet nga dizajni i instrumentit. Pajisja matëse duhet të jetë në gjendje të regjistrojë me shpejtësi sinjalin fluoreshent të shkaktuar nga ndriçimi.

M-PEA përdor sistem të shpejtë të mbledhjes së të dhënave, të aftë për të regjistruar çdo 10 mikrosekonda. Më pas përdoret një algoritëm për të përcaktuar një linjë përshtatjeje më të mirë nëpërmjet pikave të të dhënave të regjistruara menjëherë pas fillimit të ndriçimit.

Është me rëndësi primare që ndriçimi të mos variojë në intensitet gjatë matjes, përndryshe fluoreshenca e F_0 dhe piku do të jenë përcaktuar, duke përdorur nivele të ndryshme të dritës e rrjedhimisht nuk mund të krahasohen.

Ndriçimi duhet gjithashtu të jetë me intensitet të plotë matës përpara fillimit të matjeve, përndryshe pikat e hershme të të dhënave regjistrohen në intensitete të ndryshëm drite. Ky është avantazhi i përdorimit të LED-ve, pasi ato pothuajse ngrihen momentalisht në intensitet të plotë kur ndriçohen.

Në mënyrë që sinjali maksimal fluoreshent i marrë të mund të konsiderohet si F_m , prova duhet të jetë e përshtatur në të errët dhe drita duhet të jetë me intensitet të mjaftueshëm që të ngop bimën, kështu që duke shtuar më shumë dritë nuk do të shkaktojë fluoreshencë të shtuar. Nëse drita nuk është me intensitet ngopës, fluoreshenca do të arrijë vlerën pik, por ky pik nuk do të jetë sinjali maksimal i mundshëm fluoreshent (F_m) dhe nuk duhet të përdoret për llogaritjet e raporteve F_v / F_m . Intensiteti ngopës do të variojë nga lloji në lloj, e me periudhën e përshtatjes në të errët dhe kushtet e mjedisit në të cilat bima rritet. Është e rëndësishme të garantohet që ngopja arrihet duke matur në intensitete të ndryshme drite pas një sërë periudhash të përshtatjes në të errët për të kontrolluar se raporti F_v / F_m nuk mund të rritet duke përdorur nivele më të larta të dritës.

M-PEA arrin intensitete ngopje të dritës deri në $5000 \mu\text{moles hv m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nga një LED e vetme.

4.1.6 Regjistrimi i fluoreshencës klorofile të shpejtë dhe të vonuar dhe shpërndarja në 820 nm. Përpunimi i të dhënave.

Për regjistrimin e PF, DF dhe MR820 përdorëm fluorimeter M-PEA (*Multifunctional Plant Efficiency Analyzer*), prodhuar nga *Hansatech Instruments, Ltd. (King's Lynn, UK)*. Aparati përbëhet nga bllok kontrolli, i lidhur me kabëll me kokë punuese, në të cilën janë përfshirë gjithë burimet dritore dhe detektorët. Objektet ndriçohen me impuls drite, prodhuar nga diode drite (LED) e fuqishme, me gjatësi vale rreth 625 nm, me kohëzgjatje dhe intensitet sipas qellimit të studimit (deri në $4000 \mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), fokusuar mbi një sipërfaqe me diametër 5 mm. Fluoreshenca e rrezatuar kalon nëpër filtër, i cili lejon kalimin e kuantëve me $\lambda \approx 730 \text{ nm}$ dhe regjistrohet nga fotodioda. Fluorimetri është përshtatur për punë me objekte native – gjethë në bimë të larta të pakëputura. Mbajtësja e objektit është një kapëse (clip) plastmasi e lehtë. Gjethja shtrengohet me anë të një plate të zezë elastike mbi hapjen, nëpërmjet të cilës objekti ndriçohet dhe kalon në kuantet e dritës të rrezatuara prej tij. Errësimi i objektit arrihet duke mbyllur hapjen me plate metalike të levizshme. Kapësja (clip) fiksohet me friksion përpara dritares në kokën punuese, duke siguruar izolim drite të objektit dhe fotodiodave nga drita e jashtme e shpërhapur. Koka punuese fiksohet në hapësirë me ndihmë të stativit në pozicion, maksimalisht të përshtatshëm për objektin që studjohet. M-PEA punon plotësisht autonom gjatë kohës së matjes.

Per llogaritjen e parametrave strukture dhe funksional të PhSA nga JIP-test përdoren vlerat e PF në pikat e saj karakteristike (figure 4.1.4):

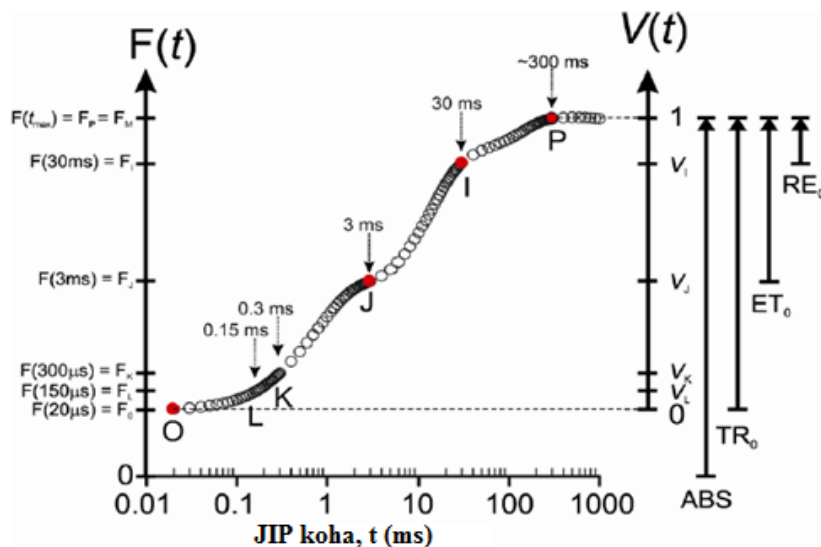


Fig. 4.1.4: Kurba e induksionit të fluoreshencës së shpejtë ($F(t)$) regjistruar nga aparati m-PEA në ndriçim 1s me dritë ngopëse. Shkalla kohore është logaritmike. Janë shënuar pikat karakteristike sipas nomenklaturës Govindjee dhe kohët, në të cilat shfaqen. Forma e sinjalit rreth L pikes plotësuese përdoret për ndjekjen e transmetimit energjetik (grupimit) midis RC-ve të ndryshme. Shkalla djathtas tregon vlerat e fluoreshencës relative variable ($V(t)$), llogaritur me formulën $(F_t - F_0)/(F_M - F_0)$, ku t është moment i zgjedhur nga induksioni. Kur ky i fundit përkon me fillim faze nga IC merret V_t , V_k , etj. Djathtas janë treguar flukset energjetike (ABS, TR_0 , ET_0 e RE_0) (Govindjee).

Regjistrimi i njëkohshem i PF dhe DF kërkon ndriçim kuazistacionar, d.m.th. alternime të periudhave të ndriçuara dhe të errëta të objektit, gjatë të cilave të regjistrohen dy tipet e sinjaleve. Për marrjen e IC të PF, maksimalisht të ngjashme me kurbën, e cila regjistrohet në ngacmim konstant (të vazhdueshëm) (figure 4.1.6), zvogëlohet pjesa relative e periudhave të errëta. Në fluorimetrimin M-PEA realizohet skema, në të cilën pjesa e intervaleve të errëta nuk tejkalon 1/3 e të ndriçuarave, d.m.th. 25% e kohës së regjistrimit. Në figure 4.1.5 paraqitet regjistrimi i njëkohshem i IC të PF dhe i kurbave në të errët të DF, të regjistruara në intervalin e induksionit 0,3 – 20 ms.

Regjimi Multi mode: Kur vendoset në multi, matjet e DF merren në intervale të rregullta të fazës së errët gjatë matjes së fluoreshencës së shpejtë që rezulton në pika të errëta.

Regjimi Single mode: Kur vendoset në single, M-PEA bën një matje të DF të vetme 5 sekonda në fund të matjes së fluoreshencës së shpejtë pasi është fikur ndriçimi aktinik.

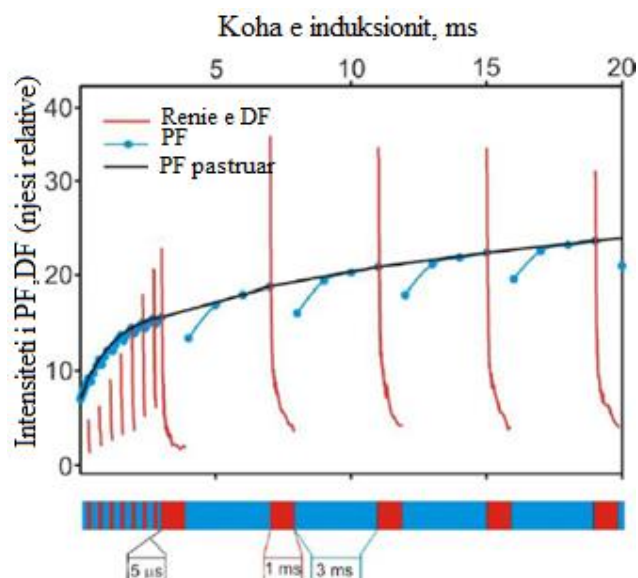


Fig. 4.1.5: Paraqitje grafike e regjistrimit të njëkohshëm të PF dhe DF me aparatit m-PEA. Nën grafik është treguar shkalla kohore e periudhave ndriçuese alternative (blu), gjatë të cilave raportohet PF, dhe periudhat e errësimit (e kuqe), që lejojnë regjistrim të relaksimit të DF. Kalimi mes regjistrimit të dy sinjaleve bëhet në interval ndërmjetes prej 5 μ s.

Njëkohësisht me regjistrimin e fluoreshencës klorofile të shpejtë dhe të vonuar M-PEA mund të regjistrojë ndryshimet në shpërndarjen e dritës së modular me $\lambda \approx 820$ nm (MR 820). Ato regjistrohen në regjim special (*reflection mode*). Drita rrezatohet nga fotodiode (LED), pas të cilës pjesë nga ajo shpërhapet nga objekti dhe regjistrohet në fotodiode. Sinjali përforcohet, dixhitalizohet nga konvertor analog-shifror dhe bashkë me të dhënat nga PF dhe DF regjistrohet në kujtesën e aparatit. Pjesa e dritës së shpërhapur zvogëlohet gjatë ndriçimit të njëkohshëm me dritë aktinike, e cila është rezultat i akumulimit të transportuesve të oksiduar P_{700}^+ dhe PC^+ , të cilët perthithin pikërisht në 820 nm. Kjo metodë jep mundësi për ndjekje të drejtpërdrejtë të gjendjes redoks të PhS 1.

Raportimi i sinjaleve të PF, DF dhe MR820 në fillim të regjistrimit (deri në 300 μ s) bëhet në çdo 10 μ s. Në periudhat e mëpasme të kinetikës së induksionit, kur ndryshimet bëhen më të ngadalshme, frekuenca rrallohet dhjetë herë (në 100 μ s, në 1 ms, 10 ms, e më tej deri në 10 s për periudha 30-300 s). Rradhitja (sequence) dhe kohëzgjatja e periudhave të regjistrimit të PF, DF dhe MR820, si dhe numri i vlerave eksperimentale për periudhën përkatëse, janë paraqitur në tabelë 4.1.1. Në kolumnën e fundit tregohen ekuacionet e shuarjes (quenching) në të errët e DF.

Tabele 4.1.1: Protokoll kohor i regjistrimit të PF, DF e MR820 me m-PEA me kohë induksioni 300s. (Kollona 6 - i.e. - intervale errësimi)

Interval i kohës së induksionit	PF dhe MR820	DF				
	Regjistr. në cdo	Nr. pikave	Nr. i.e.	Kohezgjatje e i.e.	Nr. i pikave në cdo i.e.	Fitting barazime të reneve në të erret
0-300 μ s	10 μ s	30	-	-	-	-
0.3-3 ms	100 μ s	27	7	100 μ s	9	$L_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + L_2$
3-30 ms	1 ms	27	7	1 ms	36	$L_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + L_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + L_3$
0.03-0.3 s	10 ms	27	27	2.4 ms	50	$L_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + L_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + L_3$
0.3-3 s	100 ms	27	27	24 ms	77	$L_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + L_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + L_3 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_3}} + L_4$
3-30 s	1 s	27	27	240 ms	104	$L_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + L_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + L_3 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_3}} + L_4 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_4}} + L_5$
30-300 s	10 s	27	27	2.4 s	131	$L_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} + L_2 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} + L_3 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_3}} + L_4 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_4}} + L_5$

4.1.7 Zhvillimi i eksperimenteve / Protokolle

Për arritjen e qëllimit - paraqitja dhe aplikimi i metodave fluoreshente për studimin dhe vlerësimin e gjendjes fiziologjike në aparatit fotosintetik - janë definuar detyrat e mëposhtme:

* Karakterizimi i PhSA *in vivo* në gjethe të bimës së ullirit duke analizuar tranzicionet e induktuara të fluoreshencës klorofile të shpejtë dhe të vonuar dhe të shpërndarjes së dritës në 820 nm.

* Ndjekja e ndikimit të intensitetit të dritës aktinike gjatë induksionit mbi PhSA në gjethe të ullirit.

* Vlerësimi i efekteve të temperaturave të larta e të ulta mbi PhSA në gjethe ulliri.

* Efekti i kohës së inkubacionit mbi PhSA në gjethe ulliri.

Janë ndertuar eksperimentet dhe hartuar protokollet përkatëse.

Drejtimi i metodës së regjistrimit dhe parametrat e matjes u vendosën paraprakisht në protokollin e regjistruar në memorjen e aparatit. Protokollin hartohet me ndihmën e programit *M-PEA Plus Protocol Editor*, pjesë e aparatit. Protokollin ngarkohet në bllokun e kontrollit dhe startohet matja. Pas përfundimit të matjes, të dhënat e regjistruara në memorien e aparatit kalohen në kujtesën e kompjuterit dhe trajtohen me ndihmë të *M-PEA Plus Data Analysis Modules*. Ky program jep mundësi për vizualizim të IC të PF e DF, MR820 dhe llogaritjen e

parametrave të JIP-test (Tsimilli-Michael and Strasser 2008). Për analiza dytësore të të dhënave përdoret software i specializuar *M-PEA-dataanalyzer V.5.4*, përpunuar nga “Biophysics and Radiobiology” department, Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski", Bulgaria. Ai jep mundësi për:

- vizualizim të lehtë dhe manipulim të të dhënave nga një ose më shumë eksperimente;
- mesatarizim i të dhënave nga eksperimente të përsëritura;
- marrje e të dhënave dhe kalimin e tyre në tabela elektronike (Excel) ose programe për grafike shkencore (*Sigma Plot, Origin*);
- përpunim numerik plotësues i të dhënave nga kurbat e rënies (shuarjes) në të errët të DF;
- zbërthimin e kurbave të rënies në të errët të DF në komponentet e veçanta kinetike;
- përllogaritje e parametrave të JIP-test dhe vizualizimi i tyre sipas grupeve të eksperimenteve;
- analizë numerike regressive e kinetikës së sinjalit MR820.

Për marrjen e parametrave të ndryshëm të sinjaleve fluoreshente dhe optike përdoret programi *Microsoft Excel*, dhe për paraqitje të grafikeve – *Sigma Plot*.

Protokollet e përdorur:

1 - PF - 1s 0300 μ E DF-single MR-100

1 - PF - 1s 0500 μ E DF-single MR-100

1 - PF - 1s 1000 μ E DF-single MR-100

1 - PF - 1s 2000 μ E DF-single MR-100

1 - PF - 1s 3000 μ E DF-single MR-100

1 - PF - 1s 4000 μ E DF-single MR-100

2 - PF - 1s 1000 μ E DF-multi MR-100

2 - PF - 1s 2000 μ E DF-multi MR-100

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100 - 5 °C

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100 - 10 °C

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100 - 24 °C

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100 - 30 °C

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100 - 35 °C

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100 - 40 °C

2 - PF - 1s 4000 μ E DF-multi MR-100 - 45 °C

2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 50 °C

2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 55 °C

3 - PF - 180s 1000 μ E DF-multi MR-100

3 - PF - 180s 2000 μ E DF-multi MR-100

3- PF - 180s 4000 μ E DF-multi MR-100

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 5 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 10 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 20 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 25 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 30 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 35 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 40 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 45 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 50 °C

3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 55 °C

4 - 21 Pulses - PF - 0.3s 4000 μ E DF-off MR-100 - 30s - 0 μ E

4 - 21 Pulses - PF - 0.3s 4000 μ E DF-off MR-100 - 30s - 100 μ E

4 - 21 Pulses - PF - 0.3s 4000 μ E DF-off MR-100 - 30s - 300 μ E

4 - 21 Pulses - PF - 0.3s 4000 μ E DF-off MR-100 - 30s - 500 μ E

4 - 21 Pulses - PF - 0.3s 4000 μ E DF-off MR-100 - 30s - 1000 μ E

5 - 20 Pulses - PF - 0.3s 4000 μ E DF-off MR-100 - Dark relaxation after - 10 min 100 μ E

5 - 20 Pulses - PF - 0.3s 4000 μ E DF-off MR-100 - Dark relaxation after - 10 min 1000 μ E

Protokoll 1 –Matje të njëkohshme të IC e PF dhe MR820. Koha totale e matjes 1s. Intensiteti i rrezatimit ndryshon: 300 μ E, 500 μ E, 1000 μ E, 2000 μ E, 3000 μ E, 4000 μ E. DF është në single mode. MR 100 (max). Çdo vlerë është marrë si mesatare e 6 provave në gjethe të ndryshme.

Qëllimi: Ndikimi i intensitetit të dritës aktinike gjatë induksionit mbi PhSA në gjethe ulliri.

Në figure 4.1.6 jepet vizualizim i IC të PF marrë nga Protokoll 1. Koha totale e matjes 1 s. Intensiteti i rrezatimit ndryshon: 300 μE , 500 μE , 1000 μE , 2000 μE , 3000 μE , 4000 μE . DF është në single mode. Gjashtë seri kurbash janë paraqitur, nga një për çdo vlerë të intensitetit të dritës.

Në figure 4.1.7 vizualizim i IC të PF dhe MR 820 marrë nga Protokoll 1. Koha totale e matjes 1 s. Intensiteti i rrezatimit është 4000 μE . DF është në single mode. Dy kurbat e induksionit të matura njëkohësisht janë mbivendosur.

Protokoll 2 – Matje të njëkohshme të PF, DF, MR820. Koha totale e matjes 1s. Intensiteti i rrezatimit është: 4000 μE . Ndryshon temperatura e plastinës metalike: 5, 10, 24, 30, 35, 40, 45, 50, 52, 55°C. Kontrolli: temperaturë e ajrit - 24°C. Matet PF. DF është në multi mode, matje në 4 intervale kohe: (0,01- 0,08) ms; (0,09 – 0,9) ms; (1 – 2,3) ms; (2,4 – 23) ms. Merret MR820. Çdo vlerë është marrë si mesatare e 6 provave në gjethe të ndryshme.

Qëllimi: Efekti i temperaturës në bimët e ullirit studjuar me matjet e njëkohshme të kinetikave të fluoreshencës së shpejtë, fluoreshencës së vonuar dhe reflektimit të moduluar 820 nm.

Në figure 4.1.8 paraqiten pamje nga IC të PF dhe DF. Shihet se kurbat e induksionit të PF për temperaturë 24°C – 45°C ruajnë formën e tyre karakteristike, duke dhënë fluoreshencë me vlera të konsiderueshme. Në temperaturat e larta mbi 45°C vërehet rritje e F_0 dhe rënie e F_M , zvogelim i amplitudes . DF gjithashtu ruajnë format karakteristike deri në 40-45°C, pas të cilës forma priset.

Protokoll 3 – Matje të njëkohshme të PF, DF, MR820. Koha totale e matjes 180s. Intensiteti ndryshon: 1000 μE , 2000 μE , 4000 μE . Matet PF. DF është në multi mode, matur në 6 intervale kohe: (0,01- 0,08) ms; (0,09 – 0,9) ms; (1 – 2,3) ms; (2,4 – 23) ms; (24 – 230) ms; (240 – 2300) ms. Merret MR820. Çdo vlerë është marrë si mesatare e 6 provave në gjethe të ndryshme.

Protokoll 3 – Matje të njëkohshme të PF, DF, MR820. Koha totale e matjes 180s. Intensiteti mbahet 4000 μE . Ndryshon temperatura e plastinës metalike: 5, 10, 24, 30, 35, 40, 45, 50, 52, 55°C. Kontrolli: temperaturë e ajrit - 24°C. Matet PF. MR 820 është 100 (max). DF është në multi mode, matur në 6 intervale kohe: (0,01- 0,08) ms; (0,09 – 0,9) ms; (1 – 2,3) ms; (2,4 – 23) ms; (24 – 230) ms; (240 – 2300) ms. Çdo vlerë është marrë si mesatare e 6 provave në gjethe të ndryshme.

Qëllimi: Efekti i temperaturës dhe intensitetit të dritës në proceset e relaksimit, shuarjes.

Në figure 4.1.9 dhe 4.1.10 jepen vizualizime nga pamja e përgjithshme e kurbave të marra.

Protokoll 4, Protokoll 5

Qëllimi: analizë e proceseve të fluoreshencës së vonuar dhe proceseve të relaksimit (shuarjes).

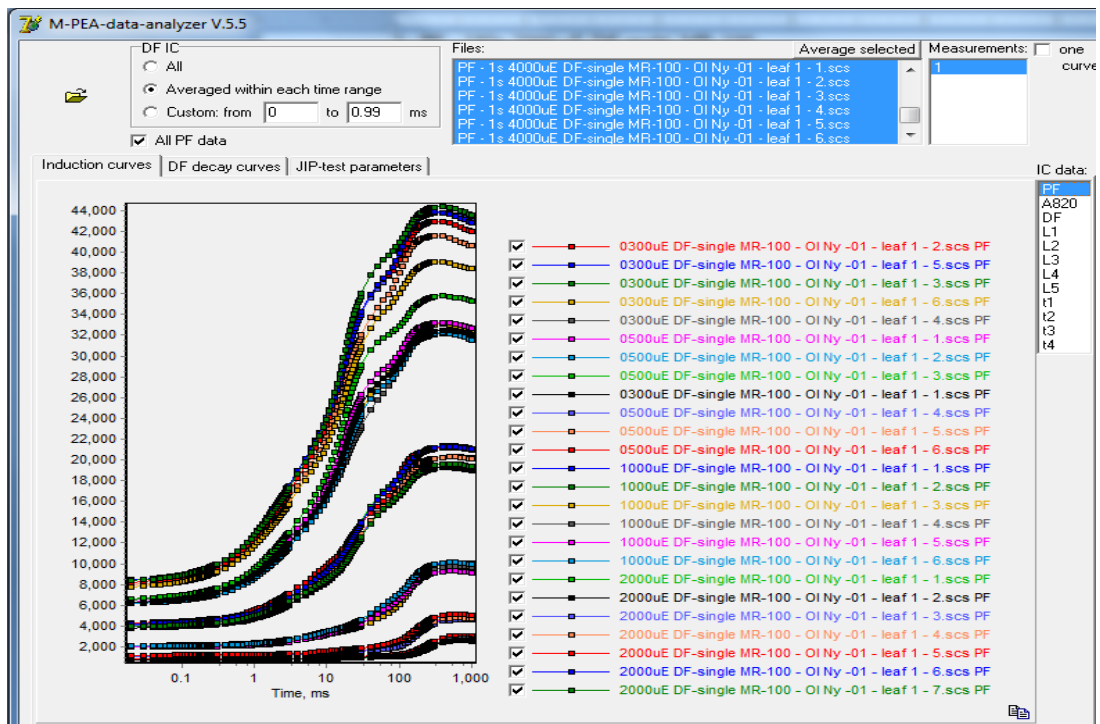


Fig 4.1.6: Vizualizim i IC të PF marrë nga Protokoll 1. Koha totale e matjes 1 s. Intensiteti i rrezatimit ndryshon: 300 μE , 500 μE , 1000 μE , 2000 μE , 3000 μE , 4000 μE . DF është në single mode.

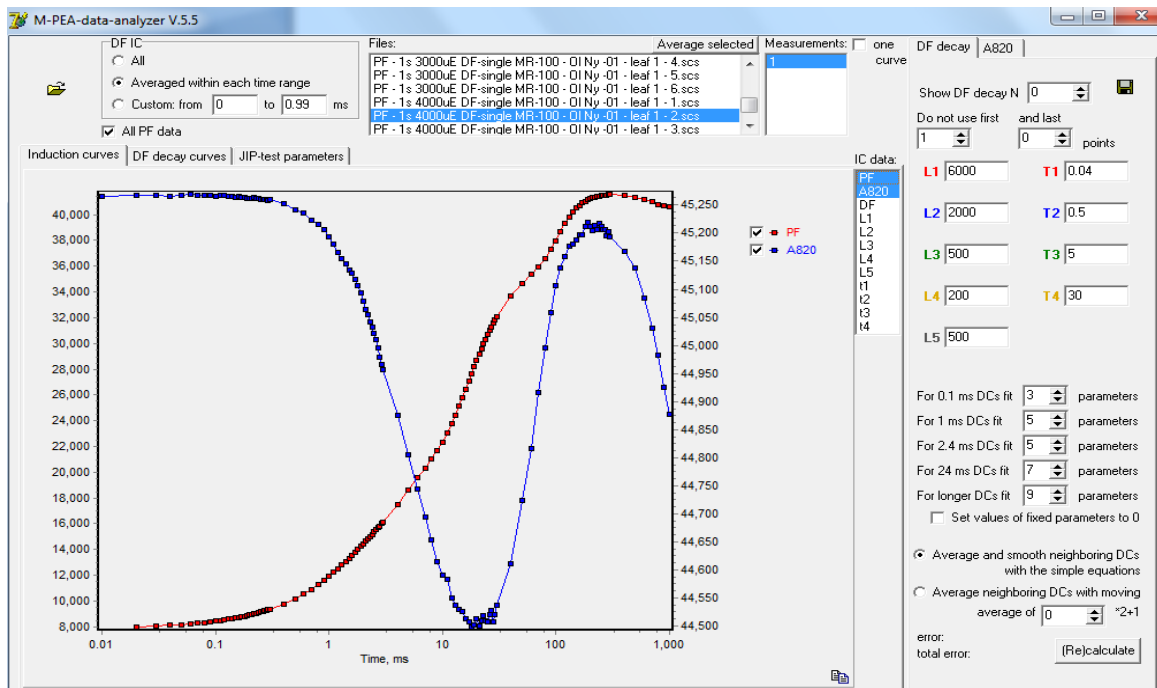


Fig 4.1.7: Vizualizim i IC e PF dhe MR820 marrë nga Protokoll 1. Intensiteti i rrezatimit është maksimali 4000 μE . DF është në single mode.

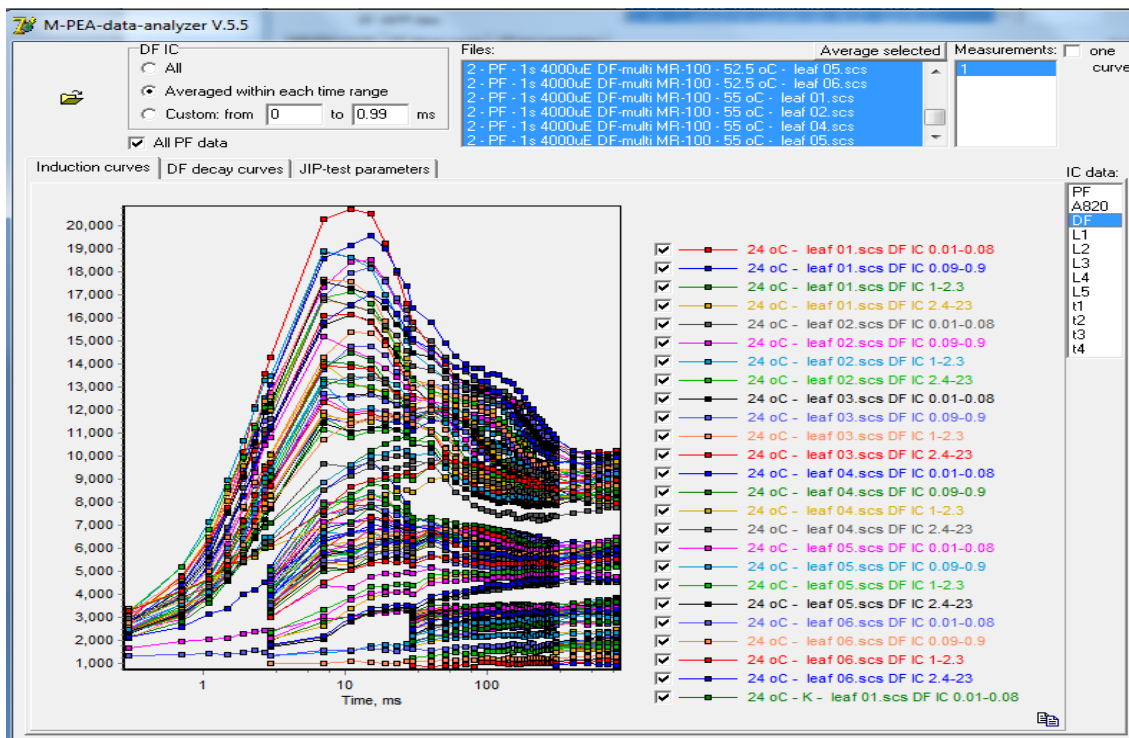


Fig 4.1.8: DF të marra nga Protokoll 2. DF është në multi mode, matur në 4 intervale kohe: (0,01-0,08) ms; (0,09 – 0,9) ms; (1 – 2,3) ms; (2,4 – 23) ms.

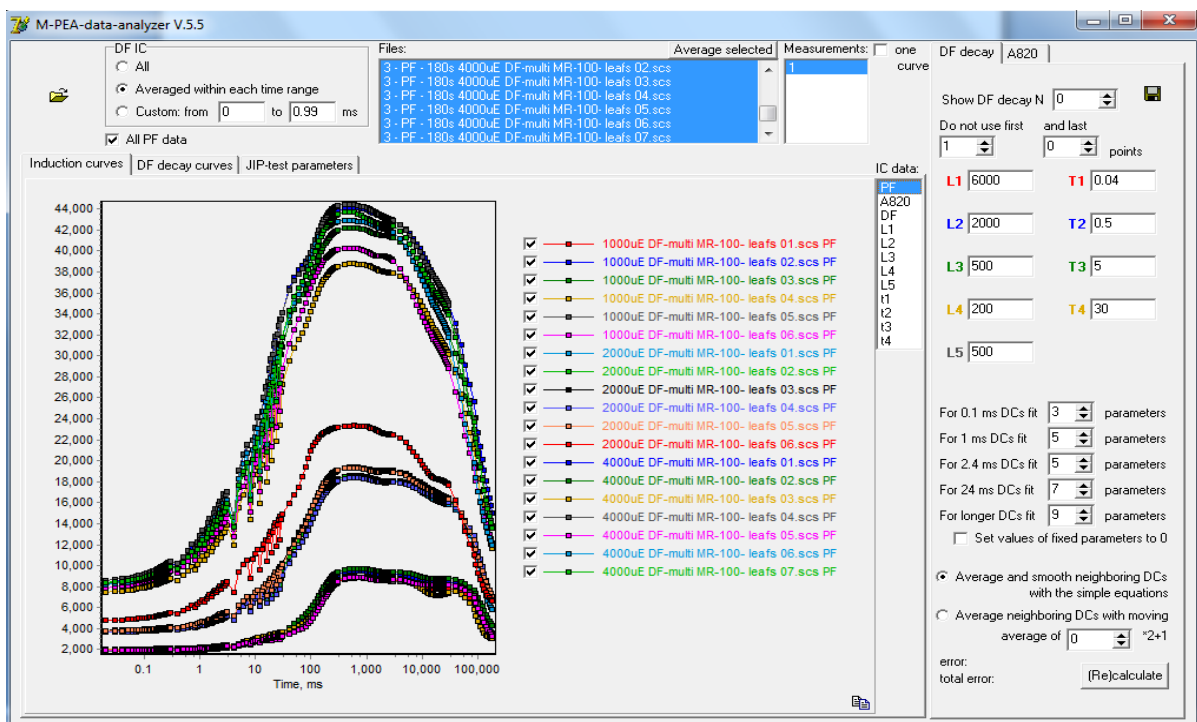


Fig 4.1.9: Vizualizim i IC te PF e marrë nga Protokoll 3. Koha totale e matjes 180 s. Intensiteti ndryshon: 1000 μE , 2000 μE , 4000 μE .

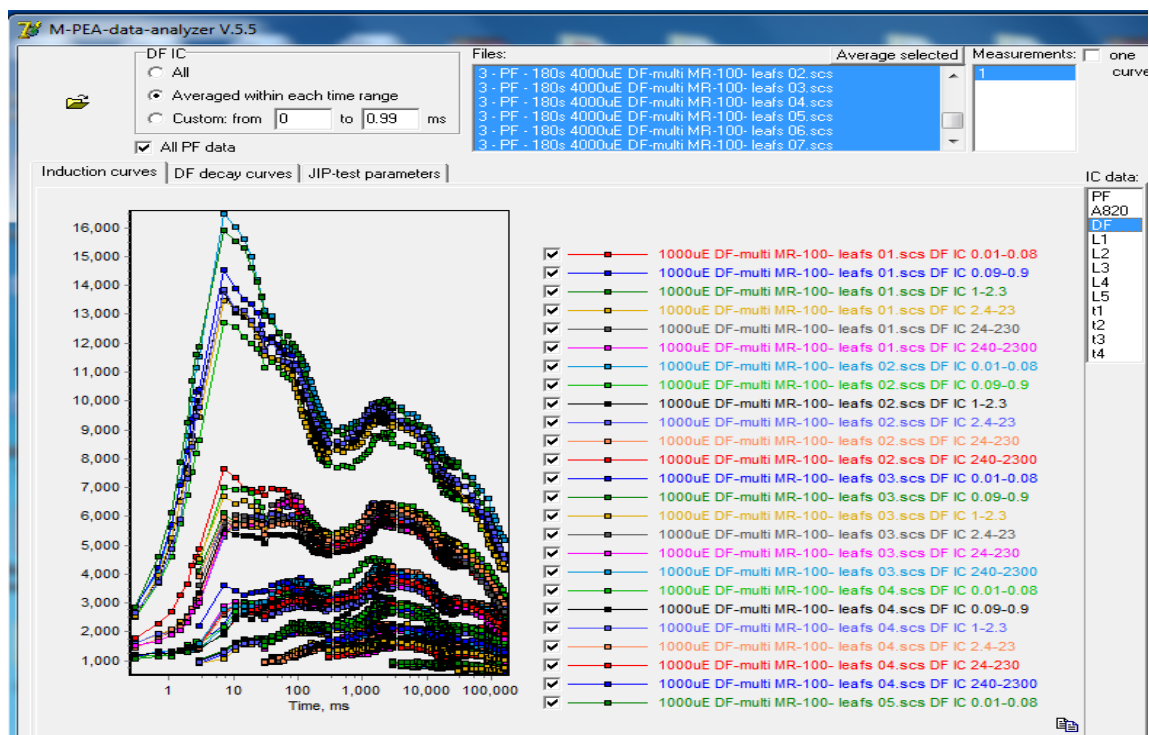


Fig. 4.1.10: Vizualizim i kurbave te DF e marrë nga Protokoll 3. Koha totale e matjes 180 s. Intensiteti ndryshon: 1000 μ E, 2000 μ E, 4000 μ E. Intervalet kohore të matjeve: (0,01- 0,08) ms; (0,09 – 0,9) ms; (1 – 2,3) ms; (2,4 – 23) ms; (24 – 230) ms; (240 – 2300) ms

4.2 EFEKTI I TEMPERATURËS NË BIMËT E ULLIRIT STUDJUAR ME MATJET E NJËKOHSHME TË KINETIKAVE TË FLUORESHENCËS SË SHPEJTË, TË VONUAR DHE REFLEKTIMIT TË MODULUAR NË 820 nm.

Përmbledhje

Reagimi i aparatit fotosintetik në bimët e larta ndaj temperaturës së lartë dhe të ulët analizohet, duke përdorur matje të njëkohshme in vivo të fluoreshencës klorofile të shpejtë, fluoreshencës së vonuar dhe reflektim të moduluar në 820 nm. Segmente të gjetheve të bimës së ullirit janë vendosur në një sipërfaqe metalike në temperaturë 10° dhe 5°C (kërcim në temperaturë të ulët) dhe 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 52.5° dhe 55°C (kërcim në temperaturë të lartë). Ne përshkruajmë qasjet eksperimentale për të studiuar gjëndjen e aparatit fotosintetik dhe mënyrat e studimit të parametrave të rëndësishëm strukturorë dhe funksionalë, si efektiviteti kuantik i fluksit të elektroneve në fotosistemin 2, fotosistemin 1 dhe zinxhirin e transportit të elektroneve midis dy fotosistemeve; përqëndrimi i qendrave aktive të reaksionit të fotosistemit 2; kapaciteti elektronik i zinxhirit të transportit të elektroneve; si dhe parametri total që karakterizon produktivitetin në reaksionet fillestare të aparatit fotosintetik.

Është treguar se temperatura e ulët përkohësisht ul efikasitetin fotosintetik të transportit elektronik, ndërsa temperatura e lartë mbi 40°C nxit proceset e inaktivimit të reaksioneve fotosintetike. Ndjeshmëria ndaj nxehtësisë në vende të ndryshme të zinxhirit të transportit të elektroneve zvogëlohet në rendin e mëposhtëm: (RC e PhS 2) > (QA-PQ-pool) > (PQ.H2-PC-PhS 1 -akceptorë të PhS 1). Ne rekomandojmë metodën e matjes së njëkohshme të fluoreshencës së shpejtë dhe të vonuar të klorofilit dhe reflektimin e dritës në 820 nm në gjethe in vivo me fluorimetrit Multi-Function Plant Efficiency Analyser, për vlerësim të gjëndjes fiziologjike të bimëve dhe informacion të dobishëm në vlerësimin e shkallës së tolerancës së bimës në kushte të ndryshme mjedisore.

4.2.1 Hyrje

Bimët, si sistem termodinamik i hapur, ekzistojnë në kushtet e një mjedisi që ndryshon vazhdimisht. Forca e influencës së jashtme përcakton në masë të madhe dhe efektin përfundimtar mbi organizmin bimor. Influenca të forta të faktorëve biotik dhe abiotik të mjedisit janë të afta të shkaktojnë ndryshime sinjifikative në strukturë dhe fiziologji ose dëmtime të bimëve. Ndërkaq faktorët me intensitet të ulët modifikojnë karakteristikat funksionale variabël të qelizës bimore, duke siguruar efikasitet maksimal të proceseve që rrjedhin në organizma (Strasser et al., 2000). Fotosinteza është procesi energjetik më i rëndësishëm në bimë. Reaksionet fotosintetike janë shumë të ndjeshme ndaj ndryshimit të kushteve të jashtme, prandaj ato mund të përdoren si model për të studiuar reagimin e bimëve. Strasser et al (Tsimilli-Michael and Strasser 2008; Strasser et al 2010;.. Goltsev et al, 2010) kanë përpunuar metodë për të karakterizuar gjëndjen funksionale të sistemeve native bimore (bimë të tëra in vivo dhe in situ), e cila bazohet në studimin e ndryshimeve të fotoindukuara të fluoreshencës klorofile a në indet bimore.

Temperatura është një nga faktorët më të rëndësishëm mjedisor që përcakton funksionimin e bimëve.

Në këtë punim ne ndjekim reagimin kompleks të PhSA në gjethet e bimëve të ullirit ndaj temperaturave të ulëta (10, 5°C) ose të lartë (30, 35, 40, 45, 50, 52,5, 55°C) duke përdorur tre sinjale - PF, DF dhe reflektimin e moduluar MR 820 nm. Ne kemi treguar se matja e njëkohshme e PF, DF dhe MR është një instrument eficient për të karakterizuar influencën e temperaturave në sistemet fotosintetike dhe mund të përdoret si një mjet për të monitoruar këto ndryshime të induktuara në membranat fotosintetike.

4.2.2 Materiali dhe Metoda

Materiali bimor

Në eksperimente janë përdorur fidanë *Olea Europaea L. Sativa*, "Kalinjot" dhe "Ulliri i hollë i Himarës", bimë native, kultivarë autoktonë, të rritur në natyrë, janë marrë nga Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë dhe u transportuan në laboratorët Katedra e Biofizikës dhe Radiobiologjisë, Fakulteti i Biologjisë, Universiteti "Kliment Ohridski" Sofie, ku kanë vazhduar të rriten në temperaturë ajri 22-25 °C, regjim ditë / natë 12:12h dhe ndriçim lumineshent me intensitet 250 $\mu\text{mol hv. m}^{-2}\text{s}^{-1}$, i afërt me ndriçimin ekologjik natyral.

Eksperimentet u kryen me fluorimetër M-PEA (*Multifunctional Plant Efficiency Analyzer*), prodhuar nga *Hansatech Instruments, Ltd (King's Lynn, UK)* mbi gjethe të pakëputura nga fidanë 1 deri në 3 vjeçarë të bimës së ullirit. Bima paraprakisht përshtatet në errësirë për 1 orë. Gjithë eksperimentet janë zhvilluar në ambient të errësuar fort (me intensitet të dritës së shpërndarë $<< 1 \mu\text{mol hv.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), për të mos u dëmtuar gjendja e përshtatjes në të errët të objekteve. Koka punuese e mbajtur nga një stativ fleksibël, pozicionohet në mes të gjethes së pakëputur mbi faqen e sipërme të saj. Përzgjedhja e gjethëve është bërë në drejtim nga poshtë lart. Për çdo kusht eksperimental janë bërë nga 6 matje në gjethe të ndryshme. Me *M-PEA-data-analyzer V.5.4* vlerat janë regjistruar, përpunuar dhe përdorur për analizë dhe vizualizim e përpunim të grafikëve.

Puna me m-PEA

Ndryshimet në karakteristikat e kurbave të induksionit të fluoreshencës klorofile, të shkaktuara nga ndryshimet në temperaturë të objektit, u studjuan duke përdorur një sistem eksperimental (foto 4.2.1), që përfshin një fluorimetër m-PEA, një bllok termostatik, që lejon të ruhet mbi pllakën metalike të punës një temperaturë në intervalin -10°C deri +70°C. Pas një përshtatjeje në errësirë për 1h të bimës së ullirit, segment nga gjethja vendoset në mbajtëse, duke siguruar kontakt me anën e poshtme të gjethes mbi sipërfaqen e pllakës të bllokut termostatik. Temperatura e pllakës rregullohet me saktësi prej +/- 0,1°C. Koka punuese e fluorimetrit, e montuar në një stativ të lëvizshëm, vendoset në njësi. Rezultatet e marra analizohen nga softueri i fluorimetrit m-PEA.



Foto 42.1: Sistem eksperimental për studimin e efekteve të "kërcim temperature" në gjethe.

1 minute pas vendosjes mbi pllakën e termostatit, prova në studim ndriçohet nga një seri 40 impulse drite me intensitet $4000 \mu\text{mol hv. m}^{-2}\text{s}^{-1}$, të alternuara me interval errësire midis impulseve të veçanta. Analizohen tranzicionet e lidhura me kërcim temperature të lartë (nga 24°C në 30, 35, 40, 45, 50, 52,5, 55°C) dhe të ulët (nga 24°C në 10, 5°C). Regjistrohen kinetikat e induksionit të PF dhe DF. Kinetika e shpërndarjes së modular në 820 nm (MR820) merret në ndriçim me dritë të kuqe dhe infra të kuqe, intensiteti i të cilës është maksimali (100%), të cilin aparati m-PEA mund të sigurojë. Intensiteti 100% drite infra e kuqe i përgjigjet afërsisht $700 \mu\text{mol hv.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dritë e kuqe, domethënë ndriçimi infra i kuq është shumë më i dobët.

Për çdo kurbë induksioni të PF llogariten parametrat e JIP-test, rendimentet kuantike të reaksioneve të transportit të elektroneve në qendrën e reaksionit të PhS 2, (ϕ_{PO}), në anën akceptore të PhS 2, (ϕ_{EO}) dhe midis pool plastokinon dhe akceptorëve të PhS 1, (ϕ_{RO}). Llogariten shpejtësi oksidimi të P700, (V_{ox}) dhe reduktimi e P700^+ , (V_{red}) në segmente të marra nga kurbat, që aproksimojnë sinjalin MR820.

Protokolli i matjeve

- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 5°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 10°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 24°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 30°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 35°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 40°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 45°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 50°C
- 2 - PF - 1s 4000uE DF-multi MR-100 - 55°C
- 3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 5°C

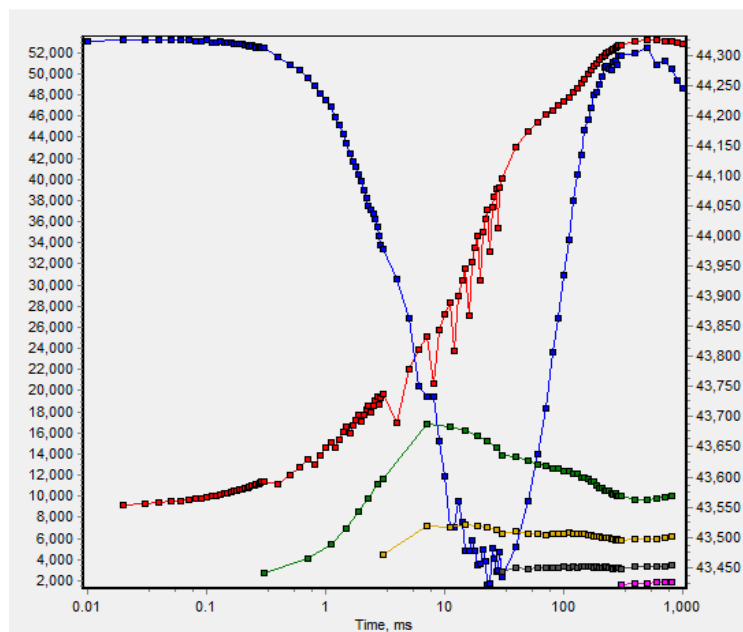
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 10 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 20 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 25 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 30 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 35 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 40 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 45 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 50 °C
3-PF - 180s 2000uE DF-multi MR-100 - 55 °C

4.2.3 Rezultate dhe Diskutim

Qëllimi i studimit ishte të analizohet reagimi i PhSA në bimë të larta gjatë aplikimit të stresit relativisht të dobët, i cili nuk shkakton modifikime strukturore të konsiderueshme, dhe dëmtime të pakthyeshme në funksionet e qelizave. Duam të ndjekim mundësinë e qelizës bimore të ndryshojë karakteristikat e saj, për të siguruar funksionim optimal në kushte të reja të jashtme, të krijuara nga ndryshimi i temperaturës. Vlerësimi i efektit të temperaturave të larta e të ulta mbi PhSA në gjethe ulliri është bërë duke analizuar:

- kurbat e induksionit të fluoreshencës klorofile të shpejtë;
- kurbat e induksionit të fluoreshencës klorofile të vonuar;
- kurbat e induksionit të shpërndarjes së moduluar në 820 nm;
- parametra nga JIP-testi të fluoreshencës klorofile të shpejte;
- parametra të shpërndarjes së moduluar në 820 nm.

a)



b)

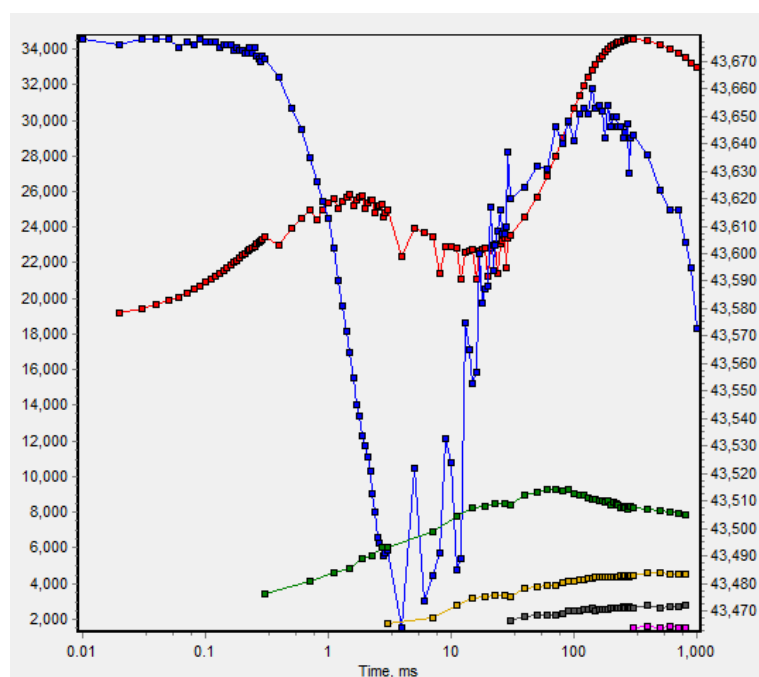


Fig. 4.2.1: Vizualizim nga *m*-PEA-data-analyzer V.5.5 i kinetikave të ndryshimeve të sinjaleve të PF, DF dhe MR820 të marra njëkohësisht në gjethe ulliri në intensitet të dritës ngacmuese $4000 \mu\text{mol } h\nu \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dhe a) në temperaturë 30°C b) në temperaturë 55°C .

Në figure 4.2.1 paraqiten tranzitimet induktive të tre sinjaleve PF (ngjyrë e kuqe), DF (e gjelbër, e verdhë, e zezë, rozë) dhe MR820 (blu) të marra njëkohësisht në intensitet të dritës ngacmuese $4000 \mu\text{mol } h\nu \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. IC janë krahasuar në një shkallë lineare kohore në dy intervale kohe. Shkalla e majtë tregon IC e PF dhe DF (vlera absolute), shkalla e djathtë MR820 (vlera relative) dhe boshti horizontal paraqet kohën e induksionit, kinetikat e

ndryshimeve në sinjaleve të IC e PF, DF dhe MR janë krahasuar në një shkallë logaritmike kohore.

Në figure 4.2.1a) temperaturë 30 °C, IC e PF ruan formën e vet karakteristike – duke kaluar nëpër pikat karakteristike OJIP fazat arrin F_M në 200 ms. IC e MR 820 arrin minimumin në fazën I-P të PF. Paraqiten katër komponente të DF: – IC 0,01 – 0,08 ms; - IC 0,09 – 0,9 ms; - IC 1-2,3 ms; - IC 2,4 – 23 ms. Vihet re se DF ka intensitet jashtëzakonisht të ulët (disa rinde më i ulët se intensiteti i PF), për shkak të vet origjines së këtij sinjali, fakt ky i njohur. K-pik nuk formohet qartë, pasi ky pik shfaqet kur bima ndodhet në kushte stresi. Rezultatet e marra janë klasikisht standartet, kjo pasi 30 °C është një temperaturë që përfshihet në normat ekologjike të rritjes së bimës së ullirit.

Në figure 4.2.1b) temperaturë 55°C, kinetikat e PF, MR820, DF nuk ruajnë formën karakteristike; vlera e F_0 zmadhohet më shumë se 2 herë; vlera e F_M zvogëlohet ndjeshëm; amplituda zvogëlohet, shfaqet K-pik. MR820 arrin minimumin karakteristik shumë shpejtë për kohë 1-2 rinde më të ulët. Influenca mbi kurbat e DF është e dukshme, kanë humbur formën karakteristike dhe janë të inhibuara. Këto kurba karakteristike vlerësimi të gjendjes, vlerat e parametrave të përftuar nga matjet e drejtpërdrejta, parametrat e llogaritura nga të dhënat e matura, flukset dhe rendimentet kuantike dëshmojnë se bima ndodhet në kushte stres temperature, proteinat janë në kufirin e dëmtimeve të pakthyeshme.

Në figure 4.2.2a janë treguar IC e PF (vlera absolute), dhe figure 4.2.2b –Vt (fluoreshenca variabël relative) në intensitet të dritës ngacmuese 4000 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nga vlerat e matura dhe vizualizimet e IC të PF shihet se në interval temperature 5°C deri në 50°C kurbat ruajnë formën karakteristike, e cila prishet në temperaturë 52,5°C - 55°C.

Lëvizja e parametrave me ndryshimin e temperaturës paraqitet në figure 4.2.2a, c, tabele 4.2.2. Në kërcim në temperaturë të ulët nga 24 në 10 °C dhe 5 °C fluoreshenca maksimale, e emetuar nga objekti, në të cilin gjithë qendrat e reaksionit të PhS 2 janë të mbyllura, F_M , rritet me rreth 20%; koha për arritjen e F_M , T_{FM} , rritet; F_0 nuk ndryshon. Një arsye për këtë është se gjatë veprimit të faktorëve me intensitet të ulët modifikohen karakteristikat funksionale të qelizës bimore, për të siguruar efikasitet maksimal të proceseve që rrjedhin në organizma.

Në interval temperature 24°C deri 40°C F_M nuk pëson ndryshime të dukshme, ulet pak në 45 - 50°C, T_{FM} zvogëlohet me rritjen e temperaturës, F_0 nuk ndryshon deri në 50°C.

F_M zvogëlohet me rreth 30% në kërcim temperature të lartë nga 30 °C në 55°C, F_0 rritet, T_{FM} zvogëlohet. Arsyeja për këtë mund të jetë denatyrim i komplekseve pigment - proteina (zvogëlimi i RC/CS₀ - zvogëlimi i numrit të qendrave aktive fotokimike reaksioni të PhS 2, që mund të reduktojnë QA) ose rritje e shuarjes jofotokimike (rritja e shpërndarjes së energjisë si nxehtësi zvogëlon rendimentin e fluoreshencës) për shkak të akumulimit të P680⁺. Fenomeni i fundit ilustruhet lehtë me rritjen e K-pik në temperaturë të rritur (figure 4.2.2a,e). Ky pik vërehet qartë në vet IC të PF në 50°C dhe pikërisht në këtë mënyrë është regjistruar për herë të parë nga Bruno Strasser (Strasser 1997), i cili shpjegohet me dëmtime në strukturën dhe funksionin e sistemit të zhvillimit të oksigjenit.

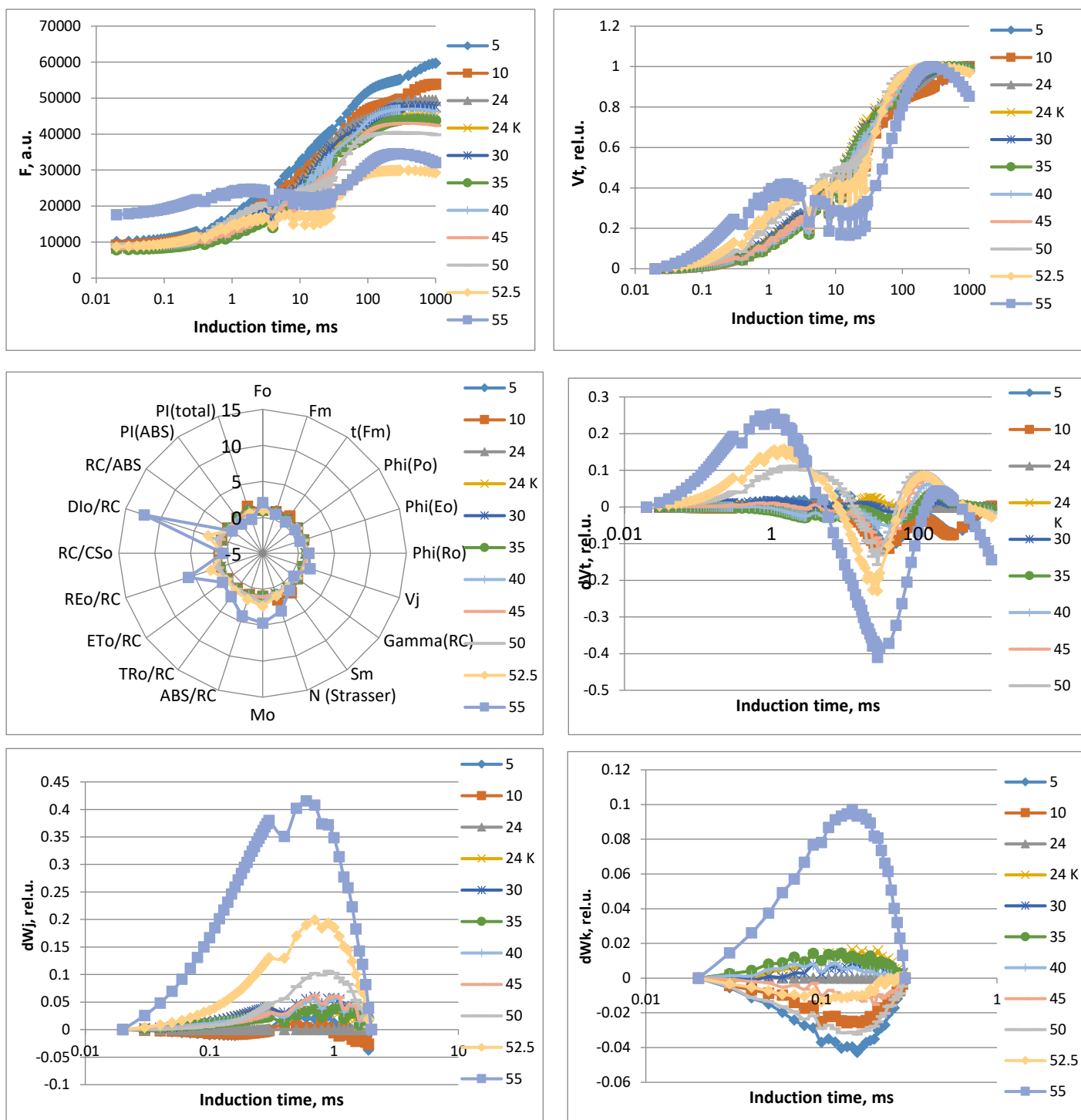


Fig. 4.2.2: Efekti i temperaturës mbi fluoreshencën klorofile në fidanë ulliri. Gjethe ulliri të përshtatura për 1h në errësirë janë vendosur mbi termostatat me temperature të rregulluar nga 5-55°C dhe pas 1min inkubim janë regjistruar kurbat e induksionit të PF në intensitet të dritës ngacmuese $4000 \mu\text{mol hv} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Paraqiten: a) IC e PF, vlera absolute; b) IC e fluoreshencës variable relative (Vt); c) Parametra të JIP-test referuar 24°C; d) Ndryshime në formën e IC të Vt për gjithë periodën e matjeve si sinjal referent është përdorur ai i marrë në 24°C – Vt(24); e) K- pik: ndryshime në format e IC të Vt në intervalin O-J; f) L- pik: ndryshime në format e IC të Vt në intervalin O-K.

Me rritjen e temperaturës rritet dhe shuarja jofotokimike pas P (figure 4.2.2 d). K-pik negative në temperaturat e ulëta lidhet me ET të vonuar në anën akceptore të PhS 2, për arsye të shkëmbimit të vonuar midis QB dhe PQ -"pool", për shkak të difuzionit të zvogëluar të molekulave PQ në TM. Kjo e fundit konfirmohet nga vlerat e larta të J dhe T_{FM} në 5 dhe 10°C (tabele 4.2.1, figure 4.2.2c).

Tabele 4.2.1 Parametra JIP-test

	F_0	F_m	$t(F_m)$	$\phi(F_0)$	$\phi(E_0)$	$\phi(R_0)$	V_i	$\gamma_a(RC)$	δ_m	$N(Stt)$	M_0	ABS/RC	TR_0/RC	ET_0/RC	RE_0/RC	RC/CS_0	D_0/RC	RC/ABS	$PI(ABS)$	$PI(total)$
5	1.175	1.207	1.463	1.006	0.984	1.332	1.088	0.99	1.851	1.899	1.113	1.019	1.025	1.003	1.359	1.155	0.991	0.981	0.903	1.497
10	1.064	1.089	1.439	1.005	1.012	1.416	0.973	1.001	1.791	1.803	0.976	1	1.005	1.012	1.418	1.066	0.977	1.002	1.057	1.866
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24K	0.954	0.919	0.707	0.992	1.006	0.929	0.944	0.934	0.831	0.937	1.063	1.136	1.127	1.142	1.055	0.842	1.179	0.883	0.9	0.792
30	0.979	0.966	0.829	0.997	1.001	1.054	0.985	0.953	0.948	1.027	1.112	1.102	1.098	1.095	1.14	0.882	1.118	0.919	0.989	1.103
35	0.909	0.892	0.732	0.996	1.027	1.111	0.871	0.96	0.913	0.979	0.937	1.079	1.075	1.108	1.198	0.841	1.101	0.927	1.07	1.246
40	0.981	0.948	0.585	0.993	1.017	1.16	0.901	0.94	0.8	0.891	1.003	1.122	1.114	1.141	1.301	0.876	1.16	0.892	0.967	1.194
45	0.944	0.869	0.585	0.982	0.983	1.317	0.993	0.928	0.763	0.858	1.116	1.146	1.125	1.127	1.509	0.825	1.245	0.872	0.791	1.286
50	1.094	0.817	0.383	0.928	0.807	1.331	1.531	0.863	0.652	0.789	1.845	1.303	1.207	1.051	1.741	0.844	1.756	0.771	0.305	0.76
52.5	1.01	0.605	0.456	0.851	0.729	1.484	1.58	0.719	0.84	1.233	2.363	1.743	1.483	1.268	2.577	0.575	2.971	0.576	0.161	0.822
55	2.044	0.699	0.395	0.594	0.459	1.413	1.931	0.382	1.385	3.42	4.705	4.159	2.439	1.885	5.859	0.5	12.3	0.248	0.021	-0.058

Tabele 4.2.2 Rate ox, Rate red

	5	10	24	24 K	30	35	40	45	50	52.5	55
Rate ox	2.82289	2.64386	2.57422	2.53756	2.51393	2.30475	2.67084	2.38838	2.09454	1.61827	1.83319
Rate red	0.01033	0.03996	0.11422	0.12358	0.13323	0.11799	0.08208	0.03268	0.00697	0.00697	0.00697

Shënojmë, se efikasiteti kuantik i reaksionit fillestar fotokimik në P680, $\phi_{P_0} (\equiv TR_0 / ABS = [1 - (F_0 / F_m)] = F_V / F_m$ – rendimenti maksimal kuantik i reaksioneve fotokimike fillestare, $t = 0$, i cili tregon probabilitetin e kapjes së energjisë të fotoneve të absorbuara (ose ngacmimin që migron nëpër antenë) nga qendrat e reaksionit PhS 2 thuajse nuk ndryshon nga 5 në 45°C, që tregon, se në këtë diapazon temperature komplekset e proteinave të RC të PhS 2 janë stabile. Në temperaturë 55 °C ϕ_{P_0} zvogëlohet me rreth 40% , pasi në këtë temperaturë komplekset e proteinave të RC të PhS 2 denatyrohen.

Sipas literaturës më i ndjeshëm është transporti elektronik midis dy fotosistemeve, duke gjykuar sipas $\phi_{E_0} (= ET_0 / ABS = [1 - (F_0 / F_m)] \psi_0 = \phi_{P_0} \psi_0$ - efikasiteti kuantik i transferimit të elektroneve nga QA^- në $t = 0$, ϕ_{E_0} lidhet me PhS 2) dhe $\phi_{R_0} (= \phi_{P_0} \phi_{E_0} \delta_{R_0} = RE_0 / ABS = \phi_{P_0} (1 - VI)$ – rendimenti kuantik i reduktimit të akceptorit fundor të elektroneve në anën akceptore të PhS 1 (RE), ϕ_{R_0} lidhet me PhS 1).Në matjet tona ϕ_{E_0} për të njëjtin interval temperaturash nga 5 në 45°C thuajse nuk ndryshon, për të cilën mendojmë se bima e ullirit është pershtatur si kultivar i qëndrueshëm ndaj temperaturave të larta, sepse temperaturat në diapazonin nga 0 deri ne 50 °C janë të zakonshme për vegjetimin e kulturave bimore në Shqipëri, kështu bimët e ullirit janë të afta ti rezistojnë ndikimeve afatshkurtëra, dhe ka qëndrueshmëri mesatare ndaj të ftohtit. Ndërkaq ϕ_{R_0} nuk ndryshon nga 24 në 40°C, në intervalet 5°C - 10°C dhe 45°C - 55°C vlerat rriten me rreth 40%, qe tregon reagime të

ngjashme në transportin elektronik midis dy sistemeve në dy diapazonet e skajshme të temperaturave.

Një tjetër veçori karakteristike në temperatura dëmtuese (55°C) është shfaqja e vlerës fillestare (F_0) të lartë (figure 4.2.2a, c, tabele 4.2.1). Parametri F_0 paraqitet si indikator i humbjes së energjisë gjatë transmetimit të energjisë së ngacmimit nga antenna në qendrën e reaksionit të PhS 2 (Murkowski, 2002, Baker and Rosenquist, 2004). Vlerat e larta F_0 tregojnë transferim më pak efektiv të energjisë së ngacmimit midis molekulave të pigmentit në antenën dritëmbledhëse të PhS 2 gjatë stresit termik, kur ka dëmtime në thylakoide dhe inaktivim të PhS 2. Rritja e F_0 gjithashtu mund të jetë e lidhur me një rënie në efektivitetin e transferimit të energjisë në qendrën e reaksionit të PhS 2, të shkaktuar nga disocimi i LHC 2 nga bërthama e PhS 2 (Havaux, 1993), apo për shkak të ndarjes së komplekseve antenë nga PhS 2 (Yamane et al., 1997). Duke krahasuar ndryshimet në L-pik (figure 4.2.2f), tendenca e çgrupimit të antenave është e dukshme, madje edhe në temperatura të larta pak të dëmshme. Në temperaturat e ulta, vërehet procesi i kundërt - grupimi rritet, për shkak të fluiditetit të zvogëluar të TM. Vëzhgimet deri këtu tregojnë ndjeshmëri të lartë temperature të PhS 2. Në matjet tona procesi i grupimit vërehet në diapazonet e temperaturave 5°C - 10°C dhe 45°C - 52.5°C.

IC të MR820 japin informacion për varësinë nga temperatura të reaksioneve redox në PhS I. Nga sinjali llogariten shpejtësi karakteristike të oksido - reduktimit (V_{ox} , V_{red}). Amplituda e oksidimit në RC të PhS 1, si dhe koha për arritjen e saj, zvogëlohet me rritjen e temperaturës (figure 4.2.3a). Në përputhje me këtë është rënia e shpejtësisë së oksidimit të P700 (V_{ox}) dhe njëkohësisht rritja e shpejtësisë së reduktimit të $P700^+$ (V_{red}) (figure 4.2.3b, tabele 4.2.2). Duhet shënuar se të dy shpejtësitë ndryshojnë me një rend midis tyre. Varësia e tyre nga temperatura është e ndryshme: nga 5 deri 30°C V_{ox} zvogëlohet shume ngadalë, V_{red} rritet rreth 10 herë më shpejtë krahasuar me V_{ox} ; nga 30 deri 50°C madhesia e V_{red} zvogëlohet me 95%, V_{ox} vazhdon të zvogëlohet rreth 4 herë më ngadalë. Meqenëse V_{ox} pasqyron vetëm reaksionin primar fotokimik në RC të PhS 1, rezulton se kjo e fundit influencohet më dobët nga temperatura në ndryshim nga komponentët e tjerë të zinxhirit të transportit të elektroneve, veçanërisht PhS 2. Realisht inhibimi i PhS 1 fillon vetëm pas 30°C, kurse temperaturat e ulëta nuk kanë ndikim të pafavorshëm mbi të. Rritja e V_{red} është e lidhur me "lëngëzimin" e membranës dhe lehtësimin e difuzionit në transportuesit e ndërmjetëm elektronikë. Pas 45°C dëmtimi i fortë i PhS 2 çon në zvogëlim të V_{red} .

a)

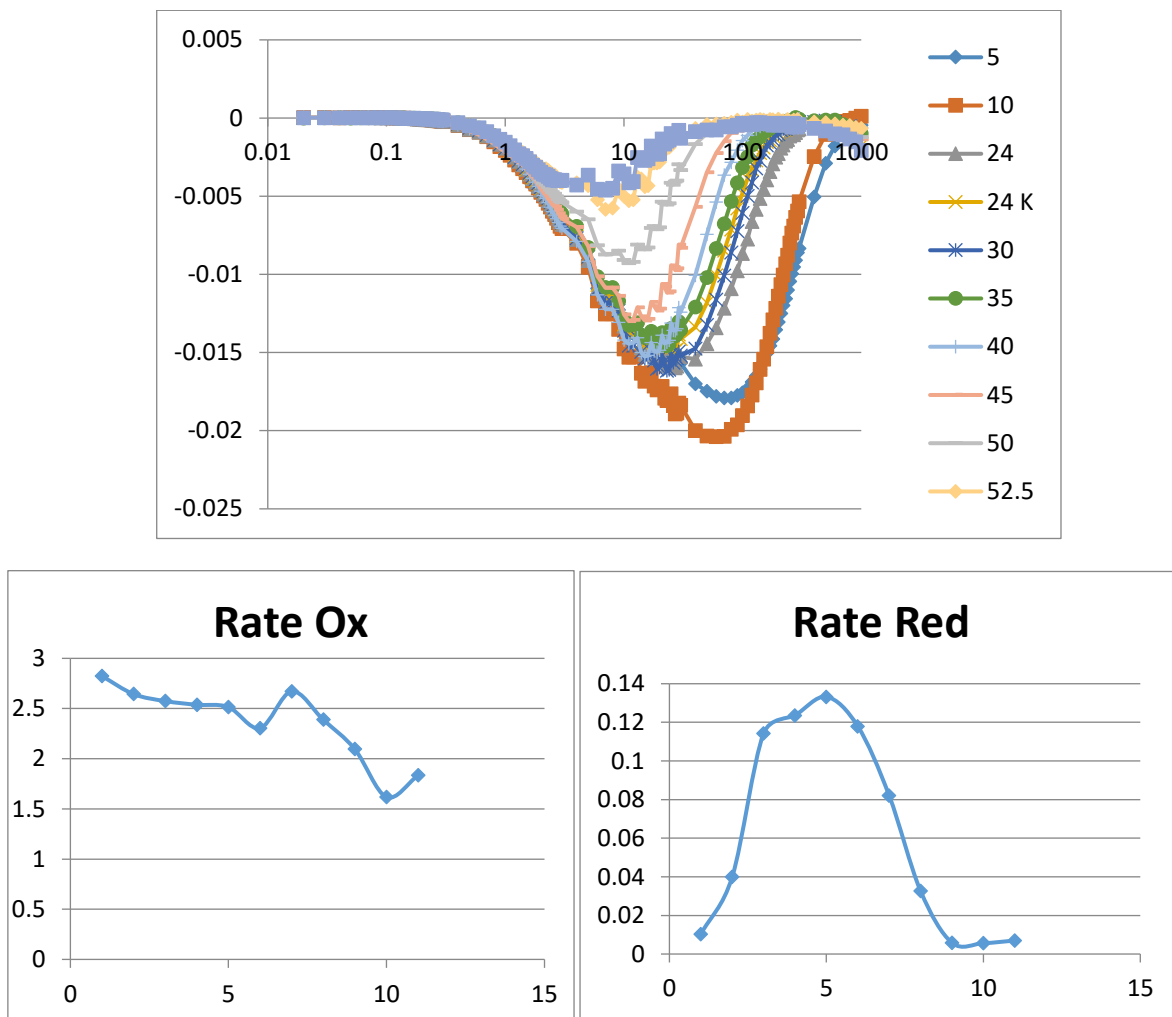


Fig. 4.2.3: Efekt i temperaturës mbi MR820 në gjethë të ullirit. Kushtet eksperimentale janë të njëjta si në figure 4.2.2. Paraqiten: a) IC të MR820 në $4000 \mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dritë e kuqe; b) Shpejtësi oksidimi të P700 (V_{ox}) dhe reduktimi e P700⁺ (V_{red}), të marra nga kurbat, që aproksimojnë sinjalin MR820 nga a) në interval kohe të përcaktuar.

Diferencat në ecurine e Vred gjatë ndriçimeve (ref tabele 4.2.2, figure 4.2.3) të ndryshme shpjegohen me faktin, se në intensitet drite të lartë është e limituar tërheqja e elektroneve nga PQ- "pool" për në PhS 1, kurse në intensitet të ulët i kufizuar është reduktimi i "pool" të PhS 2. Siç u përmend më sipër, kjo e fundit është shumë e ndjeshme ndaj temperaturave të larta.

Ne nuk kemi vërejtur asnjë ndryshim në formën dhe intensitetin e kurbave të PF dhe DF, kur temperatura është rritur në 40°C. Në temperaturë 45 dhe 50°C vërtetëm zvogëlim të amplitudës së kurbës PF dhe ndryshime relative në formën e saj. Në temperaturë 55°C amplituda e kurbës PF zvogëlohet 2.4 herë krahasuar me kontrollin 24°C dhe prishet forma karakteristike e IC.

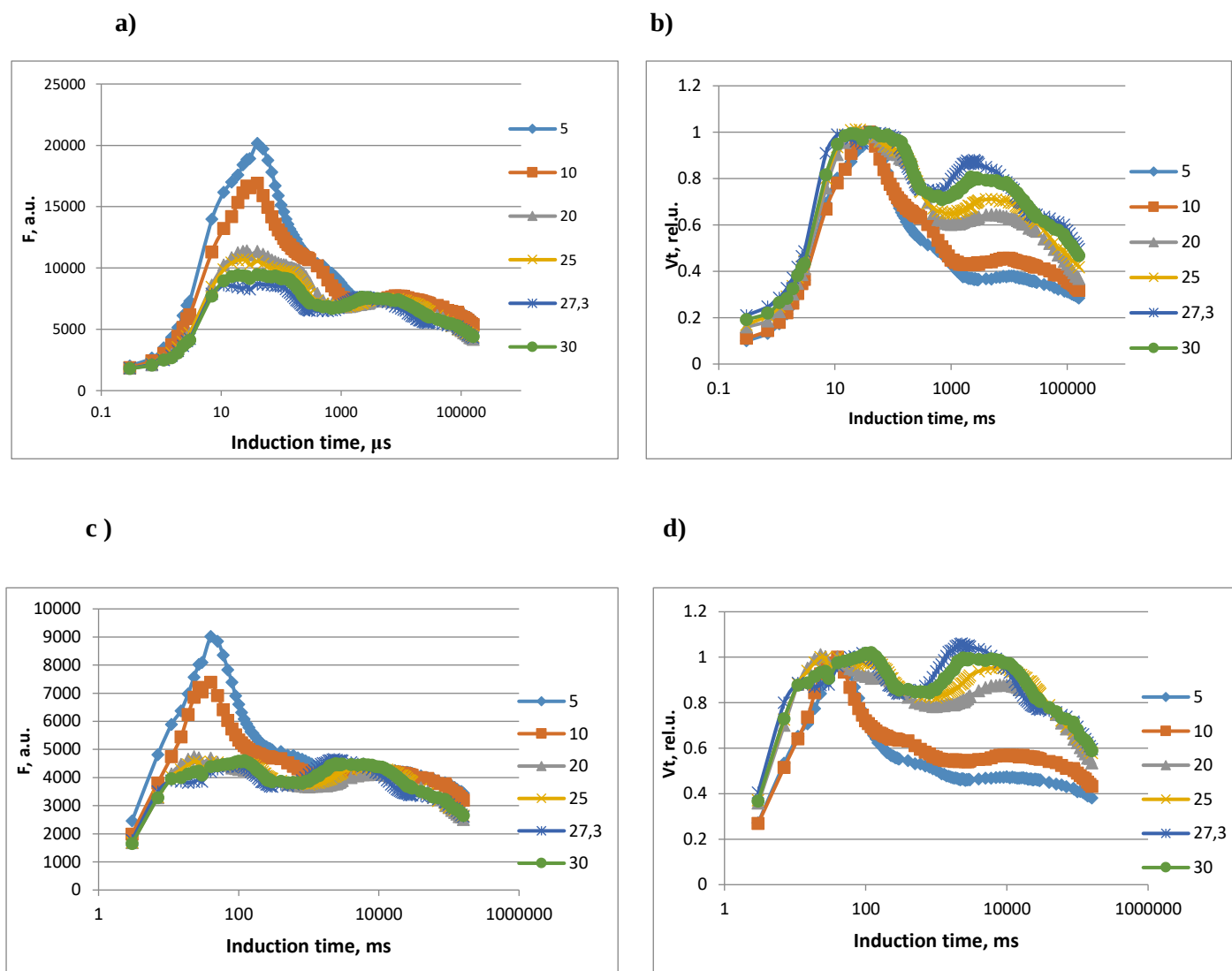


Fig. 4.2.4: Kurbat e induksionit të DF të regjistruara në intervalin 10-100 μ s pas çkyçjes së dritës ngacmuese në varësi nga temperatura. a) DF vlera absolute, microsecond; b) DF variabile relative, microsecond; c) DF vlera absolute, submillisecond; d) DF variabile relative, submillisecond.

Ne kemi vërejtur se kurbat e DF ishin më të prekura se kurbat e PF në temperaturat 25, 30°C (figure 4.2.4 a-d) (ref tabele). Kjo mund të thote që kurbat e DF janë më termosensitive sesa kurbat e PF. Në të vërtetë në këto temperatura kemi vërejtur zvogëlim në amplitudë të kurbës së DF dhe ndryshim në piket I_1 , I_2 dhe I_3 (ref tabele), të marra nga DF10-30 ms, ndërsa janë vërejtur ndryshime të lehta në kurbat e PF. Në temperatura relativisht të larta sinjali i DF bie nën nivelin e vërejtuar të kontrollit. Temperatura akoma më të larta (45, 50°C) çojnë në uljen e rendimenteve në piket në I_1 (7ms) dhe I_2 (100ms), zhdukjen e rënies së DF nga I_1 në I_2 dhe të pikut I_1 në 50°C. Zhdukja e zbritjes midis pikeve I_1 dhe I_2 ndodh paralel me zhdukjen e fazës J-I nga kurba e PF (figure 4.2.1a). Relativja I_2 në fazën e shpejtë të DF rritet dhe induksioni relativ i DF rritet në fazën e ngadaltë. Rritja e DF relative në fazën e ngadaltë mund të lidhet me aktivizimin e ciklit Calvin-Benson. Këto vërtetime raportohen nga Zaharieva et al.,2001 (figure 4.2.1b). Maksimumi I_4 merret paralelisht me uljen e intensitetit të PF. Ketu kemi vërejtur, se I_4 është më pak e prekur nga nxehtësia. Në temperaturë të ulët nga 10 deri në 5°C

vërehen ndryshime në formën karakteristike të IC të DF (figure 4.2.4a,c), rritje të amplitudës (amplituda në 5°C është sa dyfishi i amplitudës në 30°C).

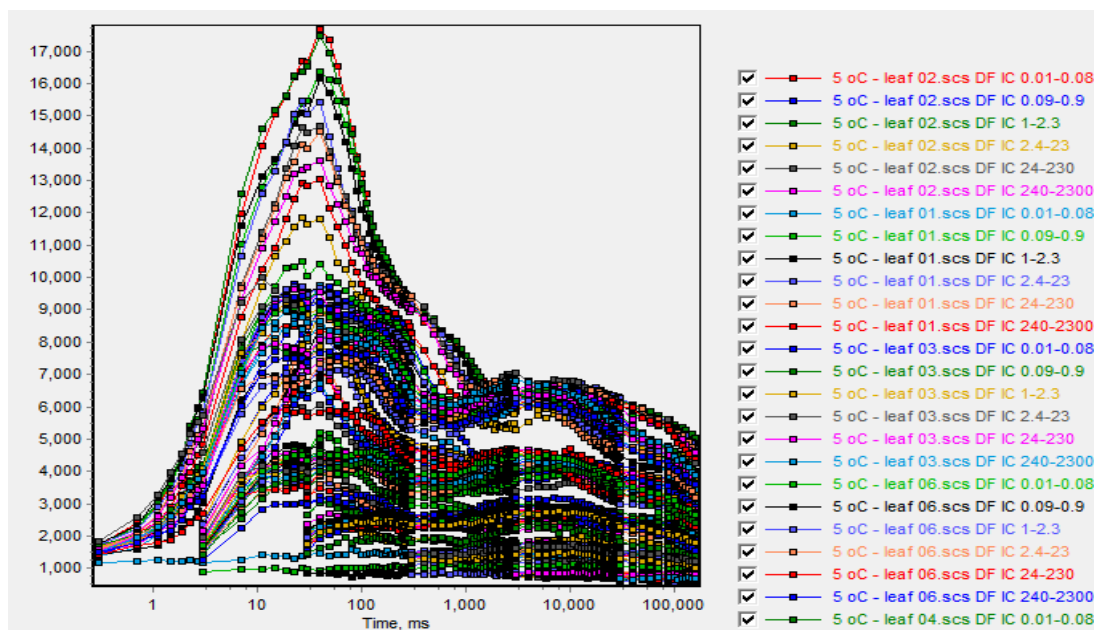


Fig.4.2.5: Vizualizim nga m-PEA-data-analyzer V.5.5 i kinetikave të DF në interval matje 0-099ms, rezultati i mesatarizimit dhe përpunimit të të cilave është paraqitur në figure 4.22.4.

Lidhja eksperiment biofizikë në influenca e temperaturës në organizmat fotosintezues

Për gjykimin dhe për të bërë lidhjen eksperiment biofizikë e PhSA, kemi bërë analiza dhe eksperimente të ndryshme, rezultatet e të cilave i krahasojmë.

Bimët, që rriten në brezin e gjërësive mesatare, u nënështrohen luhatjeve të temperaturës dhe stresit të shpeshtë, shkaktuar nga temperatura të ulëta dhe të larta (McKersie and Leshem, 1994). Në kushte të tilla stres temperature ndryshon ngopja e zinxhirëve të hidrokarbureve të acideve yndyrore në lipidet e membranave dhe viskoziteti i membranave, që mund të ndikojnë në efektivitetin e transportit fotosintetik të elektroneve.

Temperatura e ulët çrregullon funksionin e aparatit fotosintetik (Öquist et al.1987). Vërehet një inhibim i sintezës së saharozës, që çon në reduktimin e reciklimit të fosfatit dhe fosforilimit (Labate and Leegood 1988) dhe vonesa në transportin elektronik fotosintetik (Savitch et al., 1997). Temperaturat e ulëta rrisin probabilitetin e fotoinhibimit (Goodde and Bornman 2004). Gjatë stresit të shkaktuar nga ngrica vërehen ndryshime të parametrave të fluoreshencës klorofile a, të tilla si PIABS, ET/CS, AM(zonës) dhe RC/CS (Rapacz, 2007). Përshtatja gjatë rritjes në temperaturë të ulët lidhet me rregullimin e kapacitetit maksimal fotosintetik (Adams et al., 2001). Ky rregullim përfshin në vetvehte rritje në shpërndarjen e energjisë termike (Demmig-Adams et al., 1996) dhe përmbajtjen e proteinave hidrofobe PsbS, të cilat janë të përfshira në procesin e shpërndarjes së energjisë termike (Li et al., 2000). Kjo çon në rënie të gjenerimit të formave reaktive të oksigjenit, të tilla si peroksid hidrogjeni dhe oksigjeni singlet, gjatë rritjes së bimëve në temperatura të ulëta (Morgan-Kiss et al., 2006).

Toleranca e rritur e bimëve ndaj temperaturave të ulëta sigurohet nga një mekanizëm adaptiv i cili mirëmban fluiditetin e membranave në kufijtë fiziologjik (Morgan-Kiss et al., 2006).

Reduktimi i fluoreshencës nën stres nga temperatura të larta shkaktohet nga dëmtimi i membranave thylakoide dhe zvogëlim i aktivitetit të PhS 2 (Harding et al, 1990 ;. Ilík et al, 2003 ;. Weng and Lai, 2005). Rritja e kohës për arritjen e nivelit maksimal të fluoreshencës (T_{FM}) në kushte të temperaturës së lartë tregon se ka bllokim të transferimit të energjisë nga qendrat e reaksionit në plastoquinonyl (Reigosa and Weiss, 2001).

Stresi i shkaktohet nga temperaturë e larte konsiderueshëm rrit përshkueshmërinë e membranave, dëmton subnjësitë e PhS 2 dhe redukton aktivitetin e çlirimit të oksigjenit si rezultat i dëmtimit të pjesshëm të kompleksit mangan të PhS 2, që çon në kufizimin e transportit elektroneve në anën e donorëve të PhS 2 (indikatori i së cilës është shfaqja e fazës "K" në kurbën induksionit të fluoreshencës).

Dëmtimi i membranave thylakoide dhe rritja e përshkueshmërisë së tyre nuk shkaktohet vetëm nga oksidimi i peroksideve të lipideve të tyre, por edhe i ndryshimeve konformacionale në proteinat e membranave, hapja e kanaleve jonike, ndryshime në bashkëveprimin e lipideve, rishpërndarjen e disa lipideve në membranat thylakoide (Santarius, 1980; Havaux et al, 1996), si dhe formimi segmenteve njëstresore nga faza lipide e membranës (Gounaris et al, 1984 ;. Kota et al, 2002). Shfaqja e K-pik mbi kurbën e induksionit të PF në rastin e bimëve të rritura në temperaturë të lartë, indikon për dëmtim të pjesshëm të kompleksit të evolucionit të oksigjenit (Strasser et al., 2005). Arsyeja e shfaqjes së tij është ndoshta një disbalance mes shpejtësisë së transferimit të elektroneve nga tirozina YZ në klorofilin e oksiduar $P680^+$ në qendrën e reaksionit (RC) të PhS 2 dhe shpejtësia e reoksidimit të QA dhe QB. Duke reduktuar shpejtësinë e reaksioneve të transportit të elektroneve në anën donore të PhS 2, rindarja e ngarkesave mund të çojë në akumulimin e $P680^+$ ose në rekombinimin e shpejtë të tyre (Strasser 1997).

Vlerat e larta të ABS/CS (F_0), të cilat vërehen në temperatura të larta, mund të lidhen me dissociimin e kompleksit të mbledhjes së dritës në PhS 2 (Schreiber and Armond, 1978, Yamane et al, 1997).

Vlerat e ulëta të parametrin F_M në temperaturë të ulët ose të lartë tregojnë se madhësia e "pool" për reduktimin e akceptorëve të elektroneve në PhS 2 (kryesisht QA) është zvogëluar. Efekt i njëjtë i zvogëlimit të vlerës F_M mund të vërehet në rastin e bllokimit të transportit të elektroneve nga qendrat e reaksionit (RC) në "pool" të plastohinon (Schreiber et al, 1989, Hansatech, 2000).

Vijon ta demonstroj me tabele: Stresi i temperaturës së lartë redukton aktivitetin e PhS 2, i cili shihet qarte nga parametrat fenomenologjikë (flukset e absorbuara dhe energjia e kapur nga RC të energjisë si dhe flukset e transportit të elektroneve).

Rezultatet tona tregojnë, se parametri PI(ABS) është indikatori më i ndjeshëm në influencën e faktorëve të ndryshëm të stresit, përfshi dhe temperaturën (Goltzev et al., 2014). Në matjet tona PI(ABS) - indeksi i produktivitetit, tregues i aktivitetit funksional të PhS 2, lidhur me energjinë e thithur, zvogëlohet me rreth 13% kur temperatura rritet nga 24 °C - 45 °C, pas të cilës bie thuajse vertikalisht dhe bëhet 0 në 55 °C.

Ne zhvilluam nje eksperiment te tille: gjethet e bimës së ullirit, pas matjeve në kërcim temperature nga 24 °C ne 50, 55 dhe 60 °C (stress temperature) i lamë të relaksojnë për 24 ore, pas të cilave bëmë karakterizimin e të njëjtit material në temperaturë ajri 24 °C. Rezultatet që morëm tregonin se materiali ishte rikuperuar plotësisht, nuk kishte shenja stresi, parametrat paraqesin proces efikas fotosintetik dhe gjendje normale fiziologjike të provave të marra. Kjo u interpretua: bimët u rezistojnë streseve afatshkurtëra, përshkueshmëria e membranave rivendos gjendjen normale.

4.3.4 Përfundime

Aparati fotosintetik në bimë të larta përgjigjet ndjeshëm ndaj ndryshimeve në kushtet mjedisore. Reagimi kompleks i PhSA të bimëve native gjatë kërcimit në temperaturë, bëhet me drejtim ruajtjen nga dëmtimi dhe përshtatjen funksionale.

Temperaturat në diapazonin nga 0 deri ne 50 °C janë të zakonshme për vegjetimin e kulturave bimore në Shqipëri dhe bimët e ullirit janë të afta ti rezistojnë ndikimeve afatshkurtëra. Njëkohësisht ndryshim i menjëhershëm në temperaturë pas qëndrimit të vazhdueshëm në 24 °C në më të lartë (30-50 °C) ose në më të ulët (10-5 °C) shkakton reagim të komplikuar në PhSA të bimëve, me synim përshtatjen e qelizave të bimëve ndaj kushteve të reja të funksionimit. Duke aplikuar metodën e matjes së njëkohshme të PF, DF dhe MR820, ne ndjekim gjendjen e PhSA në momente të ndryshme, kur vërojmë parametra karakterizues, nder te cilet efektivitetet kuantike të fluksit të elektroneve në PhS 2, PhS 1 dhe në zinxhirin e transportit të elektroneve midis dy fotosistemeve; përqendrimin e qendrave aktive të reaksionit në PhS 2, kapacitetin elektronik në zinxhirin e transportit të elektroneve; parametrin total, që karakterizon produktivitetin në reaksionet fillestare në PhSA.

Nëpermjet parametrave të JIP testit ne analizuam reagimin stresant të PhSA në ndryshim të menjëhershëm të temperaturës në gjethë të fidanëve të ullirit dhe studjuam dinamikën e kalimeve, të induktuara nga kërcimi në temperaturë të ulët dhe të lartë. Nën ndikimin e temperaturës së ulët, efektiviteti i transportit të elektroneve ulet shpejtë në të gjitha segmentet e analizuara, pas të cilës rrjedhin procese, të cilat kompensojnë këtë ulje. Në ngrohje të menjëhershme deri në 40 °C vërohet rritje e efektivitetit të transportit të elektroneve, kurse në temperaturë më të lartë zhvillohen procese të inaktivimit të reaksioneve fotosintetike. Analiza e sinjalit të shpërndarjes në dritën infra të kuqe (820 nm) tregon ndryshimin midis reaksioneve të PhSA ndaj temperatures së lartë dhe të ulët. Në temperaturat e larta ndodh inaktivim i lidhjes midis dy fotosistemeve, ku PhS 1 ngelet funksionale edhe në 50 °C. Stresi i temperaturës së ulët (kalimi 24 °C – 5 °C) shkakton inaktivim të përkohshëm në transportin elektronik mes sistemeve.

Parametri fenomenologjik PI(ABS), indikator i më i ndjeshëm, është stabil në intervalin nga 10 deri në 40°C, zvogëlohet pak në 5 °C, ndërsa nga 45 deri në 55 °C zvogëlohet rreth 40 herë.

Temperatura është faktor bazë ekologjik për bimët. Amplituda e saj ditore dhe vjetore është dukshëm e theksuar në Tokë. Në fidanë Olea Europaea L. Sativa (figure 4.2.3 dhe figure 4.2.4) temperatura më të larta se 45 °C influencojne dukshem në P680 (ϕ Po) dhe më dobët në P700 (Vox). PhS 2 është më shumë termolabil se PhS 1. Temperaturat e ulta (5,10 °C)

zvogëlojnë dukshëm shuarjen jo-fotokimike, ndërsa të lartat e zmadhojnë. Ndjeshmëri të lartë tregon transporti i elektroneve (niveli i fazes J, ϕ_{EoH} ϕ_{Ro}), me siguri për shkak të rritjes së energjisë së transportuesve, të nevojshme për transferimin e elektroneve, si dhe prania e transportuesve të levizshëm (PQ dhe PC), difuzioni i të cilëve rritet me rritjen e temperaturës.

Në temperatura të larta (50°C) vërehet shfaqja e K-pik i vërtetë pozitiv. Veç dëmtimit të OEC, në 55 °C komplekset antenë (LHC) disociojnë nga RC-të, duke gjykuar nga rritja e ABS/RC. L-pik pozitive tregojnë zvogelim të grupimit mes tyre që në temperaturë jodestruktive. Në temperatura të ulëta në PhS 2 i limituar është ET mes Q_A dhe Q_B , për të cilin gjykohet nga K-pik negative, kurse grupimi rritet – L-pik negative. Reduktimi i $P700^+$, për shkak si të ETC, ashtu edhe të donatorëve stromal përshpejtohet me temperaturën.

4.3 NDIKIMI I INTENSITETIT TË DRITËS AKTINIKE GJATË INDUKSIONIT MBI PhSA NË GJETHE ULLIRI

Përmbledhje

Drita është një nga faktorët fizikë kryesorë ekologjikë, që përcakton jo vetëm mundësinë për ekzistencën e bimëve, por edhe gjëndjen fiziologjike të aparatit të tyre fotosintetik. Duke përdorur matjet e njëkohshme të kinetikave të PF, DF dhe reflektimit të moduluar në 820 nm, ne kemi investiguar përgjigjen e aparatit fotosintetik në gjethet e ullirit kur ndryshojmë intensitetin e dritës (300-4000 $\mu\text{mol fotone m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ne përshkruajmë qasjet eksperimentale për të studiuar gjëndjen e aparatit fotosintetik dhe mënyrat për studimin e parametrave të rëndësishëm strukturorë e funksionalë, si efikasiteti kuantik i fluksit elektronik në PhS 2, PhS 1 dhe zinxhirin e transportit të elektroneve (ETC) midis dy fotosistemeve; përqendrimin e qëndrave aktive të reaksionit të PhS 2; kapaciteti elektronik i ETC; si dhe parametri total, i cili karakterizon produktivitetin e reaksioneve fillestare të PhSA.

4.3.1 Hyrje

Në trajtimin tonë, derivimi i lidhjeve mes sjelljes energjike të aparatit fotosintetik dhe sinjaleve të fluoreshencës bazohet në 'Teoria e flukseve të energjisë në biomembrane' [Kreu 2.4 në këtë punim]. Teoria fut dhe definon pesë sasi bazë dhe të veçanta që lidhen me çdo sistem pigmenti (skema Foto 4.3.1 dhe [29]).

Drita në zonën PAR është e nevojshme në procesin e fotosintezës dhe rritjes së bimëve (Walters and Horton, 1994). Gjatë ditës, cilësia dhe sasia e rrezatimit aktiv fotosintetik ndryshojnë shpesh, dhe bimët përpigjen të gjejnë ekuilibrin midis energjisë së absorbuar të rrezatimit dhe mbrojtjes së aparatit fotosintetik (Bailey et al., 2004).

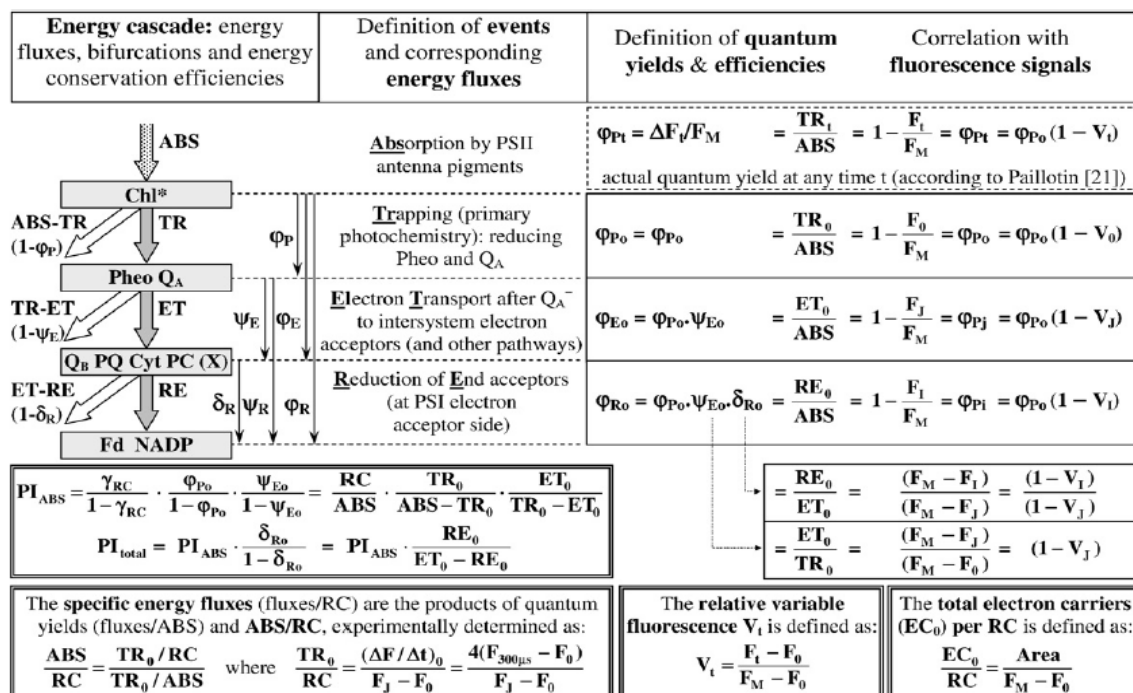


Fig. 4.3.1: Paraqitje skematike formula dhe fjalor i termave të përdorur nga JIP-test për analizën e tranzitimit O-J-I-P të fluoreshencës (nga Reto J. Strasser).

4.3.2 Materiali, Metodat dhe Protokollet

Materiali bimor

Materiali bimor i përdorur në këtë punim është fidanë ulliri rritur në kushtet e ndriçimit natyror diellor në Shqipëri.

Fidanët *Olea Europaea L. sativa*, “Kalinjot” dhe “Ulliri i hollë i Himares”, kultivarë autoktonë, rritur në natyrë, janë marrë nga Qendra e Transferimit të Teknologjive Bujqësore, Vlorë dhe janë transferuar në laboratorët e Katedrës së Biofizikës dhe Radiobiologjisë, Fakulteti i Biologjisë, Universiteti "St. Kliment Ohridski" Sofie, ku kanë vazhduar të rriten në kushtet - temperaturë ajri 22-25 °C, regjim ditë / natë 12: 12h dhe ndriçim lumineshent me intensitet 250 $\mu\text{mol hv. m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Eksperimentet u kryen me fluorimetër M-PEA (*Multifunctional Plant Efficiency Analyzer*), prodhuar nga *Hansatech Instruments, Ltd (King's Lynn, UK)* mbi gjethe të pakëputura në fidanë 1 deri në 3 vjeçar, të bimës së ullirit. Bima paraprakisht përshtatet në errësirë për 1 orë. Gjithë eksperimentet janë zhvilluar në ambient të errësuar fort (me intensitet të dritës së shpërndarë $\ll 1 \mu\text{mol hv.m}^{-2}\text{s}^{-1}$), për të mos u dëmtuar gjendja e përshtatjes në të errët të objekteve. Koka punuese e mbajtur nga një stativ fleksibël, pozicionohet në mes të gjetheve të pakëputur mbi faqen e sipërme të saj. Përzgjedhja e gjetheve është bërë në drejtim nga poshtë lart. Për çdo kusht eksperimental janë bërë nga 6 matje në gjethe të ndryshme. Me *M-PEA-data-analyzer V.5.4* vlerat janë regjistruar, përpunuar dhe përdorur për analizë dhe vizualizim e përpunim të grafikëve.

Protokolle te përdorur:

- 1 - PF - 1s 0300 μE DF-single MR-100
- 1 - PF - 1s 0500 μE DF-single MR-100
- 1 - PF - 1s 1000 μE DF-single MR-100
- 1 - PF - 1s 2000 μE DF-single MR-100
- 1 - PF - 1s 3000 μE DF-single MR-100
- 1 - PF - 1s 4000 μE DF-single MR-100
- 3 - PF - 180s 1000 μE DF-multi MR-100
- 3 - PF - 180s 2000 μE DF-multi MR-100
- 3 - PF - 180s 4000 μE DF-multi MR-100

Protokoll 1: Merren kurbat e PF, MR820, parametrat e PF përpunohen. Koha e matjes: 1 s. Intensitetet e përdorura në protokoll janë: 300, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, DF-single, MR-100 – maksimum.

Në vijim, vlerësohet efekti i intensitetit të dritës aktinike (me gjatësi vale $\lambda \approx 625$ nm) mbi PhSA në gjethet e ullirit për tranzicion induksioni prej 1s nga intervale të ndryshme kohe. Matjet janë bërë në bimë, përshtatur në errësirë për 1h.

Protokoll 3: Merren parametrat dhe kurbat e DF përpunohen. Koha e matjes 180 s. Intensitetet e përdorura ne protokoll janë: 1000, 2000, 4000 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, DF-multi, MR-100 – maksimum.

Cikli i një matje përfshin periudha të ndriçuara dhe të errëta në raportin 3:1. Gjatë ciklit, PF matet kur drita aktinike është e kyçur dhe DF regjistrohet kur drita çkyçet.

Në figure 4.3.2 paraqitet pamje e drejtpërdrejtë e kurbave PF të marra nga m-PEA gjatë matjeve në gjethet e ullirit (protokolli 1: PF-1s 0300 μE DF - single MR-100). Seritë janë marrë gjatë ndryshimit të intensitetit të dritës: 300, 500, 1000, 2000, 3000 dhe 4000 μE . Koha jepet ne shkallë logaritmike.

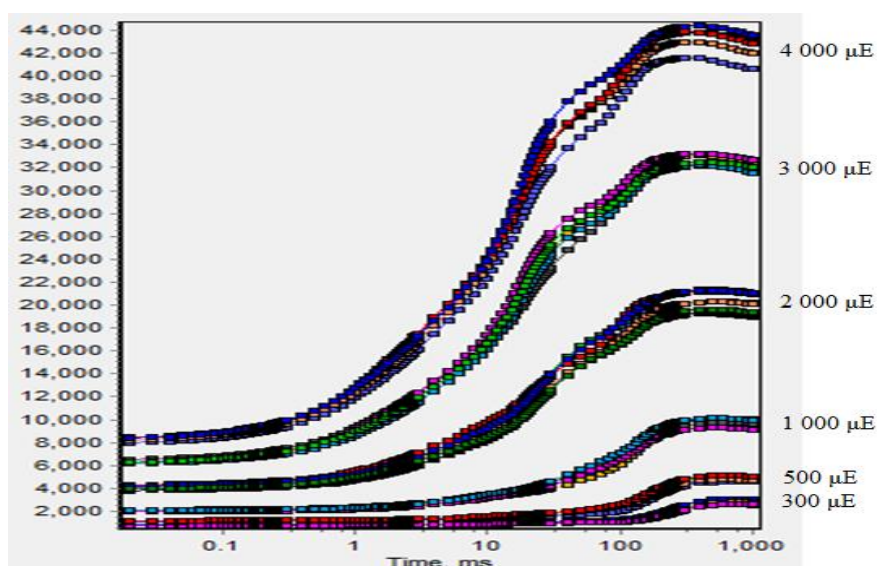


Fig.4.3.2: Visualizim me m-PEA-data-analyzer V.5. Paraqitet pamje e drejtpërdrejtë e IC të PF të marra nga m-PEA gjatë matjeve në gjethet e ullirit (protokolli 1: PF-1s 0300 μE DF - single MR-100). Intensiteti i dritës ndryshon nga 300 deri në 4000 μE .

Në figure 4.3.3 paraqitet pamje e drejtpërdrejtë e kurbave DF të marra nga m-PEA gjatë matjeve në gjethet e ullirit (protokolli 3: 3 - PF - 180s 1000 μE DF-multi MR-100). Intensiteti i dritës ndryshon - 1000, 2000, 4000 μE . Koha jepet në shkallë logaritmike. Kohëzgjatja 180 s. e eksperimentit lidhet me kërkesën për informacion për gjendjen stacionare dhe procesin e shuarjes.

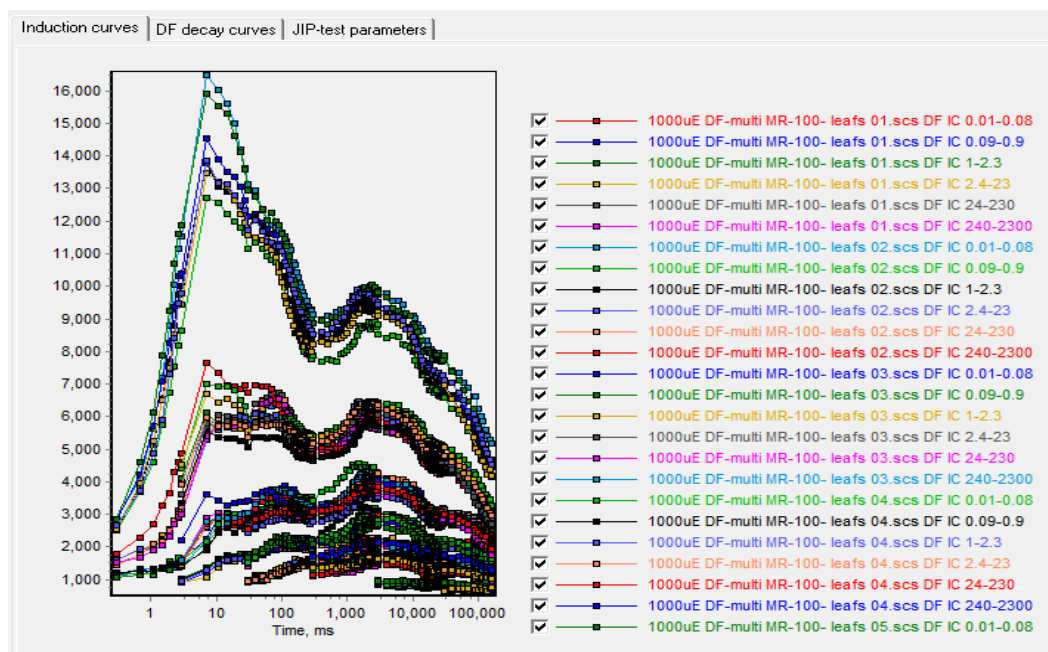


Fig.4.3.3: Visualizim me *m-PEA-data-analyzer* V.5. Paraqitet pamje e drejtpërdrejtë e kurbave DF të marra nga *m-PEA* gjatë matjeve në gjethet e ullirit (protokolli 3: 3 - PF - 180s 1000uE DF-multi MR-100). Intensiteti i dritës ndryshon - 1000, 2000, 4000 μE .

Hollësi të metodës për studimin e aparatit fotosintetik (PhSA) nga kurbat e induksionit, IC e DF, janë prezantuar në Kreu 3 dhe Kreu 4.1 (teknikat).

4.3.3 Rezultate dhe Diskutime

Qëllimi i kësaj pune është studimi dhe karakterizimi i efektit të intensitetit të dritës aktinike në sisteme fotosintetike.

Kemi ndjekur reagimin e qelizës bimore kur ndryshon karakteristikat e saj në mënyrë që të sigurojë funksionim të vet optimal në kushtet e reja - intensitet i ndryshuar i dritës. Për këtë, gjethet e bimëve të ullirit u nënshtruan një ndryshimi në intensitetin e dritës rrezatuese, nga ku u regjistruan parametrat e OJIP test dhe u përfutuan IC të fluoreshencës klorofile a, në vijim, janë regjistruar dhe konfiguruar gjithashtu MR820 dhe DF.

Kurba e induksionit të fluoreshencës perfaqëson ndryshime të emisioneve të FI klorofile në objektet fotosintezuese.

Në figure 4.3.4/a janë paraqitur tranzicionet e induksionit të PF, të regjistruara në diapazon kohe nga 0,01 ms deri në 1000 ms. Varësia e tranzitimit të induktuar nga intensiteti i dritës është lehtësisht e dukshme. Për intensitet drite $\geq 1500 \mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ kurbat e IC të PF ruajnë formën karakteristike të përshkallëzuar, klasike sipas 'Teoria e flukseve të energjisë në biomembrane'. Shënojmë se fluoreshenca maksimale e regjistruar (F_p) është e barabartë në vlerë me (F_M) maksimalen e regjistruar në 100% të RC-ve të mbyllura, vetëm në intensitet $\geq 1500 \mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, intensitet ky, i cili nuk takohet në natyrë, por e përdorim për studim.

Me rënien e intensitetit (vlerat 1000, 500, 300 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), IC-te humbasin formën e vet karakteristike të përshkallëzuar, amplitudat zvogelohet, vlerat e fazave përkatese (J, I, P) zvogëlohen gjithashtu. (Shih Tabele 9.2.1 vlerat e F_M , $F_M - F_0$.) Koha T_{FM} për arritjen e F_M rritet, maksimumi zhvendoset djathtas.

Në figure 4.3.4/b paraqet IC e fluorescencës së ndryshueshme relative, $V_t = (F_t - F_0) / F_V$, ku F_t është vlera në kohën t të regjistrimit, F_0 - fillestare dhe $F_V = F_M - F_0$ - fluoreshenca variable. Fluoreshenca e ndryshueshme (variabile) - $F_V = F_M - F_0$, matur pas përshtatjes në të errët, varet nga rendimenti maksimal kuantik i PhS 2. Vlera e ulët e këtij parametri tregon ulje të aktivitetit të PhS dhe difuzion të energjisë së ngacmimit si nxehtësi. Vlera F_V ulët nën ndikimin e faktorëve stresant të mjedisit që shkaktojnë dëmtimin e thylakoids.

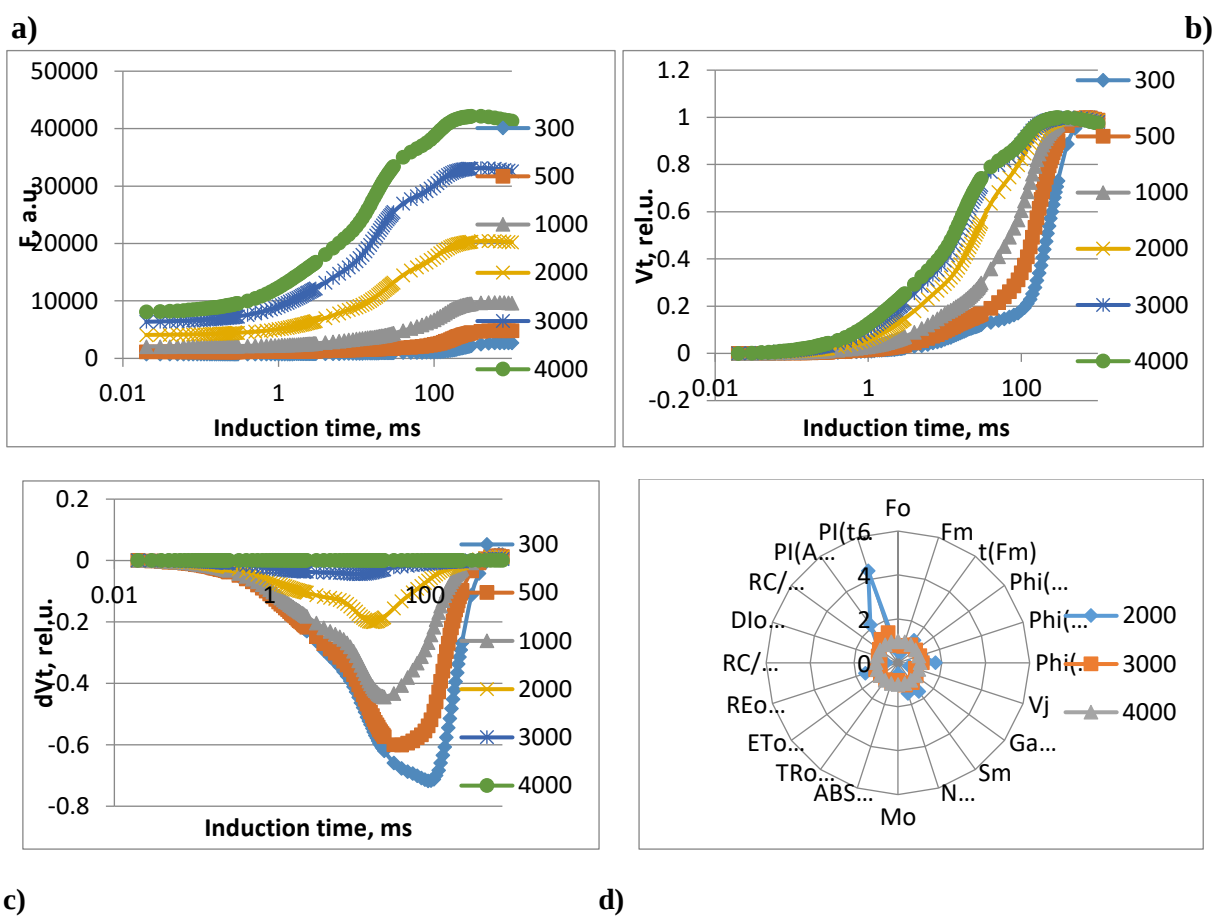


Fig. 4.3.4: Efekti i intensitetit të dritës në PhSA në gjethe ulliri. Të përshtatura në errësirë për 1 orë, gjethet e ullirit ndriçohen me dritë aktinike të kuqe me një intensitet nga 300 deri në 4000 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Paraqitur: a) IC e F_t a.u., PF në kohën t pas fillimit të ndriçimit aktinik; b) IC e fluoreshencës së ndryshueshme relative, $V_t = (F_t - F_0) / F_V$, ku F_t është vlera në kohën t të regjistrimit, F_0 - fillestare dhe F_V - fluoreshenca variabel; c) ΔV_t , rel.u. ; d) PF parametrat nga JIP-testi në lidhje me vlerat në 4000 $\mu\text{mol hv. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Diagrama merimange tregon shmangien relative të JIP – parametrat e objektit të studjuar, i cili ndodhet në gjendje stresi, nga madhesitë e kontrollit (kontrolli – rreth jeshil me vlerat e gjithë parametrave 100%). Parametrat janë grupuar si më poshtë: shpejtësia e fluksit të energjisë, produktiviteti dhe efikasiteti kuantik, fluksi specifik i energjisë dhe flukset relative fenomenologjike, si dhe treguesit funksional të PhS 2.

Në figure 4.3.4/c ΔV_t normuar në 4000 μE – minumumi zhvendoset djathtas me intensitetin, parametri T_{FM} përcakton kohën nga fillimi i matjes, gjatë të ciles Fl klorofile

arrin nivelin maksimal (F_M), shpesh për vetëm 500-800 ms. Parametri T_{FM} përcakton madhësinë e (baseinit) pool plastoquinon të oksiduar. Rritja e konsiderueshme e tij tregon se është ngadalësuar transporti i elektroneve me energji të lartë nga qendra e reaksionit tek plastoquinony.

Në figure 4.3.4/d paraqiten PF parametrat nga JIP-testi në lidhje me vlerat në 4000 $\mu\text{mol hv. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Diagrama merimange tregon shmangien relative të JIP – parametrat e objektit të studjuar, i cili ndodhet në gjendje stresi, nga madhësitë e kontrollit (kontrolli – rreth jeshil me vlerat e gjithë parametrave 100%). Parametrat janë grupuar si me poshtë: shpejtësia e fluksit të energjisë, produktiviteti dhe efikasiteti kuantik, fluksi specifik i energjisë dhe flukset relative fenomenologjike, si dhe treguesit funksional të PhS 2. Tabele 9.2.2 paraqet JIP Parametrat nga protokoll 1.

Tabele 4.3.1: Parametrat e marrë për PF, nga protokoll 1

	300	500	1000	2000	3000	4000
Fo	772.5	1160.833	2070.833	4088.286	6379.333	8126.429
Fm	2734.833	4858.667	9769.333	20456.86	33148.5	42173.86
Fv	1962.333	3697.833	7698.5	16368.57	26769.17	34047.43
Fi	1013.333	1784	4369.333	13223	25491.33	33415.14
Fj	806	1258.333	2467.833	5898.571	10918.83	15037.71
Fk	786	1183.333	2161.833	4452.429	7315.5	9602
Fv/Fm	0,72	0,76	0,79	0,80	0,81	0,81

Raporti F_V/F_M – efektiviteti maksimal fotokimik i PhS 2, matur në bimë të përshtatura në errësirë, pasqyron efikasitetin potencial kuantik të PhS 2. Zvogëlimi i parametrat konsiderohet se para matjes bima ka qenë objekt i stresit, i cili ka dëmtuar funksionet e PhS, që shpie në uljen e efikasitet të transferimit të elektroneve. Kjo shpesh vrojtohet në bimë që ekspozohen ndaj faktorëve të ndryshëm stresant, si ekspozimi ndaj dritës së fortë. Ndryshimi në vlerën e parametrat F_V / F_M konsiderohet si indikator më i ndjeshëm, karakterizues i efektit të fotoinhibimit të fotosintezës dhe dëmtim i aparatit fotosintetik në intensitete të larta drite (He et al, 1996 ;. Basu et al, 1998 ;. Seppanen, 2000). Për shumicën e bimëve me zhvillim të plotë në kushte normale, të mungesës së stresit, vlera maksimale e raportit F_V / F_M , nga disa autore jepet 0,83 (Bjorkman and Demmig, 1987; Angelini et al, 2001). Në punën tonë ne kemi marrë vlera më të ulta. Për intensitete drite të lartë, mbi 1500 μE raporti është 0,81 dhe zvogëlohet në 0,72 në intensitete drite të afërta me normat ekologjike, 300 μE (shih tabele 4.3.1). Mostrat e fidaneve të ekzaminuar nga ne janë kultivarë autoktone, rritur në natyrë, në Shqipëri jugore, brezi i klimes mesdhetare, të cilat përpara matjeve janë përshtatur në errësirë për 1 ore. Vlerat më të ulta të marra nga ne ndoshta janë për shkak se fidanet e ullirit (me moshë 1, 2 dhe 3 vjet) nuk kanë arritur moshën e zhvillimit të plotë si bimë.

ABS / RC - nga vlerat e marra në Tabele 9.2.2, raporti leviz në dy drejtime: për intensitet 300 – 1000 μE raporti zvogëlohet nga 2 në 1. Për intensitet 2000 – 4000 μE parametri rritet shumë pak. Kjo ndoshta pasi vlerat e intensitetit 300 – 1000 μE bien pranë normave ekologjike, si pasojë efektiviteti i sistemit duhet të jetë më i madh.

TR0 / RC - Ecuria e ketij parametri është e afërt me ABS / RC.

ET0 / RC - në intensitet 300 – 1000 μE raporti zvogëlohet nga 2 në 1. Për intensitet 2000 – 4000 μE nuk influencohet.

DIO / RC - Ky raport sillet si ET0 / RC. Për intensitet 2000 – 4000 μE nuk influencohet.

RE0 / RC- Për intensitet drite 300 – 1000 μE raporti zvogëlohet nga 6 në 2,5 dhe për intensitet 2000 – 4000 μE zvogëlohet nga 1,5 në 1.

Me rritjen e intensitetit (2000 – 4000 μE), flukset specifike të energjisë ABS / RC, TRo / RC rriten dhe ETo / RC dhe DIo / RC pothuajse nuk influencohen, si dhe densiteti i RC-ve active (RC / CSO), ndërsa REo / RC dhe probabiliteti, që një molekulë klorofile e dhënë e PhS 2 të funksionojë si RC (γ), zvogëlohet.

Tabele 4.3.2: JIP Parametrat nga protokoll 1

	Fo	Fm	t(Fm)	Phi(Po)	Phi(Eo)	Phi(Ro)	Vj	Gamma(FSm)	N(Stress)Mo	ABS/RC	TRo/RC	ETo/RC	REo/RC	RC/CSo	DTo/RC	RC/ABS	PI(ABS)	PI(total)		
300 AVE	0.09506	0.06492	2.538354	0.888712	1.096091	3.028205	0.083855	0.747652	7.397481	13.26314	0.14902	1.994551	1.778125	2.193107	6.062241	0.060442	2.900411	0.633471	5.607338	97.48915
500 AVE	0.142847	0.115299	2.099024	0.943175	1.152299	3.047193	0.129518	0.908846	4.931976	6.011124	0.153869	1.266426	1.195156	1.460402	3.878943	0.123903	1.564732	0.862596	6.212621	75.55002
1000 AVE	0.254827	0.231565	1.757322	0.976164	1.161715	2.659627	0.253727	0.998919	2.945833	2.891739	0.248979	1.004254	0.980467	1.166798	2.674413	0.254404	1.103816	0.999743	4.169305	24.80309
2000 AVE	0.503085	0.484914	1.506276	0.991257	1.106301	1.702361	0.544424	1.039253	1.613081	1.473982	0.497043	0.921432	0.913443	1.019512	1.569292	0.546062	0.95487	1.085622	2.13387	4.400947
3000 AVE	0.785011	0.785688	1.171548	1.00025	1.04221	1.115418	0.835374	1.021613	1.113516	1.065722	0.799804	0.956458	0.956589	0.996526	1.06862	0.821556	0.955911	1.046789	1.310332	1.452842
4000 AVE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Nga rendimenti kuantik i transportit të elektroneve nga PQ drejt akceptorëve fundorë të ETC (ϕ_{Ro}), (shih diagramën në figure 4.3.4 d dhe tabele 4.3.2) shihet se reaksionet e varura nga drita janë më efektive gjatë ndriçimit më të dobët - 300 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ky intensitet bie brenda normave ekologjike të kultivimit të bimës së ullirit. Gjatë ditës, cilësia dhe sasia e rrezatimit aktiv fotosintetik ndryshojnë shumë, dhe bimët përpiqen të gjejnë ekuilibrin midis energjisë së rrezatimit të absorbuar dhe aparatit fotosintetik. Intensitete më të mëdha se 2000 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ vrojtohen rrallë në natyrë, por, për shkak të faktit që në mënyrë të shpejtë dhe efektive sigurojnë reduktim të plotë të transportuesve në ETC të PhSA, preferohen në zhvillimin e eksperimenteve fluoreshente me bimët. Nga ndryshimi i intensitetit të ndriçimit, më dobët influencohen rendimentet kuantike të reaksionit fillestar fotokimik (PPhR) në RC të PhS 2, (ϕ_{Po}) dhe të reduktimit të PQ nga QA, (ϕ_{Eo}).

Ndryshimet në MR820 janë paraqitur në figure 4.3.4/e. Analiza e rënies në pjesën e parë të IC (deri në 30 ms) evidenton, se sa më i fortë të jetë fluksi i dritës, aq më shpejtë dhe më shumë $P700^+$ akumulohen (figure 4.3.4/f dhe table 4.3.3). Kjo varesi thuhet lineare shpjegohet me faktin, se sinjali në intervalin fillestar të kohës pasqyron vetëm PPhR në PhS 1. Për këtë kohë, elektronet nga PhS 2 ende nuk kanë kaluar nëpër ETC, dhe reduktimi i $P700^+$ të akumuluar nuk vërehet. Niveli i oksidimit të RC ($P700^+$) arrin një maksimum në minimumin e IC të MR820. Pas kesaj sistemi kalon në gjendje stacionare, që do të thotë se shpejtësit e foto-oksidimit dhe reduktimit janë afuar. Kjo e fundit përcaktohet nga gjendja redox e PQ-pool dhe pas reduktimit të plotë të saj (Faza I e IC te PF) fillon të tejkalojë shpejtësinë e oksidimit. Ajo bëhet përcaktuese për ecurinë në ngritje të sinjalit MR820 në pjesën e dytë të kurbës së tij të induksionit. Nga pjerrësia e fiteve lineare, ndërtuar në pjesën përkatëse të kurbës, llogariten shpejtësitë e reaksioneve redox të $P700$ në subsekondë (Vox dhe Vred në figure 4.3.4/f). Meqenëse pjesa e dytë e IC-së jep informacion për veprimin e dy proceseve të kundërta që rrjedhin njëkohësisht, shpejtësia e reduktimit e përfutur është vizive (fiktive) dhe jo reale. Megjithatë varësia e saj në lidhje me ndriçimin është përsëri lineare, por vetëm deri në $1000 \mu\text{mol hv m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ku arrihet pikë infleksioni, pas së cilës varësia e Vox-it nga intensiteti bëhet më e fortë se varësia e Vred-it.

Varësi analoge që vërehet për ϕ_{PO} tregon, se PPhR e P680, dmth. transporti elektronik linear i PhS 2, përcakton shpejtësinë e reduktimit të $P700^+$.

Më tej nga të dy shpejtësitë, varësi më e fortë nga intensiteti vërohet në reduktim, se sa oksidim, kjo është pasojë e drejtpërdrejtë e absorbimit më efektiv të P680 në diapazonin rreth 625 nm.

Në figure 4.3.4/g (majtas dhe djathtas), krahasohet forma e IC në DF, e cila kryesisht karakterizon komponenten e vet kinetike në mikro-sekondë dhe sub-milisekonde, respektivisht. Raporti mes pikeve karakteristike ndryshohet gjatë ndriçimit të ndryshëm. Duke u rritur intensiteti, rritet raporti I_1 / I_2 (table 4.3.4, shtojca), i cili lidhet me rritjen e fluksit të energjisë së kapur në RC, ndërkaq fluksi i elektroneve mes dy fotosistemeve mbetet konstant.

Tabelë 4.3.3: Shpejtësia e oksidimit të $P700$ (Vox) dhe reduktimit të $P700^+$ (Vred).

Light intensity	300	500	1000	2000	3000	4000
Rate Ox	0.383634	0.542674	0.863271	1.396226	2.230482	2.698609
Rate Red	0.046393	0.077047	0.126726	0.148519	0.168	0.195656

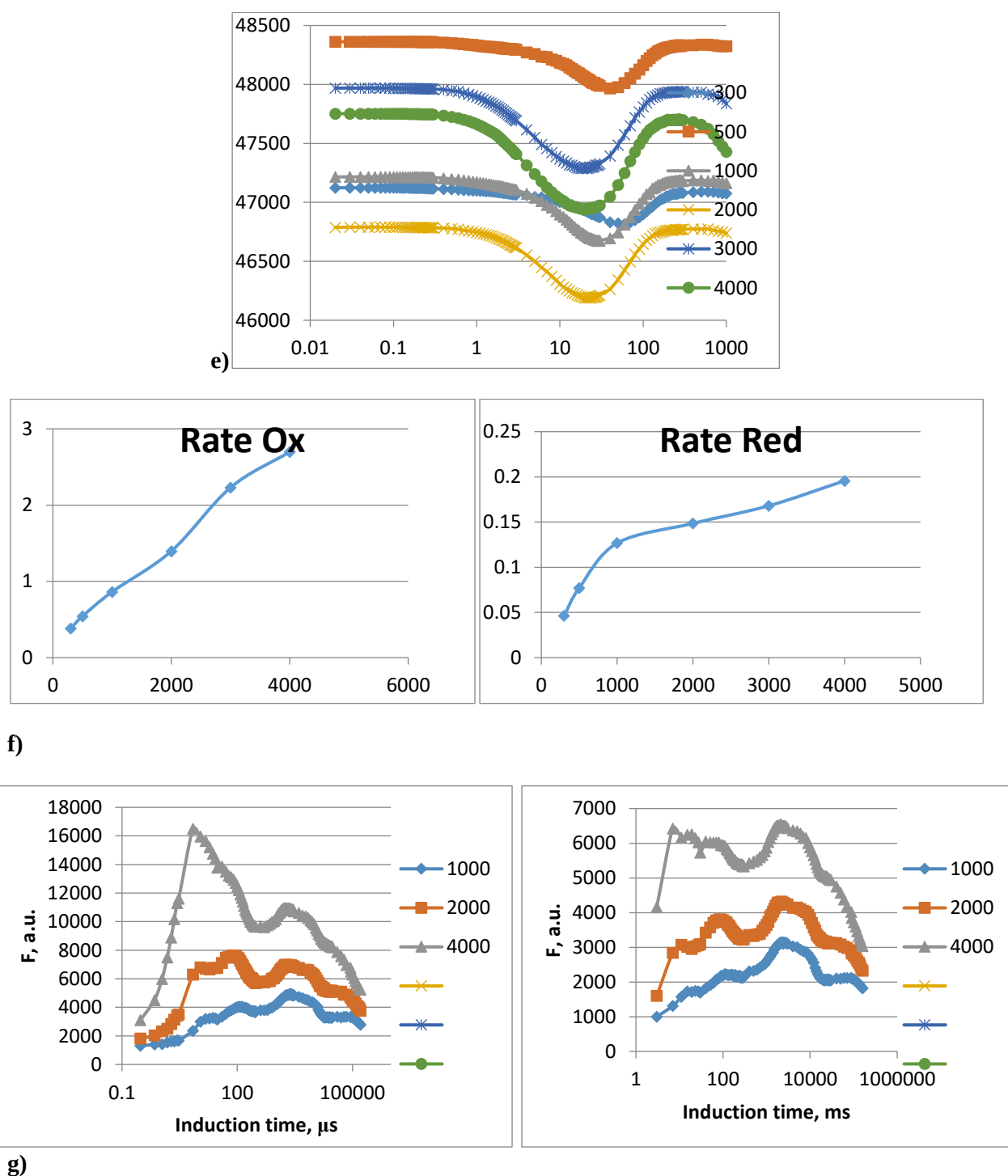


Fig. 4.3.4: Efekti i intensitetit të dritës në PhSA në gjethe ulliri. Të pershtatura në errësirë për 1 orë, gjethet e ullirit ndriçohen me dritë aktinike të kuqe me një intensitet nga 300 deri në 4000 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Paraqitur: e) Shpërndarja e modular në 820 nm (MR820 rel.u.), normalizuar deri në vlerën mesatare midis 0.1-0.3ms; f) Shpejtësitë e oksidimit të P700 (Vox) dhe reduktimit të P700+ (Vred), të marra nga pjerrësia e drejtëzës (slope of straight), që aproksimon sinjalit MR820 për një interval kohe të dhene. Ato krahasohen me efikasitetin kuantik të PPhR (reaksionit primar fotokimik) në RC të PhS II (ϕ_{P0}); g) IC e fluoreshencës së vonuar (DF), (Ft a.u.), regjistruar në diapazonin μs (majtas) dhe ms (djathtas); Kurbat në intensitete të ulëta ($< 1000 \mu\text{mol hv.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) të DF nuk janë shënuar për shkak të raportit të ulët sinjal / zhurmë, gjë që pengon llogaritjen e saktë të komponenteve përkatëse kinetike.

Tabele 4.3.4: Parametra DF mikro-sekundë dhe sub-milisekonde

DF(t)		1000	2000	4000
I1	7	2364.14	6289.566	16493.56
I2	80	3887.473	7630.934	12931.96
D2	260	3709.555	5874.468	9768.353
I3	2400	4944	6898.132	10900.46
I4	6000	4557.61	6638.998	10374.36

Në intensitet drite shumë të lartë, të absorbuar nga pigmentet fotosintetike, gjithë energjia e perthithur nuk mund të përdoret në procesin e fotosintezës. Kur shpejësia e absorbimit të kuantëve të dritës konsiderueshem tejkalon mundësitë e përdorimit të energjisë së tyre në fotosintezë, në bimë arrihet gjendje stres dritor. Si rezultat i stresit dritor mund të ndodhin dëmtime funksionale të reaksioneve fotosintetike – photoinhibition, e madje edhe dëmtime të aparatit fotosintetik (Coleman et al, 1988; Prasil et al 2008; Weng et al, 2005). Në kushte natyrore, zakonisht, stresi dritor kombinohet me lloje të tjera stresi (Allakhverdiev and Murata, 2004; Allakhverdiev et al, 2007). Ka shumë mekanizma mbrojtës të reaksioneve të fazës së ndriçuar të fotosintezës dhe të struktureve thylakoide (kryesisht kompleksi PhS 2). Bimët mund të mbrohen nga stresi dritor nëpërmjet photoinhibimit dhe në këtë mënyrë të shmangin dëmtimet që shkakton rrezatimi i tepërt (Mulkey and Pearcy, 1992 ;. Feild et al, 2001), por mundet gjithashtu të mos lejojnë PAR të tepërt, dhe/ose të rikuperojnë dëmtimet e shkaktuara në kloroplaste (Kozaki and Takeba, 1996; Baena-Gonzalez, et al, 1999 ;. Asada, 1999, 2000, Govindjee, 2002). Studime të shumta tregojnë se PhS 2 luan rol të rëndësishëm në mbrojtjen e aparatit fotosintetik (Force, et al, 2003; Schreiber 1986).

Konstatohet ndikimi negativ i stresit dritor në fotosintezë, por ai akoma nuk është sqaruar plotësisht dhe pavarësisht punimeve të shumta, që tregojnë, se PhS 2 luan një rol të rëndësishëm në mbrojtjen e aparatit fotosintetik (Schreiber, 1986; Strasser et al., 2000; Force et al., 2003; Kalaji and Rutkowska, 2004), ende nuk ka studim të plotë dhe literaturë përkatëse mbi shpërndarjen e energjisë në PhS 2.

Në kushtet e intensitetit të ulët të drites pjesa më e madhe e energjisë dritore të perthithur mund të përdoret në procesin e fotosintezës (në saje të efektivitetit të lartë të aparatit fotosintetik), ndërkaq / njëkohësisht përdoret vetëm një pjesë e vogël e PAR me intensitet të lartë (Long, et al., 1994).

Në bimë, ekzistojnë mekanizma të ndryshëm fizikë dhe funksionalë, që u lejojnë të "rregullohen" me stresin, e shkaktuar nga shkëlqimi i lartë, të tilla si *zvogëlim i përmasave të pigment antenës së PhS 2* - (Cjernev, et al, 2006). *Rritja e efikasitetit të fotosintezës*, e cila ul probabilitetin e fotodegradimit, si dhe *ndryshime në stoichiometrinë e fotosistemeve*, mundet të përdoren për optimizimin e përdorimit të PAR (Walters, 2005).

Rritja, kultivimi i bimëve në dritë të fortë ndihmon bimët të përshtaten me tepriçë energjie dritore dhe të *zhvillojnë mekanizma të ndryshëm aklimatizimi për përshtatje*, që shërbejnë kryesisht për mbrojtjen e aparatit fotosintetik. Në bimët, që rriten në kushte të ndriçimit të fortë, madhësia e antenës është më e vogël se madhësia e saj në bimët, që zhvillohen në intensitet të ulët drite. Nga ana tjetër, bimët me *antena më të vogla kanë predispozitë të ulët për fotoinhibim*. Si rregull, në përgjigje të shtimit të dritës ndodhin ndryshime në përbërjen e proteinave bazë periferike të antenës (Tanaka and Tanaka, 2000). Është treguar rritje e sasisë së klorofilit dhe e LHC 2, si dhe komponente të ciklit Calvin-Benson (veçanërisht përqendrimi i fermentit Rubisco). Kjo mendohet që çon në *aktivizimin e transportit të elektroneve* dhe rritjen e evolucionit / zhvillimit të oksigjenit si dhe asimilimit të dioksidit të karbonit, CO₂, (Bailey et al., 2001). Në *kushtet e rritjes së tepërt të antenës në PAR* aktivizohen mekanizmat mbrojtës të aparatit fotosintetik, veçanërisht PhS 2. Kjo çon në *ngadalësimin e transportit elektronik dhe degradimin e pjesshëm të proteinës kryesore D1* (Hendrich, 1995; Horton et al., 1996; Baroli and Melis, 1998). Reduktimi i pool plastoquinones rrit probabilitetin e rekombinimit të ngarkesave të ndara në RC të PhS 2 (P680⁺Pheo⁻). Në këtë rast mund të krijohet triplet P680 (³Chl*), i cili, si rezultat i reaksionit me oksigjenin molekular, gjeneron oksigjen reaktiv singlet (¹O₂). Kjo molekulë oksigjeni drejtpërdrejt ose nëpërmjet radikaleve sekondare, atakon proteinën D1, duke shkaktuar degradimin e saj të mëtejshëm (Aro et al, 1993 ; Adir et al, 2003).

Në parim, bimët, përshtatur në nivel të ulët ndriçimi, janë më pak të afta të eliminojnë format reaktive të oksigjenit, krahasuar me bimët e rritura në dritë të fortë diellore (Murchie and Horton, 1997; Logan et al, 1998 ;. Burritt and Mackenzie, 2003).

Konsiderohet, se *photorespirimi luan një rol të rëndësishëm në kushtet e stresit të dritës*, kur asimilimi i CO₂ bëhet shumë i ulët. Në rrethana të tilla aktiviteti carboxylase i Rubisco sfumohet dhe photorespirimi siguron FGA – acid 3 – fosfoglicerik përmes funksionit alternativ oxygenase të kësaj enzime, dhe parandalon inhibimin e sintezës së proteinave D1, e cila është e nevojshme për "riparimin" e dëmtimit në dritë të PhS 2 (Kozaki and Takeba, 1996; Takahashi, et al, 2007; Takahashi and Murata, 2008). Efikasiteti i shpërndarjes së energjisë varet nga madhësia e gradientit të pH, dhe shuarja jo-fotokimike (nxehtësia) mbron zinxhirin e transportit elektronik nga reduktimi i shtuar dhe është një mekanizëm photoprotektimi, që funksionon në rast rrezatimi të shtuar.

Një tjetër mekanizëm i cili i lejon bimës të "përballojë" stres dritor, lidhet me dezaktivimin e gjendjeve të ngacmuara të pigmenteve, në kalimin e energjisë së ngacmimit në sistemet antena fotosintetike në nxehtësi.

Mekanizëm tjetër mbrojtje nga rrezatimi i drejtpërdrejtë shfaqet rritja e transportit ciklik të elektroneve, i cili luan rol të rëndësishëm në fotombrojtje (Teicher and Scheller, 1998).

Gjithashtu, karotinoidet, që gjenden në membranat tilakoide, parandalojnë formimin e formave reaktive të oksigjenit (Powles, 1984; Krause, 1988). Këta ngjyruar absorbojnë rrezatim në gjatësi vale të ndryshme nga klorofili (vetëm në spektrin vjollcë dhe blu), dhe puna e tyre rrit efikasitetin e përthithjes së dritës. Funksioni i dytë kryesor është mbrojtja nga foto-oksidimi i lipideve në kloroplaste (oksidimi nën ndikimin e dritës). Karotenoidet mund të

kapin energjinë e tepërt të molekulave të ngacmuara të klorofilit dhe termikisht ta çaktivizojnë atë, gjë që parandalon formimin e oksigjenit singlet - formë aktive e oksigjenit.

Heat Dissipation intensifikohet në rastin e stresit, e lidhur si me intensitet PAR të lartë, ashtu edhe me të ulët. Shpërndarja e energjisë në formë nxehtësie analizohet nëpërmjet rritjes së vlerës të fluoreshencës minimale (F_0).

4.3.4 Përfundime

Aparati fotosintetik në bimë të larta reagon ndjeshëm ndaj ndryshimeve në kushtet e mjedisit. Lidhja e bimëve në kushtet e ndriçimit paracakton gjendjen fiziologjike të aparatit të tyre fotosintetik.

Ndikimi i intensitetit të dritës aktinike mbi bimën e ullirit është treguar nëpërmjet kurbave të dritës të tre sinjaleve dhe parametrave të PF dhe MR820 në figure 4.3.4. Efikasiteti kuantik i reduktimit të akceptoreve fundore në PhS 1, (ϕ_{R0}), është më i lartë në ndriçimin më të dobët. Në të njëjtën kohë, efikasiteti i PPhR në PhS 2, (ϕ_{P0}), arrin pllajë në $2000 \mu\text{mol hv m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Rezultatet janë në përputhje me vlerat fiziologjikisht të rëndësishme të intensitetit të ndriçimit, i cili ndryshon gjatë ditës dhe vitit. $200 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ janë plotësisht të mjaftueshme për funksionimin e ciklit Calvin-Benson, dmth., për të mbuluar nevojat anabolike të bimës, ndërsa $2000 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ është një vlerë ekstreme në zenitin e Diellit gjatë muajve të verës. Përdorimi i intensiteteve më të larta se $1500 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ është i detyrueshëm në aplikimin e JIP- testit, atëhere eksperimentatori është i sigurt, që arrihet maksimumi real, dmth ($F_P = F_M$).

Nga varësitë e ndryshme të shpejtesise së oksidimit të P700 (V_{ox}) - lineare, dhe e reduktimit të $P700^+$ (V_{red}), që ndjek ecurinë e ϕ_{P0} , bëhet e qartë, se të dyja i përgjigjen proceseve të ndryshme. E para tregon ndikimin vetëm të PPhR në PhS 1 dhe e dyta përcaktohet edhe nga fotooksidimi i P700 dhe nga re-reduktimi i saj nga elektronet që vijnë nga PhS 2. Meqe PhS 1 nuk frenohet (inhibim) nga intensitete të larta, mund të konsiderohet, se aktivizohet transporti ciklik elektronik, i cili nga ana e tij ndërmjetëson rritje të shuarjes jo-fotokimike të fluoreshencës.

Raporti i maksimumeve I_1 / I_2 të IC të DF konfirmon vërtetimin për zvogëlim të fluksit të ngacmimeve në RC me intensitete të ulëta. Sa me i lartë intensiteti i dritës, aq më shumë molekula kryejnë fluoreshencë. Fotosinteza është me efektive kur intensiteti i dritës bie brenda normale ekologjike afërsisht $300 \mu\text{E}$.

Matja e njëkohshme e kinetikave të fluorescencës së shpejtë dhe të vonuar dhe reflektimit të moduluar në 820 nm është një metodë informative për vlerësimin e dinamikës së reaksionit dhe gjendjes së bimës. Duke aplikuar metodën, ndjekim gjendjen e PhSA në momente të ndryshme dhe përmes parametrave të JIP-test, analizojmë reagimin e aparatit fotosintetik gjatë një ndryshimi në intensitetin e dritës aktinike në bimët e ullirit.

4.4 EFEKTI I KOHËS SË INKUBACIONIT NË 40°C MBI PhSA NË GJETHE ULLIRI

Rezultate dhe diskutime

Përveç periudhës standarde të temperimit për 1 min (Kreu 4.3, 4.4), janë aplikuar dhe inkubacione në 2, 5 dhe 10 minuta. Në këtë mënyrë është ndjekur dinamika e stresit në temperaturë të lartë mbi PhSA në gjethe ulliri. Kjo është vështirë e konstatueshme, duke parë IC te PF dhe V_t (figure 4.4.1). Duke krahasuar kurbat diferenciale dhe JIP parametrat, megjithatë shihet, se ndikim më të fortë rezulton te këtë inkubimi në 2 min. Ky fakt jep arsye për të menduar, që PhSA i nevojitet kohë (në kufijtë e 3-5 mins), për tu përshtatur ndaj temperaturave të larta.

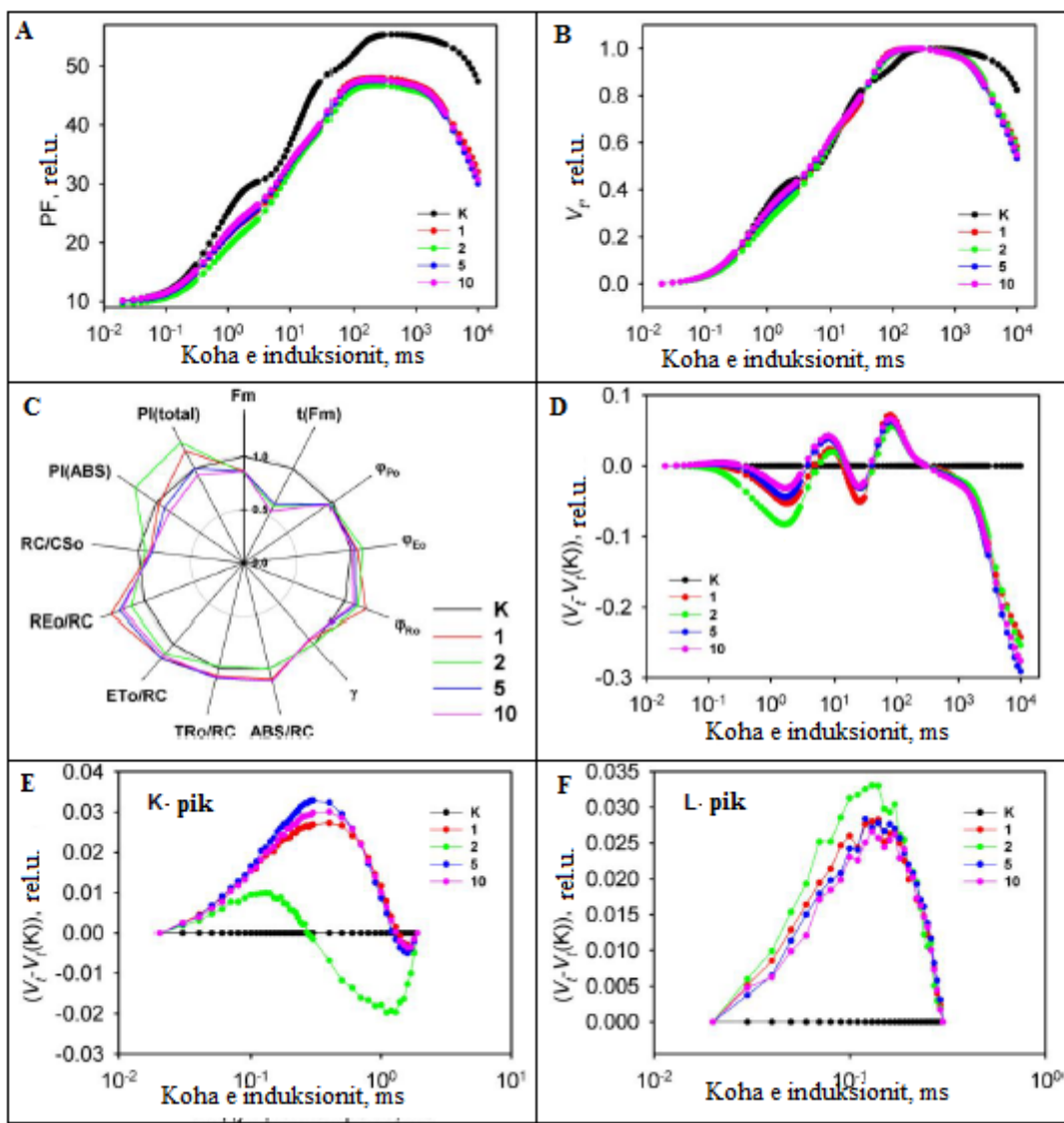


Fig. 4.4.1: Dinamika e stresit të temperaturës në gjethe ulliri në 40 °C. Periodat e inkubimit të përdorura janë: 1, 2, 5 dhe 10 mins. Kontrolli (K) është marrë temperaturë 20 °C pas inkubimit 1 min. Kushtet e tjera eksperimentale janë dhënë në figure 4.2.2 (Efekti i temperaturës).

- A) IC e PF, vlera absolute;
- B) IC e fluoreshencës relative variabile (V_t);

- C) Parametra të JIP-test kundrejt atyre në 20 °C;
- D) Ndryshime në formën e IC të Vt për gjithë periudhën e matjeve. Si sinjal referent është përdorur ai që merret në 20°C Vt (K)
- E) Ndryshime në formën e IC të Vt në periudhën O-J;
- F) Ndryshime në formën e IC në Vt të periudhës O-K.

Ndërkaq, për të filluar dëmtimet nuk është e mjaftueshme 1 min me amplitudë maksimale. Gjatë inkubacionit në 2 minsuta, K-pik zhduket për llogari të L-pik pozitiv maksimal. Shkak i mundshëm është prania e rigrupimeve dinamike të antenave, gjë që e bën të pamundur zbulimin e ndryshimeve në OEC. Në pjesën tjetër të inkubacioneve, ndryshimet në OEC dhe në antena janë të papërfillshme.

Dinamika e stresit ndaj amplitudës së sinjalit MR820 është më e theksuar përgjate ndriçimit me dritë infra të kuqe se sa të kuqe. Amplituda zvogëlohet monotonisht me rritje të kohës së inkubacionit, dmth efekti i inhibimit të temperaturës mbi PhS 1 rritet (figure 4.4.2).

Shpejtësitë e oksidimit ndryshojnë më pak, krahasuar me ato të reduktimit, duke treguar përsëri rezistencë më të madhe të PhS 1 ndaj ndryshimeve të temperaturës. Në dritë të kuqe, variacionet e Vox dhe Vred janë të kundërta, siç është edhe tek efekti i temperaturave të ndryshme. Ky fakt, së bashku me uljen të ngjashme të dy shpejtësive në ndricim infra-kuqe, konfirmojnë vëzhgimin, se në intensitete të ulëta i limituar është reduktimi i PQ nga PhS 2, dhe në të larta - tërheqja e elektroneve nga PQ në PhS 1. Shpejtësitë ndryshojnë pak, dmth. dinamika e stresit në 40°C për periudhën 10 - minutëshe të studimit është minimale.

Konstantja e shpejtësisë së ETC rreth PhS 1 (k1) pak ndryshon me rritjen kohës së inkubacionit, në ndryshim nga ajo e reduktimit nga donorët stromale (k2), e cila arrin maksimumi në 2 mins, pastaj zvogëlohet. Ky fakt është ndoshta i lidhur me termolabilitet më të madh të enzimave që marrin pjesë në oksidimin e donorëve stromal krahasuar me komplekset e proteinave përgjegjëse për ETC.

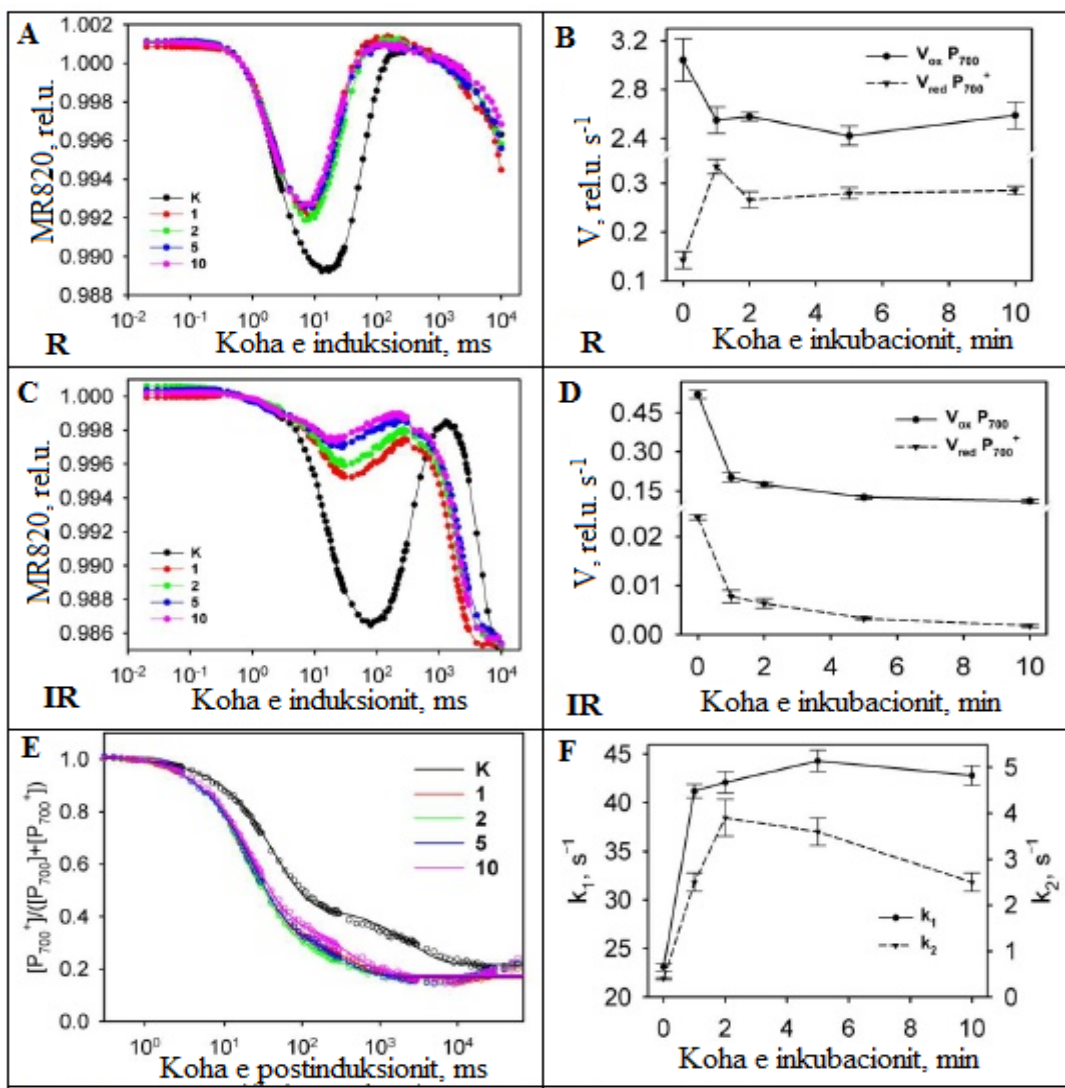


Fig. 4.4.2: Dinamika e stresit të temperaturës në PhSA në gjethet e ullirit në 40 °C. Kushtet eksperimentale në figure 4.2.3. Koha e inkubimit 0 mins i përgjigjet kushteve të kontrollit. A) kurbat e induksionit të MR820 në 4000 $\mu\text{mol hv.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dritë e kuqe (R); B) shpejtësitë e oksidimit të P700 (V_{ox}) dhe të re-reduktimit të P700⁺ (V_{red}), të marra nga pjerrësitë e drejtëzave, aproksimative në sinjalin e MR820 nga A) në interval kohe të dhënë; C) kurbat e induksionit të MR820 në 100% dritë infrared (IR); D) shpejtësitë e oksidimit të P700 (V_{ox}) dhe të re-reduktimit të P700⁺ (V_{red}), të marra nga pjerrësitë e drejtëzave, aproksimative në sinjalin e MR820 nga B) në interval kohe të dhënë; E) numri relative i P700⁺ në errësirë; F) konstantet e shpejtësisë (k_1 dhe k_2) të reduktimit të P700⁺ në errësirë, të marra nga pershtatje dy eksponenciale të pikave nga E).

KREU 5: SHËNIME PËRMBYLLËSE

5.1 PËRFUNDIME, PERSPEKTIVA

Konceptet themelore që rrinë përfund procesit të fotosintezës, si dhe një përshkrim i të kuptuarit aktual e perspektivës së çështjes, janë trajtuar. Biofizika e fotosintezës është dhënë në nivele të ndryshme të organizimit të materies: molekulare, qelizore dhe organizmi, duke kombinuar bashkë pamjen e përgjithshme me elementët specifik.

Është treguar mënyra, se si gjatë tranzitimit elektronik - përfshi transferimin e elektroneve ose migrimin e energjisë së rritur elektronike, ndodh ndërveprimi me gradët e lirisë vibracionale. Ky paraqitet si mjet për adresimin e mekanizmit të ndërveprimeve elektron-konformacionit, ku bazohet funksionimi i biomakromolekulave.

Mekanizmat e transferimit të elektronit në biostruktura janë trajtuar nëpërmjet një analize teorike të reaksioneve të transferimit të elektronit në biostruktura, reaksione këto me rëndësi të pazëvendësueshme për shumë transformime biologjike - nga fotosinteza te frymëmarrja aerobe.

Procesi ET mund të shihet si një proces relaksimi joradiativ nga një gjendje fillestare me donor elektroni të reduktuar dhe akceptor të oksiduar në një gjendje përfundimtare me donor të oksiduar dhe akceptor të reduktuar.

Reaksionet e transferimit të elektroneve në sistemet biologjike ndodhin për shkak të: i) distancës midis donorit dhe akceptorit, ii) ndryshimi standart i gjendjes së energjisë së lirë, iii) parametri Marcus ose energjia e riorganizimit, e cila mund të konsiderohet si sasia e energjisë, së nevojshme për të shtrembëruar gjeometrinë e reagentëve në atë të produkteve pa transferim real të elektroneve; iv) lloji i proteinave dhe struktura e tyre; v) kushtet e mjedisit dhe shumë faktorë të tjerë.

Në shumë raste është e dobishme një tablo e thjeshtuar, e cila konsideron shpejtësinë e procesit të transferimit të elektroneve si kryesisht të varur nga distanca midis donorit dhe akceptorit. Ky formalizëm supozon, që ndryshimi i energjisë së lirë të reaksionit dhe parametri Marcus janë të barabarta, kështu që procesi është optimal dhe diferencat e vrojtuar të shpejtësisë reflektojnë vetëm distancën mes dy llojeve reaguese. Praktikisht vërehet se rasti është i këtillë, korektimet konsiderojnë diferencat. Kjo pikëpamje supozon se shumica e proteinave janë mjaft të ngjashme në vetitë dielektrike, që të sillen në mënyrë të njëjtë, dhe detajet e strukturës së proteinave janë mesatarizuar, kështu që shpejtësia është një funksion vetëm i distancës midis donorit të elektronit dhe akceptorit.

Shqyrtimi i efekteve të mjedisit mbi reaksionet e transferimit të elektroneve në sisteme komplekse dinamike, është me interes të veçantë. Varësia nga temperatura e shpejtësisë të reaksionit fillestar të transferimit elektronik mund të pasqyrojë një shpërndarje të qendrave të reaksionit që kanë diferenca në faktorë të tillë si distancat ose orientimet ndërmjet kofaktorëve.

Për sqarimin e mekanizmave të reaksioneve të transferimit të elektroneve në sistemet biologjike, variacionet konformacionale duhet të përfshihen në model, si dhe cili është ndikimi i variacioneve konformacionale të sistemit mbi tunelimin kuantik të elektroneve në sistemet biologjike.

Mekanizmi fizik i transferimit të energjisë së antenave fotosintetike – teoria Forster, e cila është paster e aplikueshme në pigmentet e lidhura dobët të sistemeve fotosintetike, është diskutuar. Koncepti bazë i antenave fotosintetike është se drita e absorbuar nga një pigment mund të transferohet më pas tek pigmente të tjera. Një mënyrë e përshtatshme për të vëzhguar këtë proces të transferimit të energjisë është të rrezatohet një provë me dritë që absorbohet në mënyrë selektive nga një grup pigmentesh dhe pastaj të monitorohet fluoreshenca me origjinë një grup tjetër pigmentesh.

Transferimi i ngacmimit është në thelb një proces me veprim në distancë më të gjatë se transferimi i elektronit. Kjo është për shkak të natyrës së efektit dipol-dipol të lidhjes kuloniane, e cila nuk kërkon mbivendosje të drejtpërdrejtë të funksioneve valore molekulare si në transferimin e elektroneve. Kushtet e shkëmbimit të elektroneve mund të kontribuojnë në procesin e transferimit të energjisë. Ky mendohet të jetë rasti i shuarjes së gjëndjeve triplete të klorofilit nga karotenoidet, ku përfshihen tranzicione të ndaluara.

Mekanizmi, që aplikohet për pigmentet e lidhura dobët, mekanizmi Forster i transferimit të energjisë, është një proces transferimi joradiativ rezonance. Ndërkohë, procesi i transferimit elektroneve mund të shihet si një proces joradiativ relaksimi nga një gjendje fillestare me donor elektroni të reduktuar në një gjendje finale me akceptor të oksiduar. Kur pigmentet janë fizikisht shumë afër, e cila për klorofile shpesh është më pak se 10 Å, bashkëveprimi midis tyre manifestohet në një mënyrë cilësisht të ndryshme, të njohur si lidhje exciton. Të dyja bashkë, teoria standarde Forster dhe formalizmi exciton janë esenciale për kuptimin e kompleksit antenë fotosintetike.

Formulimi analitik i biofizikës së aparatit fotosintetik, sipas modeleve me kompleksitet të ndryshëm sa i përket arkitekturës së njësisë fotosintetike dhe mënyrave të komunikimit energjetik mes grupeve të pigmenteve, si dhe lidhjet e tyre me sinjalet eksperimentale fluoreshente janë derivuar, duke u bazuar në ‘Teoria e Flukseve të Energjisë në Biomembrana’ dhe mbi konceptin bazë, se rendimenti fluoreshent i PhS 2 përcaktohet nga gjendja – e hapur apo e mbyllur - e qendrës së reaksionit (RC).

Janë prezente disa nomenklatura, nuk ka një të tillë të unifikuar. Ajo çka realisht është e rëndësishme është të bëhet lidhje mes sinjalit të fluoreshencës dhe biofizikës së sistemit.

Për investigimin e sjelljes energjike të një sistemi fotosintetik sot përdoren shumë teknika eksperimentale. Fluoreshenca klorofile (CHL) a, megjithëse i korrespondon një fraksioni shumë të vogël të energjisë së shpërndarë nga aparati fotosintetik, pranohet gjerësisht për të kuptuar strukturën dhe funksionimin e tij.

JIP testi, çon në një kuantifikim të arkitekturës së PhS 2 dhe mënyrës së sjelljes. Simulimet numerike vërtetojnë se formulat e JIP-testit, megjithëse të nxjerra me disa kompromise teorike, japin përafrim të mirë të parametrave. Këta parametra përshkruajnë arkitekturën mesatare / sjelljen e mostrës të testuar, por gjithashtu sigurojnë mjete për detektimin, karakterizimin dhe kuantifikimin e heterogjenitetit të mostrës në nivele të caktuara.

Lehtësia e matjes, në çfarëdo kushte dhe për një kohë të shkurtër, qindra tranzitime të PF dhe përpunimi automatik i të dhënave e bëjnë JIP-testin një mjet të fuqishëm për skринing të shpejtë të 'vitalitetit' të bimëve, për më tepër që investigimet në fushë kryhen me saktësi të

lartë laboratorike. Zgjerimi në të ardhmen i këtij hulumtimi do të përmirësojë më tej aftësitë diagnostikuese.

Analiza e O-J-I-P e transient të fluorescencës, jep një informacion të pasur mbi PhS 2. Për të ardhmen, shkencetarët planifikojnë analiza të mëtejshme të transientëve, duke synuar avancim në dy drejtime: analizë biofizike për të arritur një kuptim më të mirë të strukturës dhe funksionit të aparatit fotosintetik, dhe zgjerimi i JIP-test për skringing të shpejtë të 'vitalitetit' të bimëve.

Investigimet e mëtejshme të transientëve të fluorescencës, të matura njëkohësisht dhe oksidimi i P700 do sigurojnë një kuptim më të mirë të të dy fotosistemeve dhe zinxhirit të transportit elektronik midis sistemeve, si dhe të sinjaleve të fluoreshencës, që do të përdoren për teste rutinë të vitalitetit dhe për simulime numerike. Të dy fotosistemet janë të ndarë, biokimikisht të pastruar dhe strukturat e tyre janë të përcaktuara. Proteinat, që i përbëjnë ato, janë identifikuar, dhe gjenet, që kodifikojnë ato, janë identifikuar dhe renditur. Ndërkaq, mbeten shumë çështje rreth se si bashkëveprojnë të dy fotosistemet dhe se si është rregulluar bashkë inputi i energjisë në to nga antenat dhe fluksi elektronik midis tyre.

Fluoreshenca klorofile a është një metodë e lehtë studimi, e ndjeshme, jep informacion të lartë, e shpejtë dhe jo-destruktive. Matja dhe analiza e parametrave të fluoreshencës klorofile a paraqitet si instrument për studimin e efektivitetit të aparatit fotosintetik për vlerësimin e gjëndjes fiziologjike të organizmave fotosintetikë, reagimet e aparatit fotosintetik nën stres dhe për vlerësimin e ndikimit të faktorëve të mjedisit në bimë.

Fluorimetri M-PEA (Multifunctional Plant Efficiency Analyzer) prodhim i Hansatech Instruments, Ltd. (King's Lynn, UK), i përdorur në këtë punë, ofron besueshmëri të lartë gjatë punës mbi objekte in vivo. Ai mund të regjistrojë njëkohësisht ndryshime të fotoindukuara të sinjalit të PF, DF e MR820 (Strasser et al. 2010; Goltsev et al. 2014). Tre llojet e sinjaleve tregojnë ndryshime karakteristike gjatë ndriçimit të objektit me dritë aktive fotosintetike, të cilat pasqyrojnë proceset dhe reaksionet e fotoindukuara që rrjedhin në qelizën e bimëve. Krahasimi i dinamikës së tre sinjaleve lejon një interpretim më të besueshëm të të dhënave. Matjet e njëkohshme të PF, DF dhe MR lejojnë grumbullimin dhe korrelacionin e informacionit plotësues për të tre domenet e transportit elektronik fotosintetik - ana donore e elektroneve PhS 2, transporti i elektroneve midis PhS 2 dhe PhS 1, dhe ana akceptore e elektroneve PhS 1.

Simulimet në proces provojnë të integrojnë fluoreshencën e vonuar (Tyystjärvi and Vass), në mënyrë që të sigurojnë njohje të re kombinimit specifik të ngarkesës dhe reaksionet mbrapa nga ana akceptore në donore të PhS 2.

Aparati fotosintetik i bimëve të larta përgjigjet ndjeshëm ndaj ndryshimeve në kushtet e mjedisit. Forca e influencës së jashtme përcakton në masë të madhe dhe efektin përfundimtar mbi organizmin bimor. Influenca të forta të faktorëve biotik dhe abiotik të mjedisit janë të afta të shkaktojnë ndryshime sinjifikative në strukturë dhe fiziologji ose dëmtime të bimëve. Ndërkaq faktorët me intensitet të ulët modifikojnë karakteristikat funksionale variabël të qelizës bimore, duke siguruar efikasitet maksimal të proceseve që rrjedhin në organizma (Strasser et al., 2000). Është treguar reagimi i PhSA në gjethe në fidanë *Olea Europaea* L. *Sativa* gjatë aplikimit të stresit relativisht të dobët, i cili nuk shkakton modifikime strukturore

të konsiderueshme dhe dëmtime të pakthyeshme në funksionet e qelizave. Tregohet mundësia e qelizës bimore të ndryshojë karakteristikat e saj, për të siguruar funksionim optimal në kushte të reja të jashtme, të krijuara nga ndryshimi i temperaturës dhe intensitetit të dritës.

Ndikimi i intensitetit të dritës aktinike mbi bimën e ullirit është treguar nëpërmjet kurbave të dritës të tre sinjaleve dhe parametrave të PF, DF dhe MR820 në figure 4.4.4. Efikasiteti kuantik i reduktimit të akceptoreve fundore në PhS 1, (ϕ_{Ro}), është më i lartë në ndriçimin më të dobët. Në të njëjtën kohë, efikasiteti i PPhR në PhS 2, (ϕ_{Po}), arrin pllajë në $2000 \mu\text{mol hv m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rezultatet janë në përputhje me vlerat fiziologjike të rëndësishme të intensitetit të ndriçimit, i cili ndryshon gjatë ditës dhe vitit. $200 \mu\text{mol hv m}^{-2} \text{s}^{-1}$ janë plotësisht të mjaftueshme për funksionimin e ciklit Calvin-Benson, dmth., për të mbuluar nevojat anabolike të bimës.

Nga varësitë e ndryshme të shpejtësisë së oksidimit të P700 (Vox) - lineare, dhe e reduktimit të P700^+ (Vred), që ndjek ecurinë e ϕ_{Po} , bëhet e qartë, se të dyja i përgjigjen proceseve të ndryshme. E para tregon ndikimin vetëm të PPhR në PhS 1 dhe e dyta përcaktohet edhe nga foto-oksidimi i P700 dhe nga re-reduktimi i saj nga elektronet që vijnë nga PhS 2. Meqë PhS 1 nuk frenohet (inhibim) nga intensitete të larta, mund të konsiderohet, se aktivizohet transporti ciklik elektronik, i cili nga ana e tij ndërmjetëson rritje të shuarjes jo-fotokimike të fluoreshencës.

Raporti i maksimumeve I_1 / I_2 të IC të DF konfirmon vrojtimin për zvogëlim të fluksit të ngacmimeve në RC me intensitete të ulëta.

Konstatohet ndikimi negativ i stresit dritor në fotosintezë, por ai akoma nuk është sqaruar plotësisht dhe pavarësisht punimeve të shumta, që tregojnë, se PhS 2 luan një rol të rëndësishëm në mbrojtjen e aparatit fotosintetik (Schreiber, 1986; Strasser et al., 2000; Force et al., 2003; Kalaji and Rutkowska, 2004), ende nuk ka studim të plotë dhe literaturë përkatëse mbi shpërndarjen e energjisë në PhS 2. Në kushtet e intensitetit të ulët të dritës pjesa më e madhe e energjisë dritore të përthithur përdoret në procesin e fotosintezës në sajë të efektivitetit të lartë të aparatit fotosintetik.

Efekti i temperaturës në bimët e ullirit treguar në figure 4.3.1, 4.3.2 dhe figure 4.3.3 është studjuar duke aplikuar metodën e matjes së njëkohshme të PF, DF dhe MR820. Janë analizuar parametra karakterizues, si efektivitetet kuantike të fluksit të elektroneve në PhS 2, PhS 1 dhe në zinxhirin e transportit të elektroneve midis dy fotosistemeve; përqëndrimin e qendrave aktive të reaksionit në PhS 2, kapacitetin elektronik në zinxhirin e transportit të elektroneve; parametrin total, që karakterizon produktivitetin në reaksionet fillestare në PhSA.

Temperaturat në diapazonin nga 0 deri në 50 °C janë të zakonshme për vegjetimin e kulturave bimore në Shqipëri dhe bimët e ullirit janë të afta ti rezistojnë ndikimeve afatshkurtëra. Njëkohësisht ndryshim i menjëhershëm pas qëndrimit të vazhdueshëm në 24 °C në temperaturë më të lartë (30-50 °C) ose në më të ulët (10-5 °C) shkakton reagim të komplikuar në PhSA të bimëve, me synim përshtatjen e qelizave të bimëve ndaj kushteve të reja të funksionimit.

Nëpermjet parametrave të JIP testit dhe sinjalit MR820 është analizuar reagimi stresant i PhSA në ndryshim të menjëhershëm të temperaturës në gjethe të fidanëve të ullirit dhe është treguar dinamika e kalimeve, të induktuara nga kërcimi në temperaturë të ulët dhe të lartë. Është treguar se nën ndikimin e temperaturës së ulët, efektiviteti i transportit të elektroneve ulet shpejtë në të gjitha segmentet e analizuara, pas të cilës rrjedhin procese, të cilat kompensojnë këtë ulje. Në ngrohje të menjëhershme deri në 40 °C vrojtohet rritje e efektivitetit të transportit të elektroneve, kurse në temperaturë më të lartë zhvillohen procese të inaktivimit të reaksioneve fotosintetike. Analiza e sinjalit të shpërndarjes në dritën infra të kuqe (820 nm) tregon ndryshimin midis reaksioneve të PhSA ndaj temperaturës së lartë dhe të ulët. Në temperaturat e larta ndodh inaktivim i lidhjes midis dy fotosistemeve, ku PhS 1 ngelet funksionale edhe në 50 °C. Stresi i temperaturës së ulët (kalimi 24 °C – 5 °C) shkakton inaktivim të përkohshëm në transportin elektronik mes sistemeve.

Ndjeshmëria ndaj nxehtësisë në vende të ndryshme të zinxhirit të transportit të elektroneve zvogëlohet në rendin e mëposhtëm: (RC e PhS 2) > (QA-PQ-pool) > (PQ.H2-PC-PhS 1 - akceptorë të PhS 1).

Parametri fenomenologjik PI(ABS) është stabil në intervalin nga 10 deri në 40 °C, zvogëlohet pak në 5 °C, ndërsa nga 45 deri në 55 °C zvogëlohet rreth 40 herë.

Amplituda e temperaturës ditore dhe vjetore ndryshon në kufij të gjerë mbi Tokë. Në gjethet e ullirit (figure 4.3.1, 4.3.2 dhe figure 4.3.3) temperatura më të larta se 45 °C influencojnë dukshëm në P680 (ϕP_o) dhe më dobët në P700 (V_{ox}). PhS 2 është më shumë termolabil se PhS 1. Temperaturat e ulta (5, 10 °C) zvogëlojnë shuarjen jo-fotokimike, ndërsa të lartat e zmadhojnë. Ndjeshmëri të lartë tregon transporti i elektroneve (niveli i fazes J, ϕ_{E_0H} ϕ_{R_0}) (shtojca), me siguri për shkak të rritjes së energjisë së transportuesve, të nevojshme për transferimin e elektroneve, si dhe prania e transportuesve të levizshëm (PQ dhe PC), difuzioni i të cilëve rritet me rritjen e temperaturës.

Në temperatura të larta (50°C) vërehet shfaqja e K-pik i vërtetë pozitiv. Veç dëmtimit të OEC, në 55 °C komplekset antenë (LHC) disociojnë nga RC-të, duke gjykuar nga rritja e ABS/RC. L-pik pozitive tregojnë zvogelim të grupimit mes tyre që në temperaturë jodestruktive. Në temperatura të ulëta në PhS 2 i limituar është ET mes Q_A dhe Q_B , për të cilin gjykohet nga K-pik negative, kurse grupimi rritet – L-pik negative. Reduktimi i $P700^+$, për shkak si të ETC, ashtu edhe të donatorëve stromal përshejtohet me temperaturën.

Sinjali i PF mund të normohet dhe midis dy pikave karakteristike, p.sh. O-J dhe O-K, pas të cilës paraqitet sërish nën formën e kurbave diferenciale në intervalet respektive. Ketu përftohen pike pozitive ose negative në K dhe L pik respektivisht. Kjo ecuri aplikohet, për të vizualizuar ndryshimet në pjesët më të shpejta të IC. Piku në K lidhet me ekuilibrin (balancin) midis ET nga ana akceptore dhe donore e PhS 2. Kur ET nga OEC vonohet vërehet pik pozitiv, dhe kur është limituar ET drejt Q_B – negativ (figure 5.1). Klasikisht K-pik shfaqet në vet IC të PF në temperatura të larta, të cilat destabilizojnë strukturën e OEC. Ajo nuk mund të dhurojë elektron drejt $P680^+$ të oksiduar pas rënies të fotonit të dytë. Ky i fundit është shuarës jofotokimik me efektivitet të lartë i fluoreshencës. Pas absorbimit të fotonit të parë për re-reduktim në RC do të hyjë elektron nga Yz, por nëse OEC është me aktivitet të dëmtuar

mbetja tirozine do të ngelet në gjendjen Yz^+ . Për këtë shkak fluoreshenca fillimisht rritet deri në 0,3 ms, pas të cilës fillon të zvogëlohet, d.m.th. formohet K-pik pozitiv.

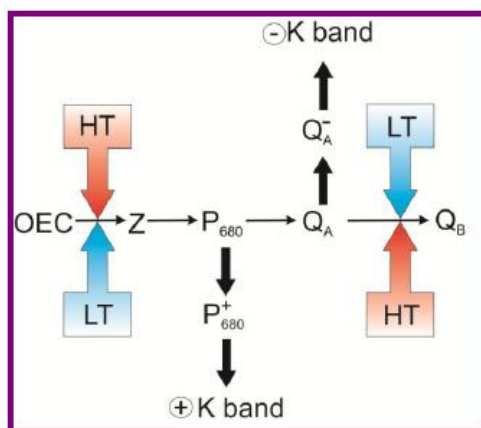


Fig. 5.1: Skema sqaron formimin e K-pik (band) si pasojë e ndryshimeve të induktuara nga temperatura në PhS 2. Temperaturat e larta (HT- high temperatures) sfumojnë ET në anën donore të PhS 2, ndërsa shpejtojnë në anën akceptore, si rezultat i të cilës formohet $P680^+$, dmth K-pik pozitiv. Veprimi i temperaturave të ulta (LT – low temperatures) është pikërisht e kundërta dhe çon në K-pik negative, për shkak të grumbullimit të Q_A^- .

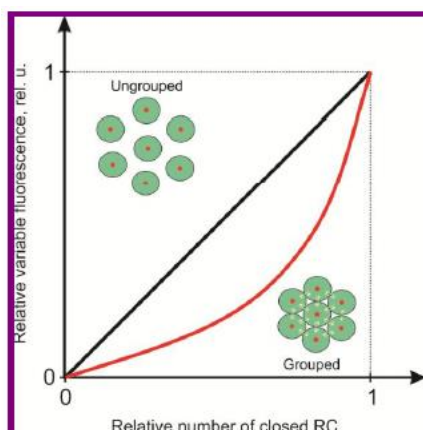


Fig. 5.2: Varësia e V_t nga numri relative i RC-ve të mbyllura në nivele të ndryshme grupimi të RC-ve të veçanta. Vija e zezë – RC të pagrupuara , kurba e kuqe – RC të grupuara.

Është treguar efekti i kohëve të ndryshme të inkubcionit (nga 1 deri 10 min) në 40 °C mbi PhSA në gjethë fidanë *Olea Europaea L. Sativa* (figure 4.5.1, 4.5.2). PhSA i duhen rreth 5 minuta, që të përshtatet në temperaturë të lartë. Dinamika e stresit në temperaturë të lartë në bimë ulliri shprehet relativisht më dobët, duke gjykuar nga sinjlet e PF, MR820 dhe parametrat e JIP-test, Vox dhe Vred. Ky fakt përforcon rezistencën e lartë të ullirit.

5.2 KONTRIBUTE, REKOMANDIME

Përzgjedhja e temës, është specifike pasi tradicionalisht fotosinteza trajtohet nga biologë e kimistë, e pak nga fizikanë e matematicienë. Punimi paraqet veshtrim të fizikanit për një proces fundamental biologjik, i cili zgjedh të trajtoje biofizikën e fotosintezës në nivele të ndryshme të organizimit: molekulare, qelizore dhe organizmi, si dhe lidhjen biofizikë – eksperiment. Realizimi i këtij konceptimi bëhet nga një strukture delikate ndërtimi të punimit.

Punimi realizon qëllimin - studimi i koncepteve themelore biofizike që rrinë përfund procesit të fotosintezës, përshkrimi i të kuptuarit aktual e perspektivës së çështjes, - aplikimi i metodave fluoreshente për studimin dhe vlerësimin e gjendjes fiziologjike në aparatit fotosintetik, dhe – detyrat e definuara.

Janë analizuar mekanizmat fizikë të proceseve të transformimit të energjisë së elektroneve në biostrukturat. Me rëndësi të veçantë në proceset biologjike janë reaksionet e transferimit të elektroneve, të cilat janë analizuar me hollësi.

Teoria Forster për mekanizmin fizik të migrimit të energjisë në antenna fotosintetike është diskutuar dhe në këtë funksion janë ballafaquar konsideratat mes ET dhe migrimit të energjisë: 1. Procesi ET mund të shihet si një proces relaksimi joradiativ nga një gjendje fillestare me donor elektroni të reduktuar dhe akceptor të oksiduar në një gjendje përfundimtare me donor të oksiduar dhe akceptor të reduktuar. 2. Mekanizmi, që aplikohet për pigmentet e lidhura dobët, mekanizmi Forster i transferimit të energjisë, është një proces transferimi joradiativ rezonance.

Është zberthyer dhe përdorur Teoria e Flukseve të Energjisë në Biomembrana në Analiza e Transferimeve të Fluoreshencës Klorofile a – sipas Strasser, e cila është një teori – metodologji, që bën lidhjen mes sinjalit të fluoreshencës me biofizikën e sistemit.

Është përzgjedhur dhe aplikuar metoda e fluoreshencës klorofile a, është përdorur fluorimetri m-PEA, i cili mbi një objekt mund të vëzhgojë njëkohësisht disa karakteristika lumineshente dhe optike.

Është treguar, se nëpërmjet analizës së tranzicioneve të induktuara të fluoreshencës klorofile a të shpejtë, të vonuar dhe shpërndarjes së dritës në 820 nm mund të kryhet karakterizim in vivo i të gjithë komponenteve të aparatit fotosintetik në bimët e larta (fidanë *Olea Europaea L. Sativa*).

Është treguar se reaksionet fotosintetike, të cilat varen nga ndriçimi në bimën e ullirit janë me efektive në ndriçim të dobët $200 \mu\text{mol hv}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, intensitet ky që bie brenda normave ekologjike të basejnit Mesdhetar në të cilin rritet bima e ullirit.

Janë përpunuar qasje për të marrë informacion plotësues për gjendjen e aparatit fotosintetik, të bazuara në analizën e dinamikave diferenciale të fluoreshencës variabile në fillim të tranzicionit të induktuar – të ashtuquajturat K-pik dhe L-pik, që karakterizojnë aktivitetin e sistemit të zhvillimit të oksigjenit dhe shkallën e grupimit të kompleksit PhS 2. Nga shfaqja e K dhe L-pik në kurbat diferenciale respective të PF, lehtë mund të regjistrohen ndryshime

minimale të induktuara nga temperatura, të lidhura respektivisht me rigrupimin e komplekseve antenë në membranat tilakoide dhe fluksin e elektroneve nëpër PhS 2. K dhe L-pik mund të shfrytëzohen me sukses edhe në ndjekjen e ndikimit të faktoreve të tjerë ekologjik mbi komponentet respektive të aparatit fotosintetik. Parametra të tjerë të ndjeshëm ndaj temperaturës janë shpejtësitë e oksidimit dhe re-reduktimit të P700.

Është treguar, se PhS 2 është më i ndjeshëm ndaj temperaturave të larta, PhS 1 – më i ndjeshëm ndaj temperaturave të ulta, dhe transporti elektronik midis dy fotosistemeve është i ndjeshëm ndaj çdo lloj ndryshim temperature.

Ka rezultuar se bima e ullirit është relativisht rezistente ndaj faktorit temperaturë.

Në punën tonë ne kemi karakterizuar bimë native të përshtatura për ndriçim të lartë në habitatin e tyre. Karakteristikat e kurbave të induksionit të PF dhe MR820 nuk treguan devijime sinjifikative. U gjet se kurbat e induksionit të DF ndryshojnë në mënyrë karakteristike, varësisht nga intensiteti i dritës. Bima e ullirit ka afinitet të larte ndaj dritës.

Reaksionet fotosintetike janë shumë të ndjeshme ndaj ndryshimit të kushteve të jashtme, prandaj ato janë përdorur si model për të studiuar reagimin e bimëve. Për vlerësim të plotë të ndikimit të këtyre ndryshimeve duhet të ekzistojë qasje, e cila të lidh një kurbë induksioni ose parametër të dhënë me gjendjen, si të etapave të vecanta nga transformimi i energjisë diellore në PhSA: absorbimi nga komplekset antenë, reaksionet fillestare fotokimike, reaksionet e transportit të elektroneve, gjenerim të potencialit protonik ndërmembranor dhe reaksioneve të pavarura nga drita të reduktimit të CO₂; ashtu edhe të gjithë PhSA, e prej andej dhe e organizmit.

Për menaxhimin efektiv të kulturave, pentarisë, pyjeve dhe bimësisë natyrore nevojiten mënyra të ndryshme vlerësimi të gjendjes fiziologjike të bimëve, vitalitetin e tyre, si dhe prezenca e forcave për përballimin e stresit. Një aspekt i rëndësishme në krijimin e bimëve me rezistencë të lartë ndaj kushteve të vështira të mjedisit shfaqen teknikat eksperimentale, që japin mundësi në kushte in vivo të monitorohet gjendja fiziologjike e bimëve dhe të vërtetohet përgjigja e tyre ndaj stresit, si dhe të bëjë vlerësimin e potencialit të tyre për të mbijetuar në këto kushte të pafavorshme.

Të kuptuarit e përshtatjes ndaj stresit biotik dhe abiotik duhet të jetë prioritet i projekteve kërkimore ndërkombëtare. Vëzhgimi dhe studimi nga rastet ekzistuese në natyrë që shfaqin strategji të jashtëzakonshme të mbijetesës ndaj stresit mund të bëhen esenciale për inxhinierimin e bimëve transgjenike. Këtu përshkruhen qasjet eksperimentale për të studiuar gjendjen e aparatit fotosintetik dhe mënyrat e llogaritjes së parametrave të rëndësishëm strukturorë dhe funksionalë, që karakterizojnë efikasitetin kuantik, dhe shpejtësitë e përgjigjes së transportit të elektroneve në PhS 1 dhe PhS 2.

Rekomandojmë që është koha për përdorim masiv të instrumenteve për matjen e njëkohshme dhe paralele të fluoreshencës, të fluksit elektronik në gjithë zinxhirin, aktivitetin e PhS 2 dhe PhS 1, evolucionin e O₂ dhe absorbimin e CO₂ në bimët, sepse qëllimi i marrjes së biomasës, biokarburanteve dhe bioenergjisë varen nga efikasiteti i fotosintezës në të gjitha nivelet.

Ne studimin e procesit dhe aparatit fotosintetik, metoda e fluoreshencës ofron informacion jashtëzakonisht të plotë e të pasur në vlera parametrash, madhësi fizike, kimike, etj. Teoritë biofizike, fizike, kimi, etj., të përdorura, kërkojnë një kuptim të koncepteve themelore të kimit fizike, përfshirë termodinamikën, kinetikën dhe mekanikën kuantike. Në aplikimin e këtij bagazhi shkencor, studjuesit përdorin lidhjen shkak / pasojë - studjohen influencat e faktoreve biotikë e abiotikë duke aplikuar çdo faktor me vehte, jo të kombinuar. Në vijim interpretimi bëhet individualisht. Vështirë që një studjues të mund të mbulojë një sfond kaq të gjerë teori kimike, fizike, biologjike, etj. Rekomandojmë unifikim parametrash, përdorim më të gjerë të matematikës, ndoshta ndërtim të funksioneve dhe ekuacioneve të Hamilton - Lagranzhit me parametra të përgjithësuar.

Hulumtimi në natyrën e fotosintezës është vendimtar, sepse vetëm duke kuptuar fotosintezën mund ta kontrollojmë atë dhe të shfrytëzojmë parimet e saj në dobi të njerëzimit.

LISTA E PUBLIKIMEVE TË LIDHURA ME TEMËN E DISERTACIONIT

Rezultatet kryesore të temës së disertacionit janë publikuar në:

Botime:

1.Effect of Light Intensity on Chlorophyll Fluorescence in Olive Plants –Application of mPEA Fluorometer - Emilia ÇAÇI, 2017. ISSN: 2218-2020, © Agricultural University of Tirana Albanian j. agric. sci. 2017;16 (4): 163-172.

<http://ajas.inovacion.al/archive-volume-16-issue-iv/>

2.Mechanisms of electron transfer in biostructures - Emilia CHACHI,ISSN 2074-0867,Journal of Natural and Technical Sciences – Academy of Sciences of Albania– JNTS No 46 / 2018 (XXIII): 103-128.

3. Temperture Effects on Olive Plants probed by Simultaneous Measurements of the Kinetics of Prompt Fluorescence, Delayed Fluorescence and Modulated 820 nm Reflection -

Emilia CHACHI, Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology (JMEST) ISSN: 2458-9403 Vol. 6 Issue 7, July – 2019: 10455 – 10465.

www.jmest.org

4.Temperture effects on olive plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence and delayed fluorescence - Emilia ÇAÇI, *Buletini Shkencor*ISSN 2078-7111, Fan S. Noli University, Korce – në botim

Pjesëmarrje në konferenca:

1.Experimental In Vivo Measurements of Light Emission in Plants – EmiliaÇAÇI,ISCPS 2016 1st International Scientific Conference on Professional Sciences, Aleksander Moisiu University, Durrës, 25 – 26 Nëntor 2016 Abstract Book. ISBN: 978-9928-4381-5-7, Conference Proceeding.

2.Aplication of biophysical luminescence methods for study functional state of the photosynthetic apparatus - EmiliaÇAÇI,The center of agricultural technology transfer in Vlore, 5 Tetor 2016.

3.The physical mechanism for energy transfer of photosynthetic antennas – Forster theory – Emilia CHACHI,10th International Conference Structure and Stability of Biomacromolecules SSB 2017, Slovak Academy of Sciences Institute of Experimental Physics Department of Biophysics, September 4 – 7 2017, Košice, Slovakia. Book of Contributions, 10th International Conference Structure and Stability of Biomacromolecules SSB2017, September 4 – 7, 2017, Košice, Slovakia ISBN: 978-80-89656-19-6 EAN: 9788089656196 , Conference Proceeding.

4.The Multifunctional Plant Efficiency Analyser m-PEA – an unique instrument for experimental approaches to studying the state of the photosynthetic apparatus – Emilia

ÇAÇI, 1-st International Conference on research and New Advamces in computer science and information Technology. 30 June-1 July 2017, Ismail Qemali University, Vlore.

5. Comparative investigation of the moderate heat stress reaction between two ecotypes of plane (platanaus orientals) and olive (olea Europea) trees. - M. PAUNOV¹ , B. PAVLOVA¹ , E. CHACHI² , ST. DIMITROVA¹ , K. DANKOV¹ , V. VELIKOVA³ , TS. TSONEV³ , M. KOUZMANOVA¹ , V. GOLTSEV¹ . Scientific conference "Kliment's days", 17-18 novembre 2016, "St. Kliment Ohridski" University of Sofia, Biological Faculty, Sofia, Bulgaria.

LITERATURĂ E PËRDORUR

- Adams W.W.I., Demmig-Adams B., Rosenstiel T.N., Ebbert V. (2001) Dependence of photosynthesis and energy dissipation activity upon growth form and light environment during the winter. *Photosynth. Res.* **67**: 51–62.
- Adir N., Zer H., Shokhat S., Ohad I. (2003) Photoinhibition – a historical perspective. *Photosynth. Res.*, **76**:343–370.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD(1994) Molecular Biology of the Cell (3rd ed.). New York.
- Aleksandrov I.V. and Goldanskii V.I., 1984: Electron transfer driven by conformational variations; *Chem. Phys.* **87**, 455 (1984).
- Allakhverdiev S.I. (2011) Recent progress in the studies of structure and function of photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **104**: 1:1–8
- Allakhverdiev S.I., Klimov V.V., Carpentier R. (1994) Variable thermal emission and chlorophyll fluorescence in photosystem II particles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**: 1:281–285.
- Allakhverdiev S.I., Los D.A., Mohanty P., Nishiyama Y., Murata N. (2007) Glycinebetaine alleviates the inhibitory effect of moderate heat stress on the repair of photosystem II during photoinhibition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**: 12:1363–1371.
- Allakhverdiev S.I., Murata N. (2004) Environmental stress inhibits the synthesis *de novo* of proteins involved in the photodamage – repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta*, **1657**: 1:23–32.
- Allen J.F. (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci.*, **8**: 15–19.
- Ames J., van Gorkom H.J. (1978) Delayed fluorescence in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **29**:47–66.
- Andrews J.R., Fryer M.J., Baker N.R. (1995) Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. *J. Exp. Bot.*, **46**:1195–1203.
- Angelini G., Ragni P., Esposito D., Giardi P., Pompili M.L., Moscardelli R., Giardi M.T. (2001) A device to study the effect of space radiation on photosynthetic organisms. *Physica Medica*, v. XVII, Supplement 1, 1st International Workshop on Space Radiation Research and 11th Annual NASA Space Radiation Health Investigators' Workshop.
- Arnon, D. I. (1984) The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 1–5.
- Arnon, D. I., Allen, M. B. and Whatley, F. R. (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature*, **174**, 394–396.
- Aro E.-M., McCaffery S., Anderson J.M. (1993) Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.*, **103**: 835–843.
- Arthur W.E., Strehler B.L. (1957) Studies on the primary process in photosynthesis. I. Photosynthetic luminescence: Multiple reactants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**:507–526.

- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **50**:601–639.
- Asada K. (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos. Trans. R. Soc. London B*, **355**:1419–1431.
- Baena-Gonzalez E., Barbato R., Aro E. (1999) Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta***208**:196–204.
- Bailey S., Horton P., Walters R.G. (2004) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta*, **218**:793–802.
- Bailey S., Walters R.G., Jansson S., Horton P. (2001) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate Low Light and High Light Responses. *Planta*, **213**:794–801.
- Baker N.R., Rosenquist E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.*, **55**: 1607–1621.
- Balabin I., Onuchic J.N., 2004: Dynamics of Electron Transfer Pathways in Cytochrome c Oxidase, *Biophysical Journal* Volume 86 March 2004, 1813–1819.
- Barber J., Neumann J. (1974) An energy-conservation site between H₂O and DBMIB: Evidence from msec delayed light and chlorophyll fluorescence studies in chloroplasts. *FEBS Lett.*, **40**:186–189.
- Baroli I., Melis A. (1998) Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the Photosystem II light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta*, **205**:288–296.
- Basu P.S., Sharma A., Sukumaran N.P. (1998) Changes in net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by waterstress. *Photosynthetica*, **35**:13–19.
- Bendall D. S., 1996: Protein Electron Transfer, Hardcover, Student Edition of Textbook, 1996.
- Berden-Zrimec M., Drinovec L., Molinari I., Zrimec A., Umani S.F. (2008) Delayed fluorescence as a measure of nutrient limitation in *Dunaliella tertiolecta*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **92**:13–18.
- Berger B., Parent B., Tester M. (2010) High-throughput shoot imaging to study drought responses. *J. Exp. Botany*, **61**: 13:3519–3528.
- Björkman O., Demmig B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, **170**: 4:489–504.
- Blankenship R.E.(2002): Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Department of Chemistry and Biochemistry Arizona State University Tempe,Arizona USA.
- Blankenship R.E., 2014: Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Blackwell Science, USA, 2014. -321c.
- Blankenship Robert E., Molecular Mechanisms of Photosynthesis; 2014.
- Bolton, J. R. and Hall, D. O. (1979) Photochemical conversion and storage of solar energy. *Ann. Rev. Energy*,**4**, 353–401.

- Born-Oppenheimer Approach: Diabatization and Topological Matrix". Beyond Born-Oppenheimer: Electronic Nonadiabatic Coupling Terms and Conical Intersections. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. 28 March 2006. pp. 26
57. [doi:10.1002/0471780081.ch2](https://doi.org/10.1002/0471780081.ch2). ISBN 978-0-471-78008-3.
- Bottin H., Mathis P. (1985) Interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center: a kinetic study by flash absorption spectroscopy. *Biochem.*, **24**: 23:6453–6460.
- Boyer P.D. (1997) The ATP synthase – A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**:717–749.
- Brettel K., 1997: Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1318: 322–373.
- Brettel K., Leibl W. (2001) Electron transfer in Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**:100–114.
- Buchta J., Grabolle M., Dau H. (2007) Photosynthetic dioxygen formation studied by time-resolved delayed fluorescence measurements – Method, rationale, and results on the activation energy of dioxygen formation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**:565–574.
- Buchta J., Shutova T., Samuelsson G., Dau H. (2008) Time-resolved delayed chlorophyll fluorescence to study the influence of bicarbonate on a green algae mutant Photosystem II. In: Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis (Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B (eds.)). – Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 35–38.
- Bukhov N.G., Carpentier R. (2000) Heterogeneity of photosystem II reaction centers as influenced by heat treatment of barley leaves. *Physiol. Plant.*, **110**:279–285.
- Burritt D.J., Mackenzie S. (2003) Antioxidant Metabolism during Acclimation of *Begonia × erythrophylla* to High Light Levels. *Ann. Bot.*, **91**: 7:783–794.
- Butler WL and Strasser RJ (1977a) Tripartite model for the photochemical apparatus of green plant photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3382–3385
- Calef D.F. and Wolynes P.G., 1983: Classical solvent dynamics and electron transfer. II. Molecular aspects; *J. Chem. Phys.* 78, 470 (1983).
- Calvin, M. (1989) 40 years of photosynthesis and related activities. *Photosynth. Res.* **21**, 3–16.
- Calvin–Benson Cycle. In: Gargaud M. et al. (eds) *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cantor, C. R. and Schimmel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry Part II. Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W. H. Freeman, San Francisco
- Cantor, C. R. and Schimmel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry Part II. Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Chernev P., Goltsev V., Zaharieva I., Strasser R.J. (2006) A highly restricted model approach quantifying structural and functional parameters of Photosystem II probed by the chlorophyll *a* fluorescence rise. *Ecol. Eng. Envir. Protect*, **2**:19–29.
- Christen G., Reifarth F., Renger G. (1998) On the origin of the '35-ms kinetics' of P680^{•+} reduction in photosystem II with an intact water oxidising complex. *FEBS Lett.*, **429**:49–52.

- Christen G., Steffen R., Renger G. (2000) Delayed fluorescence emitted from light harvesting complex II and Photosystem II of higher plants in the 100 ns–5 ms time domain. *FEBS Lett.*, **475**:103–106.
- Cogdell, R. J., Isaacs, N. W., Howard, T. D., McLuskey, K., Fraser, N. J. and Prince, S. M. (1999) How photo- synthetic bacteria harvest solar energy. *J. Bacteriol.* **181**, 3869–3879
- Coleman L.W., Rosen B.H., Schwartzbach S.D. (1988) Preferential Loss of Chloroplast Proteins in Nitrogen Deficient Euglena. *Plant Cell Physiol.*, **29**: 6:1007–1014.
- Condon E. (1926): *A theory of intensity distribution in band systems. Physical Review.* **28**: 1182–1201. Bibcode:1926PhRv...28.1182C. doi:10.1103/PhysRev.28.1182.
- Condon E. (1928). "Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Physical Review.* **32**:858872. Bibcode:1928PhRv...32..858C. doi:10.1103/PhysRev.32.858.
- Croxdale J.G., Omasa K. (1990a) Chlorophyll *a* Fluorescence and Carbon Assimilation in Developing Leaves of Light-Grown Cucumber. *Plant Physiol.*, **93**: 3:1078–1082.
- Croxdale J.G., Omasa K. (1990b) Patterns of Chlorophyll Fluorescence Kinetics in Relation to Growth and Expansion in Cucumber Leaves. *Plant Physiol.*, **93**: 3:1083–1088.
- Dai Y., Shen Z., Liu Y., Wang L., Hannaway D., Lu H. (2009) Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. *Environ. Exp. Bot.*, **65**: 2–3:177–182.
- Dakhnovskii Y. and Coalson R.D., 1995: Manipulating reactant–product distributions in electron transfer reactions with a laser field; *J. Chem. Phys.* **103**, 2908 (1995).
- Dau H., Sauer K. (1996) Exciton equilibration and photosystem II exciton dynamics – a fluorescence study on photosystem II membrane particles of spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, **1273**:175–190.
- De Vault D., 1980: Quantum mechanical tunnelling in biological systems; *Q. Rev. Biophys.* **13**, 387 (1980).
- Demmig-Adams B., Adams III W.W., Barker D.H., Logan B.A., Bowling D.R., Verhoeven A.S. (1996) Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.*, **98**: 2:253–264.
- Devi S.R., Prasad M.N.V. (1996) Influence of ferulic acid on photosynthesis of maize: analysis of CO₂ assimilation, electron transport activities, fluorescence emission and photophosphorylation. *Photosynthetica*, **32**.
- Dogonadze R.R. and Levich V.G., 1961: Adiabatic theory of electron-processes in solution; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **26**, 193 (1961).
- Duysens L.N.M., 1956: The study of reaction centers and of the primary and associated reactions of photosynthesis by means of absorption difference spectrophotometry; *Biochim. Biophys. Acta* **19** (1956) 188.

- Duysens LNM and Sweers HE (1963) Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: Japanese Society of Plant Physiologists (eds) *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, pp 353–372. University of Tokyo Press, Tokyo
- Duysens, L. M. N., Ames, J. and Kamp, B. M. (1961) Two photochemical systems in photosynthesis. *Nature*, **190**, 510–511.
- Duysens, L.M.N.(1989) The discovery of the 2 photosynthetic systems – a personal account. *Photosynth. Res.* **21**, 61–79.
- Edwards G., Baker N. (1993) Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis *Photosynth. Res.*, **37**: 2:89–102.
- Emerson, R. and Arnold, W. (1932a) A separation of the reactions in photosynthesis by means of intermittent light. *J. Gen. Physiol.* **15**, 391–420.
- Emerson, R. and Arnold, W. (1932b) The photochemical reaction in photosynthesis. *J. Gen. Physiol.* **16**, 191–205.
- Emerson, R., Chalmers, R. and Cederstrand, C. (1957) Some factors influencing the longwave limit of photosynthesis. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, **43**, 133–143.
- Feild T.S., Lee D.W., Holbrook N.M. (2001) Why Leaves Turn Red in Autumn. The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-Osier Dogwood. *Plant Physiol.*, **127**: 2:566–574.
- Fermi E. (1950): *Nuclear Physics*. University of Chicago Press. ISBN 978-0226243658., formula VIII.2
- Ferreiro-Arman M., Da Costa J.-P., Homayouni S., Martín-Herrero J. (2006) Hyperspectral image analysis for precision viticulture. In: *Image Analysis and Recognition* (Campilho A. and Kamel M, eds.). – Springer-Verlag, Berlin, p. 730–741.
- **Finazzi G., Forti G.** (1995) The effect of protons on PS2 photochemistry. In: *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Mathis P. ed.), vol. III. – Springer, p. 175–178.
- Fleming, G. R. and van Grondelle, R. (1997) Femtosecond spectroscopy of photosynthetic light-harvesting systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 738–748.
- Flexas J., Escalona J.M., Evain S., Gulías J., Moya I., Osmond C.B., Medrano H. (2002b) Steady-state chlorophyll fluorescence (Fs) measurements as a tool to follow variations of net CO₂ assimilation and stomatal conductance during water-stress in C₃ plants. *Physiol. Plant.*, **114**: 2:231–240.
- Force L, Critchley C, Rensen JJS: **New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants**. *Photosynth. Res.* **78**:17-33, 2003.
- Force L., Critchley C., van Rensen J.S. (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynth. Res.*, **78**: 1:17–33.
- Förster Th. (1965): *Delocalized Excitation and Excitation Transfer*. In *Sinanoglu, Oktay. Modern Quantum Chemistry. Istanbul Lectures. Part III: Action of Light and Organic Crystals. 3. New York and London: Academic Press. pp. 93–137.*
Retrieved 2011-06-22.
- Förster Theodor (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz [Intermolecular energy migration and fluorescence]. *Annalen der Physik* (in

- German). 437: 55– 75. Bibcode: 1948AnP...437...55F.
doi:10.1002/andp.19484370105.
- Förster, Th. (1965): Delocalized excitation and excitation transfer. In: Modern Quantum Chemistry Istanbul Lectures, vol. 3 (ed.O. Sinanoglu), Academic Press, New York, pp. 93–137.
 - Fracheboud Y. (2000) Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. <http://jaguar.fcav.unesp.br/download/deptos/biologia/durvalina/TEXT0-71.pdf>.
 - Fracheboud Y., Leipner J. (2003) The Application of Chlorophyll Fluorescence to Study Light, Temperature, and Drought Stress. In: *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (DeEll J. and Toivonen P.A. eds.). – Springer, USA, p. 125–150.
 - Franck J. (1926): *Elementary processes of photochemical reactions. Transactions of the Faraday Society.* 21: 536–542. doi:10.1039/tf9262100536.
 - Franck-Condon Principle. 1996, 68, 2243. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition (1997). www.iupac.org/goldbook/F02510.pdf
 - Fryer M.J., Andrews J.R., Oxborough K., Blowers D.A., Baker N.R. (1998) Relationship between CO₂ Assimilation, Photosynthetic Electron Transport, and Active O₂ Metabolism in Leaves of Maize in the Field during Periods of Low Temperature. *Plant Physiol.*, **116**: 2:571–580.
 - Gaevski N., Morgun V. (1993) The use of variable fluorescence and delayed light emission to studies on plant physiology. *Fiziol. rast.*, **40**:136–145.
 - Garstka M. (2007) Strukturalne podstawy reakcji wietlnych fotosyntezy. *Postpy biologii komorki*, **34**:445–476.
 - Garstka M., Venema J., Rumak I., Gieczewska K., Rosiak M., Koziol- Lipinska J., Kierdaszuk B., Vredenberg W., Mostowska A. (2007) Contrasting effect of dark-chilling on chloroplast structure and arrangement of chlorophyll–protein complexes in pea and tomato:
 - Genty B., Briantais J.-M., Baker N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **990**: 1:87–92.
 - Georgieva K., Yordanov I. (1993) Temperature dependence of chlorophyll fluorescence parameters of pea seedlings. *J. Plant Physiol.*, **142**:151–155.
 - Gest, H. and Kamen, M. D. (1948) Studies on the phosphorus metabolism of green algae and purple bacteria in relation to photosynthesis. *J. Biol. Chem.* **176**, 299–318.
 - Ghanotakis D., Tsiotis G., Bricker T. (1999) Polypeptides of Photosystem II:
 - Gilmore A, Itoh S and Govindjee (2000) Global spectral-kinetic analysis of room temperature chlorophyll *a* fluorescence from light harvesting antenna mutants of barley. *Phil Trans Roy Soc London B* 335: 1–14
 - Goltsev V. , Kalaji, M.H., Kuzmanova M. A., Allakhverdiev S.I. (2014): Prompt and delayed fluorescence of chlorophyll *a* - theoretical foundations and practical application in the study of plants.; – М.– Ижевск: Институт компьютерных исследований, – 220 с.

- Goltsev V. N., Kalaji M. H., Kouzmanova M. A., Allakhverdiev S. I., 2014: Variable and Delayed Chlorophyll *a* Fluorescence – Basics and Application in Plant Sciences. – Moscow–Izshevsk: Institute of Computer Sciences, 2014. – 220 c.
- Goltsev V., Chernev P., Zaharieva I., Lambrev P., Strasser R.J. (2005) Kinetics of delayed chlorophyll *a* fluorescence registered in milliseconds time range. *Photosynth. Res.*, **84**:209–215.
- Goltsev V., Ortoidze T.V., Sokolov Z.N., Matorin D.N., Venediktov P.S. (1980a) Delayed luminescence yield kinetics in flash illuminated green plants. *Plant Sci. Lett.*, **19**:339–346.
- Goltsev V., Traikov L., Hristov V. (1998) Effects of exogenous electron acceptors on kinetic characteristics of prompt and delayed fluorescence in atrazine inhibited thylakoid membranes. In: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. – Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 3885–3888.
- Goltsev V., Yordanov I. (1997) Mathematical model of prompt and delayed chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica* **33**: 3– 4:571–586.
- Goltsev V., Yordanov I., Gurmanova M., Kouzmanova M., Dambov Sh., Apostolova S., Savova G., Strasser R.J.: Multifunctional plant efficiency analyzer m-PEA used to describe the physiological states of the photosynthetic apparatus; Academic Publishing House of the Agricultural University, Volume II Issue 4, Plovdiv 2010, 14-24.
- Goltsev V., Yordanov I., Gurmanova M., et: Temperature-induced transitions in the photosynthetic apparatus of bean plants probed by JIP-test; Agricultural University – Plovdiv Agricultural sciences, Volume II Issue 4, 2010, 6-13.
- Goltsev V., Yordanov I., Stefanov D., Zaharieva I., Lambrev P., Strasser R. (2001) Simultaneous analysis of variable and delayed chlorophyll fluorescence during induction period in photosynthetic apparatus. In: *Proceedings of 12th International Congress on Photosynthesis*. – CSIRO Publishing, Melbourne, Australia.
- Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Kouzmanova M., Kalaji H.M., Yordanov I., Krasteva V., Alexandrov V., Stefanov D., Allakhverdiev S.I., Strasser R.J. (2012) Drought-induced modifications of photosynthetic electron transport in intact leaves: Analysis and use of neural networks as a tool for a rapid non-invasive estimation. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**: 8:1490–1498.
- Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J. (2009a) Delayed chlorophyll fluorescence as a monitor for physiological state of photosynthetic apparatus. *Biotechnol. Biotec. Eq.*, **23** (Special Edition): 452–457.
- Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J. (2009b) Delayed fluorescence in photosynthesis. *Photosynth. Res.*, **101**: 217–232.
- Goltsev V., Zaharieva I., Lambrev P., Yordanov I., Strasser R. (2003) Simultaneous analysis of prompt and delayed chlorophyll *a* fluorescence in leaves during the induction period of dark to light adaptation. *J. Theor. Biol.*, **225**: 2:171–183.
- Goltsev V.N., Venediktov P.S., Janumov D.A. (1980b) Temperature dependence of the delayed fluorescence from wheat leaves treated with DCMU. *Biochim. Biophys. Acta*, **593**:133–135.

- Gounaris K., Brain A.R.R., Quinn P.J., Williams W.P. (1984) Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heatstress. *Biochim. Biophys. Acta*, **766**: 1:198–208.
- Govindjee, Papageorgiou G. (1971) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: Fluorescence transients. In: *Photophysiology* (Giese A.C. ed.). – Academic Press, New York–London, p. 1–46.
- Govindjee: A Role for a Light-harvesting Antenna Complex of Photosystem II in Photoprotection (Editorial). *Plant Cell* 14: 1663-1668, 2002.
- Grabolle M., Dau H. (2005) Energetics of primary and secondary electron transfer in Photosystem II membrane particles of spinach revisited on basis of recombination-fluorescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta* **1708**:209–218.
- Gray H.B., Winkler J.R., 1996: Electron transfer in proteins, *AnnuRev.Biochem.* 1996;65:537-61.
- Green, B. R. and Parson, W. W. (eds) (2001) *Light-Harvesting Antennas*. Kluwer Academic Press, Dordrecht
- Grifoni M. and Hanggi P., 1996: Coherent and Incoherent Quantum Stochastic Resonance; *Phys. Rev. Lett.* 76, 1611 (1996).
- Grigorov L.N. and Chernavskij D.S., 1972: Electron transfer driven by conformational variations; *Biofizika* (U.S.S.R.) 17, 195 (1972).
- Grigoryev Y., Morgun V., Gold V., Gaevsky N. (1982) Study of light-induced changes of ms-delayed light emission in pea chloroplasts [in Russian]. *Biofizika*, **27**: 6:973–976.
- Gurmanova M., Goltsev V., Kouzmanova M., Stefanov D., Strasser R.J.: Delayed chlorophyll fluorescence as a measure for evaluation of adaptation of plants to environmental light conditions; Reports from the Jubilee Scientific Conference "Bulgaria and Bulgarians in Europe" Union of Scientists in Bulgaria, Veliko Tarnovo, 2010, 394-403.
- Haehnel W., Präpper A., Krause H. (1980) Evidence for complexed plastocyanin as the immediate electron donor of P-700. *Biochim. Biophys. Acta*, **593**: 2:384–399.
- Hall D.O., Rao K.K. (1999). *Fotosynteza*. – WNT, Warszawa, 260 p.
- Hall David O., Krishna Roa, 1999: *Photosynthesis*, Cambridge University Press, Jun 24, 1999 - Science, 214 pages.
- Hankamer B., Barber J., Boekema E.J. (1997) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **48**:641–671.
- Hansatech (2000) *Chlorophyll Fluorescence Training Manual*. Hansatech Instruments Ltd. <http://www.hansatech-instruments.co.uk>.
- Hansatech (2008) *Chlorophyll Fluorescence*. Hansatech Instruments Ltd. <http://www.hansatech-instruments.co.uk>.
- Harding S.A., Guikema J.A., Paulsen G.M. (1990) Photosynthetic decline from high temperature stress during maturation of wheat. I. Interaction with senescence processes. *Plant Physiol.*, **92**:648–653.
- Hartel H., Lokstein H., Grimm B., Rank B. (1996) Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. *Plant Physiol.*, **110**:471–482.

- Havaux M. (1993) Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant Cell Environ.*, **16**: 4:461–467.
- Havaux M., Tardy F., Ravenel J., Chanu D., Parot P. (1996) Thylakoid membrane stability to heat stress studied by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves: influence of the xanthophyll content. *Plant Cell Environ.*, **19**: 12:1359–1368.
- He J., Chee C.W., Goh C.J. (1996) ‘Photoinhibition’ of *Heliconia* under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. *Plant Cell Environ.*, **19**: 11:1238–1248.
- Hecks B., Wulf K., Breton J., Leibl W., Trissl H.W. (1994) Primary charge separation in photosystem I: a two-step electrogenic charge separation connected with P700+ A0- and P700 + A1- formation. *Biochem.*, **33**:8619–8624.
- Hendrich W. (1995) Response of the photosynthetic apparatus to the excess light intensity. *Acta Physiol. Plant.*, **17**:153–165.
- Hermans C., Delhay J.P., Strasser R.J. (2001) Magnesium deficiency in sugar beets probed by optical measurements *in vivo*. In: Congress on Photosynthesis Brisbane, Australia, August 18–23.
- Hideg E., Kobayashi M., Inaba H. (1990) Ultraweak photoemission from dark-adapted leaves and isolated chloroplasts. *FEBS Lett.*, **275**: 1,2:121–124.
- Hideg E., Kobayashi M., Inaba H. (1991) The far red induced slow component of delayed light from chloroplasts is emitted from photosystem-IIevidence from emission-spectroscopy. *Photosynth. Res.*, **29**:107–112.
- Hill, R. and Bendall, F. (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. *Nature*, **186**, 136–137.
- Hill, R. (1939) Oxygen produced by isolated chloroplasts. *Proc. Royal Soc. London, Series B*, **127**, 192–210.
- Hipkins M.F., Barber J. (1974) Estimation of the activation energy for millisecond delayed fluorescence from uncoupled chloroplasts. *FEBS Lett.*, **42**:289–292.
- Hiyyama T., Ke B. (1972) Difference spectra and extinction coefficients of P700. *Biochim. Biophys. Acta*, **267**: 1:160–171.
- Hoch G. (1977) P-700. In: *Photosynthesis I.* – Springer, p. 136–148.
- Hoff A.J. and Deisenhofer J., 1997: Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria, *Physics Reports* 287(1):1-247 · August 1997
- Hopfield J.J., 1976: Electron Transfer Between Biological Molecules by Thermally Activated Tunneling; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3640.
- Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **47**:655–684.
- Hunt S. (2003) Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiol. Plant.*, **117**: 3:314–325.
- Ilík P., Kouřil R., Kruk J., Myśliwa-Kurdziel B., Popelková H., Strzałka K., Nauš J. (2003) Origin of Chlorophyll Fluorescence in Plants at 55– 75 °C. *Photochem. Photobiol.*, **77**: 1:68–76.

- Itoh S., Murata N. (1973) Correlation between delayed light emission and fluorescence of chlorophyll *a* in system II particles derived from spinach chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, **18**:209–218.
- Itoh S., Murata N., Takamiya A. (1971) Studies on the delayed light emission in spinach chloroplasts. I. Nature of two phases in development of the millisecond delayed light emission during intermittent illumination. *Biochim. Biophys. Acta*, **245**: 1:109–120.
- Jalink H., Van der Schoor R., Frandas A., Van Pijlen J.G., Bino R.J. (1998) Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a nondestructive marker for seed maturity and seed performance. *Seed Sci. Res.*, **8**: 4:437–443.
- Joliot A and Joliot P (1964) Etude cinétique de la réaction photochimique libérant l'oxygène au cours de la photosynthèse. *CR Acad Sci Paris* 258: 4622–4625
- Jones M.R., Fyfe P.K. (2001) Photosynthesis: New light on biological oxygen production. *Curr. Biol.*, **11**: 8:R318–R321.
- Jortner J., 1976: Temperature dependent activation energy for electron transfer between biological molecules; *J. Chem. Phys.* 64, 4860 (1976).
- Jursinic P. (1986) Delayed fluorescence: current concepts and status. In: *Light Emission by Plants and Bacteria* (Govindjee, Ames J., Fork D.J. eds.). – Academic Press, Orlando, Florida, p. 291–328.
- Jursinic P., Govindjee (1977) Temperature dependence of delayed light emission in the 6 to 340 microsecond range after a single flash in chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, **26**:617–628.
- Jursinic P., Govindjee, Wraight C.A. (1978) Membrane potential and microsecond to millisecond delayed light emission after a single excitation flash in isolated chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, **27**:61–71.
- Kalaji H., Goltsev V., Brestic M., Bosa K., Allakhverdiev S., Strasser R.J., Govindjee (2014) *In Vivo* Measurements of Light Emission in Plants. In: *Photosynthesis: Open Questions and What We Know Today* (Allakhverdiev S., Rubin A., Shuvalov V. eds.), vol. 1. – Institute of Computer Science, Izhevsk–Moscow, p. 1–40.
- Kalaji H., Govindjee, Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Strasser R. (2012) Experimental *in vivo* measurements of light emission in plants: A perspective dedicated to David Walker. *Photosynth. Res.*, **114**:69–96.
- Kalaji HM, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Strasser RJ, et al. (2012): Experimental *in vivo* measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. *Photosynth Res* 114: 69–96, 2012.
- Kalaji M., Rutkowska A. (2004) Reakcje aparatu fotosyntetycznego siewek kukurydzy na stres solny. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, **496**:545–558.
- Kalaji M.H., Goltsev V., Bresti M., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Strasser R.J., and Govindjee: *In Vivo* Measurements of Light Emission in Plants, Open questions and what we know today; volume 1, Moscow, 2014.
- Kalaji M.H., Guo P. (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Useful Tool In Barley Plant Breeding Programs. In: *Photochemistry Research Progress* (Sanchez A., Gutierrez S.J. eds.). – Nova Science Publishers Inc., NY, USA, pp. 439–463.

- Kalaji M.H., Pietkiewicz S. (2004) Some physiological indices to be exploited as a crucial tool in plant breeding. *Plant Breed. Seeds Sci.*, **49**:19–39.
- Katsumata M., Takeuchi A., Kazumura K., Koike T. (2008) New feature of delayed luminescence: Preillumination-induced concavity and convexity in delayed luminescence decay curve in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **90**:152–162.
- Kautsky H., Hirsch A. (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, **19**: 48:964–964.
- Ke B. (1973) The primary electron acceptor of Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **301**: 1:1–33.
- Kirmaier C. and Holten D., 1990: Evidence that a distribution of bacterial reaction centers underlies the temperature and detection-wavelength dependence of the rates of the primary electron-transfer reactions; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3552, 1990.
- Klughammer C., Schreiber U. (1991) Analysis of light-induced absorbance changes in the near-infrared spectral region. I: Characterization of various components in isolated chloroplasts. *Z. Naturforsch. C, Biosci.*, **46**: 3–4:233–244.
- Knox, R. S. and Gülen, D. (1993) Theory of polarized fluorescence from molecular pairs: Förster transfer at large electronic coupling. *Photochem. Photobiol.* 57, 40–43.
- Koscielniak J., Biesaga-Koscielniak J. (1999) Effects of exposure to short periods of suboptimal temperature during chili (5 degrees C) on gas exchange and chlorophyll fluorescence in maize seedlings (*Zea mays* L.). *J. Agron. Crop. Sci.*, **183**: 231–241.
- Kosson R. (2003) Wykorzystanie fluorescencji chlorofilu do wykrywania uszkodzeń chłodowych owoców papryki słodkiej. In: *Informator o wynikach badań naukowych przeznaczonych do upowszechniania: Seria, Ogrodnictwo*, vol. 26. – Krajowe Centrum Doradztwa Rozwoju Rolnictwa i Obszarów Wiejskich, Poznań.
- Kóta Z., Horváth L.I., Droppa M., Horváth G., Farkas T., Páli T. (2002) Protein assembly and heat stability in developing thylakoid membranes during greening. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **99**: 19:12149–12154.
- Kozaki A., Takeba G. (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature*, **384**:557–560.
- Kramer D.M., Avenson T.J., Edwards G.E. (2004) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends Plant Sci.*, **9**: 7:349–357.
- Kramer G., Erdal H., Mertens H.J., Nap M., Mauermann J., Steiner G., Marberger M., Biven K., Shoshan M.C., Linder S., 2004: *Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18*. *Cancer Res* 64: 1751–1756, 2004.
- Krause G.H. (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.*, **74**: 3:566–574.
- Krause G.H. (1994) Photoinhibition induced by low temperatures. In: *Photoinhibition of Photosynthesis* (Baker N.R., Bowyer J.R. eds.). Environmental Plant Biology. – BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, p. 331–348.
- Krause G.H., Weis E. (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth. Res.*, **5**:139–157.

- Krause G.H., Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **42**: 1:313–349.
- Krüger G.H.J., Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. (1997) Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiol. Plant.*, **101**: 2:265–277.
- Kuckenberg J., Tartachnyk I., Noga G. (2008) Evaluation of fluorescence and remission techniques for monitoring changes in peel chlorophyll and internal fruit characteristics in sunlit and shaded sides of apple fruit during shelf-life. *Postharvest Biol. Technol.*, **48**: 2:231–241.
- Kuckenberg J., Tartachnyk I., Noga G. (2009) Temporal and spatial changes of chlorophyll fluorescence as a basis for early and precise detection of leaf rust and powdery mildew infections in wheat leaves. *Precision Agric.*, **10**: 1:34–44.
- Labate C., Leegood R. (1988) Limitation of photosynthesis by changes in temperature. *Planta*, **173**: 4:519–527.
- Lavergne J and Trissl H-W (1995) Theory of fluorescence induction in Photosystem II: Derivation of analytical expressions in a model including exciton-radical-pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units. *Biophys J* **68**: 2474–2492
- Lavorel J. (1975) Luminescence. In: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee ed.). – Academic Press, London, p. 223–317.
- Lawlor D.W. (2001) *Photosynthesis*. – BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, 336 p. plants with a different susceptibility to non-freezing temperature. *Planta*, **226**: 5:1165–1181.
- Levich, V.G. and Dogonadze, R.R. 1961. Adiabaticeskaya Teoriya Elektronnikh Protsessov v Rastorakh. Coll. Czech. Chem. Commun. 26. 193 – 214.
- Li X.-P., Bjorkman O., Shih C., Grossman A.R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, **403**: 6768:391–395.
- Lichtenthaler H., Buschmann C., Knapp M. (2004) Measurement of chlorophyll fluorescence kinetics (Kautsky effect) and the chlorophyll fluorescence decrease ratio (RFd-values) with the PAM-fluorometer. In: *Analytical methods in plant stress biology* (Filek M., Biesaga-Kocielniak J., Marciska I. eds.). The Franciszek Gorski Inst. Plant Physiol., Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland, pp. 93–111.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Rev. Anal. Chem.*, **19**: 1:29–85.
- Logan B.A., Demmig-Adams B., Adams W.W., Grace S.C. (1998) Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. acclimated to four growth PPFDs in the field. *J. Exp. Bot.*, **49**: 328:1869–1879.
- Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G. (1994) Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **45**: 1:633–662.
- Lüttge U. (2000) Light-stress and crassulacean acid metabolism. *Phyton*, **40**:65–82.
- Malkin S., Barber J. (1978) Induction patterns of delayed luminescence from isolated chloroplasts. I. Response of delayed luminescence to changes in the prompt fluorescence yield. *Biochim. Biophys. Acta*, **502**:524–541.

- Malkin S., Bilger W., Schreiber U. (1994) The relationship between millisecond luminescence and fluorescence in tobacco leaves during the induction period. *Photosynth. Res.*, **39**:57–66.
- Mar T., Brebner J., Roy G. (1975) Induction kinetics of delayed light emission in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **376**:345–353.
- Marcus R.A., 1965: On the theory of electron-transfer reaction. VI. Unified treatment for homogeneous and electrode reactions. *The Journal of Chemical Physics*. 43 (2): 679. <https://doi.org/10.1063/1.1696792>.
- Marcus R.A., J. Chem. Phys. 43, 679 ~1965
- Marcus, R. A. and Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265–322.
- Massacci A.N., S.M., Pietrosanti L., Nematov S.K., Chernikova T.N., Thor K., Leipner J. (2008) Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant. Physiol. Biochem.*, **46**:189–195.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, **51**: 345:659–668.
- McKersie B.D., Leshem Y.Y. (1994) *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Merz D., Geyer M., Moss D.A., Ache H.J. (1996) Chlorophyll fluorescence biosensor for the detection of herbicides. *Fresen J. Anal. Chem.*, **354**:299–305.
- Mimuro M., Akimoto S., Tomo T., Yokono M., Miyashita H., Tsuchiya T. (2007) Delayed fluorescence observed in the nanosecond time region at 77 K originates directly from the photosystem II reaction center. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**:327–334.
- Mitchell P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, **206**: 4423:1148–1159.
- Mohammed G.H., Binder W.D., Gillies S.L. (1995) Chlorophyll fluorescence: A review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand. J. Forest Res.*, **10**: 1–4:383–410.
- Morgan-Kiss R.M., Priscu J.C., Pocock T., Gudynaite-Savitch L., Huner N.P. (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**: 1:222–252.
- Morillo M. and Cukier R.I., 1996: Controlling low-temperature tunneling dynamics with external fields; *Phys. Rev. B* 54, 13962 (1996).
- Moser C.C., Keske J.M., Warncke K., Farid R.S., Dutton P.L., 1992: Nature of biological electron transfer, *Nature* 1992, Feb 27; 355(6363): 796-802.
- Mulkey S.S., Pearcy R.W. (1992) Interactions between acclimation and photoinhibition of photosynthesis of a tropical understory herb, *Alocasia macrorrhiza*, during simulated canopy gap formation. *Funct. Ecol.*, **6**: 6: 719–729
- Müller P, Li X-P and Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558–1566

- Munday JC, Jr and Govindjee (1969) Light induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* in vivo. III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophys J* 9: 1–21
- Murchie E.H., Horton P. (1997) Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant Cell Environ.*, **20**:4:438–448.
- Murkowski A. (2002) Oddziaływanie czynników stresowych na luminescencję chlorofilu w aparacie fotosyntetycznym roślin uprawnych. In: *Monografia 61.* – Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin.
- Myers, J. and French, C. S. (1960) Relationships between time course, chromatic transient, and enhancement phenomena of photosynthesis. *Plant Physiol.* **35**, 963–969.
- Nedbal L., Soukupová J., Whitmarsh J., Trtílek M. (2001) Postharvest Imaging of Chlorophyll Fluorescence from Lemons Can Be Used to Predict Fruit Quality. *Photosynthetica*, **38**: 4:571–579.
- Neubauer C and Schreiber U (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: 1. Saturation characteristics and partial control by the Photosystem II acceptor side. *Z Naturforsch* 42c: 1246–1254
- Oja V., Bichele I., Hüve K., Rasulov B., Laisk A. (2004) Reductive titration of photosystem I and differential extinction coefficient of P700+ at 810– 950 nm in leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, **1658**: 3:225–234.
- Öquist G., Greer D., Ögren E. (1987) Light stress at low temperature. In: *Photoinhibition* (Kyle J., Osmond C.B., Arntzen C.J. eds.). – Elsevier, Amsterdam, pp. 67–87.
- Ott T., Clarke J., Birks K., Johnson G. (1999) Regulation of the photosynthetic electron transport chain. *Planta*, **209**:250–258.
- Oukarroum A, Goltsev V, Strasser RJ: Temperature Effects on Pea Plants Probed by Simultaneous Measurements of the Kinetics of Prompt Fluorescence, Delayed Fluorescence and Modulated 820 nm Reflection, *PLOS ONE* | www.plosone.org, March 2013 | Volume 8 | Issue 3 | e59433.
- Papageorgiou G (1975) Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: Govindjee (ed) *Bioenergetics of Photosynthesis*, pp 319–371. Academic Press, New York
- Papageorgiou G.C. and Govindjee, (eds), 2004: *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers. Printed in The Netherlands, 2004 – 793c.
- Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.): *Advances in Photosynthesis and Respiration Series* (Govindjee – Series Editor), *Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004.
- Papageorgiou GC (1996) The photosynthesis of cyanobacteria (blue bacteria) from the perspective of signal analysis of chlorophyll *a* fluorescence. *J Sci Indust Res* 55: 596–617
- Pearlstein, R. M. (1996) Coupling of exciton motion in the core antenna and primary charge separation in the reaction center. *Photosynth. Res.* **48**, 75–82

- Powles S.B. (1984) Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 1:15–44.
- Prasil O., Suggett D.J., Cullen J.J., Babin M., Govindjee (2008) Aquafluo 2007: Chlorophyll fluorescence in aquatic sciences, an international conference held in Nove Hradý. *Photosynth. Res.*, **95**: 1:111–115.
- Pudlak M., 1998: Electron transfer driven by conformational variations; *Journal of chemical physics*, vol 108, numer 13, 1998.
- Pudlak M., 2004: Effect of the conformational transitions on electron transfer in biological systems; *Physica A* 341 (2004) 444 - 454.
- Pudlak M., Pincak R., 2001: Noise breaking the twofold symmetry of photosynthetic reaction centers: Electron transfer; *Physical review*, volume 64, 031906, 2001.
- Pudlak M., Pincak R., 2001: The role of accessory bacteriochlorophylls in the primary charge transfer in the photosynthetic reaction centers; *Chemical Physics Letters* 342 (2001) 587±592.
- Pudlak M., Shaitan K.V., 1993: The influence of energy- level fluctuation and acceptor local diffusion on electron transport in biological systems; *Journal of biological physics* 19: 39-64,1993.
- Pullerits, T. and Sundström, V. (1996) Photosynthetic light-harvesting pigment–protein complexes: Toward understanding how and why. *Acc. Chem. Res.* 29, 381–389
- Quick W.P., Horton P. (1984) Studies on the induction of Chlorophyll Fluorescence in Barley Protoplasts. I. Factors Affecting the Observation of Oscillations in the Yield of Chlorophyll Fluorescence and the Rate of Oxygen Evolution. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Bio.*, **220**: 1220:361–370.
- Rabinowitch, E. I. (1945) *Photosynthesis and Related Processes*, vol. 1. Interscience Publishers, New York.
- Radenovic C., Markovic D., Jeremic M. (1994) Delayed chlorophyll fluorescence in plant models. *Photosynthetica*, **30**:1–24.
- Rajendran K., Tester M., Roy S.J. (2009) Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell Environ.*, **32**:3:237–249.
- Rapacz M. (2007) Chlorophyll *a* fluorescence transient during freezing and recovery in winter wheat. *Photosynthetica*, **45**: 3:409–418.
- Reigosa M.J. (1997) Técnicas de Medida de la Fluorescencia *in vivo* en Ecofisiología Vegetal. In: *Manual de Técnicas en Ecofisiología Vegetal* (Pedrol N., Reigosa M.J. eds.). – Gamesal, Vigo, Spain.
- Reigosa R.M.J., Weiss O. (2001) Fluorescence techniques. In: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques* (Reigosa R.M. ed.). – Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, p. 155–171.
- Rodenburg J., Bastiaans L., Schapendonk A.H.C.M., Putten P.L., Ast A., Dingemanse N., Haussmann B.G. (2008) CO₂-assimilation and chlorophyll fluorescence as indirect selection criteria for host tolerance against *Striga*. *Euphytica*, **160**: 1:75–87.
- Romanowska E., Drożak A., Pokorska B., Shiell B.J., Michalski W.P. (2006a) Organization and activity of photosystems in the mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *J. Plant Physiol.*, **163**: 6:607–618. Structure and function. In:

- Concepts in Photobiology* (Singhal G.S., Renger G., Sopory S.K., Irrgang K.D., Govindjee eds.). – Springer, Netherlands, p. 264–291.
- Romanowska-Duda Z.B., Kalaji M.H., Strasser R.J. (2005) The use of PSII activity of *Spirodela oligorrhiza* plants as an indicator for water toxicity. In: *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives* (van der Est A., Bruce D. eds.). – Allen Press Inc., Lawrence, KS, p. 585–587.
 - Rosenqvist E., Kooten Ov. (2003) Chlorophyll Fluorescence: a general description and nomenclature. In: *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (Dell J.R., Toivonen P.M.A. eds.). – Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, p. 31–77.
 - Rottenberg H. (1977) Proton and ion transport across the thylakoid membranes. In: *Photosynthesis I. Electron Transport and Photophosphorylation* (Trebst A., Avron M. eds.). – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 338–349.
 - Rubin A.B., 2004. Teoreticheskaya Biofizika. Tom 1,2 (Russian) Hardcover.
 - Rubin A.B., Teoreticheskaya Biofizika. 2004: Tom 1,2 (Russian) Hardcover, 2004.-440c, - 456c.
 - Rutherford A.W., Govindjee, Inoue Y. (1984) Charge accumulation and photochemistry in leaves studied by thermoluminescence and delayed light emission. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**:1107–1111.
 - Santarius K.A. (1980) Membrane lipids in heat injury of spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.*, **49**:1–6.
 - Savitch L., Gray G., Huner N.A. (1997) Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. *Planta*, **201**: 1:18–26.
 - Schansker G., Srivastava A., Govindjee, Strasser R.J. (2003) Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Funct. Plant Biol.*, **30**: 7:785–796.
 - Schansker G., Srivastava A., Govindjee, Strasser R.J.: Characterization of 820 nm transmission induction curves in pea leaves: kinetic separation between plastocyanin and P700 contributions, *Funct. Plant Biol.* 30 (2003) 1–10.
 - Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochim. Biophys. Acta*, **1706**: 3:250–261.
 - Schatz, G. H., Brock, H. and Holzwarth, A. R. (1988) A kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II. *Biophys. J.* 54, 397–405
 - Schreiber U. (1986) Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.*, **9**:261–272.
 - Schreiber U., Armond P.A. (1978) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level. *Biochim. Biophys. Acta*, **502**:138–151.
 - Schreiber U., Neubauer C., Klughammer C. (1989) Devices and Methods for Room-Temperature Fluorescence Analysis. *Philos. T. Roy. Soc. B, Biological Sci.*, **323**: 1216:241–251.

- Seelig H.-D., Hoehn A., Stodieck L.S., Klaus D.M., Adams III W.W., Emery W.J. (2009) Plant water parameters and the remote sensing R 1300/R 1450 leaf water index: controlled condition dynamics during the development of water deficit stress. *Irrigation Sci.*, **27**: 5:357–365.
- Seppanen M.M. (2000) Characterization of freezing tolerance in *Solanum commersonii* (dun.) with special reference to the relationship between freezing and oxidative stress. Univ. of Helsinki, Publ. № 56, Academic Dissertation.
- Shaitan K.V. and Rubin A.B., 1980: Effects of isotope substitution on intermolecular electron transfer in biological systems; *J.Theor. Biol.* 86, 203 (1980).
- Shannon M.C. (1998) Adaptation of plants to salinity. *Adv. Agron*, **60**:75–119. Sharma P., Dubey R.S. (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian J. Plant Physiol.*, **17**:35–52.
- Skórska E. (2000) Reakcja wybranych roślin uprawnych na promieniowanie UV-B. In: *Rozprawy nr.*, vol. 192. – Akademia Rolnicza Szczecinie.
- Srivastava A., Strasser R.J. (1997) Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient: OKJIP. *Biochim. Biophys. Acta*, **1320**:95–106.
- Steffen R. (2003) Time-resolved spectroscopic investigations of photosystem II. *Ph. D. thesis*, Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universitat, Berlin.
- Strasser B. (1997) Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. *Photosynth. Res.*, **52**: 2:147–155.
- Strasser R.J. (1978) The grouping model of plant photosynthesis. In: *Chloroplast Development* (Akoyunoglou G. ed.). – Elsevier, North Holland, pp. 513–524.
- Strasser R.J. (1981) The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. In: *Photosynthesis III. Structure and Molecular Organisation of the Photosynthetic Apparatus* (Akoyunoglou G. ed.). – Balaban International Science Services, Philadelphia, p. 727–737.
- Strasser R.J. (1988) A concept for stress and its application in remote sensing. In: *Application of Chlorophyll Fluorescence* (Lichtenthaler H.K. ed.). – Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 333–337.
- Strasser R.J., Srivastava A., Govindjee: Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria; *Photochem. Photobiol.* 61 (1995) 32–42.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation & Adaptation* (Mohanty P., Yunus, Pathre eds.). – Taylor & Francis, London, p. 443–480.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V. (2010) Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochim. Biophys. Acta.*,
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration Series* (Papageorgiou G., Govindjee eds.). Chlorophyll *a* Fluorescence: a Signature of Photosynthesis. – Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 321–362.

- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A., (2001): Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient; in: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration Series* (Govindjee – Series Editor), *Chlorophyll *a* Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*, vol. 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 321–362.
- Strasser RJ (1986) Mono- bi- tri- and polypartite models in photosynthesis. *Photosynth Res* 10: 255–276
- Strasser RJ and Govindjee (1992a) The F0 and the O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae. In: Argyroudi-Akoyunoglou JH (ed) *Regulation of Chloroplast Biogenesis*, pp 423–426. Plenum Press, New York
- Strasser RJ and Govindjee (1992b) On the O-J-I-P fluorescence transient in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas Reinhardtii*. In: Murata N (ed) *Research in Photosynthesis*, Vol. 4, pp 29–32. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Strasser RJ and Greppin H (1981) Primary reactions of photochemistry in higher plants, In: Akoyunoglou G (ed) *Photosynthesis III. Structure and Molecular Organisation of the Photosynthetic Apparatus*, pp 717–726. Balaban International Science Services, Philadelphia
- Strasser RJ, Srivastava A and Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61: 32–42
- Strasser RJ, Srivastava A: How do land plants respond to stress temperature and stress light/ Stress and stress management of land plants during a regular day. *Archs Sci Gene`ve* 48: 135–146, 1995.
- Strasser RJ: The grouping model of plant photosynthesis. In: Akoyunoglou G (ed) *Chloroplast Development*, pp 513–524. Elsevier/North Holland, 1978.
- Strasser RJ: The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. In: Akoyunoglou G (ed) *Photosynthesis III. Structure and Molecular Organisation of the Photosynthetic Apparatus*, pp 727–737. Balaban International Science Services, Philadelphia, 1981.
- Strzałka K. (2002) Przemiany związków organicznych i energii u roślin. In: *Fizjologia roślin* (Kopcewicz J., Lewak S. eds.). – PWN, Warszawa.
- Sundström, V., Pullerits, T. and van Grondelle, R. (1999) Photosynthetic light-harvesting: Reconciling dynamics and structure of purple bacterial LH2 reveals function of photosynthetic unit. *J. Phys. Chem. B*, 103, 2327–2346
- Szwejkowska A. (1997) *Fizjologia roślin*. – Wydaw. Naukowe UAM, Poznań
- Taiz L., Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*. – The Benjamin/Cummings Pub. Comp. Inc.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*. 2nd Edition, Sinauer Associates Publishers, Sunderland, Massachusetts. <http://dx.doi.org/10.1071/PP9840361>
- Takahashi S., Bauwe H., Badger M. (2007) Impairment of the Photorespiratory Pathway Accelerates Photoinhibition of Photosystem II by Suppression of Repair But Not Acceleration of Damage Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **144**: 1:487–494.
- Takahashi S., Murata N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.*, **13**: 4:178–182.

- Tanaka R., Tanaka A. (2000) Chlorophyll *b* is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. Paper presented at the PORPHYRINS 9 – International porphyr in-heme symposium 4th, Tokyo.
- Teicher H.B., Scheller H.V. (1998) The NAD(P)H Dehydrogenase in Barley Thylakoids Is Photoactivatable and Uses NADPH as well as NADH. *Plant Physiol.*, **117**: 525–532.
- Thekaekara, M. P., Solar energy outside the earth's atmosphere; 1973.
- Trissl H-W and Lavergne J (1995) Fluorescence induction from Photosystem II: Analytical equations for the yields of photochemistry and fluorescence derived from analysis of a model including exciton-radical pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units. *Aust J Plant Physiol* 22: 183–193
- Tsimilli-Michael M, Eggenberg P, Biro B, Köves-Pechy K, Vörös I and Strasser RJ (2000) Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the chlorophyll *a* polyphasic fluorescence transient O-J-I-P. *Applied Soil Ecology* 15: 169–182
- Tsimilli-Michael M, Pêcheux M and Strasser RJ (1998) Vitality and stress adaptation of the symbionts of coral reef and temperate foraminifers probed *in hospite* by the fluorescence kinetics O-J-I-P. *Archs Sci Genève* 51: 1–36
- Tsimilli-Michael M, Pêcheux M and Strasser RJ (1999) Light and heat stress adaptation of the symbionts of temperate and coral reef foraminifers probed *in hospite* by the chlorophyll *a* fluorescence kinetics O-J-I-P. *Z Naturforsch* 54C: 671–680
- Tsimilli-Michael M, Pêcheux M and Strasser RJ: Vitality and stress adaptation of the symbionts of coral reef and temperate foraminifers probed *in hospite* by the fluorescence kinetics O-J-I-P. *Archs Sci Genève* 51: 1–36, 1998.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. (2008) *In vivo* assessment of stress impact on plants' vitality: applications in detecting and evaluating the beneficial role of Mycorrhization on host plants. In: *Mycorrhiza: State of the art, genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, ecophysiology, structure and systematics* (Varma A. ed.), vol. 3rd. – Springer, p. 679–703.
- Tsimilli-Michael, Strasser R.J.: Experimental resolution and theoretical complexity determine the amount of information extractable from the chlorophyll fluorescence transient OJIP; in: Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B.(Eds.), *Photosynthesis. Energy from the sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008, pp. 697–701.
- Tyystjarvi E., Vass I. (2004) Light emission as a probe of charge separation and recombination in the photosynthetic apparatus: relation of prompt fluorescence to delayed light emission and thermoluminescence. In: *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (Papageorgiou G., Govindjee eds.), vol. 19. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. – Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 363–388.
- van Armerongen, H., van Grondelle, R. and Valkunas, L. (2000) *Photosynthetic Excitons*. World Scientific, London.
- van der Tol C., Verhoef W., Rosema A. (2009) A model for chlorophyll fluorescence and photosynthesis at leaf scale. *Agr. Forest Meteorol.*, **149**: 1:96–105.

- van Grondelle, R. (1985) Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 811, 147–195.
- van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T. and Sundström, V. (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1187, 1–65
- van Niel, C. B. (1941) The bacterial photosyntheses and their importance for the general problem of photosynthesis. *Adv. Enzymol.* **1**, 263–328.
- Vidaver W.E., Lister G.R., Brooke R.C., Binder W.C. (1991) A manual for the use of variable chlorophyll fluorescence in the assessment of the ecophysiology of conifer seedlings, vol. 163. – Ministry of Forests, Victoria, BC, Canada.
- Vredenberg WJ (2000) A 3-state model for energy trapping and fluorescence in PS II incorporating radical pair recombination. *Biophys J* 79: 26–38
- Walters R., Horton P. (1994) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: Changes in composition of the photosynthetic apparatus. *Planta*, **195**: 2:248–256.
- Walters R.G. (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J. Exp. Bot.*, **56**: 411:435–447.
- Weiss O., Reigosa R.M.R. (2003) Modulated Fluorescence. In: *Handbook of plant ecophysiology techniques* (Roger M.J. ed.). – Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, pp. 173–185.
- Weng J.H., Lai M.F. (2005) Estimating heat tolerance among plant species by two chlorophyll fluorescence parameters. *Photosynthetica*, **43**: 3:439–444.
- Weng X.-Y., Xu H.-X., Jiang D.-A. (2005) Characteristics of Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Expression of Key Enzymes in Photosynthesis During Leaf Senescence in Rice Plants. *J. Integr. Plant Biol.*, **47**: 5:560–566.
- Wong D., Govindjee, Jursinic P. (1978) Analysis of microsecond fluorescence yield and delayed light emission changes after a single flash in pea chloroplasts: Effects of mono- and divalent cations. *Photochem. Photobiol.*, **28**:963–974.
- Yamane Y., Kashino Y., Koike H., Satoh K. (1997) Increases in the fluorescence F_0 level and reversible inhibition of Photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth. Res.*, **52**:57–64.
- Zaharieva I, Taneva SG, Goltsev V (2001) Effect of temperature on the luminescent characteristics in leaves of arabidopsis mutants with decreased unsaturation of the membrane lipids. *Bulg J Plant Physiol* 27: 3–18.
- Zaharieva I, Taneva S.G., Goltsev V. (1999) Effect of PS II antennae size on the induction kinetics of prompt and delayed chlorophyll fluorescence. *Bulg. J. Plant Physiol.*, **25**: 3-4:17–30.
- Zaharieva I, Wichmann J.M., Dau H. (2011) Thermodynamic limitations of photosynthetic water oxidation at high proton concentrations *J. Biol. Chem.*, **286**: 20:18222–18228.
- Zusman L.D., 1980: Outer-sphere electron transfer in polar solvents; *Chem. Phys.* 49, 295 (1980).
- Аллахвердиева С.И., Рубина А. Б., Шувалова В.А., 2014: Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем сегодня. Т. 1 / — Москва _ Ижевск 2014 - 568 с: Институт компьютерных исследований, ISBN 978-5-4344-00 ББК 28.573.1143