

# LI-6400; Gazometrická stanovení fotosyntetických parametrů

May 2019

*Tato úloha by Vás měla seznámit s gazometrickými metodami stanovení fotosyntetické aktivity rostlin, potažmo s přístrojem LI-6400XT, který v současné době patří k nejpoužívanějším gazometrickým systémům ve fyziologii a ekofyziologii rostlin. Principy měření, vyhodnocení interpretace naměřených parametrů budou demonstrovány na rozdílné asimilaci CO<sub>2</sub> u C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> rostlin. Zopakujte si proto, v čem tkví rozdíl mezi těmito fotosyntetickými typy (viz Fyziologie rostlin, Procházka et al.; názorné video na youtube:*

*<https://www.youtube.com/watch?v=HbLg4lMpUa8>; aj.).*

## Úvod

List fixuje ve fotosyntéze CO<sub>2</sub>, který proudí z vnější atmosféry. Současně ale uvolňuje CO<sub>2</sub> při respiračních pochodech. Na světle u nestresovaného zeleného listu převládá většinou fotosyntéza nad respirací. Budeme měřit bilanci obou procesů, která se nazývá „rychlost čisté fotosyntézy“ ( $A_n$ ) a je vyjadřována jako hustota toku CO<sub>2</sub> na jednotku plochy listu za čas ( $\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\text{m}^{-2}(\text{listu})\text{s}^{-1}$ ). Gazometrické metody umožňují měření rychlosti výměny plynů mezi listem a okolní atmosférou. Příjem resp. výdej CO<sub>2</sub> se projeví změnou koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře obklopující měřený objekt, která je měřena pomocí infračerveného analyzátoru plynů (IRGA).

$A_n$  je výrazně závislá na dvou faktorech

- i) intenzitě dopadající radiace (PAR) (tzv. „světelná křivka fotosyntézy“)
- ii) koncentraci CO<sub>2</sub> v podprůduchové dutině (C<sub>i</sub>) (tzv. „CO<sub>2</sub> křivka fotosyntézy“).

Z těchto závislostí lze stanovit fotosyntetické parametry, které danou rostlinu (list) charakterizují z biofyzikálního a biochemického hlediska.

Tato úloha je zaměřená na porovnání rostlin s C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> metabolismem asimilace CO<sub>2</sub>. Z naměřených křivek a vypočtených parametrů bude zřetelný rozdíl v jejich mechanismu zabudování CO<sub>2</sub> a využití dopadajícího záření.

## 1 Princip měření a výpočty

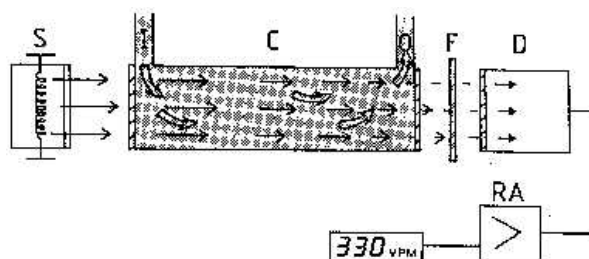
### 1.1 Princip infračervené analýzy plynů

Heteroatomické molekuly absorbují záření při specifických vlnových délkách v infračervené oblasti, přičemž každý plyn má charakteristické absorpční spektrum. Molekuly složené ze dvou identických atomů (homoatomické) mají nulový dipólový moment (např. O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) a toto dlouhovlnné infračervené záření neabsorbují (tudíž nepřekáží při stanovení koncentrace heteroatomických molekul). Znejběžnějších plynů a par majících absorpci v infračervené oblasti spektra lze uvést: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, CO, N<sub>2</sub>O, NO, SO<sub>2</sub>, HCN, plynné uhlovodíky, všechny vyšší uhlovodíky apod. Hlavní absorpční pás CO<sub>2</sub> je při 4.25  $\mu\text{m}$  s druhotnými maximy při 2.66, 2.77 a

14.99  $\mu\text{m}$ .

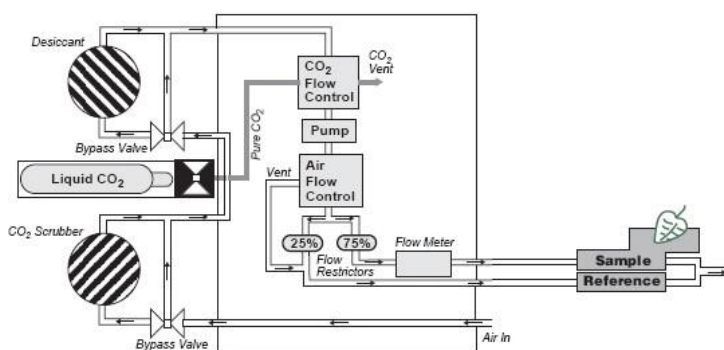
Jediný plyn normálně přítomný ve vzduchu s absorpčním spektrem překrývající absorpční spektrum  $\text{CO}_2$  (společné maximum při 2.7  $\mu\text{m}$ ) je vodní pára. Výsledné spektrum je kombinací elektronového, rotačního a vibračního spektra. Absorpční čáry pak odpovídají rotaci dané molekuly.

IRGA (=InfraRed Gas Analyser) se skládá ze čtyř základních částí: široko-spektrálního zdroje infračerveného (IR) záření (S), asimilační komory (C), optického filtru (F) a detektoru (D). Přítomnost  $\text{CO}_2$  v kyvetě způsobí pokles radiace a snížení výstupního signálu na detektoru. Elektronicky zpracovaný signál je převeden na koncentraci. Optický filtr ohraničuje záření na spektrální pásy, které jsou absorbovány určitými plyny.



Obr. 1: Nákres jednoduchého infračerveného analyzátoru plynů (IRGA). Infračervené záření vyzařované ze zdroje (S) prochází přes kyvetu (C), kterou proudí plyn dovnitř (I) a ven (O). Infračervená radiace vycházející z kyvety prochází přes širokospektrální filtr (nejčastěji centrováný na 4,3  $\mu\text{m}$ ), a pak je analyzována detektorem (D). Signál z detektoru je zesílen (RA). Jakýkoliv nárůst koncentrace plynu v kyvetě, který absorbuje v IR oblasti, se projeví jako pokles signálu na detektoru.

## 1.2 Uspořádání otevřeného gazometrického systému LI-6400



Obr. 2 Schématické znázornění toku vzduchu v LI-6400. Vzduch je nasáván membránovou pumpou z vnější atmosféry. Dále prochází kolonami, které jej zbavují i) oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$  scrubber) a ii) vodní páry (desiccant). Vzduch je následně upravován na námi požadovanou koncentraci  $\text{CO}_2$  přidáváním potřebného množství plynu z externího zdroje  $\text{CO}_2$ . Před vstupem do asimilační komory, kde je umístěn list, je měřena rychlost průtoku vzduchu.

## 1.3 Jak přístroj počítá gazometrické parametry? Aneb kapitolka pro zvědavé

Vše, co je uvedeno v této kapitole, za vás udělá přístroj. Teorie výpočtů je zde uvedena jen proto, aby LICOR pro zvědavé nebyl příliš černou skříňkou.

Fotosynteticky aktivní list, uzavřený v komoře, bude pohlcovat  $\text{CO}_2$ . Známe-li průtok vzduchu komorou  $F$ , koncentraci  $\text{CO}_2$  ve vzduchu vstupujícím do komory,  $c_I$ , a ve vystupujícím vzduchu po jeho styku s listem,  $c_O$ , a plochu listu uzavřeného v komoře ( $S$ ), můžeme spočítat hustotu toku  $\text{CO}_2$  do listu čili rychlost fotosyntézy  $A_n$ :

$$A_n = F * (c_I - c_O) / S \quad (1)$$

Dosadíme-li za koncentrace  $c$  hodnoty v mikromolech  $\text{CO}_2$  na mol vzduchu, za průtok  $F$  mol vzduchu za sekundu a plochu listu  $S$  v  $\text{m}^2$ , vyjde  $A$  v  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  jak je obvyklé. Podobně z rozdílu koncentrací vodní páry ve vystupujícím ( $w_O$ ) a vstupujícím ( $w_I$ ) vzduchu, z průtoku vzduchu  $F$  a plochy listu  $S$  přístroj vypočítá rychlost transpirace  $E$ :

$$E = F * (w_O - w_I) / S \quad (2)$$

Spočtená rychlost transpirace  $E$  (obvykle v  $\text{mmol (vody) m}^{-2} (\text{listu}) \text{s}^{-1}$ ), změřená teplota listu ( $T_l$ ) a koncentrace vodní páry ve vzduchu v listové komoře ( $w_O$ ) nám umožní spočítat vodivost listu pro difuzi vodní páry  $g_l$ . Vzduch se v komoře intenzivně míchá ventilátorem, a proto jsou koncentrace vody i  $\text{CO}_2$  kolem listu rovny koncentracím na výstupu z komory. Díky intenzivnímu míchání vzduchu je také tloušťka nemíchané vrstvy vzduchu nad listem velmi malá, její difúzní vodivost tedy velká a toky vody a  $\text{CO}_2$  mezi listem a okolním vzduchem limitují prakticky jen průduchy svojí otevřeností a počtem (průduchy jsou vzhledem k nemíchané hraniční vrstvě umístěny v sérii). Propustnost kutikuly pro vodu i  $\text{CO}_2$  je naopak velmi malá, a protože je vzhledem k průduchům paralelně, můžeme vodivost kutikuly zanedbat. Proto budeme vodivost listu  $g_l$  považovat za totožnou s vodivostí průduchů  $g_s$ . Vodivost průduchů pro vodní páru  $g_{sw}$  tedy je:

$$g_{sw} = E / (w_{T_l}^s - w_O) \quad (3)$$

kde exponent  $s$  značí nasycenou koncentraci při teplotě listu  $T_l$ . Difúzní vodivost pak vyjde ve stejných jednotkách jako transpirace nebo fotosyntéza (např. v  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Dostupnost  $\text{CO}_2$  pro karboxylační reakce je ovlivněna vodivostí průduchů. Protože vodivost není nekonečně veliká, koncentrace  $\text{CO}_2$  v atmosféře ( $c_a$ ) je vyšší než koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu ( $c_i$ ). Pro studium fotosyntézy v intaktním listu je proto žádoucí "odfiltrovat" vliv průduchů a znát koncentraci  $\text{CO}_2$  v místech za průduchy tj. v mezibuněčných prostorách listu. Známe-li rychlost fotosyntézy ( $A_n$ ) a difúzní vodivost průduchů pro vodní páru ( $g_{sw}$ ), můžeme vypočítat koncentraci  $\text{CO}_2$  uvnitř listu  $c_i$ :

$$c_i = c_a - (1.6A / g_{sw}) \quad (4)$$

koeficient 1.6 zde převádí difúzní vodivost pro vodní páru na difúzní vodivost pro  $\text{CO}_2$ . Výpočty, jejichž princip je výše uveden, za vás udělá (v dokonalejší verzi) fotosyntetický systém LI-6400, který budete používat.

## 2 Analýza $A/C_i$ a světelných křivek

Výsledkem gazometrických měření mohou být tzv. fotosyntetické křivky.  $\text{CO}_2$  křivka fotosyntézy vyjadřuje vztah mezi koncentrací  $\text{CO}_2$  (přesněji koncentrací  $\text{CO}_2$  v podprůduchové dutině ( $c_i$ )) a rychlosti fotosyntézy při dané teplotě a ozáření. Obdobný vztah vyjadřují světelné křivky fotosyntézy, tj. vztah mezi ozáření listu a rychlosti fotosyntézy při dané teplotě a koncentraci  $\text{CO}_2$ . Všeobecně mají tyto křivky lineární charakter při nízkých koncentracích  $\text{CO}_2$  resp. nízké ozáření. Se zvětšující se koncentrací  $\text{CO}_2$  (resp. ozáření) dochází k postupné inflexi křivky. Při vysokých koncentracích resp. ozáření dosahují křivky konstantních hodnot, které

odpovídají maximálním hodnotám  $A_n$  ve vztahu ke koncentraci  $\text{CO}_2$  nebo ozáření.

## 2.1 $A/C_i$ křivky

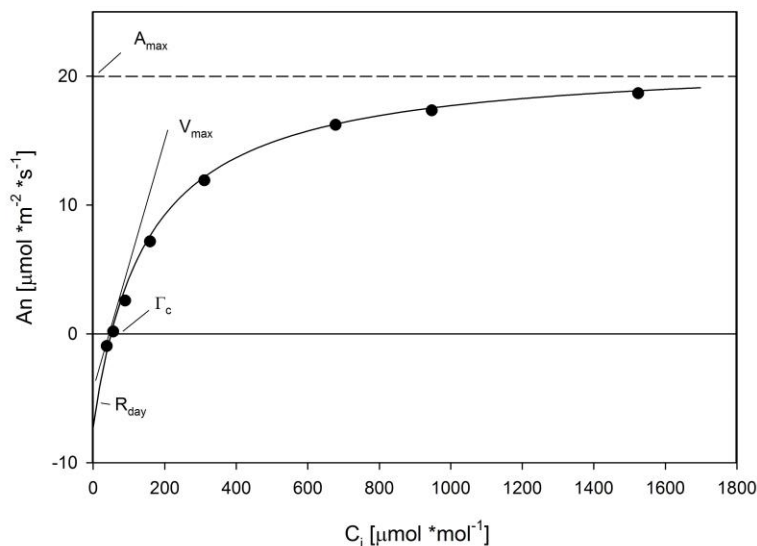
Závislost rychlosti příjmu  $\text{CO}_2$  povrchem listu ( $A_n$ ) na koncentraci  $\text{CO}_2$  v podprůduchové dutině ( $c_i$ ) bývá označována jako  $A/c_i$  křivka fotosyntézy. Tato křivka má typický průběh blíží se nerovnoosé hyperbole a můžeme u ní rozlišit několik částí.

i) Počáteční lineární část začíná v bodě výdeje  $\text{CO}_2$  ( $R_{\text{day}}$ ) při nenulové ozáření a nulové koncentraci  $\text{CO}_2$ .

ii) Při zvyšování koncentrace  $\text{CO}_2$  dojde k dosažení tzv. kompenzační koncentrace ( $\Gamma_c$ ), kdy příjem  $\text{CO}_2$  fotosyntézou je roven výdeji  $\text{CO}_2$  respirací, tedy  $A_n = 0$ . V tomto stavu vůbec neprobíhá výměna plynů, přestože průduchy mohou být zcela otevřeny.  $\Gamma_c$  představuje důležitou charakteristiku a je citlivým parametrem pro posouzení fotosyntetické aktivity rostlin.  $\text{C}_3$  rostliny dosahují vyšších hodnot  $\Gamma_c$  než  $\text{C}_4$  rostliny.

iii) V další části je závislost lineární.  $A_n$  je zde limitována dostupností substrátu - tedy  $\text{CO}_2$  a aktivitou enzymu Rubisco (Ribulosa-1,5- bisfosát karboxyláza/oxygenáza). Směrnice této lineární části určuje karboxylační aktivitu enzymu Rubisco.

iv) Následuje inflexní část. V této hyperbolické části je závislost  $A/c_i$  nelineární. v) Za inflexní části křivky je  $A_n$  limitována množstvím substrátu pro karboxylaci - RuBP (Ribuloza-1,5- bisfosfát), které je dáno rychlostí regenerace RuBP v Calvinově cyklu.

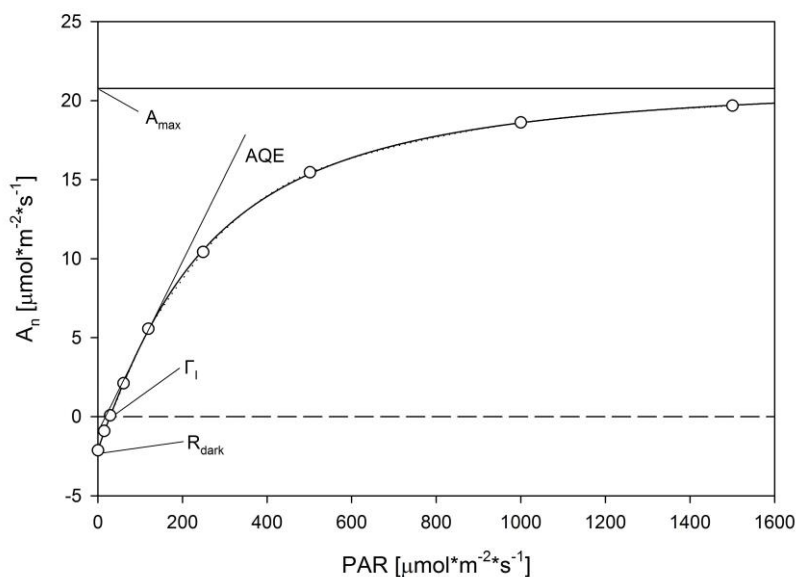


Obr. 3: Závislost rychlosti asimilace  $\text{CO}_2$  ( $A$ ,  $\mu\text{mol}_{(\text{CO}_2)} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) na koncentraci  $\text{CO}_2$  v podprůduchové dutině ( $C_i$ ). V grafu jsou vyznačeny parametry charakterizující biochemickou aktivitu: Respirace na světle ( $R_{\text{day}}$ ),  $\text{CO}_2$  kompenzační koncentrace ( $\Gamma_c$ ), maximální rychlost karboxylace ( $V_{\text{max}}$ ) a maximální rychlost asimilace  $\text{CO}_2$   $A_{\text{max}}$ .

## 2.2 Světelné křivky

Světelnou křivkou myslíme závislost rychlosti asimilace  $\text{CO}_2$  ( $A_n$ ) na intenzitě dopadající radiace (PAR,  $\mu\text{mol}_{(\text{fotonů})} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Křivka má opět charakter nerovnoosé hyperboly a můžeme ji rozdělit na několik částí.

i) počáteční hodnota  $A_n$  světelné křivky určuje temnostní (mitochondriální) respiraci ( $R_{dark}$ ). Je to množství uvolněného  $CO_2$  při nulové ozáření. ii) Při dalším nárůstu ozáření dochází k výraznému nárůstu  $A_n$  až k hodnotě tzv. světelného kompenzačního bodu  $\Gamma_I$ . iii) Za tímto bodem křivka získává lineárně závislý průběh v rozmezí intenzit ozáření 50-200  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ . Stoupání respektive směrnice lineární závislosti  $A/I$  je interpretována jako maximální kvantový výtěžek fotosyntézy (AQE). iv) Za touto lineární částí můžeme pozorovat inflexi. Míru zakřivení udává parametr  $\Theta$ . v) Po inflexi pozorujeme mírné stoupání dokud křivka nedosáhne saturační hodnoty fotosyntézy. Tato hodnota je označována jako světelná saturační rychlost asimilace  $CO_2$  ( $A_{max}$ ).



Obr. 4: Závislost rychlosti asimilace  $CO_2$  na intenzitě dopadající radiace (PAR). V grafu jsou vyznačeny parametry charakterizující biochemickou a biofyzikální aktivitu: Temnostní respirace ( $R_{dark}$ ), kompenzační ozáření ( $\Gamma_I$ ), kvantový výtěžek fotosyntézy (AQE) a maximální rychlost asimilace  $CO_2$  ( $A_{max}$ ).

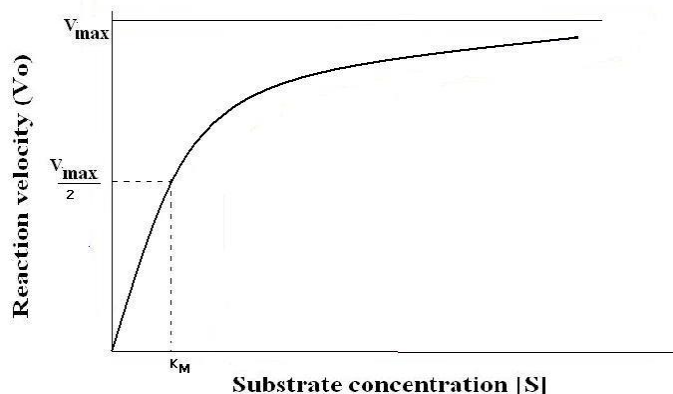
### 2.3 Matematické modely fotosyntetických křivek

Tvar nerovnoosé hyperboly  $A/C_i$  a  $A/I$  křivek poukazuje na enzymatickou podstatu obou závislostí. Pro matematický popis těchto závislostí jsou používány rovnice pro enzymatické reakce, které navrhli Michaelis a Mentonová:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (5)$$

kde  $v$  je rychlost pochodu,  $V_{max}$  jeho nejvyšší možná rychlost,  $[S]$  koncentrace substrátu (v našem případě tedy  $CO_2$  nebo PAR)  $K_m$  je Michaelis-Mentonová konstanta (ta odpovídá koncentraci

substrátu, při níž enzymatická reakce dosahuje poloviny maximální rychlosti).



Obr. 5: Typická závislost enzymatické reakce, ze které vychází matematický popis fotosyntetických křivek. Michaelis-Mentenová konstanta ( $K_M$ ); Maximální rychlost reakce ( $V_{max}$ ).

Pro modelování  $A/C_i$  křivek byl sestaven následující model:

$$A_n = \frac{A_{max} * (C_i - \Gamma_c)}{C_i + K} - R_{day} \quad (6)$$

kde  $A_{max}$  je maximální rychlost čisté fotosyntézy,  $c_i$  je koncentrace  $CO_2$  v podprůduchové dutině,  $\Gamma_c$  je kompenzační koncentrace  $CO_2$ ,  $K$  představuje hodnotu  $C_i$ , při které je poloviční maximální  $A_n$ , a  $R_{day}$  je míra respirace.

Pro modelování světelných křivek je možno použít následující rovnici:

$$A_n = \frac{AQE * PAR * A_{max}}{AQE * PAR + A_{max}} - R_{dark} \quad (7)$$

kde AQE je zdánlivá kvantová účinnost přeměny dopadající radiace, PAR intenzita dopadající radiace,  $A_{max}$  je maximální rychlost fotosyntézy,  $R_{dark}$  respirace za tmy.

Kompenzační radiace ( $\Gamma_I$ ) pak může být vypočítána podle rovnice č. 8:

$$\Gamma_I = \frac{R_{dark} * A_{max}}{AQE * (A_{max} - R_{dark})} \quad (8)$$

Tyto matematické popisy jsou racionálním vyjádřením vlastních experimentálních výsledků, jsou vhodné pro interpolaci naměřených hodnot a umožňují z experimentálních dat odvodit parametry charakterizující biofyzikální a biochemické funkce fotosyntetického aparátu.