

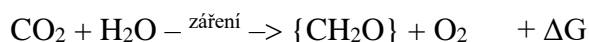
6

TÉMA

Fotosyntetický výdej kyslíku

TEORETICKÝ ÚVOD

Fotosyntéza je pochod, kterým některé druhy bakterií, nižší a vyšší rostliny přeměňují zářivou energii pohlcenou chlorofylem a jinými doprovodnými barvivy v energii chemických vazeb primárních metabolitů – energií bohatého ATP a redukčního ekvivalentu NADPH. Takto získaná energie slouží v sledu dalších reakcí k asimilaci oxidu uhličitého. Hlavními meziprodukty, které opouštějí chloroplast, jsou tříuhlíkaté deriváty cukrů. Označíme-li si $\{CH_2O\}$ jako strukturní jednotku cukrů, pak můžeme formálně napsat celkovou rovnici tzv. kyslíkové fotosyntézy:

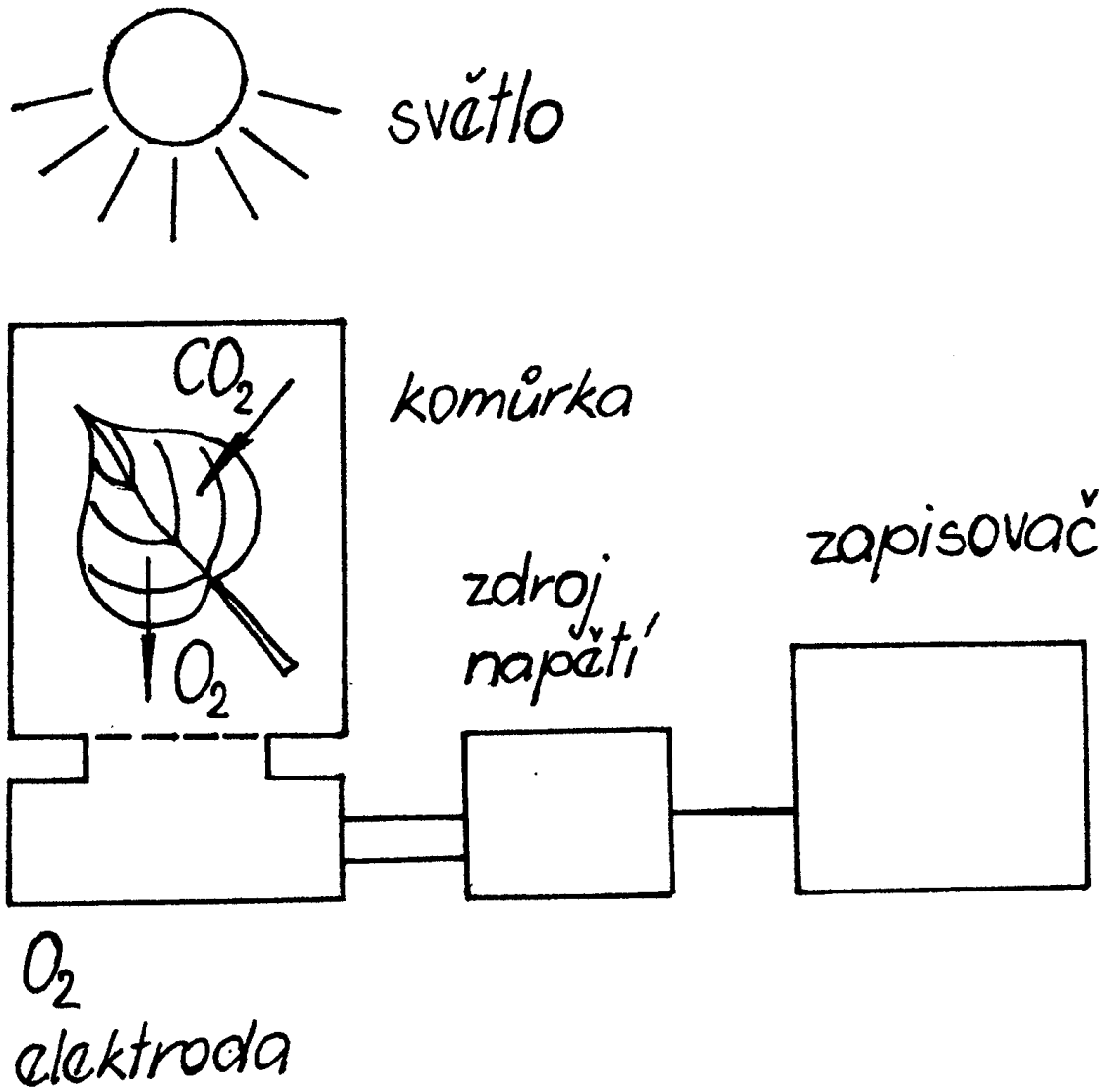


Dodá-li se autotrofnímu organismu, který má dostupnou vodu, oxid uhličitý za současného ozařování, tento organismus vyvíjí kyslík.

Měření výdeje kyslíku patří mezi nejjednodušší prostředky, kterými lze studovat fotosyntézu.

PRINCIP MĚŘENÍ

Princip měření je patrný z *obr. 1*. Ozařuje-li se zdrojem viditelného záření listové pletivo v uzavřené komůrce a je-li současně přítomen zdroj oxidu uhličitého a dále netrpí-li pletivo výrazným nedostatkem vody, pak běží fotosyntéza a uvolňuje se kyslík. Ten difunduje do okolí listu, čímž dochází ke zvyšování jeho parciálního tlaku v uzavřeném prostoru komůrky. Změny parciálního tlaku kyslíku jsou snímány vhodným detektorem, převáděny na elektrický signál a zaznamenávány na zapisovači.



Obr. 1

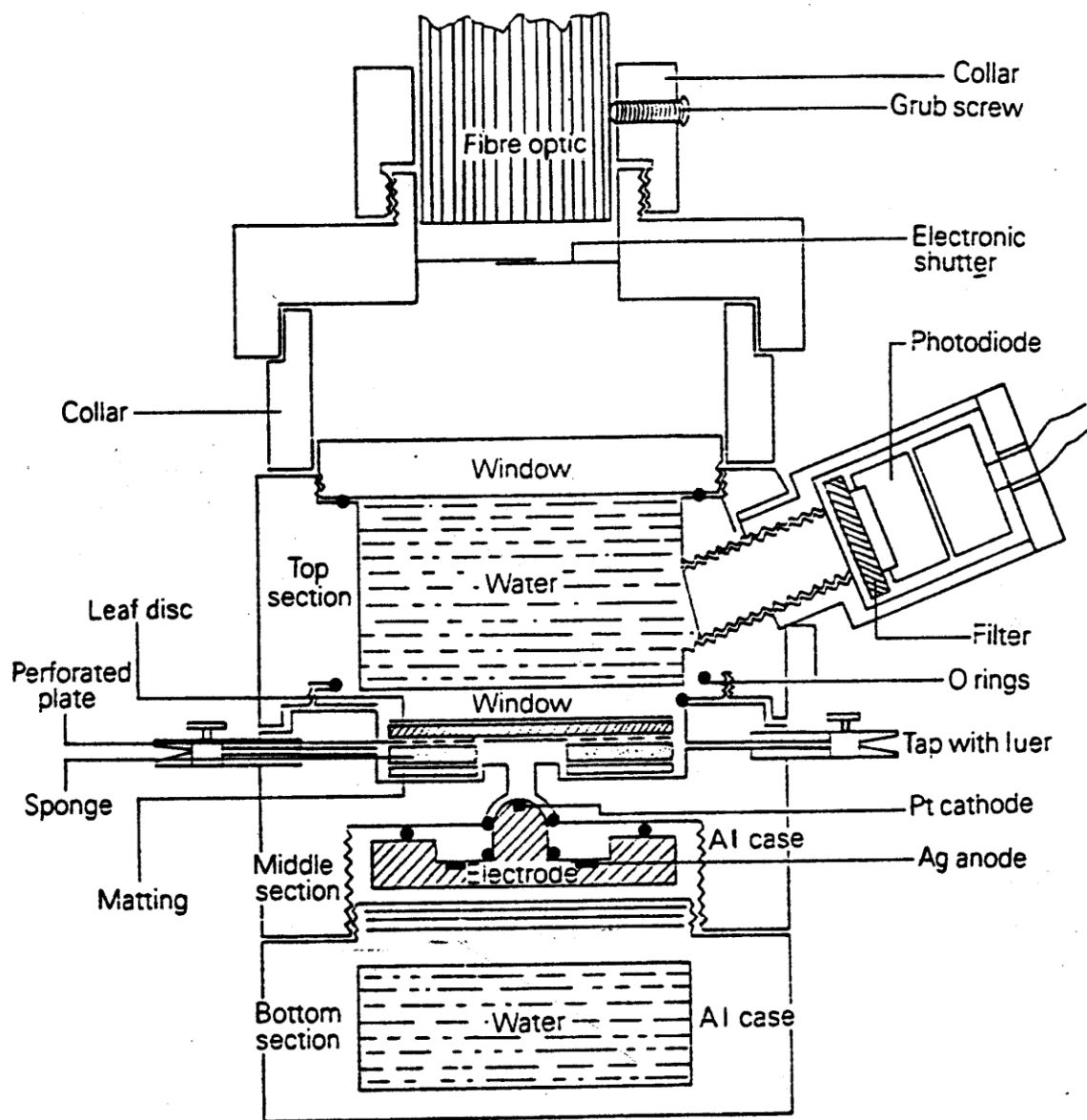
POPIS ZAŘÍZENÍ

K měření vývoje kyslíku asimilačních pletiv v uzavřeném systému slouží komůrka, kde detekčním prostředkem je kyslíková elektroda. Anglicky se toto zařízení nazývá “leaf disc oxygen electrode unit”; český název je „listová (disková) kyslíková elektroda“.

Na *obr. 2* je uveden schematický náčrt komůrky s kyslíkovou elektrodou pro měření v plynné fázi. Listový terčík leží na nerezové kovové síťce ve střední části přístroje. Kyslíkový detektor (elektroda Clarkova typu) přiléhá zespodu ke komůrce s listem. Jeho platinová katoda je vystavena atmosféře v komůrce. Pletivo listu je mírně přitlačováno proti termostatovanému hornímu dílu zařízení pomocí disku z pěnového polyuretanu, který jej také odděluje od terčíku z hrubé tkaniny, v jejíchž pórech je nasáknut roztok schopný uvolňovat oxid uhličitý. Vzorek je osvětlován shora přes dvě průhledná okna vhodným světelným zdrojem. Kohouty na prostředním dílu jsou pro přívod a odvod plynů sloužících ke kalibraci zařízení či nastavení požadovaného složení atmosféry v komůrce. Všechny spoje a dosedací plochy jsou těsněny gumovými o-kroužky. Svorky, jimiž se připevňuje horní díl k prostřednímu, a nástavce pro přívod a odvod vody z termostatu nejsou na obrázku zakresleny.

ÚLOHA

Změřte teplotní závislost výdeje a spotřeby kyslíku u terčíků vyseknutých z listů dvou druhů rostlin. K tomuto účelu použijte C3 rostlinu a C4 rostlinu. Pracujte s teplotami 25 a 40 °C. Jako substrát použijte jak bikarbonát (NaHCO_3) s převažujícím ^{13}C tak i s ^{12}C . Výsledky uveďte v jednotkách $\mu\text{mol}(\text{O}_2) \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (normování na jednotku plochy listu). Výsledky vzájemně porovnejte.



Obr. 2

POSTUP

1. Příprava zařízení a sestavení komůrky

- a) Zapněte termostat. Základní teplotu zvolte 25 °C.
- b) Sestavte měřicí komůrku: Do prostředního dílu komůrky vsuňte středovací přípravek a vložte 7 disků v pořadí plná kovová podložka s vyseknutým středem, hrubá tkanina, kovová síťka s neperforovaným středem, pěnový polyuretan, kovová síťka, hrubá tkanina a terčík z černé látky (místo terčíku z listu).
- c) Vyjměte přípravek na středování disků a zkontrolujte, zda je pod ním gumový těsnicí o-kroužek.
- d) Nechte oba kohouty otevřené a nasad'te horní díl komůrky na prostřední. Zajistěte je dvěma protilehlými svorkami.

Pozn.: V případě, že jsou ve vodním filtru velké vzduchové bubliny, natočte horní díl před jeho nasazením na komůrku tak, aby vývod temperovací vody směřoval kolmo vzhůru. Bubliny se tak vypudí ven.

2. Kalibrace

Listová disková kyslíková elektroda se ovládá prostřednictvím počítače a programu Oxy-Trace+. Při kalibraci postupujte podle příkazů, které se objeví po otevření „Calibrate > Gas Phase Calibration“ na liště nabídek.

3. Měření výdeje kyslíku

- a) Sejměte horní termostatovaný díl komůrky.
- b) Pomocí pinzety vyjměte z komůrky 5 disků shora, až se dostanete na druhý disk odspodu (hrubá tkanina).
- c) Na tuto porézní tkaninu napipetujte 200 μ l nasyceného vodného roztoku NaHCO_3 jako zdroj CO_2 .
- d) S pomocí středovacího přípravku umístěte disky do komůrky ve stejném pořadí jako byly. Poslední disk (terčík z černé látky) tam nevracejte (místo něj bude listový terčík).

- e) Tkaninu, na níž bude spočívat listové pletivo, mírně navlhčete H_2O .
- f) Z listu dané rostliny vysekněte k tomu určeným přípravkem terčík, který má velikost 10 cm^2 , a umístěte jej na disky v komůrce.
- g) Vyjměte středovací přípravek, uzavřete komůrku a oba kohouty na jejím středním dílu.
- h) Na okénko na horní straně komůrky opatrně nasad'te zdroj světla.
- i) Spust'te záznam tlačítkem „Go“ v programu OxyTrace+ na liště nástrojů.
- j) Rozsvi'te světlo. **List fotosyntetizuje a uvolňuje kyslík** – zapisujete křivku jeho výdeje. Zaznamenávejte tak dlouho, dokud není dosaženo stacionárního výdeje O_2 – lineárního tvaru zápisu.
- k) Zhasněte světlo. **List dýchá** – zapisujete křivku spotřeby O_2 . Zaznamenávejte tak dlouho, dokud není dosaženo linearit'y zápisu.
- l) Ukončete záznam dat a výsledky zpracujte podle pokynů vedoucího.
- m) Dále postupujte podle zadání úlohy.

4. Ukončení práce

- a) Po skončení pokusu vyjměte z komůrky všechny disky.
- b) Plnou kovovou podložku s vyseknutým středem a oba terčíky z porézní tkaniny důkladně umyjte vodovodní vodou, abyste z nich odstranili zbytky roztoku i vykrystalizovaného $NaHCO_3$, pak je opláchněte destilovanou vodou a vysušte mezi čtverečky buničiny. Vypněte všechny přístroje kromě polarizace elektrody.

5. Zpracování výsledků

Po zkalkulování přístroje udává OxyTrace+ výsledky vyvinutého nebo spotřebovaného kyslíku celým listovým terčíkem (10 cm^2) vzhledem k jeho atmosférickému množství (RTA) v jednotkách látkového množství (mol) za minutu. Pro přepočítání na požadovanou jednotku [$\mu\text{mol}(O_2)\text{ s}^{-1}\text{ m}^{-2}$] vynásobte výsledek faktorem 16,667. Tento faktor zadejte do tabulky dosažitelné z lišty nástrojů „Rate > Display Rate Table > Set Normalise Factor“.