

Měření výměny plynů jako nástroj pro studium fotosyntézy I.

Fotosyntéza je z kvantitativního hlediska nejdůležitější biochemický proces na Zemi. Zelené organismy při něm za přístupu světla tvoří z oxidu uhličitého (CO_2) a vody organické sloučeniny. Jako „vedlejší produkt“ při tom vzniká rozkladem vody molekulární kyslík (O_2). Jde o buněčný pochod odehrávající se v chloroplastech a sinicích o rozměrech řádově mikrometrů, který ale, kvůli jejich astronomicky velkému počtu v biosféře Země, ovlivňuje klíčovým způsobem naši planetu, především cykly uhlíku, kyslíku a energie. Je zdrojem energie a kyslíku pro vše živé nezelené (heterotrofní) včetně nás lidí; vedle toho je původcem fosilní energie, hlavně ropy, zemního plynu, dřeva a odvozených konstrukčních hmot, vláken pro naše oblečení, umělých hmot a většiny člověkem produkovanych ostatních organických látek – to pokud se na fotosyntézu díváme více antropocentricky. Motivace studia fotosyntézy je tedy zřejmá (viz úvodní kresba od Vladimíra Renčína).

Co znamená „výměna plynů“ a jak se v principu měří?

Z úvodních vět je zřejmý i tradiční způsob, jak se o fotosyntéze dozvědět víc, jak podhalit její mechanismy a zjistit, které faktory prostředí ji ovlivňují. Vede k tomu měření výměny CO_2 nebo O_2 a případně i vodní páry mezi listem, porostem či obecněji vegetací a okolní atmosférou, nebo fytoplanktonem, řasami nebo jinými vodními rostlinami a vodou v případě vodních autotrofních organismů. V dalším textu ukážeme, jak lze zjišťovat toky zmíněných plynů, tedy rychlost fotosyntézy, mezi zelenými částmi rostliny a okolním vzduchem, jak analyzovat získaná data a co nám o rostlině mohou prozradit.

Technologický pokrok a teoretické práce v oblasti fyziky prostředí na konci 50. let 20. století umožnily konstrukci přístrojů, jejichž „srdcem“ bylo zařízení pro měření koncentrace plynů založené na principu absorpce infračerveného (IR) záření (biatomické plyny, jejichž molekula je složena z atomů dvou různých prvků, jako je CO_2 nebo H_2O , absorbují IR záření, zatímco monoatomické, např. O_2 nebo N_2 , ho neabsorbují). Jakmile máme k dispozici IR analyzátor citlivý na CO_2 a na H_2O (obě látky absorbují IR záření převážně odlišných vlnových délek), je principiálně snadné změřit rychlost, s jakou list nebo celá rostlina odebírá z okolní atmosféry CO_2 nebo vydává vodní páru. Stačí list či rostlinu

uzavřít do průhledné komory protékané proudem vzduchu a změřit koncentraci CO_2 a vodní páry v proudu před vstupem a na výstupu z komory (obr. 1). Komora musí mít průhledné víko, aby k listu mohlo pronikat světlo, a protékající vzduch musí být uvnitř komory míchaný ventilátorem, aby se snížil difúzní odpor hraniční vrstvy vzduchu nad listem (o hraniční vrstvě viz např. Živa 2024, 6: 304–307) a aby se koncentrace plynů ve vzduchu homogenizovala. Pak už stačí jen zjistit z rozdílu koncentrací CO_2 a vodní páry na vstupu a výstupu komory, kolik si list „vzal“ CO_2 , tedy jaká je čistá rychlost asimilace CO_2 (označovaná většinou A , nebo A_{net}), a kolik do vzduchu přidal vody, tedy jaká je rychlost transpirace (E). K tomu ale ještě musíme znát, kolik vzduchu protéklo komorou (rychlost průtoku vzduchu) a plochu listu (listů) uzavřených v komoře. Při malém průtoku vzduchu nebo velké ploše listů v komoře bude rozdíl koncentrací obou plynů mezi vstupním a výstupním vzduchem větší než při velkém průtoku nebo s malým listem. Způsob výpočtu je naznačen v popisu obr. 1.

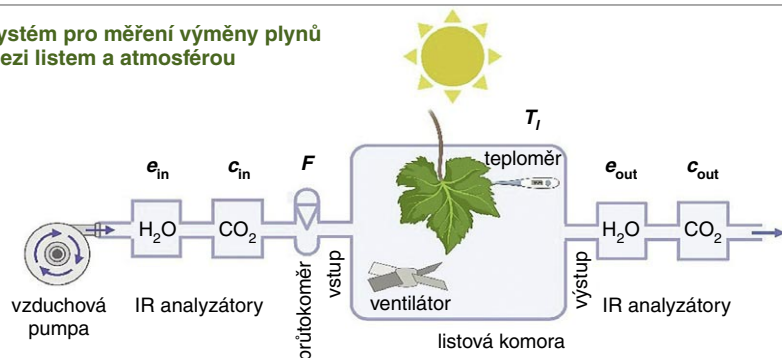
Kromě zmíněného principu měření, založeného na uzavření zelené části rostliny do komory, se už od 30. let minulého století vyvíjely metody měření výměny plynů mezi porosty (např. zemědělských plodin, tedy obilí na poli, nebo lesního ekosystému) a atmosférou založené na mikrometeorologických měřeních koncentrace plynů v profilu porostu. Nověji pak na měření toků plynů z volné atmosféry do porostu (např. CO_2 během dne) nebo ven z porostu (CO_2 během noci) pomocí speciálního IR analyzátoru s otevřenou dráhou IR paprsku a ultrazvukového (sonického) anemometru, který měří rychlost větru ve třech navzájem kolmých osách. O tomto způsobu tzv. vírové kovariance (eddy covariance) podrobněji pojednává článek na str. 160–165 tohoto čísla Živy.

K čemu je dobré znát rychlosti výměny CO_2 (A) a vody (E)

Stručně řečeno, abychom se dozvěděli více o mechanismech důležitého přírodního děje – využití světelné energie k pohonu všech biologických pochodů na naší planetě. Námítka: výstižné, ale příliš obecné. Když chceme poznat mechanismus toho, jak fungují mechanické hodinky, nestačí sledovat jejich ručičky; musíme je otevřít, pozorovat, rozebrat a zase složit a testovat, jestli se mé představy shodují se skutečností. Najdeme přitom některé obecné charakteristiky společné všem hodinkám, ale i rysy specifické pro různé typy nebo značky. Podobné je to s poznáváním mechanismů fotosyntézy. Fotosyntetické „hodinky“ za nás otvírali zvědaví lidé už od 17. století a boom poznání přišel hlavně ve 20. století. Díky jejich přemýšlení, entuziasmu a zvědavosti (méně už snaze vyniknout, profitovat ekonomicky, mít vliv a budovat kariéru) dnes víme ve větších nebo menších detailech, jak ty sluncem poháněné hodinky vyrábějí z CO_2 cukry. Může ale znalost dvou základních čísel, A a E , zjištěných při měření výměny plynů, pomoci podhalit detaily toho, co se děje uvnitř chloroplastů? Není to, že sledujeme rychlost fotosyntetické fixace CO_2 a výdej vody transpirací, jen analogií ke sledování pohybu ručiček na hodinkách?



Systém pro měření výměny plynů mezi listem a atmosférou



1 Schéma systému pro měření výměny plynů mezi listem (rostlinou) a atmosférou. Jsou zobrazeny základní složky tzv. otevřeného systému pro měření rychlosti fotosyntézy (A), transpirace (E) a difuzní vodivosti listu (g_l): listová komora protéká vzduchem nasávaným z volné atmosféry a hnaným pumpou, infračervené (IR) analyzátorů pro měření koncentrace vodní páry a oxidu uhličitého (CO_2), průtokoměr na vstupu vzduchu do komory a infračervené analyzátorů na výstupu vzduchu z komory. Vzduch v komoře musí být míchaný ventilátorem a teplotu listu (T_l) měříme teploměrem (obvykle kontaktně pomocí termočlánku). IR analyzátorů stanoví koncentrace vodní páry a CO_2 na vstupu do komory (e_{in} a c_{in}) a na výstupu vzduchu z komory (e_{out} a c_{out}). Průtokoměrem stanovíme množství vzduchu, který projde komorou za jednotku času (F). Známe-li plochu listu S (obvykle se bere jako plocha exponovaná slunečnímu záření, tedy plocha jen jedné strany listu), spočítáme rychlost transpirace $E = F \times (e_{\text{out}} - e_{\text{in}}) / S$ a fotosyntézy $A = F \times (c_{\text{in}} - c_{\text{out}}) / S$. Takto změřené E nám poslouží k výpočtu vodivosti listu pro difuzní transport vodní páry ven z listu $g_l = E / (e^s_{T_l} - e_{\text{out}})$, kde $e^s_{T_l}$ je koncentrace nasycené vodní páry při teplotě listu T_l .

2 Schéma klíčových struktur a pochodů při fotosyntéze listu. Typický bifaciální list (vlevo) je na příčném řezu (uprostřed) uspořádán tak, aby zachycoval dostatek slunečního záření a zároveň dovozoval vstup molekulám CO_2 (červeně) z vnější atmosféry póry mezi svěřacími buňkami průduchů (světle zelené buňky s chloroplasty ve spodní pokožce). Prostor uvnitř listu vymezený horní a spodní pokožkou – složenou z buněk bez chloroplastů (šedé) a kutikuly (modře) – je vyplněn mezofylóvými buňkami (zelené) s chloroplasty

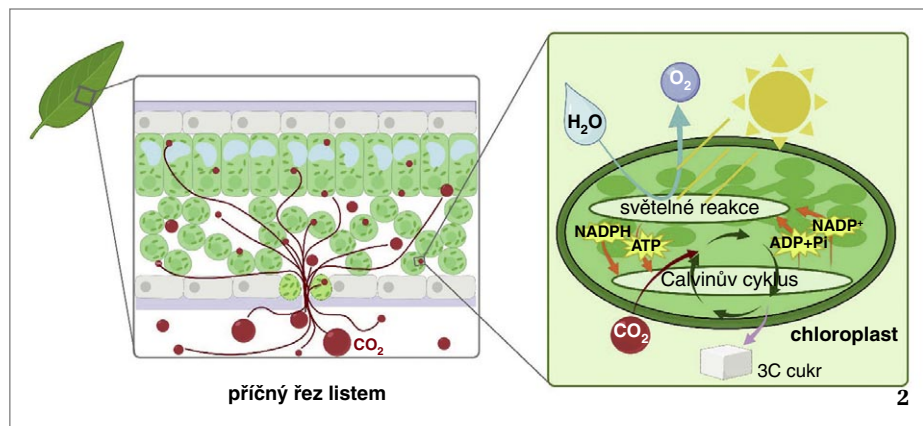
(tmavě zelené) a mezibuněčnými prostory vyplněnými vzduchem (bílé). Procesy odehrávající se v chloroplastech znázorňuje schéma vpravo. Dochází zde k vázání energie světla do chemických vazeb adenosintrifosfátu (ATP) a nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH) za současného štěpení vody a uvolnění kyslíku, které probíhá na membránách tylakoidů – váčků uspořádaných v granech (sloupečcích nad sebou, středně zelená) – při světelných nebo primárních reakcích fotosyntézy. A dále se ATP a NADPH využívají k fixaci CO_2 enzymy (karboxylačním enzymem Rubisco) a produkci tříuhlíkatého (3C) cukru (triózy) v Calvinově (Calvinově–Bensonově–Basshamově, CBB) cyklu ve stromatu (prostoru vně tylakoidů) chloroplastů (světle zelená). Triózy se transportují ven přes chloroplastovou obálku (tmavě zelená) nebo se z nich uvnitř chloroplastů syntetizuje škrob.

Pokusíme se ukázat, že ne, tedy že sledování toku CO_2 dovnitř a vody ven z listů může sloužit jako mikrosonda, kterou lze pozorovat biofyzikální a biochemické procesy řídící fotosyntetickou fixaci CO_2 i na úrovni chloroplastových enzymů, tylakoidních membrán nebo molekulárního transportu CO_2 a asimilátů. Výhodou je, že toto pozorování můžeme uskutečnit na živém intaktním listu, *in vivo*, a vzhledem k miniaturizaci a přenosnosti dnešních přístrojů také *in situ* – na místě přirozeného růstu rostliny. Kromě už zmíněného slouží měření výměny plynů i ke zjištění strategií, které rostliny používají pro hospodaření s vodou, k odhalení metabolického typu fotosyntetické fixace CO_2 u různých druhů rostlin, C_3 , C_4 nebo CAM druhů (viz dále v textu), nebo ke zpřesnění modelů řešících úlohu vegetace v globálních cyklech uhlíku a vody a v klimatických modelech.

Základní charakteristiky fotosyntetického aparátu stanovené technikami výměny plynů (gazometrie)

Fotosyntézu si pro přehlednost můžeme rozdělit na tři navazující, vzájemně propojené a závislé pochody (obr. 2): světlem přímo poháněné (primární) procesy probíhající na tylakoidních membránách chloroplastů, jejichž studium je doménou biofyziků; druhými jsou na světlo podmíněně nezávislé, enzymatické pochody probíhající ve stromatu chloroplastů, které studují hlavně biochemikové; ty mohou probíhat bez přítomnosti světla, pokud došlo k aktivaci enzymů. Třetí skupinu tvoří transportní pochody, týkající se hlavně přenosu CO_2 z atmosféry do chloroplastů, ale také transportu asimilátů (cukrů) z chloroplastů do okolních buněk a orgánů rostliny, které zkoumají převážně rostlinní fyziologové. Zkratkovitě řečeno, klíčovým procesem, který ukazuje, že probíhají primární procesy, tedy přeměna energie světla na tylakoidních membránách, je rychlost transportu elektronů označovaná symbolem J . Druhý pochod představuje enzymatickou asimilaci CO_2 ve známém Calvinově–Bensonově–Basshamově (CBB) cyklu, za jehož objev dostal americký chemik Melvin Calvin r. 1961 Nobelovu cenu za chemii. Lze jej charakterizovat rychlostí karboxylace (označovanou symbolem V_c ; V z anglického Velocity a c místo carboxylation) cukru ribulóza-1,5-bisfosfátu (RuBP) enzymem ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza (Rubisco). Schopnost přenášet dostatek CO_2 do chloroplastů (třetí pochod) je nejčastěji charakterizována difuzní vodivostí listu, případně průduchů, označovanou g , kterou si lze představit jako míru otevření průduchů. Má-li fotosyntetická asimilace CO_2 v dostatečné míře zásobovat list a celou rostlinu cukry, musejí všechny tři zmíněné pochody probíhat koordinovanou rychlostí. Není dlouhodobě možné, aby se jeden z nich zastavil a ostatní běžely. Aby se např. zastavil přísun CO_2 , třeba když rostlina nemá dostatek vody a zavře průduchy, a přitom docházelo ke karboxylaci RuBP. Podobně není možné, aby fixace CO_2 pokračovala nadále velkou rychlostí, když např. husté mraky zastíní slunce, a sníží se tak rychlost toku elektronů J a přeměna sluneční energie na chemickou.

Hodnoty parametrů všech tří dílčích procesů (J , V_c a g) se navenek projevují okamžitou rychlostí příjmu CO_2 do rostliny. Můžeme si to přiblížit v analogii s autem. O momentální rychlosti auta rozhoduje míra stlačení pedálu plynu, která je dána např. tím, jak moc spěcháte, jak hustý je provoz nebo co vám předepisuje případná značka omezené rychlosti. Aktuální rychlost auta je tedy daná okolnostmi a chováním řidiče. Vedle toho ale existují konstrukční parametry samotného auta, např. výkon motoru, valivý odpor kol či aerodynamický odpor karoserie, které definují maximální dosažitelnou rychlost. Rostlina a její fotosyntetický aparát mají také podobné „konstrukční“ parametry, limity, které omezují maximální rychlost asimilace CO_2 . Jsou jimi maximální rychlost transportu elektronů při saturační ozáření (dostatku „paliva“ ze slunce, J_{max}), omezená např. rychlostí štěpení vody, případně rychlostí transportu elektronů, dále

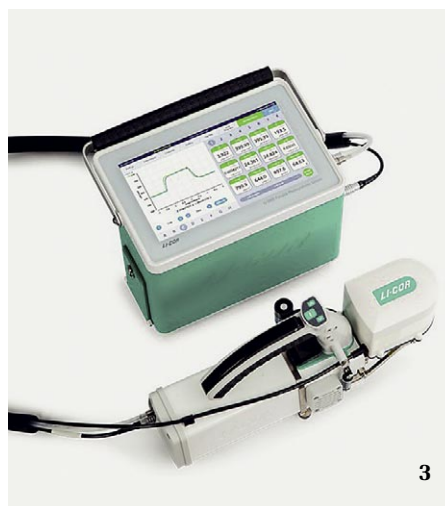


maximální rychlost karboxylace enzymem Rubisco ($V_{c\max}$), při nadbytku CO_2 (a proto potlačené fotorespiraci – viz dále v textu) a také maximální celková difúzní vodivost listu pro CO_2 ($g_{\max}$). Auto, které budete mít na stínu parkovat na slunci nebo ho vystavíte nízké vlhkosti vzduchu, nezmění své konstrukční parametry. Jinak je to s rostlinou. Ta se na dlouhodobé změny ozáření, zvýšenou koncentraci CO_2 v atmosféře nebo na růst v suchém vzduchu aklimuje – reaguje změnami proteinových komplexů v chloroplastech i změnou struktury (anatomie) nových listů, a tedy i změnami svých „konstrukčních“ hodnot $J_{\max}$, $V_{c\max}$ a $g_{\max}$. U auta se konstrukční parametry dozvíte ze štítku pod kapotou nebo vám je sdělí výrobce. V případě rostlin nám může pomoci měření výměny plynů (laboratorní hantýrkou gazometrie).

Vyžaduje to ale měření závislosti A na některých faktorech prostředí, hlavně na světle a na koncentraci CO_2 , a využití matematického modelu fotosyntézy (viz dále). Kromě zmíněné maximální rychlosti transportu elektronů a maximální rychlosti karboxylace ($J_{\max}$ a $V_{c\max}$), které souhrnně vyjadřují kapacitu fotosyntézy, se fotosyntetický aparát dané rostliny často charakterizuje i několika dalšími konstrukčními vlastnostmi měřenými pomocí gazometrie. O nich se dočtete v pokračování článku v kulérové příloze (str. CXIX–CXXI).

Okamžité (aktuální) parametry fotosyntetického aparátu

Vraťme se v této chvíli od konstrukčních, dlouhodobých vlastností listů k časově omezeným, okamžitým charakteristikám rozhodujícím o rychlosti fotosyntézy. Rychlost asimilace CO_2 listu vloženého do komory (obr. 1) ovlivňují nejvíce čtyři faktory prostředí. Jsou jimi: zaprvé intenzita světla neboli ozáření fotosynteticky aktivním zářením, tedy světlem v rozmezí vlnových délek zhruba 400–700 nm, měřená obvykle jako počet fotonů dopadajících na jednotku plochy listu za jednotku času a vyjádřená např. v jednotkách μmol (fotonů) $\cdot \text{m}^{-2}$ (listu) $\cdot \text{s}^{-1}$ (1 μmol fotonů je $A \times 10^{-6}$ fotonů, A zde značí Avogadrovo číslo $6,022 \times 10^{23}$); dále teplota listu měřená dnes nejčastěji dotykovým termočlánkem nebo bezdotykově infračerveným teploměrem; zatřetí koncentrace CO_2 a O_2 ve vzduchu v okolí listu a začtvrté koncentrace vodní páry v okolním vzduchu – vlhkost vzduchu. Hodnoty koncentrací se obvykle vyjadřují v jednotkách molárního zlomku, např. μmol (CO_2) $\cdot \text{mol}^{-1}$ (vzduchu), nebo číselně stejného tlakového zlomku, tedy μbar (CO_2) $\cdot \text{bar}^{-1}$ (vzduchu); přičemž za molekulovou hmotnost vzduchu se považuje střední molekulová hmotnost všech plynů obsažených ve vzduchu vážená jejich poměrným zastoupením (29 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Aby naše měření fotosyntézy listu uzavřeného v komoře nebylo zatíženo proměnlivostí některého z uvedených čtyř faktorů prostředí, na nichž fotosyntéza závisí, musíme je během měření udržovat neměnné; nastavit je na požadovanou hodnotu a po vložení listu do komory je regulovat tak, aby zůstaly stálé. Pak můžeme screeningovým typem měření porovnávat za stejných podmínek okamžitou rychlost fotosyntézy např. u listů různých rostlin, kultivarů



3

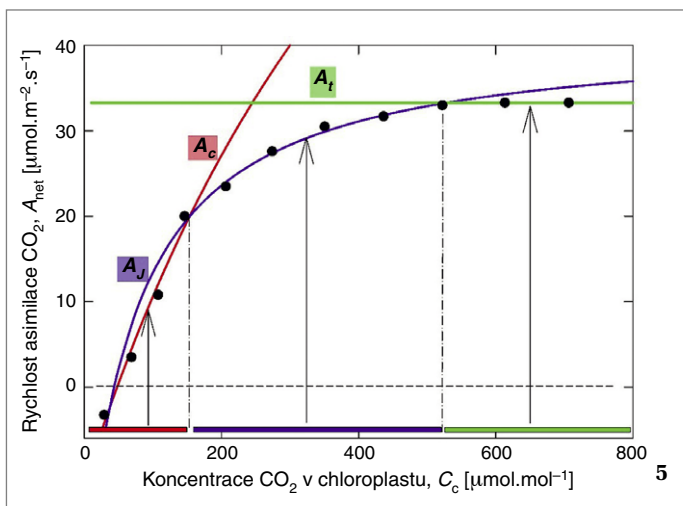
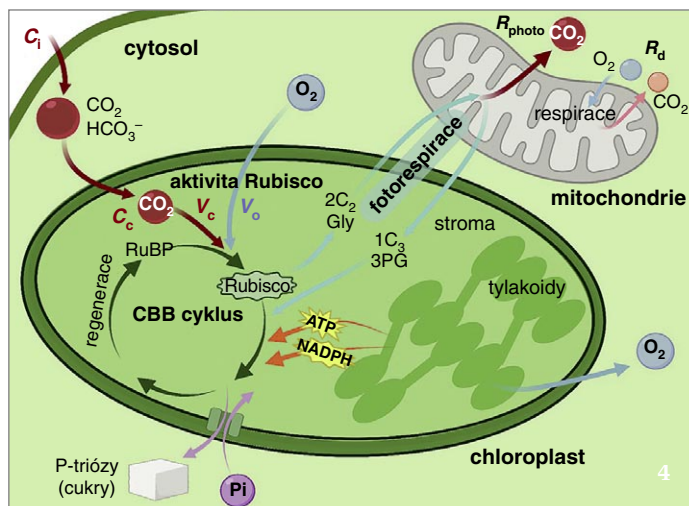
nebo listů rostlin po určitém experimentálním ovlivnění. Naštěstí doba pokročila a tento technicky dost složitý úkol za nás vyřešilo hned několik firem komerční výrobou a nabídkou přístrojů, které lze jednoduše naprogramovat, a nastavit tak podmínky v listové komoře, jaké zvolíme. Tyto přístroje navíc uloží všechna data, zpracují je a výsledky nabídnou ve formě grafů nebo tabulek. Přístroje bývají přenosné, napájené z baterií, a můžeme je tedy používat i v terénu od tropů až po Arktidu, ve sklenících nebo v laboratoři. Bohužel jsou ale drahé, v řádu milionů Kč, a tak je jejich použití např. ve školách vázáno spíše na spolupráci s univerzitami nebo výzkumnými pracovišti (na obr. 3 je jeden z dnes nejčastěji používaných).

S takovým přístrojem je pak možné procházet pokusným porostem s desítkami odrůd třeba pšenice, vkládat listy jednotlivých odrůd a zjistit, která odrůda má (v dané chvíli a při nastavených podmínkách prostředí v komoře) např. nejvyšší rychlost čisté fotosyntézy A_{net} nebo nejvyšší průduchovou (stomatální) vodivost g_s , jejíž hodnota je dána otevřeností průduchů a jejich hustotou na listu (počet průduchů na 1 mm^2). Průduchová vodivost, suchost vzduchu (kolik mu zbývá do nasycení vodní parou), teplota listu a rychlost větru rozhodují o tom, jak rychle list v daný moment ztrácí vodu čili o transpiraci E . Je přitom ale dobré vědět, že naměřené hodnoty se mění během denní doby – mají určitou denní rytmicitu, závisí na tom, jak jsou rostliny zásobené vodou, a mění se mimo jiné se stářím listu. Statistické vyhodnocení dat je tedy nezbytné a určitá zkušenost ku prospěchu. Příklad screeningové aplikace použití gazometrie nemusí směřovat jen do šlechtitelských nebo agronomických programů. Můžeme chtít vědět, zda a jak se fotosyntetický aparát brání napadení patogenem, nebo sledovat uhlíkovou bilanci rostliny. Zmíněné zařízení je totiž možné naprogramovat tak, aby simulovalo uvnitř listové komory vnější atmosférické podmínky ve všech čtyřech důležitých parametrech a monitorovat pak např. 24hodinový cyklus příjmu (při světle ve dne) a výdeje (ve tmě v noci) CO_2 – uhlíkovou bilanci listu nebo rostliny. Podrobněji se o dalších okamžitých (měnících se s časem v řádu sekund a minut) charakteristikách listu zjišťovaných gazometrií dozvíte opět na str. CXIX–CXXI kuléru.

3 Přenosný fotosyntetický systém (LI-COR, USA, www.licor.com) – řídící konzole upravující vstupní vzduch a zpracovávající data (zelená) a listová komora s IRGA (Infrared Gas Analyser) měřením koncentrací plynů (bílá). V tomto provedení je listová komora schopna kromě výměny plynů měřit také fluorescenci chlorofylu. Obě části jsou spojeny hadičkou a dvěma kabely.

4 Schéma tří hlavních příčin omezujících rychlost čisté fotosyntézy. Jednou z nich je aktivita enzymu Rubisco jako výsledek rychlosti karboxylace V_c a rychlosti oxygenace V_o substrátu ribulóza-1,5-bis-fosfátu (RuBP). CO_2 putuje z intercelulárního prostoru přes cytosol do stromatu chloroplastu (červenohnědé šipky). Produkty karboxylace RuBP vedou do CBB cyklu, zatímco při oxygenaci (modrozelené) se její dvouuhlíkatý produkt glykolát (Gly) zpracovává ve fotorespiračním (glykolátovém) cyklu tak, že ze dvou glykolátů se uvolní v mitochondriích jedna molekula CO_2 (fotorespirace R_{photo}) a tříuhlíkatý zbytek (tří-fosfoglycerát, 3PG) se vrací do CBB cyklu. Další příčinou je dodávka ATP a NADPH (červené šipky) pro fosforylace a redukce v CBB cyklu a výslednou regeneraci RuBP. Syntéza ATP a NADPH probíhá při primárních („světelných“) reakcích fotosyntézy na tylakoidních membránách a provázených produkcí kyslíku. Třetí faktor představuje transport a využití asimilátů (triózafosfátů) a návrat anorganického fosfátu (Pi) do chloroplastů (fialové šipky). Mitochondriální dýchání na světle R_d bývá menší než fotorespirace R_{photo} .

5 Analýza $A(C_c)$ křivek. Na listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*) se měřilo, jak závisí rychlost čisté fotosyntézy (A_{net}) na koncentraci CO_2 uvnitř listu (zde v chloroplastu, C_c). Černé body představují změřené hodnoty A_{net} pro 11 různých koncentrací C_c (měněny tak, že nastavíme různé koncentrace CO_2 v atmosféře okolo listu, C_a). Chceme zjistit, který proces ze tří možných (aktivita enzymu Rubisco; transport elektronů a regenerace RuBP; odvod asimilátů a návrat fosfátu do chloroplastů) brání tomu, aby fotosyntéza byla při dané C_c větší. Analýza založená na FvCB modelu (blíže v textu) ukazuje, jaká by byla A_{net} , kdyby fotosyntéza závisela pouze na aktivitě Rubisco (A_c a červená křivka), regeneraci RuBP (A_r a modrá křivka) nebo návratu fosfátu (A_t a zelená křivka). Nejnižší hodnota ze všech tří (A_c , A_r a A_t) při libovolné C_c (šipky) ukazuje, který ze zmiňovaných procesů fotosyntézu omezuje. Při nízkých koncentracích CO_2 v chloroplastech bývá A_{net} omezena nedostatečnou aktivitou Rubisco (červeně vymezená oblast C_c), při středně vysokých nedostatkem energie pro regeneraci RuBP (modrá oblast), při velmi vysokých C_c pak slabým využitím asimilátů a nedostatečným návratem fosfátu (zelená oblast C_c). Matematické vyjádření průběhu A_c , A_r a A_t je následující: $A_c = (V_{c\max} \cdot C_c) / [C_c + k_{mc} \cdot (1 + O / k_{mo})]$, $A_r = (J \cdot C_c) / (4C_c + 8\Gamma^*)$, $A_t = (3T_p \max \cdot C_c) / (C_c - \Gamma^*)$, kde O , k_{mc} , k_{mo} jsou v pořadí koncentrace kyslíku,



konstanta Michaelisova–Mentenové pro karboxylaci a pro oxygenaci RuBP a $T_{p\max}$ je maximální rychlost transportu triázofosfátů z chloroplastů. Ostatní proměnné byly zmíněny v textu (Γ^* – blíže v kuléru na str. CXIX–CXXI). Optimálním proložením těchto závislostí našimi naměřenými body zjistíme, že daný list tabáku lze charakterizovat hodnotami $V_{c\max} = 147$, $J = 175$ a $T_{p\max} = 11,9$, vše v $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temnostní respiraci $R_{\text{dark}} = 2,41$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a mezofylovou vodivostí pro CO_2 $g_m = 3,9$ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$. Konstanty použité pro proložení: $k_{\text{mc}} = 27,24$ Pa, $k_{\text{mo}} = 16,58$ kPa a $\Gamma^* = 3,74$ Pa. Pro proložení křivek a výpočty viz T. D. Sharkey a kol. (2007)

Co omezuje rychlost fotosyntézy?

Analýza na základě CO_2 křivek

Počátkem 80. let minulého století se objevila klíčová práce, která analyzovala dva základní procesy spolupracující na asimilaci CO_2 v chloroplastech C_3 rostlin, a to světlem poháněný tok elektronů v tylakoidních membránách a karboxylaci pomocí Rubisco ve stromatu chloroplastů. Práce navrhla způsob, jakým se oba procesy podílejí na výsledné rychlosti čisté fotosyntézy. Autoři využili znalosti enzymové kinetiky a tehdejších poznatků o stechiometrii pochodů v chloroplastech a formulovali matematický předpis, který oba procesy popisuje (Farquhar a kol. 1980). Vznikl tak matematický model, pro který se dnes občas používá zkratka FvCB sestavená z iniciál přijmení autorů (Farquhar, von Caemmerer, Berry). Nedlouho poté byla vydána práce, která přidala ke dvěma předchozím ještě další pochod, jenž za určitých okolností může ovlivnit fixaci CO_2 v chloroplastech – odvod triázofosfátů (cukrů) z chloroplastů a návrat fosfátových iontů do chloroplastů (Sharkey 1985). FvCB model umí s rozumnou přesností předpovědět rychlost fotosyntézy při zadaných podmínkách prostředí, a i proto se stal součástí komplexnějších modelů na úrovni listu, porostu, ekosystému i globálních vegetačních modelů. V kontextu tématu tohoto článku je potřeba práci zmínit proto, že využívá gazometricky měřené závislosti rychlosti čisté fotosyntézy na koncentraci CO_2 uvnitř listu, tzv. $A(C_c)$ křivky (pro výpočet koncentrace CO_2 uvnitř listu, C_c , blíže kulérový příspěvek), a umožňuje

kvantifikovat dva už dříve zmíněné parametry, $V_{c\max}$ a J , které charakterizují kapacitu fotosyntetického aparátu. Jak na to?

Víme, že rychlost karboxylace v CBB cyklu může být omezena ze tří důvodů: kvůli nedostatečné aktivitě enzymu Rubisco, pomalé regeneraci RuBP v důsledku nedostatečné dodávky ATP a NADPH z elektron-transportních pochodů v tylakoidních membránách nebo z důvodu pomalého odvodu produktů karboxylace, tedy fosforylovaných tříuhlíkatých cukrů (triázofosfátů) ven z chloroplastů a návratu fosfátů (obr. 4). Každá z tří jmenovaných příčin uplatňuje svůj vliv na karboxylaci jinou měrou v závislosti na koncentraci CO_2 v místě karboxylace, v chloroplastu (C_c), ale i na množství absorbovaného světla nebo na kapacitě využítí a ukládání asimilátů. Rychlost karboxylace V_c ovšem není totožná s rychlostí čisté fotosyntézy A_{net} , kterou měříme v listové komoře na obr. 1. Víme (viz také pojednání v kulérové části), že karboxylaci musíme snížit o fotorespiraci R_{photo} , tedy tok CO_2 produkovaný oxygenací s rychlostí V_o , a o respiraci ve tmě R_{dark} (poněkud sniženo z důvodů, o kterých píšeme v kuléru také, a proto ji nazveme R_d), abychom spočítali velikost čisté fotosyntézy A_{net} ; tedy $A_{\text{net}} = V_c - 0,5 \times V_o - R_d$. Rychlost oxygenace V_o se zde odečítá od karboxylace jen z jedné poloviny, protože ze stechiometrie metabolismu fotorespirace víme, že na každé dvě oxygenace vznikne pouze jedna molekula CO_2 (viz také obr. 4).

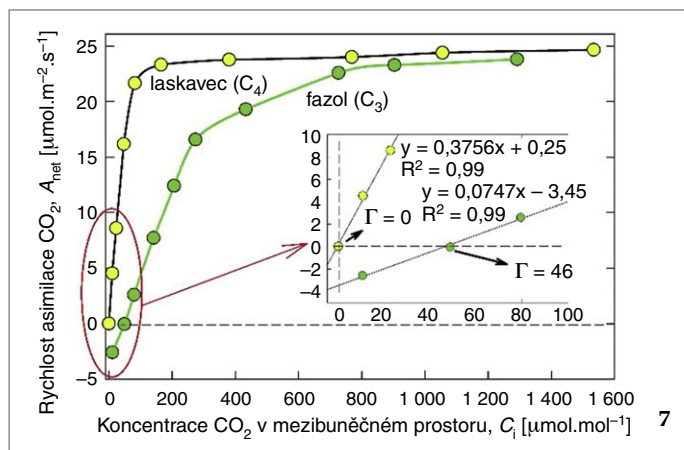
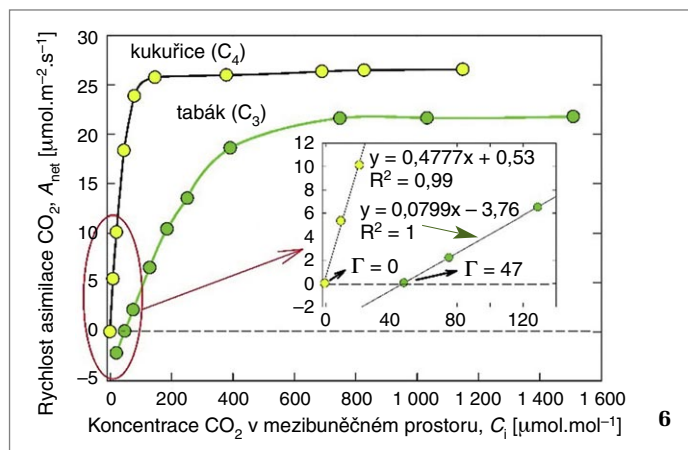
Pokud by rychlost čisté fotosyntézy byla omezoována jen činností enzymu Rubisco (první příčina), řídila by se její závislost na koncentraci CO_2 v chloroplastu funkcí, kterou ukazuje červená křivka na obr. 5. Zde se předpokládá, že energetických sloučenin produkovaných světlem a tokem elektronů (ATP, NADPH) je nadbytek. Tuto „červenou fotosyntézu“ označíme A_c .

Pokud by ovšem fotosyntézu limitovala pouze produkce energetických sloučenin ATP a NADPH na tylakoidních membránách, a tedy regenerace RuBP (druhá příčina), vystihovala by ji modrá závislost a fotosyntézu, která je nyní omezena rychlostí toku elektronů J , označíme A_j . V takové situaci se předpokládá, že aktivita Rubisco je neomezeně velká. Obě to jsou saturační hyperboly, jejichž matematické vyjádření odvozené na základě kinetiky enzymu Rubisco a stechiometrie produkce ATP

a NADPH je uvedeno v legendě k obr. 5 (k tomu, aby enzym Rubisco mohl navázat jednu molekulu CO_2 na RuBP a aby se regeneroval RuBP, tedy jednou se „protočil“ CBB cyklus, se musejí vyprodukovat tři molekuly ATP a dvě molekuly NADPH). Pokud by nastala situace, že z nějakého důvodu (např. nízké teploty) se nestačí z cytosolu do chloroplastů vracet anorganický fosfát (PO_4^{3-}) nebo je omezené využití triázofosfátů jako produktů CBB cyklu (třetí příčina), rychlost čisté fotosyntézy, nyní A_i , by probíhala po zelené křivce. A_c , A_j i A_i jsou modelové (matematickým modelem předpověděné) rychlosti čisté fotosyntézy. Jaká ale bude realita?

Jaká by měla být skutečná, námi naměřená A_{net} při různých koncentracích CO_2 v chloroplastech? Nebo se zeptejme jinak: Můžeme z naměřených skutečných hodnot A_{net} zjistit, co fotosyntézu dané rostliny za daných podmínek omezuje? Proč není vyšší a proč rostlina, porost, globální vegetace nespotebouvá více CO_2 a, potažmo, rostliny nerostou rychleji? Porostou rychleji, pokud budeme dále zvyšovat koncentraci CO_2 v atmosféře Země? To jsou otázky, k jejichž řešení by mohl náš mechanistický model fotosyntézy přispět. Vraťme se proto o mnoho pater organizace zpět – od planety k chloroplastům. Skutečná naměřená rychlost čisté fotosyntézy je v obr. 5 vyznačena černými body a ukazuje, že pokud uvažujeme celý rozsah koncentrace CO_2 , nevyhovuje ani jeden z navržených modelů pro A_c , A_j nebo A_i . Křivka proložená našimi měřeními hodnotami by ale v určitých rozmezích koncentrace CO_2 sledovala navržené průběhy (červený, modrý a zelený). Zmíněný model FvCB ukázal, že skutečně zjištěná rychlost čisté fotosyntézy při dané koncentraci CO_2 je minimem ze všech tří předpovědí. Tedy A_{net} bude mít hodnotu té předpovědi, která bude ze všech tří nejmenší – jako kdybyste stoupali podle šipek v obr. 5 a narazili na strop, který vás omezuje a nepustí výš. Symbolickým zápisem, $A_{\text{net}} = \min(A_c, A_j, A_i)$. Obecně platí, že při nízkých C_c je fotosyntéza omezena aktivitou Rubisco, při vyšších nedostatkem ATP a NADPH a při hodně vysokých někdy pomalým zpracováním produktů – triázofosfátů.

Kombinace gazometrického měření CO_2 křivek a FvCB modelu poskytuje možnost zjistit dvě důležité vlastnosti fotosyntetického aparátu C_3 rostlin, maximální rychlost



karboxylace ($V_{c \max}$) a rychlost toku elektronů (J) při dané intenzitě světla (zde je vhodné zmínit, že maximální rychlost toku elektronů $J_{\max}$, tedy takovou rychlost, které by teoreticky bylo možné dosáhnout při nekonečně velké ozáření, lze zjistit z měření světelné závislosti fotosyntézy – $A(I)$ křivky). Obě veličiny, $V_{c \max}$ a J , figuruji v matematickém předpisu A_c a A_j (viz legenda obr. 5) a mohou být zjištěny proložením funkcí A_c a A_j námi změřenými body tak, aby odchylka funkcí a naměřených bodů byla co nejmenší. Pro tento účel existují volně dostupné programy založené na funkci Solver v programu Excel nebo R-kódu (např. Sharkey a kol. 2007, Stinziano a kol. 2021). Proto, abychom snížili počet použitých parametrů, a tedy zvýšili přesnost výpočtu, je výhodné znát (změřit nebo alespoň kvalifikovaně odhadnout) velikosti dýchání na světle (R_d) a kompenzační koncentraci CO_2 (Γ^*); oba parametry lze zjistit také měřením výměny plynů. Detaily mechanistického FvCB modelu fotosyntézy v kontextu výměny plynů najdete v mnoha publikacích, přehledně např. v nedávno vydané od F. A. Busche a kol. (2024), kde jsou rozebrány i praktické rady a úskalí, s nimiž se setkáme při měření výměny plynů. Před samotným měřením je důležité si uvědomit, že FvCB model je sestaven pro rostliny s C_3 typem metabolismu, a pokud tedy chceme z měření a modelu stanovit $V_{c \max}$ a J , musíme pro měření zvolit C_3 rostlinu. Pro C_4 rostliny zatím takový podobný, relativně jednoduchý a obecně přijatý, model nemáme.

Jak gazometrií rozlišit C_3 , C_4 a CAM typy fotosyntetického metabolismu?

O tom, že existují v hrubém rozdělení tři metabolické typy fotosyntetické asimilace CO_2 (C_3 , C_4 a CAM), se můžeme poučit téměř v každé učebnici biologie rostlin. Přibližně 75–80 % druhů cévnatých rostlin používá C_3 typ nazvaný podle toho, že první stabilní produkt fixace CO_2 je tříuhlíkatý cukr (triózaofosfát). Zbývajících asi 25 % druhů připadá na CAM (ca 20 %) a C_4 (méně než 5 %) druhy, které v prvním kroku fixují CO_2 nikoli enzymem Rubisco, ale pomocí enzymu fosfoenolpyruvát karboxylázy (PEPc) za vzniku čtyřuhlíkaté organické kyseliny (oxalacetátu, dále pak jablečnanu neboli malátu) – proto název C_4 rostliny; zkratka CAM vychází z *Crassulacean Acid Metabolism* podle čeledi tlusticovitých (*Crassulaceae*), u níž byl objeven. V dalším kroku se dekarboxy-

6 a 7 Závislost rychlosti čisté fotosyntézy (A_{net}) na koncentraci CO_2 (C_i) změřená u dvou dvojic C_3 a C_4 rostlin: tabáku virginického (*Nicotiana tabacum*) a kukuřice seté (*Zea mays*, obr. 6) a fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) a laskavce ocasatého (*Amaranthus caudatus*, 7). C_4 rostliny vždy mají CO_2 kompenzační koncentraci Γ blízkou nule, zatímco u C_3 druhů se Γ pohybuje nejčastěji mezi 40 a 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ (viz vložené grafy s detaily průsečíků křivek s osou x, kde je A_{net} rovno nule). Typický rychlý náběh fotosyntézy při nízkých koncentracích CO_2 je u C_4 rostlin způsoben jejich koncentračním mechanismem pro CO_2 (CO_2 pumpou). Všechny orig. J. Šantrůček a T. Kalistová

laci čtyřuhlíkatých kyselin vzniklý CO_2 opět karboxyluje, tentokrát už standardně enzymem Rubisco. CAM a C_4 rostliny se liší tím, kde se čtyřuhlíkatá kyselina přechodně skladuje a dekarboxyluje (v buňkách pochev cévních svazků u C_4 , ve vakuolách stejné buňky u CAM) a kdy se zpracovává (během světelné periody u C_4 a v noci během temnostní periody u CAM).

Spolehlivý a asi nejsnazší způsob, jak rozlišit, zda daný druh rostliny využívá C_3 , nebo C_4 typ metabolismu, je změřit jeho CO_2 kompenzační koncentraci Γ , tedy zjistit, při jaké koncentraci CO_2 v mezibuněčných prostorech (C_i) bude tok CO_2 do listu shodný s výdejem CO_2 z listu a $A_{\text{net}} = 0$. Pokud bude Γ v rozmezí od 30 do 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, jde o C_3 rostlinu, jestliže bude Γ blízké nule, pak druh využívá C_4 typ metabolismu (obr. 6 a 7). Odlišný průběh $A_{\text{net}}(C_i)$ křivek je důsledkem fotorespirace probíhající u C_3 a nepřítomné u C_4 rostlin. Hodnota Γ vyšší než 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ dává poměrně spolehlivý důkaz o tom, že dochází k fotorespiraci, která je u C_4 druhů potlačena v důsledku CO_2 koncentračního mechanismu (CO_2 pumpy). Na přítomnost CO_2 pumpy u C_4 rostliny ukazuje i typický strmý vzestup křivky při nízkých koncentracích CO_2 , kdy jsou C_4 druhy schopny zkoncentrovat CO_2 v okolí Rubisco v buňkách pochev cévních svazků na více než 10násobek atmosférické koncentrace CO_2 . Fotosyntéza proto stoupá při nízkých hodnotách C_i daleko rychleji u C_4 než u C_3 rostlin (obr. 6). Odvozený, ale technicky náročnější důkaz o absenci fotorespirace, a tedy příslušnosti k C_4 rostlinám, dostaneme, když odstraníme kyslík ze vzduchu vstupujícího do listové komory. Hodnota

čisté fotosyntézy se u C_4 rostlin v takových podmínkách nezmění, kdežto u C_3 rostlin zaznamenáme skokový nárůst A_{net} .

Výměna plynů mezi CAM rostlinami a atmosférou se od C_3 a C_4 rostlin velmi liší denním chodem. Převážnou většinu uhlíku získávají CAM rostliny během noci, kdežto fotosyntetická asimilace CO_2 se v C_3 a C_4 rostlinách odehrává výhradně na světle – během dne. Měření bilance příjmu a výdeje uhlíku během dne a noci je tedy vhodným způsobem, jak odhalit CAM rostlinu. Je ale potřeba mít na paměti, že se CAM metabolismus u některých druhů, rodů i čeledí rostlin aktivuje až při nedostatku vody a/nebo při vyšší teplotě (např. u tlusticovitých). Některé rostliny tedy dokážou přecházet z režimu C_3 do CAM, a naopak podle podmínek prostředí, jsou fakultativně CAM. Zajímavé je, že podobný rys přechodu na CAM nebyl pozorován u žádných C_4 rostlin s výjimkou šruchy (*Portulaca*).

Měření výměny plynů mezi rostlinou a atmosférou dává nahlédnout do mechanismů fotosyntetické fixace CO_2 na úrovni buňky, listu, rostliny i celých ekosystémů. Umožňuje nám pochopit fungování „fotosyntetických hodin“ a porozumět množství anatomických, biofyzikálních a biochemických adaptací, které rostlinám dovolují přežít a prosperovat za podmínek variabilního a ne vždy pro autotrofní život příznivého prostředí. Analýza závislosti rychlosti fotosyntézy na světle a koncentraci CO_2 přináší možnost zjistit, který dílčí proces omezuje fotosyntézu a za pomoci molekulárněgenetických technik v budoucnu využít těchto znalostí k cílenému šlechtění na vyšší produkci nebo odolnost zemědělských plodin, lesních stromů nebo okrasných rostlin. Měření výměny plynů (gazometrie) spolu s měřením fluorescence chlorofylu a údaji o zastoupení stabilních izotopů uhlíku od úrovně listu po porost a ekosystémy nám pomáhá porozumět procesům odehrávajícím se na subbuněčné až celoplanetární úrovni.

Použitá literatura uvedena na webu Živy. O biologii, ekologii, evoluci a globálním významu C_4 rostlin viz také např. Vesmír 2012, 1–3; Nová Botanika 2020, 2: 39–40; o CAM rostlinách např. Živa 1999, 3: 105–108; 2003, 2: 59–61; 2020, 2: 68–71; 2021, 3: 117–120.