

Stabilní izotopy pomáhají objevovat a měřit fotosyntézu

Stabilní izotopy se v posledních desetiletích staly neocenitelným pomocníkem v mnoha oborech. Na rozdíl od izotopů radioaktivních má o nich veřejnost mnohem menší povědomí. Živa již představila uplatnění těchto neradioaktivních forem prvků v několika příspěvcích v oblastech archeologie a ekologie. Na tyto a další texty se budeme v obecných záležitostech odkazovat. V následujícím příspěvku se pokusíme představit využití stabilních izotopových technik ve výzkumu a kvantifikaci fotosyntézy a produkčního procesu rostlin, tedy oblastí, v nichž tyto metody již významně rozšířily naše poznání a dále jej rozšiřují. Zmíníme stručně i některé přesahy, které jsou aplikačně nebo finančně velmi významné.

¹⁴C a objev fotosyntetické fixace uhlíku

Přestože se budeme zabývat převážně stabilními izotopy, začneme radioaktivním uhlíkem ¹⁴C, který pomohl v 50. letech 20. století odhalit posloupnost chemických reakcí fotosyntézy – od příjmu anorganického CO₂ až po organické sacharidy. Za tento objev získal v r. 1961 Nobelovu cenu za chemii americký vědec Melvin Calvin.

Téma je vhodné pro úvodní kapitolu snad minimálně ze tří důvodů. Chronologicky – většina metod a objevů souvisejících se stabilními izotopy je novějších. Významem – Nobelova cena by mohla přesvědčit, že fotosyntéza, izotopy či obojí jsou hodny pozornosti. A didaktickou jednoduchostí, kdy se ještě obejdeme bez definice izotopu.

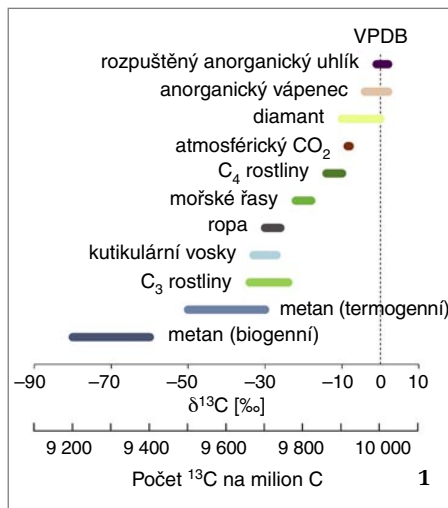
Radioaktivní atomy, přesněji jejich jádra, se s určitou pravděpodobností (udáváno nejčastěji poločasem rozpadu, tedy časem, za který se rozpadne polovina jader) rozpadají (mění) na jiná jádra a při tom vyzařují určitý typ částic do svého okolí. Uhlík ¹⁴C se s poločasem 5 700 let mění na dusík ¹⁴N, přičemž vyzařuje elektron. Tento typ tzv. β-záření můžeme citlivě detekovat scintilací.

M. Calvin s mladšími kolegy Andy Bensonem a Jamesem Basshamem provedli důmyslný experiment. Fotosyntetizující řasy rodu *Chlorella* v průhledné nádobě osvětlovali silným světlem a přidávali jim radioaktivní oxid uhlíčitý (¹⁴CO₂), který řasy fotosyntézou zabudovávaly do té doby neznámým sledem reakcí. Co je ale důležité, se sekundovou přesností od přidání ¹⁴CO₂ dokázali řasovou suspenzi v přesném množství vypouštět a buňky usmrcovat ve vroucím etanolu. Tím se samozřejmě reakce fotosyntézy zastavily. Jednotlivé látky z buněk řas extrahovali a rozdělávali papírovou chromatografií. Následně nebylo obtížné zjistit, které látky jsou radioaktivní a v jaké míře. Z časové řady odběrů, asi nikterak složitým matematickým aparátem, pak sestavili biochemický cyklus

„sekundárních reakcí fotosyntézy“, který se nyní musejí studenti učit.

Tento cyklus se dříve po hlavním objeviteli označoval jako Calvinův. Zajímavou a poněkud kontroverzní otázkou zůstává, proč Nobelovu cenu získal jen Calvin. Jeho kolegové měli na objevu nepopíratelný podíl a jednu Nobelovu cenu mohou, podle propozic, sdílet až tři osobnosti. Proto, jako jisté zadostiučinění, se nyní doporučuje zmíněný biochemický cyklus označovat jako Calvinův–Bensonův–Basshamův, zkratkou CBB (takže to studenti mají zase o něco obtížnější).

1 Zastoupení izotopu uhlíku ¹³C v různých přírodních. Množství je vyjádřeno jak v počtu ¹³C atomů na milion všech atomů uhlíku, tak delta notací, a udává rozdíl (nejčastěji v promile, ‰) mezi zastoupením ¹³C ve vzorku a příslušném standardu. Tím je pro uhlík zvláštní druh druhohorního sedimentárního vápence, vídeňský Pee Dee belemnit (VPDB), který má 11 800 ¹³C na milion C. My však, jako i jinde v textu a na obr. 4, budeme pro lepší přehlednost uvažovat 10 000.



Stabilní izotopy a jejich měření

Nyní trocha fyziky a fyzikální chemie (v míře nezbytně nutné). Čtenáři Živy se ostatně se stabilními izotopy již několikrát setkali, např. v souvislosti s archeologií a potravní a migrační ekologií (Živa 2008, 1: 42–45 a 2: 87–90; 2016, 5: 230–233 a 233–236). Hlubší zájemce o izotopové děje, měření a vyjadřování množství stabilních izotopů nechť otevře knihu Jiřího Šantrůčka, Hany Šantrůčkové a kol. Stabilní izotopy biogenních prvků. Použití v biologii a ekologii (Academia 2018).

Izotopy (nuklidy) jsou atomy příslušného prvku lišící se počtem neutronů v jádře (zatímco počet protonů, který určuje daný prvek, zůstává stálý). V případě uhlíku, o kterém budeme psát nejčastěji, nacházíme v jeho jádře vždy 6 protonů. Počet neutronů může kolísat. Pokud je neutronů málo, nebo naopak příliš mnoho, jádro je nestabilní. To je případ zmíněného uhlíku ¹⁴C, který má 8 neutronů, což je už moc (6 + 8 = 14 je nukleonové číslo, které píšeme horním indexem, a definuje jednoznačně daný izotop). Podobně ¹¹C (s poločasem rozpadu pouhých 20 minut) má neutronů pět, což je zase málo. Možná tušíte, že uprostřed stojí dvě možné kombinace s 6 a 7 neutrony, tedy izotopy ¹²C a ¹³C. Tyto dva uhlíky jsou stabilní, nepodléhají samovolné radioaktivní přeměně. Předpovědět, které izotopy budou pro daný prvek stabilní (nebo jaký poločas a typ rozpadu budou mít ty nestabilní), není jednoduché a přesahuje záměr našeho textu. Přesto se můžete zamyslet nad otázkou, kterou jsme nevysvětlili v předchozí kapitole (protože se netýká stabilních izotopů): Co z pohledu elementárního složení jádra znamená, když se ¹⁴C změní na ¹⁴N, a proč při tom musí vyzařit elektron?

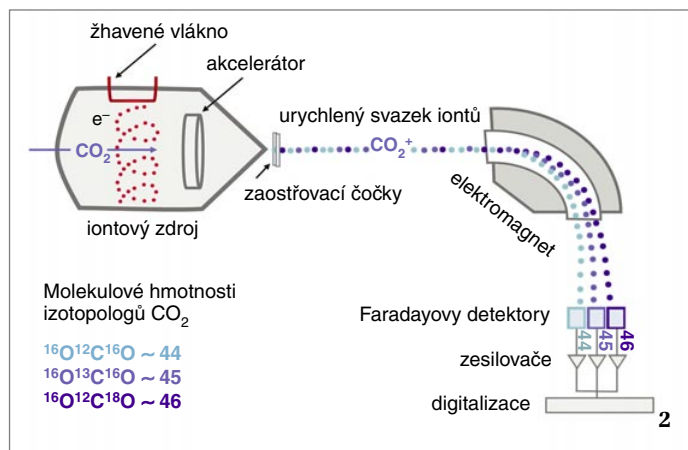
Pro naše další uvažování jsou klíčové tři vlastnosti stabilních izotopů.

- U většiny prvků se na Zemi (a i ve vesmíru) vyskytují dva, nebo dokonce několik stabilních izotopů. U uhlíku, jak již víme, jde o lehčí ¹²C a o jeden neutron těžší ¹³C. V případě kyslíku jsou to izotopy tři – ¹⁶O, ¹⁷O a ¹⁸O.

- Jednotlivé izotopy se liší, často dramaticky, ve svém přírodním zastoupení. Uhlík ¹²C v přírodě převládá, ¹³C představuje jen asi 1 % (přesněji zhruba 1,1 %), ale pro jednodušší následné úvahy a kalkulace zaokrouhlíme na 1 %.

- Fyzikální, chemické, a tedy i biologické procesy mají tendenci některé izotopy upřednostňovat, většinou ty lehčí. Fotosyntéza např. zabudovává nepatrně ochotněji ¹²C než ¹³C. I když je tento rozdíl malý a variabilní, stojí na něm velká část našeho článku.

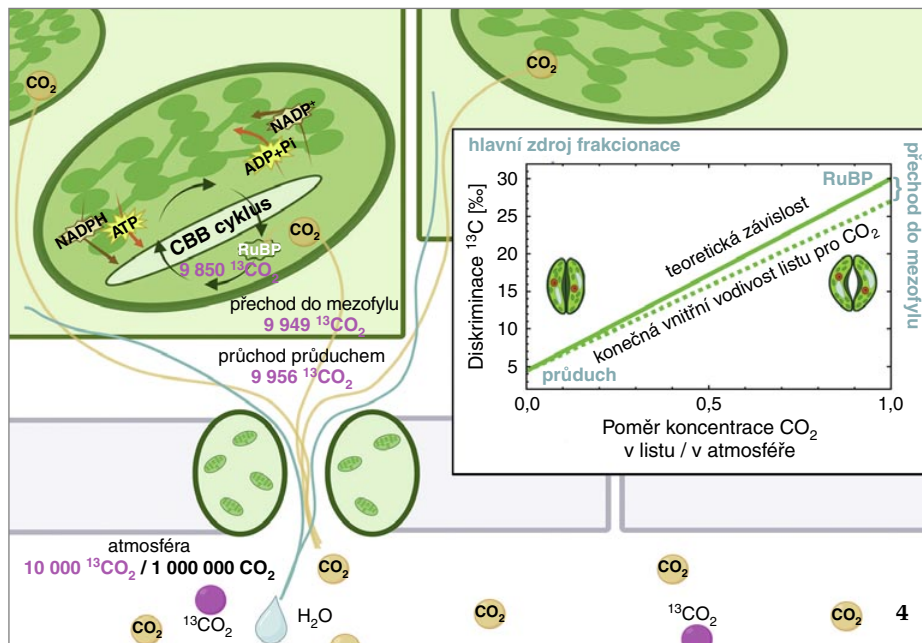
Stabilní izotopy tak poskytují obrovský potenciál bez nebezpečí ozáření ionizujícím zářením (výzkumníka i výzkumného objektu). Jejich použití, nejen při studiu fotosyntézy, je ovšem za radioaktivními izotopy opožděno. Důvod je jednoduchý. Radioaktivní záření jsme se naučili s dostatečnou přesností měřit (např. expozicí citlivého filmového materiálu) již na začátku 20. století. Rozdíly v přirozeném zastoupení stabilních izotopů, třeba mezi rostlinou a atmosférou, jsou velmi malé, a tedy obtížné měřitelné (obr. 1). To, že rostliny jsou v uhlíku izotopově lehčí než vzdušný



oxid uhličitý, pozorovali překvapivě již v r. 1939 fyzikové Alfred Nier a Otto Gulbransen. Dostatečně přesná instrumentace však začíná být šířeji dostupná až v 70. letech 20. století. A právě A. Nier je považován za otce izotopové poměrové hmotnostní spektroskopie (IRMS, z anglického Isotope Ratio Mass Spectrometry), první dostatečně přesné metody, která se využívá dodnes (obr. 2). Nyní máme i alternativní, zejména optické, metody stanovování přirozených rozdílů v zastoupení stálých izotopů (Chemické listy 2016, 110: 166–173).

Fotosyntéza má raději lehký uhlík ^{12}C – izotopová frakcionace

Vlastně nejde o nic složitějšího a už jsme ji zjednodušeně definovali jako „izotopovou vybíravost“ různých procesů. Nyní si ji ukažme na konkrétní situaci – fotosyntéze, přesněji fotosyntetickém příjmu a zabudování CO_2 . Fotosyntéza raději přijímá CO_2 s lehkým uhlíkem ^{12}C (někdy se píše, že diskriminuje ^{13}C), ale jde o rozdíl malý a navíc variabilní. Proč tomu tak je? Co znamená ona variabilita a jak nám může pomoci s výzkumem a měřením fotosyntéz?



Hlavní procesy omezující fotosyntézu a jejich izotopová vybíravost jsou znázorněny v diagramu na obr. 4. Zastoupení izotopů jsme přepočítali na počet atomů minoritního izotopu z milionu všech (viz dále). Připomeňme si dva nejdůležitější faktory.

- Difuze přes průduchovou štrbinu propouští o 0,44 % (4,4 ‰) ochotnější oxid uhličitý s lehkým uhlíkem ($^{12}\text{CO}_2$) než s těžkým izotopem ($^{13}\text{CO}_2$). Když ^{13}C bude ve vzdušném CO_2 představovat 1 ‰ (10 000 atomů ^{13}C na milion všech atomů uhlíku), znamená to, že frakcionace se uplatňuje právě na tomto množství. Při frakcionaci 0,44 ‰ bude tedy za průduchovou štrbinou $10\,000 \times (100 - 0,44) / 100 = 9\,956$ molekul CO_2 s atomem ^{13}C , o 44 méně ^{13}C na milion všech atomů uhlíku než ve vzduchu vně listu.

- Enzym Rubisco, který zabudovává CO₂ do prvních organických produktů (bližší také Živa 2010, 2: 52–54; 2021, 3: 117–120), naproti tomu znevýhodňuje ¹³C až o 3 ‰ (30 ‰). Stejným výpočtem pak vychází, že v produktech fotosyntézy bude 10 000 × (100 – 3) / 100 = 9 700 atomů ¹³C na milion všech atomů C, o 300 méně atomů ¹³C na každý milion všech atomů uhlíku než ve vzduchu.

Kdyby tedy byly průduchy (difuze) jediným omezujícím faktorem příjmu CO_2 , bude znevýhodnění ^{13}C zmíněných 44 čás-

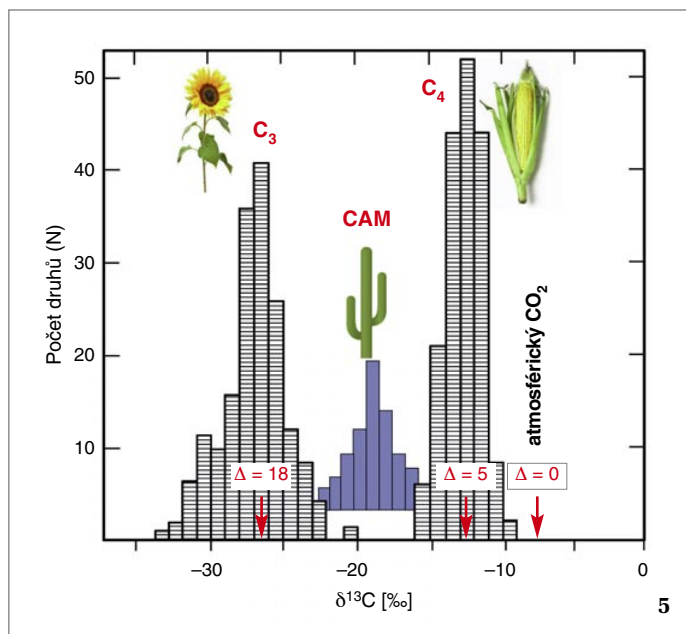
tic na milion, pokud nebudou průduchy a ostatní anatomické struktury v listu klást příjmu CO_2 žádný odpor, pak rychlost enzymu Rubisco nebude omezovat snížená koncentrace CO_2 , a jeho diskriminace bude plná – zmíněných 300 částic na milion. Skutečnost bude ležet někde mezi, protože jak průduchy, tak Rubisco mají jistý nenulový (ale také nikdy 100%) limitující vliv na příjem CO_2 . Rozhodující pro celkovou míru diskriminace těžkého izotopu uhlíku ve fotosyntéze je koncentrace CO_2 uvnitř listu, přesněji její poměr ke koncentraci atmosférické – vně listu (obr. 4). Pokud je poměr malý, znamená to, že průduchy jsou přivřené a diskriminace ^{13}C bude nízká (blízká 4,4 ‰). Je-li velký, průduchy jsou široce otevřené, jen málo omezují fotosyntézu a diskriminace ^{13}C bude vysoká, blízká maximu diskriminace Rubisco (30 ‰). Toto kontinuum je zajímavé zejména proto, že souvisí s efektivitou využití vody, jak si ukážeme v jedné z následujících kapitol.

V praxi se setkáváme se znevýhodněním v rozsahu přibližně 100–200 ^{13}C na milion C, tedy diskriminací 10–20 ‰ (na obr. 4 můžeme odečíst, jakému poměru CO_2 v listu vůči atmosféře to odpovídá). Pokud nechceme překročit chybu měření 1 ‰, nesmíme tedy špatně rozlišit více než právě jeden izotop z milionu přítomných atomů uhlíku! Tímto příkladem chceme ukázat, jak technicky náročné je měření přirozených zastoupení stabilních izotopů.

2 Izotopová poměrová hmotnostní spektroskopie (IRMS). Molekula, v našem případě CO_2 , se ionizuje proudem elektronů, čímž vzniknou kladné ionty CO_2^+ . Ty jsou urychlovány v elektrickém poli a jejich dráha zakřívována průletem magnetickým polem. Lehčí izotopové formy CO_2 zahýbají více než těžší. Izotopology (nejhojnější jsou $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) tak vytvoří samostatné iontové svazky, které dopadají do individuálních detektorů. Vzniklý elektrický proud (v řádu pikoampér až nanoampér) je následně zesílen a přesně měřen. Výsledky jsou digitalizovány a s četností asi 5–10krát za sekundu ukládány do paměti počítače.

3 Kombinované měření plynové výměny a diskriminace uhlíku ^{13}C umožňuje stanovení mezofylové vodivosti listu pro CO_2 (viz text). Na snímku nevadlec hřebeatý (*Celosia argentea*), jehož jeden list je uzavřen v komoře přístroje Li-6400 (blíže na str. 152–156 této Živy). Vzduch, ze kterého fotosyntéza odčerpala část CO_2 , je pak odebírán a měřen na zastoupení ^{13}C .

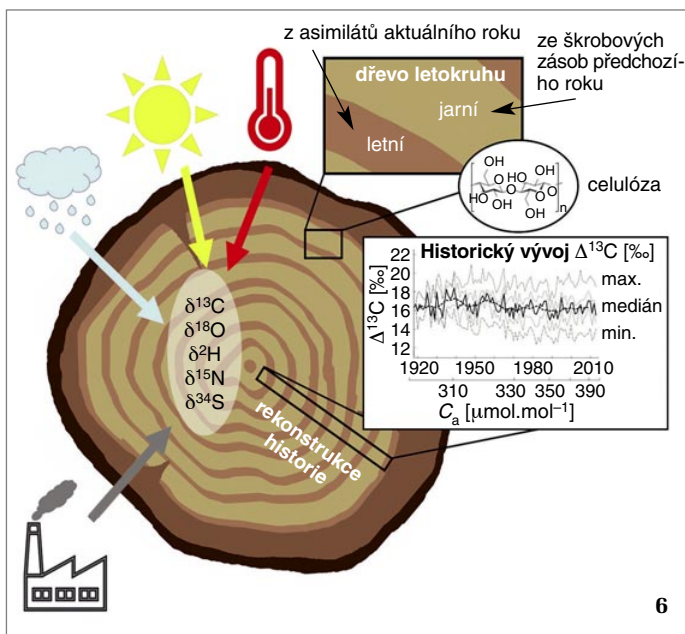
4 Hlavní faktory ovlivňující diskriminaci ^{13}C , a tedy izotopové složení C_3 rostlin. Dva hlavní hráči, kteří ovlivňují zastoupení ^{13}C – průduchy a Rubisco – jsou uvedeny a vysvětleny v textu. Zde zmíníme ještě jeden proces, kterým je mezofylová vodivost s velmi malým frakcionačním faktorem 1,8 ‰. Pokud by



tato vodivost byla nekonečně velká (odpornulový), frakcionace způsobená transportem se neprojeví (sériově řazené odpory: průduchová a mezofyllová vodivost). Pokud však transport uvnitř listu omezuje příjem CO_2 do listu souměřitelně, jako to dělají průduchy, což je běžné, celková diskriminace se snižuje oproti modelu, kde počítáme jen s transportem přes průduchy a karboxylaci. Část vysoké diskriminace připisáné v modelu karboxylaci pomocí Rubisco (30 ‰) je totiž nahrazena malou diskriminací během difuze CO_2 mezofylem (1,8 ‰). ^{13}C tak nachází další uplatnění v charakterizaci transportních vlastností listu, a tedy i jeho fotosyntetického či produkčního potenciálu. Zde se však neobejdeme bez dobře změřené průduchové vodivosti a metod zmiňovaných na str. 152–156. ADP – adenosindifosfát, ATP – adenosintrifosfát, CBB cyklus – Calvinův–Bensonův–Basshamův cyklus, NADP^+ , NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, Pi – fosfát, RuBP – ribulóza-1,5-bisfosfát

5 Relativní zastoupení ^{13}C v biomase zjištěné měřením 351 druhů rostlin z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*, trávy). Povášněme si, že C_3 rostliny jsou vždy ochuzenější o ^{13}C (zápornější delta ^{13}C hodnoty) než C_4 rostliny a že C_4 mají menší variabilitu. CAM rostliny (zde už jde o různé jiné čeledě, nikoli trávy) leží někde mezi a jejich jednoznačné určení pomocí izotopů uhlíku není vždy možné. O parametru Δ blíže na webu Živý. Převzato z knihy J. Šantrůčka a kol. (2018), s laskavým svolením

6 Schematické záznamy letokruhů dřevin a jejich postupného vývoje. Na grafu je znázorněna izotopová chronologie souboru asi 100 let starých smrků – od r. 1920 téměř do současnosti. Letokruhy mohou v izotopech odhalovat vývoj klimatu, tedy původ a intenzitu srážek, vlhkost vzduchu, teploty ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{15}\text{N}$), hurikány a velké bouře ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$), nadmořskou výšku a zeměpisnou šířku ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{88}\text{Sr}$), atmosférické znečištění ($\delta^{34}\text{S}$, Pb), hnojení půdy ($\delta^{15}\text{N}$), zdroj vody, dešťová × spodní ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$), znečištění půdy, přírodní × antropogenní ($\delta^{68}\text{Zn}$).



Náš úžas nejspíše ještě vzroste, když prozradíme, že nyní k měření stačí mikrogramy, v některých případech dokonce nanogramy, vzorku (abychom ale byli schopni vzorek vůbec připravit a dopravit „do stroje“, potřebujeme většinou mnohonásobně více).

C_4 a C_3 fotosyntéza aneb Rum nebo tuzemák?

Skutečnosti zmíněné v předchozí kapitole platí pro nejrozšířenější, C_3 typ fotosyntézy (název pochází z počtu uhlíků v prvním stabilním produktu fotosyntézy). U fotosyntézy označované C_4 je mnohé jinak (blíže na str. 152–156 této Živý, podrobnější vysvětlení najdete také v Živě 2021, 3: 117–120 a v seriálu ve Vesmíru 2012, 1–3).

Pro naše účely je důležité, že C_4 fotosyntéza vyvinula CO_2 pumpu, která přilepšuje enzymu Rubisco, ale současně činí systém převážně uzavřeným. Rubisco v C_4 rostlinách si zjednodušeně řečeno může jen málo vybírat, který izotop uhlíku zabuduje. U rostlin C_3 to ovšem bylo rámcově podobné. Jen (částečnou a proměnnou) uzavřenost způsobovaly průduchy a odpor mezofylu listu při cestě CO_2 do chloroplastů (obr. 4).

Výsledkem je mnohem menší frakcionace, tedy vyšší podíl ^{13}C v biomase C_4 rostlin než u rostlin C_3 . Zastoupení ^{13}C je dokonce pro téměř každou jednotlivou C_4 rostlinu vyšší než u C_3 rostlin (obr. 5). Rostlinu C_4 tedy dokážeme téměř s jistotou poznat od jakékoli C_3 rostliny. Stačí nám malý úlomek listu, např. herbářové položky. To je výhodné mimo jiné pro objevování nových druhů s C_4 fotosyntézou. Herbářových položek různých rostlin existují ve světových herbářích miliony, avšak fyziologické parametry – které by také mohly odhalit zmíněnou fotosyntetickou adaptaci – u většiny z nich zaživa nebyly měřeny.

Tento rozdíl má ale i velmi praktický dopad při ověřování pravosti rostlinných produktů. Např. z C_4 cukrové třtiny se dělá pravý rum. Naproti tomu „tuzemák“ bývá většinou z C_3 brambor. Celníci proto využívají izotopových technik pro ověření původu/pravosti různých komodit (mívají často obrovské laboratoře). Destiláty jsou

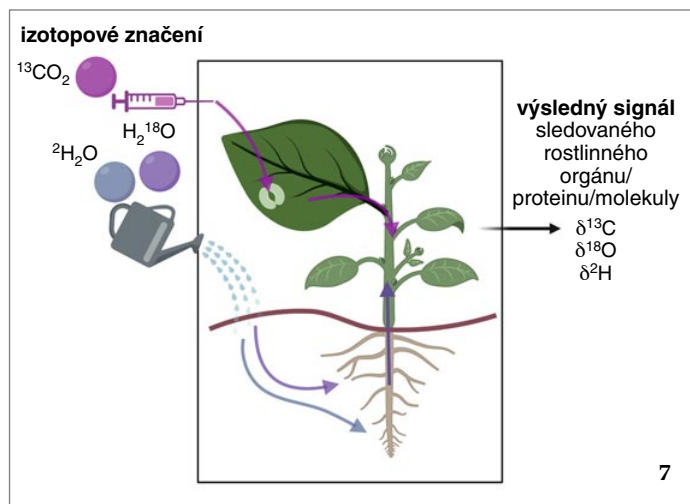
jen špičkou ledovce. Ověřit lze třeba i geografický původ vína či medu. Podobně se dá poznat, zda byl přidán umělé cukr. Zde se využívají i izotopy dalších prvků, především vodíku a kyslíku, jejichž zastoupení v rostlinných produktech izotopově odráží původní rostlinný materiál i např. izotopové složení vody v místě růstu. Detaily přesahují rámec tohoto článku. Chceme tu jen ukázat, že využití stabilních izotopů dalece přesahuje základní výzkum a může odhalit podvody, velké finanční úniky, nebo pomoci forenzním kriminalistům.

Využití frakcionace izotopů uhlíku má však své místo i ve skutečném výzkumu C_4 fotosyntézy. Uvedli jsme, že si Rubisco u C_4 rostlin „může částečně vybírat“ (samozřejmě jde o stochastický proces, ne o vůli enzymu Rubisco), zda zabuduje $^{12}\text{CO}_2$ nebo $^{13}\text{CO}_2$. Jistě již přemýšlíte, na čem ta „částečnost“ závisí. Jde o to, jak dobře koncentrační mechanismus CO_2 u těchto rostlin funguje. Pokud by byl systém plně plynotěsný, Rubisco by muselo zužitkovat všechno dopravené CO_2 a jeho frakcionace by se neprojevila (s jistým zjednodušením). Naopak C_4 rostlina bez koncentračního mechanismu CO_2 se bude chovat jako C_3 rostlina (rostliny evolučně na půli cesty od C_3 k C_4 nebo ještě před polovinou, blíže k C_3 typu, opravdu existují). Zastoupení ^{13}C v biomase či produktech fotosyntézy C_4 rostlin nám tedy může prozradit, jak efektivně rostlina využívá svou CO_2 pumpu. To záleží na evolučním stáří druhu, ale také na podmínkách prostředí. Taková zjištění mohou mít agronomický význam – C_4 rostliny patří k nejproduktivnějším druhům planety a jen kukuřice, čirok a cukrová třtina dohromady tvoří asi 30 % zemědělské produkce světa.

Závěrem opět otázka: Proč a jak z uvedeného vyplývá, že role otevřenosti průduchů na diskriminaci ^{13}C u C_4 rostlin bude mnohem menší než u C_3 rostlin (a proto jsme si ji tu dovolili zanedbat)?

Vyschnout, nebo vyhladovět? (a co nám poví ^{13}C)

Průduchy se snaží najít kompromis mezi výparem vody z listu a příjmem CO_2 (podrobněji např. Živa 2022, 1: 6–10). Pro



nás je nyní důležité, že když se průduchy přivírají, neklesá příjem CO_2 a výdej vody stejně. Fotosyntéza má své maximum, ke kterému se blíží, zatímco výpar stoupá prakticky lineárně s otevřeností průduchů. Široce otevřené průduchy tedy umožňují intenzivní fotosyntézu, ale list současně plýtvá vodou (pokud jí má dost, je vše v pořádku). Přivřené průduchy omezí fotosyntézu, ale ještě více výpar vody, které se většinou nedostává. Rostlina tak fotosyntetizuje (a většinou i roste) pomaleji, ale na jednotku příjmu CO_2 spotřebuje méně vody. Poměru asimilace CO_2 a transpirace (výdeje vody) tedy nepřekvapivě říkáme efektivita využití vody (zkratkou např. WUE – Water Use Efficiency). Čím je WUE větší, tím hospodárněji je voda v procesu růstu využívána – je vyprodukováno větší množství biomasy s menším výparem vody.

Izotopy uhlíku ukládají informaci o této efektivitě v produktech fotosyntézy, např. v celulóze listu. Jak již víte, při přivřených průduších je znevýhodnění ^{13}C menší (a WUE vyšší, viz předcházející odstavec), protože průduchy jsou faktorem, který v této situaci limituje příjem CO_2 a jeho koncentrace uvnitř listu klesá (znázorněno jako poměr koncentrace CO_2 v listu vůči volné atmosféře na obr. 4). Enzym Rubisco si potom nemůže „vybírat“ – při nízké koncentraci CO_2 „vezme častěji zavděk“ i molekulou $^{13}\text{CO}_2$. Vyrovnanější zastoupení ^{13}C a ^{12}C , tedy menší diskriminace izotopu ^{13}C , tak značí vysokou efektivitu hospodaření s vodou (a pomalou fotosyntézu). Naopak ochuzení o ^{13}C je znakem silně otevřených průduchů, rychlé fotosyntézy (při dostatku vody), a tedy i relativního plýtvání s vodou (nízká WUE). Diskriminaci ^{13}C ovlivňují i další procesy, např. mezofyllová vodivost (obr. 4), transport asimilátů a syntéza složitějších látek z jednoduchých cukrů. WUE záleží také na vlhkosti vzduchu obklopujícího list. Když bude mít vzduch 100% relativní vlhkost (např. během ranní mlhy), výpar neprobíhá. V případě suchého vzduchu je výpar při stejné otevřenosti průduchů naopak velký. Fotosyntéza může být při obou těchto situacích stejná (a WUE vyšší při vlhkém vzduchu, při mlze dokonce nekonečně velká). Zastoupení ^{13}C odráží poměr asimilace a otevřenosti průduchů (přesněji difúzní vodivosti listu), což není přesně WUE. Zastoupení ^{13}C v listech (či jiných částech rostliny) tedy informuje o účinnosti vztažené k vodi-

7 Zjednodušené schéma principu značení stabilními izotopy. Pro rostlinu se nabízejí dva hlavní přístupy. Protože asimiluje oxid uhličitý, můžeme jí nabídnout v přírodě vzácný (ale neškodný) $^{13}\text{CO}_2$. Protože přijímá a po celém těle rozvádí vodu, můžeme ji zalít těžkou vodou ($^2\text{H}_2\text{O}$, H_2^{18}O). Zvýšený obsah těžkých izotopů se pak v časoprostorovém kontinuu objevuje v různých částech a metabolitech rostliny. Blíže v textu. Orig. J. Kubásek a T. Kalistová, není-li uvedeno jinak

8 Stabilní izotopy pomáhají i při výzkumu „netradičních rostlin“. Např. u lišejníků jde o trofický vztah fotosyntetického partnera (řasa, sinice) s houbou. Pokud necháme lišejník asimilovat $^{13}\text{CO}_2$, můžeme následně sledovat předávání ^{13}C obohacených metabolitů mezi partnery. Na snímku porpidie roztroušená (*Porpidia crustulata*)

vosti průduchů, nikoli přímo k množství vypařené vody (transpiraci). Proto takové efektivitě říkáme anglicky intrinsic Water Use Efficiency (WUE_i), česky překládáno jako vnitřní efektivita využití vody. WUE_i nám říká o vzájemném vztahu chování průduchů a fotosyntézy. Bez ohledu na další faktory přináší cenný vhled do strategického chování rostliny ve vztahu k vodě.

Tato informace je integrována (průměrována) přibližně během doby, kdy se list vyvíjel. To může být výhodné, protože fyziologická měření, která také poskytují údaje o využívání vody (např. gazometrická, viz str. 152–156 této Živy), většinou provádíme jen krátkodobě. Stabilní izotopy tedy mohou odhalit efektivní chování rostliny/listu během sezony. Pokud budeme extrahovat rozpustné cukry (asimiláty) z listu a měřit ^{13}C , bude v nich „otříděno“ WUE_i za poslední hodiny či dny. Konečně, budeme-li měřit $^{13}\text{CO}_2$ ve vzduchu ovlivněném listem (což je technicky obtížnější), získáme hodnoty téměř okamžité. Vidíme, že izotopové techniky mohou operovat na široké časoprostorové škále. Získané poznatky můžeme využít třeba při šlechtění plodin na vysokou WUE_i nebo při porovnání různých ekologických skupin rostlin. Informace z listů, které se po opadu rychle rozloží, nemusí být ztracena. Uhlík se v podobě asimilátů transportuje do dalších částí rostlin a jeho izotopový poměr může

být zachován s nadsázkou na věky. Takovým neocenitelným archivem jsou letokruhy dřevin.

Letokruhový izotopový archiv

Významnou část uhlíku druhotně tloustnoucí rostliny (dřeviny) ukládají v dřevní části cévních svazků. Tento uhlík, v podobě odolných biopolymerů celulózy a ligninu, se ukládá postupně od středu kmene (nejstarší část) k obvodu (nejmladší) a zejména v sezonním klimatu může být přesně datováno, kdy ho fotosyntéza zabudovala (tvoří se letokruhy). A hlavně je v letokruzích uložena řada údajů, které přetrvávají roky až století (u konzervovaného dřeva i tisíciletí, obr. 6). Šíře letokruhů je odhadem přírůstu stromu, a tedy i příhodného počasí během příslušného roku. Letokruhy počítá a měří dendrometrie a datuje dendrochronologie. Tyto obory ale už před mnoha lety využily právě stabilní izotopové techniky, umožňující vyčíst z letokruhů ještě mnohem více (blíže např. Živa 2002, 6: 249–252; 2022, 3 a 6, a 2024, 3).

WUE_i prozrazuje, jak se měnilo klima v minulosti. Protože však tento parametr plyne z poměru fotosyntézy a průduchové otevřenosti, nevíme, zda rostlina měla daný rok účinnost využití vody vysokou z důvodu intenzivní fotosyntézy (tedy hodně tepla a slunečního záření), nebo naopak sucha (přivřené průduchy), případně obojího. Použití izotopů kyslíku ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) může zpřesnit náš odhad příčin změn WUE_i, růstové teploty a vzdušné vlhkosti. Kyslík se totiž v listu vyměňuje mezi molekulami H_2O a CO_2 (vyměna OH^- v důsledku disociace vody na H_3O^+ a OH^- a hydratace CO_2 za vzniku hydrogenuhličitanu neboli bikarbonátu HCO_3^-). Růstová teplota a vlhkost ovlivní zastoupení ^{18}O ve vodě (výpar vody z listu vede k obohacování vody o těžké izotopy) a tato informace se „propíše“ i do kyslíku v organických látkách, např. v celulóze. Jelikož diskriminace ^{18}O ve vodě záleží na více faktorech (kromě uvedených teploty a vzdušné vlhkosti ještě na $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ v půdní i atmosférické vodě), je interpretace izotopů kyslíku v rostlině většinou obtížnější a méně přímočará než u izotopů uhlíku. Pro zajímavost, vodík ($^2\text{D}/^1\text{H}$, viz dále v textu) se v letokruzích většinou nestanovuje, protože je výměnný (v OH skupinách celulózy může být nahrazen novým), a tudíž nezachovává signál z doby vzniku dřeva.

V letokruhovém archivu se ale zachová i řada dalších prvků a informací (podrobněji v popisku obr. 6). Např. stopy olova mohou říci, kolik strom přijal Pb, a tudíž jaké bylo znečištění v době, kdy se používal olovnatý benzín, a jak se situace zlepšovala v následujících letech, po jeho zákazu. Právě poměr izotopů olova rozliší přírodní olovo a olovo uvolněné spalováním benzínu. Přírodních, ale i z kontaminace životního prostředí pocházejících izotopů, které nalézáme v letokruzích a které mohou poskytnout cenné údaje, je více.

Izotopové značení aneb Když frakcionaci zanedbáváme

Až doposud jsme informaci o různých dějích v rostlinách dekodovali z přirozené izotopové vybíravosti (frakcionace) přírodních procesů. Izotopy ale můžeme s výhodou použít i ke sledování toků a přeměn látek v rostlině, a to často velmi přímočaře. Využíváme zde rozdílného přírodního zastoupení jednotlivých izotopů, většinou tak, že rostlině přidáme výrazně více toho vzácnějšího a pozorujeme, kam a jak rychle se obohacení šíří (izotopové frakcionace tak můžeme často zanedbat). Dva nejběžnější způsoby značení – těžkým oxidem uhlíčitým a těžkou vodou – jsou znázorněny na obr. 7. Nejcitlivější značkou bude deuterium (těžká voda s deuteriem, D_2O), protože v přírodě připadá jen jeden deuteriový atom (D, tedy 2H) na přibližně 6 660 atomů vodíku lehkého (protium, 1H). Jedna kapka deuteriové vody tak může bez nad-

sázky výrazně označit konev vody použitou k zalívce rostliny a pozorujeme, v kterých látkách a částech rostlin se přebytek deuteria objevuje – fotosyntéza využívá vodík z vody k redukčním reakcím, zatímco kyslík se uvolňuje do atmosféry.

Fotosyntéza zabudovává CO_2 , a tak se nabízí předložit rostlině $^{13}CO_2$ (podobně jako to Calvin se spolupracovníky udělali s $^{14}CO_2$) a sledovat jeho osud. Pokud bude obohacení dost velké, můžeme směle zanedbat fotosyntetickou frakcionaci. Psali jsme, že fotosyntéza z 10 000 ^{13}C nabídnutých zabuduje o 44 až 300 atomů méně (a o to více ^{12}C). Předložíme-li jí však čistý $^{13}CO_2$ (milion ^{13}C na milion atomů C), může se v produktech fotosyntézy snadno objevit ne o desítky či stovky, ale třeba o desítky tisíc atomů ^{13}C více, než je v přírodě. Podíl 3 % ^{13}C např. znamená 30 000 ^{13}C na milion C (tedy o 20 000 více). Tam pak opravdu nehraje roli, že fotosyntéza zabudovala třeba o 200 atomů ^{13}C méně než ^{12}C (diskriminovala ^{13}C).

9 Stabilní izotopy pomáhají pochopit i celá společenstva a ekosystémy.

Ve Švýcarsku např. roky fumigují jeden hektar lesa oxidem uhlíčitým obohatěným o ^{13}C (vzniklým spalováním fosilních paliv). Snížený obsah ^{13}C se pak postupně objevuje v různých částech rostlin, ale rovněž v houbách a dalších konzumentech a rozkladačích. Zjistíme tak dynamiku rostlinné produkce, ale zároveň předávání látek mezi patry trofické pyramidy. Snímky J. Kubáška

Značením ^{13}C pak můžeme jednoduše měřit třeba rychlost fotosyntézy nebo její (ne)rovnoměrnost v listu. Necháme list nějakou dobu fotosyntetizovat v $^{13}CO_2$, pak ho usmrtíme (např. v kapalném dusíku), čímž se reakce zastaví a můžeme měřit, jak hodně a v kterých částech je obohacení ^{13}C patrné. Izotopová značení však mohou zodpovědět mnohem více otázek.

V naší laboratoři např. $^{13}CO_2$ používáme ke studiu rostlinné kutikuly. Kutikula je tenká ochranná hydrofobní vrstva na povrchu listů, ale také plodů a květních orgánů. Když rostlina asimiluje $^{13}CO_2$, nejprve jej zabuduje do jednoduchých cukrů. Ty jsou následně transportovány v rostlině a přeměňovány do prakticky všech organických látek. Pokud se např. objeví v kutikule dospělého listu, je zřejmé, že se tato kutikula musí obnovovat i poté, co list dokončil svůj vývoj, což se dříve moc nevědělo (více se dozvíte na videích přiložených k článku na webu Živy).

Značení, nejen uhlíkem ^{13}C , má uplatnění v celé řadě dalších aplikací, jak v souvislosti s fotosyntézou, tak bez ní. I když, jsou na Zemi skutečné procesy, které nesouvisí s fotosyntézou? O tom snad někdy příště.

Použitou literaturu, internetové odkazy, videa a odpovědi na otázky položené v textu najdete na webové stránce Živy.

