

**Gazometrické merania a modelovanie A-Ci kriviek
(manuál)**

Obsah

1. Základy merania výmeny plynov	3
1.1. Príjem a výdaj CO ₂ rastlinou	3
1.2. Princíp merania výmeny plynov gazometrickým systémom	3
1.3. Fotosyntetické krivky.....	4
1.3.1. Svetelné krivky fotosyntézy.....	5
1.3.2. CO ₂ krivky fotosyntézy.....	6
1.4. Fotorespirácia rastlín.....	6
1.5. Bunková respirácia	8
2. Meranie výmeny plynov pre pokročilých	10
2.1. Zapojenie jednotlivých častí prístroja	10
2.2. Prietok plynov prístrojom.....	11
2.3. Ovládanie prístroja	12
2.4. Príprava a nastavenie prístroja.....	13
2.5. Meranie A-Ci kriviek	16
2.6. Model pre spracovanie A-Ci kriviek.....	18

1. Základy merania výmeny plynov

1.1. Príjem a výdaj CO₂ rastlinou

Mierou fotosyntézy je množstvo asimilovaného CO₂. Súčasne s fotosyntetickou asimiláciou CO₂ prebiehajú procesy, pri ktorých sa CO₂ uvoľňuje: bunková respirácia (dýchanie, R_D) a fotorespirácia R_L (oxidácia substrátu oxygenázovou aktivitou Rubisco). Respirácia zahŕňa procesy glykolýzy, Krebsovoho cyklu a transport elektrónov vnútornou membránou v mitochondriách. CO₂ sa uvoľňuje v Krebsove cykle. Celková (hrubá) fotosyntéza P_G je týmito procesmi znížená. Výsledné množstvo zabudovaného CO₂ nazývame čistá fotosyntéza P_N. Platí teda:

$$P_N = P_G - R_D - R_L$$

Za určitých okolností môže výdaj CO₂ nad asimilovaným CO₂ prevažovať (napr. nedostatok svetla, stres zo sucha, ktorý spôsobuje uzavretie prieduchov a nedostatok CO₂). Keďže pre fotosyntézu je nevyhnutný príjem CO₂ z prostredia prostredníctvom prieduchov, ktoré sa zavierajú pri nedostatku vody, je pri meraniach dôležité prihliadať aj na tento dôležitý faktor.

1.2. Princíp merania výmeny plynov gazometrickým systémom

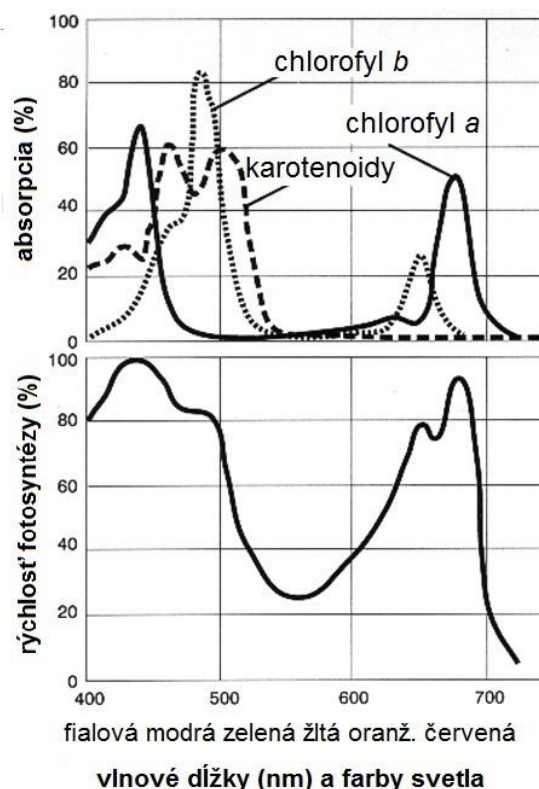
Merania výmeny plynov sa používajú na kvantifikáciu rýchlosti čistej fotosyntézy, možnosti prístroja sú však výrazne väčšie a meria resp. kalkuluje množstvo iných parametrov (rýchlosť transpirácie, vodivosť prieduchov atď.). Princípom je meranie zmien koncentrácií CO₂ (väčšinou rovnako tak vodných pár) v dôsledku aktivity listu uzavretého v meracej komore. Na meranie týchto zmien sú využívané tzv. infraanalýzátory (IRGA), ktorých princíp spočíva v tom, že CO₂ a H₂O absorbujú infračervené žiarenie v špecifickej vlnovej dĺžke. Keď teda plyn s obsahom CO₂ alebo H₂O prechádza trubicou so zdrojom infračerveného žiarenia na jednej strane a s detektorom na strane druhej, bude sa signál na detektore znižovať s ich vzrastajúcou koncentráciou a naopak.

Bežné je v súčasnosti automatizované a presné udržiavanie konštantných (nastaviteľných) hodnôt teploty vzduchu, prietoku vzduchu, intenzity žiarenia, koncentrácie CO₂ príp. aj vlhkosti vzduchu v komore.

1.3.Fotosyntetické krivky

Fotosyntetické krivky sú vlastne závislosti rýchlosti asimilácie CO_2 (P_N) na intenzite svetla resp. koncentrácii CO_2 v obklopujúcej atmosfére príp. vo vnútri listu. Rozlišujeme teda svetelné a CO_2 krivky fotosyntézy. Tieto môžu byť ľahko použité pre odvodenie niektorých základných parametrov. Často sú tiež využívané ako podklad pre modely, ktoré zlepšujú predstavu o dielčích dejoch nesmierne komplexného procesu fotosyntézy, ktorý je neustále ovplyvňovaný mnohými faktormi prostredia a dokonca ich vzájomnou interakciou.

Nie všetky svetelné spektrá sú rastlinou absorbované. Svetlo, ktoré rastliny dokážu zachytiť má vlnové dĺžky od cca 400 do 700 nm a nazývame ho fotosynteticky aktívnu radiáciu (FAR). Žiarenie o rôznych vlnových dĺžkach je pritom absorbované rôznymi pigmentami s rôznou efektivitou. Najdôležitejšími pigmentami pre zachytávanie svetla rastlinou sú: chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy (obr. 1). V oblasti zeleného svetla je absorpcia svetla slabá (svetlo sa odráža), preto sa ľudskému oku listy rastlín javia ako zelené.



Obr. 1: Pomerná absorbancia hlavných typov asimilačných pigmentov pri rôznych vlnových dĺžkach a relatívna rýchlosť fotosyntézy pri ožiarení listu svetlom rôznych vlnových dĺžok

Najdôležitejším pigmentom pri fotosyntéze je chlorofyl *a*, pretože sa zúčastňuje fotochemických reakcií, ktorých výsledkom je vytváranie zlúčenín bohatých na energiu. Chlorofyl *b* a karotenoidy majú pri fotosyntéze špecifické úlohy, sú súčasťou svetlozberných pascí. Rastlinné farbivá ďalej plnia úlohu ochranného filtra proti účinkom ultrafialového žiarenia a zachytávania tepelných lúčov. Okrem toho sa zúčastňujú pri dýchaní rastlín ako súčasť redox-systémov.

1.3.1. Svetelné krivky fotosyntézy

Fotosyntéza je fotochemický dej, využívajúci energiu z dopadajúceho slnečného žiarenia. Pri nízkych hodnotách fotosynteticky aktívneho žiarenia (FAR) rastie rýchlosť fotosyntézy rýchlo a viac-menej lineárne so vzrastajúcou intenzitou žiarenia, nakoľko je limitovaná obmedzovanou rýchlosťou fotochemických dejov (obr. 3). Pri vysokých hodnotách žiarenia naopak limitujú rýchlosť fotosyntézy nadväzujúce procesy sekundárnej fázy fotosyntézy (prenos elektrónov, chemické deje Calvinovho cyklu). S narastajúcou intenzitou žiarenia sa preto rýchlosť približuje k maximálnej hodnote (líši sa v závislosti na druhu rastliny, fyziologickom stave aj adaptácii na dlho trvajúce podmienky rastu rastliny či vetvy). Pri nadmernom ožiarení však môže dôjsť k poklesu P_N v dôsledku poškodenia fotosyntetického aparátu (fotoinhibícia príp. fotodeštrukcia).



Obr. 2: Gazometrický systém na meranie výmeny plynov (Li6400XT, Li-cor, USA)

Úloha: Na univerzitnej stránke si v záložke študentského servisu nájdite a stiahnite dáta namerané na smrek a brezu. Vytvorte závislosti čistého výnosu fotosyntézy na intenzite ožiarenia a vykreslite priemernú svetelnú krivku pre smrek aj brezu. Z grafov odčítajte:

- kompenzačnú ožiarenosť (intenzita svetla, pri ktorom sa rýchlosť fotosyntézy a respirácie s fotorespiráciou vyrovnajú, $P_N = 0$),
- saturačnú ožiarenosť: hranica pre žiarenie, po navýšení ktorej už nedochádza k ďalšiemu nárastu fotosyntetickej aktivity,
- maximálnu hodnotu fotosyntézy.

Namerané údaje porovnajte a zistite, ktorá drevina má väčší potenciál pre využívanie vysokej intenzity žiarenia.

1.3.2. CO₂ krivky fotosyntézy

Meranie týchto kriviek je vlastne sledovanie zmien čistého výnosu P_N v závislosti od zmien v koncentrácii CO₂ v okolí obklopujúcom list resp. zmien v intercelulárnej koncentrácii CO₂ (obr. 3). V dôsledku zvýšenia koncentrácie v obklopujúcej atmosfére je väčší koncentračný gradient medzi mezoflyom listu a prostredím, čo uľahčí difúziu CO₂ do listu aj pri privretých prieduchoch. Tieto merania prebiehajú v podmienkach optimálneho zásobenia svetlom (pri saturačnom ožiarení) tak, aby jediným potenciálne limitujúcim faktorom bola koncentrácia CO₂. Merania najmä pri vysokých hladinách CO₂ treba robiť bez zbytočných prestojov, pretože prieduchy sa pomerne rýchlo sa uzatvárajú.

Úloha: Na univerzitnej stránke si v záložke študentského servisu nájdite a stiahnite dáta namerané na buku. Vytvorte závislosť čistého výnosu fotosyntézy na koncentrácii CO₂ a vykreslite priemernú CO₂ krivku. Z grafov odčítajte:

- kompenzačnú koncentráciu CO₂ (intenzita svetla, pri ktorom sa rýchlosť fotosyntézy a respirácie s fotorespiráciou vyrovnajú, $P_N = 0$),
- zistite maximálnu hodnotu fotosyntézy, vyhodnoťte jej nárast oproti bežnej koncentrácii CO₂ v ovzduší (cca 400 ppm).

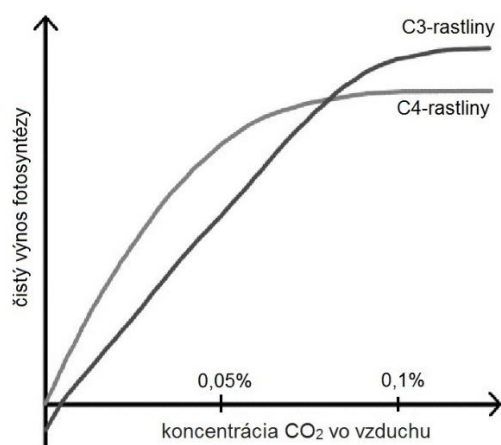
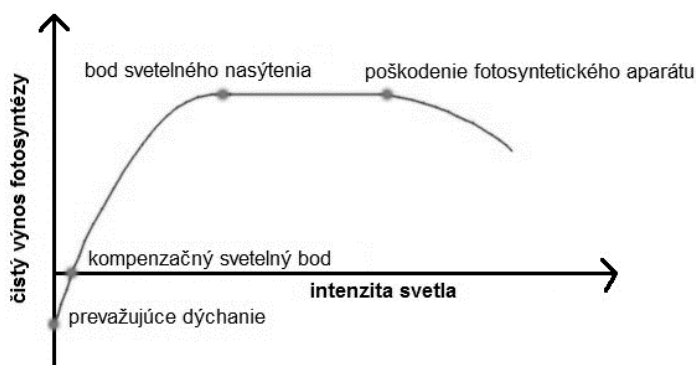
1.4. Fotorespirácia rastlín

Dôsledkom fotorespirácie pri osvetlených listoch je príjem atmosférického kyslíka a príslušný výdaj CO₂. Je spôsobená karboxylačno-oxidačnou aktivitou enzýmu Rubisco (to znamená, že namiesto CO₂ môže byť viazaný kyslík). Aktivita Rubisco je za bežných podmienok v pomere asi 4:1, ale pri nízkych koncentráciách CO₂ a vysokých koncentráciách O₂ môže prevládať jej oxidačná aktivita. Naviazaním kyslíka na ribulóza 1,5-bisfosfát vznikne 5-uhlíkatý medziprodukt, ktorý nie je stály a rozpadá sa na 3-fosfoglycerát (3 atómy uhlíka) a 2-fosfoglykolát (2 atómy uhlíka). Trojuhlíkatý produkt vstúpi do Calvinovho cyklu, zatiaľčo 2-

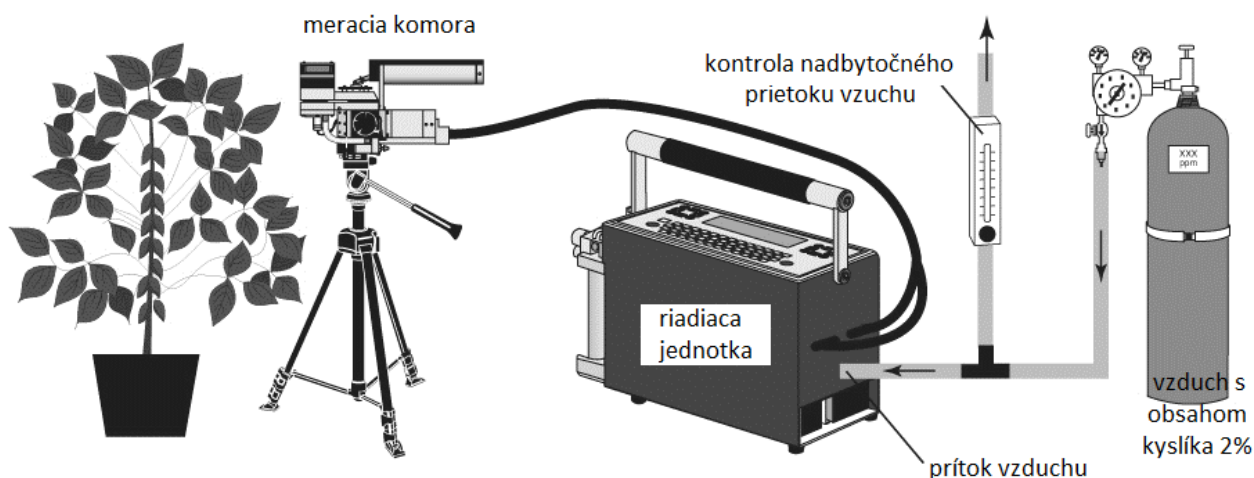
uhlíkatý produkt je ďalej metabolizovaný a môže byť využitý pre syntézu niektorých látok (aminokyselín). Väčšina z neho je však rozložená až na CO_2 . Pri fotorespirácii sa na rozdiel od mitochondriálneho dýchania neuvolňuje ATP (energia), ale dochádza k štiepeniu medziproduktov fotosyntézy a tým dochádza k stratám na substráte a energii. Rastliny môžu takto strácať 20 až 40 % prijatého CO_2 . Niektoré rastliny dokázali v priebehu evolúcie potlačiť fotorespiráciu a tým zabrániť stratám na uhlíku. Ide o tzv. C_4 rastliny využívajúce tzv. Hatch-Slackov cyklus.

Princíp merania fotorespirácie spočíva v tom, že na prístroj počas merania napojíme prívod plynu s nízkym obsahom kyslíka (cca 2%) tak, ako je to uvedené na schéme (obr. 4). To eliminuje oxidačnú aktivitu enzýmu Rubisco.

Úloha: Fotosyntézu zmerajte bežným spôsobom na dvoch typoch rastlín – C_3 a C_4 (napr. buka a kukurice). Fotosyntézu zmerajte pri nízkom obsahu kyslíka v prostredí. Rozdiel nameraných hodnôt nám určuje intenzitu fotorespirácie. Porovnajte hodnoty namerané na kukurici a buku.



Obr. 3: Závislosť čistého výnosu fotosyntézy (asimilácie CO_2) na intenzite žiarenia (vľavo) a na koncentrácii CO_2 obklopujúceho list (vpravo)

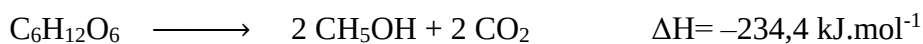
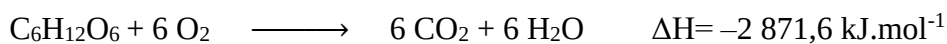


Obr. 4: Schéma merania fotorespirácie gazometrickým systémom

1.5. Bunková respirácia

Dýchanie (respirácia) je biologická oxidácia organických látok, pri ktorej sa uvoľňuje energia potrebná pre krytie energetických potrieb živého organizmu s udržiavaním štruktúry, delenia a rastu buniek, aktívneho príjmu a transportu iónov, biosyntézy organických látok a pod. Proces uvoľňovania energie prebieha postupne, pričom predýchavaný substrát (sacharidy, tuky, organické kyseliny, niekedy aj bielkoviny) sa pretvára cez rad medziproduktov až na konečný produkt oxidácie CO_2 a H_2O . Medziprodukty látkového metabolizmu môžu byť z procesu vyňaté a využité pri biosyntéze nových látok.

Množstvo uvoľnenej energie pri aeróbnom a anaeróbnom dýchaní je evidentné z nasledujúcich rovníc:



Oxidácia organických látok v živých organizmoch prebieha za spoluúčasti enzymatických sústav – oxidázy a dehydrogenázy lokalizovaných v mitochondriách. Metódy merania intenzity dýchania sú založené na sledovaní:

a/ úbytku organickej hmoty – gravimetrické,

b/ analýzy plynov (O_2 a CO_2) v uzavretom priestore – gazometrické metódy.

Rýchlosť dýchania závisí tak od vnútorných ako aj od vonkajších podmienok: je to predovšetkým teplota, koncentrácia O_2 a CO_2 v atmosfére, podmienky minerálnej výživy,

vodnej nasýtenosti. K vnútorným podmienkam patria druhové a vekové odlišnosti, zásobenosť asimilátmi a pod. Pomer uvoľneného CO_2 ku spotrebovanému O_2 nazývame respiračným kvocientom (RQ).

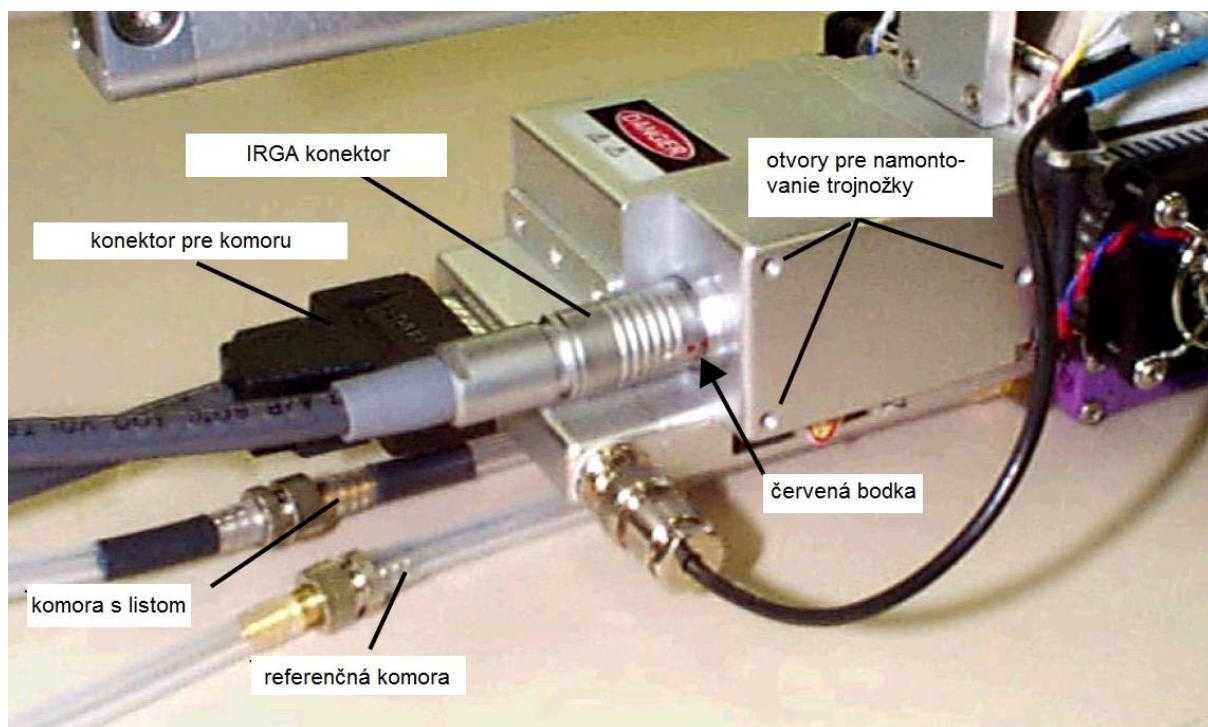
Rýchlosť respirácie asimilačných orgánov sa najčastejšie meria gazometrickou metódou na základe stanovenia nárastu koncentrácie CO_2 v uzavretom priestore, kde listy v podmienkach bez svetla respirujú pričom ostatné procesy ovplyvňujúce celkovú bilanciu spotreby/uvolňovania CO_2 (fotosyntéza, fotorespirácia) sú nulové (viď predošlú kapitolu).

2. Meranie výmeny plynov pre pokročilých

V tejto kapitole sa budeme podrobnejšie venovať princípu fungovania a spôsobu použitia gazometrického systému LI6400XT (obr. 2), ako aj meraniu A-Ci kriviek (závislosť rýchlosti čistej asimilácie na intercelulárnej koncentrácii CO_2). Výsledky týchto meraní budú vložené do modelu a vykalkulované hodnoty použijeme pre spresnenie výpočtov v rastovom simulátore SIBYLA v module FYZIOLÓG.

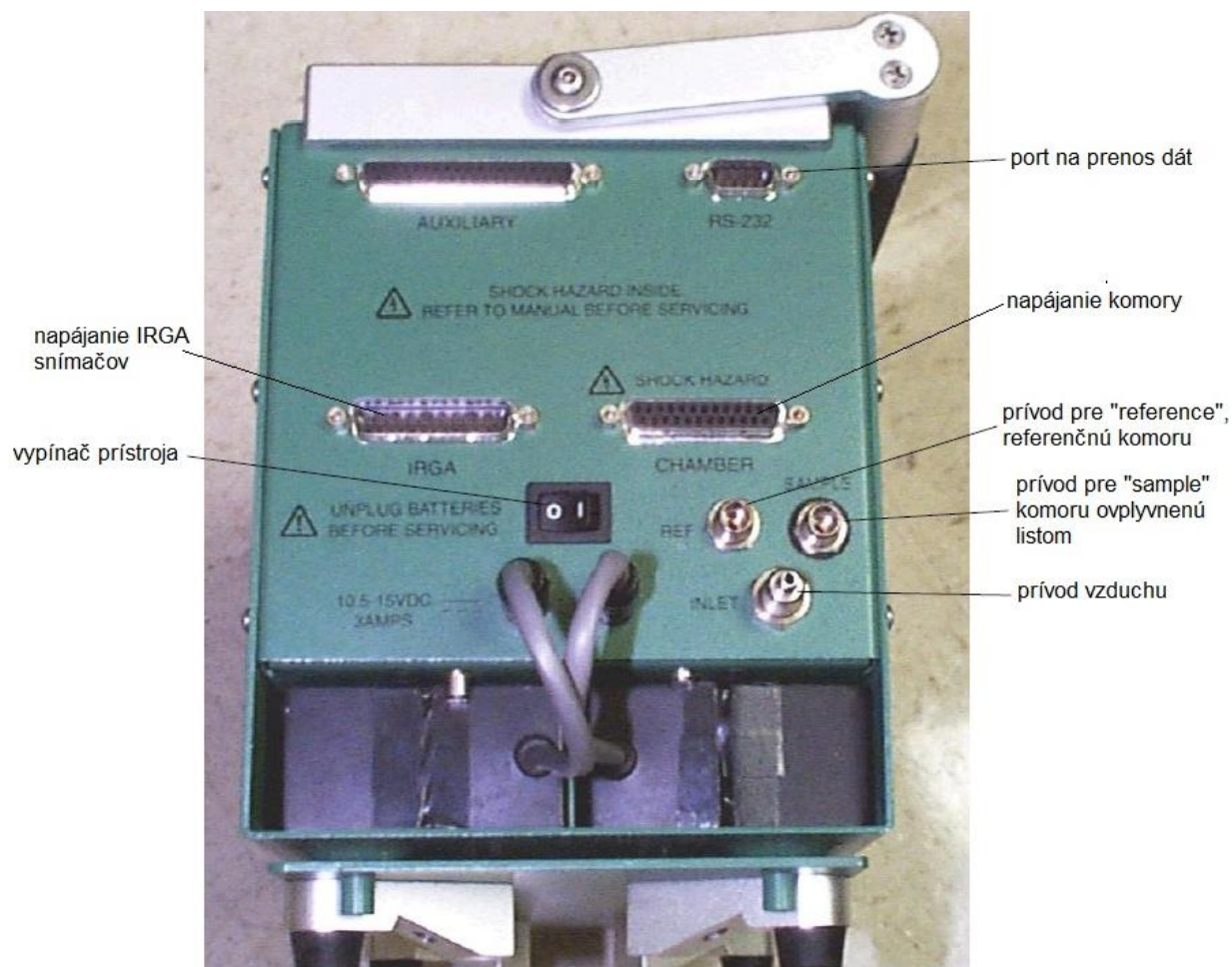
2.1. Zapojenie jednotlivých častí prístroja

Napojenie kabeláže a hadičiek je jednoduché a vlastne nie je možné chybné zapojenie. Na čo si treba dať pozor, je pripájanie pripojenie kábla pre napojenie IRGA. Červená bodka kábla musí byť oproti červenej značke na konektore kyvety. Inak by mohlo dôjsť k poškodeniu kolíkov. Kábel jemne zatlačíme tak, aby konektor zacvakol. Pri náhodnom vytiahnutí kábla by



Obr. 5: Napojenie kabeláže a hadičiek pre prietok vzduchu ku kyvete

mohlo dôjsť k poškodeniu IRGA snímača. Tiež je mimoriadne dôležité, aby IRGA snímač nebol odpájaný počas chodu prístroja.



Obr. 6: Napojenie kabeláže a hadičiek pre prietok vzduchu k prístroju

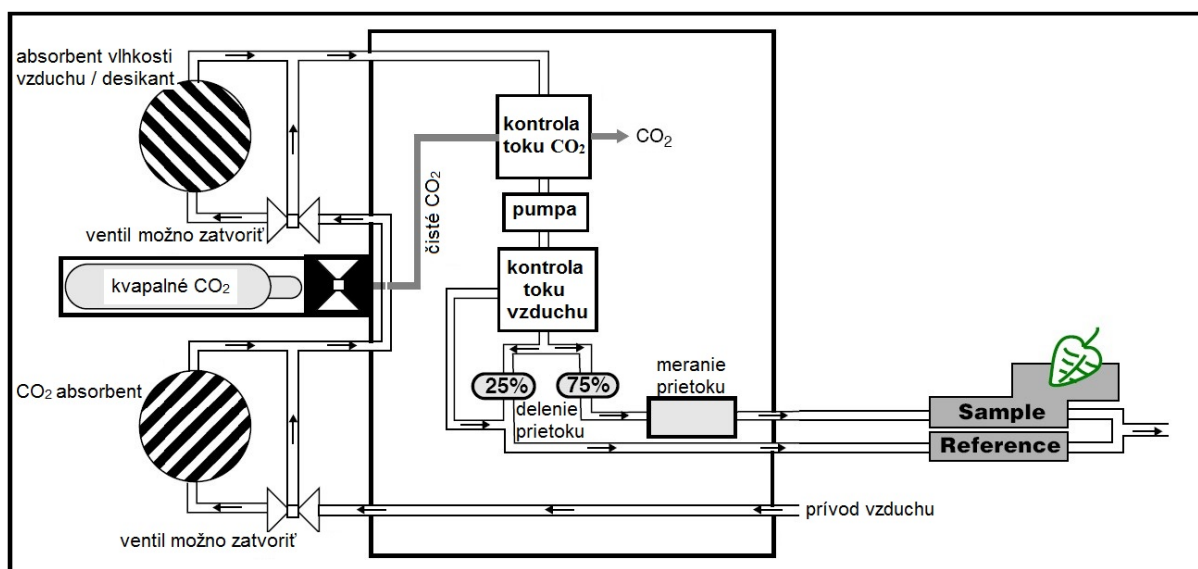
2.2. Prietok plynov prístrojom

Prívod vzduchu do prístroja je vyznačený na obrázkoch 6 a 7. Koncentrácia vzduchu v okolí je samozrejme ovplyvnená vonkajšími faktormi (napr. našim vlastným dýchaním) a najmä v uzavretých priestoroch nie je stabilná. Zdroj vzduchu pre meranie listu musí mať konštantnú koncentráciu CO_2 . Existujú v zásade dve možnosti, ako to zabezpečiť:

- a.) prívod vzduchu je napojený na zdroj plynu, ktorý je vopred namiešaný podľa aktuálnej potreby ešte pred vstupom do prístroja. To však vyžaduje zásobu požadovaného plynu resp. zariadenie, ktoré požadovanú zmes plynov vytvorí.

b.) zdrojom CO_2 je v našom prípade CO_2 bombička. Vzduch je teda nasávaný z okolia, všetok prijatý vzduch následne preteká trubicou obsahujúcou absorbent CO_2 (tzv. „ CO_2 pasca“). Potom je vzduch, ktorý má nulovú koncentráciu CO_2 obohatený veľmi presne regulovaným (a nastaviteľným) množstvom CO_2 z bombičky (obr. 7) tak, aby bola dosiahnutá požadovaná koncentrácia vo vzduchu.

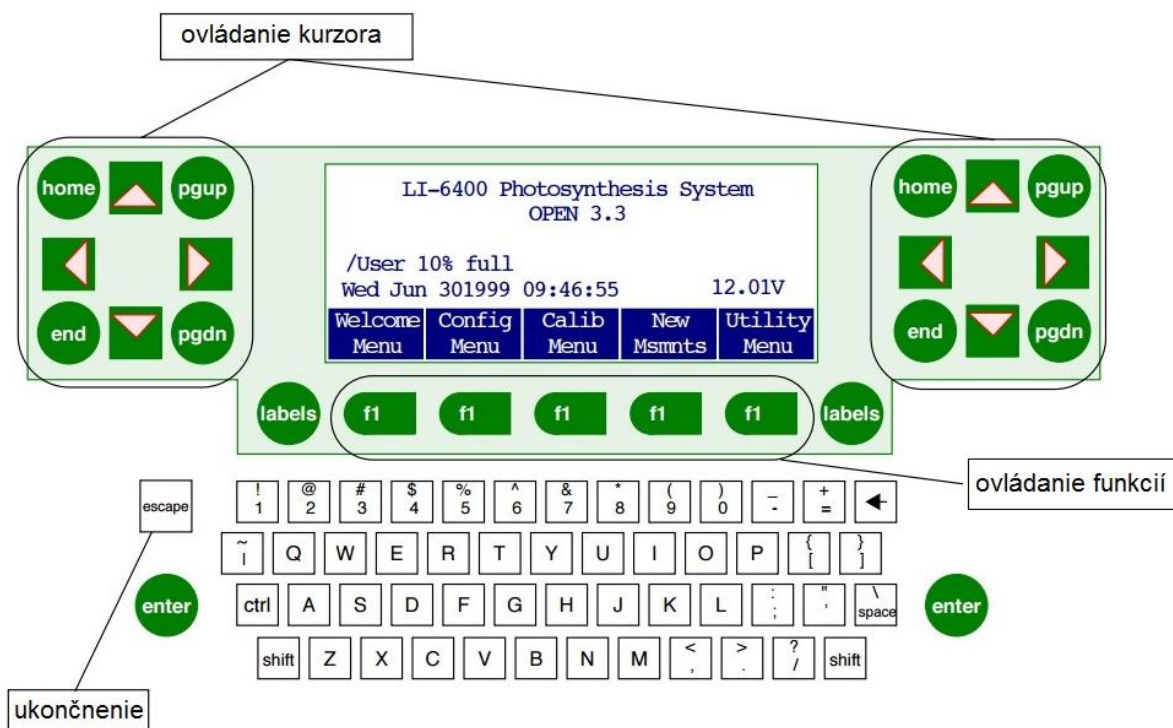
Vzduch môže, ale nemusí prechádzať trubicou obsahujúcou desikant, t.j. absorbent vlhkosti vzduchu. Ak je ventil otvorený, preteká ním všetok vzduch, ktorý tak má nulovú relatívnu vlhkosť. Ak ventil uzatvoríme (tzv. bypass), všetok vzduch preteká mimo desikačnej trubice a vlhkosť vzduchu tak ostáva nezmenená oproti vzduchu v priestore. Zníženie vlhkosti vzduchu je potrebné najmä ak hrozí kondenzovanie vzdušnej vlhkosti vo vnútri trubičiek spájajúcich riadiacu jednotku a meraciu kvetu.



Obr. 7: Schematické zobrazenie prietoku cez prístroj LI 6400XT s vlastným zdrojom CO_2

2.3.Ovládanie prístroja

Na obrázku 8 vidíme časť riadiacej jednotky, pomocou ktorej prístroj ovládame. Klávesy f1 až f5 slúžia na potvrdenie voľby v menu, čísllice umožňujú prepínanie medzi jednotlivými typmi menu. Písmená resp. šípky umožňujú zobrazenie jednotlivých meraných parametrov tak, ako sú uvedené v tabuľke 1. V kapitole 2.4. je pre zjednodušenie popísané, v ktorom menu resp. pod akým písmenom sa nachádzajú parametre, ktoré treba nastaviť resp. skontrolovať.



Obr. 8: Displej a klávesy na radiacej jednotke.

2.4.Príprava a nastavenie prístroja

A. počas zahrievania

- 1) pripravte zdroj CO₂
- 2) Teplota: hodnoty OK? T_{leaf} reaguje?
- 3) Zdroj svetla. Reaguje senzor? Hodnoty OK?
- 4) Senzor tlaku: hodnoty OK? Sú stabilné?
- 5) Ventilátor: beží?
- 6) Kontrola prietoku? Maximálny prítok OK? Tesnosť trubíc?

B. Po zahriatí

- 1) Skontroluj nulový prietok
- 2) Tesne uzavri komoru
- 3) Skontroluj nulové CO₂
- 4) Skontroluj nulové H₂O
- 5) Kalibrácia mixera (voliteľné)
- 6) Kalibrácia žiarenia (voliteľné)
- 7) Skontroluj nulové T_{leaf}
- 8) Nastav referenčnú CO₂ a H₂O
- 9) Otestuj tesnosť
- 10) Match IRGA. Funguje ventil?

C. Meranie prvého listu

- 1) Nastav svetlo
- 2) Nastav prietok na 400
- 3) Nastav referenčnú hodnotu CO₂
- 4) Teplota?
- 5) Uzatvor list
- 6) Nastav pomer prieduchov
- 7) Nastaviť konštantnú vlhkosť?

Príprava prístroja je zosumarizovaná v predchádzajúcej tabuľke. Nie je nevyhnutné kontrolovať všetky súčasti prístroja pred každým meraním, môže to byť však za určitých okolností dobrá „časová investícia“, ktorá niekedy ušetrí veľa času, ak predídeme chybným meraniam hneď na začiatku. Niektoré chyby je meranie je totiž veľmi ťažko odhaliť v jeho priebehu.

Nižšie je podrobnejšie popísaný spôsob kontroly a prípravy prístroja s uvedenou lokalizáciou jednotlivých možností resp. potrebných informácií. Ak sa rozhodneme prístroj nekontrolovať, príp. je už vopred pripravený na meranie, môžete prejsť k bodu **MERANIE**. Je však vždy potrebné otvoriť trubicu s absorbentom CO₂ (full scrub), skontrolovať tesnosť komory a ak ubehlo 10 minút od zapnutia IRGA, vykonať procedúru „Match“ – jej podstata bude vysvetlená neskôr.

KONTROLA SYSTÉMU

- 1.) Skontroluj zapojenie všetkých súčastí a zapni prístroj,
- 2.) Ak používaš štandardnú komoru, zvol: **2x3 LED** (enter),
- 3.) Ak je komora, pripojená stlač „Y“ (yes). **Nikdy nemanipuluj s pripojením IRGA počas chodu!!!**
- 4.) Stlačením **F4** zvol **new measurement**.

Počas zahrievania IRGA (10–15 min):

- 5.) Skontroluj CO₂ – v prípade potreby inštaluj bombičku (každý deň nová) resp. vymeň tesnenie.
- 6.) Stlačením „h“ skontroluj teploty (mali by byť podobné) a reakciu termočlánku v komore na dotyk.
- 7.) Stlačením „g“ skontroluj svetelné senzory (pre kontrolu vonkajšieho senzora – odstráň červenú krytku)
- 8.) Skontroluj umelý zdroj svetla: stisni „2“ (vyberieš tým menu č. 2) a následne **F5** (lamp). Nastav požadované FAR (**keep**).
- 9.) Pre kontrolu tlaku stlač „g“ – hodnota musí byť konštantná (95-100 kPa).
- 10.) Pre kontrolu ventilátora v komore vyber v menu č. 2 možnosť **F1**: stisni „0“ pre vypnutie, „5“ pre zapnutie. Musí byť počuť rozdiel. Po teste ventilátor nechaj zapnutý.
- 11.) Pre kontrolu prietoku stisni v menu č. 2 tlačidlo **F2**. Nastav prietok na hodnotu 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$.
V riadku **b** skontroluj flow (hodnota prietoku by mala byť okolo 700).
- 12.) Kontrola tesnosti trubíc s chemikáliami (CO₂ pasca, desikant)
 - a) CO₂ nastav na **full bypass** a desikant na **full scrub** (následne skontroluj prietok – pokles po nastavení scrub by mal byť 5–10 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$).
 - b) CO₂ nastav na **full scrub** a desikant **full bypass** (opäť skontroluj pokles o 5–10 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)
- 13.) V menu č. 2 stisni **F2**. Nastav prietok na 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$.

Po zahriatí IRGA:

- 14.) Ak už ubehlo 10 minút od zapnutia prístroja, pokračuj (ak nie, počkaj).
- 15.) Kontrola nulového prietoku: vypni pumpu a ventilátor – v menu č. 2 stisni **F2**. Následne stlač **F1** a potom „O/0“. Pozoruj prietok – mal by klesnúť na $0\text{--}2\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$. Po teste zapni ventilátor (**F1**).
- 16.) Nastavenie tesnenia komory:
 - a) Zavri komoru a pozri sa, či je medzi tesneniami medzera,
 - b) Dotiahni skrutku tak, aby tam nebola medzera,
 - c) Otvor komoru a urob 1–2 polootočená v smere hodinových ručičiek,
 - d) Zatvor komoru.
- 17.) Kontrola nulového CO_2 :
 - a) V menu č. 2 stisni **F2**, potom „F“, čím zapneš pumpu – nastav na $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$.
 - b) CO_2 pascu nastav na **full scrub** a desikant na **full bypass** – CO_2R a CO_2S musia klesnúť k nule (tolerancia je $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), CO_2R klesá rýchlo, CO_2S pomalšie. Kontrola sa robí pri „mixer off“!
- 18.) Kontrola nulovej H_2O : CO_2 scrub nastav na **full scrub** a desikant nechaj nastavený na **full scrub**. V riadku „a“ skontroluj H_2OR a H_2OS . Hodnoty musia klesnúť k nule. Tu je klesanie pomalšie ako pri CO_2 , rýchlejšie padá H_2OR . Rýchlejšia kontrola: v priebehu minúty by mala H_2OR klesnúť o $0,2\text{--}0,3\ \text{mmol}$. Tolerancia je $0,5\ \text{mmol}\cdot\text{mol}^{-1}$.
- 19.) Kontrola nulovej teploty listu: odpoj fialovú koncovku, teplota bloku a listu by mala byť rovnaká (tolerancia $0,1\ ^\circ\text{C}$). Po zapojení skús, či senzor reaguje napr. na teplotu prsta.
- 20.) Zisti stabilitu koncentrácie CO_2 . V menu číslo 2 stlač **F3** a následne „R“ – nastav $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$.
- 21.) CO_2 scrub nechaj nastavené na **full scrub**, desikant nastav skrutkou na polovicu. CO_2R by malo byť stabilné (je OK, ak sa za 30 sekúnd zmení maximálne o $\pm 2\ \mu\text{mol}$).
- 22.) Testovanie tesnosti: v menu č. 2 stisni **F2** a nastav prietok na $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$. Dýchni na zavretú komoru pre overenie tesnenia. Ak je tesnenie dobré, CO_2 ostáva stabilné (tolerancia: $1\ \mu\text{mol}$).
- 23.) V menu č. 1 stisni **F5** (Match) a počkaj na stabilizáciu, kedy sa objaví „match IRGAs“ a „exit“. Najprv stlač **F5** (match IRGAs) a potom stisni **F1** (exit).

MERANIE

- 1.) Nastav požadovanú intenzitu svetla tak, aby si zatváral list do osvetlenej komory (menu č. 2, **F5**). V tme sa totiž rýchlo zatvárajú prieduchy. Zbytočné svietenie počas prestojov výrazne skracuje životnosť batérií, preto je dobré svetlo vypínať.
- 2.) Nastav prietok (menu č. 2, **F2**) na $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$.
- 3.) Nastav desikant skrutkou na polovicu.
- 4.) Nastav CO_2 (menu č. 2, **F3**) na 390 ppm.

- 5.) CO₂ pasca musí byť na **full scrub**.
- 6.) Nastav teplotu cez Block temperature (menu č. 2, **F4**), zväčša používame 20–25 °C.
- 7.) Nastav správny pomer prieduchov (0 – listnáče resp. ak sú prieduchy na jednej strane; 1 pre rovnaký pomer na prieduchov na vrchnej a spodnej časti listu; ak si nie si istý, použi 2).
- 8.) Vytvor nový súbor (menu č. 1, **F1**), dáta ukladaj stlačením **F1** (log). Pre pridanie poznámky stlač **F4**.

Match: Podmienkou presného merania je „Match“ systému. Je nutné ho robiť pred každým meraním, ale aj pri zmene CO₂, resp. pri zmenách teploty (stačí každých 30 minút). Match je dôležitejší pri nízkych hodnotách fotosyntézy resp. transpirácie.

Vlhkosť vzduchu: nezabúdaj kontrolovať vlhkosť vzduchu tak, aby bola zhruba rovnaká počas meraní.

Údržba: Ak máš problém so stabilitou hodnôt, najčastejšou príčinou je netesnosť systému (dotiahnuť skrutku resp. vymeniť tesnenia) alebo nefunkčnosť chemikálií (pri výmene treba **odskrutkovať spodnú časť trubice!!!**). Po použití 25 bombičiek treba vymeniť filter.

AC-modul – priame napájanie na sieť: vždy oba konektory z modulu do prístroja, môže ísť aj batéria do AC-modulu.

VYPÍNANIE

Vypnutie prístroja: pomocou „**Backspace/ESC**“ sa vráť až k „**welcome menu/utility menu**“ a zvol „**QUIT/SLEEP**“. Potvrď „Y“, vypni. Nesnaž sa vymontovať bombičku po meraniach (až na druhý deň).

Po ukončení merania **UVOĽNI SKRUTKU NA KYVETE** tak, aby nedošlo k trvalému zdeformovaniu tesnenia.

2.5. Meranie A-Ci kriviek

Význam merania A-Ci kriviek (teda závislosť čistého fotosyntetického výnosu na intercelulárnej koncentrácii CO₂):

- ponúkajú náhľad do biochemických procesov na úrovni listu a o efektívnosti karboxylácie: počiatočný sklon krivky vypovedá o aktivite enzýmu Rubisco. Niekedy tu hovoríme o mezofylovej vodivosti.
- Pri meraní A-Ci kriviek môžeme oddeliť vplyv prieduchovej limitácie od mezofylovej limitácie.
- V rámci mezofylu môže byť oddelená karboxylačná limitácia od limitácie na úrovni transportu elektrónov.

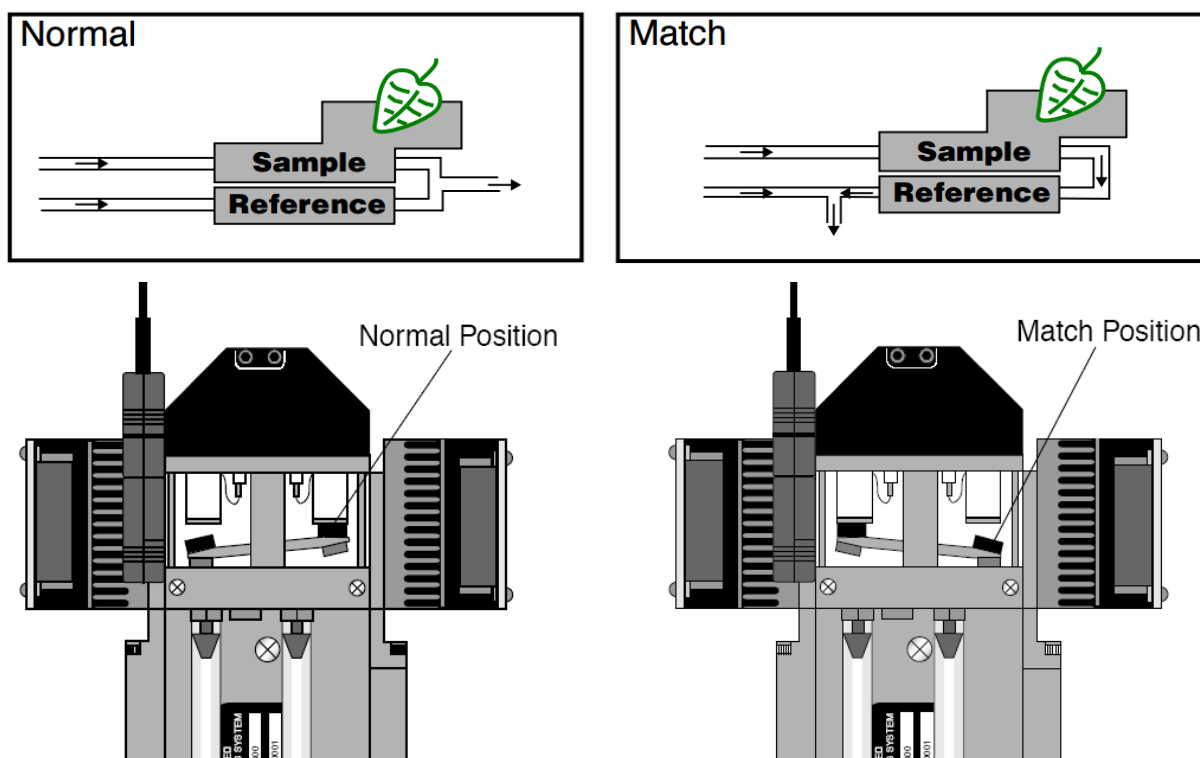
Čo sa týka svetla, to by počas merania vplyvu CO_2 na fotosyntézu nemala byť limitujúcim faktorom, preto používame saturačné ožiarenie. Treba však rátať s možným otváraním prieduchov počas merania, keďže modré svetlo, ktoré je pri umelom svetle zastúpené, stimuluje otváranie prieduchov. Ich postupné otváranie nie je príliš podstatné, je však potrebné vyhnúť sa počiatočnému meraniu pri zavretých prieduchoch.

Pri voľbe koncentrácií CO_2 pre samotné meranie sú podstatné niektoré fakty hodné zváženia: pôsobenie vysokých koncentrácií CO_2 spôsobuje rýchle zatváranie prieduchov. Preto ich robíme na záver merania krivky a vždy bez časových prestojov. Ďalšou dôležitou informáciou je, že dlhodobé zotrvanie listu v prostredí s nízkou koncentráciou CO_2 (okolo kompenzačného bodu) môže spôsobiť deaktiváciu enzýmov. Možným prístupom je začať na prirodzenej koncentrácii CO_2 (400 ppm resp. $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) pokračovať poklesom ku kompenzačnému bodu, vrátiť sa ku hodnote 400 ppm na záver realizovať merania nad prirodzenou koncentráciou CO_2 . Uvedený je príklad koncentrácií CO_2 : 400, 300, 200, 100, 50, 400, 600, 800, 1200 ppm. Po dosiahnutí nastavenej koncentrácie postačuje spravidla 60 sekundová adaptácia pre stabilizovanie hodnôt fotosyntézy. Mimoriadne dôležité je dobré tesnenie kyvety, keďže s meniacimi sa koncentraciami v komore narastá gradient a riziko prestupu je vyššie. Ak sú hodnoty fotosyntézy rozkolísané, pravdepodobne je problém v netesnosti systému.

Teplota listu aj vlhkosť vzduchu by mali byť počas merania konštantné.

Mimoriadne dôležitá je procedúra „match“, ktorú treba realizovať po každej zmene koncentrácie CO_2 v komore (po ustálení koncentrácie). Inak namerané hodnoty budú chybné!

Príčinou pre vykonanie tejto procedúry je odstránenie odchýlka (nulovanie) medzi analyzátormi v referenčnej a „sample“ komore ovplyvnenej aktivitou listu. „Match“ zvyšuje presnosť meraní najmä pri nízkych hodnotách asimilácie. Dôležitým krokom je prísun rovnakého vzduchu pre oba páry IRGA senzorov – toto je mechanická procedúra spojená s preklopením „lavičky“ tak, ako je to zobrazené na obr. 9. Druhým krokom je matematická operácia, ktorú prístroj vykoná automaticky. Problémom pri tejto procedúre môže byť nestabilita meraných hodnôt. V takom prípade prístroj upozorní na možnú chybu.



Obr. 9: Ventil pri procedúre „match“ sa preklopí a do oboch komôr sa vháňa rovnaký vzduch (zo „sample“ komory ovplyvňovanej aktivitou listu do referenčnej komory). V ľavej časti obrázka vidíme „normálnu“ pozíciu ventilu, v pravej časti je poloha pri procedúre „match“.

2.6. Model pre spracovanie A-Ci kriviek

Po nameraní A-Ci kriviek využijeme namerané dáta pre kalkuláciu ďalších parametrov. Pre modelovanie kriviek sme vytvorili jednoduchý program. Po spustení programu, ktorý je nainštalovaný na počítačoch, je potrebné zadať zvolené hodnoty žiarenia a teploty listu, pri ktorých prebiehalo meranie (hodnoty určíme pred meraním podľa potreby, napr. druhu rastliny). Tieto hodnoty sú počas merania konštantné. Ďalej zadáme koncentráciu CO_2 , ktorú sme počas merania postupne menili a napokon hodnotu fotosyntetického výnosu nameranú pre jednotlivé koncentrácie CO_2 .

Tlačidlo „update table“ slúži na uloženie zadaných parametrov (obr. 10), tlačidlo „delete“ na vymazanie posledného riadka, tlačidlo „go“ na vyrovnanie krivky, tlačidlo „save“ uloží zadané údaje, ktoré sa potom zobrazia aj po zatvorení programu a opätovnom otvorení. Tlačidlo „download“ umožní uložiť výstup programu ako *.pdf súbor.

Vstupne veliciny

Par

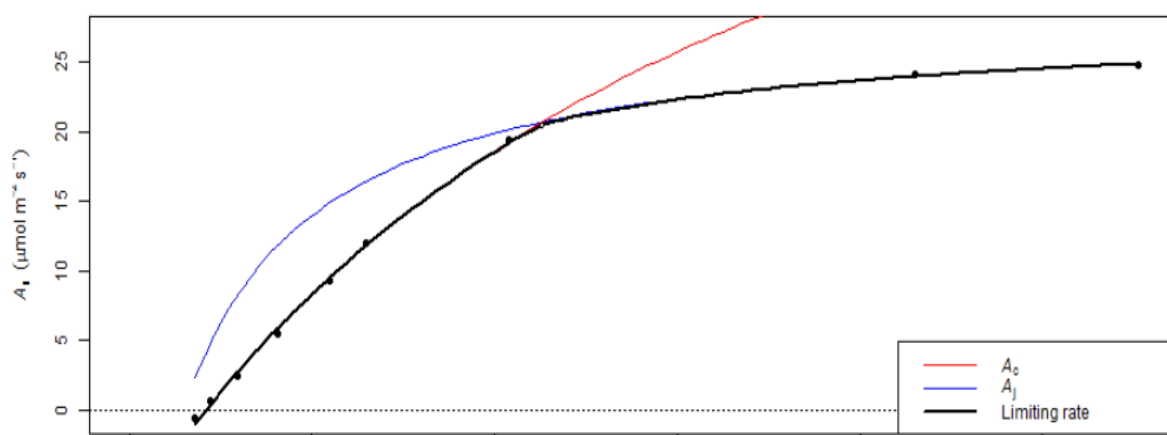
Par	Ci	Foto	Temp
1800	50	-0.06	25
1800	72	-0.6	25
1800	89	0.6	25
1800	119	2.4	25
1800	163	5.5	25
1800	219	9.25	25
1800	259	12.02	25
1800	416	19.37	25
1800	861	24.08	25
1800	1105	24.72	25

Ci

Photo

Temp

Obr. 10: Zadávanie intenzity žiarenia (Par), intercelulárnej koncentrácie CO₂ (Ci), intenzity čistého fotosyntetického výnosu (Foto) a teploty listu do modelu (Temp). Na ľavej strane zadávame hodnoty, na pravej sa zobrazujú hodnoty už vložené (vlastný program).



Obr.11: Príklad grafického výstupu programu – vyrovnanie krivky.

Výsledkom je grafický a numerický výstup (obr. 11 a 12). V module FYZIOLOG rastového simulátora využijeme vykalkulované hodnoty, ktoré sú vyznačené v červenom rámečku: V_{cmax} = maximálna rýchlosť karboxylácie, J_{max} = maximálna rýchlosť elektrónového transportu, R_d = temnotná (bunková) respirácia.

You entered

```
Data and prediction :
  Ci Ameal Amodel Ac Aj Ap Rd VPD Tleaf PPFD Patm
1 72 -0.60 -1.0004565 2.575183 5.916879 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
2 89 0.60 0.4094723 3.985269 8.444301 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
3 119 2.40 2.7564694 6.332633 11.879384 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
4 163 5.50 5.9067548 9.483710 15.417220 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
5 219 9.25 9.4840151 13.062625 18.441201 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
6 259 12.02 11.7852861 15.365814 19.999276 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
7 416 19.37 19.1942431 22.824678 23.712441 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
8 861 24.08 23.9585582 35.866421 27.543097 3000 3.575441 1.5 25 1800 100
9 1105 24.72 24.8456574 40.303264 28.427896 3000 3.575441 1.5 25 1800 100

Ci_original
1 72
2 89
3 119
4 163
5 219
6 259
7 416
8 861
9 1105
```

```
Vcmax Jmax Rd :
      Estimate Std. Error
Vcmax 68.875812 1.3546056
Jmax 135.439437 1.7445723
Rd 3.575441 0.2388223
```

```
Michel-Menten coef for Farquhar model Km G* :
[1] 42.75
```

Obr. 12: Príklad numerického výstupu programu: zobrazené sú dáta použité pre kalkuláciu a vykalkulované hodnoty (v červenom rámečku).

Tab. 1: Premenné a ich spôsob zoskupenia zobrazovaného v prístroji pri základnom nastavení

Skupina	Skratka	Popis
A	CO2R_μml	Koncentrácia CO ₂ v referenčnej komore (μmol CO ₂ mol ⁻¹)
	CO2S_μml	Koncentrácia CO ₂ v komore ovplyvnenej aktivitou listu (μmol CO ₂ mol ⁻¹)
	H2OR_mmol	Koncentrácia H ₂ O v referenčnej komore (mmol H ₂ O mol ⁻¹)
	H2OS_mmol	Koncentrácia H ₂ O v komore ovplyvnenej aktivitou listu (mmol H ₂ O mol ⁻¹)
B	ΔCO2_μml	Rozdiel koncentrácie CO ₂ CO2S a CO2R (μmol CO ₂ mol ⁻¹)
	ΔH2O_mmol	Rozdiel koncentrácie vodnej pary H2OS a H2OR (mmol H ₂ O mol ⁻¹)
	Flow_μml	Prietok vzduchu do komory s listom (μmol s ⁻¹)
	RH_S_ %	Relatívna vlhkosť vzduchu v komore s listom (%)
C	Photo	Čistý výnos fotosyntézy (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)
	Cond	Vodivosť/konduktancia prieduchov pre H ₂ O (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)
	Ci	Intercelulárna koncentrácia / koncentrácia CO ₂ v liste (μmol CO ₂ mol ⁻¹)
	Trmmol	Rýchlosť transpirácie (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)
D	Ci/Ca	Koncentrácia intercelulárneho CO ₂ / obklopujúceho CO ₂
	VpdL	Deficit tlaku vodných pár na základe teploty listu (kPa)
	VpdA	Deficit tlaku vodných pár na základe teploty vzduchu (kPa)
E	totalCV%	Suma ΔCO2CV_%, ΔH2OCV_% a Flow_CV%
	ΔCO2CV_ %	Variačný koeficient ΔCO2_μml (%)
	ΔH2OCV_ %	Variačný koeficient ΔH2O_mmol (%)
	Flow_CV%	Variačný koeficient prietoku "Flow_μml" (%)
F	RH_R_ %	Relatívna vlhkosť vzduchu v referenčnej komore (%)
	RH_S_ %	Relatívna vlhkosť vzduchu v komore s listom (%)
	Td_R_ %	Teplota rosného bodu v referenčnej komore (°C)
	Td_S_ %	Teplota rosného bodu v v komore s listom (°C)
G	Prss_kPa	Atmosferický tlak (kPa)
	ParIn_μm	Intenzita fotosynteticky aktívneho žiarenia v komore (μmol m ⁻² s ⁻¹)
	ParOut_μm	Intenzita fotosynteticky aktívneho žiarenia mimo komory (μmol m ⁻² s ⁻¹)
	BLC_mol	Celková vodivosť priľahlej vrstvy vzduchu (zohľadňuje pomer prieduchov) (mol m ⁻² s ⁻¹)
H	Tblock	Teplota chladiaceho bloku (°C)
	Tair_°C	Teplota v komore s listom (°C)
	Tleaf°C	Teplota listu (°C)

Tab. 1 (pokračovanie): Premenné a ich spôsob zoskupenia zobrazovaného v prístroji pri základnom nastavení

I	HH:MM:SS	Čas
	Program	Stav automatického programu
	CHPWMF	Stav (sumár) bližšie rozpísaný v skupine J
	Battery	Voltáž batérie (V)
J	CO2	Stav CO ₂ IRGA snímačov
	H2O	Stav H ₂ O IRGA snímačov
	Pump	Stav pumpy
	Flow	Stav regulátora prietoku
	Fan	Rýchlosť ventilátora
K	Program	Stav automatického programu
	ProgPrgs	zobrazenie krokov automatického programu
	FwMxCrLp	Numerický sumár (kontrola prietoku, CO ₂ mixer, kontrola teploty, žiarenie)
	totalCV%	Suma $\Delta\text{CO}_2\text{CV}_\%$, $\Delta\text{H}_2\text{OCV}_\%$ a $\text{Flow}_\text{CV}\%$
L	CRagc_mv	AGC signál referenčnej CO ₂ (automatic gain control, mV)
	CSagc_mv	AGC signál CO ₂ ovplyvneného listom
	HRagc_mv	AGC signál referenčnej H ₂ O
	HSagc_mv	AGC signál H ₂ O ovplyvnenej vzorkou