

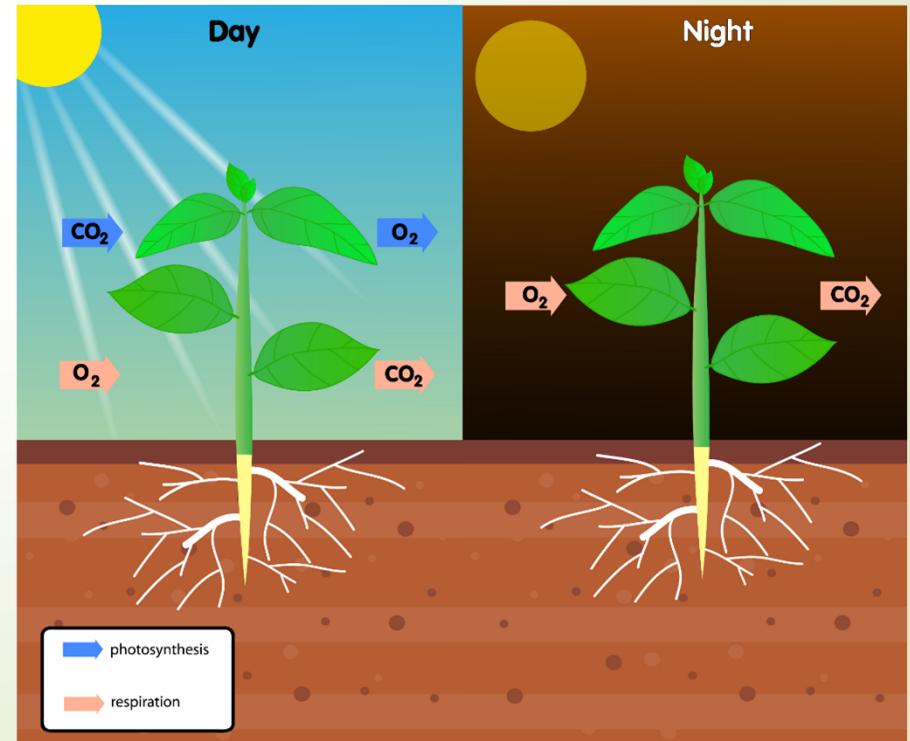
Cvičení z fyziologie rostlin



4. Respirace

Co je respirace?

- Aerobní respirace („dýchání“) :
 - Probíhá ve všech živých buňkách kořenů, stonků, listů (květů, plodů)
 - Hlavní zdroj energie v noci a v heterotrofních (nezelených) orgánech
 - Při fotosyntéze je rychlost respirace v zelených částech rostlin omezená



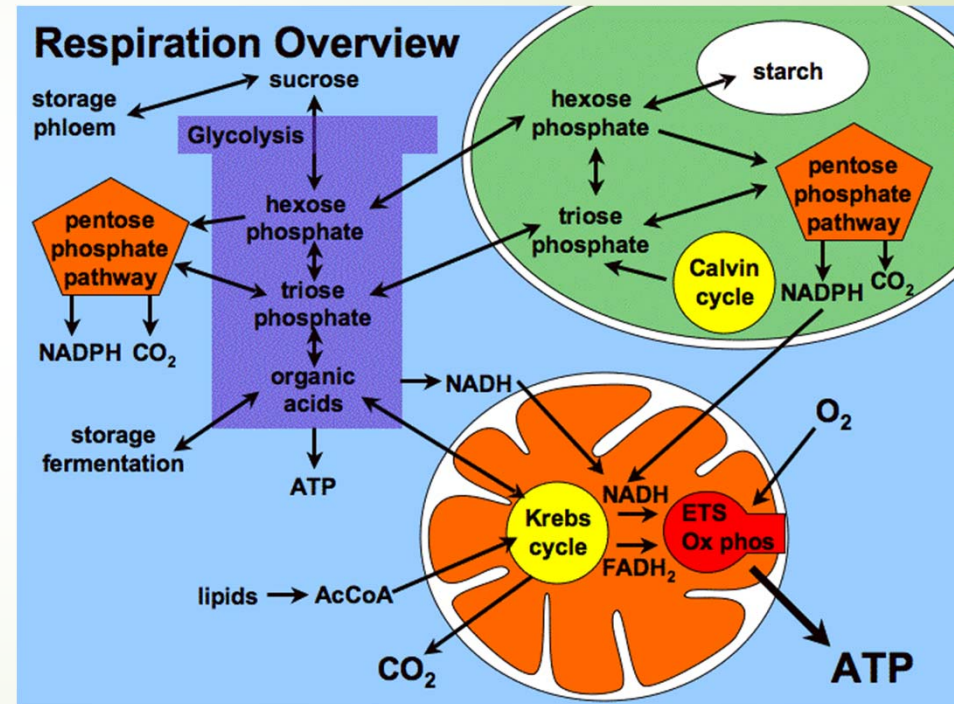
Co je respirace?

- Aerobní respirace („dýchání“) :
 - Katabolický děj buněčného metabolismu
 - Aerobní proces, tj. O_2 je konečný akceptor elektronů
 - Zisk **energie** a uhlíkatých **meziproduktů** pro syntézy **rozkladem organických molekul** za **spotřeby O_2** a **uvolnění CO_2** .
 - Substráty – **sacharidy**, tuky, bílkoviny, organické kyseliny
 - Produkty – **ATP**, NADH, uhlíkaté skelety, CO_2 , H_2O



Co je respirace?

- Lokalizace procesů respirace v buňce:
 - Cytoplazma – glykolýza, pentózo-fosfátový cyklus
 - Plastidy – pentózo-fosfátový cyklus
 - Mitochondrie - Krebsův (citrátový) cyklus, koncový dýchací řetězec (oxidativní fosforylace)
- Řízení respirace
 - Redoxní signály – NADPH, ROS, RNS, přenašeče elektronů atd...
 - Specifické metabolity / meziprodukty – malát, ...

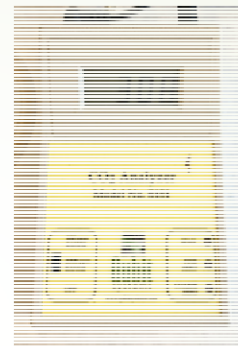


Respirace a její rychlost

- ▶ Faktory ovlivňující rychlost respirace
 - ▶ Dostupnost O_2 – anaerobní procesy produkují málo ATP
 - ▶ Koncentrace CO_2 - zvýšená hladina zpomaluje respiraci
 - ▶ Teplota – nízká teplota zpomaluje, vysoká zrychluje respiraci
 - ▶ Záření – dostatek světla podporuje fotosyntézu a částečně potlačuje respiraci v zelených částech rostlin
 - ▶ Dostupnost minerálních živin – fosfor, dusík...
 - ▶ Stupeň ontogeneze a fyziologický stav rostliny
 - ▶ Vysoká respirace u klíčících semen, mladých rostlin a nefotosyntetizujících orgánů rostlin
 - ▶ Vyšší respirace u mírně nebo akutně stresovaných rostlin – v první „poplachové“ fázi energie pro nastartování obranných mechanismů, v druhé „resistenční“ fázi energie pro udržování obrany

Metody měření respirace

- Gazometrické metody
 - detekce koncentrace CO_2 (ve vzduchu)

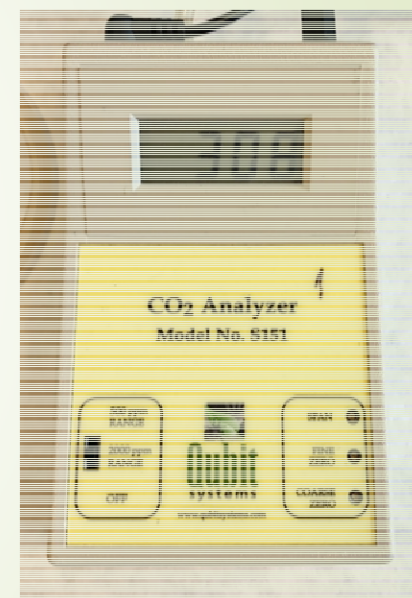


- Oxymetrické metody
 - Detekce koncentrace kyslíku (plynného i rozpuštěného v roztoku)



Gazometrické měření respirace

- ▶ Detekce koncentrace CO_2
- ▶ IRGA – infračervený analyzátor plynů
 - ▶ Princip – detekce změn koncentrace CO_2 podle absorbance IR záření
- ▶ Výhody
 - ▶ Jednoduché a rychlé měření změn koncentrace CO_2 v proudu vzduchu
 - ▶ Vysoká citlivost
- ▶ Nevýhody
 - ▶ Nutno odstranit vlhkost ze vzduchu (vodní pára také absorbuje IR záření)
 - ▶ Potřeba zdroje vzduchu se stabilní koncentrací CO_2 , nebo upraveného vzduchu bez CO_2



Oxymetrické měření respirace

- ▶ Detekce koncentrace kyslíku (plynného i rozpuštěného v roztoku)
- ▶ Elektrochemická (Clarkova) kyslíková elektroda
 - ▶ Princip – redukce O_2 v elektrolytu okolo elektrod za plynopropustnou membránou – vznik elektrického proudu
- ▶ Optická kyslíková elektroda
 - ▶ Princip – změna (snížení) intenzity luminiscence barviva vázaného na membráně v přítomnosti kyslíku, obsahuje zdroj excitačního záření a detektor luminiscence



Oxymetrické měření respirace

- ▶ Výhody
 - ▶ Rychlé měření, běžně dostupné přístroje
- ▶ Nevýhody
 - ▶ Vhodné zejména pro roztoky a suspenze
 - ▶ Citlivá membrána a nestabilní signál elektrochemické sondy kvůli průběžné spotřebě O_2 během redukce na elektrodě



Proč měříme rychlost respirace?

- Stanovení uhlíkové bilance rostliny
- Stanovení nákladnosti fyziologických procesů (např. příjem iontů, růst, udržování biomasy)
- Stanovení dynamických změn v reakci na podněty (např. stres)



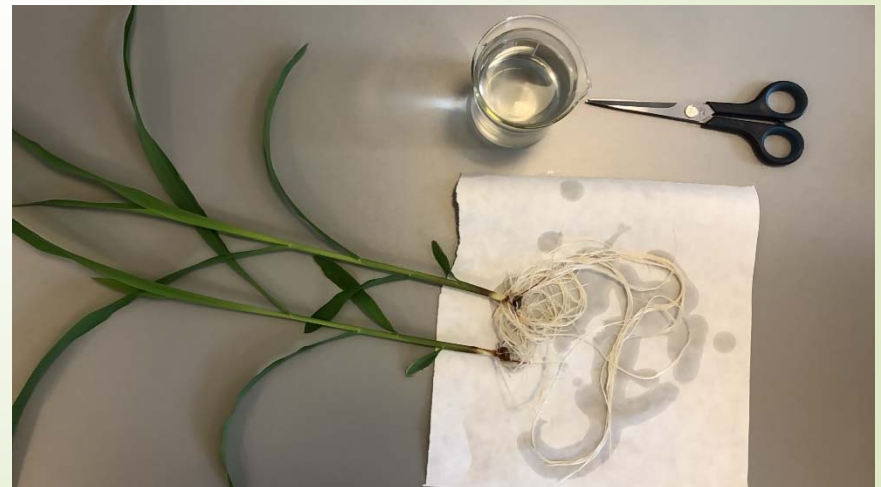
Praktická část

Gazometrické měření rychlosti respirace

- **Experiment 1** – Porovnání rychlosti respirace různě dlouhou dobu bobtnajících semen
 - Materiál: semena (bob, pšenice...) bobtnající ve vodě po dobu 2 hodin a 2 dnů
 - Úkoly: Vypočtete rychlosti respirace, porovnejte výsledky, rozdíly popište a vysvětlete v Závěru.
 - Hypotéza: Semena bobtnající delší dobu budou mít vyšší rychlost respirace.
- **Experiment 2** – Porovnání rychlosti respirace kořenů rostlin kukuřice pěstovaných při deficienci některé makroživiny (N, P, Fe)
 - Materiál: kořeny rostlin kukuřice pěstovaných v živném roztoku bez vybraných makroživin (N, P, Fe)
 - Úkoly: Vypočtete rychlosti respirace, porovnejte výsledky, vyjádřete v procentech změny u deficientních rostlin oproti kontrole, rozdíly stručně popište a vysvětlete v Závěru.
 - Hypotéza: Kořeny deficientních rostlin se budou lišit rychlostí respirace od kořenů kontrolní rostliny, ale v závislosti na významu konkrétní živiny pro růst a na rozsahu poškození způsobeném jejím nedostatkem.

Gazometrické měření rychlosti respirace

- ▶ Princip:
 - ▶ Stanovení rychlosti respirace ze změny koncentrace CO_2 ve vzduchu proudícím okolo rostlinného vzorku
- ▶ Rostlinný materiál:
 - ▶ semena (bob, pšenice,...), bobtnající ve vodě po krátkou (2 hodiny) a dlouhou (2 dny) dobu
 - ▶ Kořeny rostlin rostoucích při deficienci některé makroživiny



Gazometrické měření rychlosti respirace

Sestavení měřicí soupravy

Počítač pro záznam dat

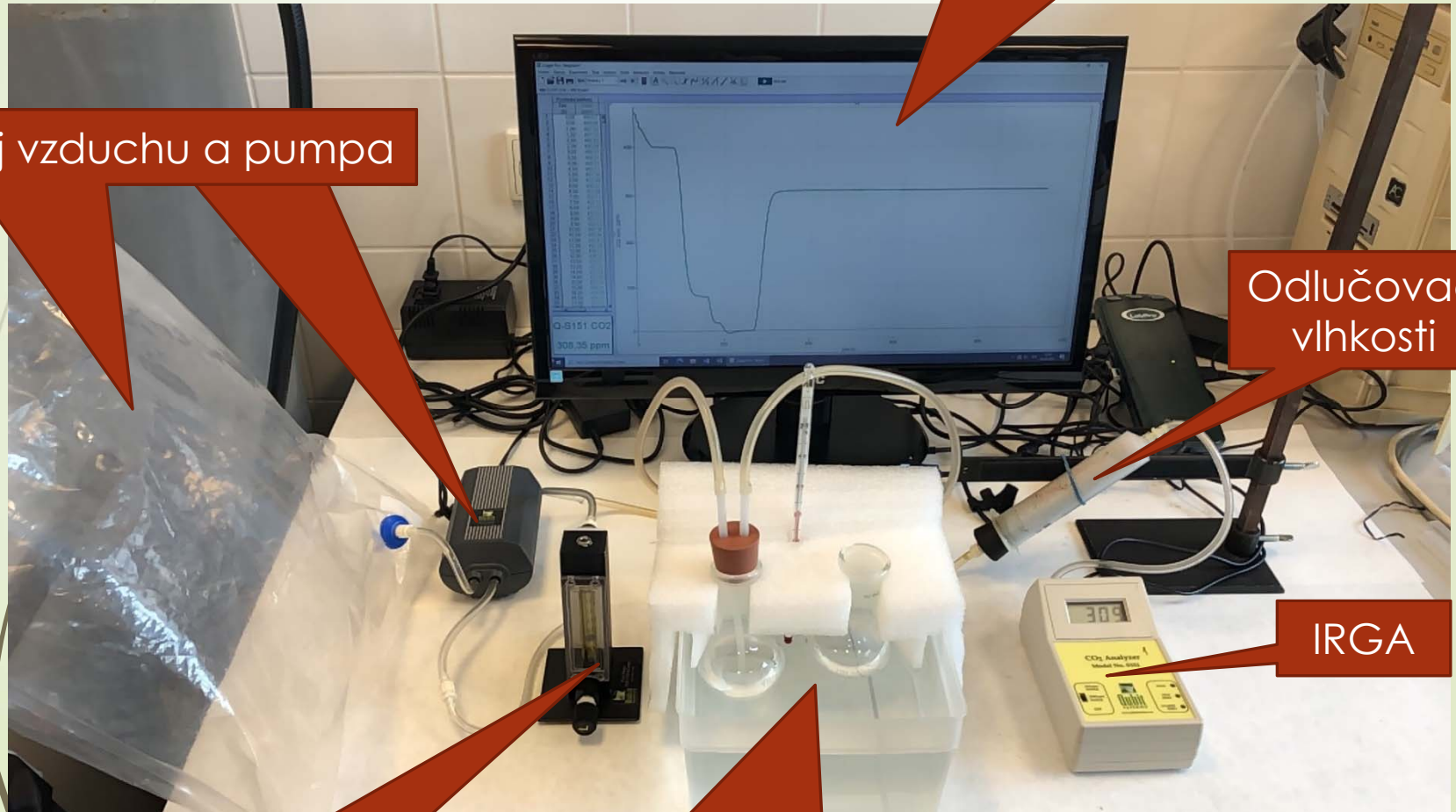
Zdroj vzduchu a pumpa

Odlučovač vlhkosti

IRGA

Regulátor průtoku

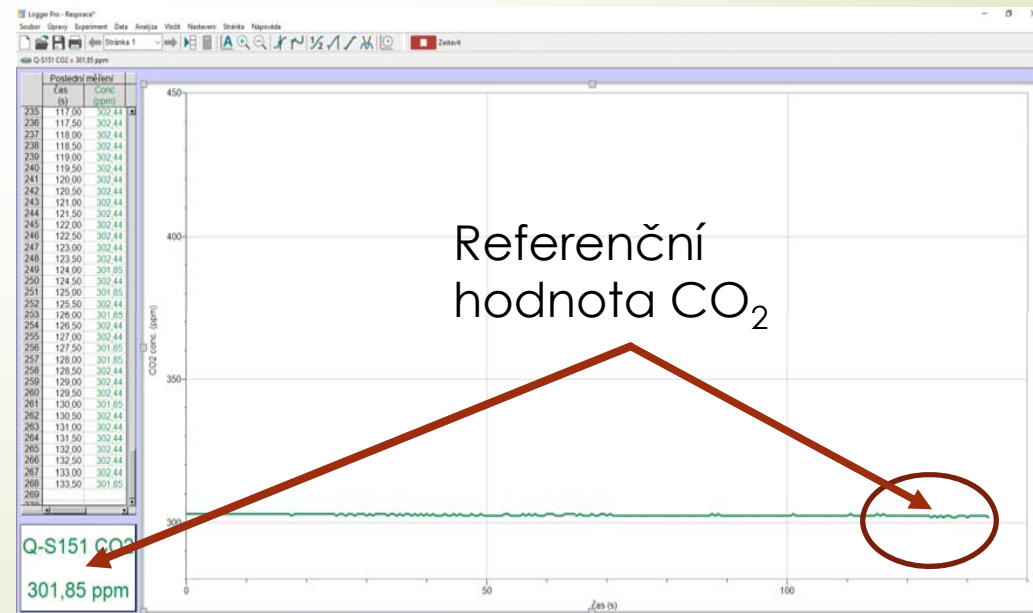
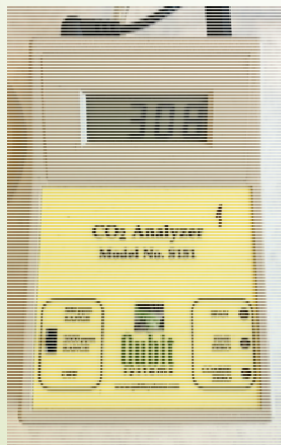
Vodní lázeň a měřící baňky



Gazometrické měření rychlosti respirace

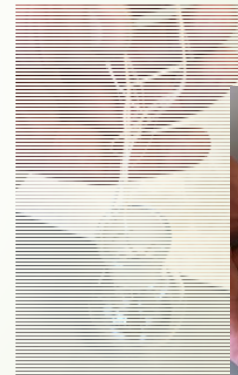
Provedení

- Zapojit měřící soupravu
- Změřit referenční hodnotu (výchozí koncentraci) CO_2 ve zdroji vzduchu
 - Zapojit prázdnou baňku
 - Zregulovat průtok na 0.2 L/min
- Počkat na ustálení signálu z IRGA, odečíst hodnotu koncentrace CO_2



Gazometrické měření rychlosti respirace

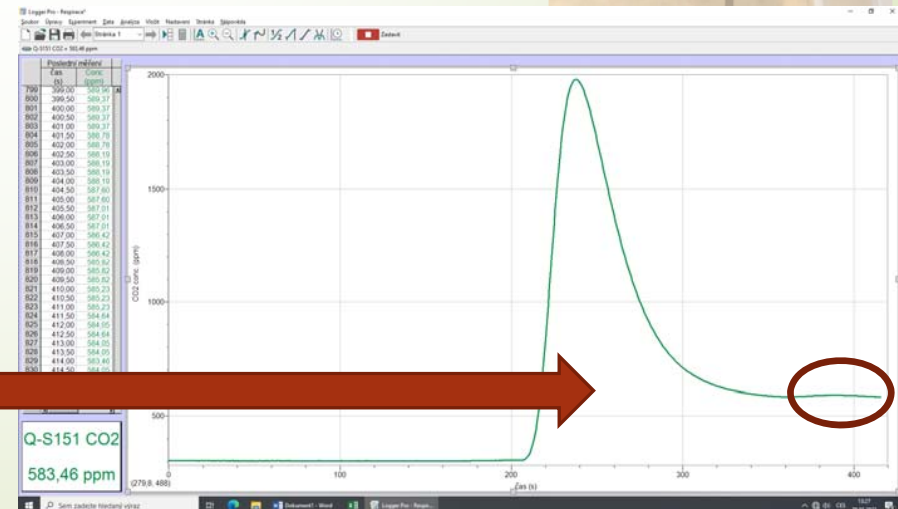
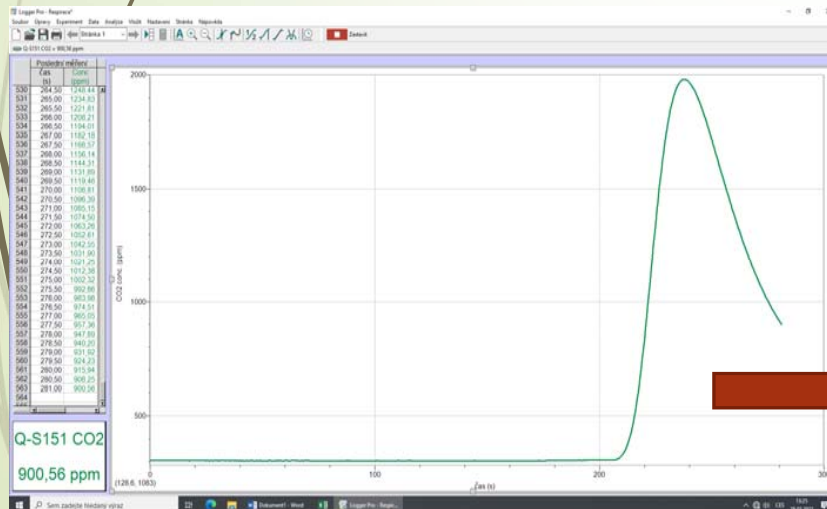
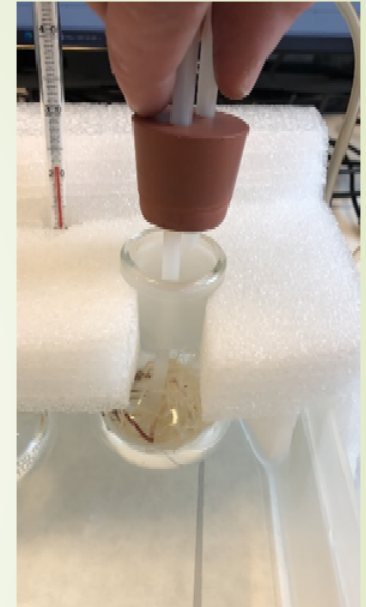
- Provedení
- Připravit rostlinný vzorek
 - Kořeny oddělit od rostliny
- Semena / kořeny lehce osušit
- Šetrně vložit do měřicí baňky
- Umístit baňku do držáku ve vodní lázni



Gazometrické měření rychlosti respirace

➤ Měření

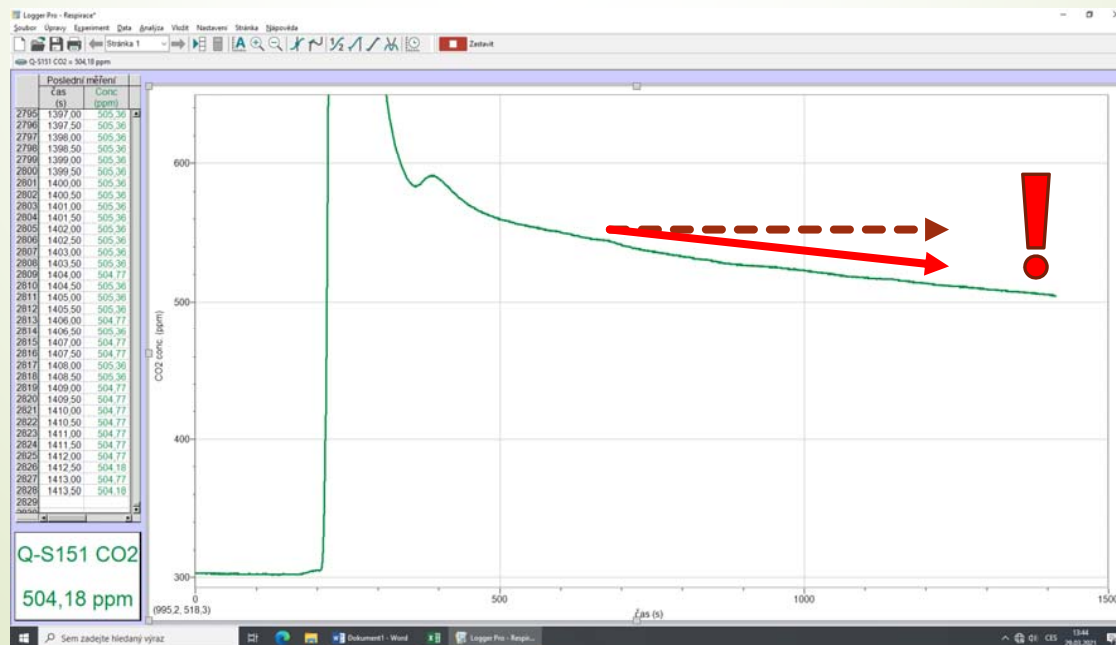
- Zapojit baňku se vzorkem do měřicího okruhu
- Zkontrolovat hodnotu průtoku (optimálně 0.2 L/min)
- Počkat na ustálení signálu z IRGA a odečíst hodnotu koncentrace CO_2



Gazometrické měření rychlosti respirace

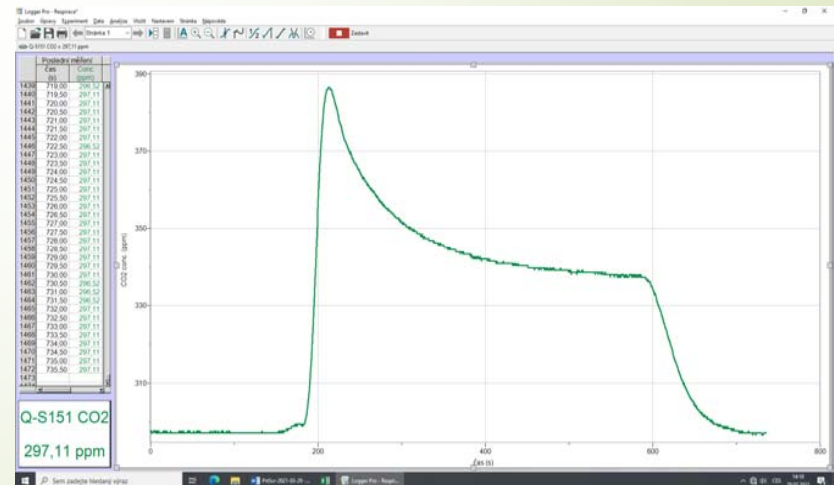
➤ Měření

- Ustalování signálu IRGA trvá obvykle několik (5-10) minut.
- Pokud se hodnota výrazně nemění (o víc než 1-2 ppm) během jedné minuty, lze ji považovat za ustálenou.
- Při odečtu po delší době (10-15 minut) může být hodnota ovlivněna zpomalováním respirace z důvodu vysychání vzorku!!!



Gazometrické měření rychlosti respirace

- Ukončení měření
 - Po odečtu ustálené hodnoty koncentrace CO_2 odečíst také **teplotu vodní lázně** a hodnotu **průtoku vzduchu** v systému
 - Odpojit baňku s rostlinným vzorkem (možno připojit baňku s dalším vzorkem a pokračovat v měření, nebo připojit prázdnou baňku a zopakovat měření referenční hodnoty CO_2)

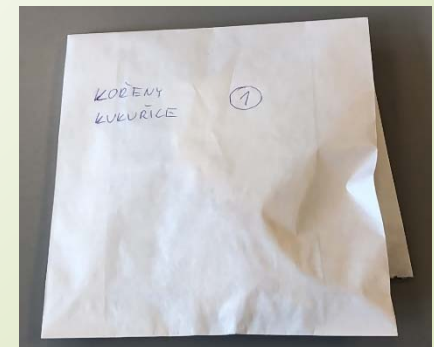
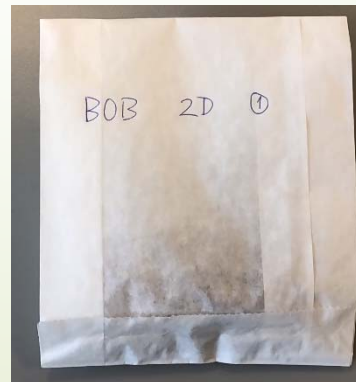


Gazometrické měření rychlosti respirace

- Ukončení měření
 - Vyjmout vzorek z baňky



- Uložit vzorek do označeného papírového sáčku pro usušení (nutno stanovit sušinu)



Gazometrické měření rychlosti respirace

► Výpočet rychlosti respirace

$$\text{► } V_r = (\Delta c(\text{CO}_2) * f * k) / m \quad (\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1})$$

► $\Delta c(\text{CO}_2)$ – rozdíl referenční a ustálené hodnoty koncentrace CO_2 v ppm

► f – průtok (přepočítat z L/min na L/h !!)

► m – hmotnost sušiny vzorku (g)

► k – koeficient pro přepočet koncentrace CO_2 z ppm na látkové množství v závislosti na atmosférickém tlaku a teplotě

$$k = (n/V) = p / (R * T), \text{ kde}$$

p je atmosférický tlak (průměrně 101 kPa),

R je univerzální plynová konstanta ($8,31447 \text{ kPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$),

T je absolutní teplota vodní lázně v době měření ($273,15 \text{ K} + t[^\circ\text{C}]$)