

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра физиологии и биохимии растений

ПРАКТИКУМ ПО
ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
ФОТОСИНТЕЗ

Учебно-методическое пособие

КАЗАНЬ- 2013

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета ФГАОУВПО
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»*

*учебно-методической комиссии Института фундаментальной
медицины и биологии*

Протокол № 1 от 21 марта 2013 г.

заседания кафедры физиологии и биохимии растений

Протокол №2 от 21 марта 2013 г.

Составители:

канд. биол. наук, доцент В.Н. Воробьев

канд. биол. наук, ст. преп. Т.П. Якушенкова

аспирант Г.В. Воробьев

Рецензент

канд. биол. наук, доцент Ю.Ю. Невмержицкая

Практикум по физиологии и биохимии растений. Фотосинтез: Учебно-методическое пособие /В.Н. Воробьев, Т.П. Якушенкова, Г.В. Воробьев. - Казань: Казанский университет, 2013 – 32 с.

Настоящее учебно-методическое пособие является частью содержания практикума по физиологии и биохимии растений, проводимого на кафедре физиологии и биохимии растений. В пособии представлены лабораторные работы по фотосинтезу, проводимые с использованием газоанализатора GFS-3000.

Пособие предназначено для студентов, бакалавров, магистров и аспирантов, изучающих биоэлектрическую активность высших растений.

©Казанский университет, 2013

©Воробьев В.Н., 2013

ФОТОСИНТЕЗ УНИКАЛЬНЫЙ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

Среди многообразия живых организмов на земле, только зеленые растения способны усваивать солнечную энергию и сохранять её в виде потенциальной химической энергии органических соединений, образующихся в процессе фотосинтеза. Фотосинтез является одним из самых замечательных процессов происходящих на нашей планете. Английский физиолог Ф. Блэкман (F.F. Blackman) на основании анализа кривой насыщения фотосинтеза обосновывает его как двухстадийный процесс, включающий фотохимические (световые) процессы и темновые (метаболические) химические реакции. Метаболические варианты фотосинтетической фиксации CO_2 у растений принято классифицировать на C_3 -, C_4 - и САМ-фотосинтез. Образующиеся в темновых реакциях углеводы могут откладываться в виде крахмала в хлоропластах; выходить из хлоропластов и использоваться в образовании нового структурного материала клеток; служить источником энергии для различных метаболических процессов; транспортироваться в запасующие органы растения.

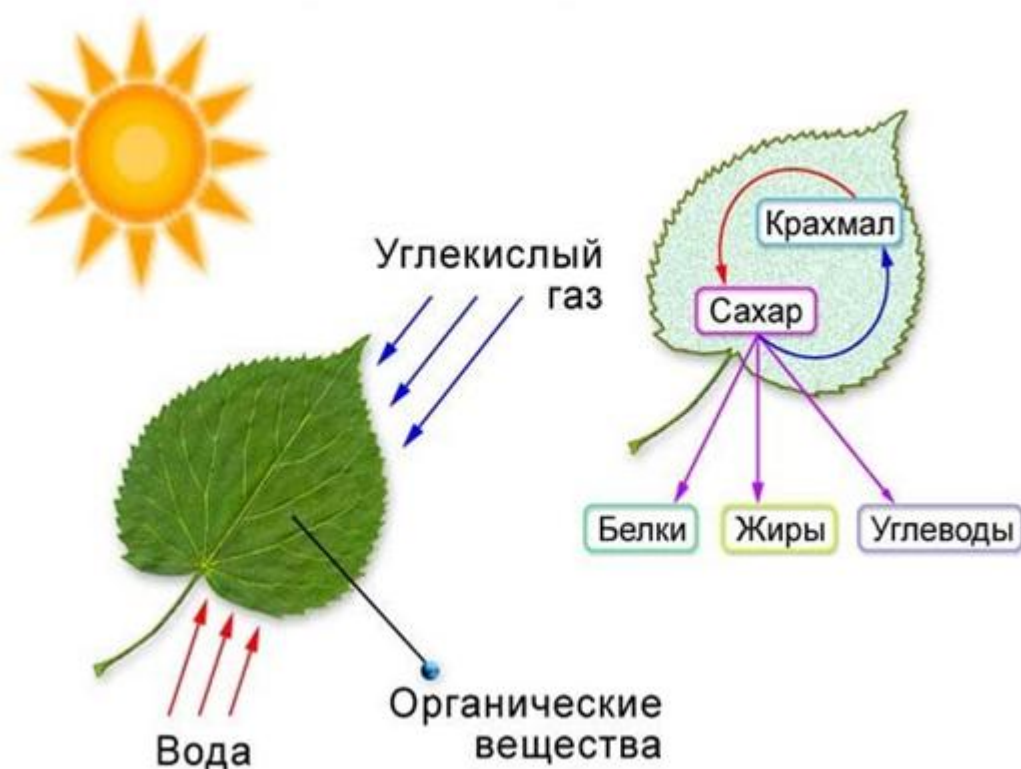


Рис. 1. Схема фотосинтетических процессов.

C₃ - путь фотосинтеза

Восстановительный пентозофосфатный цикл фиксации CO₂ (C₃ - путь, или цикл Кальвина), открытый американскими учеными Э. Бенсоном и М. Калвином в 1950-е годы, универсален и обнаруживается практически у всех автотрофных организмов. В этом цикле фиксация CO₂ осуществляется на пятиуглеродное соединение рибулезобисфосфат при участии фермента рибулезобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (RubisCO). Первым стабильным продуктом являются две молекулы трех углеродного соединения 3-фосфоглицериновой кислоты (3-ФГК), восстанавливаемая затем с использованием АТФ и НАДФН до трехуглеводных сахаров, из которых образуется конечный продукт фотосинтеза — шестиуглеродная глюкоза. Субстратом ключевого фермента фотосинтетической фиксации CO₂ — RubisCO — наряду с CO₂ может быть и O₂. При взаимодействии РубФ с кислородом реализуется гликолатный, или C₂-путь, известный как фотодыхание. Большинство наземных растений осуществляют фотосинтез по C₃ -пути. Типичные представители этой группы — горох, фасоль, конские бобы, шпинат, салат, капуста, пшеница, овес, рожь, ячмень, свекла, подсолнечник, тыква, томаты и другие одно- и двудольные растения.

C₄ - путь фотосинтеза

У некоторых видов растений (в основном тропических и очень небольшого числа видов из умеренных широт) первыми стабильными соединениями при фиксации CO₂ являются четырехуглеродные органические кислоты — яблочная и аспарагиновая. Такие растения отличаются видимым отсутствием фотодыхания (или очень низким уровнем), высокой скоростью фиксации CO₂ в расчете на единицу поверхности листа, более высокой общей фотосинтетической продуктивностью, быстрой скоростью роста. Функционально и анатомически в ткани их листьев выделяют 2 типа фотосинтезирующих клеток — клетки паренхимной обкладки, окружающие проводящие пучки, и клетки мезофилла.

Для всех растений этой группы характерна катализируемая ферментом фосфоенолпируваткарбоксилазой (ФЕП-карбоксилазой) фиксация CO₂ на трехуглеродное соединение фосфоенолпируват (ФЕП) с образованием щавелевоуксусной кислоты, которая далее превращается в яблочную (малат) или аспарагиновую кислоту. Эти реакции протекают в цитоплазме клеток мезофилла листа. C₄ - кислоты затем поступают в клетки обкладки

проводящих пучков, где подвергаются декарбоксилированию, а высвободившаяся CO_2 фиксируется через цикл Кальвина. Следовательно, у C_4 - растений фотосинтетический метаболизм углерода пространственно разделен и осуществляется в клетках различного типа, т. е. по «кооперативному механизму», подробно описанному австралийскими исследователями М. Хетчем и К. Слэком и советским биохимиком Ю. С. Карпиловым в конце 1960-1970 годов.

В соответствии с первичным механизмом декарбоксилирования C_4 - кислот все C_4 -растения подразделяются на три группы. НАДФ-малатдегидрогеназные растения осуществляют декарбоксилирование малата с помощью фермента НАДФ-малатдегидрогеназы в хлоропластах клеток обкладки проводящих пучков. Типичные представители этой группы — кукуруза, сахарный тростник, сорго, росичка кроваво-красная и другие злаки. НАД-малатдегидрогеназные растения осуществляют декарбоксилирование малата с помощью митохондриальной НАД-малатдегидрогеназы. Первичным продуктом фиксации углекислоты у них является аспартат. К типичным представителям этой группы принадлежат различные виды амаранта, портулак огородный, просо обыкновенное, бизонья трава, растущая в прериях Северной Америки и др. Фосфоенолпируват-карбоксикиназные растения осуществляют декарбоксилирование аспартата в цитоплазме клеток обкладки проводящих пучков с образованием ФЕП. Типичные представители — некоторые виды проса, хлориса, бутелуа.

У суккулентных растений, произрастающих в условиях водного дефицита, фиксация CO_2 осуществляется с помощью так называемого САМ-пути (метаболизм кислот по типу растений семейства толстянковых). Первичный продукт фиксации углекислоты (яблочная кислота) образуется у них в темновой период и накапливается в вакуолях клеток листа. В дневное время при закрытых устьицах (которые закрываются для сохранения воды в тканях листа) осуществляется декарбоксилирование этой кислоты, а освобождающаяся CO_2 поступает в цикл Кальвина.

Возникновение C_4 - и САМ-путей фотоассимиляции CO_2 связано с давлением на высшие наземные растения засушливого климата. C_4 -растения хорошо адаптированы к высокой интенсивности света, повышенным температурам и засухе. Оптимальная температура для осуществления фотосинтеза у них выше, чем у C_3 -растений. C_4 -растения наиболее

многочисленны в зонах с высокими температурами. Они более экономно используют воду по сравнению с C_3 -растениями. В настоящее время известно, что все растения с C_4 -фотосинтезом — цветковые (из 19 семейств: 16 — двудольных и 3 — однодольных). Не обнаружено ни одного семейства, которое бы состояло только из C_4 -растений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА

Согласно современным представлениям процесс фотосинтеза включает сложный комплекс разнообразных по природе реакций и поэтому для характеристики интенсивности данного процесса могут быть использованы разные показатели: интенсивность газообмена, энергетическая эффективность фотосинтеза, активность отдельных звеньев фотосинтеза, содержание в хлоропластах различных окислительно-восстановительных систем. В зависимости от целей и задач исследований в настоящее время применяют различные методы исследования, такие как спектрофотометрия, хроматография, полярография, электронная микроскопия, газометрический и т.д. Для характеристики фотосинтетической деятельности растений используется показатель интенсивности фотосинтеза. Интенсивность фотосинтеза можно охарактеризовать несколькими методами

- через количество поглощаемого растением CO_2 ,
- через количество выделяемого растением O_2 ,
- определяя количество синтезируемого растением органического вещества.

Интенсивность и направленность процесса фотосинтеза можно характеризовать накоплением отдельных продуктов фотосинтеза.

Основным методом оценки суммарной интенсивности процесса фотосинтеза являются методы определения газообмена, основанные на учете количества поглощенного углекислого газа или выделенного кислорода. Газообмен определяется как обмен газами между растением и окружающей средой. В этом процессе задействованы многие газы, однако основная роль принадлежит двуокиси углерода, кислороду и водяному пару. Обмен CO_2 и O_2 связан с элементарными процессами фотосинтеза, тогда как испарение воды к водному балансу растений. Термин «газообмен» очень часто обозначает

обмен именно этими тремя газами. Поскольку обмен кислородом и двуокисью углерода эквивалентен, достаточно определить изменение концентрации водяного пара и CO_2 , чтобы измерить газообмен растения. Принцип газометрического определения скорости фотосинтеза заключается в регистрации изменения концентрации CO_2 в потоке газа, проходящего через камеру, герметически отделенную от атмосферы, в которую помещен лист растения. При освещении листа концентрация CO_2 в потоке газа, контактирующего с ним, уменьшается из-за фотосинтетического поглощения углекислоты. Регистрация изменений концентраций CO_2 в потоке газа производится с помощью инфракрасного газоанализатора. Принцип работы инфракрасного газоанализатора основан на том, что большинство газообразных веществ обладают специфическими спектрами поглощения в инфракрасной области. Газ, будучи помещенным в замкнутый объем и освещенным инфракрасным светом нагревается, в результате чего давление внутри замкнутого пространства увеличивается. Это изменение давления может быть зарегистрировано и служит показателем количества ИК – радиации, попавшей на светочувствительный элемент ИКГ, так называемый лучеприёмник. При изменении потока ИК-радиации, поглощенной газом в лучеприемнике, температура, а, следовательно, и давление внутри лучеприемника будут также изменяться. Если интенсивность источника ИК света постоянна, изменение потока ИК падающей на лучеприемник будет связано с изменением в той газовой среде, через которую проходят ИК лучи. Газометрические установки, используемые для определения интенсивности фотосинтеза, различаются по принципу поддержания концентрации углекислоты в листовой камере на установки закрытого и открытого типов. В установках закрытого типа газ, содержащий CO_2 постоянно циркулирует по замкнутому кругу, включающему листовую камеру. Соответственно в процессе освещения листа в газовом контуре концентрация CO_2 постоянно снижается до достижения светового компенсационного пункта. Поэтому при измерениях фотосинтеза в установках закрытого типа фотосинтетический аппарат всегда находится в нестационарных условиях. Этому недостатка лишены установки открытого типа, в которых выбранная концентрация углекислоты поддерживается постоянной на входе листовой камеры в течение всего процесса измерения фотосинтетической активности. Это позволяет исследовать кинетику изменений фотосинтетической активности, как при изменении интенсивности света, так и в стационарных условиях.

Портативная система измерения газообмена GFS – 3000 – очень точная и гибкая система для измерения параметров фотосинтеза и дыхания, применимая во многих областях науки. Она дает возможность моделировать условия окружающей среды в камере или проводить измерения с учетом таких важнейших показателей как освещенность, температура, концентрация CO_2 и H_2O во всем диапазоне, в котором происходит фотосинтез растений

ИЗМЕРЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА НА ПОРТАТИВНОМ ГАЗОАНАЛИЗАТОРЕ GFS – 3000

Переносная система для изучения газообмена и флуоресценции растений

Портативная система для изучения газообмена и флуоресценции растений Walz GFS-3000 является мощным высокоточным инструментом, великолепно адаптированным для работы в полевых условиях, в лаборатории, в вегетационных домиках и в теплицах. Система Walz GFS-3000 обеспечивает полный контроль концентрации углекислого газа, воды, температуры и освещенности объекта, а также контроль вентиляции компартмента с образцом.



В систему GFS-3000 может быть интегрирован ПАМ-флуориметр. Это позволяет одновременно с регистрацией данных по газообмену получать информацию по фотосинтетическим параметрам, проводя измерения интенсивности флуоресценции хлорофилла.

Вместо стандартного источника света на основе комплекса светоизлучающих элементов LED к системе может быть присоединен специальный модуль LED/ПАМ, что даст возможность получать информацию об интенсивности флуоресценции всей поверхности образца (до 8 см² в ячейке).

К системе Walz GFS-3000 может быть присоединен ПАМ-флуориметр IMAGING-ПАМ М (MINI-версия), либо оптоволоконный ПАМ-флуориметр для измерений при естественном освещении. Все полученные данные по

газообмену и флуоресценции сохраняются в едином массиве данных, что упрощает анализ и обработку полученных результатов.

Система Walz GFS-3000 является универсальной, позволяя исследовать фотосинтетический аппарат различных организмов, включая лишайники, мхи и плауны в условиях повышенной влажности, а также образцы, растущие на поверхностях в естественных условиях (например, на камнях и коре деревьев). Система позволяет проводить отдельное изучение верхней и нижней сторон листа. Опционно к системе могут быть присоединены кюветы и компартменты для образцов большого размера. Они предоставляют возможность полного контроля внутреннего микроклимата и позволяют проводить исследования веток и даже целых растений.

Доступные аксессуары

- большой выбор кювет и компартментов для различных образцов (лишайники, мхи, плауны, хвойные, арабидопсис (*Arabidopsis*) и т.д.)
- кюветы и компартменты больших размеров (полный климат-контроль)
- оптоволоконный ПАМ-флуориметр (3050-F)
- интегрированный модуль LED-массив/ПАМ-флуориметр (3055-FL)
- сканирующий флуориметр IMAGING-ПАМ MINI

Инструкция по безопасности

1. Прежде чем приступать к работе внимательно прочитайте инструкцию по эксплуатации.
2. Прибор оснащен источником света высокой интенсивности, который может причинить вред зрению. **Не смотрите прямо на источник света!**
3. Защищайте прибор от воздействия воды и сырости.
4. Защищайте прибор от воздействия пыли, песка и грязи.
5. Обеспечивайте достаточную вентиляцию прибора.

6. Следите, что бы внутрь прибора не попадала вода и другие инородные предметы.

Обзор компонентов системы

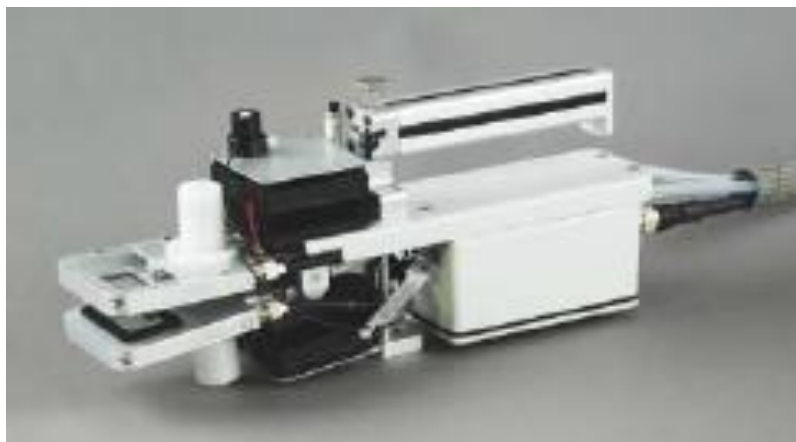


Рис. 2. Основные компоненты GFS-3000 или GFS-3000FL.

Обозначения:

1. Блок управления 3100-C
2. Стандартная измерительная головка 3010-S
3. Светодиодный источник света 3040-L (для GFS-3000) или светодиодный РАМ-флуориметр 3055-FL (для GFS-3000FL).
4. Источник питания 3020-N
5. Li-ионная батарея 3025-A
6. Зарядное устройство для Li-ионной батареи LC-03.
7. Листовой адаптер.
8. Кюветы для арабидопсиса, хвойных или лишайников/мхов (опционально).

Стандартная измерительная головка 3010-S



Универсальная измерительная головка характеризуется объемом кюветы 40 мл, широким температурным диапазоном и эффективной вентиляцией. Отсоединяемый электронный блок для использования других кювет. Верхняя и нижняя половины кюветы имеют каждая отдельный вентилятор. заменяемые адаптеры под различные площади листа. Кювета, расширяемая до различных объемов и форм (цилиндр либо куб) для измерений образцов мхов, лишайников и хвойных. разъемы для подключения светодиодного источника света 3040-L или дополнительного компонента (например светодиодного массива/РАМ-флуориметра 3055-FL).

Светодиодный источник света 3040-L



Включает 24 красных и 2 синих светодиода, вентилятор для охлаждения светодиодов, электронные модули для управления количеством синего света, контакты для подключения к верхней или нижней части кюветы.

Светодиодный источник является источником света высокой интенсивности, который может причинить вред зрению.

Не смотрите прямо на источник света!

Описание работы воздушной схемы и составляющие ее компоненты

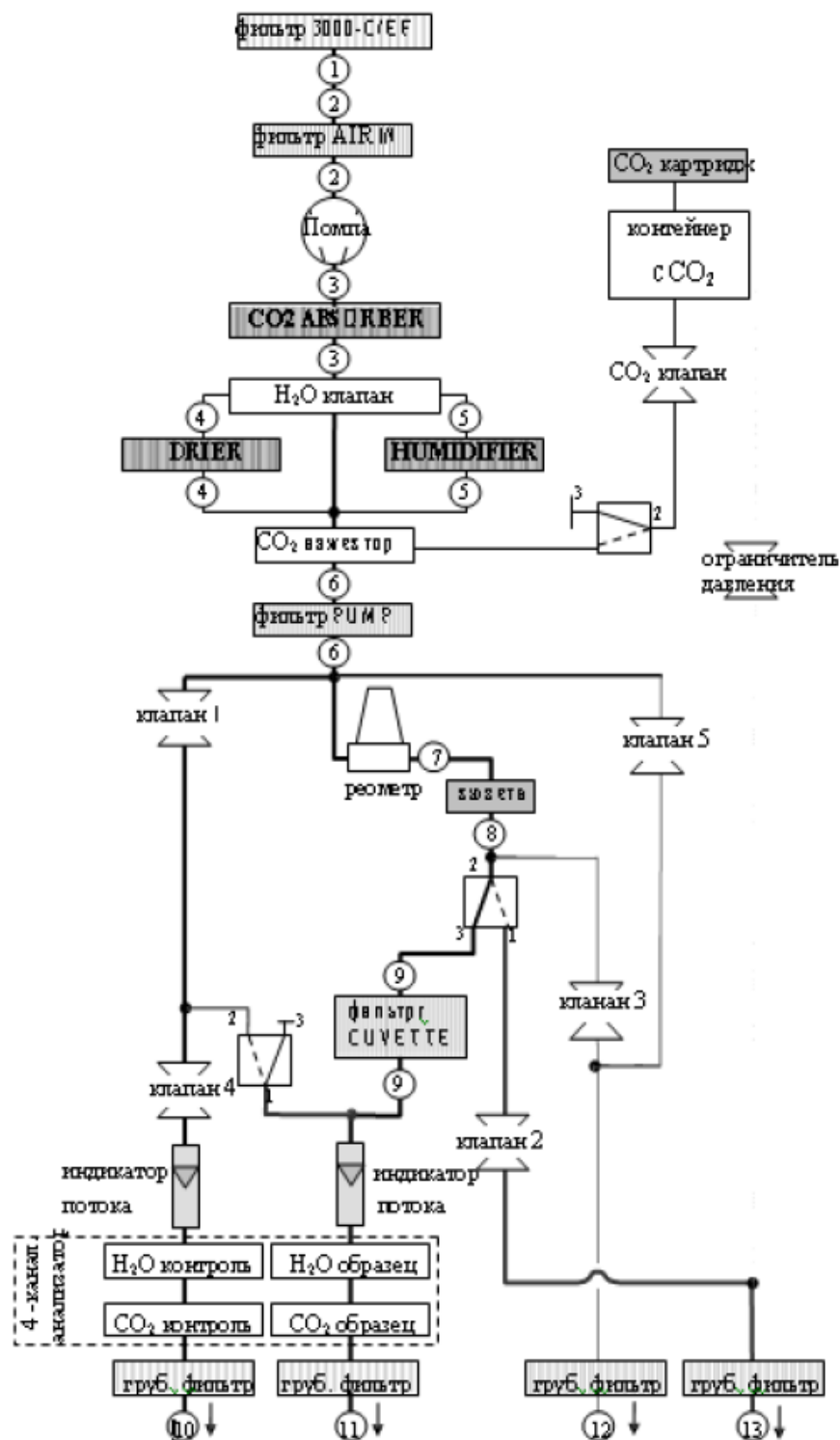




Рис. 3. Воздушная система GFS-3000

 Серый или заштрихованный прямоугольник: элемент подключается к фронтальной стороне блока управления.

 Белый фон: элемент находится внутри блока управления.

 Соленоидный клапан (сплошная линия показывает отключенное состояние)

- Воздушный патрубок на фронтальной стороне блока управления 3000-С и 3100-С.

Нумерация:

1. Воздушный патрубок “AIR IN”
2. 2 воздушных патрубка “FILTERS”/ “AIR IN”
3. 2 воздушных патрубка “CO₂ ABSORBER”
4. 2 воздушных патрубка “DRIER”
5. 2 воздушных патрубка “HUMIDIFIER”
6. 2 воздушных патрубка “FILTERS”/ “PUMP”
7. Воздушный патрубок “CUVETTE”/ “TO”
8. Воздушный патрубок “CUVETTE”/ “FROM”
9. 2 воздушных патрубка “FILTERS”/ “CUVETTE”
10. Воздушный патрубок “ANALYSER”/ ”REF”
11. Воздушный патрубок “ANALYSER”/ “SAMPLE”
12. Воздушный патрубок “SAMPLE”
13. Воздушный патрубок “VENT”

- Всасываемый воздух проходит через фильтр грубой очистки «3000-С-ЕF», который удаляет различные механические частицы, мелких насекомых и снижает шум работающей помпы.

- Фильтр подсоединен к воздушному патрубку “Air IN”
- Фильтр тонкой очистки подсоединен к патрубку “FILTERS”/”AIR IN”, удаляет из входящего воздуха мелкие частицы.
- Воздушная помпа прокачивает воздух по системе. Помпа регулируемая, по этому выставленные в настройках параметры потока соответствуют измеренным реометром значениям.
- В системе помпа установлена после поглотителя CO₂, который удаляет из входящего воздуха весь CO₂. При проведении измерений с окружающим воздухом система контроля CO₂ должна быть отключена и поглотительная трубка “CO₂ ABSORBER” должна быть заменена на смесительную емкость, 40 мл 3000-C/MV. Кроме того, необходимо подсоединить 10 л емкость из набора для наружных измерений.
- CO₂ или наружный воздух далее проходит через систему контроля H₂O. Если эксперимент должен проводиться с окружающим воздухом, то контроль должен быть отключен. В этом случае воздух прямо проходит через контрольный клапан H₂O без прохождения через осушитель или увлажнитель. При этом если не подсоединен поглотитель CO₂, то воздух будет иметь влажность, соответствующую влажности наружного воздуха. Если система контроля H₂O включена, то воздух частично проходит через осушитель или увлажнитель, таким образом влажность измеренная в контрольной ячейке анализатора (H₂Oabs), будет соответствовать установленным значениям.
- CO₂-инжектор. Если система контроля CO₂ выключена, поступление CO₂ в систему перекрыто соленоидным клапаном. При включении системы контроля CO₂ в воздух будет добавляться чистый CO₂ через термоклапан, таким образом концентрация CO₂ измеренная в контрольной ячейке анализатора (CO₂abs), будет соответствовать установленным значениям. Обычно для контроля концентрации CO₂ используются CO₂-картриджи.
- Фильтр тонкой очистки подсоединен к патрубку “FILTERS”/”PUMP” удаляет из воздуха пыль, попавшую в систему

из помпы или трубок с поглотителями. Фильтр находится на конце смесительной части воздушной системы. Далее воздушная смесь попадает в анализирующую часть системы.

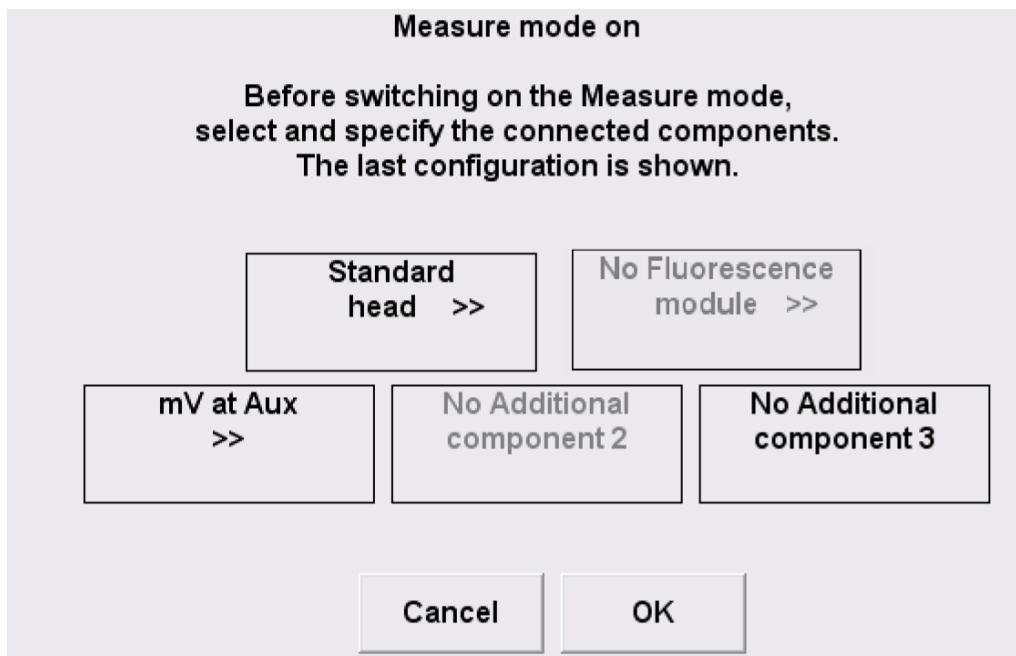
- После очистки воздушный поток разделяется на контрольный и измерительный газ.
- Далее в системе установлены два соленоидных клапана. На схеме клапаны показаны в выключенной позиции.
- Газоанализатор имеет 4 ячейки и измеряет в двух из них абсолютную молярную фракцию CO_2 и в двух других - абсолютную молярную фракцию H_2O .
- Контрольный газ проходит через клапаны 1 и 4 и индикатор скорости потока. Затем контрольный газ проходит через ячейки “ H_2O контроль” и “ CO_2 контроль” анализатора. Измеренные значения используются для контроля концентрации H_2O и CO_2 . Еще один фильтр тонкой очистки установлен на выходе контрольного газа из системы на выходном патрубке “ANALIZER”/”REF”.
- Измерительный газ проходит через электронный измеритель скорости потока (реометр). Измеренные значения используются для контроля скорости потока в замкнутой системе регулирования. Далее измерительный газ проходит через кювету образца, подсоединенную к патрубкам “CUVETTE”/”TO” и “CUVETTE”/”FROM”. После чего соленоидный клапан, который в выключенной позиции направляет газ через фильтр “FILTERS”/”CUVETTE”. Фильтр служит для удаления примесей попавших в кюветы, например спор или пыли. Затем установлен механический индикатор скорости потока. В случае если через кювету не будет проходить газ, показания индикатора будут снижаться. Измерительный газ проходит через ячейки “ H_2O образец” и “ CO_2 образец” анализатора. Измеренные абсолютные значения ($\text{H}_2\text{O}_{\text{sam}}$ и CO_2_{sam}) не отображаются на дисплее, кроме как во время калибровки системы. Из полученных концентраций H_2O и CO_2 вычисляется разница между контролем и образцом ($d\text{H}_2\text{O}$ и $d\text{CO}_2$) и данные сохраняются в памяти прибора.

- Клапан 5 должен быть открыт при низкой скорости потока воздуха для увеличения скорости в смешивающей части. Клапан 3 определяет скорость потока воздуха из кюветы через анализатор. Он открывается при высокой скорости потока.

Включение и работа газоанализатора GFS – 3000



- Нажмите, не удерживая, тумблер питания на блоке. Индикатор состояния загорится желтым/оранжевым светом и будет мигать во время запуска системы. Запуск помпы будет слышен.
- Программа GFS-Win запустится автоматически, дождитесь завершения загрузки.
- После завершения загрузки появится следующее окно, выберите измерительную головку и сопутствующие модули.



Если в поле **Standard head** написано  нажимайте на это поле до появления надписи **Standard head**.

Нажмите кнопку ОК.

После завершения всех необходимых тестов на экране появится следующее окно.



Газоанализатор включен.

Внимание! После перехода в режим измерений MP прибор должен достигнуть постоянной температуры (прогрев газоанализатора). Обычно значения стабилизируются в течении 15 минут.

Начало измерения.

Настройки для измерения газообмена с примарными значениями

Параметр	Режим (единицы)	Значение
имя файла (8 символов)		тест
площадь/вес	*area (см ²) weight (мг)	8
скорость вентилятора	(уровни)	7
свет	*PARtop PARbot (мкмоль/м ² с) PARamb	1000
температурный контроль	follow Tamb *Tcuv (°C) Tleaf	25
скорость потока	(мкмоль/мин)	750
CO ₂	*off (поглотитель удален) значение (необходим CO ₂ картридж и поглотитель)	
H ₂ O (осушитель и увлажнитель могут нуждаться в продувке чистым CO ₂ , без наружного воздуха)	без контроля (внешняя) * ppm (мг/м ³) rh (% , тркбует установки Tcuv)	20000
Интервал, время продувки	(с)	60
Интервал: усреднение и время измерений	(с)	005/060

Перед началом работы всегда нужно устанавливать нулевые точки, поскольку значения параметров газообмена в режиме МР зависят от нулевых значений ZP. Рекомендуется повторять калибровку (установку нулевых точек) через каждый час работы или после изменения значений CO₂ и H₂O, рекомендуется устанавливать нулевые точки ZP_i. Калибровка в режиме ZP_c точнее, но может проводиться только в ручном режиме путем нажатия на кнопку и при отсутствии образца в кювете.

- Нажмите на кнопку  откроется стандартное для системы Windows окно сохранения файла.

После нажатия на кнопку ОК откроется окно с выбором расчета эксперимента:


A – по площади образца.

W – по массе образца.

Выбрав соответствующее для вашего эксперимента значение, нажмите кнопку ОК.

В окне 

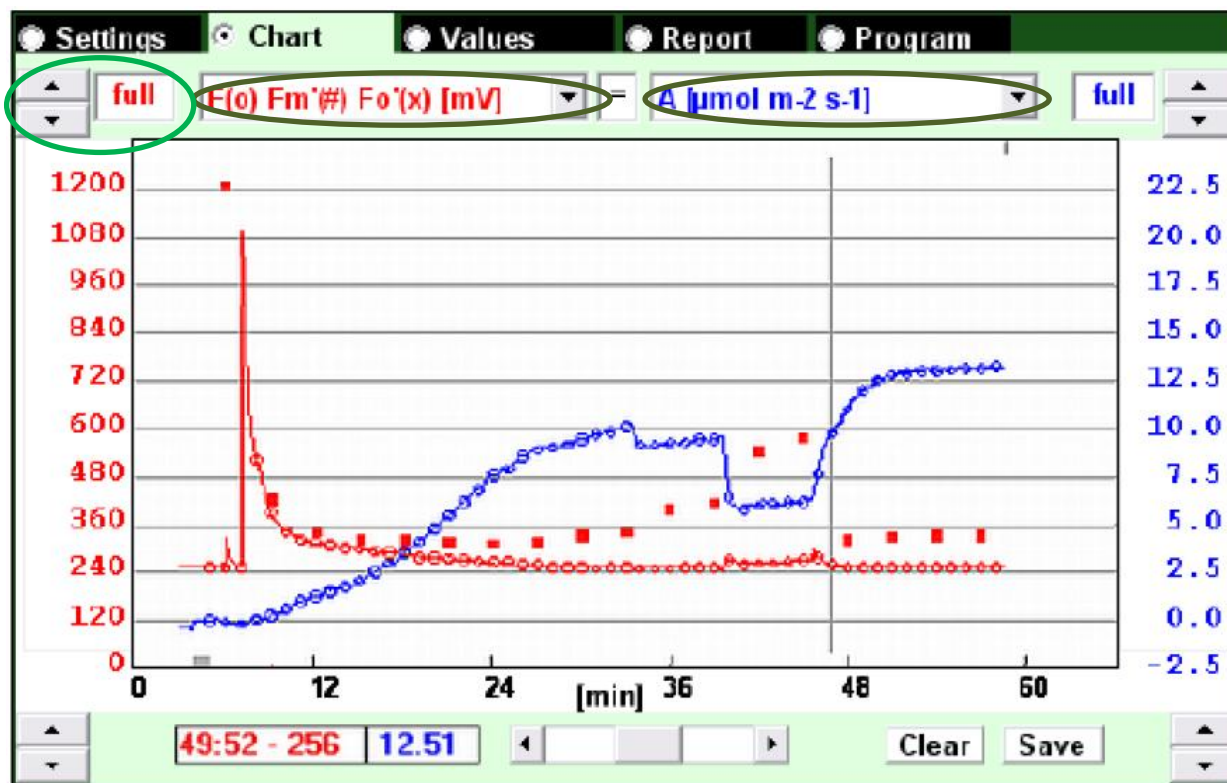
выберите соответствующую программу для вашего эксперимента.

- Для запуска программы нажмите кнопку  далее следуйте указаниям программы.

Для мониторинга эксперимента перейдите во вкладку Chart.



Окно Chart:



Во всплывающих вкладках выберите соответствующие показатели для просмотра.



кнопка позволяет масштабировать график.

Проведение эксперимента без использования программы.

- Нажмите на кнопку  откроется стандартное для системы Windows окно сохранения файла.

После нажатия на кнопку ОК откроется окно с выбором расчета эксперимента:

A – по площади образца. **W** – по массе образца.

Выберете соответствующее для вашего эксперимента значение, нажмите кнопку ОК.

- В основном окне программы выберите соответствующие значения параметров работы газоанализатора:

Flow 0
CO2 off
H2OMode off
SetValue xxx

-Flow – значение скорости потока воздуха (станд. 750 мкмоль/с)

-CO2 controloff – измерение с окружающим воздухом, в этом случае поглотитель CO2 заменяется на смесительную трубку.

-CO2 control от 0 до 2000 ppm – регуляция концентрации CO2.

-H2O Mode off – контроль влажности отключен.

-H2O Mode absolute – установка концентрации в ppm.

Итоговая влажность зависит от температуры в кювете.

-H2O Mode relative humidity – установка относительной влажности в %. Контроль температуры TempMode должен быть установлен в режиме Tscuv. (контролируется относительная влажность входящего в кювету воздуха).

-H2O Mode Completelydry – сухой воздух, воздух пропускается через осушитель.

Impeller 0
Light Mode PARtop
Light 0
TempMode off
SetValue xxx

- Impeller – скорость работы вентилятора для охлаждения кюветы.

- Используйте Light Mode PARtop.

- Temp Mode Off – нет контроля температуры.

- Temp Mode Setcuvettetemperature – температура кюветы поддерживается на постоянном заданном уровне.

- Temp Mod Setleaftemperature – температура листа поддерживается на постоянном заданном уровне.

- Set Value – значение температуры.

Для мониторинга хода эксперимента перейдите в окно Chart.

- Измерьте StoreZPcuv с пустой кюветой или Store ZPiga с кюветой в которой находится образец, нажатием на соответствующие кнопки.



Обработка результатов.

После завершения эксперимента для пересчета площади/массы образца перейдите на вкладку **Report**.

Recalc. file		New leaf area		New weight		Delete last line		Font +/-	
VPD Pa/kPa	GH2O mmol	A $\mu\text{mol m}^{-2}$	ci ppm	ca ppm	wa ppm	Fo mV	Fm mV	Fv.Fm	n
14.24	70.3	-0.21	56.3	52.8	18156	185	232	0.203	180
14.15	74.8	1.18	67.7	94.1	18219	185	232	0.203	181
14.15	75.4	1.28	70.3	98.7	18213	185	232	0.203	181
14.19	74.8	3.97	111.0	197.2	18205	185	232	0.203	179
14.20	74.1	3.93	111.0	197.1	18199	185	232	0.203	181
14.20	71.7	5.97	141.9	276.3	18166	185	232	0.203	183
14.23	71.2	5.93	141.1	275.8	18157	185	232	0.203	184
14.24	69.6	8.32	179.4	372.0	18146	185	232	0.203	188
14.29	69.1	8.27	178.7	371.5	18124	185	232	0.203	188
14.31	67.1	15.44	312.1	602.3	18095	185	232	0.203	209
14.31	66.3	15.28	312.0	682.5	18096	185	232	0.203	211
14.34	62.1	19.37	475.1	978.0	18049	185	232	0.203	224
14.40	60.9	19.19	470.3	977.9	18016	185	232	0.203	226

-Нажмите кнопку **New leaf area/weight**, в появившемся окне выберите номер образца для пересчёта, а в следующем окне новые значения массы/площади.

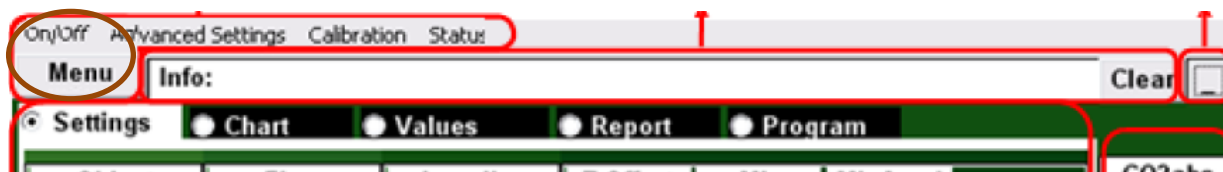
-После завершения пересчета нажмите кнопку **Recalc. file** произойдет перезапись файла.

Копирование данных на карту памяти.

- Подключите USB устройство.
- Сверните программу GFS -3000.
- Далее Пуск -> Мои документы ->GFS – 3000. Найдите необходимый файл (если вы производили пересчет, то существуют 2 файла с необходимым названием). Долгое нажатие на необходимый файл вызовет всплывающее меню, в котором выберите пункт Copy.
- Пуск -> Мой компьютер -> Ваше USB устройство. Долгое нажатие на свободном месте открытого окна вызовет всплывающее меню, выберете пункт Insert.

Выключение газоанализатора.

Для выключения или перехода в спящий режим нажмите кнопку Menu ->On/Off



Откроется окно выключения газоанализатора.



- Power off – полное выключение газоанализатора.
- Measure Mode off/Exit GFS-Win - Не использовать!
- Standby – спящий режим.
- Show Desktop + Taskbar – свернуть программу GFS Win.

Интенсивность транспирации (E)

В соответствии с von Caemmerer и Farquhar (1981) интенсивность транспирации рассчитывается как:

$$(1) E = \frac{u_e * (w_o - w_e)}{LA * (1 - w_o)}$$

где:

E – интенсивность транспирации, моль/м²·с,

u_e – скорость потока воздуха на входе в кювету образца, мкмоль/с,

w_o – молярная фракция H₂O на выходе из кюветы, ppm (мг/м³),

w_e – молярная фракция H₂O на входе в кювету, ppm (мг/м³),

LA – площадь листа, м².

ppm = частей на миллион (x0,000001).

Переменные в уравнении (1) соотносятся с параметрами, измеряемыми системой GFS-3000, как:

$$(2) u_e = Flow \text{ (скорость потока воздуха)}$$

$$(3) w_o - w_e = dH2OMP - dH2OZP$$

$$(4) w_o = wa$$

$$(5) LA = Area \text{ (площадь листа)}$$

Используя параметры, измеряемые GFS-3000, и уравнения (1) - (5), интенсивность транспирации (E) может быть рассчитана как:

$$(6) E = \frac{Flow * (dH2OMP - dH2OZP)}{Area * (1 - wa)}$$

Интенсивность ассимиляции CO₂ (A)

В соответствии с von Caemmerer и Farquhar (1981) скорость ассимиляции CO₂ (A) рассчитывается как:

$$(7) A = \frac{u_e * (c_e - c_o)}{LA} - E * c_o,$$

где:

A – скорость ассимиляции CO_2 , $\text{мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$,

u_e – скорость потока воздуха на входе в кювету образца, мкмоль/с ,

c_o – молярная фракция CO_2 на выходе из кюветы, ppm,

c_e – молярная фракция CO_2 на входе в кювету, ppm,

LA – площадь листа, м^2 ,

E – интенсивность транспирации, $\text{ммоль/м}^2 \cdot \text{с}$.

Переменные в уравнении (7) соотносятся с параметрами, измеряемыми GFS-3000, как:

$u_e = Flow$ (скорость потока воздуха)

$c_e - c_o = d\text{CO}_2\text{ZP} - d\text{CO}_2\text{MP}$

$c_o = ca$

$LA = Area$ (площадь листа)

Используя параметры, измеряемые GFS-3000, уравнения (12) – (16) и уравнение (6), скорость ассимиляции CO_2 (A) может быть рассчитана как:

$$A = \frac{Flow * (d\text{CO}_2\text{ZP} - d\text{CO}_2\text{MP})}{Area} - E * ca$$

№ 1. Зависимость интенсивности фотосинтеза от освещенности листьев.

Процесс фотосинтеза протекает за счет световой энергии, поглощаемой пигментами листа, поэтому его интенсивность зависит от интенсивности падающего на лист света, точнее, от интенсивности фотосинтетически активной радиации. Если графически выразить зависимость фотосинтеза (ордината) от освещенности (абсцисса), то мы получим так называемую «световую кривую», или «кривую насыщения», гиперболической формы. Световые кривые фотосинтеза впервые были получены в 1884 г. К. А. Тимирязевым. При небольшой силе излучения интенсивность фотосинтеза пропорциональна фотонному потоку, пока остальные факторы не являются лимитирующими. Это верно и при более высокой интенсивности света,

поэтому график зависимости наблюдаемого фотосинтеза от интенсивности света идет линейно до тех пор, пока наконец, в результате дальнейшего повышения интенсивности света интенсивность фотосинтеза больше не увеличивается (наступает *фотонасыщение*) Как правило, в такой ситуации лимитирующим фактором служит обеспечение растений CO_2 . Область фотонасыщения для растений, приспособленных к солнечным местам обитания, располагается в пределах от 500-1500 $\text{мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, у теневыносливых растений – в пределах от 100-500 $\text{мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ (кривая фотосинтеза выходит на плато). У C_4 – растений в отличие от C_3 фотонасыщение не происходит даже при интенсивном освещении вследствие более эффективного снабжения CO_2 цикла Кальвина. При еще более сильном освещении фотосинтетический аппарат может повреждаться, так что активность фотосинтеза снова падает. В естественных условиях это может произойти в том случае, если растения, адаптированные к условиям затенения, подвергнутся внезапному освещению солнечными лучами, особенно при низкой температуре, когда ферментные реакции фиксации CO_2 замедлены. Интенсивность света, при которой потребление CO_2 (соответственно выработка O_2) полностью компенсируется выработкой CO_2 при митохондриальном дыхании (соответственно поглощением O_2), называется *точкой световой компенсации* при этом нетто-фотосинтез равен нулю. В «солнечных» листьях (соответственно у светолюбивых растений) точка световой компенсации составляет около 10-15 $\text{мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, в теневых листьях (у теневыносливых растений) – около 1-10 $\text{мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

Цель работы: выявить зависимость интенсивности фотосинтеза от интенсивности света.

Материалы и оборудование: газоанализатор.

Растения: Пшеница (*Triticum aestivum*), Кукуруза (*Zea mays*)

Ход работы

Выбирается здоровое растение с достаточно большим листом, который займет всю площадь кюветы газоанализатора. Предварительно включив газоанализатор и убедившись, что на панель быстрого просмотра выводится информация (dCO_2 , А; изменить можно нажатием и последующим выбором нужного параметра) устанавливаем образец в ячейку газоанализатора.

Устанавливаем значение:

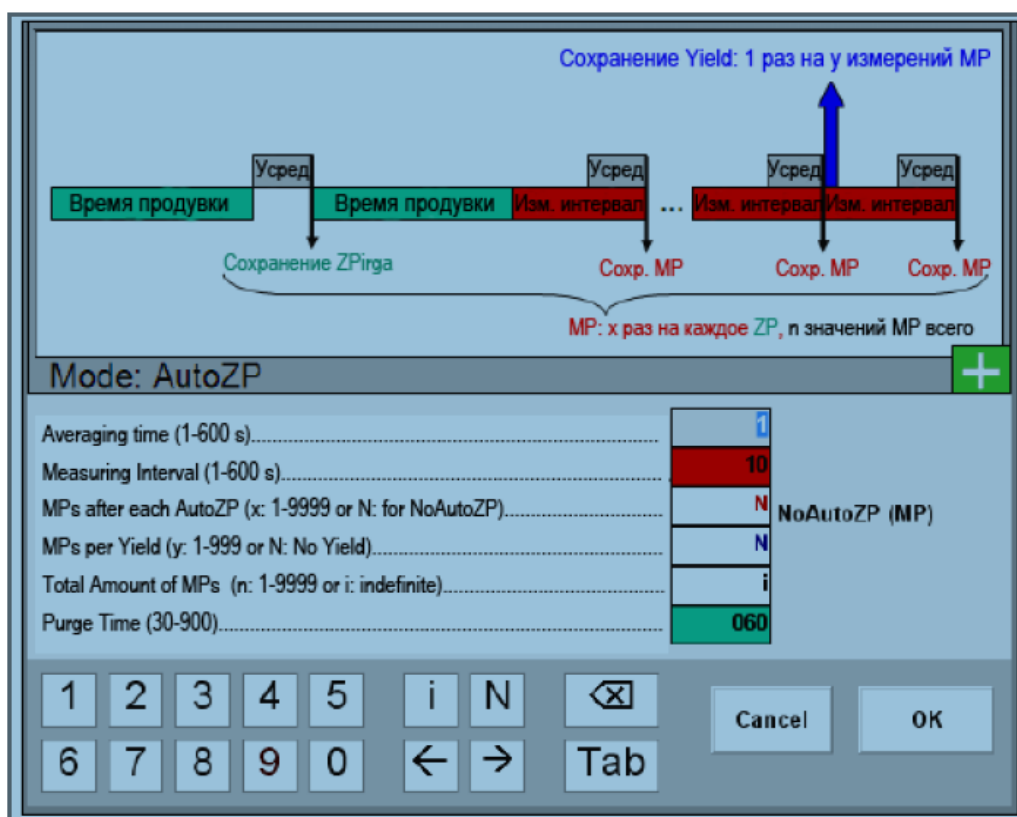
Flow = 750;

H2O Mode = 140000;

Impeller = 5;

Нажимаем на поле Filename в открывшемся окне вводим имя лаб. работы и сохраняем файл. Убеждаемся, что в поле Interval равно 001/001 если нет вносим необходимые изменения (*изменить если необходимо поля Averaging time=1, Measuring interval =1*).

Нажатием на кнопку Store ZPiga дождаемся завершения продувки и записи контрольной точки в поле Records значение увеличится на 1.



Устанавливаем значение Light = 500, засекаем 10 минут и по пришествию этого времени нажимаем кнопку Store MP, а с панели быстрого просмотра записываем в таблицу 1 значения dCO2 и A. То же самое проделываем с Light = 1000 и Light = 1500.

	Light = 500	Light = 1000	Light = 1500
dCO ₂			
A			

Задание: Описать ход работы; внести данные в таблицу 1; схематично построить график исходя из полученных значений; сделать выводы.

№ 2. Зависимость интенсивности фотосинтеза от концентрации CO₂.

Фотосинтез это — процесс образования органического вещества из углекислого газа и воды на свету при участии фотосинтетических пигментов. Поэтому интенсивность фотосинтеза напрямую зависит от концентрации CO₂. Концентрация CO₂ в атмосфере в 2000 г. составила 370 ppm (0,037 % по объему); за последние 40 лет она возросла в среднем на 1ppm в год. Это связано, прежде всего, с деятельностью человека: сжигаются ископаемые резервы углерода. Из-за повышенной концентрации атмосфера поглощает длинноволновое излучение в больших количествах. У C₃ – растений фотосинтез при полной инсоляции должен, предположительно, лимитироваться количеством доступного диоксида углерода. Путем повышения концентрации CO₂ в среде можно при прочих равных условиях добиться повышения фотосинтетической активности у этих растений. У C₄ - растений насыщение фотосинтетической активности наступает при более низкой концентрации около (около 0,02%), чем среднее содержание CO₂ в атмосфере. Это делается при использовании метода «CO₂ –удобрения» тепличных культур. Концентрацию CO₂ в теплицах с огурцами и томатами повышают на 0,1% и соответственно урожай возрастает на треть в сезон при условии, что остальные питательные вещества и свет присутствуют в достаточном количестве.

Цель работы: выявить зависимость интенсивности фотосинтеза от концентрации CO₂.

Материалы и оборудование: газоанализатор.

Растения: пшеницы, кукурузы

Ход работы

Выбирается здоровое растение с достаточно большим листом, который займет всю площадь кюветы газоанализатора. Предварительно включив газоанализатор и убедившись, что на панель быстрого просмотра выводится информация (А; изменить можно нажатием и последующим выбором нужного параметра) устанавливаем образец в ячейку газоанализатора.

Устанавливаем значение:

Flow = 750;

H2O Mode = 140000;

Impeller = 5;

Light = 1000;

Нажимаем на поле Filename в открывшемся окне вводим имя лаб. работы и сохраняем файл. Убеждаемся, что в поле Interval равно 001/001 если нет вносим необходимые изменения (см. № 1).

Нажатием на кнопку Store ZPiga дождаемся завершения продувки, и записи контрольной точки в поле Records значение увеличится на 1.

Устанавливаем значение $\text{CO}_2 = 500$, засекаем 10 минут и по пришествию этого времени нажимаем кнопку Store MP, а с панели быстрого просмотра записываем в таблицу 1 значения А. То же самое проделываем с $\text{CO}_2 = 1000$; $\text{CO}_2 = 1500$; $\text{CO}_2 = 2000$.

	$\text{CO}_2 = 500$	$\text{CO}_2 = 1000$	$\text{CO}_2 = 1500$	$\text{CO}_2 = 2000$
А				

Задание: Описать ход работы; внести данные в таблицу 1; схематично построить график исходя из полученных значений; сделать выводы.

№ 3. Зависимость интенсивности фотосинтеза от температуры образца.

При высокой освещенности скорость фотосинтеза определяется протеканием темновых реакций. В этом случае влияние температуры проявляется очень отчетливо и температурный коэффициент Q_{10} может быть около двух. Так, для подсолнечника повышение температуры в интервале от 9 до 19°C увеличивает интенсивность фотосинтеза в 2,5 раза. Температурные пределы, в которых возможно осуществление процессов фотосинтеза, различны для разных растений. Понижение температуры влияет на фотосинтез прямо, уменьшая активность ферментов, участвующих в темновых реакциях, и косвенно, благодаря повреждению органелл. Минимальная температура для фотосинтеза растений средней полосы около 0°C, для тропических растений 5—10°C. При низкой интенсивности освещения (лимитирующий фактор – свет) фотосинтез зависит от температуры меньше, чем при высокой интенсивности (лимитирующий фактор - CO_2) При повышающейся температуре растущая фотосинтетическая активность отражает прежде всего высокую скорость ферментативных реакций. С другой стороны, идущая на убыль активность фотосинтеза при температуре выше оптимума имеет сложную природу: хотя вместе с температурой повышается активность определяющего скорость реакции фермента RubisCO, его сродство к CO_2 снижается; одновременно при высокой температуре CO_2 растворяется в воде хуже относительно O_2 , т.е. фотодыхание с повышением температуры активизируется. Таким образом, продуктивность нетто-фотосинтеза уменьшается. При сильно высоких температурах фотосинтетический аппарат разрушается вследствие инактивации ферментов и повреждения мембран.

Цель работы: выявить зависимость интенсивности фотосинтеза от температуры.

Материалы и оборудование: газоанализатор.

Растения: пшеница озимая и яровая, кукуруза.

Ход работы

Выбирается здоровое растение с достаточно большим листом, который займет всю площадь кюветы газоанализатора. Предварительно включив газоанализатор и убедившись, что на панель быстрого просмотра выводиться информация (А; изменить можно нажатием и последующим выбором нужного параметра) устанавливаем образец в ячейку газоанализатора.

Устанавливаем значение:

Flow = 750;

H2O Mode = 140000;

Impeller = 5;

Light = 1500 (max значение параметра для вашего образца из предыдущих опытов);

CO2 = 1000 (наилучшее значение параметра из предыдущих опытов)

Нажимаем на поле Filename в открывшемся окне вводим имя лаб. работы и сохраняем файл. Убеждаемся, что в поле Interval равно 001/001 если нет вносим необходимые изменения (см. № 1).

Нажатием на кнопку Store ZPiga дожидаемся завершения продувки, и записи контрольной точки в поле Records значение увеличится на 1.

Устанавливаем Temp Mod в Set leaf temperature (*Temp Mod = Setleaftemperature – температура листа поддерживается на постоянном заданном уровне.*). Задаем значение Temp Mod = 10 °C, дожидаемся установления заданной температуры, после чего засекаем 10 минут и по прошествии этого времени нажимаем кнопку Store MP, а с панели быстрого просмотра записываем в таблицу значения A. То же самое проделываем с Temp Mod = 20 °C; Temp Mod = 28 °C.

	Temp Mod = 10 °C	Temp Mod = 20 °C	Temp Mod = 28 °C
A			

Задание: Описать ход работы; внести данные в таблицу 1; схематично построить график исходя из полученных значений; сделать выводы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу: Учеб. пособие для студ. вузов. / Под ред. И.П. Ермакова.- М.: Академия, 2003.-256с.

Бухов Н.Г. Динамическая световая регуляция фотосинтеза// Физиология растений.-2004.-Т.51, №6. – С.825-837.

Карпухин Л.Т. Применение инфракрасного газоанализатора для изучения CO_2 – газообмена растений// в кн.: Биофизические методы в физиологии растений – М: Наука,1971.- 44 с.

Эдвардс Дж. Фотосинтез C_3 и C_4 растений: механизмы и регуляция.- М.:Мир,1986.- 598 с.

Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф. Фотосинтез: Физиолого-экологические и биохимические аспекты – М: МГУ, 1992.- 318 с.

Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В. Ботаника. Физиология растений.- М: Академия, 2008.- 496 с.

Медведев С.С. Физиология растений – СПб.: С.Петербург. ун-та, 2004.- 336 с.

Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений. - М.: Логос, 2001. - 224 с.

van Caemmerer S., Farquhar G.D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas-exchange of leaves // Planta. – 1981. – № 153. – P. 376 – 387.