

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Využití diskriminace izotopu uhlíku ve fyziologii rostlin
a šlechtění**

Bakalářská práce

Autor práce: Anna Vaniščáková

Obor studia: Pěstování rostlin

Vedoucí práce: doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití diskriminace izotopu uhlíku ve fyziologii rostlin a šlechtění" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. dubna 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala významné řadě osob, které mne na cestě za dokončením Bakalářské práce vedli a provázeli: Za neskutečnou trpělivost a shovívavost docentu Ing. Františku Hnilíčkoví, Ph.D., Ing. Brigitě Zámečnickové, Ph.D., Ing. Jirímu Zámečnickovi Csc., Ing. Haně Vodičkové a za totéž spojené s opatrným manévrováním všem členům mé rodiny, zvlášt Mgr. et Mgr. Kláře Černé za faktické poznámky a instrukce.

Využití diskriminace izotopu uhlíku ve fyziologii rostlin a šlechtění

Souhrn

Izotop ^{13}C se v porovnání s běžněji se vyskytujícím izotopem ^{12}C v atmosféře nachází ve stopovém množství (1,1 %). Izotopy uhlíku ^{12}C a ^{13}C jsou přijímány rostlinami s odlišnými metabolickými drahami C_3 , C_4 a CAM (crassulacean acid metabolism) rozdílně, na základě jejich ochoty pracovat s těžším izotopem ^{13}C . V případě rostlin C_3 cyklu fotosyntézy je příjem ^{13}C nižší v porovnání s rostlinami C_4 cyklu. Pro plodiny je vytvoření vazby s izotopem ^{13}C energeticky o něco náročnější, ale v situaci, kdy rostlina reaguje na stres a má omezený přístup k atmosférickému zdroji uhlíku (ve formě CO_2), jsou zvýhodněny ty rostliny, které izotop ^{13}C nediskriminují tak silně. S ohledem na to, že uhlík v plynné formě a voda ve formě vodní páry vstupují do rostliny stejnou cestou skrze průduchy, které se při stresu zavírají, je schopnost pracovat s maximem omezeného zdroje uhlíku pro rostliny při deficitu vody zásadní.

Bakalářská práce se zabývala diskriminací stabilního izotopu ^{13}C ve vztahu k metabolickým drahám fotosyntézy rostlin a k vodnímu deficitu, především k efektivitě využití vody rostlinou a k jejímu zlepšování. Problematiku diskriminace uhlíku ^{13}C rozebírala v souvislosti se stresovými reakcemi rostlin v podmínkách zasolení půdy a nedostatečné dostupnosti vody pro rostlinu. Popisovala využití měření diskriminace ^{13}C a izotopového obsahu ^{13}C ke zjištění efektivity využití vody rostlinou za účelem selekce odolnějších kultivarů. Zaměřila se také na využití metody diskriminace izotopu uhlíku ^{13}C ve šlechtění rostlin. Zabývala se analýzou izotopového obsahu ^{13}C při studiu kompetice kulturních plodin a polních plevelů a pěstováním ve smíšených rostlinných kulturách. Definovala základní pojmy spojené s tematikou izotopového obsahu, diskriminace, frakcionačních faktorů a mezofylové vodivosti. Bakalářské práce byla psána formou literární rešerše.

Klíčová slova: fotosyntéza, WUE, šlechtění, izotopy C, ^{13}C , izotopový obsah, diskriminace

Use of carbon isotope discrimination in plant physiology and breeding

Summary

Isotope ^{13}C is, compared to a more common ^{12}C isotope in the atmosphere, found in trace amounts (1,1%). Carbon isotopes ^{12}C and ^{13}C are accepted by plants of different metabolic pathways C_3 , C_4 and CAM (crassulacean acid metabolism) differently based on their willingness to work with heavier ^{13}C isotope. In the case of plant photosynthesis cycle C_3 is its intake lower compared to plants of C_4 cycle. Creating bonds with this isotope by crop plants is somewhat more energetically demanding, but in a situation, where the plant is reacting to stress and has restricted access to atmospheric source of carbon (in the form of CO_2), plants that do not discriminate ^{13}C so strongly are at an advantage. Given that carbon in gaseous form and water in the form of water vapor, enter the plant through the same apertures (stomata), that close in the moment of stress, the ability to work with a maximum of a limited carbon source during water deficit is vital fact for plants.

Bachelor's thesis dealt with discrimination of a stable ^{13}C isotope in relation to metabolic paths of plant photosynthesis and to water deficit, primarily concerning the efficiency of water use by the plant and its improvement. It examined the problem of ^{13}C discrimination in relation to stress reactions of the plants in conditions of soil salinity and insufficient amount of water. It described the use of measuring ^{13}C discrimination and isotope content ^{13}C to ascertain water use efficiency by the plant for the purpose of selecting more resilient cultivars. It also focused on methods of ^{13}C isotope discrimination in plants breeding. It dealt with analysis of ^{13}C isotope content in studies of field weed and crop competition and cultivation in mixed plant cultures. It has defined basic concepts related with isotope content, discrimination, fractionation factors and mesophyll conductivity. Bachelor's thesis was written in the form of literary research.

Keywords: photosynthesis, WUE, plant breeding, carbon isotopes, ^{13}C , isotope content, discrimination

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	UHLÍK A JEHO FORMY V PŘÍRODĚ	3
3.1.1	Obecné informace izotopy	3
3.1.2	Izotopový efekt a frakcionace	4
3.1.3	Izotopové složení a jeho standard pro uhlík ^{13}C	5
3.1.4	Diskriminace těžkého izotopu uhlíku ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$)	8
3.1.5	Metody měření izotopů	12
3.2	METABOLICKÉ DRÁHY FOTOSYNTÉZY C_3 , C_4 A CAM ROSTLIN A DISKRIMINACE ^{13}C S NIMI SPOJENÁ	13
3.3	VODNÍ DEFICIT	15
3.3.1	Transpirace	15
3.3.2	Efektivita využití vody rostlinou - WUE	16
3.3.3	Metody vedoucí k vylepšení WUE plodin	18
3.4	VYUŽITÍ ^{13}C VE ŠLECHTĚNÍ ROSTLIN NA ZVÝŠENÍ WUE, ODOLNOST PŘI SUCHU A ZASOLENÍ	20
3.4.1	Měření WUE sledováním diskriminace izotopu uhlíku	20
3.4.2	Diskriminace ^{13}C a šlechtění rostlin na zvýšení WUE a odolnosti při suchu	21
3.4.3	Diskriminace ^{13}C a stresová reakce rostlin na zasolení	25
3.5	VYUŽITÍ ^{13}C KE STUDIU PRŮDUCHOVÉ, MEZOFYLOVÉ VODIVOSTI PŘI FOTOSYNTÉZE	26
3.6	VYUŽITÍ ANALÝZY OBSAHU ^{13}C PŘI STUDIU KOMPETICE ROSTLIN A SMÍŠENÝCH ROSTLINNÝCH KULTUR	27
4	ZÁVĚRY (SHRNUTÍ ZÍSKANÝCH POZNATKŮ)	30
5	LITERATURA	32

1 Úvod

Bakalářská práce se formou literární rešerše zabývá diskriminací ^{13}C , která spolu s diskriminací ^{14}C stála za objevením rozdílů ve fotosyntéze rostlin studovaných v 50. letech 20. století řadou autorů (Bassham et al. 1954; Kortshak et al. 1965; Hatch & Slack 1966; Bender 1968; Biel & Fomina 2015). Vztah diskriminace ^{13}C s koncentrací CO_2 v atmosféře a rostlině a možnost měřit tento děj spolu s transpirací, fotosyntézou a koncentrací vodní páry vedl k usnadnění studia primárních metabolických dějů v rostlině (fotosyntéza, dýchání a fotorespirace) a jejich důkladnějšímu pochopení (Evans et al. 1986). Odlišná úroveň využití diskriminace ^{13}C plodinami umožnila podrobit zkoumání jednotlivé reakční kroky fotosyntézy a zaměřit pozornost vědců na šlechtění lepších odrůd rostlin na základě dílčích částí frakcionace (Farquhar et al. 1982; Farquhar 1983; O'Leary 1988).

Z hodnot dílčích diskriminací bylo možné získat informace o lokálních koncentracích CO_2 a pohybu a úložištích produktů reakcí spojených s určitými částmi produkční metabolické řady (Scartazza et al. 1998). Na základě vztahu mezi diskriminací ^{13}C a efektivním využitím vody rostlinou (Farquhar & Richards 1984), bylo možné tuto metodu využít i v dalších biologických disciplínách. Díky tomu, že izotopový obsah ^{13}C a diskriminace ^{13}C jsou měřeny stejnými přístroji, stejnými metodami a navíc jsou převoditelné z jednoho na druhé, byly obě tyto veličiny využívány často ve studiích s vodním deficitem (O'Leary 1988; Condon et al. 2002), v komparativních růstových studiích zaměřených na šlechtění odrůd rostlin odolných ke specifickým podmínkám (Gealy & Fischer 2010; Gealy & Gealy 2011) a při studiu mezofylové vodivosti (Kodama et al. 2011). Literární rešerše se dále zabývá šlechtěním odrůd rostlin schopných kompetice proti plevelnému druhu (Svejcar a Boutton 1985) a růstu ve smíšené kultuře plodin (Eleki et al. 2005).

2 Cíle práce

Uhlík se v přírodě vyskytuje ve formě dvou stabilních izotopů: ^{12}C a ^{13}C , přičemž koncentrace ^{13}C činí cca 1,1 % a ^{12}C cca 98,9 %. Rostliny přijímají oba izotopy, ale každý v jiné míře. Příjem ^{13}C je ovlivněn metabolismem uhlíku, kdy v případě rostlin C_4 cyklu fotosyntézy je jeho příjem vyšší v porovnání s rostlinami C_3 cyklu. Dále se v rostlinách liší izotopové zastoupení uhlíku v závislosti na koncentraci CO_2 v mezofylových buňkách, kdy tento jev je možné využít pro šlechtění na odolnost rostlin vůči vodnímu deficitu.

V návaznosti na uvedená fakta byl pro vypracování bakalářské práce stanoven cíl sestavit literární rešerši, zabývající se:

- problematikou diskriminace uhlíku ^{13}C a izotopového obsahu ^{13}C ve vztahu k fotosyntéze rostlin,
- problematikou diskriminace uhlíku ^{13}C a izotopového obsahu ^{13}C ve vztahu k efektivitě využití vody,
- využitím diskriminace uhlíku ^{13}C a izotopového obsahu ^{13}C k zjištění mezofylové vodivosti,
- využitím diskriminace uhlíku ^{13}C a izotopového obsahu ^{13}C ve šlechtění rostlin na odolnost především vůči vodnímu deficitu a zasolení,
- využitím analýzy izotopového obsahu ^{13}C ke studiu kompetice rostlin a smíšených rostlinných kultur.

Uvedený cíl byl stanoven z těchto důvodů:

Efektivita využití vody je snadno sledovatelná pomocí izotopové analýzy obsahu těžkého uhlíku. Izotopová analýza poskytuje při měření současnými metodami rozsáhlé informace o fyziologii rostlin (jejich fotosyntéze, transpiraci, průduchové vodivosti a koncentraci CO_2 v různých místech v rostlině). Tato mnohostrannost a snadnost využití činí z měření izotopového obsahu ^{13}C a diskriminace ^{13}C užitečnou nedestruktivní detekční metodu, jíž lze aplikovat v laboratoři i v terénu bez nutnosti používat speciální ochranné pomůcky. V neposlední řadě byla důvodem k vytvoření literární rešerše s touto tematikou využitelnost této metody k selekci odrůd nejlépe přizpůsobených pěstebnímu prostředí, růstu v kompetici s plevelely a ve smíšených rostlinných kulturách.

3 Literární přehled

3.1 Uhlík a jeho formy v přírodě

3.1.1 Obecné informace izotopy

Prvky mohou existovat ve formě izotopů. Izotopy jsou atomy téhož prvku, které se liší počtem neutronů přítomných v jádru. Na základě toho, kolik neutronů se v jádře nachází, se určuje, zda je izotop stabilní, nebo nestabilní. Příklady stabilních izotopů jsou ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C , ^{12}C , ^{15}N , ^{14}N , ^{34}S , ^{32}S . Nestabilní izotopy podléhají radioaktivnímu rozpadu, zatímco stabilní izotopy frakcionují (Fry 2006).

Fry (2006) konstatuje, že těžké a lehké izotopy jsou z hlediska chemických vlastností téměř totožné. Rozdíl mezi nimi se projevuje na molekulární úrovni při tvorbě vazby tak, že izotop bohatší o neutron reaguje relativně pomaleji oproti příslušnému lehčímu izotopu. Se stoupajícím atomovým (protonovým) číslem prvků se rozdíl v rychlosti reakce mezi lehčím a těžším izotopem snižuje

Fry (2006) uvádí, že přirozeným jevem pro stabilní izotopy je frakcionace a míchání, což jsou dva izotopové pochody opačného účinku spojené v jeden přirozený cyklus. Při izotopovém míchání se spojuje více molekul za vzniku produktů s odlišně umístěnými izotopy.

Frakcionace je podle Farquhara a Loyda (1993) reakce, jejímž výsledkem je produkt případně produkty s jiným izotopovým složením než u zdroje reakce. Dojde k rozdělení původního izotopu mezi dvě látky nyní s odlišným izotopovým obsahem. Tato reakce je poháněna jednak kinetickým efektem vycházejícím z odlišných rychlostí reakcí a difuzních koeficientů, a pak také termodynamickým efektem v případě reakce, kde dochází k izotopové výměně.

Podle O'Leary (1981) je potřeba sledovat rychlosti mezireakcí, aby bylo možné určit, zda se jedná o frakcionaci kinetickou, nebo termodynamickou, na základě čehož lze volit matematický model vhodný ke sledování izotopové změny.

O'Leary (1981), Farquhar et al. (1982), Farquhar a Richards (1984), Evans et al. (1986) a O'Leary (1993) použili modely postavené na frakcionaci. Pracovali se sčítatelností frakcionačních faktorů, což jim umožnilo sledovat frakcionaci během mnoha mezikroků reakce.

3.1.2 Izotopový efekt a frakcionace

V současnosti jsou pro popis frakcionace (neboli diskriminace) používány tři veličiny, mezi které patří: frakcionační faktor α , jinými slovy izotopový efekt (α), izotopová diskriminace, jinak také frakcionace (Δ), a „enrichment faktor“ - frakcionační faktor (ε). Lze je vzájemně převádět viz rovnice (1), (3) za účelem snazšího porovnání hodnot, protože se mezi sebou snáze posuzují hodnoty v promilích (v případě Δ a ε) než v desetinných číslech s mnoha pozicemi za desetinnou čárkou (α). α nabývá hodnot blízkých se k 1 (Fry 2006; Meier-Augenstein 2010).

V různých vědeckých disciplínách jsou přednostně používány ty z nich, které jsou pro daný obor praktičtější. Δ a ε jsou veličiny popisující stejný jev - frakcionaci, avšak ε vychází v záporných hodnotách promile, protože pracuje s α , která je invertovaným poměrem reakčních rychlostí lehkého ku těžkému izotopu (Fry 2006; Meier-Augenstein 2010):

$$\Delta = (\alpha - 1) \cdot 1000 \text{ [‰]}, \text{ kde} \quad (1)$$

$$\alpha = \alpha_{H/L} = k_H / k_L, \quad (2)$$

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \cdot 1000 \text{ [‰]}, \text{ kde} \quad (3)$$

$$\alpha_{L/H} = k_L / k_H. \quad (4)$$

Izotopový efekt je poměrem rychlostních konstant reakce, které vypovídají o reaktivitě sledovaných izotopových látek (O'Leary 1981).

$\alpha_{H/L}$ - hodnota poměru rychlostních konstant těžkého (heavy) ku lehkému (light) izotopu prvku je běžně méně než 1. $\alpha_{L/H}$ je invertovaným poměrem rychlostních konstant. Nabývá hodnot větších než 1. Který frakcionační faktor alfa z uvedených rovnic (2, 4) se použije, závisí na vědní disciplíně. Pro geochemiky a hydrology dává větší smysl používat poměr těžkého isotopu ku lehkému izotopu a hodnota ε v promilích tedy bude díky odečtení od 1 záporná (Fry 2006). Biologie, chemie a ekologie jsou příklady vědeckých oborů, v nichž je přednostně užívána α ve formě $\alpha_{L/H}$. Preference tohoto typu izotopového efektu vede k získání diskriminací kladných hodnot. Podle Brand et al. (2014) by autoři studující problematiku izotopového složení měli na základě dříve dohodnuté konvence navržené Copenem (2011) používat frakcionační faktor α ve formě $\alpha_{H/L}$. Převod mezi pro biology tradičním izotopovým efektem $\alpha_{L/H}$ a jinými obory preferovanou $\alpha_{H/L}$ je vyjádřen následující rovnicí (Fry 2006):

$$\alpha_{H/L} = 1 / \alpha_{L/H}. \quad (5)$$

Vztah mezi diskriminací a enrichment faktorem je popsán jako $\varepsilon = - \Delta$, přesněji $\varepsilon_{H/L} = - \Delta_{L/H}$ (Fry 2006; Meier-Augenstein 2010).

Farquhar et al. (1982) a Farquhar s Richardsem (1984) definovali α také jako poměr difuzních koeficientů (D) viz rovnice (6), které jsou spočitatelné přes redukované molekulární hmotnosti:

$$\alpha = D(^{12}\text{CO}_2) / D(^{13}\text{CO}_2). \quad (6)$$

Další biologie používaná metoda nahlížení na izotopový efekt je vyjádření frakcionačního faktoru α jako poměr poměrů četností izotopů uhlíku v reaktantu ku produktu (Farquhar et al. 1989):

$$\alpha = R_r / R_p. \quad (7)$$

(α - izotopový efekt, R_r - četnost izotopových reaktantů, R_p - četnost izotopových produktů).

3.1.3 Izotopové složení a jeho standard pro uhlík ^{13}C

Relativní izotopové složení v promile ($\delta^{13}\text{C}$) je vztaženo k Pee Dee belemnitovi (PDB), fosilii *Belemnite americana* nalezená ve formaci Peedee v Jižní Karolíně (Park & Epstein 1960). Jako první použil PDB standard v izotopové studii Urey et al. (1951). O šest let později jej využil Keeling (1958) jako standard pro vzorky rostlinného původu. Po vyčerpání zásob PDB se začal používat jako referenční vzorek VPDB - Vienna Pee Dee Belemnite (Meier-Augenstein 2010; Brand et al. 2014).

Farquhar et al. (1982) uvádí pro výpočet izotopového složení obecnou rovnicí (8a), která vychází z poměru obsahů dvou izotopů, kde jeden poměr pochází ze vzorku, druhý je standard. Obdobně je možné použít rovnici (8b) zmíněnou Lermanem (1975):

$$\delta (\text{‰}) = [(R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}}) - 1] \cdot 1000, \quad R = ^{13}\text{C} / ^{12}\text{C} \text{ či } ^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}, \quad (8a)$$

$$\delta = [(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}] \cdot 1000 \quad [\text{‰}]. \quad (8b)$$

V rovnicích (8a) a (8b) R značí izotopový poměr neboli četnost minoritního izotopu ku majoritnímu izotopu, přičemž majoritní izotop bývá zpravidla tím lehčím z nich, příkladem jsou prvky O, C, N, S a H (Farquhar et al. 1982; Fry 2006):

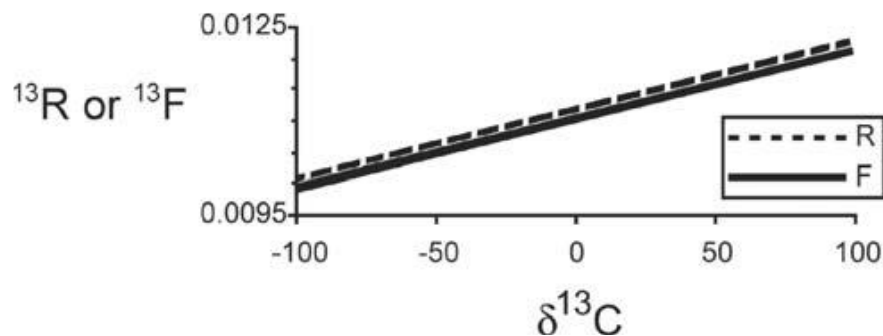
$$R = (\text{četnost minoritního izotopu}) / (\text{četnost majoritního izotopu}). \quad (9)$$

Izotopové složení (δ) lze podle Frye (2006) chápat jako relativní odchylku sledovaného vzorku od standardu. Může nabývat kladných i záporných hodnot. Kladná hodnota vypovídá o obohacení vzorku o těžší izotop, záporná o ochuzení o těžší izotop (Vogel 1993). V případě nulové hodnoty se jedná o prvek se shodným poměrem lehčího a těžšího izotopu jako se vyskytuje v příslušném standardu.

Izotopy a jejich pohyb je často popisován sadou čtyř veličin, kterými jsou izotopový obsah (δ), izotopová četnost (R), frakční četnost (F) a atomprocento (AP). V závislosti na tom, jaký izotopový proces je sledován, je volena veličina, pomocí které se změny v látkách

na úrovni izotopů sledují, to znamená, že pro izotopové míchání může být přesnější použít jiné veličiny než pro frakcionaci (Fry 2006).

Ve všech zde zmíněných publikovaných článcích autoři pracují právě s delta notací. Dle Frye (2006) je sledování izotopových změn během frakcionace pomocí δ spolehlivé, pokud se jedná o vzorky s přirozeně se vyskytujícím izotopovým obsahem (viz Graf 1). V případě uměle vytvořených izotopových vzorků doporučoval výpočty založené na frakční četnosti (F) a atomprocentech (AP), které jsou přesné vždy. Sledování pohybu izotopů za pomoci delta notace - izotopového obsahu (δ) je považováno za praktické z důvodu snazšího proměření. Pro přirozeně se vyskytující vzorky biogenních prvků, které jsou nejčastěji sledovány v rostlinné biologii, je možné ignorovat rozdíly mezi hodnotami AP, F, R které jsou dopočitatelné ze změřeného obsahu izotopů (δ), protože rozdíly jsou zanedbatelně malé (Fry 2006).



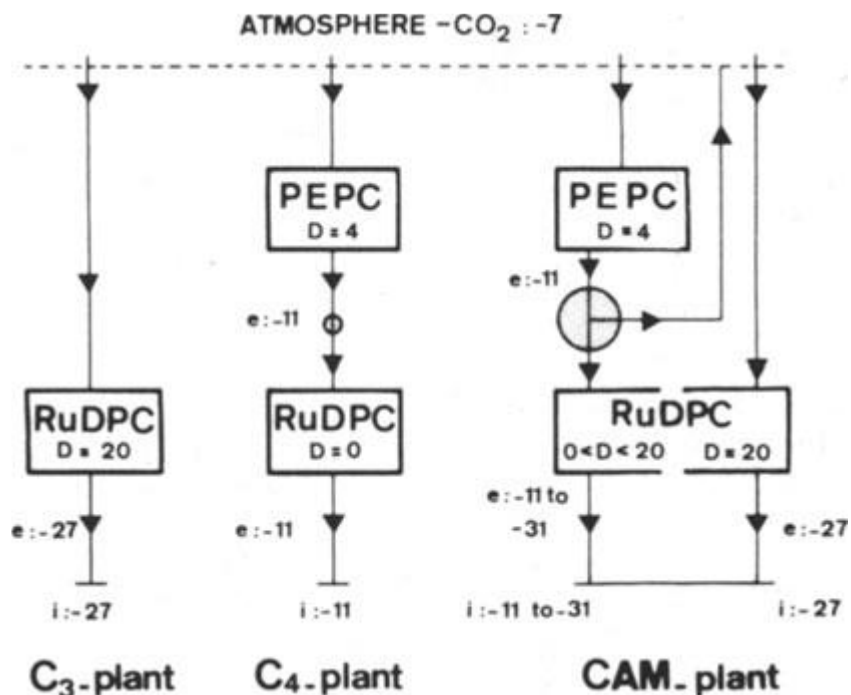
Graf 1: Graf vztahu izotopového obsahu ^{13}C a ^{13}R a ^{13}F (převzato z Frye 2006).

Z grafu 1 je vidět lineární vztah mezi izotopovou četností ^{13}C (^{13}R) nebo frakční četností ^{13}C (^{13}F) a izotopovým obsahem ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$), který dokazuje zaměnitelnost hodnot F a R, pokud se jedná o přirozeně se vyskytující izotopy v rozsahu δ : -100 až 100 ‰ a není nutné získat zcela exaktní výsledky (Fry 2006).

O'Leary (1981) hovořila o snadnosti záměny výsledků hodnot δ a Δ , jelikož jsou obě vyjadřovány v promile. Proto také doporučila používání R a δ jakožto mezivýpočtů pro získání celkových izotopových frakcionací, čímž by se možnost záměn snížila. Autorka dále uvádí, že v porovnání se standardem sledovaného prvku dochází v případě uhlíku k tomu, že prvek je proti standardu výrazně ochuzen o těžší izotop, tudíž hodnota jeho δ je negativní. Porovnáme-li výsledky δ mezi sebou, méně negativní hodnota je spojena s relativně vyšším obsahem těžšího izotopu.

Hodnota $\delta^{13}\text{C}$ je v současných rostlinách záporná, protože většina rostlin diskriminuje ^{13}C a upřednostňuje lehčí uhlík ^{12}C . K selekci ve prospěch ^{12}C dochází při příjmu a asimilaci CO_2 . Za zápornou hodnotu $\delta^{13}\text{C}$ je také odpovědná nižší hodnota poměrů izotopů uhlíku

v atmosféře (R_a) v porovnání s hodnotou poměrů izotopů uhlíku ve standardu PDB (Condon et al. 2002). Keeling et al. (1979), Goodman (1980, in Farquhar et al. 1982) a Farquhar s Lloydem (1993) udávají hodnotu $\delta^{13}\text{C}$ v atmosféře rovnou -8 ‰ . Izotopové složení v rostlinách se s postupujícími roky mění, kvůli snižování obsahu těžšího izotopu uhlíku v atmosféře způsobeného spalováním fosilních paliv (Farquhar et al. 1989). V poslední čtvrtině 20. století na počátcích studia izotopové analýzy bylo množství přirozeného těžkého uhlíku v atmosféře vyšší (Lerman 1975), za 14 let se tedy izotopový obsah v atmosféře změnil o 1 ‰ . Tehdy naměřené hodnoty izotopových obsahů v rostlinách ale zůstaly velmi blízko současným rozsahům viz Obr. 1 (Lerman 1975). Farquhar s Lloydem (1993) naměřili rozsah obsahu ^{13}C v rostlinách mezi hodnotami $-8,9 \text{ ‰}$ a $-30,1 \text{ ‰}$. Tento rozsah izotopového obsahu je velmi široký, jelikož jsou v něm obsaženy tři různé skupiny rostlin (C_3 , C_4 a CAM - crassulacean acid metabolism), každá se specifickou variantou fotosyntézy. V C_3 rostlinách je obsah ^{13}C od -22 ‰ do -38 ‰ , v C_4 rostlinách od -8 ‰ do -15 ‰ a v CAM rostlinách od -13 do -30 ‰ (Farquhar 1989; Yeh & Wang 2001). Rozdíly ve fotosyntéze a frakcionaci izotopů během ní se v těchto skupinách rostlin blíže zabývají následující kapitoly.



Obr. 1: Modely hodnot izotopového obsahu ^{13}C v atmosféře a tří skupin rostlin (C_3 , C_4 a CAM - crassulacean acid metabolism) lišících se metabolickou drahou fotosyntézy. Tehdejší hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ jsou velmi blízké současným hodnotám $\delta^{13}\text{C}$. $\delta^{13}\text{C}$ jsou vyjádřeny v ‰ (převzato z Lermana 1975).

3.1.4 Diskriminace těžkého izotopu uhlíku ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$)

Frakcionace izotopů uhlíku je považována za jednu z nejvhodnějších metod ke sledování příjmu CO_2 v průběhu fotosyntézy (O'Leary 1981).

Diskriminace uhlíku v rostlině je dána poměrem izotopů uhlíku nacházejících se v rostlině v porovnání s jejich poměrem v okolní atmosféře (10). Farquhar a Richards (1984) vychází z porovnání rovnic (1) a (7):

$$\Delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{atm}} / R_{\text{plant}}) - 1] \cdot 1000. \quad (10)$$

Autoři, kteří se věnovali této tématice, používali různé znaky pro označení diskriminace. Symbol D je používán v práci Lermana (1975), d je upřednostňovaný Farquharem et al. (1982), $\Delta\delta$ se vyskytuje v publikacích O'Leary (1988). Nejčastěji používaný symbol Δ je preferovaný většinou autorů (např.: Farquhar & Richards 1984; Condon et al. 2002; Kodama et al. 2011). V novějších publikacích např. Kondo et al. (2004), Shirazi et al. (2015) se objevuje označení diskriminace jako CID (carbon isotope discrimination).

V atmosféře je podle O'Leary (1980) přítomno přibližně 98,9 % stabilního izotopu ^{12}C a 1,1 % ^{13}C . Hodnota diskriminace uhlíku v C_3 rostlinách je kladná, protože rostliny vědomě upřednostňují pro fotosyntézu izotop ^{12}C (Condon et al. 2002). Již z poměru v jakém se izotopy uhlíku v atmosféře nacházejí, je možné očekávat, že v rostlinném materiálu bude tento silný nepoměr ve prospěch lehčího izotopu uhlíku zachován. Na atmosféru je tedy možné nahlížet jako na zdroj izotopových reaktantů, které dávají v rostlině vzniknout izotopickým produktům (Lerman 1975). Diskriminaci je pak možné s menší nepřesností chápat jako rozdíl v izotopovém obsahu ^{13}C mezi atmosférou a rostlinou. Fry (2006) ji ve velmi zjednodušené variantě představil jako:

$$\Delta = \delta_r - \delta_p \quad [\text{‰}], \quad (11)$$

kde poměr izotopů v atmosféře vnímá jako poměr v zásobě reaktantů a s poměrem v rostlině zachází jako s poměrem mezi vzniklými produkty. Rovnici (11) lze získat z modelu představeného Farquharem et al. (1984) za předpokladu, že hodnota izotopového obsahu v rostlině je natolik malé číslo, že ve jmenovateli rovnice (12) vyjde číslo blízké 1:

$$\Delta = (\delta_r - \delta_p) / [1 + (\delta_p / 1000)] \quad [\text{‰}]. \quad (12)$$

Velká a malá C , c představují koncentrace CO_2 v odlišných lokacích vůči rostlině, malá písmena abecedy (a, b, d, e, f) značí dílčí frakcionace, viz např.:

$$\Delta_A = a \cdot [(C_a - C_s) / C_a] + b \cdot (C_{st} / C_a) = a + (b - a) \cdot C_{st} / C_a. \quad (13)$$

Spojením rovnice (11) s rovnicí (13) publikovanou Farquharem a Llyoedem (1993),

která zobrazuje diskriminaci jako souhrn dílčích frakcionací násobených poměrem koncentrací CO₂ v příslušných místech v rostlině, lze získat pravděpodobně nejznámější rovnici platnou pro rostliny s fotosyntézou typu C₃ vytvořenou Farquharem et al. (1982):

$$\delta = \delta_a - a - (b - a) \cdot c_i / c_a. \quad (14)$$

Farquhar a Lloyd (1993) použili v rovnici (13) symbol C_{st} místo C_i pro přesnější vyjádření parciálního tlaku v intracelulárním prostoru rostliny.

V porovnání s poměrným izotopovým složením (δ) vyjadřujícím relativní odchylku izotopového obsahu vzorku oproti standardu, izotopová frakcionace (Δ) jinými slovy diskriminace popisuje izotopovou změnu v průběhu reakce (Fry 2006).

O'Leary (1988) hovořila o tom, jaké zdroje uhlíku je potřeba vzít do úvahy pro výpočet izotopového složení v rostlině. Většina uhlíku dle ní přichází do listu rostliny zvnějšku a je fixována fotosynteticky aktivními pletivy. Samozřejmě list není izolované prostředí, proto autorka také zmiňovala výměnu uhlíku mezi listem a ostatními částmi rostliny během jeho vývoje a života. Jako další důvod změny v celkovém obsahu uhlíku v listu uvedla ztrátu prodýcháváním uhlíku dříve naasimilovaného.

Condon et al. (2002) používali upravenou verzi rovnice (14) v podobě, která celkovou diskriminaci v rostlině popisuje jako souhrn dílčích diskriminací při transportu a zpracování CO₂ během fotosyntézy:

$$\Delta^{13}\text{C} = (a - d) + (b - a) \cdot c_i / c_a. \quad (15)$$

O'Leary (1988) nepovažovala výčet jednotlivých frakcionací za dokonalý popis diskriminace ¹³C rostlinou. Tyto dílčí frakcionace měla za takové kroky frakcionace, při nichž rostlina nejvíce vzdoruje použití ¹³C, výčet tedy není definitivním součtem možných frakcionací, kterým CO₂ projde. Viděla je jako souhrn kroků, které jsou nejvýrazněji pozorovatelné a měřitelné.

Rovnice (15) popisuje prvky účastníci se diskriminace ¹³C v rostlině. Obsahuje dílčí diskriminace ¹³C během procesů, jimiž celkový CO₂ při fotosyntéze prochází. Je zde zahrnutý CO₂ přijatý rostlinou nově i ten, který již původně obsahovala (i ve formě složitějších látek). Její dílčí členy popsali Farquhar et al. (1982) jako frakcionaci: při difuzi CO₂ průduchy (a), během karboxylace Rubiscem (b), frakcionaci při fotorespiraci, dýchání a při zpětné karboxylaci ¹³CO₂ uvolněného z prodýcháných uhlíkatých stavebních látek (d). Z rovnice (15) lze poznat že Δ¹³C a c_i / c_a jsou přímo úměrné (Farquhar et al. 1982).

Vogel (1993) preferoval použití méně časté sady znaků pro diskriminaci a její frakcionační faktory ve formě řeckého písmene ε (éta), u dílčích faktorů z indexů z prvních

písmen názvu reakcí (d - difuze, c - karboxylace atd.) a změnil znaménko viz rovnice (16b). V práci Vogela (1993) se nachází rovnice diskriminace popisující totéž jako rovnice (15), avšak s tou změnou, že autor preferuje vyjádření vlivu koncentrací CO₂ na diskriminaci formou poměru parciálních tlaků (p_i / p_a):

$$\Delta = a + (b - a) \cdot p_i / p_a , \quad (16a)$$

$$\varepsilon \approx \varepsilon_d + (\varepsilon_c - \varepsilon_d) \cdot p_i / p_a . \quad (16b)$$

Dílčí diskriminace b nezávisle na metabolické cestě fotosyntézy nabývá dle Farquhara et al (1982) hodnot mezi 27 ‰ a 30 ‰, dle Brugnoliho a Farquhara (2000) hodnot mezi 26 až 29 ‰. Rozsah mezi hodnotami b, který obě skupiny autorů uvádějí je výsledkem úpravy hodnoty frakcionačního faktoru pro karboxylaci Rubiscem snížením o hodnotu diskriminace způsobenou prací PEPC a o rozpustnost CO₂ ve vodě. Pro C₃ rostliny frakcionační faktor a nabývá dle Farquhara et al. (1982) hodnoty 4,4 ‰.

Při pohledu na rovnice (15) a (16a) je vidět že je možné zanedbat dílčí frakcionaci (d) vypovídající o zpětném využití již asimilovaného CO₂, dýchání a fotorespiraci ve sledované části rostliny (O'Leary 1993; Vogel 1993).

Evans et al. (1986) pracovali s rovnicí, která byla mnohem komplikovanější a popisovala čistou diskriminaci v C₃ rostlinách jako:

$$\Delta = a_b \cdot (p_a - p_s) / p_a + a \cdot (p_s - p_i) / p_a + (b_s + a_i) \cdot (p_i - p_c) / p_a + b \cdot p_c / p_a - (eR_d / k + f\Gamma^*) / p_a . \quad (17)$$

Část (eR_d / k + fΓ*) / p_a z rovnice (17) bere v úvahu přínos fotorespirace, kompenzačního bodu fotosyntézy a temné respirace.

Evans et al. (1986) pozorovali u C₃ rostlin stejnou závislost diskriminací na p_i / p_a. Rovnice (18) je nezjednodušenou formou rovnice (13) pro diskriminaci ¹³C. Tato komplexní rovnice je používána autory, kteří chtějí zahrnout obsáhlejší množství možných dílčích diskriminací (Farquhar & Lloyd 1993):

$$\Delta_A = a_b \cdot [(C_a - C_s) / C_a] + a \cdot [(C_s - C_{st}) / C_a] + a \cdot [(C_{st} - C_w) / C_a] + (e_s + a_i) \cdot [(C_w - C_c) / C_a] + b \cdot (C_c / C_a) - [(e \cdot R_d / k + f \cdot \Gamma^*) / C_a] . \quad (18)$$

Podobné podrobnější rovnice, které rovněž vycházejí z rovnic navržených Farquharem (1982), používají mnozí současní autoři (např.: Brugnoli et al. 1988; Lanigan et al. 2008; Kodama et al. 2011). V případě Lanigana et al. (2008) její části zahrnují přestupy z atmosféry do vzdušné vrstvy kolem listu, do podprůduchové štěrbin, do mezofylových buněk a započítávají snížení diskriminace fotorespirací a dýcháním:

$$\Delta = a_b \cdot [(C_a - C_s) / C_a] + a \cdot [(C_s - C_i) / C_a] + a_m \cdot [(C_i - C_c) / C_a] + b \cdot (C_c / C_a) - f \cdot \Gamma^* / C_a - e \cdot R_d / (A + R_d) \cdot (C_c - \Gamma^*) / C_a. \quad (19)$$

Oba výše zmínění autoři počítali s tím, že diskriminace je pro C_3 rostliny ovlivněna poměrem koncentrací CO_2 . Farquhar et al. (1982) a Condon et al. (2002) tuto složku diskriminace vnímali jako poměr koncentrací CO_2 mezi intracelulárním prostorem listu a atmosférou. O'Leary (1993) a Vogel (1993) dali přednost vyjádření tohoto prvku jako poměru parciálních tlaků.

V případě C_4 rostlin je nutné do rovnice celkové diskriminace připočítat diskriminaci při zpracovávání CO_2 pomocí PEPC (fosfoenolpyruvát karboxylázy) o další karboxylační dílčí diskriminaci $b_3\phi$, což změní rovnici (16a) v rovnici použitou Farquharem a Richardsem (1984) a O'Leary (1993):

$$\Delta = a + (b_4 + b_3\phi - a) p_i / p_a, \quad (20)$$

kde b_4 představuje frakcionaci při karboxylaci PEPC. $b_3\phi$ započítává do rovnice frakcionaci při karboxylaci enzymem Rubisco roznásobenou o množství CO_2 , které uniklo z pochev cévních svazků zpět do mezofylu. ϕ je symbolem netěsnosti pochev cévních svazků (BSC).

Dle Vogela (1993) lze rovnici (20) vyjádřit jako:

$$\varepsilon = \varepsilon_d + (\varepsilon_{bg} + \varepsilon_4 - \varepsilon_d) \cdot p_i / p_a. \quad (21)$$

Zde ε_4 vypovídá o kinetické frakcionaci bikarbonátu s PEPC a ε_{bg} představuje termodynamickou frakcionaci plynného CO_2 a bikarbonátu.

Na rozdíl od C_3 rostlin podle Evanse et al. (1986) poměr p_i / p_a na diskriminaci ^{13}C u C_4 rostlin příliš vliv neměl.

V práci Farquhar (1983) se nachází rovnice popisující izotopový obsah ^{13}C v CAM rostlinách, s tím že se od rovnice pro C_4 (14) liší frakcionačním faktorem pro karboxylaci (b) a δ_{env} je zkratkou pro environment, tedy prostředí, v rovnici (14) autoři použili zkratku δ_a , značící atmosférický:

$$\delta = \delta_{env} - a - (b_4 - a) \cdot c_i / c_a. \quad (22)$$

Díky možnosti sledovat dílčí frakcionace během metabolických dějů v rostlinném materiálu a vztahu koncentrace CO_2 s diskriminací ^{13}C je možné použít jejich měření ke studiu fyziologie rostlin a šlechtění lépe přizpůsobivých rostlin na různé typy prostředí, čemuž se budu dále věnovat v kapitole 3.4, 3.5 a 3.6.

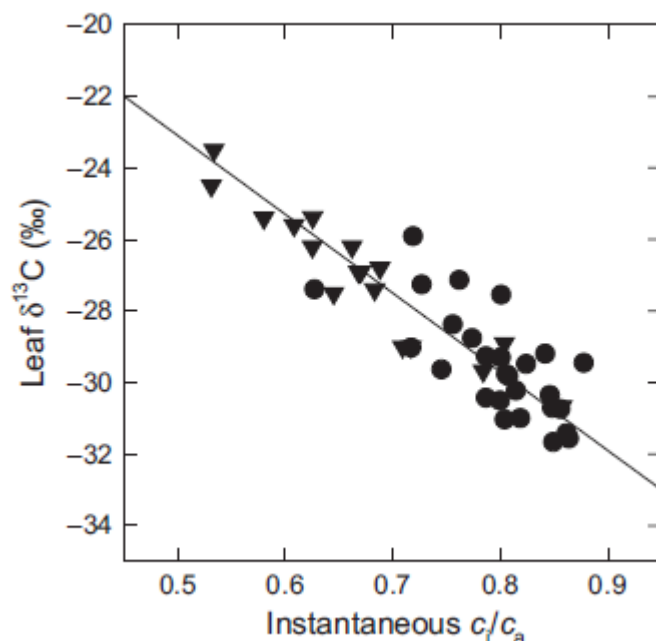
3.1.5 Metody měření izotopů

Jedna z prvních verzí metod studia rostlin s pomocí značení stabilními izotopy ^{13}C byla provedena pomocí vstříknutí $^{13}\text{CO}_2$ plynu do komory se sledovanými rostlinami, z nichž pak byly odebrány vzorky rostlinného materiálu ke spálení v křemíkových nádobkách. Následně byl přečištěný CO_2 analyzovaný manometricky ke zjištění jaké procento objemu je tvořeno uhlíkem a poté spektrometricky izotopovou (dual inlet) hmotnostní spektrometrií (Svejar et al. 1990).

Ve většině současných (novějších) prací je preferována analýza $\Delta^{13}\text{C}$ pomocí „isotope ratio mass spectrometry“ (IRMS), kde se měří přímo izotopový obsah (δ) vloženého vzorku. Dále je možné informace o $\Delta^{13}\text{C}$ zjistit gazometricky současným měřením rychlosti fotosyntézy a transpirace, ze kterých se počítá intracelulární koncentrace CO_2 .

Podle Evanse et al. (1986) je pojmenována Evansova „on-line“ metoda měření $\Delta^{13}\text{C}$, kde je měřena změna v izotopovém složení vzduchu v blízkosti fotosyntetizujícího listu sledované rostliny. Analýzu provádí hmotový spektrometr, který zpracovává informace z listové komory. Tato metoda se v adaptovaných variacích běžně v současnosti používá. Autoři v případech on-line metod porovnávají hodnoty očekávané $\Delta^{13}\text{C}_i$ nebo také $\Delta^{13}\text{C}_{\text{pred}}$ a skutečně naměřené $\Delta^{13}\text{C}_{\text{obs}}$ (Kodama et al. 2011, Lanigan et al. 2008).

Srovnání výsledků získaných měřeními $\delta^{13}\text{C}$ pomocí IRMS a gazometricky zjištěných okamžitých hodnot koncentrací CO_2 je zobrazeno v grafu č. 2. Vyšší rozptyl hodnot kolem regresní přímky při zachycení výsledků korelace $\delta^{13}\text{C}$ a poměru okamžitých hodnot c_i a c_a je přičítán několika faktorům. Jednou z příčin vyššího rozptylu hodnot je porovnávání velmi proměnlivé okamžité hodnoty poměru koncentrací CO_2 způsobené závislostí na podmínkách v okolním prostředí listu s integrální hodnotou $\delta^{13}\text{C}$, která je na těchto podmínkách nezávislá (Cernusak et al. 2013). Další z možných příčin jsou podle Šantrůčka et al. (2003) nestejnorodá rychlost fotosyntézy působená nestejnou prouduchovou vodivostí a existence mezofylového odporu. Při měření Evansovou metodou k rozptylu hodnot od regresní přímky nedochází kvůli poměření dvou okamžitých hodnot (Evans et al. 1986).



Graf 2: Graf vztahu poměru okamžitých koncentrací CO₂ v listu a atmosféře a izotopového obsahu δ¹³C v listu. Vzorčky jsou semenáčky krytosemenných a nahosemenných rostlin (převzato z Cernusaka et al. 2013).

3.2 Metabolické dráhy fotosyntézy C₃, C₄ a CAM rostlin a diskriminace ¹³C s nimi spojená

Rostliny můžeme rozdělit do tří skupin, definovaných jejich odlišným přístupem k zapracování uhlíku ve formě CO₂ nebo HCO₃⁻ do organických kyselin. Každá z těchto tří skupin rostlin používá odlišnou metabolickou dráhu, která vychází již z anatomické struktury fotosyntetizujících pletiv na buněčné úrovni. Rozdíl mezi nimi nastává v okamžiku první karboxylace. Metabolické dráhy sdružující tyto rostliny jsou pojmenovány podle výzkumníků, jež tyto dráhy studovali a podle organických kyselin, které jsou meziprodukty karboxylačního cyklu. Tyto dráhy a cykly se nazývají Calvinův cyklus, Hatch and Slackův (Procházka et al. 1998).

První z cyklů, používaný C₃ rostlinami, kde meziproduktem je tří uhlíkatý 3-fosfoglycerát je nazýván po jednom autorů výzkumu fotosyntetických cyklů Calvinův cyklus (Benson-Bassham-Calvin cycle) (Biel & Fomina 2015). Byl studován za pomoci značení radioizotopovou metodou izotopem uhlíku ¹⁴C (Bassham et al. 1954).

Příklady pěstovaných plodin s C₃ fotosyntézou jsou rýže (*Oryza sativa*), pšenice (*Triticum aestivum* L.), ječmen (*Hordeum vulgare* L.), oves (*Avena sativa* L.), sója (*Glycine max* L.), vojtěška (*Medicago sativa* L.) a bavlník (*Gossypium hirsutum* L.). Z plevelů se mezi ně řadí bér (*Setaria* spp.) a povijnice (*Ipomoea* spp.) (Gealy & Fischer 2010). Tento cyklus

probíhá v mezofylových buňkách za pomoci enzymu ribuloza-1,5-bisfosfát karboxyláza oxygenáza, nazývaného Rubisco a katalyzuje reakci fixace uhlíku ve formě CO₂. Calvinův cyklus je společný pro všechny rostliny s tím, že ty z rostlin, které fixují uhlík pouze touto cestou, patří do skupiny rostlin s C₃ typem fotosyntézy (Procházka et al. 1998).

Metabolická dráha C₄ fotosyntézy byla poprvé popsána u cukrové třtiny v roce 1965 autorským kolektivem Kortshak, Hartt a Burr (Kortshak et al. 1965) a o rok později autory Hatchem a Slackem (Hatch & Slack 1966). Tito autoři zjistili, že Calvinovu cyklu předchází v mezofylu karboxylační reakce, která vede ke vložení CO₂ v jeho aniontové formě do čtyřuhlíkaté oxaloctové kyseliny (cyklus Hatchův – Slackův – Kortschakův). Tato fixace HCO₃⁻ probíhá pomocí fosfoenolpyruvát karboxylázy - oxygenázy (PEPC). C₄ kyselina je aktivně transportována do pochev cévních svazků, kde z ní je extrahován CO₂, dále zpracováván klasickou cestou enzymem Rubisco v C₃ cyklu (Hatch 1987). Tím, že C₄ rostliny mohou požívat dvojí karboxylaci, mají možnost dosáhnout efektivnějšího využití dostupného uhlíku (Procházka et al. 1998). Také slabá diskriminace PEPC proti použití těžkého bikarbonátu (b= 5,7 ‰) přináší evoluční výhodu spolu s pouze karboxylační aktivitou enzymu PEPC (PEPC nemá oxygenázovou aktivitu, nepracuje fotorespiračně) (Farquhar 1983; Procházka et al. 1998). Rovnice diskriminace ¹³C počítá se ztrátami CO₂ způsobenými netěsností BSC (Farquhar 1983). BSC neudrží CO₂, který rostlina přenáší přes membránu za pomoci ATP uvnitř v buňkách, neustále dochází k jeho ztrátám zpět do mezofylu (Hatch 1987).

Mezi plodiny s C₄ fotosyntetickou drahou patří kukuřice (*Zea mays* L.) a čirok (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), z plevelů ježatka kuří noha (*Echinochloa cruz-gali* L. Beauv.) a laskavec (*Amaranthus* spp.) (Gealy & Fischer 2010).

Na souvislost mezi nově objevenou C₄ metabolickou drahou a obsahem obohaceného izotopu uhlíku ¹³C v tropických travách upozornila svými výzkumy Bender (1968). O'Leary (1988) testovala rozdíly v δ ¹³C u C₃ i C₄ rostlin (*Zea mays*, *Medicago sativa*) a konstatovala, že v rámci jednoho druhu lišícího se počtem chromozomálních sad (ploidie) se hodnoty δ ¹³C téměř nelišily, neboť poměr koncentrací vnitrobuněčného a atmosférického CO₂ byl téměř shodný bez ohledu na ploidii rostliny.

Speciálním typem fotosyntézy částečně postavené na C₄ metabolické dráze je CAM fotosyntéza, kde spojení písmen CAM znamená „*crassulacean acid metabolism*“. Příkladem rostlin s fotosyntézou typu CAM jsou podle Kluge & Ting (1978) pouštní a sukulentní rostliny (*Opuntia* sp., *Tillandsia* sp., *Ananas* sp., *Portulaca* sp., *Geranium* sp., *Euphorbia* sp.). CAM rostliny využívají upravené metabolické dráhy C₄ fotosyntézy, avšak oddělují

zapracovávání CO₂ pomocí PEPC do malátu a jeho pozdější rozštěpení a následné zpracování Rubiscem jak místně, tak i časově (Kluge & Ting 1978; O'Leary 1988). CAM cyklus je na základě časového oddělení jeho metabolických fází také nazýván „*diurnal acid rhythm*“ či „*diurnal acid cycle*“. Je pro něj typické nízké pH kvůli vyšší koncentraci C₄ kyselin (převážně kyseliny jablečné) ve vakuolách přes noc a vyšší koncentrace uhlikatých metabolitů C₃ cyklu přes den (Kluge & Ting 1978; Black & Osmond 2003). Tento jev byl pozorován již 1813 Benjaminem Heyesem, který ochutnával listy *Bryophyllum calycinum* pozoroval jejich kyselost v brzkých ranních hodinách a pokles této kyselosti s přibývajícimi hodinami dne (Heyne 1816; Meidner 1986). Při temnostní fázi přijímají rostliny otevřenými průduchy CO₂ a pracují PEPC a MDH (malát dehydrogenázou). Při zavřených průduších v denní fázi cyklu pracují Rubiscem (Kluge & Ting 1978; O'Leary 1988). Sinha (2004) rozděluje CAM rostliny dle používání tohoto typu fotosyntézy na obligátně a fakultativně CAM fotosyntetizující. Mezi obligátní CAM rostliny patří např. *Opuntia basilaris*. V případě fakultativních uvádí např.: *Mesembryanthemum crystallinum*, *Agave americana*, *A. deserti*.

3.3 Vodní deficit

Obsah vody v rostlině lze vyjádřit ve formě vodního sytostního deficitu (VSD), nebo relativního obsahu vody (RWC). Tyto veličiny jsou definovány poměrem čerstvých hmotností a hmotností sušiny. Vodní sytostní deficit udává procentuální množství vody, které rostlina postrádá do plného nasycení. Oproti tomu relativní obsah vody poskytuje informace o skutečném procentuálním nasycení rostliny vodou (Procházka et al. 1998).

Existuje více metod, jak stanovit stav vody v rostlinách. Nejčastěji sledovaná je regulace zavírání a otevírání průduchů, jelikož je dobře měřitelná svou spojitostí s příjmem a fixací CO₂. Dále rostliny omezují ztrátu vody pomocí naklánění listu do úhlu a jeho rozvíjení či zavíjení změnou tlaku vody v pletivech (Cowan 1982). Jinou strategií je podle Cowan (1982) přerušování vodivých pletiv v řapíku a opad listu rostlinou v případě, kdy poměr růstu a mortality rostliny dosáhne hodnoty při které příjem CO₂ a jeho fixace není pro rostlinu dostatečně ekonomicky výhodná na to, aby rostlina udržovala zásobování listu vodou.

3.3.1 Transpirace

Výdej vody v rostlině je prováděn dvěma jevy nazývanými gutace a transpirace. Gutace je zodpovědná za výdej vody v její kapalně podobě otvory, které jsou k tomu evolučně navrženy, hydatodami. Tento výdej není z pohledu rostliny regulovatelný v tom smyslu, že průsvit hydatod není ovladatelný (hydatody jsou tedy vždy otevřené). Druhou a dominantní

metodou výdeje vody rostlinou, zodpovědnou za maximum transportované vody ve formě vodní páry je transpirace (Procházka et al. 1998).

Transpirace vydává vodu do prostředí v její plynné formě skrze průduchy a pokožku nadzemní části rostliny. Prostup vody pokožkou a kutikulou je nazývaný kutikulární transpirací a není přímo ovladatelný. Póry pro vodu v kutikule jsou trvale otevřené. Dle Cowana (1982) rostlina může v extrémních případech uzavřít listové stopy a nechat listy opadnout a tím regulovat plochu, z níž kutikulární transpirací ztrácí vodu. Druhou a hlavní formou transpirace je transpirace skrze průduchy (průduchová, stomatální) (Procházka et al. 1998).

Celková vodivost pro CO₂ v rostlině se skládá z několika prvků, které jsou definovány podle prostředí, kterými tento plyn (a vodní pára) procházejí při transportu z atmosféry do míst karboxylace, tedy do chloroplastů. Tato celková vodivost je nazývána mezofylová vodivost a jejími prvky jsou vodivost skrze „intercellular air space“ (g_{ias}), přes buněčnou stěnu (g_w) a vodivost v kapalně fázi v cytoplasmě (g_{liq}) (Flexas et al. 2008).

Rovnice popisující vodivost pro CO₂ v rostlině v závislosti na hodnotě čisté fotosyntézy (A_N), koncentrace v atmosféře (C_a), koncentrace v podprůduchové dutině - intracelulárních prostorech (C_i) a koncentrace v chloroplastech (C_c) (Long & Bernacchi 2003).

$$A_N = g_s (C_a - C_i) = g_m (C_i - C_c) . \quad (23)$$

Flexas et al. 2008 dále tvrdili, že g_{liq} a někdy i g_w jsou hlavními původci změn v g_m . Ve srovnání s průduchovou vodivostí, reaguje mezofylová vodivost na změny v prostředí rychleji nebo nejméně stejně pružně jako průduchová vodivost (Vrábl et al. 2009).

Okamžitá efektivita využití vody (WUE) se ukázala být vhodným parametrem na sledování krátkodobého dopadu dostupnosti vody pro rostlinu a pohyb vody a uhlíku v rostlině. Pro dlouhodobé měření je výhodnější použít veličinu nazývanou transpirační efektivita (W). Tato veličina je vhodná pro sledování toku uhlíku a vody po delší časová období využívaná pro pozorování produktivity a růstu stromových korun (Ehleringer et al. 1993a).

3.3.2 Efektivita využití vody rostlinou - WUE

Sinclair et al. (1984) ve své práci popisovali pojem „water use efficiency“, který představuje poměr mezi naakumulovanou biomasou, jež je vyjádřena formou asimilace CO₂ (A), celkovou biomasou plodiny (B) a plodinovým výnosem zrna (G) k množství spotřebované vody. Suma vody je představována transpirací (T), evapotranspirací (ET), nebo celkovým příjmem vody (I).

Rostliny jsou schopny ovlivnit kolik vody vytranspirují za současného získání uhlíku. Takovéto regulaci ztráty vody se říká vnitřní využití vody W_T a je to jev nepřímo měřitelný jako $\Delta^{13}C$ (Condon et al. 2002).

Vnitřní využití vody (W_T) „intrinsic water use efficiency“ - okamžitá efektivita využití vody je popsána Condonem et al. (2002) jako poměr okamžitých rychlostí asimilace CO_2 (A) a transpirace (T) průduchy. Vnitřní využití vody závisí na vodivosti průduchů (g_s) a koncentračních gradientech (c) v rostlině a jejím okolí. Pro asimilaci uhlíku se jedná o koncentrační gradient vnitřního (c_i) a atmosférického (c_a) CO_2 a vodivost průduchů pro tento plyn (g_c). V případě transpirace je její rychlost ovlivňována vodivostí průduchů pro vodní páru (g_w) a jejími koncentračními gradienty: (w_i) v rostlině a (w_a) v atmosféře.

Rovnice (24), (25), (26) a (27) byly převzaty z práce Condon et al. (2002):

$$A = g_c (c_a - c_i) , \quad (24)$$

$$T = g_w (w_i - w_a) , \quad (25)$$

$$W_T = A / T = [g_c (c_a - c_i)] / [g_w (w_i - w_a)] , \quad (26)$$

$$W_T \approx 0,6 c_a (1 - c_i / c_a) / (w_i - w_a) . \quad (27)$$

Složení vztahů pro A a T z rovnic (24) a (25) může být sestavena rovnice popisující okamžitou účinnost využití vody WUE_o (28) použitá Farquharem a Richardsem (1984) a později Condonem et al. (2002):

$$WUE_o = A / E = c_a (1 - c_i / c_a) / 1,6 (w_i - w_a) . \quad (28)$$

V rovnici (28) je 1,6 hodnotou poměru difuzivity CO_2 a vodní páry v atmosféře (Ehleringer et al. 1993a).

Rovnice (29) vycházející ze vztahu pro WUE_o (28) ukazuje schopnost rostliny kompenzovat ztráty a příjem vody spojené s regulací karboxylační kapacity a difuzní vodivosti omezené prací průduchů (Xu et al. 2009):

$$c_i = c_a - A / g_{CO_2} . \quad (29)$$

Kontrola koncentrace CO_2 v intercelulárním prostoru a na cestě do míst karboxylace je dle Xu et al. (2009) hlavním mechanismem k ovládní WUE rostlinou. Podle (Ehleringer et al. 1993a) je vnitřní využití vody rostlinou (intrinsic WUE) popsáno jako poměr rychlosti fotosyntézy (A) ku vodivosti průduchů (g). Také ji zobrazují jako okamžitou efektivitu využití vody rostlinou (WUE_o) násobenou hodnotou gradientu tlaku vodní páry mezi listem a atmosférou (v):

$$WUE_i = A / g , \quad (30)$$

$$WUE_i = WUE_o(\text{instaneous}) \cdot v , \quad (31)$$

$$v = (e_i - e_a) / P = vpd / P, \quad (32)$$

kde vpd je deficitem vodní páry (Sinclair et al. 1984; Ehleringer et al. 1993a).

Hodnota poměru koncentrací CO₂ (c_i / c_a) je dána vztahem mezi fotosyntetickou kapacitou a vodivostí průduchů viz rovnice (29). Zvýšení vnitřní efektivity využití vody je tedy spojené se snížením hodnoty poměru koncentrací CO₂ (c_i / c_a) pomocí snížení (g) nebo navýšení (c) nebo současnou změnou obou parametrů (Condon et al. 2002). Podle Condon et al. (2002) je možné výrazně zlepšit využití vody v rostlině při poměrně mírné změně v hodnotě (c_i / c_a). Příkladem je zlepšení rychlosti asimilace navázané na zvýšenou fotosyntetickou kapacitu, je však pravděpodobné, že při zvýhodnění jednoho z parametrů určujících W_T dojde ke zhoršení jiného. Snížení (c_i / c_a) snížením hodnoty stomatální vodivosti (g) se odrazí na rychlosti asimilace CO₂. Nižší stomatální vodivost také pravděpodobně povede k nárůstu teploty v listu (pokud tato změna v g není doprovázena existencí silné tepelné vodivosti v nejbližším okolí listu) a vzroste množství vodní páry uvnitř rostliny. Obojí se odrazí ve zvýšení hodnoty rychlosti transpirace na jednotku stomatální vodivosti. Ve výsledku dle Condon et al. (2002) nedojde snížením (c_i / c_a) k očekávanému výhodnému zlepšení W_T .

3.3.3 Metody vedoucí k vylepšení WUE plodin

Sinclair et al. (1984) popsali pět okruhů, v nichž by mohlo dojít ke změnám, které by vedly k vylepšení WUE plodin, u všech však zmínili určitý kompromis. Uvedli možnost úpravy v oblasti biochemických změn, ve fyziologii stomat, v úpravě pěstebního prostředí, vylepšení sklizňového indexu a navýšení objemu protranspirované vody.

V rámci biochemických intervencí navrhovali Sinclair et al. (1984) pokusit se vylepšit účinnost fotosyntézy rostlin, případně změnit charakter produktů, které dané rostliny generují (např. směrem podporujícím lepší odolnost rostlin). Ke druhé variantě se však autoři nepřikláněli, protože cílem pro pěstování rostlin je ve většině případů dosáhnout co největšího výnosu. Pracovali s myšlenkou, že okamžitou efektivitu využití vody na úrovni listu rostliny je možné vyjádřit zjednodušeně jako rozdíl v koncentracích CO₂. Tento rozdíl v koncentracích CO₂ měřili jako poměr parciálních tlaků tohoto plynu v rostlině a atmosféře. Pro C₃ rostliny je tento poměr konstantní, pro C₄ rostliny se hodnota této konstanty mění. Tuto konstantu (c) matematicky popsali jako rozdíl poměru parciálních tlaků CO₂ od hodnoty 1 (Sinclair et al. 1984):

$$c = 1 - (P_i / P_a) . \quad (33)$$

U C₃ nabývá c hodnoty 0,3 a pro C₄ má hodnotu 0,7. Tutéž hodnotu pro nestresované

C₄ rostliny udávají Farquhar et al. (1989). Na základě uvedených hodnot Sinclair et al. (1984) předpokládali, že se pro C₄ rostliny pravděpodobně nebudou výrazná zlepšení WUE ubírat cestou vylepšení c, jelikož už nyní je jeho hodnota blízka 1. Pro C₃ rostliny je tato cesta (přes šlechtění na lepší užití CO₂) vylepšení WUE možná skrze účinnější karboxylaci a skrze snížení stomatální rezistence. Doteď bylo toto vylepšování C₃ WUE řešeno cestou výběru kultivarů s lepší c (Sinclair et al. 1984).

Při uvažování o zvýšení WUE díky úpravě fyziologie stomat, nastínili Sinclair et al. (1984) možnost snížení ztráty vody během transpirace pomocí zvýšení citlivosti reaktivity průduchů na vnější podmínky. Doufali v dosažení uzavření průduchů v polední době, kdy je rozdíl mezi hodnotou saturace vodní páry v listu (e^*_a) a množstvím vodní páry v atmosféře (e) nejvyšší. Deficit vodní páry představený členy ($e^*_a - e$) je parametrem WUE, jenž je s využitím vody v rostlině v nepřímé úměře. Pro dosažení nezměněné produktivity by však při zvýšené reaktivitě průduchů bylo nutné prodloužit pěstební dobu plodiny, což by vyžadovalo zajistit rostlinám zvýšenou ochranu proti dalším vnějším stresům (Sinclair et al. 1984).

Ohledně změny pěstebního prostředí Sinclair et al. (1984) navrhovali, že pokud by plodiny byly pěstovány ve vlhčím klimatu, či vlhčí části pěstební sezóny, došlo by k omezení deficitu vodní páry (vytvořeného rozdílem v tlaku vodní páry mezi atmosférou a rostlinou ($e^*_a - e$) a využití vody rostlinou by se tak zvýšilo. Šlechtění tohoto typu rostlin by bylo praktické pro plodiny s nejvyšší hodnotou růstu na počátku jejich života v chladnějších jarních měsících (v případě klimatu mírného pásma). Tyto rostliny by však vzhledem k této adaptaci dosahovaly nižšího sklizňového indexu Sinclair et al. (1984).

Dle Sinclair et al. (1984) je sklizňový index (harvest index - H) v přímé úměře s WUE. K vylepšení sklizňového indexu je dle autorů vhodnější pěstování ranějších kultivarů, u nichž nedochází k vodnímu deficitu v reprodukčních fázích vývoje.

Z rovnice WUE (Growth, Transpiration, seasonaly) vyvodili autoři, že transpirace a rostlinná produkce (sklizňový index) jsou v přímé úměře:

$$WUE (G, T, s) = H \int k_d T / (e^*_a - e) / \int T . \quad (34)$$

Rostliny, které jsou pěstovány v prostředí s nedostatkem vody, by mohly být šlechtěny na vytvoření větší masy kořenů, aby dosáhly hlouběji do půdy. Taková adaptace by ale současně měla nevýhodu v podobě změněného fitness rostliny a také rychlejšího vyčerpání dostupné vody. Pro zvýšení množství vody dostupného pro rostlinu by tedy bylo vhodnější využít agronomických úprav jejího prostředí ve formě snížení povrchového odtoku, zamezení rychlého vsakování do spodních vod a snížení evaporace (Sinclair et al. 1984).

3.4 Využití ^{13}C ve šlechtění rostlin na zvýšení WUE, odolnost při suchu a zasolení

Rostliny jsou schopny ovlivnit změnou poměru koncentrací a kontrolou aktivity průduchů kolik vody vytranspirují za současného získání uhlíku. Této regulaci ztráty vody se říká vnitřní využití vody (W_t) a je to jev nepřímo měřitelný jako diskriminace ^{13}C (Condon et al. 2002).

O nalezení vztahu mezi CO_2 v mezibuněčném prostoru a poměrem izotopů uhlíku v jednotlivých rostlinách se zasloužili autoři Farquhar et al. (1982). Farquhar a Richards (1984) uvádí, že by tento vztah mohl být použit na vyšlechtění genotypů s vysokou transpirační efektivitou a genotypů s větším výnosem suché hmoty při přísušku. Stavěli svá měření na předpokladu, že vnitrobuněčná koncentrace CO_2 je jedním z významných faktorů ovlivňujících efektivitu využití vody (WUE).

Condon et al. (1987) potvrdili, že vztah izotopového obsahu ^{13}C a WUE je použitelný pro volbu kultivarů snášejících sucho. V případě, kdy voda není v nedostatku, je růst výnosu zrna a plodin spojen s rostoucí hodnotou diskriminace ^{13}C . Na základě jejich práce lze uvažovat o diskriminaci ^{13}C jako o parametru použitelném pro hledání vhodného šlechtěnce s vyšším výnosem u pšenice. Změny ve vodivosti průduchů se zobrazují ve změnách diskriminace (Condon et al. 1987).

3.4.1 Měření WUE sledováním diskriminace izotopu uhlíku

Farquhar a Richards (1984) uvádějí, že analýza izotopového efektu uhlíku v rostlině může být velmi efektivní metodou k posouzení a vylepšení WUE u rostlin s omezenou dostupností vody. Měření diskriminace izotopu uhlíku ($\Delta^{13}\text{C}$) bylo autory Farquharem a Richardsem (1984) vybráno jako vhodné pro proměňování využití vody (WUE) v rostlině i pro svou praktičnost. Umožňuje totiž odběr vzorků nejen z laboratorních podmínek, ale i z terénu bez speciální péče o sledované rostliny. Qamar et al. (2012) potvrdil svým výzkumem vhodnost využití metody zjišťování $\Delta^{13}\text{C}$ v polních podmínkách. Navíc není při měření diskriminace izotopu uhlíku potřeba hlídat celkový příjem vody, který by měl být sledován u klasických metod (Farquhar a Richards 1984). Měření W_T pomocí měření $\Delta^{13}\text{C}$ je výhodné v tom, že je měřitelné v jakékoliv růstové fázi rostliny a ve všech jejích orgánech, jelikož si rostlina tento izotop uhlíku z větší části hromadí ve své biomase, je možné sledovat obsah v listech, stoncích, zrnech či v celé rostlině (Condon et al. 2002). Odběr části rostliny dále umožňuje analyzovat vývoj rostliny a neomezuje sběr dat na konec její vegetační sezóny

(Farquhar & Richards 1984). Pro izotopovou analýzu postačuje odebrat malé množství rostlinného materiálu, tato metoda je tedy snazší na skladování vzorků pro opakované pokusy.

Nevýhodou zjišťování WUE pomocí měření $\Delta^{13}\text{C}$ je, že tato metoda nedává informace o absolutním výnosu a o poměru celkového výnosu sušiny k vytranspirované vodě podává pouze nepřímé informace, jak uvádí Farquhar a Richards (1984). Nejistíme z ní informace o rychlosti fotosyntézy a dalším problémem je nemožnost zjištění původce změny v c_i / c_a (tedy i ve W_T). Měření $\Delta^{13}\text{C}$ také neumožňuje získání informací o hodnotách koncentrace vodní páry v rostlině a atmosféře (w_i , w_a) v době měření a o výměně CO_2 s okolím (Condon et al. 2002). Tanner a Sinclair (1983) měli rozdíl mezi w_i a w_a za veličinu, která je odpovědná za variaci v WUE v měřítku plodin. V neposlední řadě je měření $\Delta^{13}\text{C}$ také finančně náročné na reagentie a přístrojové vybavení (Farquhar & Richards 1984).

3.4.2 Diskriminace ^{13}C a šlechtění rostlin na zvýšení WUE a odolnosti při suchu

O'Leary (1988) se ve své práci pokusila pomocí analýzy založené na diskriminaci ^{13}C určit, na které oblasti fotosyntézy se zaměřit šlechtěním, aby se zvýšila efektivita využití uhlíku. Na základě změřených hodnot dílčích diskriminací a izotopových obsahů ^{13}C tvrdila, že je pro diskriminaci u C_3 rostlin podstatný průběh karboxylace, a že diskriminace C_4 rostlin je definována hlavně frakcionací při difuzi. Jelikož karboxylace je nevratný krok reakce, následné kroky již neovlivňují izotopovou frakcionaci (O'Leary 1988). Enzym Rubisco ($b_{(3)} \cong 28 \text{‰}$ diskriminuje ^{13}C silněji než PEPC ($b_4 \cong -5,7 \text{‰}$), ale protože PEPC karboxylace vstupuje do reakce první, diskriminace v Calvinově cyklu již nemá na produkty reakce vliv (Farquhar 1983; O'Leary 1988). Předpokladem pro hypotézu, že diskriminace rostlin s C_4 typem fotosyntézy je ovládána převážně hodnotou frakcionačního faktoru při difuzi je fakt, že se k enzymu Rubisco dostávají produkty původně zpracované PEPC, u kterých již k izotopové frakcionaci došlo (O'Leary 1988). C_4 rostliny jsou podle O'Leary (1988) tedy limitovány ve využití uhlíku během difuze. U C_3 rostlin je diskriminace nejvíce limitovaná karboxylační aktivitou. Ke zlepšení využití uhlíku (bez zhoršení využití vody rostlinou - WUE) by tedy vedla cesta přes zvýšení aktivity enzymu Rubisco a šlechtěním na odolnost proti fotorespiraci. U C_3 rostlin dochází k 30% ztrátám asimilovaného CO_2 díky fotorespiraci, které C_4 rostliny téměř nepodléhají kvůli nízkému kompenzačnímu bodu fotosyntézy a vysoké efektivitě práce PEPC (Sinha 2004).

Dingkuhn et al. (1991) pracovali na nalezení odrůdy rýže, která by co nejlépe snášela suché podmínky. V jejich práci se ukázalo, že změny v diskriminaci ^{13}C a WUE nebyly u odrůd rýže působeny obsahem dusíku ani průduchovou vodivostí (g_s). Nízká hodnota

průduchové vodivosti však dle těchto autorů bývá zpravidla spojena s vysokými hodnotami diskriminace ^{13}C . Stanovili měření diskriminace ^{13}C a WUE z listu jako selekční metodu k volbě genotypu rýže, který by lépe snášel stres suchem (Dingkuhn et al. 1991).

Scartazza et al. (1998) sledovali diskriminaci ^{13}C a WUE nejen na listech, ale zahrnuli do studie i analýzu stonků rostlin rýže. Sledovali diskriminaci v produktech fotosyntézy. Zaměřili se hlavně na mezofylovou vodivost a její vliv na asimilaci CO_2 a na efektivitu využití vody (WUE). Asimilace CO_2 reagovala v přímé úměře na mezofylovou vodivost, což bylo zřejmé z pozorovaných současně klesajících hodnot mezofylové vodivosti a diskriminace ^{13}C . Jelikož diskriminace ^{13}C v uhlovodících extrahovaných ze stonku měla přímý vztah s relativní rychlostí růstu rostliny a obojí negativně ovlivňovalo WUE v čase kvetení a časného růstu zrna, zvolili Scartazza et al. (1998) analýzu diskriminace v uhlovodících v listech a stoncích jako indikátor růstu a fotosyntetických předpokladů k dosažení vyššího výnosu za stresu suchem na rostlinách rýže.

Qamar et al. (2012) také použili metodu zjištění diskriminace izotopu uhlíku na selekci kultivarů rýže za podmínek vodního stresu. Metoda byla zvolena na základě faktu, že se v předchozích studiích projevil kladný vztah mezi výnosem zrna a diskriminací ^{13}C v listech a slámě rýže u variant rýže šlechtěných na výnos zrna (mezi genotypy RSP-1, RSP-2, RSP-3, RSP-4, RSP-5 se varianty RSP-1 a RSP-2 ukázaly jako nejvýnosnější a nejlépe hospodařící s vodou).

Ve studii autorů Qamar et al. (2012) bylo poprvé popsáno použití $\Delta^{13}\text{C}$ k selekci genotypu snášejícímu lépe vodní stres a stres zasolením současně v prostředí nížinných zavlažovaných rýžových polí v Pákistánu. Jedním z možných důvodů proč stoupá účinnost využití vody v zrně za stresových podmínek je, že stres snižuje rychlost transpirace více než rychlost asimilace uhlovodíků. Použili tedy diskriminaci ^{13}C k selekci odrůdy vhodné pro sušší podmínky vycházející z předpokladu, že kultivar odolávající suchu odčerpává méně ^{13}C než kultivar podléhající suchým podmínkám (Qamar et al. 2012).

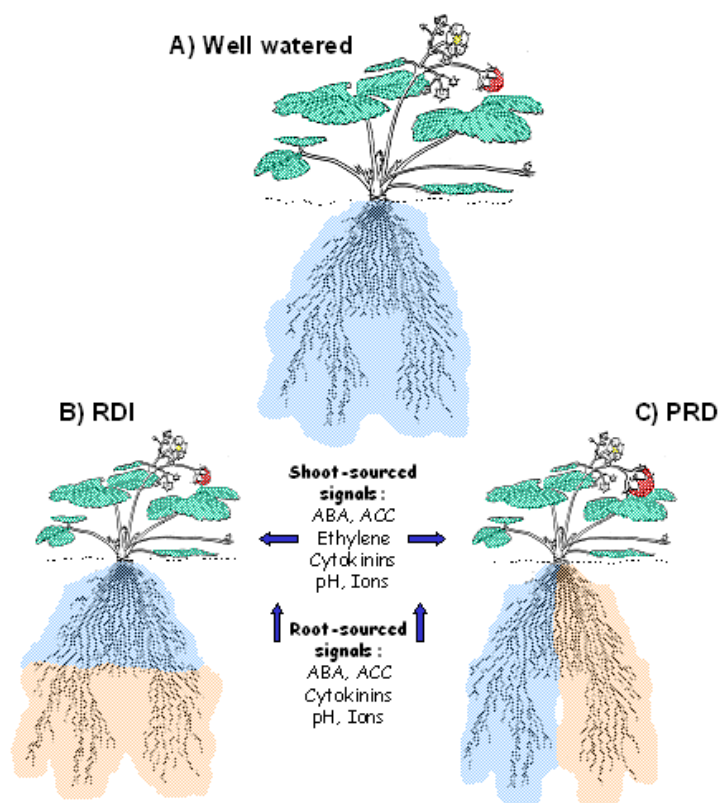
Condon et al. (2002) uskutečnili pokusy s pšenicí (*Triticum aestivum* L.), tvrdozrnnou pšenicí (*Triticum turgidum* L.) a ječmenem (*Hordeum vulgare* L.) na ověření vztahů g_s , W_T a $\Delta^{13}\text{C}$ v prostředích s dostatečným zásobením vodou a jejím kontrolovaným omezením tak, aby výsledky mohly být přičteny sledovaným parametrům.

Navzdory odlišným hodnotám ve sledovaných parametrech oba kultivary využily v sušší z oblastí téměř stejné množství vody. Uvedení autoři proto konstatují, že vyšší hodnota W_T způsobená malou hodnotou g je vhodným parametrem u kultivarů určených pro sušší podmínky, kde rostliny musí pracovat s vodou z půdních zásob, kdežto v dobře

zavlažovaných prostředích takovéto kultivary nedokáží využít potenciál prostředí a nejsou pro ně vhodné (Condon et al. 2002).

De Souza et al. (2005) testovali rostliny vinné révy na využití vody rostlinou (WUE_i) autoři použili vztah pro rychlost fotosyntézy v poměru k průduchové vodivosti (A / g_s) a izotopové složení ($\delta^{13}C$) za různých podmínek dostupnosti vody. Testovali rostliny při třech rozdílných typech zavodnění: při úplném zavlažování (FI) odpovídající 100% evapotranspiraci plodin (ET_c), při srážkovém zavlažování bez umělé závlahy (NI) a při dvou druhách nedostatkovém zavlažování "deficit irrigation", které odpovídalo 50% ET_c . Tyto dva druhy nedostatkového zavlažování se lišily místem, do něhož byla voda dodávána. První typ spočíval ve střídavém zavlažení dávkou vody z 50% ET_c , do vertikálně rozdělených polovin kořenového systému (PRD - „partial root zone drying“), přičemž ke změně stran docházelo v 15 denních intervalech. Druhým typem bylo klasické nedostatkové zavlažování (DI), které se od předešlého lišilo tím, že zalévací dávka vody měla hodnotu poloviny ET_c (50 %), s rozdělením závlahy na poloviny (25%) na každou stranu rostliny vinné révy (de Souza et al. 2005).

Metoda PRD – partial root zone drying je popsána Daviesem a Hartungem (2004). Funguje na principu toho, že je kořenový systém rozdělen do dvou částí, které jsou zavlažovány střídavě, kdy jedna z nich trpí vodním deficitem (viz Obr. 2). Závlaha musí být optimalizována, aby nedošlo ke ztrátě turgoru v nadzemní části rostliny. Výsledkem je nižší transpirace, kvůli zavřeným průduchům a současně vyšší výnos, jelikož je rostlina dobře zavlažována z druhé části kořenů.



Obr. 2: Metoda částečného zavlažování (převzato z Daviese a Hartunga 2004).

Část (C) Obr. 2 zobrazuje metodu částečného zavlažování, při které je v kořenovém systému bariéra umožňující střídavé zavlažování obou částí. Ta část kořenového systému vystavená stresu suchem generuje vyšší množství kyseliny abscisové, která vede k uzavírání průduchů, čímž se sníží transpirace a zvýší WUE. Současně s tím je rostlina dobře zavodněna druhou částí kořenového systému, což má celkově za následek vysokou kvalitu a velikost plodů při o něco menším habitu rostliny. Davies a Hartung (2004) při této metodě zavlažování deklarovali dosažení i vyšší než běžné velikosti plodů. Tato metoda vyžaduje optimalizaci střídavého zavodnění, aby byl v rostlině zachován turgor. Část (A) Obr. 2 zobrazuje běžně zavlažovanou rostlinu standardního habitu a výnosu. Na schématu (B) Obr. 2 je rostlina zavlažována polovinou množství vody, což může vést k deficitu vrcholového růstu a má za následek menší výnos a velikost plodů. Pokud by suchem stresovaná část kořenů nebyla časem zavodněna, tato část kořenového systému by odumřela (Davies & Hartung 2004).

Na základě sledování "predawn" vodního potenciálu (Ψ_{pd} – měřeno před rozběskem) v listech rostlin vinné révy (Castelão, Moscatel) a jeho integrálu (S_{Ψ}) v letech 2001 a 2002 de Souza et al. (2005) usuzovali, že PRD působí ve prospěch lepšího využití vody rostlinou za sušších podmínek prostředí. K efektivnějšímu využívání vody docházelo dle autorů díky účinnější kontrole průduchů nebo také menšímu habitu rostlin a s ním spojeným nižším

množstvím laterálních listů (de Souza et al. 2005).

Sledované rostliny měly jednoznačně lepší vodní stav v případě PRD než v případě DI, ale rozdíly v hodnotách WUE_i a $\delta^{13}C$ mezi těmito typy zavlažení nebyly statisticky významné, což dle de Souzy et al. (2005) hovořilo o tom, že zavírání průduchů nebylo hlavním důvodem pro vylepšení vodního režimu ve sledovaných rostlinách. De Souza et al. (2005) přisuzovali naměřený lepší vodní režim spíše menšímu vzrůstu rostlin spojenému s nižší celkovou listovou plochou. Metodami PRD a DI ošetřené rostliny měly vyšší izotopové složení ^{13}C v porovnání s rostlinami plně zavlažovanými (FI). Stres suchem umocňuje rozdíly v hodnotách naměřených za vodních podmínek definovaných těmito metodami (de Souza et al. 2005).

De Souza et al. (2005) konstatovali, že rostliny vystavené deficitnímu zavlažování jsou v porovnání s plně zavlažovanými rostlinami schopny využívat vodu efektivněji. Využívání vody plodinami je dle nich ovlivněno odrudou rostliny a podmínkami prostředí s tím, že za sušších podmínek jsou reakce rostlin výraznější pro pozorovatele. V krátkodobém časovém výhledu je možné sledovat stav využití vody rostlinou jakožto A / g_s , v dlouhodobém výhledu je vhodným ukazatelem hodnota $\delta^{13}C$, která u rostlin stresovaných suchými podmínkami roste. Důsledky dostupnosti vody pro rostliny zobrazené v hodnotách $\delta^{13}C$ byly nejvíce výrazné u celých hroznových bobulí a jejich dužině. Nejužší provázání mezi hodnotami $\delta^{13}C$, A / g_s a S_{Ψ} se ukázalo v dužině bobulí a proto byla $\delta^{13}C$ autory zvažována jakožto vhodná veličina ke zhodnocení dostupnosti vody pro rostlinu během vegetační sezóny. V podmínkách Středomoří, kde dochází často koncem vegetační sezóny k suchům, mohly být hodnoty $\delta^{13}C$ naměřené v pletivech silně ovlivněny množstvím vody dodaném pomocí zavlažování (de Souza et al. 2005).

3.4.3 Diskriminace ^{13}C a stresová reakce rostlin na zasolení

Fawaz a Al-Chammaa (2013) studovali účinky různých úrovní zasolení na fyziologické parametry u tří odlišných genotypů ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Soustředili se na změny v diskriminaci uhlíku, vodivost průduchů, hmotnost sušiny, příjem dusíku a efektivita využití dusíku (NUE) při působícím zasolení. Sledovali také poměr koncentrace uhlíku v atmosféře a v rostlině.

Při zvýšení zasolení bylo prokázáno snížení diskriminace uhlíku, které bylo pravděpodobně způsobené uzavřením průduchů (na což poukazuje také fakt, že poměr v parciálních tlacích intercelulárního a atmosférického uhlíku výrazně poklesl). Snížený poměr mezi koncentracemi uhlíku v intracelulárním prostoru a v atmosféře (c_i / c_a) by mohl

dle autorů být také výsledkem dosažení vyšších hodnot rychlosti čisté fotosyntézy (fotosyntetická kapacita) než zavřením průduchů.

Fawaz s Al-Chammaa (2013) poukazují na to, že závislost NUE a výnosu sušiny s diskriminací uhlíku v rostlině se mění s úrovní zasolení, sledovaným orgánem a genotypem rostliny. C₃ rostliny za působení stresu diskriminují ¹³C, což se projeví jeho nižším zastoupením ve vytvořené sušině.

Guy et al. (1980) sledovali desetipercentilní nárůst izotopového složení (δ) u halofytů spojený se vzrůstajícím zasolením. O'Leary (1988) i Guy a Reidem (1986) tento nárůst přisuzovali snížení koncentrace vnitrobuněčného CO₂. K tomuto vztahu odkazuje rovnice (35) publikovaná O'Leary (1988), jež je v souladu s rovnicí (16a):

$$\Delta\delta = a + (b - a) [\text{CO}_2(\text{in})] / [\text{CO}_2(\text{ext})] . \quad (35)$$

O'Leary (1988) dále uvedla, že změny v rychlosti fotosyntézy rostlin vystavených zasolení, mohou být důsledkem změn ve stomatální vodivosti (g).

3.5 Využití ¹³C ke studiu průduchové, mezofylové vodivosti při fotosyntéze

Mezofylová vodivost (g_m) představuje difuzi CO₂ z mezibuněčného prostoru do míst karboxylace. Závisí na ní parciální tlak CO₂ v chloroplastech (Evans & von Caemmerer 2012). Mezofylová vodivost spolu s vodivostí průduchů kontrolují rychlost fotosyntézy (Tazoe et al. 2011). Podle Tazoe et al. (2011) je mezofylová vodivost sledovanou veličinou, jelikož je prvkem limitujícím fotosyntézu za určitých vnitrobuněčných koncentrací CO₂. g_s je nově měřena pomocí speciálního nastavitelného diodového laseru TDLAS, jehož částí je spektrometr (Tazoe et al. 2011)

Vrábl et al. (2009) dokázali silný vztah mezi vnitrobuněčnou koncentrací CO₂ a mezofylovou vodivostí, která je touto koncentrací ovládána. Také konstatovali, že vztah mezi průduchovou a mezofylovou vodivostí není závislý, ale obě jsou silně závislé na vnitrobuněčné koncentraci CO₂, přičemž jejich reakce se například za působení kyseliny abscisové liší.

Kodama et al. (2011) použili diskriminaci izotopu uhlíku ¹³C jako jednu z metod ke zjištění mezofylové vodivosti (g_m) v experimentu, při kterém se pokusili zjistit, která část listu bude vnášet nejmenší chybu do měření na základě odlišné anatomie listu v jeho různých částech. Naměřili rostoucí hodnoty rychlosti fotosyntézy (A) a stomatální vodivosti (g_s) ve směru od báze ke špičce listů jednoděložných rostlin s tím, že tyto parametry byly vůči sobě v přímé úměře, v oblasti špičky listů obě tyto hodnoty poklesly (Kodama et al. 2011).

Podle Pons et al. (2009) je vhodné použít nejméně dvě na sobě nezávislé metody měření g_m , protože se tím sníží chybovost měření. Kodama et al. (2011) proměřovali g_m pomocí tří různých metod: metodou srovnání křivek závislosti A na C_c (curve fitting method), přičemž C_c odkazuje na koncentraci CO_2 v místě karboxylace. Dále pracovali s metodou konstantního J (J označuje hustota toku látky) neboli s měřením fluorescence chlorofylu a metodou izotopové frakcionace s trvalou iradiací.

g_m rostla také směrem ke špičce listu, kde se její hodnota rovněž mírně snížila (Kodama et al. 2011). Oproti tomu se poměr mezibuňčné koncentrace CO_2 (C_i) a koncentrace CO_2 na povrchu chloroplastu (C_c) ukázaly (při měření směrem od báze ke špičce listu) jako parametry klesající. Ve špičce listu hodnota poměru C_i / C_c na rozdíl od g_m a g_s o trochu vzrostla (Kodama et al. 2011). Všechny tři použité typy měření g_m dosáhly obdobných hodnot. A / C_c a metoda konstantního J vydaly nejpodobnější výsledky, ale frakcionační metoda měla nižší hodnotu standardní chyby (Kodama et al. 2011).

Pozorované hodnoty diskriminace $^{13}C_{obs}$ (observation) vrostly v pletivech listů směrem od báze do dvou třetin jeho délky o 3,3 ‰ (Kodama et al. 2011). Podle informací zjištěných proměřováním práce nejdůležitějších enzymů karboxylujících CO_2 , nebyly za nárůst hodnot diskriminace zodpovědné enzymy Rubisco a PEPC (Kodama et al. 2011).

Proměrování A, g_s a g_m ukázalo, že měnicími se hodnoty A a g_s , ovlivňují diskriminaci jen málo, největší část změn v hodnotách diskriminace souvisela se změnami g_m (Kodama et al. 2011). Všechny tři typy testování hodnot g_m se shodovaly v tom, že g_m dosáhla své nejvyšší hodnoty ve dvou třetinách listu směrem od báze a že variace v jejích hodnotách podél délky listu odpovídá skutečnosti (Kodama et al. 2011). Na základě zjištěných hodnot mezofylové vodivosti Kodama et al. (2011) určili, že nejvhodnější místo pro vložení do listové komory se nachází v jedné třetině listové délky směrem od jeho báze.

Výsledky studie výzkumného týmu Kodama et al. (2011) naznačily, že anatomie listu silně ovlivňuje hodnoty mezofylové vodivosti a významně se tedy promítá do diskriminace.

3.6 Využití analýzy obsahu ^{13}C při studiu kompetice rostlin a smíšených rostlinných kultur

Podle Holma et al. (1977), kteří se ve své práci věnovali s převahou C_4 rostlinám, jsou plevele vyskytující se s pěstovanými plodinami často rostliny s odlišnou metabolickou drahou. Myšlenku použít izotopovou analýzu na rozlišení rostlin na základě jejich rozdílů ve fotosyntetických drahách v kompetitivních studiích a ve studiích sdruženého pěstování rostlin ve své práci přinesli Ludlow et al. (1976).

Ludlow et al. (1976) studii prováděli na směsi vzorků z rostlinných těl. Izotopový obsah ($\delta^{13}\text{C}$) různých rostlinných částí porovnávali i Badeck et al. (2005) a Klumpp et al. (2005). Klumpp et al. (2005) studovali rozdíly v obsahu izotopu ^{13}C mezi nadzemní a podzemní částí rostliny s tím, že mezi nimi nenalezli velký rozdíl. Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ se od sebe lišily pouze o několik promile (v případě vojtěšky - *Medicago sativa* kolem 2 ‰). Zaměnitelnost těchto dvou částí rostliny díky obsahu izotopu ^{13}C použili ve své práci Gealy a Fisher (2010).

Svejcar a Boutton (1985) prováděli studium ve výrobních oblastech, kde si C_3 a C_4 rostliny během dvou sezón vyměnily dominanci v habitu a fitness. V těchto podmínkách pro ně bylo klíčové nalézt metodu, kterou by kompetitivnost plodiny mohli sledovat důkladněji. Svejcar s Bouttonem (1985) byly jedni z prvních, kteří se při studiu kompetitivnosti rostlin izotopovou analýzou zaměřili na vztah mezi izotopovým obsahem a délkou kořenů.

Gealy a Gealy (2011) pracovali s různými druhy C_4 plevelů ve snaze stanovit křivku závislosti izotopového poměru uhlíku v rostlině k poměru obsahu plevelu a plodiny v testovaném vzorku. Účelem studie bylo vytvořit standardní křivky pro odečet poměru množství kořenů plodiny a plevelu k $\delta^{13}\text{C}$ ve směsi kořenů (a malého množství půdy kontaminující vzorek), aby usnadnili budoucí experimenty se selekcí kompetitivnějších odrůd rýže vůči určitému plevelnému druhu, což se jim podařilo. Stanovili, jaké plevelu mají nejvyšší a nejnižší hodnotu $\delta^{13}\text{C}$. Propočítali vliv celkové hmoty rostliny, množství uhlíku, uhlíkové frakce a $\delta^{13}\text{C}$ v kořenech a v půdě na proměny hledaných křivek. Podařilo se jim zpřesnit odhad $\delta^{13}\text{C}$ ve vzorcích kořenů kontaminovaných půdou a specifikovat poměr obsahu kořenů plodiny a plevelu (Gealy & Gealy 2011).

Gealy a Fisher (2010) studovali kompetitivnost dvou druhů rýže (Lemontova dlouhozrná rýže a PI 312777 plevel potlačující indická rýže) s Ježatkou kuří nohou (*Echinochloa cruz-galii*) na úrovni jejich kořenových systémů. K rozlišení kořenů z odebraných vzorků použili izotopovou analýzu obsahu ^{13}C , protože rýže a ježatka patří do odlišně fotosyntetizujících skupin rostlin. Rýže (jakožto C_3 rostlina) má oproti ježatce (C_4 rostlině) nižší $\delta^{13}\text{C}$, protože rostliny s C_3 fotosyntézou diskriminují proti izotopu ^{13}C výrazněji než rostliny s C_4 typem fotosyntézy. Výsledkem studie bylo zjištění, že se v polích s PI 312777 plevel potlačující indickou rýží vyskytovalo dvakrát méně plevelu ježatky, než v polích s dlouhozrnou Lemontovou rýží. Gealy a Fischer (2010) tedy v tomto experimentu prokázali úspěšnost využití isotopové analýzy obsahu uhlíku k volbě vhodnější odrůdy pro ježatkou zaplevelená pole a stanovili standardní hodnoty křivek poměru isotopů ^{13}C a ^{12}C k poměru obsahu kořenů rýže a kořenů ježatky ve zkušebním vzorku.

Opačný názor na záměnnost rostlinných částí oproti Gealy a Fischer (2010) měl Badeck et al. (2005). Ten tvrdil, že mezi listy a ostatními rostlinnými orgány je téměř vždy rozdíl v izotopovém složení ^{13}C (s výjimkou nedřevnatějících stonků, které se hodnotou blížily listům). Tento rozdíl ale nepovažoval za příliš výrazný, listy byly v průměru o 1,9 ‰ ochuzenější o těžký izotop uhlíku (^{13}C) a jeho vznik přičítal postfotosyntetické diskriminaci produktů fotosyntézy.

Eleki et al. (2005) úspěšně využili izotopovou analýzu $\delta^{13}\text{C}$ ke srovnání poměru objemu kořenových systémů u společné kultury kukuřice (*Zea mays*) a jetele kavkazského (*Trifolium ambiguum* M. Bieb.) používaného jako živý mulč. Analýza prokázala vysokou korelaci ($r_2 = 0,99$) mezi $\delta^{13}\text{C}$ a množstvím kukuřičné kořenové masy ve směsi kořenů kukuřice a jetele. Použití izotopové analýzy ^{13}C pro zkoumání pěstební směsi luštěniny a obilniny vyskytující se v tropickém a subtropickém zemědělství bylo navrženo Ludlowem et al. (1976).

4 Závěry (shrnutí získaných poznatků)

Vypracováním bakalářské práce vznikla literární rešerše pokoušející se nastínit: (1.) vztah diskriminace uhlíku ^{13}C a izotopového obsahu ^{13}C k fotosyntéze rostlin, (2.) k efektivitě využití vody, (3.) ke zjištění mezofylové vodivosti. Posléze byla pozornost věnována možnostem využití těchto teoretické informací v praxi (4) šlechtění rostlin na odolnost především vůči vodnímu deficitu a zasolení a (5) ke studiu kompetice rostlin a smíšených rostlinných kultur.

Zmíněné body lze shrnout ve smyslu následujících závěrů práce:

1. Diskriminace izotopu uhlíku ^{13}C umožnila studovat příjem a pohyb CO_2 rostlinou od míst vstupů do míst, kde byly produkty a meziprodukty (kyseliny a sacharidy) fotosyntézy uloženy, což umožnilo porovnávat transport látek a diskriminaci ^{13}C mezi různými moduly rostliny. Použití rovnice navržené Farquharem et al. (1982) dovolilo dosáhnout lepšího pochopení funkce a získat informace o možnosti šlechtění rostlin na základě informací podaných dílčími frakciovými specifickými metabolickými drah fotosyntézy. Do budoucna by soustředění na výzkum tímto směrem mohlo vést k lepšímu pochopení enzymů a usměrnění jimi katalyzovaných reakcí vhodným šlechtěním reakce.
- 2., 3., 4. Studium efektivitě využití vody rostlinou pomocí diskriminace ^{13}C a analýzy izotopového obsahu ^{13}C umožnilo navrhnout metody k vylepšení zmíněné efektivitě tak, aby bylo u sledovaných plodin dosaženo nárůstu žádoucích vlastností (např. průduchových vodivosti, transpirace a fotosyntézy. Při studiu fotosyntézy byla diskriminace ^{13}C z větší části regulována poměrem koncentrací CO_2 a poměrem koncentrací vodních par (Sinclair et al. 1983; Tanner a Sinclair 1983; Farquhar & Richards 1984; Condon et al. 2002). Metoda sledování využití vody v rostlině byla velmi úspěšně použita na volbu suchu (Quamar et al. 2012) a zasolení odolávajících odrůd (Guy et al. 1980; Guy & Reid 1986; Fawaz & Al-Chammaa 2013). Tato metoda měření byla jednou ze strategií zvolených ke studiu a k selekci odrůd s vyšším výnosem zrna a celkové biomasy rostliny (Quamar et al. 2012). Byla s úspěchem použita u studií na vinné révě k volbě ekonomičtějších zavlažovacích strategií (de Souza et al. 2005). Jinou výhodou u využití izotopové analýzy byla možnost porovnat vzorky kořenů z hlediska jejich objemu na jednotku půdy a dále možnost sledovat jejich délky. Obě strategie byly v rešerši představenými autory použity k posouzení kompetice

studovaných rostlin či smíšených kultur o vodu, světlo, živiny a prostor, což jim umožnilo zvolit vhodnou nejvíce kompetitivní odrůdu rýže v poměru ke studovaným plevelným rostlinám (Gealy & Fisher 2010; Gealy & Gealy 2011). Také se zmíněná metoda autorům osvědčila k porovnání kompetice kulturních plodin s polními plevelely a k porovnání téhož mezi dvěma kulturními plodinami, za podmínky kombinace rostlin s C₃ a C₄ metabolismem do páru (Ludlow et al. 1976; Eleki et al. 2005).

5. Sledováním hodnot mezofylové vodivosti měřením diskriminace ¹³C bylo možno získat nové informace o fyziologických procesech v rostlině a srovnatelnosti vyžití tří různých metod určených k posuzování mezofylové vodivosti (Kodama et al. 2011). Kromě fyziologických parametrů se autorům podařilo analýzu diskriminace ¹³C využít na zpřesnění metodiky měření s důrazem na studium heterogenity listu ve smyslu proměnlivých hodnot průduchové a mezofylové vodivosti a také fotosyntézy.

5 Literatura

- Badeck FW, Tcherkez G, Nogués S, Piel C, Ghashghaie J. 2005. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs - a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**:1381-1391.
- Bassham JA, Benson AA, Kay LD, Harris AZ, Wilson AT, Calvin M. 1954. The Path of Carbon in Photosynthesis. XXI. The Cyclic Regeneration of Carbon Dioxide Acceptor. *Journal of the American Chemical Society*, **76**:1760-1770.
- Bender MM. 1968. Mass spectrometric studies of carbon-13 variations in corn and other grasses. *Radiocarbon* **65**:468-472.
- Black CC, Osmond CB. 2003. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: 'working the night shift'. *Photosynthesis Research* **76**:329-341.
- Brand WA, Coplen TB, Vogl J, Rosner M, Prohaska T. 2014. Assessment of international reference materials for isotope-ratio analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **86**:425-467.
- Biel K, Fomina I. 2015. Benson-Bassham-Calvin cycle contribution to the organic life on our planet. *Photosynthetica* **53**:161-167.
- Brugnoli E, Farquhar GD. 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. Pages 399-434 in Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S, editors. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Brugnoli E, Hubick KT, von Caemmerer S, Wong SC, Farquhar GD. 1988. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C-3 plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon-dioxide. *Plant Physiology* **88**:1418-1424.
- Cernusak LA, Ubierna N, Winter K, Holtum JAM, Marshall, JD, Farquhar GD. 2013. Tansley review: Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist* **200**:950-965.
- Condon AG, Richards RA, Farquhar GD. 1987. Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field. *Crop Science* **27**:996-1001.
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD. 2002. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Science* **42**:122-131.
- Coplen TB. 2011. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**:2538-2560.

- Cowan IR. 1982. Regulation of water use in relation to carbon gain in higher plants. Pages 589-613 in Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, editors. *Physiological plant ecology: Water relations and carbon assimilation*. Springer, Berlin.
- Davies WJ, Hartung W. 2004. Has extrapolation from biochemistry to crop functioning worked to sustain plant production under water scarcity? International Crop Science Congress, Brisbane. Available from www.cropscience.org.au (accessed December 2018).
- De Souza CR, Maroco JP, dos Santos TP, Rodrigues ML, Lopes CM, Pereira JS, Chaves MM. Impact of deficit irrigation on water use efficiency and carbon isotope composition ($\delta^{13}C$) of field-grown grapevines under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany* **56**:2163-2172.
- Dingkuhn M, Farquhar GD, de Datta SK, O'Toole JC. 1991. Discrimination of ^{13}C among upland rices having different water use efficiencies. *Australian Journal of Agricultural Research* **42**:1123-1131.
- Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD. 1993a. Introduction: Water use in the relation to productivity. Pages 3-8 in Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD, editors. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. Academic Press, New York.
- Ehleringer JR, Vogel JC. 1993b. Historical aspects of stable isotopes in plant carbon and water relations. Pages 9-18 in Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD, editors. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. Academic Press, New York.
- Eleki K, Cruse RM, Albrecht KA. 2005. Root segregation of C_3 and C_4 species using carbon isotope composition. *Crop Science* **45**:879-882.
- Evans JR, Sharkey TD, Berry JA, Farquhar GD. 1986. Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas Exchange to investigate CO_2 diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**:281-292.
- Evans JR, von Caemmerer S. 2012. Temperature response of carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in tobacco. *Plant, Cell and Environment* **36**:745-756.
- Farquhar GD. 1983. On the nature of carbon isotope discrimination in C_4 species. *Australian Journal of Plant Physiology* **10**:205-226.
- Farquhar GD, Ehleringer JR., Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **40**:503-537.
- Farquhar GD, Lloyd J. 1993. Carbon and oxygen isotope effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere. Pages 47-70 in Ehleringer JR,

- Hall AE, Farquhar GD, editors. Stable isotopes and plant carbon-water relations. Academic Press, New York.
- Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **9**:121-137.
- Farquhar GD, Richards RA. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **11**:539-552.
- Fawaz K, Al-Chammaa M. 2013. Growth, carbon isotope discrimination and nitrogen uptake in silicon and/or potassium fed barley grown under two watering regimes. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* **9**:14-27.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H. 2008. Mesophyll conductance to CO₂: Current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment* **31**: 602-621.
- Fry B. 2006. Stable isotope ecology. Springer, Baton Rouge.
- Goodman HS. 1980. In: Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **9**:121-137.
- Guy RD, Reid DM. 1986. Photosynthesis and the influence of CO₂-enrichment on $\delta^{13}\text{C}$ values in a C₃ halophyte. *Plant, Cell and Environment* **9**:65-72.
- Gealy DR, Fischer AJ. 2010. ¹³C discrimination: A stable isotope method to quantify root interactions between C₃ rice (*Oryza sativa*) and C₄ barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in Flooded Fields. *Weed Science* **58**:359-368.
- Gealy DR., Gealy GS. 2011. ¹³Carbon isotope discrimination in roots and shoots of major weed species of southern US rice fields and its potential use for analysis of rice-weed root interactions. *Weed science* **59**:587-600.
- Guy RD, Reid DM, Krouse HR. 1980. Shifts in carbon isotope ratios of two C₃ halophytes under natural and artificial conditions. *Oecologia* **44**:241-247.
- Hatch MD. 1987. C₄ photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* **895**: 81-106.
- Hatch MD, Slack CR. 1966. Photosynthesis by sugarcane leaves: A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal* **101**:103-111.
- Heyne B. 1816. On the deoxidation of the leaves of *Cotyledon calycina*. *Transactions of the Linnean Society of London* **11**:213-215.

- Holm LG, Plucknett DL, Pancho JV, Herberger JP. 1977. The world's worst weeds: Distribution and biology. University Press of Hawaii, Honolulu.
- Keeling CD. 1958. The concentration and isotopic abundances of atmospheric carbon dioxide in rural areas. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **13**:225-344.
- Keeling CD, Mook WG, Tans PP. 1979. Recent trends in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of atmospheric carbon dioxide. *Nature Publishing Group* **277**:121-123.
- Kluge M, Ting IP. 1978. Crassulacean acid metabolism: Analysis of an ecological adaptation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Klumpp K, Schäufele R, Lötscher M, Lattanzi FA, Feneis W, Schnyder H. 2005. C-isotope composition of CO_2 respired by shoots and roots: fractionation during dark respiration? *Plant, Cell & Environment* **28**:241-250.
- Kodama N, Cousins A, Tu KP, Barbour MM. 2011. Spatial variation in photosynthetic CO_2 carbon and oxygen isotope discrimination along leaves of the monocot triticale (*Triticum* × *Secale*) relates to mesophyll conductance and the Pécelet effect. *Plant, Cell and Environment* **34**:1548-1562.
- Kondo M, Pablico PP, Aragonés DV, Agbisit R. 2004. Genotypic variations in carbon isotope discrimination, transpiration efficiency, and biomass production in rice as affected by soil water conditions and N. *Plant and Soil* **267**:165-177.
- Kortschak HP, Hartt CE, Burr GO. 1965. Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves. *Plant Physiology* **40**:209-213.
- Lanigan GJ, Betson N, Griffiths H, Seibt U. 2008. Carbon isotope fractionation during photorespiration and carboxylation in *Senecio*. *Plant Physiology* **148**:2013-2020.
- Lerman JC. 1975. How to interpret variations in the carbon isotope ratio of plants: Biologic and environmental effects. Pages 323-335 in Marcelle R, editor. *Environmental and Biological Control of Photosynthesis*. Dr. W. Junk b.v. Publishers, The Hague.
- Long SP, Bernacchi CJ. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2393-2401.
- Ludlow MM, Troughton JH, Jones RJ. 1976. A technique for determining the proportion of C_3 and C_4 species in plant samples using stable natural isotopes of carbon. *The Journal of Agricultural Science* **87**:625-632.
- Meidner H. 1986. Historical sketch 24. *Journal of Experimental Botany* **37**:1921-1922.
- Meier-Augenstein W. 2010. *Stable isotope forensics: An introduction to the forensic application of stable isotope analysis*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

- O'Leary MH. 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* **20**:553-567.
- O'Leary MH. 1988. Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience* **38**:328-336.
- O'Leary MH. 1993. Biochemical basis of carbon isotope fractionation. Pages 19-28 in Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD, editors. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. Academic Press, New York.
- Park R, Epstein S. 1960. Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **21**:110-126.
- Pons TL, Flexas J, von Caemmerer S, Evans JR, Genty B, Ribas-Carbo M, Brugnoli E. 2009. Estimating mesophyll conductance to CO₂: methodology, potential errors, and recommendations. *Journal of Experimental Botany* **60**:2217-2234.
- Procházka S. 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha.
- Qamar ZU, Akhtar J, Ashraf MY, Sabir SA, Ishaq W. 2012. Use of carbon isotope discrimination technique to sustain rice productivity under stressed and low land irrigated ecosystem of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany (Special Issue)* **44**:85-93.
- Shirazi MU, Khan MA, Mujtaba SM, Shereen A, Hood RC, Mayr L, Khan MA, Mahboob W. 2015. Evaluation of salt tolerance in wheat genotypes on growth and carbon isotopes discrimination technique. *Pakistan Journal of Botany* **47**:829-833.
- Sinha RK. 2004. *Modern plant physiology*. Alpha Science International Ltd., Pangbourne.
- Sinclair TR, Tanner CB, Bennett JM. 1984. Water-use efficiency in crop production. *BioScience* **34**:36-40.
- Scartazza A, Lauteri M, Guido MC, Brugnoli A. 1998. Carbon isotope discrimination in leaf and stem sugars, water-use efficiency and mesophyll conductance during different developmental stages in rice subjected to drought. *Functional Plant Biology* **25**:489-498.
- Svejcar TJ, Boutton TW. 1985. The use of stable carbon isotope analysis in rooting studies. *Oecologia* **67**:205-208.
- Svejcar TJ, Boutton TW, Trent JD. 1990. Assessment of carbon allocation with stable carbon isotope labeling. *Agronomy Journal* **82**: 18-21.
- Šantrůček J, Hronková M, Květoň J, Sage RF. 2003. Photosynthesis inhibition during gas exchange oscillations in ABA-treated *Helianthus annuus*: Relative role of stomatal patchiness and leaf carboxylation capacity. *Photosynthetica* **41**:241-252.
- Tanner CB, Sinclair TR. 1983. Efficient water use in crop production: Research or Research? Pages 1-27 in Taylor HM, Jordan WR, Sinclair TR, editors. *Limitations to efficient water use in crop production*. Amer Society of Agronomy, Madison.

- Tazoe Y, von Caemmerer S, Estavillo GM, Evans JR. 2011. Using tunable diode laser spectroscopy to measure carbon isotope discrimination and mesophyll conductance to CO₂ diffusion dynamically at different CO₂ concentrations. *Plant, Cell & Environment* **34**:580-591.
- Urey HC, Lowenstam HA, Epstein S, McKinney CR. 1951. Measurement of paleotemperatures and temperatures of the Upper Cretaceous of England, Denmark, and the southeastern United States. *Geological Society of America Bulletin* **62**:399-416.
- Vogel JC. 1993. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. Pages 29-46 in Ehleringer JR, Hall AE, Farquhar GD, editors. *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. Academic Press, New York.
- Vrábl D, Vašková M, Hronková M, Flexas J, Šantrůček J. 2009. Mesophyll conductance to CO₂ transport estimated by two independent methods: Effect of variable CO₂ concentration and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **60**:2315-2323.
- Xu Y, This D, Pausch RC, Vonhof WM, Coburn JR, Comstock JP, McCouch SR. 2009. Leaf-level water use efficiency determined by carbon isotope discrimination in rice seedlings: genetic variation associated with population structure and QTL mapping. *Theoretical and Applied Genetics*. **118**:1065-1081.
- Yeh HW, Wang WM. 2001. Factors affecting the isotopic composition of organic matter. (1) Carbon isotopic composition of terrestrial plant materials. *Proceedings of the National Science Council, ROC(B)* **25**:137-147.

