

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



Vliv kvality fotosynteticky aktivní radiace na difúzní limitace fotosyntézy

Bakalářská práce

Jitka Neuwirthová

Školitel: Mgr. Daniel Vrábl

České Budějovice 2012

Neuwirthová J. 2012. Vliv kvality fotosynteticky aktivní radiace na difúzní limitace fotosyntézy [Effect of light quality on diffusion limitations of photosynthesis. Bc. Thesis, in Czech], 29 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Stomatal and mesophyll conductance are two crucial components of diffusionall limitations of photosynthesis. Gas-exchange measurements of A_N/C_i curves and carbon isotope discrimination within photosynthesis were carry out to evaluated the size of diffusionall limitations of photosynthesis at blue, green and red light The results were discussed in relation to variable energy supply of the blue, green and red photons of incident light.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou Univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Tcheses.cz, provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 27.4.2012

.....
Jitka Neuwirthová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému školiteli Mgr. Danielu Vrábloví za vedení během celé mé práce, trpělivou pomoc, konstruktivní připomínky a cenné podmínky. Dále chci poděkovat celému kolektivu laboratoře katedry fyziologie rostlin, zvláště pak Danovi a Láďovi, za pomoc při měření a Martině při korekci. Velké díky za podporu patří mým psím i ostatním kamarádům a rodině.

Obsah

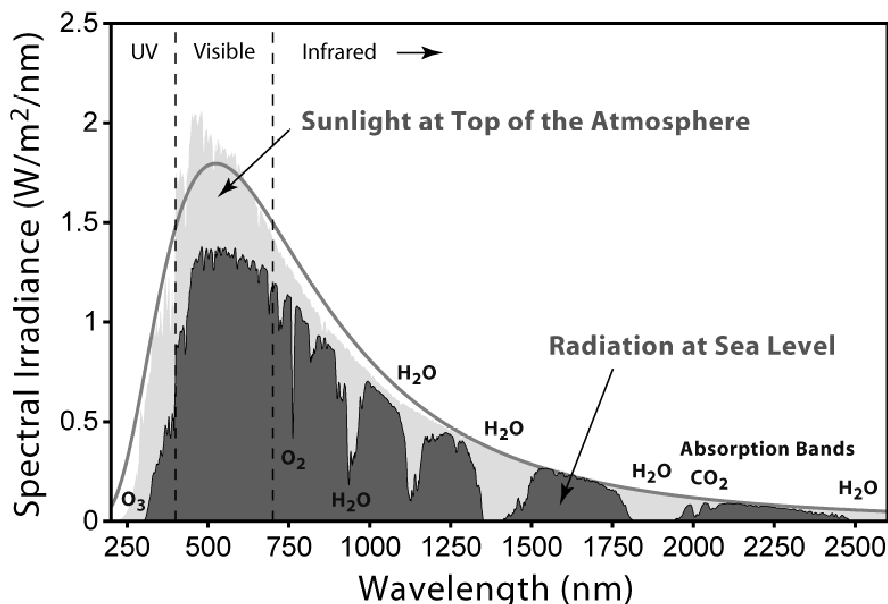
1. Seznam používaných zkratk.....	1
2. Úvod.....	2
3. Teoretická část	3
3.1. Difúzní limitace	3
3.2.Receptory záření ve viditelné oblasti a jejich vliv na proces fotosyntézy.....	10
4. Experimentální část.....	15
4.1.Cíl práce.....	15
4.2.Materiál a metody	15
5. Výsledky	18
6. Diskuse.....	21
7. Použitá literatura:	24

1. Seznam používaných zkratek

Zkratka	Název	Jednotka
λ	vlnová délka	nm
Δ	diskriminace ^{13}C	‰
A_N	Rychlost asimilace CO_2	$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
CA	anhydráza kyseliny uhličitě	
C_a	koncentrace CO_2 v okolním prostoru	$\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$
C_c	koncentrace CO_2 v chloroplastech	$\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$
C_i	Koncentrace CO_2 v průduchové dutině	$\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$
cry	krytochrom	
DCMU	3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimethylurea	
g_m	Mezofylová vodivost	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
g_s	Průduchová vodivost	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
HvPIP2;1	aquaporin plasmatické membrány	
LOV doména	light, oxygen and voltage doména	
<i>npq1</i> mutace	mutanty bez zeaxantinu	
NtAQP1	aquaporin plasmatické membrány	
PAR	Photosynthetically Active Radiation	$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
phot	fototropin	
phy	fytochrom	
Q_{10}	teplotní koeficient	

2. Úvod

Sluneční záření je primární zdroj energie pro veškerý život na Zemi. Než se dostane přes atmosféru na zemský povrch, jeho spektrum se změní. Je to vlivem přítomnosti různých plynů, například ozónu, vodních par, kyslíku atd. (obr. 1).



Obr. 1: Spektrum slunečního záření nad atmosférou a na povrchu Země.

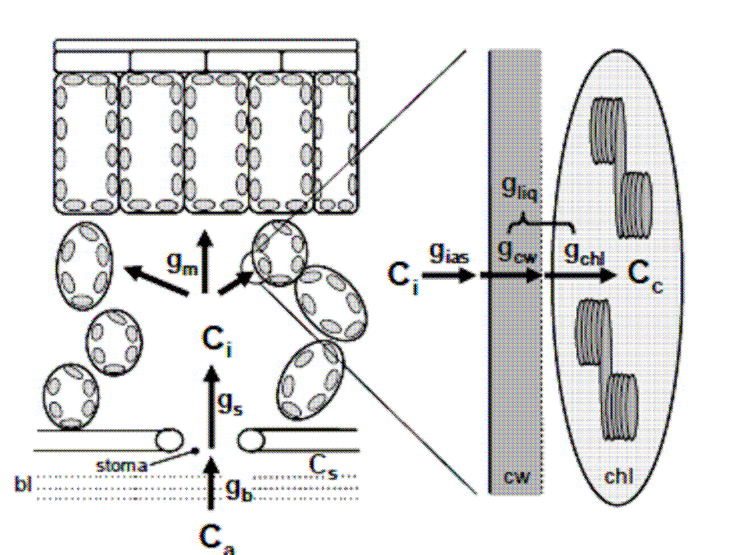
Zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/Sunlight>

V mé práci jsem se zabývala vztahem mezi kvalitou PPFD (photosynthetic photon flux density) a difúzními limitacemi fotosyntézy. Hlavními odpory pro CO₂ při cestě z okolního vzduchu do chloroplastu (do míst karboxylace) je průduchová a mezofylová vodivost. O funkci a regulaci průduchové vodivosti bylo napsáno mnoho, avšak mechanismy regulace mezofylové vodivosti jsou stále velkou neznámou. Pieruschkova práce (2010) ukázala nový pohled na mechanismus regulace průduchové vodivosti. Jako jediný regulátor je podle něj energie dopadajícího záření, popírá tedy funkci jakýchkoliv fotoreceptorů. V této práci jsem chtěla zjistit, jestli by na změnu vlnové délky dopadajícího záření (a tedy na změnu toku energie) nereagovala také mezofylová vodivost, tudíž jestli se nejedná o jednotčící mechanismus regulace průduchové a mezofylové vodivosti.

3. Teoretická část

3.1. Difúzní limitace

Při procesu fotosyntézy musí být oxid uhličitý transportován z atmosféry až do stromatu chloroplastu, kde dojde ke karboxylaci. Během této cesty je tok CO_2 limitován řadou difúzních odporů. První je odpor hraniční vrstvy. Jedná se o vrstvu vzduchu u povrchu listu, kde je proudění vzduchu pomalejší než v okolí. U krajů listu je hraniční vrstva nejmenší, roste ve směru toku až k maximální hodnotě. Směrem od listu stoupá rychlost proudění vzduchu exponenciálně, objeví se turbulentní proudění a ve větší vzdálenosti je již rychlost proudění shodná s okolím. Protože vlastnosti hraniční vrstvy nejsou stejné kolem celého listu, pro matematické výpočty se užívá dohodnutá veličina zástupná účinná tloušťka hraniční vrstvy, což je tloušťka vrstvy nehybného nebo čistě laminárně proudícího vzduchu. Na velikost této limitace má vliv rychlost větru (nepřímá úměra) a velikost listu (přímá úměra). Vliv hraniční vrstvy na celkový transport CO_2 bývá malý a často je zanedbáván (Procházka et al., 1998). Další limitací je difúze skrz průduchy, poslední je potom tzv. mezofylová vodivost, což je cesta z podprůduchové dutiny skrz buněčnou stěnu, cytoplasmatickou membránu, cytosol buňky, membrány chloroplastu až do stromatu chloroplastu (obr. 2) (Evans and von Caemmerer, 1996). CO_2 tedy musí projít plynnou a kapalnou fází a jako významné difúzní limitace fotosyntézy můžeme označit právě průduchovou a mezofylovou vodivost.



Obr. 2: Schéma difúzní cesty CO_2 z okolního vzduchu (C_a) přes průduchy (C_s) a mezibuněčný prostor (C_i) do chloroplastu (C_c). Znáznorněna je i vodivost hraniční vrstvy (g_b), průduchová vodivost (g_s) a mezofylová vodivost (g_m). Tři složky mezofylové vodivosti jsou v detailu zobrazeny v pravé části obrázku – vodivost skrz mezibuněčný prostor (g_{ias}), vodivost skrz buněčnou stěnu (g_{cw}) a vodivost do chloroplastu (g_{chl}) (Hisem, 2011)

3.1.1. Průduchová vodivost

Průduchy jsou útvary na pokožce listu tvořené dvojicí svěřacích buněk a umožňují rostlině kontrolovat výdej vody a příjem oxidu uhličitého. Tato regulovatelná bariéra umožňuje udržovat v rovnováze dostatečný příjem CO₂ a současně ztrátu vody během transpirace.

Velikost průduchové štěrbině je ovlivňována rozdílem turgoru ve svěřacích buňkách a v podpůrných buňkách. Je známo hned několik mechanismů regulace a to jak vnějšími faktory, tak vnitřně fyziologicky. Jedná se o reakci průduchů na červené a modré světlo, na změnu koncentrace CO₂ v mezibuněčném prostoru, vliv vlhkosti vzduchu nebo reakci na přítomnost fytohormonu kyseliny abscisové (Procházka et al., 1998).

Otevírání průduchů je indukováno modrou a červenou složkou PAR (photosynthetically active radiation) (Briggs et Christie, 2002; Frechilla et al., 2000; Kinoshita et al., 2001; Lawson, 2009; Roelfsema et al., 2006; Serrano et al., 1988). Modrá složka aktivuje H⁺-ATPázu v plazmatické membráně, dojde k hyperpolarizaci membránového potenciálu spolu se souběžnou acidifikací apoplastu, což vede k přesunu draselných iontů skrz napětově ovládané K⁺- kanály. Tím dojde k poklesu vodního potenciálu a k následnému nasání vody. Zvětší se objem vakuol a díky specifickému, asymetrickému uložení mikrofibril v buněčných stěnách průduchů dojde ke zvětšení průduchové štěrbině (Shimazaki et al., 2007). Tato reakce je přisuzována fotoreceptorům fototropinům (Briggs and Christie, 2002). Fototropiny mají navázány dvě LOV domény, které po fotoexcitaci modrou složkou PAR spustí jejich autofosforylaci. LOV doména prochází fotocyklem: ve tmě váže chromofor flavin mononukleotid (FMN) nekovalentně, jedná se o základní, neaktivní LOV₄₄₇ formu. Ozářením vznikne během mikrosekund kovalentní vazba a aktivní LOV₃₉₀ forma. Tato reakce je ve tmě reversibilní (zpětná reakce je pomalejší, trvá desítky až stovky sekund). Tyto dvě formy mezi sebou přechází v závislosti na ozáření. Pro zvětšení průduchové štěrbině musí dojít k aktivaci H⁺-ATPázy plazmatické membrány svěřacích buněk, kterou vyvolá fosforylace H⁺-ATPázy a navázání proteinu 14-3-3. Protein 14-3-3 patří do silně konzervované proteinové rodiny, která typicky váže fosforylované cílové proteiny a reguluje signalizaci eukaryotních buněk. Spekuluje se o tom, že právě navázání 14-3-3 proteinu způsobuje interakci mezi fototropinem a H⁺-ATPázou (Christie, 2007). Fosforylaci a následné navázání 14-3-3 proteinu může vyvolat i při absenci fototropinu 1 (phot1) a fototropinu 2 (phot2) houbový toxin fusikocin (Kinoshita and Shimazaki, 2001). Pokusy s mutanty *Arabidopsis thaliana* ukázaly,

že pokud byla mutace pouze v jednom genu (tedy *phot1* nebo *phot2* mutanty), došlo ke zvětšení průduchové štěrbině (jen citlivosti na modré světlo byla nižší než u divokého typu). Až u dvojnásobně mutantní rostliny *phot1phot2* se neobjevila žádná reakce na modrou složku PAR (Kinoshita et al., 2001). Celá tato reakce zřejmě probíhá ve svěřacích buňkách. Zeiger a Hepler (1977) prokázali zvětšení objemu izolovaných svěřacích buněk cibule (*Allium cepa*) po ozáření modrým světlem.

Existuje ale i teorie o jiném receptoru pro tuto reakci a tím je zeaxantin (karotenoid, součást xantofylového cyklu). Tuto teorii podporuje fakt, že pulzním ozářením zelenou složkou PAR dojde k reverzi reakce na modrou složku, zeaxantin absorbuje i v této oblasti vlnových délek záření a existuje ve dvou různých konformačních formách, které mezi sebou přechází (Talbot et al., 2003). Jeho přítomnost zvyšuje citlivost na modré světlo. Mutanty bez zeaxantinu (*npq1* mutace) na modré světlo nereagovaly (Frechilla et al., 1999). Talbot et al. (2003) provedli obdobný pokus s *npq1* mutantem, ovšem ozáření bylo modrou složkou PAR společně s červenou. Za takovýchto podmínek nebyl v g_s rozdíl mezi divokým typem a *npq1* mutantem.

Reakce průduchů na červenou složku PAR je zřejmě spřažena s procesem fotosyntézy. Tato reakce může být potlačena pomocí DCMU, inhibitoru fotosystému PSII (Olsen et al., 2002). Za fotoreceptor této reakce je považován chlorofyl (Zeiger et al., 2002).

Také je obecně známo, že se zvyšující se koncentrací CO_2 dochází ke snižování průduchové vodivosti (g_s) a existují dvě teorie vysvětlující tento jev. Jedno z možných vysvětlení je pomocí zeaxantinu, jehož koncentrace je závislá na PAR a C_i (koncentrace CO_2 v podprůduchové dutině), a který ovlivňuje v závislosti na své koncentraci citlivost na modrou složku PAR (Zeiger et al., 2002). Druhá teorie je na základě pozorování, že ATP vzniklé při fotosyntéze se přesouvá z chloroplastů průduchů do cytosolu, kde aktivuje H^+ pumpu plasmatické membrány (Serrano et al., 1988). Množství ATP (stejně jako zeaxantinu) se zvyšuje se zvyšujícím se pH tylakoidů (tím pádem i se zvyšujícím se PAR). Naopak při zvýšené aktivitě Calvinova cyklu koncentrace ATP klesá (tudíž i s rostoucím C_i) (Buckley et al., 2003). Toto tvrzení je podporováno studií na bílých částech listů zelence chocholátého (*Chlorophytum comosum*), při které nebyla pozorována reakce svěřacích buněk na červené světlo (Roelfsema et al., 2006). Pravděpodobné ale je, že se jedná o dva mechanismy fungující zároveň (Messinger et al., 2006).

3.1.2. Mezofylová vodivost

Mezofyl je základní pletivo v listech umístěné mezi dvěma listovými pokožkami. Jedná se o hlavní fotosyntetické pletivo rostliny. Mezofylová vodivost (g_m) zahrnuje difúzi CO_2 z mezibuněčného prostoru do míst karboxylace v chloroplastu a je dnes považována za významný faktor limitující fotosyntézu (Taiz and Zeiger, 2006).

Původně se myslelo, že mezofylová vodivost je statická veličina, závislá především na anatomické struktuře listu a na typu rostlin. K roku 2008 byla publikována data z měření na 122 rostlinných druzích, rostliny jednoleté a dvouleté dosahovaly průměrně g_m okolo $0,4 \text{ molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{bar}^{-1}$, zatímco u trvalých bylin a opadavých dřevin dosahovala g_m pouze okolo $0,2 \text{ molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{bar}^{-1}$. U neopadavých dřevin je tato hodnota dokonce ještě nižší a to v průměru jen $0,1 \text{ molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{bar}^{-1}$. Strategie rychlého růstu je doprovázena vysokým g_m a vysokou rychlostí asimilace CO_2 . Avšak i když toto pravidlo obecně platí, existují mnohé výjimky, které utváří variabilitu v rozsahu mezofylové vodivosti u jednotlivých rostlin v rámci skupin, rodů i druhů (Flexas et al., 2008).

Mnoho studií ukazuje na vztah mezi vývojem a stárnutím listu a g_m . Během rozvoje a zrání listu se zvyšuje g_m souběžně s fotosyntetickou kapacitou (Flexas et al., 2007). Listy s vysokou fotosyntetickou kapacitou na jednotku listové plochy redukují odpor mezofylu zvětšením plochy chloroplastů vystavených mezibuněčnému prostoru. Při měření na bříze bělokoré (*Betula pendula*) byla g_m mladých listů proporcionálně vyšší než u listů plně vyvinutých a stárnoucích (Eichelmann et al., 2004).

Dnes je již známo, že mezofylová vodivost je dynamická proměnná, která je různá u různých rostlinných druhů, je variabilní v závislosti na ekologických podmínkách, v nichž rostlina roste, mění se v reakci na abiotické i biotické podmínky (Flexas et al., 2008). Již dlouho je znám pokles g_m v reakci na vodní stres (Jones, 1973), na nízkou dostupnost dusíku (Evans and Terashima, 1988), vysokou nadmořskou výšku (Vitousek et al., 1990) nebo na salinitu (Bongi and Loreto, 1989). Byl prokázán i vliv aplikace kyseliny abscisové (Flexas et al., 2006a) nebo virové infekce (Sampol et al., 2003). Vztah mezi intezitou PPF (photosynthetic photon flux density) a změnou koncentrace CO_2 není zcela jistý. Existují práce popírající tento vliv (Tazoe et al., 2009) i práce prokazující tento vliv. Skupina kolem Flexase (2007) prováděla měření vlivu C_i na g_m . Z jejich výsledků vyplývá, že se zvyšující se C_i klesá g_m . Tento výsledek byl naměřen u více rostlinných druhů (*Arabidopsis thaliana*, *Limonium gibertii*, *Nicotiana tabacum*, *Vitis berlandieri* × *Vitis rupestris*, *Cucumis sativus*, *Olea europaea*). Provedli také měření s mutanty tabáku se zvýšenou expresí aquaporinu NtAQP1, s non-sense mutací

a s divokými typy a opět vznikla nepřímá závislost g_m na C_i . K obdobnému výsledku došli i Düring (2003) a Vrábl et al. (2009). Rozdílné výsledky by mohly být způsobené metodikou výpočtu g_m . Tholen a Zhu (2011) vypracovali 3D model difúzních reakcí, brali tedy v úvahu i vzájemnou prostorovou blízkost a interakci chloroplastů a mitochondrií. Do výpočtu g_m zahrnuli složku (foto)respirace, při níž se zvyšuje koncentrace CO_2 v blízkosti chloroplastů. Podle tohoto modelu je g_m na koncentraci CO_2 citlivá avšak ne tak výrazně jak ukazuje Flexas (2007) nebo Vrábl (2009).

Mezofylová vodivost je dynamická veličina, musí tedy existovat nějaký regulační mechanismus. Jsou zde zřejmě přítomny přenašeče pro CO_2 , čemuž nasvědčuje reakce g_m na změnu teploty. Pokud by zde nebyly žádné přenašeče a CO_2 by bylo přenášeno pouze prostou difúzí, pak by teplotní koeficient (Q_{10}) pro g_m byl blízký koeficientu difúze CO_2 ve vodě, (tedy 1,25 při 25°C). Bernacchi a kol. (2002) měřili teplotní závislost mezofylové vodivosti a vypočetli hodnotu Q_{10} (v rozmezí 10°C až 35°C) 2,2. Diskutuje se o dvou možných přenašečích: anhydráze kyseliny uhličitě (CA) usnadňující přenos CO_2 do chloroplastů (Tsuzuki et al., 1985), nebo aquaporinech zvyšujících propustnost buněčných membrán pro CO_2 (Terashima and Ono, 2002).

Zatímco anorganický uhlík putuje přes cytoplazmu a stroma v podobě HCO_3^- iontů, skrz membrány difunduje v podobě CO_2 (kvůli hydrofobicitě střední části membrán). Tato konverze je katalyzovaná anhydrázou kyseliny uhličitě (carbonic anhydrase, CA). Je známo více skupin této anhydrázy, rostliny kódují anhydrázy třídy α , β a γ , v rámci každé třídy je navíc více izoenzymů. Každá izoforma CA má vlastní mechanismus exprese a je lokalizována na konkrétním místě (buněčném kompartmentu), což zaručuje optimální vodivost pro CO_2 (Moroney et al., 2001; Evans et al., 2009). CA hrají zřejmě významnější roli u druhů s nízkým g_m , tedy především u dřevin (Loreto et al., 1992; Syvertsen et al., 1995). Vzhledem k buněčné stavbě mají nízkou g_w (vodivost přes buněčnou stěnu) a CA by mohly optimalizovat g_{ch} (vodivost v oblasti chloroplastu) (Gillon and Yakir, 2000).

Aquaporiny (vodní kanály zabudované do membrány) zvětšují propustnost membrán pro vodu. Některé z nich umožňují transport i dalších malých, nenabitých molekul (např. amoniaku, močoviny nebo kyseliny borité). Teprve nedávno se začalo spekulovat o tom, že některé aquaporiny by mohly transportovat i CO_2 . NtAQP1 je aquaporin plasmatické membrány, vyskytující se především v kořenech, ovšem u tabáku (*Nicotiana tabacum*) jej najdeme prakticky ve všech orgánech. V listech se akumuluje v buňkách houbového

parenchymu, nejvyšší koncentrace je pak kolem podprůduchových dutin (Otto and Kaldenhoff, 2000). Uehlein et al. (2003) srovnávali zabudovávání izotopů $^{14}\text{CO}_2$ do fotosyntetických produktů u tabáků se zvýšenou, sníženou a normální expresí NtAQP1. Nízká koncentrace NtAQP1 vedla k zabudovávání malého množství $^{14}\text{CO}_2$, zatímco vyšší koncentrace NtAQP1 vedla k zabudování většího množství $^{14}\text{CO}_2$ v porovnání s kontrolou. Toto naznačuje, že NtAQP1 slouží u tabáku jako protein s transportní funkcí pro CO_2 přes membránu. Hanba et al. (2004) měřili g_m na transgenních rostlinách rýže se zvýšenou expresí aquaporinu HvPIP2;1 (transmembránový, umístěný v plasmatické membráně, typu barel). U transgenních rostlin byla naměřena průkazně vyšší g_m než u kontroly zároveň se zvýšenou g_s . Nicméně funkce aquaporinů nebyla prokázána nade vší pochybnost (Flexas et al., 2006b).

Také kvalita světla může mít vliv na mezofylovou vodivost. Známý je efekt modrého světla, kdy dochází vlivem zeaxantinu nebo fototropinů (fotoreceptory v oblasti vlnových délek modré barvy) ke zvýšení průduchové vodivosti, zvýší se tedy koncentrace CO_2 v podprůduchové dutině (C_i) a dojde k redukci průduchové limitace. Určitou roli hraje i přítomnost fototropinů (phot2), které při nízké ozáření indukují pohyb chloroplastů směrem k buněčné stěně a podprůduchové dutině, při vysokých ozářeních indukuje pohyb opačný, směrem od zdroje záření (Christie, 2007). Mění se tedy vzdálenost, kterou musí CO_2 urazit a to může ovlivnit g_m . Pokusy s platanem východním (*Platanus orientalis*) a tabákem virginským (*Nicotiana tabacum L.*) ukázaly, že při zvýšení frakce modrého světla (doplňené červenou složkou PAR) došlo k průkaznému poklesu g_m (Loreto et al. 2009).

Je tedy evidentní, že g_m není konečně daná, ale mění se jak v delším časovém měřítku (dny, týdny), tak v rychlých reakcích (minuty, hodiny) v závislosti na mnoha enviromentálních proměnných, např. světla, teplotě, dostupnosti vody a koncentraci CO_2 . Tím je rostlina schopná regulovat proces fotosyntézy v reakci na prostředí. Nicméně mechanismům, které za těmito reakcemi stojí, doposud plně nerozumíme.

Pieruschka s kolegy (2010) publikoval článek, ve kterém se zaměřil na vztah mezi energií obsaženou v záření absorbovaném listem a průduchovou regulací transpirace. Zaznamenával hodnoty průduchové vodivosti a transpirace při změnách kvality a kvantity ozáření, které následně převáděl na energii obsaženou v toku fotonů (fotony záření rozdílných vlnových délek nesou odlišnou energii). Jeho závěrem je, že g_s je přímo-úměrně závislá na energii obsažené v absorbovaném záření a tím popírá funkci senzorů

v průduchových buňkách. Takovéto zjištění by pozměnilo pohled na modely globálních oběhů, proto se Mott a Peak (2011) rozhodli pokus zopakovat a ověřit výsledky a Pieruschkovy důkazy. Prováděli pokus obdobný, avšak věnovali velkou pozornost udržení stálé teploty v okolí a potažmo i uvnitř listu. Na tomto parametru je totiž závislý výpočet průduchové vodivosti a tím přeneseně i velikosti průduchové štěrbin. Po korekčním přepočtu g_s jejich výsledky Pieruschkovu teorii nepotvrdily. Proto bude zřejmě i nadále obecně přijímaný fakt o roli kvality ozáření a o jejím vnímání pomocí fotoreceptorů, jejichž přítomnost je v rostlinách prokázána.

3.2. Receptory záření ve viditelné oblasti a jejich vliv na proces fotosyntézy

Rostliny jsou foto-autotrofní organismy, tudíž jako zdroj energie využívají světelné záření. To je nezbytné jak pro proces fotosyntézy, tak i pro celkový vývoj rostlin (který je ovlivněn jak přítomností záření různých vlnových délek, tak i jeho intenzitou).

Vnímání záření různých vlnových délek je rostlinám umožněno díky takzvaným fotoreceptorům, tedy světlo vnímajícím proteinům, které přímo absorbují záření a tak umožní reakci na vnější prostředí. Existují tři hlavní třídy fotoreceptorů, které umožňují rostlinám „vidět“ světlo ve viditelné oblasti záření, tedy vlnové délky v rozmezí 400 až 750 nm: fytochromy, kryptochromy a fototropiny. Protože polypeptidický řetězec není schopen absorbovat záření ve viditelné oblasti, obsahuje každý fotoreceptor organický neproteinový chromofor. Čím větší je tento chromofor, tím delší vlnové délky absorbuje (Elise et al., 2012).

3.2.1. Červené světlo

Receptorem červené složky záření (tedy záření vlnové délky 625-800 nm) je u rostlin fytochrom. Byl objeven již v roce 1959 jako fotoreceptor ovlivňující růst a vývoj rostlin v reakci na dlouhovlnné viditelné záření. Jedná se o fotoreverzibilní chromoprotein vyskytující se ve dvou konformačních formách, které mezi sebou přechází. Neaktivní (cis) P_r forma, v níž je fytochrom syntetizován, absorbuje červené světlo s maximem ve vlnové délce $\lambda_{\max}=660$ nm. Po takovémto ozáření se přemění na aktivní (trans) P_{fr} formu absorbující v maximu záření o vlnové délce $\lambda_{\max}=730$ nm. Tyto konformační změny nastávají díky lineárnímu tetrapyrolu fytochromobilinu (PΦB), který je kovalentně navázán na protein. Fotokonverze zahrnuje Z-E izomeraci kolem dvojně vazby mezi C15 a C16 bilinu (Nathan et al., 2006).

U vyšších rostlin jsou fytochromy kódovány malou genovou rodinou, u *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno pět genů, phyA až phyE. Všechny geny kódují funkční fotoreceptory, které jsou syntetizovány za tmy v neaktivní P_r formě, fytochromy jsou ovšem rozdílné ve spektrálních vlastnostech. Tyto rozdíly ve funkci umožňují rostlinám reagovat na dané vnější podmínky. Všechny fytochromy jsou lokalizovány v jádře, kde regulací stability klíčových transkripčních faktorů ovlivňují genovou expresi.

Nejhojnějším fytochromem je phyA. Je esenciální pro indukci klíčení a pro adaptaci růstu ve stinném prostředí. Aktivní forma phyA je velmi nestabilní (v kontrastu k phyB).

PhyB operuje na úrovni krátkého ozáření, jeho vliv na klíčení je na rozdíl od phyA reverzibilní. Ozáření červeným světlem vede k aktivační reakci, ozáření dlouhovlnným červeným zářením vede k reverzi. Kromě klíčení se účastní deetiologizace a dalších procesů během vývoje rostliny, například ovlivňuje počet průduchů. Pokud je rostlina více vystavena fotosynteticky aktivnímu záření (je v otevřeném, nezastíněném prostředí), zvýší se obsah phyB, čímž se zvýší i průduchový index (poměr mezi počtem průduchů a všech buněk epidermis). PhyB nastartuje expresi genů FAMA a TOO MANY MOUTHS, které u mladých listů ovlivní regulaci vývoje průduchů. List má pak možnost získávat z atmosféry dostatek CO₂, aby využil co největší množství produktů primární fáze fotosyntézy (Boccalandro et al., 2009). Navíc se phyB zřejmě podílí na otevírání průduchů (společně s kryptochromy a fototropiny). V porovnání s modrým světlem je červené světlo méně efektivní ve zvětšování průduchové štěrby a je obecně přijímána teorie, že toto otevírání je založeno na procesech fotosyntézy. V takovém případě je průduch otevřen jen do takové míry, aby docházelo k fotosyntetické saturaci. Pak je reakce zastavena působením 3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), inhibitoru PSII. Předpokládá se tedy, že tuto reakci reguluje chlorofyl. Nicméně princip tohoto jevu je z velké části stále neznámý (Wang et al., 2010).

PhyD a phyE jsou zřejmě také světelně stabilní a ovlivňují elongaci internodií a dobu kvetení.

U phyC zatím není znám žádný fyziologický efekt, ještě nebyl vypěstován mutant v tomto genu (Kircher et al., 2002).

U vyšších rostlin se v chloroplastech nachází chlorofyl a (absorbční maximum je v $\lambda_{\max}=670$ nm) a chlorofyl b (absorbční maximum je v $\lambda_{\max}=650$ nm). Oba typy mají ve své struktuře metaloporfyrinový kruh s hořčíkem uprostřed a uhlovodíkový řetězec a jsou uspořádány do světlosběrných antén, kde jsou klíčovými pigmenty pro proces fotosyntézy (Taiz and Zeiger, 2006). Chlorofyl je pravděpodobně fotoreceptor pro reakci průduchů na červenou složku PAR (Zeiger et al., 2002).

3.2.2. Modré světlo

Modrá složka PAR je v oblasti vlnové délky 430 až 500 nm. Ovlivňuje mnoho procesů při vývoji rostlin: deetiologizaci semen, vnímání cirkadiálních hodin, délku dne a tím načasování kvetení. Receptory pro modré světlo jsou ze dvou rodin: kryptochromy a fototropiny.

Krytochromy (cry) patří do velké superrodiny chromoproteinů, která obsahuje i DNA fotolyázy. Celá tato nadrodina sdílí na amino-konci (N-konci) PHR doménu (photolyase-related domain), kde je navázán chromofor. Krytochromy ovšem na rozdíl od fotolyáz nemají reparační aktivitu (Brudler et al., 2003). Cry1 a cry2 zajišťují chod cirkadiálních hodin.

Fototropiny (phot), druhá skupina receptorů modré složky PAR, regulují také mnoho procesů indukovaných světlem v oblasti vlnové délky modrého záření, jako je pohyb chloroplastů, otevírání průduchů a fototropismus. Skládá se ze dvou částí, N-konce citlivého na světlo a serin/threonin proteinové kinázy na C-konci. Na N-konci jsou dvě velmi podobné LOV domény (light, oxygen and voltage), které sjednocuje sekvence asi 110 aminokyselin, zajišťující navázání kofaktoru flavinu mononukleotidu a regulaci proteinových interakcí. Fotoexcitace LOV domény vyvolá autofosforylaci a tím iniciaci signálu (Christie, 2007). Také se ukázalo, že rychlá přechodná inhibice růstu hypokotylu (tato reakce byla připisována vlivu cry1, cry2 a phyA) je způsobena vlivem phot1 (Liscum et al. 2003).

Chloroplasty průduchových buněk jsou odlišné od chloroplastů buněk mezofylu. Jsou menší a jsou schopny vyvolávat specifickou reakci na modré světlo. Přítomné karotenoidy mají absorpční spektrum odpovídající spektru modrého světla stimulujícího otevírání průduchů. Dalším možným fotoreceptorem pro modré světlo v těchto buňkách je zeaxantin. Jedná se o karotenoid (část xantofylového cyklu), jehož inhibitorem je dithiothreitol. Je vytvářen de-epoxidací violaxantinu při katalýze violaxantinu de-epoxidázy. Protože optimální pH enzymu je kolem 5,2, syntéza je podporována acidifikací lumenu chloroplastu při záření vyvolaném přenosu náboje přes tylakoidní membránu. Za tmy dojde k opačnému procesu a koncentrace zeaxantinu se snižuje. Při měření na vikvi bobu (*Vicia faba*) byla intenzita reakce průduchů úměrná k množství zeaxantinu v buňkách, koncentrace zeaxantinu byla úměrná k PPF (Zeiger and Zhu, 1998).

3.2.3. Zelené světlo

Záření zelené barvy má vlnovou délku v rozsahu 500-600 nm. Pro tuto oblast záření nemá rostlina „vlastní“ fotoreceptor, avšak fytochromy, krytochromy i zeaxantin jsou schopné absorpce zelené složky PAR.

Například po ozáření zeleným světlem se změní rovnováha oxidačního stavu flavinu (chromofor krytochromu) a tím se zmírní reakce vyvolávané cry2, jako je kvetení. Fototropismus je obecně přisuzován reakci na ozáření modrým světlem, avšak tato reakce

byla pozorována i po ozáření zeleným světlem. U semen huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a salátu hlávkového (*Lactuca sativa L.*) došlo k fototropickému natáčení vlivem zeleného světla, přestože reakce vyžadovala delší dobu a vyšší intenzitu světla (Steinitz et al., 1985). Analýzy fotocyklu phto1 LOV2 domény ovsa ukázaly, že modré světlo aktivuje extrémně nestálou formu tripletu, která absorbuje zelenou a červenou složku PAR. Její životnost je v rámci nanosekund, proto se nepředpokládá role fototropinové aktivity v přírodě (Swartz et al., 2001).

Tanada (1997) se zabývá studiem fotobiologických reakcí u rostlin. Data z mnoha měření naznačují existenci reverzibilního receptoru pro dlouhovlnné červené a zelené světlo a Tanada tento fotoreceptor nazval „heliochrom“. Takovouto reakci pozoroval např. na nyktinastických ohybech lístků *Albizia julibrissin*. Uzavírání může být oddáleno ozářením dlouhovlnným červeným světlem ($18-43 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a tato reakce může být zase negována ozářením zeleným světlem (stačí pouze velmi malá dávka, $0,01-5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ozáření v opačném pořadí ani ozáření červeným světlem tento efekt nemělo (Tanada, 1982). Dnes jsou dva předpoklady, jak by mohly tyto reakce vzniknout: Buď jsou řízeny kryptochromem a reverzovány zeleným světlem pomocí semichinonového chromoforu; nebo zde hraje roli phyA, cry2 a paralelní efekt dlouhovlnného a modrého světla. To ale nebude jisté, dokud nebude popsána forma kryptochromu pro zelené světlo nebo nebude známa cesta degradace phyA vlivem zeleného světla (Folta a Maruhnich, 2007).

Frechilla s kolegy (2000) pozorovali reverzi účinku působení modrého světla na svěrací buňky průduchů po ozáření zeleným světlem. Tento efekt je běžný v celé rostlinné říši a při ozařování záleží na kvalitě posledního pulzu (tedy pokud dojde po ozáření zeleným světlem ještě k ozáření modrým světlem, zvětší se průduchové štěrby). Možným vysvětlením jsou dvě izomerní formy zeaxantinu, který se nachází v průduchových buňkách (Frechilla et al., 2000). Nic z toho ale nebylo řádně potvrzeno a stále se spekuluje o vlivu fototropinů nebo NPQ1. Skupina kolem Talbotta (2006) pozorovala změnu reakce průduchů na zelené světlo během dne. *Arabidopsis thaliana* byla ozářena modrým a zeleným světlem, při vypnutí zeleného světla došlo ke zvětšení průduchové štěrby, po jeho opětovném zapnutí se průduchy opět uzavřely. To bylo ovšem pozorováno pouze v dopoledních hodinách, odpoledne již k tomuto jevu nedocházelo. Je to vysvětlováno rozdílným osmotikem, ráno je např. u *Vicia faba* jako osmotikum využíván draslík, odpoledne sacharóza.

V polovině minulého století byly prováděny pokusy, při kterých byly rostliny aksamitníku vzpřímeného (*Tagetes erecta L.*) a netýkavky balzamína (*Impatiens balsamina L.*)

pěstovány pod různou kvalitou světla. Při přidání filtru, který odclonil záření zelené barvy, vzrostla výška, čerstvá i suchá hmotnost o 30-50% (Klein et al., 1965). Dnes jsou ovšem tyto výsledky přisuzovány spíše snížení PPFD a odclonění značné části i modrého záření. Dougher a Bugbee (2001) ale přece jen inhibiční účinek zeleného záření dokázali. Měření prováděli tak, že zelené světlo přidávali. Výsledkem bylo, že přes zvýšení celkové PPFD byly rostliny menší a suchá i čerstvá hmotnost byla nižší. Obecně je tedy přijímán předpoklad negativního vlivu záření vlnové délky 500-600 nm na růst rostlin.

4. Experimentální část

4.1. Cíl práce

Cílem mé práce bylo zhodnotit vztah mezi spektrálním složením fotosynteticky aktivní radiace (PAR) a významnými difúzními odpory pro tok CO_2 z povrchu listu do chlo-roplastů.

4.2. Materiál a metody

Rostlinný materiál a růstové podmínky: Měřila jsem na slunečnici roční (*Helianthus annuus* L.), přibližně šest týdnů starých. Rostliny byly pěstovány v růstovém boxu (SGC097, Sanyo, UK) za stabilních podmínek. Délka dne/noci byla 16/8 hod, teplota ve dne/v noci byla 25/20°C, vlhkost 40%, PPFD přes den bylo udržováno přibližně na 450-550 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (podle výšky jednotlivých pater rostlin).

Gazometrické měření: Pro určení hodnoty fotosyntetických parametrů se běžně používá otevřený gazometrický systém, v tomto případě jsem měřila pomocí přístroje Li-6400 a Li-6400 XT (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Měřila jsem tzv. $A_N\text{-}C_i$ křivky, které zobrazují závislost rychlosti asimilace CO_2 (A_N) na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině (C_i). Měření fotosyntetických parametrů probíhalo při rozsahu koncentrací CO_2 0-1580 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Takovou křivku pak můžeme rozdělit do tří částí. V první fázi je při zvyšujícím se C_i dA_N/dC_i vysoké a je dáno karboxylační aktivitou Rubisca. S rostoucím C_i dohází poklesu dA_N/dC_i a v této fázi je limitující rychlost karboxylace Rubisca. Ve třetí fázi je limitujícím faktorem využití trioza-fosfátu (TPU), závislost je konstantní nebo dokonce A_N mírně klesá ($dA_N/dC_i \leq 0$) (Long and Bernacchi, 2003).

Na mladých, plně vzrostlých listech jsem pomocí otevřeného gazometrického systému, Li-6400 a Li-6400 XT (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), měřila A_N/C_i křivky při ozáření různými složkami PAR (modrá, červená a zelená složka). Hodnoty PPFD byly 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, rozsah koncentrací CO_2 0-1580 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. Při měření na Li-6400 byl použit laboratorní LED zdroj a měřená listová plocha byla 6x2 cm. Hlavice Li-6400 XT měla rozměry 3x2 cm a byl použit RGB zdroj – 6400-18 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA).

Výpočet g_m pomocí měření izotopové diskriminace uhlíku ^{13}C : Uhlík se v přírodě vyskytuje ve dvou stabilních izotopech, ^{12}C a ^{13}C . Přibližně 1,1% atmosférického oxidu

uhlíčitého obsahuje ^{13}C a 98,8% obsahuje lehčí ^{12}C . Izotopovou diskriminací obecně vyjadřujeme rozdíl v množství ^{13}C ve zdroji a v produktu. U většiny chemických reakcí reagují lehčí izotopy rychleji než těžší. V takovém případě nabývá diskriminace kladných hodnot. Při procesu karboxylace je poměr těchto izotopů ovlivněn řadou biochemických a environmentálních faktorů (O'Leary, 1981), ale obecně enzym Rubisko preferuje lehčí $^{12}\text{CO}_2$, což vede (společně s pomalejší difúzí $^{13}\text{CO}_2$) k obohacení okolního vzduchu o $^{13}\text{CO}_2$. Byla vypracována analýza, která předpokládá dvě složky frakcionace diskriminace $^{13}\text{CO}_2$ u C_3 rostlin, a to složku závislou na difúzi a složku závislou na biochemických procesech (Farquhar and Richards, 1984). Diskriminace uhlíku je silně ovlivněna poměrem koncentrací tlaku CO_2 v mezibuněčném prostoru (C_i) a na povrchu listu (C_a). Pokud je C_i blízký C_a , můžeme říct, že hlavní složkou diskriminace jsou biochemické procesy. Naopak v případě nízkého poměru C_i/C_a diskriminace na úrovni enzymu Rubiska ztrácí na významu (Evans et al., 1986).

Kombinací gazometrické metody a metody diskriminace izotopů můžeme vypočítat také hodnotu mezofylové vodivosti (Evans and von Caemmerer, 1996). Gazometrické parametry jsem měřila na přístroji Li-6400 s listovou komorou o velikosti 6x2 cm (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). List byl ozařován laboratorním LED zdrojem (modrá, červená, zelená). PPF D bylo $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vždy jen jedné barevné složky. Koncentrace CO_2 byla nastavena na $380 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$, teplota listu byla udržována na 25°C , průtok (flow rate) byl $300 \mu\text{mol}\cdot\text{vzduchu}\cdot\text{s}^{-1}$. Po uzavření listu do komory jsem čekala přibližně 30 min, dokud se neustálily gazometrické parametry. Na komoru byla napojena pomocí Swagelok Y-součástky skleněná nádoba o objemu 100 ml. Při ustálených podmínkách byla nádoba promývána 7 minut vzduchem odčerpávaným od listu. Současně byly zaznamenávány gazometrické parametry. Jako reference byl použit vzorek získaný stejným postupem, avšak v tomto případě měření probíhalo bez přítomnosti listu.

Poměr izotopů ^{12}C a ^{13}C byl stanoven pomocí hmotnostního spektrofotometru (DeltaPlus XL, ThermoFinnigan, Bremen, Germany).

Pro výpočet mezofylové vodivosti vycházíme ze dvou rovnic. U první rovnice (1) předpokládáme, že g_m je limitní. Pak tedy platí, že diskriminace ^{13}C (Δ) se rovná:

$$\Delta = a \frac{C_a - C_i}{C_a} + b \frac{C_i - C_c}{C_a} + c \frac{C_c}{C_a} \quad (1)$$

$a = 4,4\%$; frakcionace CO_2 během difúze ve vzduchu

$b = 1,8\%$ je diskriminace během rozpouštění a difúze CO_2 ve vodě.

$c = 29\%$; frakcionace Rubisca a fosfoenolpyruvát karboxylázy (PEPC)

C_i a C_a je koncentrace CO_2 v mezibuněčném prostoru a na povrchu listu

Pokud bychom předpokládali, že g_m je nekonečná, tudíž že $C_i = C_c$, pak bude rovnice zjednodušená (2).

$$\Delta_i = 4,4 + 22,6 \frac{C_i}{C_a} \quad (2)$$

Modely 1 a 2 se liší právě o hodnotu g_m , tudíž jejich spojením získáme rovnici (3), do které dosadíme g_m ze vztahu 4.

$$\Delta_i - \Delta = (c - b) \frac{C_i - C_a}{C_a} \quad (3)$$

$$(C_i - C_a) = \frac{A_N}{g_m} \quad (4)$$

Výpočet diskriminace uhlíku z parametrů naměřených gazometrickým přístrojem a hmotnostním spektrometrem byl prováděn podle Evanse et al. (1986) (5):

$$\Delta^{13}\text{C}_{\text{obs}} = \frac{\xi (\delta^{13}\text{C}_{\text{out}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{in}})}{1000 + \delta^{13}\text{C}_{\text{out}} - \xi (\delta^{13}\text{C}_{\text{out}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{in}})} \quad (5)$$

$$\xi = \frac{C_{\text{in}}}{C_{\text{in}} - C_{\text{out}}}$$

Jako C_{in} a C_{out} byly brány koncentrace CO_2 ve vzduchu vstupujícím do a vystupujícím z komory. Za $\delta^{13}\text{C}_{\text{in}}$ byla dosazována hodnota naměřená z reference.

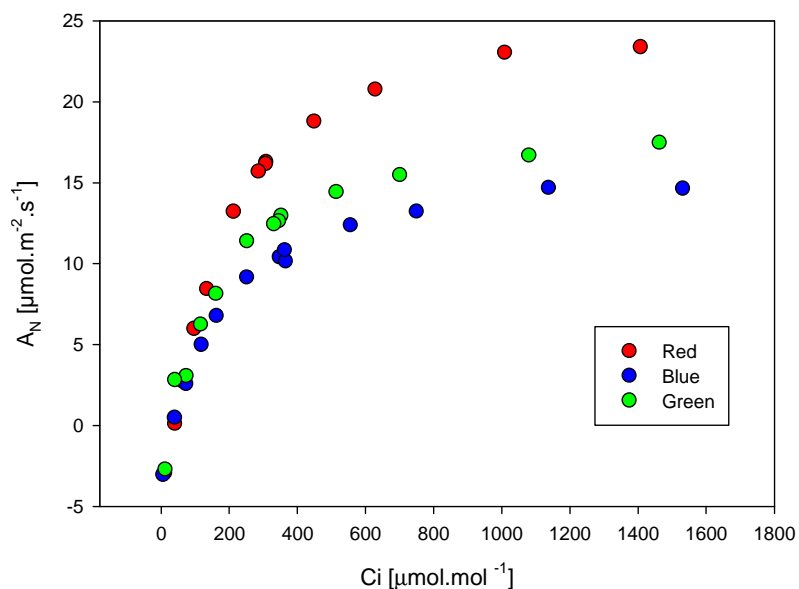
Hodnota mezofylové vodivosti byla určena srovnáním předpokládaných (Δ_i) a naměřených ($\Delta^{13}\text{C}_{\text{obs}}$) hodnot diskriminace.

Mezofylová vodivost (g_m) pak byla počítána podle Evanse and von Caemmerer (1996) (6):

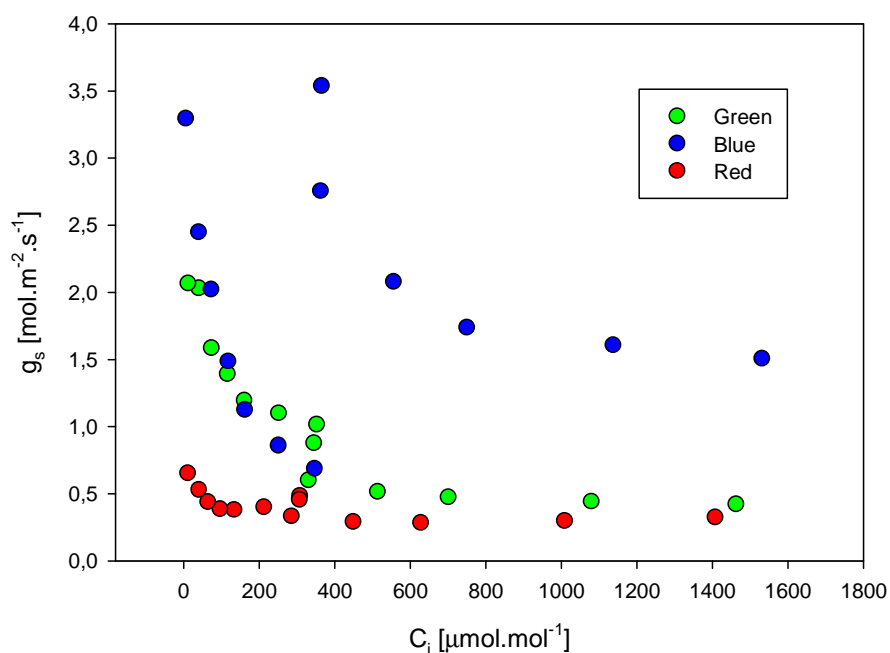
$$\Delta_i - \Delta^{13}\text{C}_{\text{obs}} = (29 - 1,8) \frac{A_N}{g_m \cdot C_a} \quad (6)$$

5. Výsledky

Z každého dne jsem získala A_N/C_i křivky pro tři složky PAR (červená, zelená a modrá). Pro názornost jsem vynesla do grafu závislost rychlosti asimilace CO_2 (obr. 3) a závislost průduchové vodivosti (obr. 4) na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině naměřenou na jednom náhodném listu.

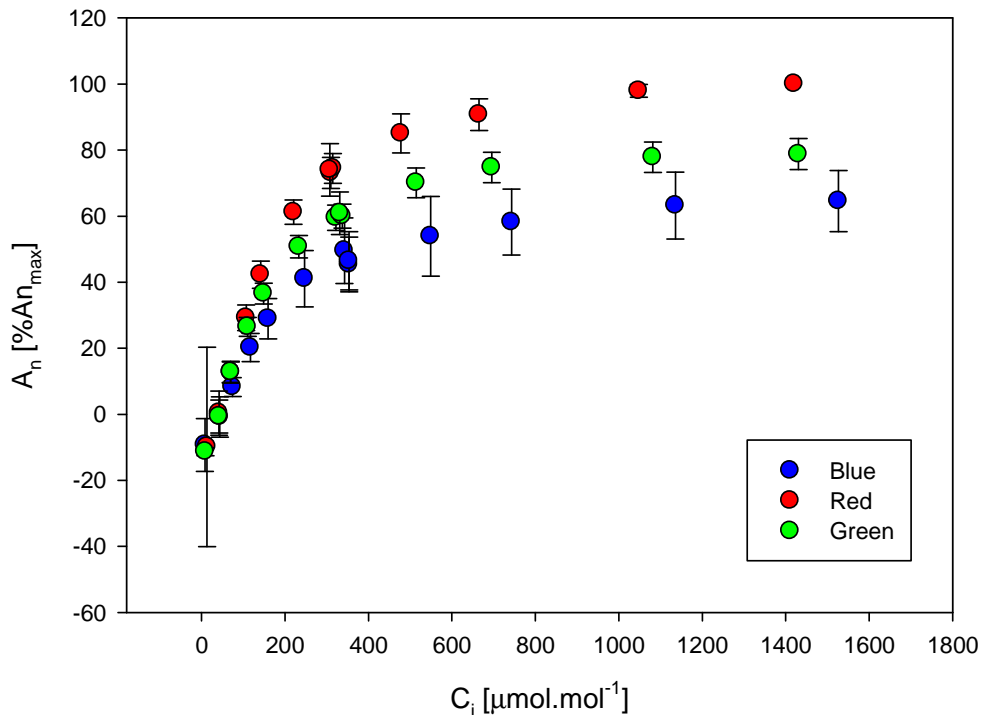


Obr. 3: Závislost rychlosti asimilace CO_2 na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině měřené při různé kvalitě PAR o hustotě zářivého toku $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.



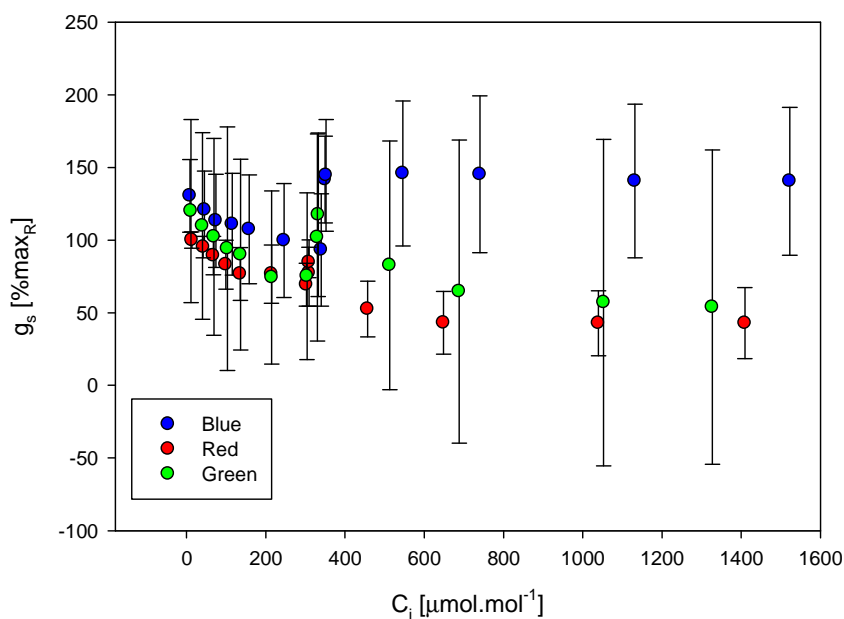
Obr. 4: Závislost průduchové vodivosti na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině při ozáření červenou, modrou a zelenou složkou PAR.

Pro vyhodnocení dat z A_N/C_i křivek jsem rychlost asimilace CO_2 normovala na maximální denní fotosyntézu (ta byla vždy při ozáření červenou složkou PAR). Mediány normovaných dat jsem vynesla opět do A_N/C_i křivek společně se směrodatnými odchylkami (obr. 5) a hodnoty při koncentraci CO_2 380ppm statisticky vyhodnotila (analýza variance - jednocestná ANOVA, Tukeyho test, $p < 0.05$).



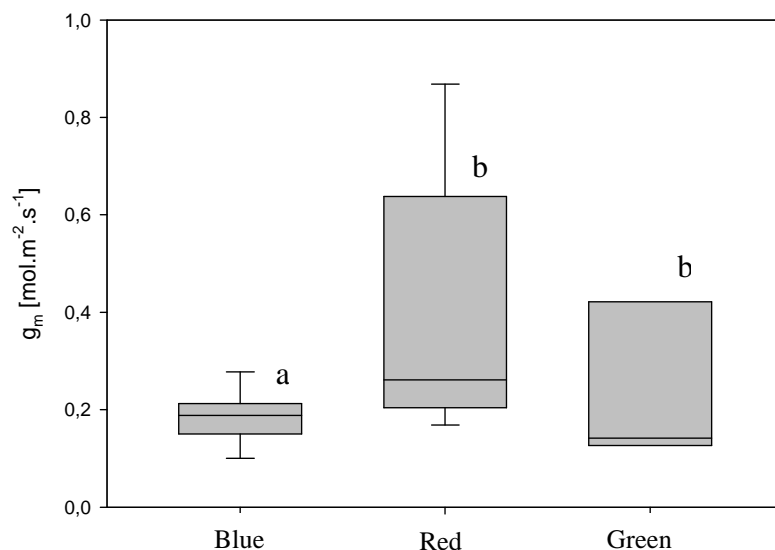
Obr. 5: Závislost hodnot rychlosti asimilace CO_2 (A_N) normovaných na max denní fotosyntézu na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině při ozáření červenou, zelenou a modrou složkou PAR. Jednotlivé body jsou mediány z 8 měření a chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky měření při jednotlivých koncentracích CO_2 .

Hodnoty průduchové vodivosti jsem také normovala na hodnotu g_s při ozáření červenou složkou PAR za koncentrace CO_2 380 ppm. Mediány společně se směrodatnými odchylkami jsou opět vyneseny do grafu v závislosti na C_i (obr. 6). Vlivem citlivosti průduchové vodivosti na vnější i vnitřní podmínky bylo měření s velkými směrodatnými odchylkami.



Obr. 6: Závislost průduchové vodivosti (g_s) normované na maximální denní průduchovou vodivost při ozáření červenou složkou PAR na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině při ozáření červenou, zelenou a modrou složkou PAR. Jednotlivé body jsou mediány ze 7 měření a chybové úsečky reprezentují směrodatné odchytky měření při jednotlivých koncentracích CO_2 .

Z dat naměřených na přístroji Li-Cor při ambientní koncentraci CO_2 (380 ppm) a na hmotnostním spektrometru jsem vypočetla hodnoty mezofylové vodivosti pro jednotlivé složky PAR. Výsledky jsem vynesla do grafu box plotu (obr. 7).

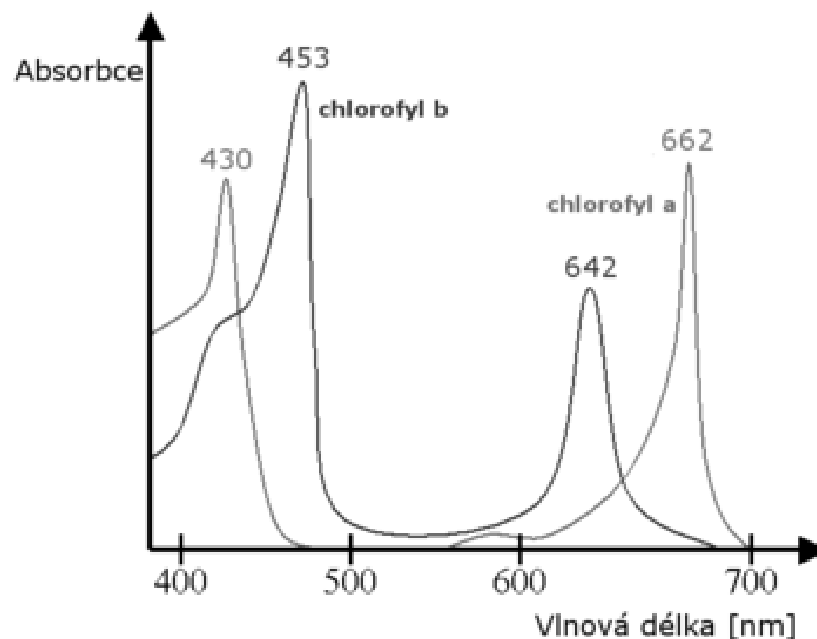


Obr. 7: Box plot z vypočtených hodnot mezofylové vodivosti a chybové úsečky pro modrou, červenou a zelenou složku PAR. Hodnoty jsou z 8 opakování měřených při ambientní koncentraci CO_2 . Chybové úsečky reprezentují směrodatné odchytky měření.

6. Diskuse

Z naměřených A_N/C_i křivek vidíme signifikantní rozdíly mezi křivkami měřenými na světle různé vlnové délky. Při stejném C_i je různá rychlost asimilace CO_2 a to nejvyšší při ozáření červenou složkou PAR, nejnižší při ozáření modrou složkou PAR a při ozáření zelenou složkou je rychlost asimilace mezi těmito krajními hodnotami. To může být dáno rozdílnou efektivitou využití PAR o různých vlnových délkách. U záření o vlnových délkách modré barvy je neefektivní přenos energie z karotenoidů na chlorofyly (Duysens, 1952), zvýšená absorpce záření epidermálními buňkami (Inada, 1976) a nevyvážená excitace fotosystému I a II (Evans, 1987). Právě tyto jevy mohou také vést ke snížení rychlosti asimilace CO_2 .

Zajímavá je míra využitelnosti zelené složky PAR, jejíž hodnoty vlnové délky nezasahují do absorpčního spektra chlorofylu (obr.8). Zelené listy však absorbují velkou část tohoto záření a v procesu fotosyntézy je efektivní (McCree 1972; Inada 1976). Tato absorpce zeleného světla je pravděpodobně způsobena spektrálními posuny v listovém mezofylu do červené oblasti.



Obr. 8: Spektrum absorpce chlorofylu *a* a chlorofylu *b* (závislost absorpce na vlnové délce záření).

Zdroj: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorofyl>

Průduchová vodivost je také odlišná pro různé složky PAR. Výsledky ukázaly známý jev, při kterém modrá složka indukuje otevírání průduchové štěrbin (Briggs et Christie, 2002; Frechilla et al., 2000; Kinoshita et al., 2001; Lawson, 2009; Roelfsema et al.,

2006). Při ozáření červenou složkou PAR je reakce opačná, dochází k zavírání průduchové štěrbin.

Při koncentraci CO₂ 380 ppm, tedy při koncentraci CO₂ okolního vzduchu, je g_s při ozáření modrou složkou výrazně vyšší než g_s při ozáření červenou složkou PAR. V podprůduchové dutině by tedy mělo být dostatečné množství CO₂ pro karboxylaci, avšak hodnoty rychlosti asimilace CO₂ jsou mnohem nižší než při ozáření červenou složkou při stejném C_i. To naznačuje rozdílné hodnoty mezofylové vodivosti, které byly pro tyto složky záření také naměřeny (obr. 7). Statistické vyhodnocení nelze provést pro ozáření zelenou složkou PAR, protože test homogenity variancí nebyl průkazný, avšak je signifikantní rozdíl mezi mezofylovou vodivostí při ozáření červenou a modrou složkou PAR. Podle naměřených A_N/C_i křivek bychom mohli předpokládat, že při ozáření zelenou složkou PAR bude g_m stejně jako g_s mezi krajními hodnotami. To se ale nepotvrdilo.

Fotony záření nesou energii a velikost této energie je závislá na vlnové délce (7) a intenzitě záření. Můžeme tedy vypočítat celkovou energii fotonů při záření dané vlnové délky o dané intenzitě (8).

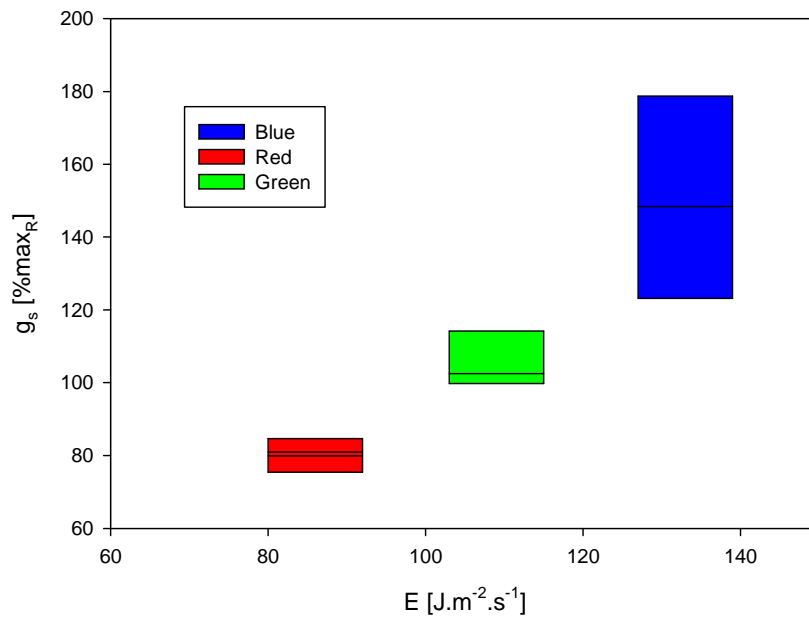
$$E_{\lambda} = \frac{120\,000}{\lambda} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

$$E_{\lambda} = \text{energie fotonů záření vlnové délky } \lambda \quad (7)$$

$$E = \frac{E_{\lambda} \cdot \text{PPFD}}{1000} \quad [\text{J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$$(8)$$

Podobně jako Pieruschka (2010) jsme vypočetla energii obsaženou v záření a vztáhla jsem na ni velikost průduchové vodivosti při koncentraci CO₂ 380 ppm (hodnoty z měření A_N/C_i křivek) (obr. 9). Vidíme, že se zvyšující se energií záření roste průduchová vodivost, což je v souladu s výsledky Pieruschka (2010).



Obr 9: Závislost velikosti průduchové vodivosti na energii fotonů. Hodnoty jsou z měření A_N/C_i křivek při koncentraci CO_2 380 ppm, provedeno bylo 6 opakování.

Při ozáření modrou složkou PAR se zvětšuje průduchová vodivost, ale zároveň dojde ke snižování vodivosti mezofylové, zatím co u ozáření červenou složkou PAR dojde ke snížení průduchové vodivosti, což je kompenzováno zvýšenou mezofylovou vodivostí. Takový trend by byl pro rostlinu velmi výhodný, protože proces karboxylace ještě není omezen množstvím CO_2 , avšak díky přivřeným průduchům je omezena transpirace. V takovém případě by měla rostlina efektivní hospodaření s vodou.

7. Použitá literatura:

Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S, Long SP (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology* 130: 1992-1998.

Boccalandro HE, Rugnone ML, Moreno JE, Ploschuk EL, Serna L, Yanovsky MJ, Casal JJ (2009) Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiology* 150: 1083-1092.

Bongi G, Loreto F (1989) Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiology* 90, 1408-1416.

Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 7: 204-210.

Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts VA, Todo T, Tainer JA, Getzoff ED (2003) Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution. *Molecular Cell* 11: 59-67.

Buckley TN, Mott KA, Farquhar GD (2003) A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant Cell and Environment* 26: 1767-1786.

Centritto M, Loreto F, Chartzoulakis K (2003) The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. *Plant Cell and Environment* 26: 585-594.

Christie JM (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* 58: 21-45.

Dougher TA, Bugbee B (2001) Evidence for yellow light suppression of lettuce growth. *Photochemistry and Photobiology* 73: 208-212.

Duan BL, Li Y, Zhang XL, Korpelainen H, Li CY (2009) Water deficit affects mesophyll limitation of leaves more strongly in sun than in shade in two contrasting *Picea asperata* populations. *Tree Physiology* 29: 1551-1561.

Duysens LNM (1952) Transfer of excitation energy in photosynthesis. PhD thesis, University of Utrecht, the Netherlands.

Düring H (2003) Stomatal and mesophyll conductances control CO₂ transfer to chloroplasts in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *VITIS* 42: 65-68.

Eichelmann H, Oja V, Rasulov B, Padu E, Bichele I, Pettai H, Niinemets Ü, Laisk A (2004) Development of leaf photosynthetic parameters in *Betula pendula* Roth leaves: correlations with photosystem I density. *Plant Biology* 6, 307-318.

Ethier GJ, Livingston NJ, Harrison DL, Black TA, Moran JA (2006) Low stomatal and internal conductance to CO₂ versus Rubisco deactivation as determinants of the photosynthetic decline of ageing evergreen leaves. *Plant Cell and Environment* 29: 2168-2184.

Evans JR (1987) The dependence of quantum yield on wavelength and growth irradiance. *Australian Journal of Plant Physiology* 14: 69-79.

Evans JR, Kaldenhoff R, Genty B, Terashima I (2009) Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *Journal of Experimental Botany* 60: 2235-2248.

Evans JR, Sharkey TD, Berry JA, Farquhar GD (1986) Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO₂ diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 110: 339-346.

Evans JR, von Caemmerer S (1996). Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology* 110, 339-346.

Evans JR, Terashima I (1988) Photosynthetic characteristics of spinach leaves grown with different nitrogen treatments. *Plant and Cell Physiology* 29, 157-165.

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.

Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmes J, Kaldenhoff R, Nedrano H, Ribas-Carbo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell and Environment* 30: 1284-1298.

Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H (2006a) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* 172, 73-82.

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.

Flexas J, Ribas-Carbó M, Hanson DT, Bota J, Otto B, Cifre J, McDowell N, Medrano H, Kaldenhoff R (2006b) Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant Journal* 48: 427-439.

Folta KM, Maruhnich SA (2007) Green light: a signal to slow down or stop. *Journal of Experimental Botany* 58: 3099-3111.

Frechilla S, Talbott LD, Bogomolni RA, Zeiger E (2000) Reversal of blue light-stimulated stomatal opening by green light. *Plant and Cell Physiology* 41: 171-176.

Frechilla S, Zhu JX, Talbott LD, Zeiger E (1999) Stomata from npq1, a zeaxanthin-less arabidopsis mutant, lack a specific response to blue light. *Plant and Cell Physiology* 40: 949-954.

Gillon JS, Yakir D (2000) Internal Conductance to CO₂ Diffusion and C¹⁸O₂ Discrimination in C₃ Leaves. *Plant Physiology* 123: 201-213.

Hanba YT, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I, Katsuhara M (2004) Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 45: 521-529.

Hisem D (2011) Effect of abscisic acid on mesophyll conductance at different CO₂ concentrations. Mgr. thesis, University of South Bohemia, Czech Republic.

Inada K (1976) Action spectra for photosynthesis in higher plants. *Plant and Cell Physiology* 17: 355-365.

Jones HG (1973) Moderate-term water stresses and associated changes in some photosynthetic parameters in cotton. *New Phytologist* 72, 1095-1105.

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656-660.

Kinoshita T, Shimazaki K (2001) Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase in response to fusicoccin. *Plant and Cell Physiology* 42: 424-432.

Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Schafer E, Nagy F (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 14: 1541-1555.

Klein RM, Edsall PC, Gentile AC (1965) Effects of near ultraviolet and green radiations on plant growth. *Plant Physiology* 40: 903-906.

Lawson T (2009). Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist* 181, 13-34.

Limousin JM, Misson L, Lavoit AV, Martin NK, Rambal S (2010) Do photosynthetic limitations of evergreen *Quercus ilex* leaves change with long-term increased drought severity? *Plant Cell and Environment* 33: 863-875.

Liscum E, Hodgson DW, Campbell TJ (2003) Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiology* 133: 1429-1436.

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.

Loreto F, Harley PC, Di MG, Sharkey TD (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiology* 98: 1437-1443.

Loreto F, Tsonev T, Centritto M (2009) The impact of blue light on leaf mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany* 60, 2283-2290.

- McCree KJ** (1972) The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agricultural Meteorology* 9: 191-216.
- Messinger SM, Buckley TN, Mott KA** (2006) Evidence for Involvement of Photosynthetic Processes in the Stomatal Response to CO₂. *Plant Physiology* 140: 771-778.
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G** (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell and Environment* 24: 141-153.
- Mott KA, Peak D** (2011) Alternative perspective on the control of transpiration by radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19820-19823.
- O'Leary MH** (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20: 553-567.
- Olsen RL, Pratt RB, Gump P, Kemper A, Tallman G** (2002) Red light activates a chloroplast-dependent ion uptake mechanism for stomatal opening under reduced CO₂ concentrations in *Vicia* spp. *New Phytologist* 153: 497-508.
- Otto B, Kaldenhoff R** (2000) Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211: 167-172.
- Pieruschka R, Huber G, Berry JA** (2010) Control of transpiration by radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 13372-13377.
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J** (1998) *Fyziologie Rostlin*. Praha, Academia.
- Roelfsema MRG, Konrad KR, Marten H, Psaras GK, Hartung W, Hedrich R** (2006) Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid. *Plant, Cell and Environment* 29: 1595-1605.
- Sampol B, Bota J, Riera D, Medrano H, Flexas J** (2003) Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist* 160, 403-412.
- Serrano EE, Zeiger E, Hagiwara S** (1988) Red-light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard-cell protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 436-440.
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T** (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annual review of plant biology* 58: 219-247.
- Steinitz B, Ren ZL, Poff KL** (1985) Blue and green light-induced phototropism in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa* L. seedlings. *Plant Physiology* 77: 248-251.

Swartz TE, Corchnoy SB, Christie JM, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR, Bogomolni RA (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *Journal of Biological Chemistry* 276: 36493-36500.

Syvertsen JP, Lloyd J, McConchie C, Kriedeman PE, Farquhar GD (1995) On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Environment* 18: 149-157.

Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*. Sunderland, Sinauer Associates.

Talbott LD, Hammad JW, Harn LC, Nguyen VH, Patel J, Zeiger E (2006) Reversal by green light of blue light-stimulated stomatal opening in intact, attached leaves of *Arabidopsis* operates only in the potassium-dependent, morning phase of movement. *Plant and Cell Physiology* 47: 332-339.

Talbott LD, Shmayevich IJ, Chung YS, Hammad JW, Zeiger E (2003) Blue light and phytochrome-mediated stomatal opening in the npq1 and phot1 phot2 mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1522-1529.

Tanada T (1997) The photoreceptors in the high irradiance response of plants. *Physiologia Plantarum* 101: 451-454.

Tanada T (1982) Effect of far-red and green irradiation on the nyctinastic closure of *Albizia* leaflets. *Plant Physiology* 70: 901-904.

Tazoe Y, von Caemmerer S, Badger MR, Evans JR (2009) Light and CO₂ do not affect the mesophyll conductance to CO₂ diffusion in wheat leaves. *Journal of Experimental Botany* 60: 2291-2301.

Terashima I, Ono K (2002) Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiology* 43: 70-78.

Tholen D, Zhu XG (2011) The mechanistic basis of internal conductance: A theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. *Plant Physiology* 156, 90-105.

Tsuzuki M, Miyachi S, Edwards GE (1985) Localization of carbonic anhydrase in mesophyll cells of terrestrial C₃ plants in relation to CO₂ assimilation. *Plant Cell Physiology* 26: 881-892.

Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425: 734-737.

Vitousek PM, Field CB, Matson PA (1990) Variation in foliar $\delta^{13}\text{C}$ in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*: a case of internal resistance? *Oecologia* 84, 362-370.

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.

Wang FF, Lian HL, Kang CY, Yang HQ (2010) Phytochrome B is involved in mediating red light-induced stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 3: 246-259.

Zeiger E, Hepler PK (1977) Light and stomatal function – Blue-light stimulates swelling of guard cell protoplasts. *Science* 196: 887-889.

Zeiger E, Zhu JX (1998) Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light-CO₂ interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany* 49: 433-442.

Zeiger E, Talbott LD, Frchilla S, Srivastava A, Zhu J (2002) The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. *New Phytologist* 153: 415-424.