

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

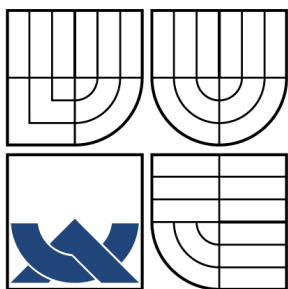
VLIV STÁŘÍ JEHLIC NA OBSAH A AKTIVITU ENZYMU RUBISCO U
SMRKU ZTEPILÉHO
V PODMÍNKÁCH NORMÁLNÍ A ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO₂

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

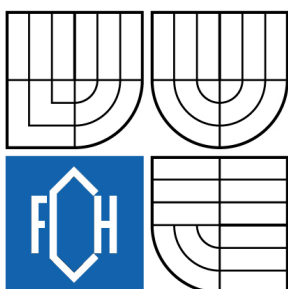
Bc. MARTINA BOŠKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV STÁŘÍ JEHLIC NA OBSAH A AKTIVITU ENZYMU RUBISCO U SMRKU ZTEPILÉHO V PODMÍNKÁCH NORMÁLNÍ A ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO₂

INFLUENCE OF NEEDLE AGE AT RUBISCO ACTIVITY AND CONTENT IN NORWAY SPRUCE
UNDER THE IMPACT OF AMBIENT AND ELEVATED CO₂ CONCENTRATIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

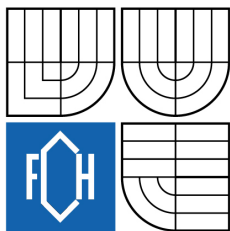
Bc. MARTINA BOŠKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2009



Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0221/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Martina Bošková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí diplomové práce: **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Vliv stárí jehlic na obsah a aktivitu enzymu Rubisco u smrku ztepilého
v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂

Zadání diplomové práce:

1. Srovnat aktivitu a obsah enzymu Rubisco u letošních a loňských jehlic v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého.
2. Potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco, popř. popsat její průběh.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Martina Bošková
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této diplomové práci byl sledován vliv stáří jehlic na obsah a aktivitu enzymu Rubisco smrku ztepilého (*Picea abies*) v podmínkách normální, tj. $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ (A – ambient) a zvýšené, tj. $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ (E – elevated) koncentrace CO_2 . Vzorky byly odebírány v průběhu vegetační sezóny dvakrát, a to v polovině června a na konci září. Byla stanovena počáteční a celková aktivita enzymu a to spektrofotometrickou metodou. Obsah Rubisco byl stanoven metodou SDS-PAGE. Aktivity u 18 měsíců starých jehlic byly v E vyšší než v A. Obsah Rubisco byl v září jak u mladých tak i u rok starých jehlic v A vyšší než v E. Vzhledem k tomu, že tyto rozdíly byly statisticky významné, lze konstatovat existenci aklimační deprese na úrovni obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 . Zdá se, že průběhy aktivit a obsahu v závislosti na stáří jehlic jsou antiparalelní, tzn. pokles obsahu je doprovázen vzrůstem aktivity a naopak.

ABSTRACT

In this diploma work influence of needle age at Rubisco activity and content in Norway spruce (*Picea abies*) was studied. The plants were cultivated in conditions with ambient (A) CO_2 concentration ($350 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) and elevated (E) CO_2 concentration ($700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Sampling was done two times during the growing season (in the middle of June and in the end of September) were taken. Initial and total Rubisco activities were measured spectrophotometrically. Rubisco content was determined by SDS-PAGE method. Rubisco activity in 18-months-old needles was in E higher than in A. Rubisco contents in current-year needles and one-year-old needles were in A higher than in E in September. These differences were statistically significant that demonstrates the down-regulation of Rubisco content in conditions of elevated CO_2 concentration. It seems the course of activities and content depending on age of the needles are antiparallel, that means that decrease of content is followed by increase of activity.

KLÍČOVÁ SLOVA

aktivita Rubisco, obsah Rubisco, smrk ztepilý, aklimační deprese

KEYWORDS

Rubisco activity, Rubisco content, Norway spruce, down-regulation

BOŠKOVÁ, M. Vliv stáří jehlic na obsah a aktivitu enzymu Rubisco u smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 62 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Děkuji tímto mému vedoucímu diplomové práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za podporu, vstřícnost a poskytnuté rady při vypracování této práce.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Fotosyntéza	10
2.1.1 Světlá fáze (primární procesy)	10
2.1.2 Temná fáze (sekundární procesy)	13
2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)	14
2.2.1 Struktura	14
2.2.2 Aktivní místo a aktivace Rubisco	15
2.2.3 Fotorespirace	17
2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny	18
2.3.1 Zvýšená rychlost fotosyntézy	19
2.3.1.1 Aklimace na zvýšenou koncentraci CO ₂	21
2.3.2 Rychlost fotorespirace	21
2.3.3 Vodivost průduchů	21
2.3.4 Rychlost dýchání	22
2.3.5 Teplota	22
2.3.6 Ozáření	23
2.3.7 Účinky zvýšené koncentrace CO ₂ na dřeviny	24
2.4 Aktivita a množství Rubisco	25
2.5 Metody stanovení aktivity	26
2.5.1 In vivo	26
2.5.1.1 Gazometrické stanovení	26
2.5.2 In vitro	27
2.5.2.1 Spektrofotometrické stanovení	27
2.5.2.2 Radiometrické stanovení	27
2.6 Metody stanovení obsahu	28
2.6.1 Gelová elektroforéza	28
2.6.2 HPLC	30
2.6.3 Kapilární elektroforéza	31
2.6.4 Imunologické metody	31
2.6.4.1 ELISA	31
2.6.4.2 Radioimunoprázecní technika	32
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1 Materiál	33
3.2 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco	34
3.2.1 Přístroje	34
3.2.2 Chemikálie	34
3.2.3 Příprava roztoků	35
3.2.3.1 Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8	35
3.2.3.2 Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0	35
3.2.3.3 Příprava aktivačních roztoků	35
3.2.3.4 Příprava extrakčního roztoku	35
3.2.3.5 Příprava roztoku glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy	35
3.2.3.6 Příprava roztoku kreatinfosfokinasy	35

3.2.3.7	Příprava roztoku R5P	36
3.2.3.8	Roztok 3-fosfoglycerátkinasy	36
3.2.3.9	Příprava pracovního roztoku	36
3.2.4	Extrakce enzymu	36
3.2.5	Měření aktivity	36
3.2.5.1	Počáteční aktivita	36
3.2.5.2	Celková aktivita.....	36
3.2.6	Výpočet aktivity enzymu Rubisco	37
3.3	Stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE	38
3.3.1	Přístroje	38
3.3.2	Chemikálie	38
3.3.3	Příprava roztoků	39
3.3.3.1	Roztoky pro přípravu gelů.....	39
3.3.3.2	Roztoky pufrů.....	39
3.3.3.3	Roztoky k vizualizaci bílkovin.....	39
3.3.4	Příprava gelů	40
3.3.4.1	Separční gel	40
3.3.4.2	Zaostřovací gel	40
3.3.5	Příprava standardů.....	41
3.3.6	Příprava vzorků	41
3.3.7	Elektroforéza	41
3.3.8	Vizualizace bílkovin.....	41
3.3.9	Vyhodnocení gelů	42
3.4	Stanovení specifické aktivity Rubisco	43
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	44
4.1	Výsledky.....	44
4.2	Diskuse.....	53
5.	ZÁVĚR.....	55
6.	LITERATURA.....	56
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	62

1. ÚVOD

Fotosyntéza je jeden z nejstarších a současně nejdůležitějších dějů v živé přírodě. Jde o biologický proces přeměny světelné energie na chemickou. Při fotosyntéze je uhlík ve vysoce oxidovaném stavu v oxidu uhličitém převáděn na redukovaný stav v sacharidu. Jedná se o endergonický redukční proces, kde energii poskytuje sluneční záření, zachycované fotoreceptory (chlorofylem) a redukční síla pochází u vyšších zelených rostlin z vodíku vody. Vznikající kyslík tedy nepochází z oxidu uhličitého, ale z oxidace vody.

Enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco) je považován za nejrozšířenější protein na Zemi a je klíčovým enzymem fotosyntézy. Katalyzuje fixaci atmosférického CO_2 do organické sloučeniny a tvoří jedinou vstupní bránu anorganického uhlíku do biosféry. Je to enzym pozoruhodně neúčinný (jeho číslo obratu činí necelé 3 molekuly substrátu za sekundu, zatímco u typického enzymu je to asi 1000 molekul substrátu za sekundu). Proto musí být Rubisco přítomen ve velkém množství (až 50 % celkového množství rozpustných proteinů v listech), aby se udržela dostatečná rychlost fotosyntézy.

Hlavním limitujícím faktorem rychlosti fotosyntézy je enzym Rubisco. U enzymu Rubisco není aktivita odrazem jeho množství, protože enzym existuje v aktivované i neaktivované formě. Pouze aktivovaná forma vykazuje určitou aktivitu, která se velmi rychle mění v horizontu 5–20 minut v závislosti na množství světla, množství substrátu, přítomnosti inhibitorů a jiných faktorech.

V mnohých publikacích posledních let je tento enzym předmětem intenzivního výzkumu. Výzkum směřuje k přípravě efektivnějšího enzymu za pomoci genových manipulací, a také k poznání faktorů, které by umožnily jeho účinnější aktivaci. Terčem diskusí se také stává, zda při zvýšené koncentraci CO_2 v atmosféře může dojít ke zvýšení výnosu plodin.

V České republice se otázkou účinků zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny zabývá Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR. Tato diplomová práce je součástí grantového projektu tohoto ústavu, na kterém dále spolupracují Katedra fyziky Ostravské univerzity a ÚCHPBT Fakulty chemické VUT v Brně. Cílem práce bylo srovnat aktivitu a obsah enzymu Rubisco u mladých a rok starých jehlic v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO_2 a potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco, popř. popsat její průběh.

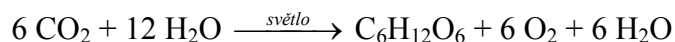
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je jeden z nejstarších a současně nejdůležitějších dějů v živé přírodě. Jde o biologický proces přeměny světelné energie na chemickou. Fotosyntéza umožňuje existenci chemotrofních organismů:

1. Zachycuje sluneční energii a z nejjednodušší sloučeniny uhlíku, oxidu uhličitého, vyrábí organickou hmotu pro výživu chemotrofů.
2. Je hlavním producentem kyslíku naší planety, nepostradatelného pro existenci aerobních organismů.

Při fotosyntéze je uhlík ve vysoce oxidovaném stavu v oxidu uhličitém převáděn na redukovaný stav v sacharidu. Jedná se o silně endergonický redukční proces, kde energii poskytuje sluneční záření, zachycované fotoreceptory (chlorofylem) a redukční síla pochází u vyšších zelených rostlin z vodíku vody. Vznikající kyslík tedy nepochází z oxidu uhličitého, ale z oxidace vody. Souhrnně lze reakce fotosyntézy zaznamenat rovnicí:

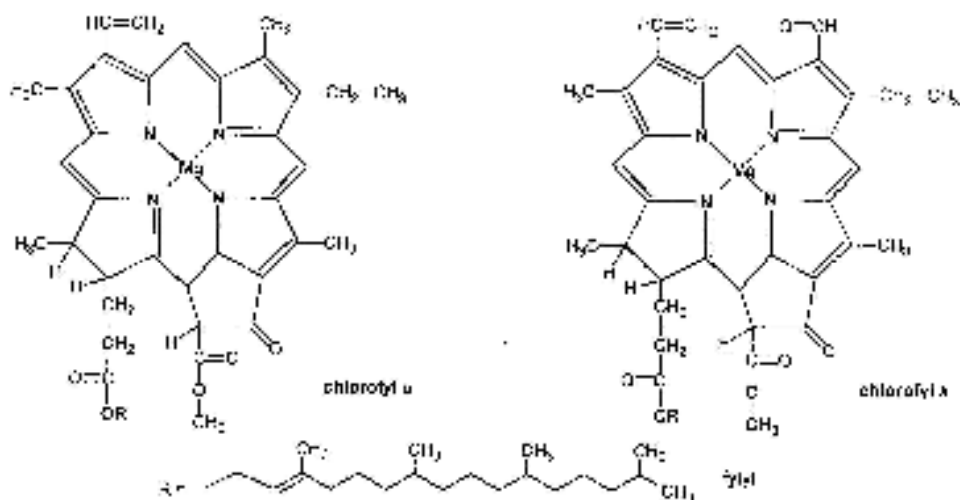


Fotosyntéza probíhá ve dvou oddělených, ale na sebe navazujících fázích – světlá fáze (primární procesy) a temná fáze (sekundární procesy – Calvinův cyklus). [1, 2]

2.1.1 Světlá fáze (primární procesy)

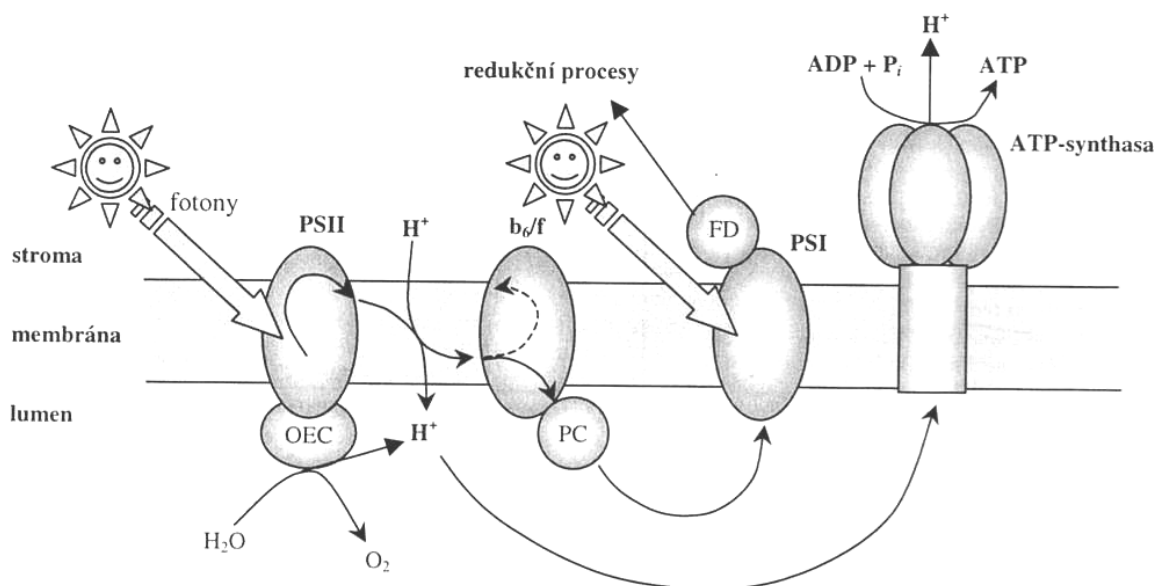
Světlá fáze je fotochemický děj spočívající v přeměně fotonů slunečního záření na energii chemickou. Energie záření se nejprve mění na energii excitovaných elektronů, která se pak používá na výrobu makroergických sloučenin (ATP a NADPH). Světlou fází provádí fotosyntetizující aparát, který sestává ze tří součástí:

1. Fotoreceptory jsou sloučeniny vázané na protein, které absorbují pro fotosyntézu potřebné světelné záření. Jsou to tetrapyrrolové sloučeniny *chlorofyl a* a *chlorofyl b*, které ve svém centru obsahují hořečnatý kation (obr. 1).



Obr. 1 Struktura chlorofylu a a b [2]

2. Fotosyntetické reakční centrum, přeměňující světelnou energii na energii elektrickou.
3. Řetězec oxidoreduktas, přeměňující energii excitovaných elektronů na energii chemickou.

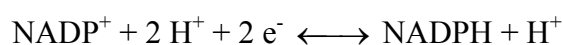


Obr. 2 Enzymy světlé fáze v tylakoidní membráně (OEC – komplex uvolňující kyslík, cyt b_6/f – komplex cytochromů, PC – plastocyanin, FD – ferredoxin, PSI – fotosystém I, PSII – fotosystém II) [2]

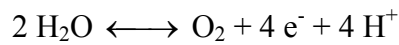
Reakce světlé fáze fotosyntézy se odehrávají v membráně tylakoidů. Obr. 2 ukazuje membránu tylakoidu, kterou prostupují enzymy fotosystému I, cytochromů b_6/f , fotosystému II a ATP-synthasy. Prvním stupněm fotosyntézy je absorpce záření chlorofylovými molekulami, které jsou umístěny v tylakoidech. Molekuly chlorofylu jsou vázány na speciální bílkoviny, které je udržují optimálně nasměrované, tak aby si mohly předávat absorbovanou energii. Prostřednictvím těchto sběračů je nashromážděná energie přenesena na molekulu chlorofylu a v tzv. reakčním centru.

Absorpcí fotonů excitované elektrony opouští molekuly chlorofylu, projdou systémem transelektronas o stoupajícím redoxpotenciálu a vrátí se do základního stavu v molekule chlorofylu reakčního centra. Na cestě řetězcem transelektronas se část energie excitovaných elektronů použije k výrobě ATP, ve spřaženém ději nazývaném fotofosforylace. Systém transportu elektronů, který začíná a končí v molekule chlorofylu reakčního centra, a je současně donorem i akceptorem elektronů, se nazývá cyklická fotofosforylace.

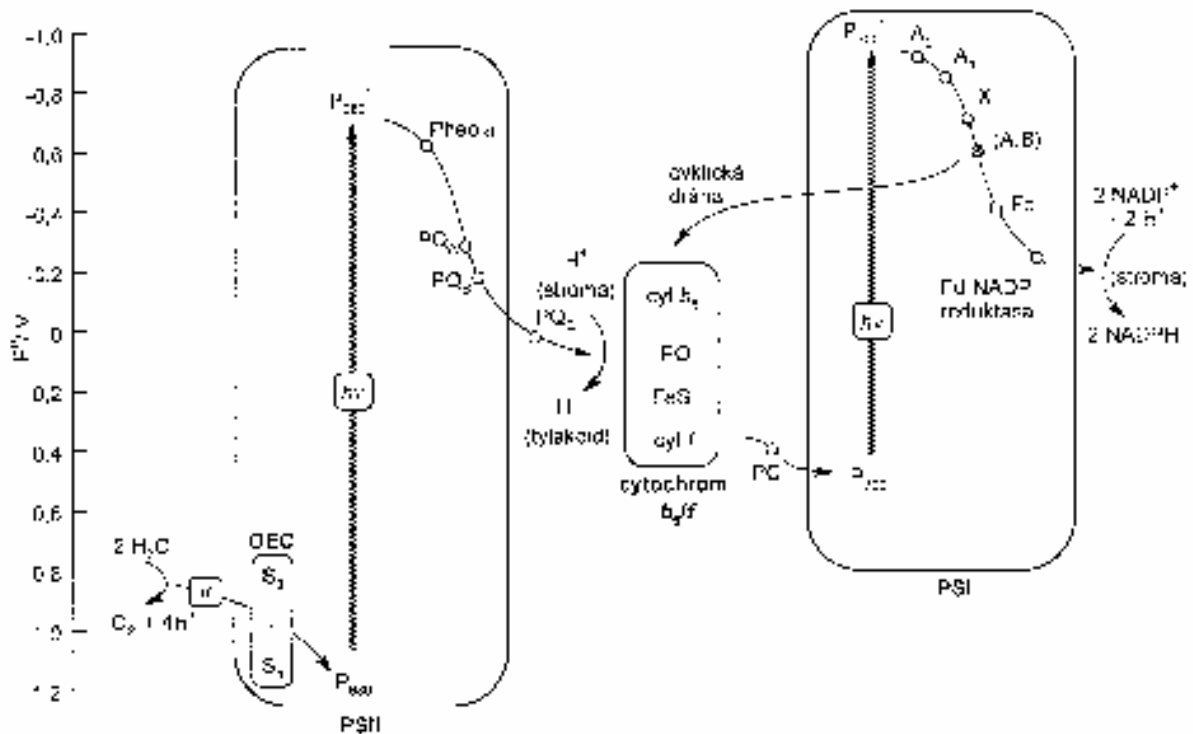
Energie světlem excitovaných elektronů se může ukládat i do další makroergické sloučeniny, kterou je NADPH. Excitované elektrony se nevracejí zpět do molekuly chlorofylu, ale využívají se k redukci NADP^+ . Tento jev se nazývá necyklická fotofosforylace a je charakterizována rovnicí:



K regeneraci chlorofylu do původního stavu se musí použít elektrony z oxidace jiné sloučeniny, která slouží jako donor elektronů. Tímto donorem je molekula vody, jejíž oxidace vede ke vzniku O₂ podle rovnice:



[1, 2]



Obr. 3 Podrobné fotosyntetické schéma Z (OEC – komplex uvolňující kyslík, Pheo – feofytin, PQ_A, PQ_B, PQ_C – plastochinony, FeS – protein se železem a sírou, PC – plastocyanin, A₀ – chlorofyl a, A₁ – fylochinon, X, A, B – ferredoxiny) [2]

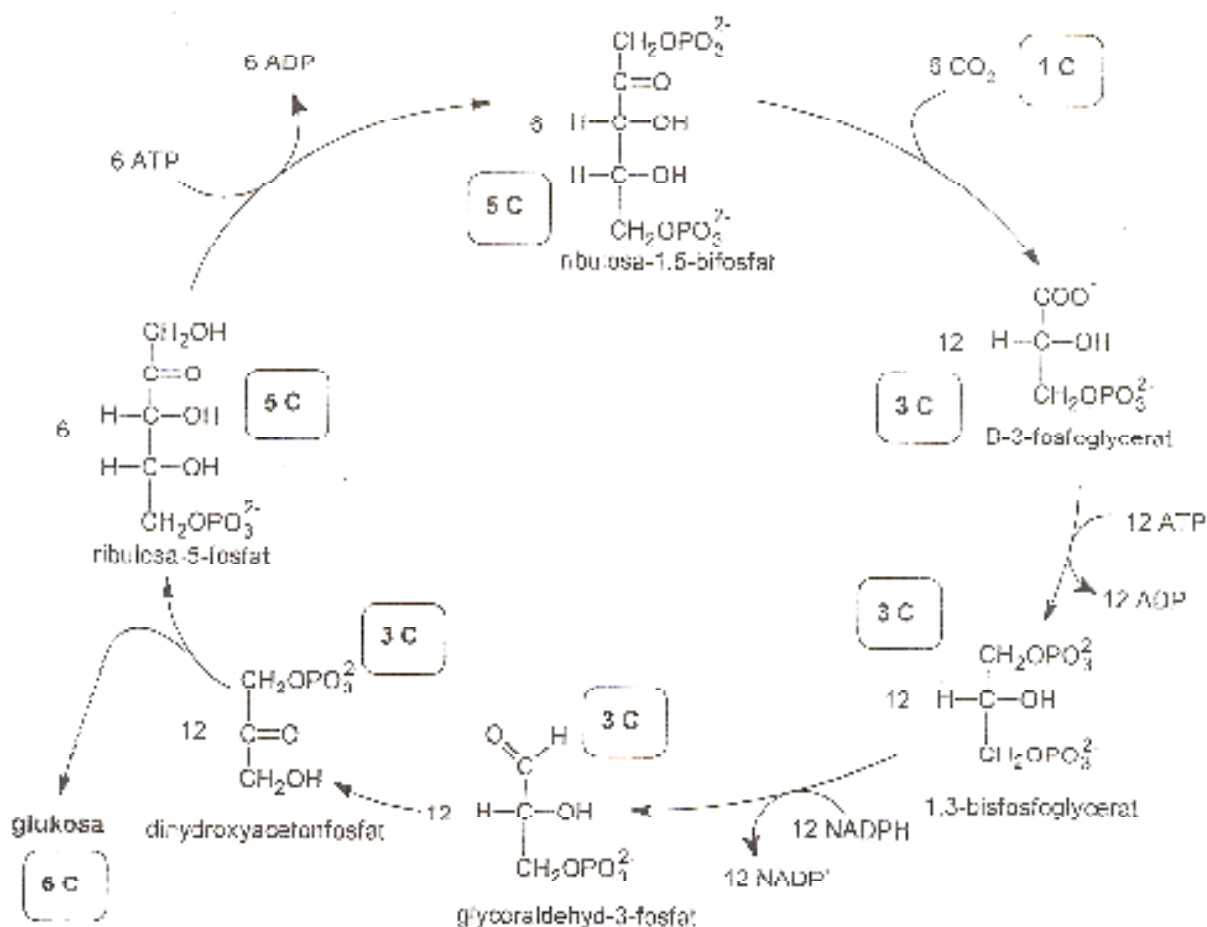
Při toku elektronů se v oxidačně redukčních dějích mění redoxní potenciál postupně se uplatňujících redoxních systémů, jak ukazuje obr. 3. V reakčním centru fotosystému II je obsažen chlorofyl P₆₈₀ (absorpční maximum je 680 nm). Po absorpci fotonu předá excitovaný P₆₈₀* elektron feofytinu a následně je elektron předán komplexu plastochinonu PQ_A s Fe²⁺. Dva elektrony jsou z PQ_A při dvou redukcích přeneseny na PQ_B za vzniku PQ_B²⁻. Tyto plastochinony jsou pevně vázány k proteinům. Fotosystém II elektrony opouštějí navázané na molekuly volně pohyblivých plastochinonů, kterých je v tylakoidní membráně vždy dostatek. Redukcí se plastochinony mění na hydrochinony a směřují k cytochromovým komplexům. Molekula chlorofylu P₆₈₀ se do svého původního stavu dostává tím, že přijímá elektron pocházející z vody. Avšak rozpadem jedné molekuly vody se uvolňují dva elektrony. Bylo ovšem zjištěno, že se současně oxidují dvě molekuly vody a tím se uvolňují celkem čtyři elektrony. K redukci plastochinonu na hydrochinon jsou potřebné nejen dva elektrony, ale také dva vodíkové ionty, které však nepocházejí z fotolýzy vody. Jsou přebírány z vnější strany membrány (ze stromatu) a při dalších redoxních změnách (hydrochinonu na chinon) se v membráně uvolňují na její opačné straně, tedy do lumen. Z toho vyplývá, že oxidací jedné

molekuly vody a následným přenosem elektronů ve fotosystému II se lumen tylakoidu obohatil o dva vodíkové ionty.

Mezi komplexem cytochromů b₆/f a fotosystémem I přenáší elektrony plastocyanin, což je molekula proteinu pohybující se v povrchové membráně dutiny tylakoidu. Tento protein obsahuje koordinačně vázanou měď. Jakmile je světelným kvantem či rezonančním přenosem oxidován aktivní chlorofyl P₇₀₀, chybějící elektron je doplněn z plastocyaninu. První akceptor elektronu z P₇₀₀ je označován jako A₀, další je označován jako A₁ a následují tři Fe-S proteiny. Všechny jsou připojeny k integrálním proteinům reakčního centra. Potom dochází k přenosu elektronu na ferredoxin, který se nachází na stromatální straně tylakoidní membrány. Ferredoxin je dobře rozpustný a tudíž pohyblivý protein s obsahem železa. Přenáší elektrony ke konečnému akceptoru v celém řetězci, k NADP⁺, který je redukován na NADPH. Reakce je zprostředkována flavoproteinem ferredoxin-NADP reduktasou a spotřebovávají se při ní dva elektrony. [2, 3]

2.1.2 Temná fáze (sekundární procesy)

Temná fáze fotosyntézy, neboli Calvinův cyklus (obr. 4), již není závislá na světle. Využívá se NADPH, který se nahromadí ve světlé fázi a energie, ve formě ATP, k redukci CO₂ na sacharidy. Biosyntéza sacharidů probíhá v kapalně části chloroplastu (stroma) a v cytosolu a zahrnuje řadu enzymových reakcí. [1]



Obr. 4 Calvinův cyklus [2]

Při každé obrátce Calvinova cyklu je zachycena jedna molekula atmosférického CO₂ a zabudována do organické sloučeniny. K vytvoření glukosy je třeba 6 obrátek Calvinova cyklu. Dochází k napojení CO₂ na pětiuhlíkatý sacharid ribulosa-1,5-bisfosfát. Vzniká nestabilní šestiuhlíkatý meziprodukt, který se rozpadá na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Katalyzátorem reakce je ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco).

Ve vlastní produkční fázi reagují tři molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu se třemi molekulami CO₂, což vede ke vzniku šesti molekul 3-fosfoglycerátu. Ten je fosforylován pomocí ATP na 1,3-bisfosfoglycerát, který je následně redukován pomocí NADPH na glycerinaldehyd-3-fosfát. Jedna molekula glycerinaldehyd-3-fosfátu opouští Calvinův cyklus a je použita k syntéze glukosy, zbylých pět molekul se účastní regenerační fáze.

V regenerační fázi je pět zbývajících molekul glycerinaldehyd-3-fosfátu přeměněno řadou reakcí na 3 molekuly ribulosa-5-fosfátu, s nimiž cyklus začínal. Tato část Calvinova cyklu probíhá již bez dodání energie, ve formě ATP, nebo redukčních ekvivalentů, ve formě NADPH. [2, 4]

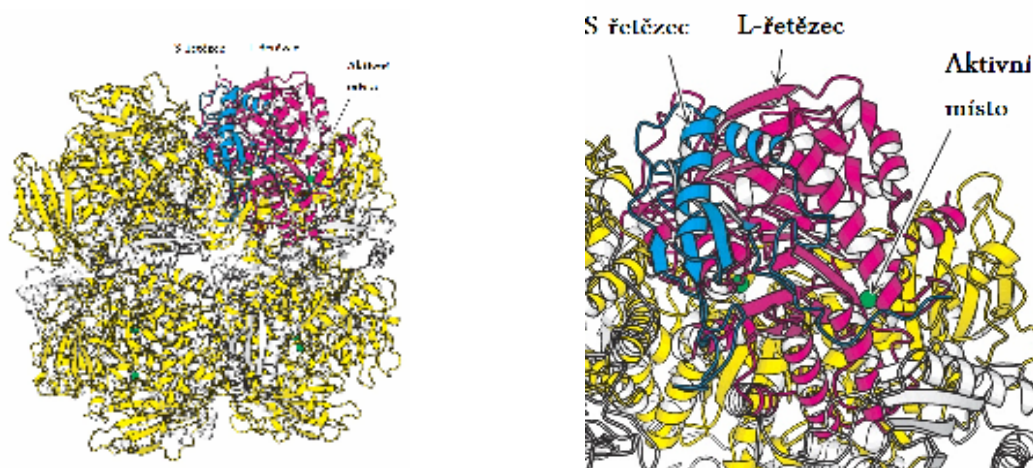
2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)

V roce 1947 Wildman a Bonner [5] objevili pomocí elektroforézy v extraktu listů protein, který u některých druhů tvořil až 50 % hmotnosti listů. Neměli o něm žádné informace a nazvali ho Frakce I. Teprve další studie, které provedli Calvin a Massini [6], Quayle et al. [7], Weissbach et al. [8] prokázaly, že protein vykazuje enzymatickou aktivitu a katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu, za tvorby dvou molekul 3-fosfoglycerátu. Proto byl enzym nazván ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa. V dalších letech Bowes et al. [9], Andrews et al. [10], Lorimer et al. [11] objevili druhou katalytickou aktivitu enzymu, tj. oxygenaci RuBP, která vede k tvorbě molekuly 3-fosfoglycerátu a molekuly fosfoglykolátu. Poté byl název změněn na ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa a postupně se pro něj vžila zkratka Rubisco.

Rubisco je považován za nejrozšířenější enzym na Zemi a je klíčovým enzymem fotosyntézy. Katalyzuje fixaci atmosférického CO₂ do organické hmoty a tvoří jedinou vstupní bránu uhlíku do biosféry. Má velmi nízkou katalytickou účinnost ($k_{\text{kat}} = 2\text{--}12 \text{ s}^{-1}$). Proto musí být Rubisco přítomen ve velkém množství, aby se udržela dostatečná rychlost fotosyntézy. [12, 13]

2.2.1 Struktura

Rubisco je jeden z největších známých enzymů. V přírodě se vyskytují dvě strukturně odlišné, ale analogické formy Rubisco. První forma Rubisco je hexadekamer (obr. 5) a je obsažen ve vyšších rostlinách, řasách a cyanobakteriích. Hexadekamer L₈S₈ má relativní hmotnost 550 kDa, je složený z osmi velkých (L, 50–55 kDa) a osmi malých (S, 12–18 kDa) podjednotek. Každá molekula L₈S₈ má osm vazebných míst pro protilátku a osm vazebných míst pro RuBP, která jsou lokalizována ve velkých podjednotkách. Velká podjednotka je kódována chloroplastovým genomem a její biosyntéza probíhá na chloroplastových ribosomech, malou podjednotku kóduje jaderný genom a je syntetizována v cytosolu. [14]



Obr. 5 Struktura enzymu Rubisco [15]

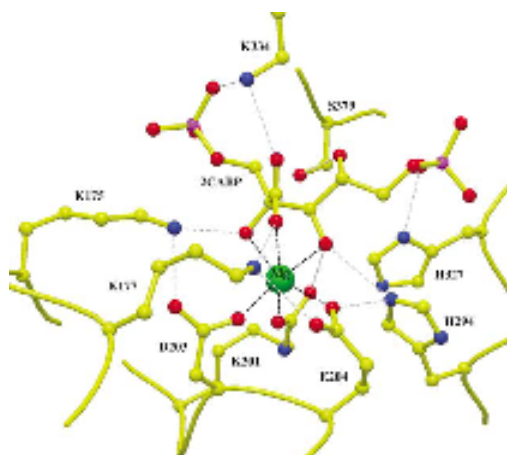
Druhá forma Rubisco je homodimer a vyskytuje se u některých purpurových bakterií. Homodimer L_2 má relativní hmotnost 100–110 kDa, je složený ze dvou velkých podjednotek, každá o relativní hmotnosti 50–55 kDa. [16]

U vyšších rostlin je sekvence aminokyselin u velké podjednotky téměř shodná. Každá velká podjednotka L se skládá z menší N-terminální domény, která je tvořena pěti úseky s β -strukturou a dvěma α -helixy, tzv. α - β -tunely. Větší C-terminální doména má soudkovitý tvar a je složena z osmi stočených struktur α/β . Malá podjednotka S se skládá ze čtyřvláknových antiparalelních β -struktur, které jsou na jedné straně překryty dvěma α -helixy. [14]

Každá L podjednotka obsahuje katalytické a regulační místo a podjednotky S zvyšují katalytickou aktivitu Rubisco. [15]

2.2.2 Aktivní místo a aktivace Rubisco

Aktivní místo (obr. 6) se nachází v ústí α - β -tunelu, kde k sobě přiléhají dvě velké podjednotky a tvoří tak dimer L_2 . Z toho plyne, že homodimer L_2 je nejmenší funkční jednotkou Rubisco, protože samotná velká podjednotka by nemohla vytvořit aktivní místo a nevykazovala by katalytickou aktivitu. [17]



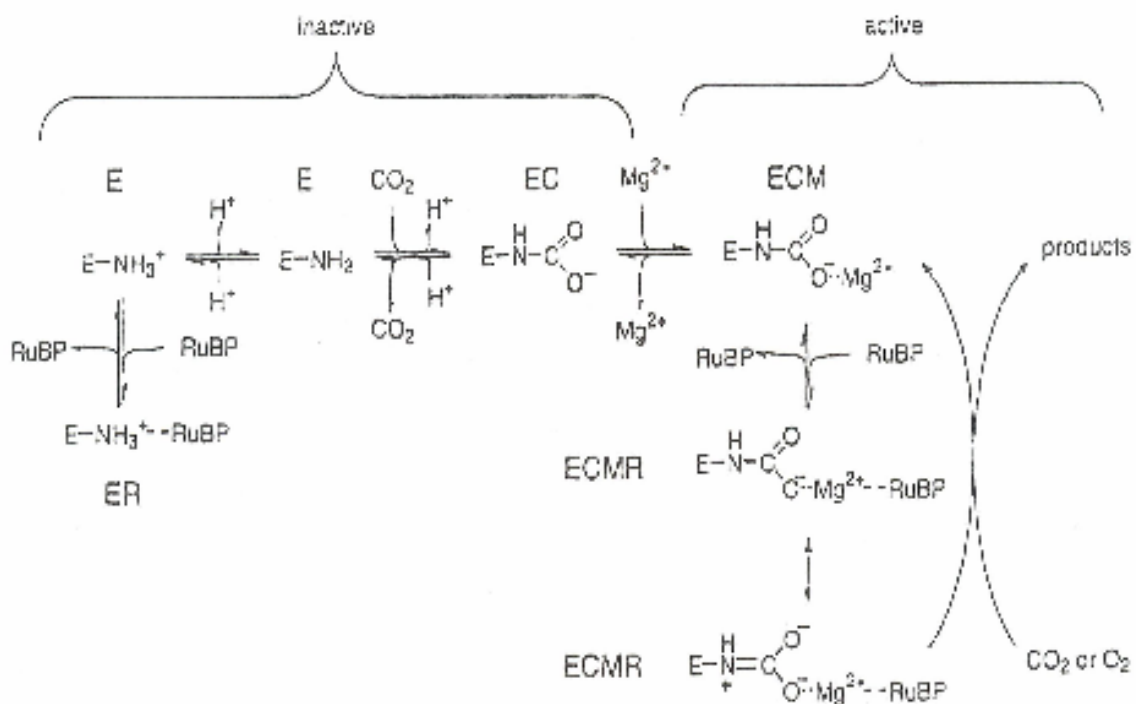
Obr. 6 Aktivní místo Rubisco s navázaným CABP [18]

Calvinův cyklus je regulován tak, aby probíhal pouze ve dne. Na aktivitu Rubisco mají vliv čtyři faktory závislé na světle:

- Rubisco má ostré optimum u pH 8, při osvětlení vzroste pH stromatu z hodnoty 7 na hodnotu 8, neboť protony se ze stromatu odčerpávají do dutiny tylakoidu.
- Odčerpané protony jsou nahrazeny ionty Mg^{2+} , které jsou důležité k aktivaci Rubisco.
- NADPH je allostericky aktivován činností fotosystému I.
- Ve tmě je enzym Rubisco silně inhibován 2-karboxyarabinitol-1-fosfátem. [4]

Aby bylo Rubisco katalycky aktivní, musí být aktivováno. Aktivace je zahájena vazbou CO_2 na ϵ -aminoskupinu Lys 201 za tvorby karbamátu. Na něj se koordinačně naváže Mg^{2+} . Vazba Mg^{2+} probíhá pouze v alkalickém prostředí a v nadbytku Mg^{2+} . [18]

Rubisco je plně aktivováno a karbamylováno při vysoké okolní koncentraci CO_2 a vysokém osvětlení. Při stanovení *in vitro* má schopnost karboxylace pouze aktivovaná enzymová forma. K aktivaci dochází navázáním molekuly CO_2 a iontu Mg^{2+} , který stabilizuje aktivní místo. RuBP se váže do nekarbamylovaného místa mnohem pevněji než do místa karbamylovaného a tím zabraňuje přístupu Mg^{2+} . Proto musí být přítomna aktivasa Rubisco a CO_2 , teprve potom je RuBP vytěsněn z aktivního místa. Volný enzym potom může být karbamylován a vzniklý komplex je následně stabilizován opětovným navázáním RuBP (obr. 7). [19]

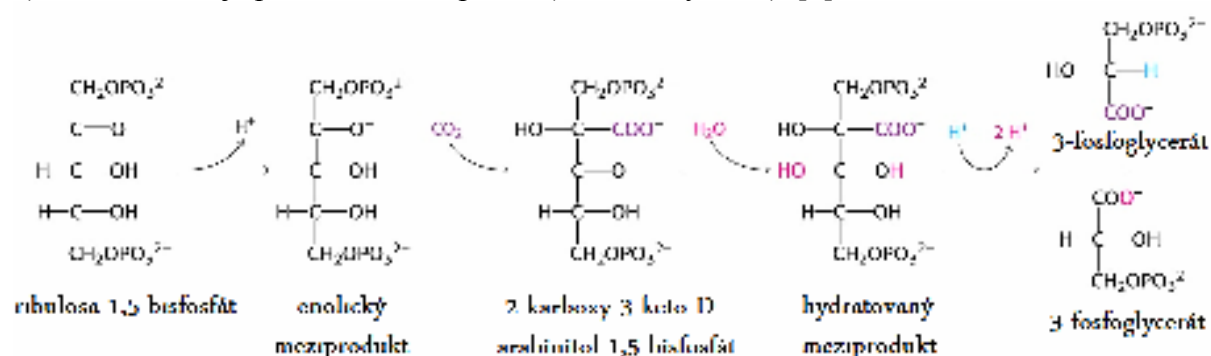


Obr. 7 Aktivace enzymu Rubisco (E) karbamylováním aminokyselinového zbytku Lys 201 (vzniká EC) následovaná navázáním iontu Mg^{2+} za vzniku ECM. Přestože RuBP může vázat karbamylovanou (vzniká ECMR) i nekarbamylovanou (vzniká ER) formu enzymu, pouze karbamylovaná forma je schopná provádět katalýzu. Přístup karbamátu k rezonanční formě nesoucí negativní náboj na obou kyslíkových atomech může být podstatný pro jeho katalyckou funkci. [13]

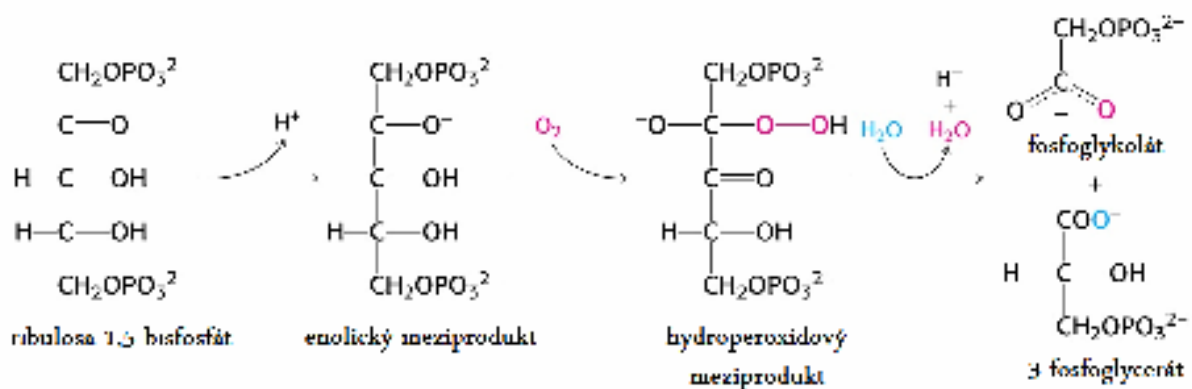
In vivo zprostředkuje aktivaci aktivního místa enzymu aktivasa Rubisco. Aktivasa Rubisco je chloroplastový protein kódovaný jaderným genomem, který usnadňuje aktivaci Rubisco při fyziologických koncentracích CO₂. Aktivasa přechází z neaktivní formy do aktivní hydrolýzou ATP a poté se naváže na Rubisco. Dojde k otevření proteinové smyčky a uvolnění RuBP. Aktivasa se deaktivuje a Rubisco přijímá CO₂. Množství aktivní formy aktivasy závisí na poměru ATP/ADP ve stromatu a je jedním z faktorů ovlivňujících aktivitu Rubisco v závislosti na úrovni aktivace. [19]

2.2.3 Fotorespirace

Rubisco katalyzuje dva druhy reakcí – karboxylaci a oxygenaci RuBP. Pokud Rubisco využívá jako substrát CO₂, jedná se o karboxylaci (obr. 8), která je prvním krokem v Calvinově cyklu. Pokud Rubisco využívá jako substrát O₂, tak se jedná o oxygenaci (obr. 9), a tato reakce je příčinou fotorespirace (světelné dýchání). [2]



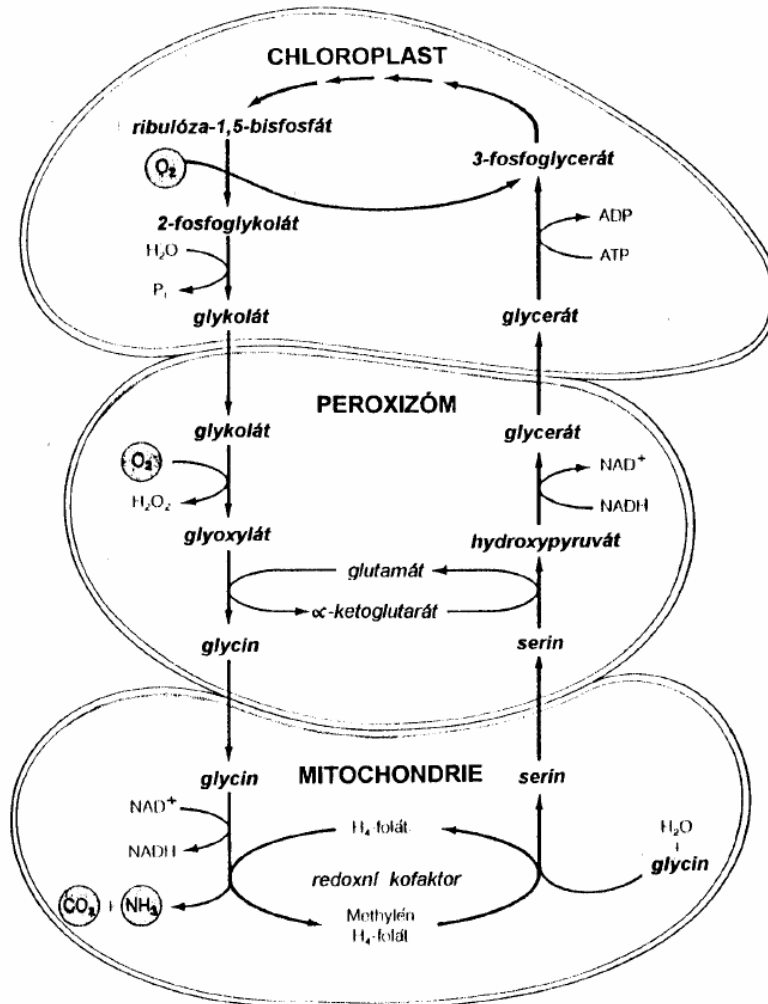
Obr. 8 Karboxylace RuBP katalyzovaná Rubisco [15]



Obr. 9 Oxygenace RuBP katalyzovaná Rubisco [15]

Fotorespirace začíná přenosem kyslíku pomocí Rubisco na stejný substrát jako při karboxylaci, tj. ribulosa-1,5-bisfosfát. Ribulosa-1,5-bisfosfát je nejprve přeměněn na enol formu, a pomocí Rubisco dojde k začlenění O₂, za vzniku nestabilní peroxosloučeniny. Tato peroxosloučenina se ve vodném prostředí rozpadá na jednu molekulu 3-fosfoglycerátu a jednu molekulu fosfoglykolátu. Z fosfoglykolátu se odštěpuje fosfátová skupina a vzniklý glykolát se transportuje z chloroplastu do blízkých peroxisomů. Tam je oxidován na glyoxylát a ten je dále transaminován na glycin. Na tyto reakce v peroxisomu navazují další, tentokrát v mitochondriích: tvorba jedné molekuly serinu ze dvou molekul glycinu – uvolňuje se při tom po jedné molekule CO₂ a NH₃. Serin může být jednak využíván v dusíkovém

metabolismu buňky (syntéza dalších aminokyselin, bílkovin a jiných složitějších látek), ale může být také transportován zpět do peroxisomů, kde po transaminaci a redukci (za spotřeby jedné molekuly NADH) vzniká glycerát. Ten se v chloroplastech fosforyluje za účasti jedné molekuly ATP na 3-fosfoglycerát, který může být využit k regeneraci původního substrátu, ribulosa-1,5-bisfosfátu. Tím se celý cyklus uzavírá (obr. 10). [3]



Obr. 10 Průběh fotorespiračních reakcí [3]

Fotorespirace je energeticky nevýhodná reakce, dochází ke ztrátě jednoho atomu uhlíku, ve formě CO_2 a jedné molekuly ATP. Fotorespirace ovšem také poskytuje rostlině důležité metabolity, např. glycin a serin. Rychlost fotorespirace je 4krát menší než rychlost karboxylace za normálních atmosférických podmínek při $25\text{ }^\circ\text{C}$. Fotorespirace, stejně jako karboxylace, potřebuje Lys 201 v karbamátové formě. [15]

2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny

Účinky zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny se projevují zejména změnou rychlosti fotosyntézy, fotorespirace a také vodivosti průduchů. Griffin et al. [20] zjistili velké rozdíly v některých parametrech rostlin pěstovaných při změněné koncentraci CO_2 a to pouze během světelné periody ve srovnání s trvale sníženou nebo zvýšenou koncentrací. Z teoretické

i praktické stránky vyplývá, že zvýšení koncentrace CO₂ zvyšuje rychlost fotosyntézy. Avšak při dlouhodobém působení vyšší koncentrace CO₂ se u většiny rostlin takto zvýšená rychlost pomalu snižuje. Toto snížení může probíhat až na původní úroveň a to tím, že se v listech rostlin snižuje obsah enzymu Rubisco. Tento proces je pak nazýván aklimace nebo aklimační deprese a jejím nejčastějším vysvětlením je nahromadění sacharidů ve fotosyntetizující tkáni.

[21]

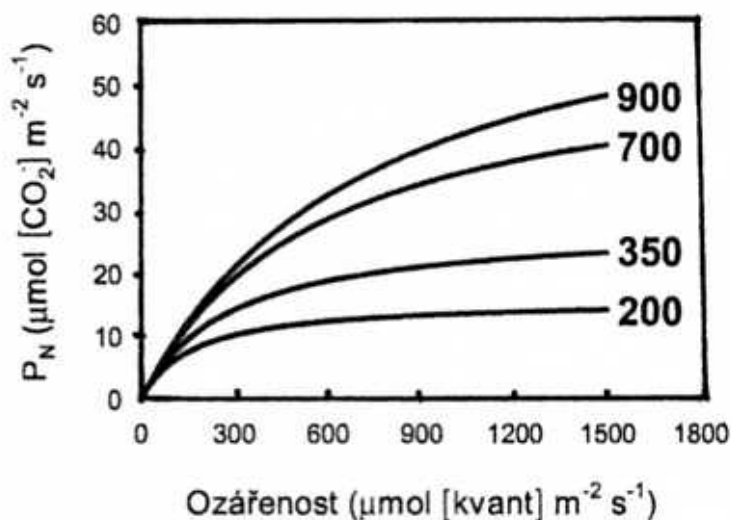
2.3.1 Zvýšená rychlost fotosyntézy

Rychlost fotosyntézy jako funkce koncentrace CO₂ je křivočará závislost s nasycením. Pro její matematický popis se používá nejčastěji rovnice Michaelise a Mentenové:

$$P = \frac{P_{\max} \cdot c_{CO_2}}{c_{CO_2} + K_c}$$

kde P je rychlost fotosyntézy, P_{max} je nejvyšší možná hodnota rychlosti fotosyntézy a K_c je konstanta obdobná konstantě K_m z rovnice Michaelise a Mentenové. [22]

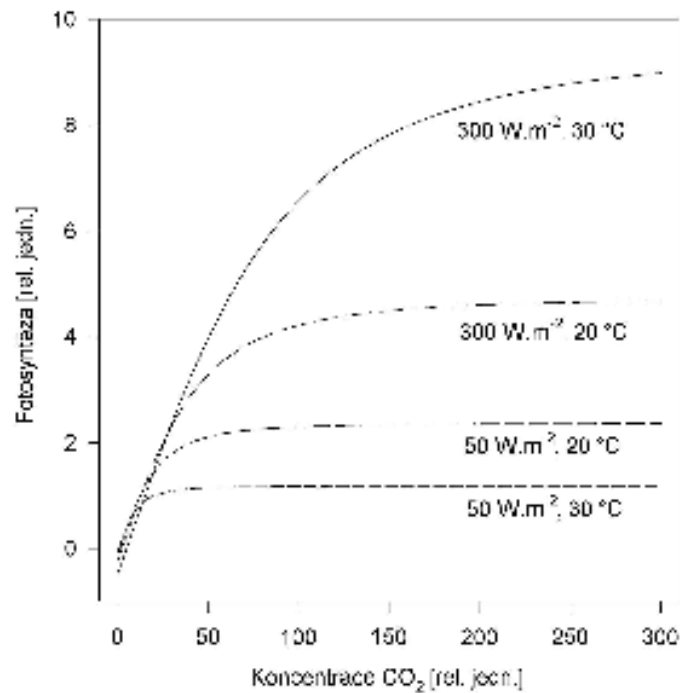
Dietz [23] zjistil, že zvýšení rychlosti fotosyntézy je výsledkem změn rychlosti karboxylace a inhibice fotorespirace způsobených zvýšenou koncentrací CO₂ ve vzduchu kolem fotosyntetických orgánů rostlin. Míra tohoto zvýšení závisí na mnoha faktorech, zejména na ozáření rostlin (obr. 11).



Obr. 11 Závislost rychlosti fotosyntézy na ozáření při různé koncentraci CO₂, udávající čísla u křivek [24]

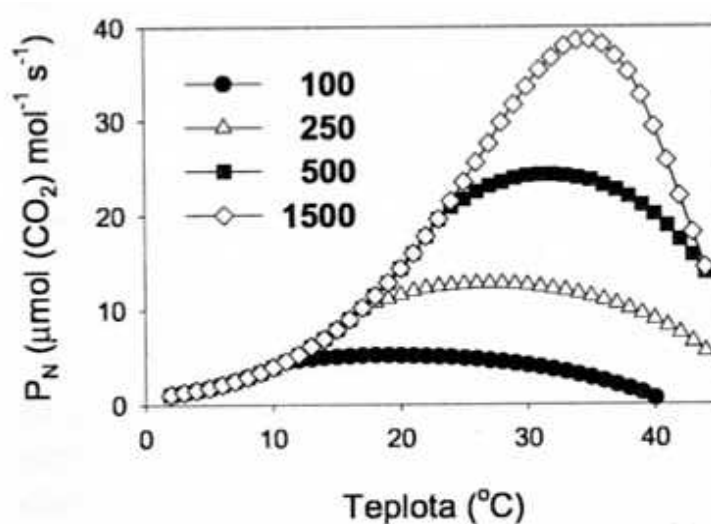
Z obrázku je patrné, že vyšší koncentrace CO₂ způsobuje zvýšení rychlosti fotosyntézy, a to zejména při vyšším ozáření. Toto zvýšení rychlosti fotosyntézy je ovšem také patrné při nižších hodnotách ozáření, což má pozitivní vliv zejména v době krátce po rozednění a před setměním.

Na obr. 12 můžeme vidět, jak roste rychlost fotosyntézy v závislosti na koncentraci CO₂, ozáření a teplotě.



Obr. 12 Závislost rychlosti fotosyntézy na teplotě při různých úrovních ozáření a koncentrace CO₂ [22]

Na zvýšení rychlosti fotosyntézy mají kromě zvýšení koncentrace CO₂ také vliv jeho vzájemné interakce se změnou teploty. Na obr. 13 je znázorněn typický vliv teploty na rychlost fotosyntézy při různých koncentracích CO₂. Z grafu je patrné, že s vyšší koncentrací CO₂ se teplotní optimum posouvá k vyšším teplotám a toto optimum se výrazně zužuje.



Obr. 13 Závislost rychlosti fotosyntézy na teplotě při ozáření, jejichž hodnoty jsou v grafu [24]

Cannell a Thornley [25] odvodili, že rychlost fotosyntézy se zvyšuje výrazněji při vyšších teplotách se spolupůsobením vyšší koncentrace CO₂. Tento proces se projevuje zejména

v teplejších oblastech. Pokud se zvýší teplota nad teplotní optimum může to mít inhibiční účinek na fotosyntézu.

2.3.1.1 Aklimace na zvýšenou koncentraci CO₂

Aklimace je přizpůsobení rychlosti fyziologických procesů na změněné hodnoty některých faktorů vnějšího prostředí. Tímto rozumíme změny, ke kterým dochází při dlouhodobém pěstování rostlin při změněných podmínkách. Demmers-Derks et al. [26] sledovali pokles rychlosti fotosyntézy, snížení množství nebo aktivity Rubisco či dalších enzymů Calvinova cyklu u rostlin dlouhodobě vystavených vyšší koncentraci CO₂. Nejvýrazněji se tato aklimace projevuje postupným poklesem rychlosti čisté fotosyntézy.

Oosten a Besford [27] vysvětlili omezení aktivit fotosyntetického aparátu při pěstování ve zvýšené koncentraci CO₂ následujícím způsobem. Při kultivaci rostlin v běžných podmínkách a při okolní koncentraci CO₂ odpovídá rychlost tvorby asimilátů kapacitě transportních drah. Za této situace je exprese fotosyntetických genů řízena především světlem a stupněm vývoje rostliny. Při kultivaci v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ přesahuje rychlost tvorby asimilátů možnosti jejich transportu.

V zásadě jsou dva důvody pro aklimaci:

- Rostlina není schopna využít nadbytečné asimiláty, proto reguluje pokles aktivity jejich zdrojů.
- Pro fotosyntézu při vyšší koncentraci CO₂ je postačující menší množství Rubisco.

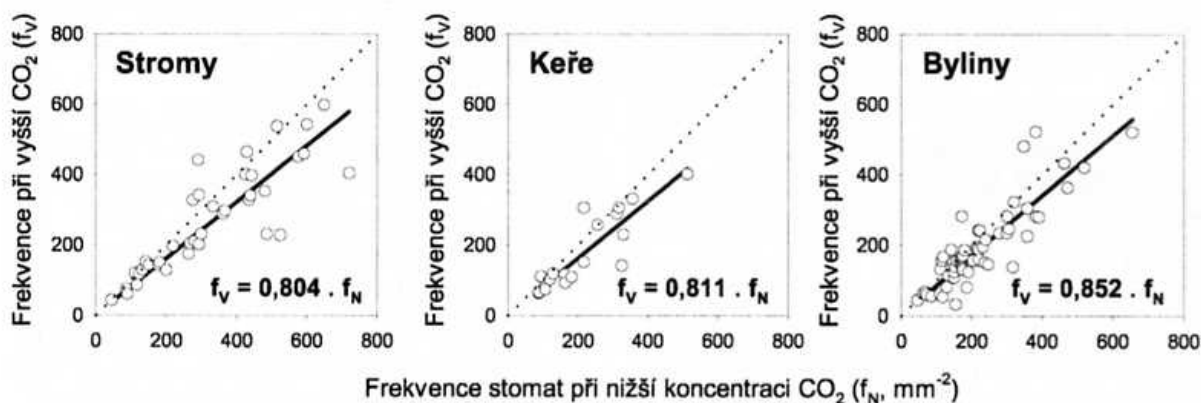
2.3.2 Rychlost fotorespirace

Metabolické základy fotosyntézy a fotorespirace spočívají ve schopnosti enzymu Rubisco navázat na stejný substrát, kterým je ribulosa-1,5-bisfosfát, jak CO₂ (karboxylace) tak i O₂ (oxygenace). Navázáním molekuly O₂ na uvedený substrát vzniká fosfoglykolát, jímž začíná tzv. glykolátová cesta, během níž se při postupném navázání dvou molekul O₂ uvolní jedna molekula CO₂. Fotorespirace je díky vyšší koncentraci CO₂ inhibována. Snížením koncentrace O₂ na méně jak 5 %, nebo zdvojnásoběním až ztrojnásobením koncentrace CO₂ dochází k úplné inhibici fotorespirace. [24]

2.3.3 Vodivost průduchů

Zvýšená koncentrace CO₂ vyvolává u většiny rostlin přivření průduchů. Drake et al. [28] provedli 41 pokusů s 28 druhy rostlin a zjistili, že průměrné snížení vodivosti průduchů při dvojnásobné koncentraci CO₂ činí 20 %. Snížená rychlost transpirace modifikuje jednotlivé složky energetické bilance listu, což se promítá i ve změně jejich teploty. Idso et al. [29] prokázali, že zvýšení teploty listů zvýšenou koncentrací CO₂ je přímo úměrné poklesu vodivosti průduchů.

Woodward a Kelly [30] shrnují výsledky 122 prací zahrnujících celkem 100 rostlinných druhů (obr. 14). Z tohoto počtu byla aklimace prokázána u 74 % druhů a průměrné snížení frekvence průduchů činilo 14,3 %. Woodward a Kelly se domnívají, že snížení frekvence průduchů je tím větší, čím je samotná hodnota frekvence průduchů při obvyklé atmosféře vyšší.



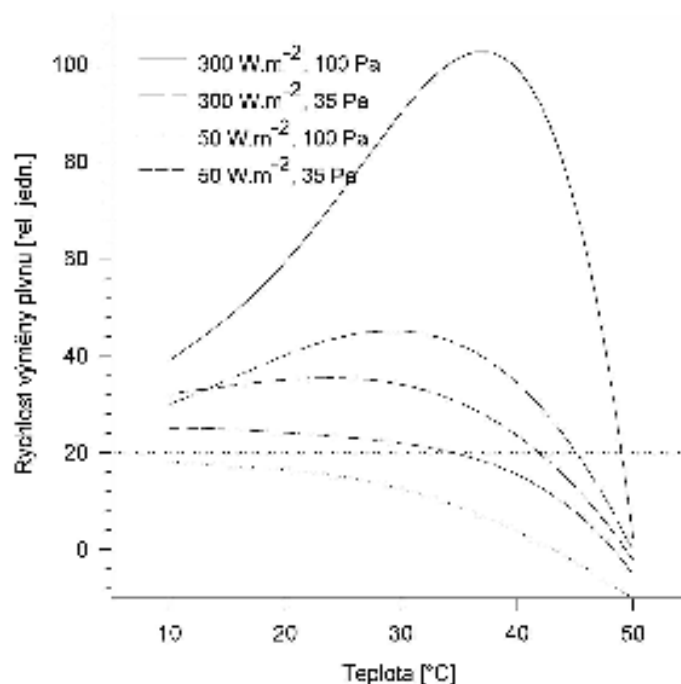
Obr. 14 Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na frekvenci průduchů u rostlinných druhů [30]

2.3.4 Rychlost dýchání

González-Meler et al. [31] prokázali přímý vliv zvýšené koncentrace CO_2 na dýchání rostlin. Došlo ke snížení rychlosti respirace, při zvýšené koncentraci CO_2 . Zvýšenou koncentrací, prokázali inhibici externě dodaného sukcinátu nebo NADH k suspenzi mitochondrií. Přitom zjistili, že zvýšenou koncentrací CO_2 je inhibována aktivita sukcinátdehydrogenasy i cytochrom-c-oxidasy. Zdvojnásobením koncentrace CO_2 se snížila rychlost příjmu kyslíku mitochondriemi o 10 až 15 %.

2.3.5 Teplota

Se stoupající teplotou rychlost fotosyntézy roste, při vyšších teplotách se však přírůstky rychlosti zmenšují, křivka vytvoří maximum a nakonec začne rychlost fotosyntézy klesat. Tento pokles začíná už při nižších teplotách, které ještě fotosyntetický aparát nepoškozují. Avšak při ještě vyšších teplotách je významnou složkou poklesu také narušení normálního uspořádání fotosyntetického aparátu včetně denaturace bílkovin. Při těchto teplotách se rychlost fotosyntézy snižuje s časem tou měrou, jak postupuje narušení fotosyntetického aparátu. Tvar křivky se mění s časem, po nějž je fotosyntetická soustava vystavena vysoké teplotě (obr. 15). Vzestupné rameno teplotní křivky je exponenciála. Velmi často se však křivka od tohoto průběhu odchyluje již při nižších teplotách a vždy se začne odchylovat při vyšších teplotách, když vytváří maximum. [22]



Obr. 15 Závislost rychlosti fotosyntézy na teplotě při různých úrovních ozáření a koncentrace CO_2 [22]

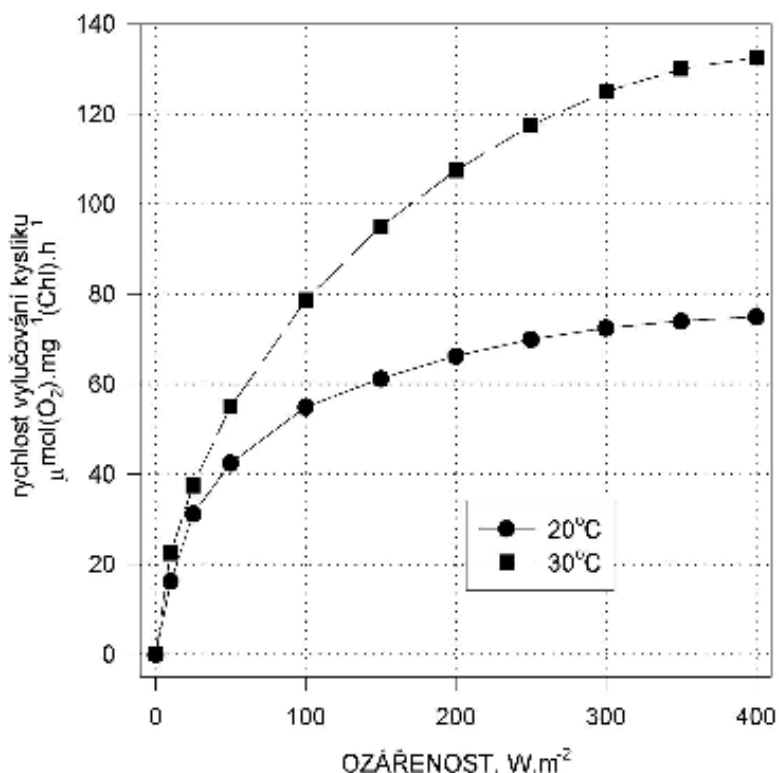
Acock et al. [32] zjistili, že zvýšení koncentrace CO_2 zvyšuje teplotní optimum fotosyntézy. To znamená, že relativní pokles rychlosti fotosyntézy při teplotách přesahujících teplotní optimum rostlin pěstovaných v okolní koncentraci CO_2 je kompenzován právě posunutím tohoto optima. S teplotou také klesá kvantový výtěžek fotosyntézy, tj. počet molů CO_2 fixovaného absorpcí jednoho molu fotonů. Zvýšení tohoto výtěžku zvýšením koncentrace CO_2 je rovněž úměrné teplotě.

2.3.6 Ozářenost

S rostoucí ozářeností se snižuje účinnost přeměny pohlceného záření, tj. snižuje se podíl pohlcených fotonů, jejichž energie se zachová v podobě rozdělených nábojů a zvyšuje podíl těch, jejichž energie se přemění v teplo nebo ve fluorescenci. Rychlost přeměny záření závisí na ozářenosti obdobně jako rychlost enzymatické reakce na koncentraci substrátu: přírůstky rychlosti v odezvě na přírůstky ozářenosti se postupně zmenšují, až se dojde ke stavu, kdy další zvyšování ozářenosti již pochod prakticky neurychluje. Říká se, že rychlost pochodu je nasycena zářením. Pro matematický popis této závislosti můžeme použít shodné rovnice, jakou pro enzymatické reakce navrhli Michaelis a Mentenová:

$$P = \frac{P_{\max} \cdot I}{I + K_s}$$

kde P je rychlost fotosyntézy, P_{\max} je nejvyšší možná rychlost fotosyntetického pochodu, I je ozářenost a K_s je konstanta obdobná konstantě K_m z rovnice Michaelise a Mentenové. [22]



Obr. 16 Závislost rychlosti fotosyntézy na různých úrovních ozáření a teplotě [22]

2.3.7 Účinky zvýšené koncentrace CO₂ na dřeviny

Pro dřeviny je charakteristická zejména tvorba jejich sekundárních pletiv, která poskytují pevnost i při velkých výškách kmenů. Jedná se o velkou investici zejména uhlíku do buněčných stěn. Tyto energetické a materiální náklady jsou kompenzovány dlouhou životností těchto rostlin. Délka jejich života však způsobuje problém při studiu vlivu změny klimatu na růst a produkci, protože vyžaduje i adekvátně dlouhé doby měření. [24]

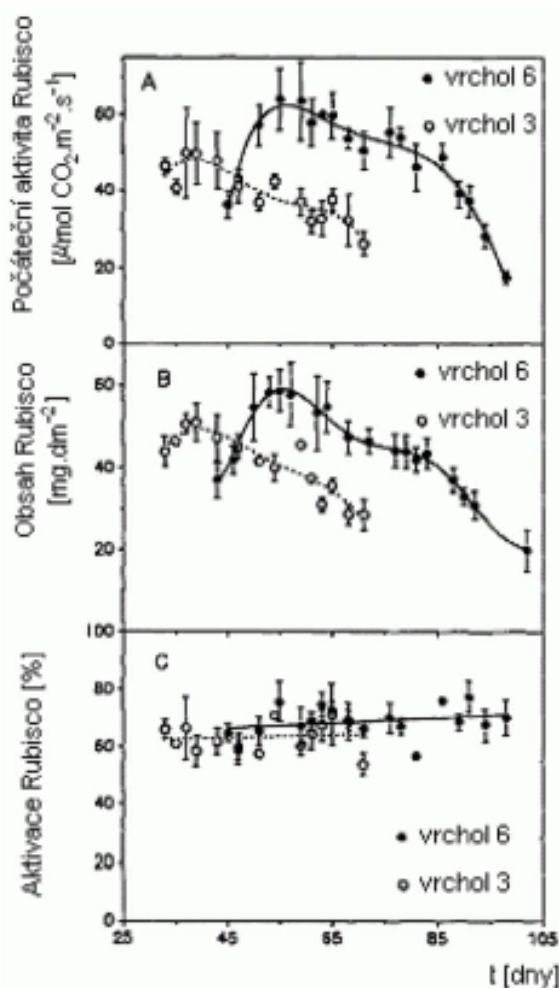
Zvýšení koncentrace CO₂ zvyšuje rychlost vývoje především v počátečních fázích. To pak činí problémy ve srovnání variant s různou koncentrací CO₂, protože se ve stejném okamžiku srovnávají vývojově rozdílné rostliny. Hättenschwiller et al. [33] sledovali tloušťku letokruhů a dubu cesmínového, které rostly 30 let poblíž přirozeného zdroje CO₂ v atmosféře obsahující 650 μmol CO₂ mol⁻¹ vzduchu. Šířka letokruhů u těchto stromů byla o 12 % větší ve srovnání se stromy rostoucích při standardní koncentraci CO₂. Tyto rozdíly se projeví pouze u mladých stromů, ke konci sledovaného období (tj. u stromů starých 25–30 let) se již rozdíly neprojevily. Hättenschwiller et al. odvozují, že v atmosféře se zvýšenou koncentrací CO₂ může dojít k rychlejší regeneraci lesních porostů.

Saxe et al. [34] odmítají projev aklimace u dřevin. Provedli řadu pokusů, v nichž zvýšená rychlost fotosyntézy v důsledku zvýšené koncentrace CO₂ zůstává zachována i při několikaleté kultivaci stromů při této zvýšené koncentraci CO₂. Osborne et al. [35] vyvodili ze svých pokusů zcela odlišné závěry. Po dobu téměř 4 let sledovali vliv zvýšené koncentrace CO₂ na jahodku indickou. Prokázali výraznou aklimaci, která se projeví zejména poklesem množství enzymu Rubisco.

2.4 Aktivita a množství Rubisco

Aktivita představuje množství enzymu, které přemění za standardních podmínek za 1 sekundu 1 mol substrátu. V případě Rubisco se aktivita vyjadřuje jako látkové množství asimilovaného CO₂ za sekundu na jednotkovou plochu listu [$\mu\text{mol (CO}_2\text{) s}^{-1} \text{m}^{-2}$]. Lze také vyjádřit i specifickou aktivitu, tj. látkové množství asimilovaného CO₂ za sekundu na jednotkovou hmotnost enzymu [$\mu\text{mol (CO}_2\text{) s}^{-1} \text{g}^{-1}$]. Aktivita Rubisco je ve srovnání s běžnými enzymy velice nízká. Zatímco běžné enzymy přemění asi tisíc molekul substrátu za sekundu, Rubisco přemění necelé tři molekuly substrátu za sekundu. Jeho pomalost je kompenzována jeho velkým množstvím.

Při stanovení aktivity Rubisco *in vitro* se rozlišuje aktivita počáteční a celková. Při měření počáteční aktivity je extrakt do reakční směsi přidán až těsně před měřením. Proto se Rubisco nemůže aktivovat více, než bylo aktivováno *in vivo*. Při měření celkové aktivity je extrakt 15 minut inkubován s aktivačními roztoky, které obsahují CO₂ a Mg²⁺ ionty ve formě KHCO₃ a MgCl₂. Tímto dojde k aktivaci aktivních center Rubisco, pokud však nejsou obsazena pevně vázanými inhibitory. Z tohoto důvodu je počáteční aktivita nižší než aktivita plně aktivovaného, neinhibovaného enzymu. Z poměru počáteční a celkové aktivity se stanovuje stupeň aktivace v procentech. Aktivace a deaktivace *in vivo* je velmi pomalá. Pro aktivaci je třeba 4–5 minut a pro deaktivaci 20–25 minut. [13, 36]



Obr. 17 Časový průběh počáteční aktivity, množství Rubisco a aktivace během stárnutí listů od zasazení rostliny [37]

Aktivní místo Rubisco může být blokováno různými inhibitory, které není možné odstranit aktivací *in vitro*. V noci a při malém ozáření se na aktivní místo pevně váže 2-karboxyarabinitol-1-fosfát (CA1P), který se velmi podobá 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Rubisco ve tmě není nikdy kompletně inaktivováno a stupeň aktivace se pohybuje mezi 30–40 %, v závislosti na druhu. Mezi denní inhibitory patří substrátové analogy D-xylulosa-1,5-bisfosfát (XuBP) a 3-keto-D-arabinitol-1,5-bisfosfát (3-KABP). [38, 39]

Množství aktivované formy se mění v horizontu 5–20 minut v závislosti na množství světla, substrátu (RuBP), množství dostupného CO₂ a přítomnosti inhibitorů. Aktivita enzymu Rubisco je veličina hodně proměnlivá a vyjadřuje pouze množství katalytických forem Rubisco, proto se také stanovuje celkový obsah enzymu.

2.5 Metody stanovení aktivity

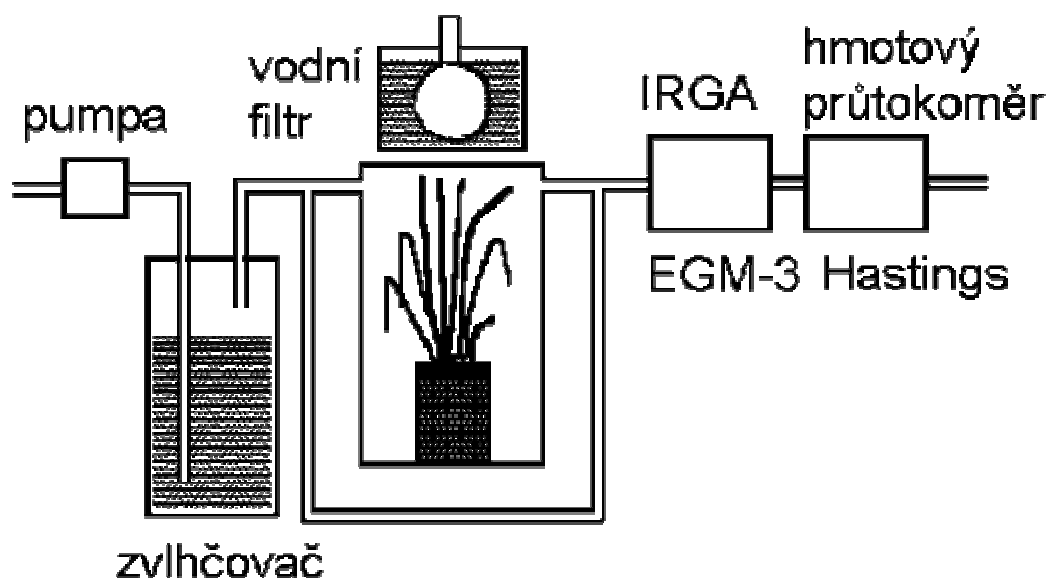
Pro stanovení aktivity se využívají metody nepřímé (*in vivo*) a metody přímé (*in vitro*). Mezi nepřímé metody patří např. metoda gazometrická, mezi metody přímé patří např. metoda spektrofotometrická a radiometrická.

Výsledná aktivita Rubisco stanovená *in vitro* je nižší než při stanovení *in vivo*. Rogers et al. [40] tento rozdíl zdůvodnili nedostatečnou extrakcí enzymu Rubisco při stanovení *in vitro*. Po extrakci a centrifugaci přechází do supernatantu pouze 33 % z celkového množství enzymu.

2.5.1 In vivo

2.5.1.1 Gazometrické stanovení

Gazometrické metody jsou založeny na principu měření rychlosti spotřeby CO₂ rostlinami. Podle uspořádání měřící aparatury, zejména zapojení infračerveného analyzátoru plynů (IRGA) do měřícího systému, rozlišujeme gazometrické metody: uzavřené a otevřené (obr. 18). Objekt je nutno vložit do asimilační komory, která je vzduchotěsná, termostabilní a s dokonalou cirkulací vzduchu uvnitř komory. Pokles koncentrace CO₂ v okolí rostliny se měří pomocí infračerveného analyzátoru plynů. [41, 42]



Obr. 18 Otevřený gazometrický systém [42]

2.5.2 In vitro

2.5.2.1 Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrické stanovení aktivity je založeno na změně absorbance při oxidaci NADH. K tomuto dochází v systému spřažených chemických reakcí, které představují první tři kroky Calvinova cyklu. Změna absorbance se měří při 340 nm.

Současná spektrofotometrická stanovení aktivity Rubisco vycházejí z metody, kterou publikovali Lilley a Walker [43]. Jako základní pufr se používá N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina (HEPES), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) nebo N,N-bis-2-hydroxyethylglycin (BICIN) o pH 7,7–8,2. Pro aktivaci Rubisco se do reakční směsi nejčastěji přidává 10 mmol dm⁻³ KHCO₃ a 20 mmol dm⁻³ MgCl₂. Hydrogenuhličitan draselný současně poskytuje oxid uhličitý pro karboxylaci.

Mezi karboxylační reakcí a oxidací NADH byla objevena časová prodleva. Ovšem tento nežádoucí efekt může být eliminován přidáním ATP do reakční směsi regenerujícího systému. Tento systém představuje fosfokreatin, který odstraňuje ADP z reakční směsi. [43]

Extrakti enzymu lze provádět různými způsoby, nesmí ovšem docházet ke změnám aktivity.

Besford [44], Du et al. [45], Gerard a Driscoll [46], Parry et al. [36], Li et al. [47] aj. doporučují vzorek ihned po odebrání ze stromu zvážít, změřit jeho plochu a zmrazit v kapalném dusíku. Před vlastním stanovením rozetřít vzorek v třecí misce s mořským pískem a kapalným dusíkem a poté extrahovat Rubisco extrakčním pufrům (HEPES, TRIS nebo BICIN) a po centrifugaci stanovit aktivitu enzymu v supernatantu.

Tissue et al. [48] preferují jiný postup, který je vhodnější pro jehličnany. Ty obsahují velké množství fenolických látek a terpenů, které při zmrazení kapalným dusíkem rozrušují strukturu Rubisco a tím snižují jeho aktivitu. Proto navrhuje čerstvě odstřižené jehlice ihned homogenizovat při 0 °C ve 100 mmol dm⁻³ HEPES, s přídavkem 5 mmol dm⁻³ EDTA a 2 % polyvinylpyrrolidonu, extrakt zcentrifugovat a teprve kapalným supernatant zmrazit v kapalném dusíku.

Při spektrofotometrickém stanovení aktivity enzymu Rubisco se rozlišuje počáteční a celková aktivita. Počáteční aktivita se stanovuje ihned po extrakci enzymu, kdy se Rubisco nestačí aktivovat více než bylo aktivované *in vivo* (fyziologicky aktivované množství). Tato aktivita je závislá na podmínkách, při kterých byl vzorek odebrán. Celková aktivita se měří po 10–15 minutové inkubaci enzymu s CO₂ a ionty Mg²⁺. Při této inkubaci dochází k aktivaci všech aktivních center, která nejsou blokována pevně vázanými inhibitory (ribulosa-1,5-bisfosfát a ribosa-5-fosfát). Po inkubaci je reakce iniciována přídavkem substrátu a měřena absorbance. [40]

2.5.2.2 Radiometrické stanovení

Radiometrická metoda je založena na asimilaci radioaktivně značeného uhlíku ¹⁴C. Proto je nutné před stanovením odstranit z reakční směsi veškerý CO₂ a endogenní uhličitany. Do reakční směsi se přidá známé množství ¹⁴C ve formě NaHCO₃ a reakce se nastartuje známým množstvím RuBP nebo extraktem aktivovaného enzymu. Po 60 sekundách se zastaví přídavkem HCl. Volný CO₂ se ze směsi kvantitativně odstraní a poté se změří radioaktivita

produktů, která odpovídá množství asimilovaného $^{14}\text{CO}_2$. Radioaktivita se určí pomocí spektrometrie s kapalným scintilátorem. [49]

2.6 Metody stanovení obsahu

2.6.1 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení bílkovin. Použití porézních gelů (agarosy nebo polyakrylamidového gelu) umožňuje separaci molekul na principu síťového efektu a zároveň na základě elektroforetické pohyblivosti dělených látek.

Na ionty, pohybující se konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, působí elektrická síla:

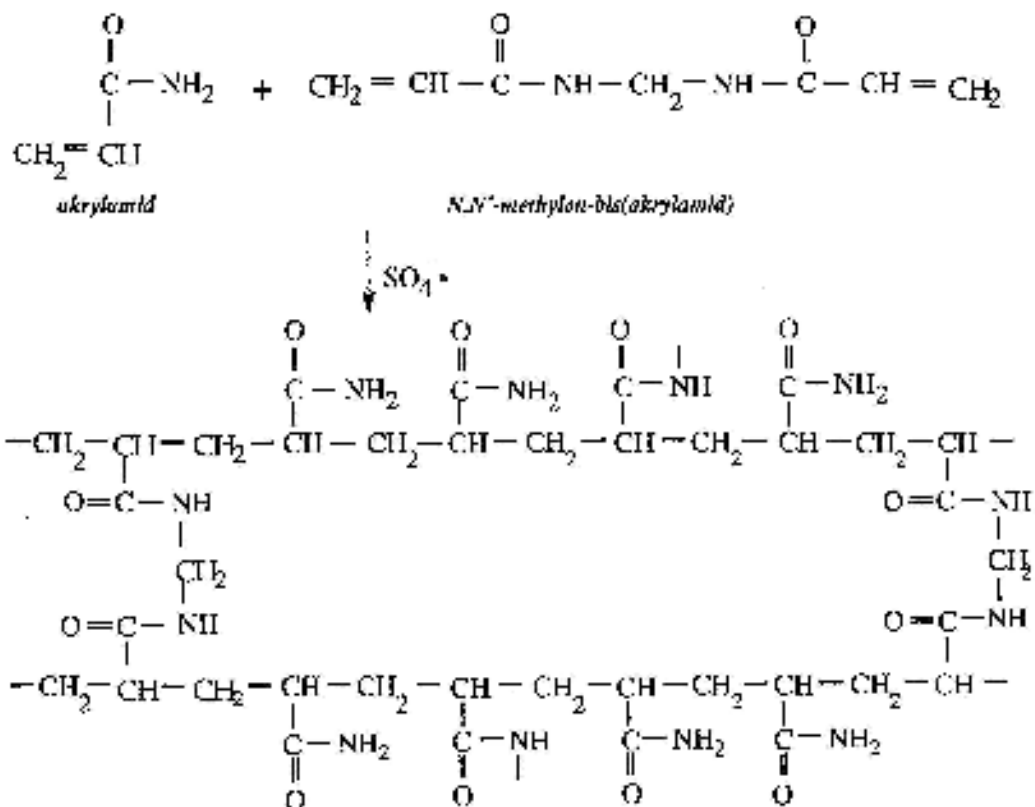
$$F_E = qE$$

kde q je náboj iontu a E je síla elektrického pole. V opačném směru působí na ionty odporová síla:

$$F_F = -6\pi\eta r v$$

kde η je viskozita prostředí, r je poloměr částice a v je rychlost částice.

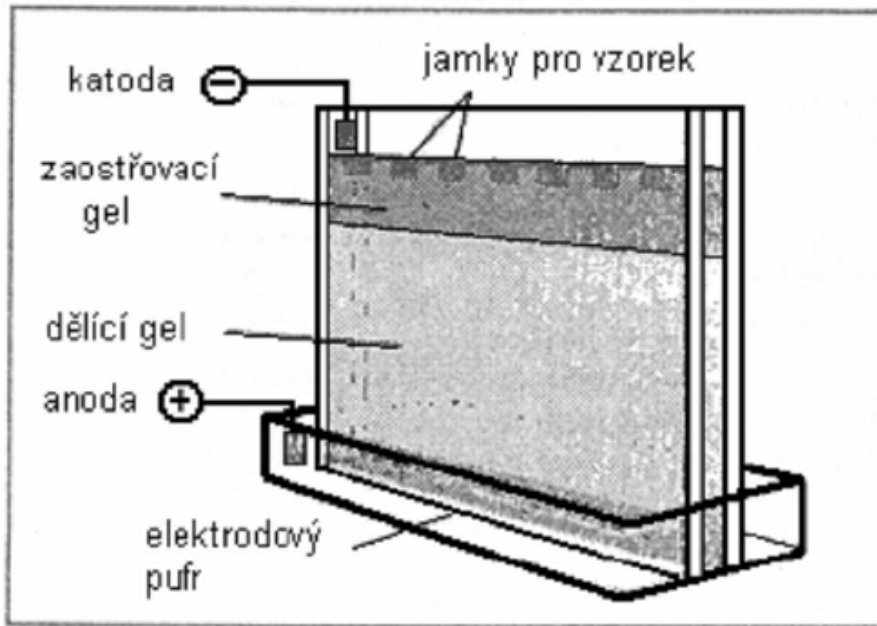
Běžně používaným nosičem je polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný, průhledný a dává možnost přípravy nosiče různých předem určených vlastností (hustota zesíťování gelu, gradient hustoty gelu aj.). Polyakrylamidový gel se připravuje kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu. Kopolymerace probíhá v roztoku pufru za přítomnosti iniciátoru peroxodisíranu amonného. Působením světla se molekuly iniciátoru rozkládají za vzniku volných radikálů, které zahájí vlastní polymerační reakci. Jako stabilizátor volných radikálů se používá N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) nebo dimethylaminopropionitril (DMPN). Polyakrylamidový gel má strukturu sestávající se z otevřených pórů určité velikosti, obsahujících kapalinu s pufrům. Chemickou strukturu gelu zachycuje obr. 19. Je-li velikost těchto pórů srovnatelná s velikostí bílkovinných molekul, pak se tyto molekuly při průchodu gelem setkávají s odporem, v jehož důsledku se pak rozdělí podle své velikosti.



Obr. 19 Chemická struktura polyakrylamidového gelu [50]

Častou variantou je elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS), který se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny a udílí jim uniformní, záporný náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu. Proteiny pokryté SDS mají tak shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty a podobný, válcovitý tvar. Následkem toho se při SDS-PAGE bílkoviny dělí především na základě rozdílnosti molekulových hmotností. Působením SDS se poruší nekovalentní interakce mezi podjednotkami a pokud se přidá 2-merkптоethanol, který redukuje disulfidové můstky, lze stanovit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek.

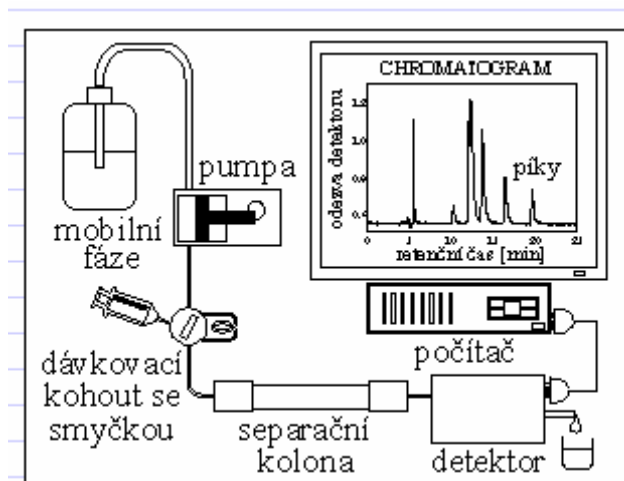
Další variantou je diskontinuální elektroforéza (obr. 20), která používá dva různé gely. Při tomto postupu se mezi elektroforetická skla nalévá nejdříve separační gel, který se po ztuhnutí překryje vrstvou zaostřovacího gelu s velkými póry. Zaostřovací gel bílkoviny zkoncentruje a v separačním gelu pak dochází k vlastní separaci bílkovin. Proužky jednotlivých látek vzniklé při elektroforetickém dělení se dají na gelu zviditelnit ponořením gelu do roztoku obsahujícího alkohol a barvivo nazývané Coomassie blue. Proteiny jsou v tomto roztoku jednak denaturovány a tím i fixovány, jednak se vytvářejí komplexy barvivo-protein. Přebytek barviva se odstraní vymýváním gelu kyselým roztokem nebo elektroforetickým odbarvením. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu a vzdálenost od místa nanesení je nepřímě úměrná jeho molekulové hmotnosti. Ke kvantifikaci bílkovin se používá software, který převede jednotlivé zóny na píky. Koncentrace určitého proteinu se vypočítá porovnáním plochy píku stanovovaného proteinu s plochou píku standardu. [50]



Obr. 20 Aparatura pro diskontinuální polyakrylamidovou elektroforézu [50]

2.6.2 HPLC

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) je druh kapalinové chromatografie, kde je separace složek analytu urychlena čerpáním elučního činidla pod velkým tlakem (obr. 21). Tato metoda je založena na vzniku slabých vazeb mezi složkami mobilní fáze, která obsahuje vzorek a pevnou fází, která tvoří náplň kolony. Složky analytu jsou k pevné fázi vázány různě velkou silou v závislosti na různých chemických či fyzikálních vlastnostech této dvojice.



Obr. 21 Schéma kapalinového chromatografu [51]

Metoda HPLC se pro stanovení množství Rubisco používá v menší míře v porovnáním s ostatními metodami. Při stanovení pomocí HPLC se používá gelová kolona, která dělí jednotlivé složky podle velikosti částic, a to tak, že nejrychleji procházejí velké molekuly a nejvíce zadržovány jsou malé molekuly. [51]

Antonov a Soshinsky [52] použili kolonu Sepharose CL6B (0,9×50 cm) a jako eluční roztok HEPES o koncentraci 15 mmol l⁻¹ a pH 7,6, obsahující EDTA (c = 0,1 mmol l⁻¹) a 2-merkptoethanol (c = 10 mmol l⁻¹). Objemový průtok elučního roztoku byl 15 cm min⁻¹.

Metodu gelové chromatografie použili také Luo et al. [53], kde byla použita kolona TSKgel G3000SW_{XL} (0,78×30 cm). Jako eluční roztok byl použit MOPS pufr o koncentraci 50 mmol l⁻¹ a pH 7,0, obsahující Na₂SO₄ (c = 0,2 mmol l⁻¹). Objemový průtok elučního roztoku byl 0,5 ml min⁻¹. Celé stanovení bylo prováděno při teplotě 4 °C.

2.6.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je založena na rovnováze elektrické a odporové síly působící na elektricky nabitou částici v elektrickém poli. Na částice analytu působí také elektroosmotický tok (ve směru pohybu částic) a třecí síla (proti pohybu částic). Odporovou sílu lze zvýšit použitím elektroforézy v síťovém prostředí, kde je kapilára naplněna gelem nebo častěji je použit jako separační pufr roztok lineárních polymerů. [54]

Kapilární elektroforéza probíhá ve velmi tenkých kapilárách zhotovených z křemene, skla nebo plastu. Tyto tenké kapiláry odvádějí teplo, takže mohou být použita elektrická pole s vysokým napětím, čímž se sníží čas potřebný pro dělení vzorku na několik minut. [50]

Tuto metodu použil ke stanovení Rubisco ve své práci Warren [55]. Stanovení bylo provedeno za použití křemenné kapiláry pokryté SDS (průměr 100 μm, efektivní délka 11,2 cm). Jako separační pufr byl použit SDS 14–200 gel (Beckman-Coulter) a analýza byla provedena při teplotě 20 °C a napětí 9 kV. Po dokončení analýzy byla kapilára 1 minutu vymývána HCl (c = 1 mol l⁻¹) a následně 2 minuty vymývána separačním pufrem.

Další variantu uvádějí Warren et al. [56] v práci, kde byla použita křemenná nepotažená kapilára (průměr 50 μm, celková délka 24 cm, efektivní délka 19,4 cm). Jako separační pufr byl použit CE-SDS proteinový měřicí pufr. Elektroforéza byla provedena při teplotě 20 °C a napětí 15 kV. Po každém měření byla kapilára 90 s vymývána NaOH (c = 0,1 mol l⁻¹), 60 s HCl (c = 0,1 mol l⁻¹) a 120 s CE-SDS proteinovým měřicím pufrem.

2.6.4 Imunologické metody

2.6.4.1 ELISA

ELISA je analytická metoda, která se používá ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Metoda má několik variant; všechny jsou založeny na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym. Tento enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt. Pokud je výsledný produkt barevný, stanovuje se spektrofotometricky, je-li fluoreskující, stanovuje se fluorimetricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku. Dalším společným znakem metod ELISA je zakotvení antigenu nebo protilátky na nerozpustný nosič, což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul. [57]

Nassoury et al. [58] použili metodu ELISA pro stanovení Rubisco. Protilátky byly vypěstovány uvnitř živých králíků. Protilátka pro Rubisco byla připravena inzercí cDNA kódujícího Rubisco a připravená DNA byla vložena do pQE31 vektoru. Vektor byl vložen do buněk M15, které byly kultivovány a získaná protilátka Rubisco byla purifikována afinitní chromatografií. Rubisco bylo reakcí s připravenou protilátkou za současné interakce

s peroxidasou označeným sekundárním antigenem a substrátem 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinem stanoveno fotometricky při vlnové délce 650 nm.

2.6.4.2 Radioimunosrážecí technika

Jedná se o metodu často využívanou mnohými autory ke stanovení množství enzymu Rubisco. Extrakt Rubisco je aktivován inkubací v přítomnosti HCO_3^- a Mg^{2+} . Dále je Rubisco inkubováno v přítomnosti radioaktivně značeného ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu a protilátkového séra se specifickou afinitou k Rubisco. Vznikne sraženina komplexu Rubisco- ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát-protilátka, která je zfiltrována na polysulfonovém filtru a promyta od nadbytku ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Množství Rubisco je úměrné úrovni radiace vyzařované sraženinou. Metodu je nutné kalibrovat na standard Rubisco. [59]

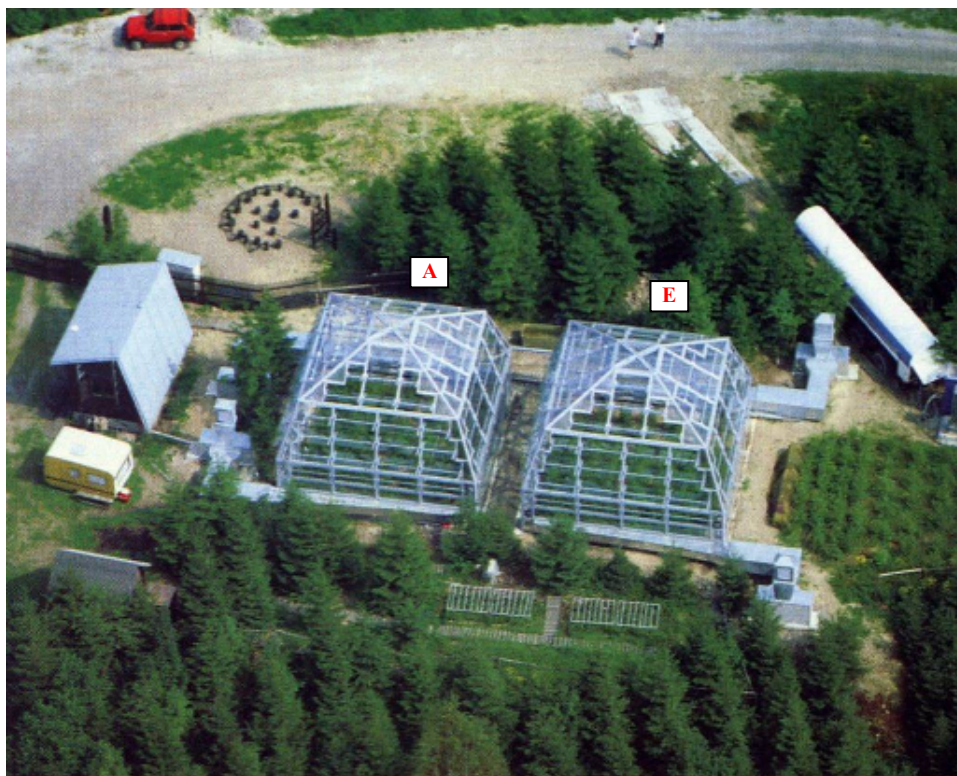
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Vliv stáří jehlic na aktivitu a obsah enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂ byl sledován u smrku ztepilého (*Picea abies*). Stromky byly kultivovány v minisférách na Experimentálním ekologickém pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydách (obr. 22). V první minisféře je atmosféra s normální koncentrací CO₂, což je asi 350 μmol CO₂ mol⁻¹, je označována A – ambient. V druhé minisféře je atmosféra se zvýšenou koncentrací CO₂, což je 700 μmol CO₂ mol⁻¹, je označována E – elevated.

Vzorky jehlic byly odebírány ve dvou termínech. Dne 12. 6. 2008, v čase od 14:30 do 15:35 hod byly odebírány vzorky pro stanovení aktivity a v čase od 15:50 do 16:40 hod byly odebírány vzorky pro stanovení obsahu. Dne 29. 9. 2008, v čase od 12:00 do 12:30 hod a od 12:50 do 13:20 hod byly odebírány vzorky pro stanovení aktivity. A v čase od 12:30 do 12:50 hod a od 13:20 do 13:45 hod byly odebírány vzorky pro stanovení obsahu.

Odběr vzorků jehlic byl proveden odstřížením jehlic z větvičky tak, aby na ní zůstal asi 1 mm zbytek. Pro stanovení se používaly jen zdravé jehlice. Jehlice byly odstříženy z několika stromků a byl vytvořen směsný vzorek, ze kterého bylo odváženo asi 60 mg. Tyto jehlice byly posléze naskenovány, pro pozdější výpočet jejich plochy, vloženy do mikrozkušavky Eppendorf a ponořeny do termosky s tekutým dusíkem. Vzorky byly při převozu uchovávány v termosce s tekutým dusíkem a poté až do samotné analýzy uchovávány v mrazničce při -20 °C.



Obr. 22 Minisféry experimentálního ekologického pracoviště ÚSBE AV ČR na Bílém Kříži
[60]

3.2 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco

Stanovení aktivity enzymu Rubisco vycházelo z metody Lilleyho a Walkera [43] s extrakcí podle Besforda [44]. Tento postup pro stanovení aktivity Rubisco je založen na sprážením tří reakcí Calvinova cyklu (reakce III–V). Metoda byla modifikována pro stanovení počáteční aktivity podle Heringové [61]. Jako substrát byl použit ribosa-5-fosfát, který se transformuje pomocí enzymů obsaženými v extraktu na ribulosa-1,5-bisfosfát (reakce I a II). Výhodou použití ribosa-5-fosfátu je jeho nižší cena a stabilnější rychlost reakce, protože se substrát uvolňuje do směsi postupně. Dále byl do směsi přidáván KHCO_3 , který uvolňuje CO_2 a aktivuje enzym Rubisco. K aktivaci Rubisco jsou důležité i ionty Mg^{2+} ve formě MgCl_2 . Do reakční směsi byly rovněž přidány enzymy, které katalyzují reakce (III) – (V), NADH a ATP. Konečným produktem reakce je glycerinaldehyd-3-fosfát (reakce III–V). Aby se zabránilo hromadění ADP, který inhibuje enzym fosfoglycerátkinasu, je ADP fosforylováno v reakci (VI). Aktivita Rubisco byla vypočítána podle Lambert-Beerova zákona z úbytku absorbance při oxidaci NADH (reakce V).

- ribosa-5-fosfát $\xrightarrow{\text{ribosa-5-fosfátisomerasa}}$ ribulosa-5-fosfát (I)
- ribulosa-5-fosfát + ATP $\xrightarrow{\text{ribulosa-5-fosfátkinasa}}$ ribulosa-1,5-bisfosfát + ADP + H^+ (II)
- ribulosa-1,5-bisfosfát + CO_2 + H_2O $\xrightarrow{\text{Rubisco}}$ 2(3-fosfoglycerát) + 2H^+ (III)
- 3-fosfoglycerát + ATP $\xrightarrow{\text{fosfoglycerátkinasa}}$ 1,3-bisfosfoglycerát + ADP (IV)
- 1,3-bisfosfoglycerát + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa}}$ glycerinaldehyd-3-fosfát + NAD^+ + HPO_4 (V)
- 2-fosfokreatin + 2 ADP $\xrightarrow{\text{kreatinfosfokinasa}}$ 2-kreatin + 2ATP (VI)

3.2.1 Přístroje

- Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO[®] CZ Hradec Králové. Parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI.
- pH metr KNICK Portamess, typ 913pH
- Centrifuga MLW T52.1
- Absorpční spektrofotometr Helios γ od firmy Spectronic Unicam. Měřicí rozsah 190–1100 nm, spektrální šířka pásu 2 nm.

3.2.2 Chemikálie

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina; Sigma ALDRICH

Na_2EDTA – ethylendiamintetraoctan disodný; Sigma ALDRICH

KOH – hydroxid draselný; Penta

DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH

MgCl_2 – chlorid hořečnatý; Sigma ALDRICH

BSA – bovinní sérový albumin; Sigma ALDRICH

KHCO_3 – hydrogenuhličitan draselný; Sigma ALDRICH

Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa; Sigma ALDRICH

Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH

R5P – ribosa-5-fosfát; Sigma ALDRICH
3-Fosfoglycerátkinasa; Sigma ALDRICH
ATP – adenosin-5'-trifosfát; Sigma ALDRICH
NADH – β -nikotinamidadeninukleotid; Sigma ALDRICH
Fosfokreatin; Sigma ALDRICH
Polyvinylpyrrolidon; Sigma ALDRICH

3.2.3 Příprava roztoků

3.2.3.1 Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8

V asi 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,372 g Na₂EDTA. Po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol l}^{-1}$) na 7,8. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu extrakčního roztoku.

3.2.3.2 Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0

V asi 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,438 g Na₂EDTA. Po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol l}^{-1}$) na 8,0. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu pracovního a aktivačních roztoků.

3.2.3.3 Příprava aktivačních roztoků

V odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,2285 g MgCl₂ v HEPES-KOH, pH 8,0.

V odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,3003 g KHCO₃ v HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě. Z těchto roztoků se pipetuje po 50 μl do optické kyvety, což odpovídá konečné koncentraci 20 mM MgCl₂ a 25 mM KHCO₃ v aktivačním roztoku.

3.2.3.4 Příprava extrakčního roztoku

V odměrné baňce na 200 ml bylo rozpuštěno 0,156 g DTT, 0,096 g MgCl₂ a 0,4 g BSA v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 7,8.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C. Takto připravený roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂ a 0,2 % BSA.

3.2.3.5 Příprava roztoku glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6 mg enzymu.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.6 Příprava roztoku kreatinfosfokinasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 byly rozpuštěny 2 mg enzymu.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.7 Příprava roztoku R5P

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6,2 mg R5P. Roztok se uchovává při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.8 Roztok 3-fosfoglycerátkinasy

Ke stanovení byl použit komerčně dodávaný roztok. Roztok se uchovává při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.9 Příprava pracovního roztoku

V odměrné baňce na 10 ml bylo rozpuštěno v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0:

0,002 g NADH

0,008 g DTT

0,013 g fosfokreatinu

0,019 g ATP

19 μl 3-fosfoglycerátkinasy

100 μl roztoku kreatinfosfokinasy

100 μl roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

Takto připravený pracovní roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 1 mM Na_2EDTA , 0,25 mM NADH, 5 mM DTT, 5 mM fosfokreatinu, 3,5 mM ATP, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat kreatinfosfokinasy a 80 nkat glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy.

Pracovní roztok je stálý maximálně 6 hodin a uchovává se při laboratorní teplotě.

3.2.4 Extrakce enzymu

Vzorek jehlic, přibližně 60 mg, byl rozdrcen v třecí misce spolu s mořským pískem. Následně bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku a půl lžičky polyvinylpyrrolidonu. Takto byl vzorek asi 30 sekund homogenizován. Výsledná suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 1 minutu odstředována. Získaný extrakt byl použit ke stanovení počáteční a celkové aktivity. Tento extrakt rychle stárne, a proto bylo nutné ho zpracovávat co nejrychleji.

3.2.5 Měření aktivity

3.2.5.1 Počáteční aktivita

Pro měření počáteční aktivity bylo do optické kyvety napipetováno 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a 50 μl aktivačního roztoku KHCO_3 . Dále bylo přidáno 20 μl extraktu, 850 μl pracovního roztoku a 30 μl roztoku R5P. Po promíchání byl ihned měřen pokles absorbance v 30s intervalech při vlnové délce 340 nm.

3.2.5.2 Celková aktivita

Pro měření celkové aktivity bylo do optické kyvety napipetováno 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a 50 μl aktivačního roztoku KHCO_3 a 20 μl extraktu. Roztok byl promíchán a 15 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo do kyvety přidáno 850 μl pracovního roztoku a 30 μl roztoku R5P. Po promíchání byl měřen pokles absorbance v 30s intervalech při vlnové délce 340 nm.

3.2.6 Výpočet aktivity enzymu Rubisco

Měřením absorbancí v 30s intervalech byly získány hodnoty A. Z těchto hodnot byl vypočítán úbytek absorbance za 0,5 minuty (ΔA). Ze změn absorbance v čase se z Lambert-Beerova zákona vypočítá aktivita enzymu.

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \varepsilon \cdot l \cdot \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

kde A je absorbance, t je čas [s], ε je molární absorpční koeficient [$\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$], l je délka optické dráhy [cm], c je koncentrace [mol l^{-1}].

Aktivita enzymu je počítána z rychlosti úbytku substrátu (CO_2):

$$\Delta n = \frac{2 \cdot \Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l}$$

Hodnota ε je pro NADH $6300 \text{ cm}^2 \text{mmol}^{-1}$, optická dráha kyvety je 1 cm.

Vzorový příklad výpočtu aktivity:

Aktivita je počítána z lineární části naměřených dat. Průměrná absorbance je uváděna za 30s, proto ji převedeme na minuty, vynásobením dvěma.

Tab. 1 Stanovení počáteční aktivity enzymu Rubisco v extraktu vzorku Ba EC_1 (září)

Počáteční aktivita	Ba EC 1 (září)	
t (s)	A	ΔA
0	0,161	0,002
30	0,159	0,002
60	0,157	0,002
90	0,155	0,001
120	0,154	0,002
150	0,152	0,002
180	0,150	0,002
210	0,148	0,001
240	0,147	0,002
270	0,145	0,002
300	0,143	0,002
330	0,141	
Průměr ΔA		0,0018

Aktivita v kyvetě:

$$\Delta n = \frac{\Delta A [\text{min}^{-1}] \cdot V [\text{cm}^3]}{2 \cdot \varepsilon [\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}] \cdot l [\text{cm}]} = \frac{0,0036 \cdot 1}{2 \cdot 6300 \cdot 1} = 2,89 \cdot 10^{-7} \text{ mmol CO}_2 \text{ min}^{-1}$$

Po převedení na sekundy:

$$\Delta n = \frac{2,89 \cdot 10^{-7} \cdot 1000}{60} = 4,81 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Aktivita v 5 ml extraktu:

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 4,81 \cdot 10^{-6}}{0,02} = 1,20 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Aktivita Rubisco vztažená na jednotkovou plochu jehlice ($S = 0,000263 \text{ m}^2$):

$$\Delta n = \frac{1 \cdot 1,20 \cdot 10^{-3}}{0,000263} = 4,5722 \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$$

3.3 Stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE

Toto stanovení vycházelo z metod Damervalové et al. [62] a Rogerse et al. [40] a metoda byla dále upravena Floriánem [63] a Zachovou [64].

3.3.1 Přístroje

- Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO[®] CZ Hradec Králové. Parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI.
- Centrifuga MLW T52.1
- Vortex – Stuart firmy MERCI s.r.o.
- Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga (Lotyšsko)
- Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 od firmy BIO-RAD (USA)
- Zdroj Power Pac 300 od firmy BIO-RAD (USA)
- Třepačka LT2

3.3.2 Chemikálie

Akrylamid; SERVA

N,N'-metylenbisakrylamid; SERVA

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma ALDRICH

Kyselina chlorovodíková; Penta

SDS – dodecylsulfát sodný; Sigma ALDRICH

Peroxodisíran amonný; SERVA

Bromfenolová modř Na sůl; SERVA

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin; SERVA

Glycin; SERVA

DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH

Glycerol; Sigma ALDRICH

2-merkapt ethanol; Sigma ALDRICH

Methanol; LACH-NER

Brilantní modř G 250 – Coomasie; SERVA

Kyselina octová; LACH-NER

Ethanol; Lachema

Butanol; Lachema

D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa izolovaná ze špenátu – standard Rubisco; Sigma
ALDRICH

3.3.3 Příprava roztoků

3.3.3.1 Roztoky pro přípravu gelů

Roztok A:

Ve 100 ml vody bylo rozpuštěno 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok B:

V 50 ml vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na pH 8,8, následně byl roztok doplněn vodou na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok C:

V 50 ml vody bylo rozpuštěno 18,16 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na pH 6,8, následně byl roztok doplněn vodou na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok D:

Ve 100 ml vody bylo rozpuštěno 10 g SDS. Roztok se uchovává v temnu.

Roztok E:

V 1 ml vody bylo rozpuštěno 0,1 g peroxodisíranu amonného. Roztok je nutné připravit pro každé stanovení čerstvý.

Roztok F:

V 1 ml vody bylo rozpuštěno 10 mg bromfenolové modři. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

TEMED – komerčně dodávaný roztok

3.3.3.2 Roztoky pufrů

Elektrodový pufr:

V 1000 ml bylo rozpuštěno 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C. Tento roztok se používá opakovaně.

TRIS pufr:

Ve 450 ml vody bylo rozpuštěno 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,02 g DTT a 50 ml glycerolu. Po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí koncentrované HCl na pH 6,8. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Vzorkový pufr:

Bylo smícháno 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptoethanolu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.3.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin

Stabilizační roztok:

Bylo smícháno 100 ml metanolu a 400 ml vody.

Barvicí roztok:

Bylo smícháno 0,5 g Coomassie Blue G 250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované CH₃COOH a 450 ml vody.

Odbarvovací roztok:

Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované CH₃COOH a 650 ml vody.

3.3.4 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla nejdříve omyta vodou a poté odmašťovacím prostředkem. Následně byla opláchnuta destilovanou vodou a vyleštěna buničinou namočenou v ethanolu. Skla byla upevněna do stojanu tak, že větší sklo bylo vzadu. Spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem svrchu byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byly použity 5% zaostřovací gel a 10% separační gel.

3.3.4.1 Separací gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky napipetovány objemy roztoků podle tab. 2.

Tab. 2 Objemy roztoků k přípravě 10% separačního gelu

Roztok	Objem [ml]
destilovaná voda	4,0
A	3,3
B	2,5
D	0,1
E	0,14
TEMED	0,004

Roztok E a TEMED byl přidán těsně před nalitím roztoku mezi skla. Roztok byl nalit mezi skla asi 2 cm od horního okraje, aby bylo možné nalít zaostřovací gel. Roztok mezi skly byl převrstven butanolem, aby se vyrovnala hladina a také jako ochrana proti odpařování vody.

3.3.4.2 Zaostřovací gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky napipetovány objemy roztoků podle tab. 3.

Tab. 3 Objemy roztoků k přípravě 5% zaostřovacího gelu

Roztok	Objem [ml]
destilovaná voda	2,1
A	1,0
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po ztuhnutí separačního gelu byl slit butanol a gel byl promyt destilovanou vodou. Roztok E a TEMED byl opět přidáván až před nalitím. Roztok byl nalit na vrstvu separačního gelu až po okraj a ihned byl do prostoru mezi skla vložen elektroforetický hřebínek. Hřebínek se

odstraňuje až před nanášením vzorků a samotném stanovením. Takto připravený gel se může uchovávat v lednici, ale pouze do druhého dne.

3.3.5 Příprava standardů

V mikrozkušavce Ependorf bylo rozpuštěno 0,2 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy v 1 ml vzorkového pufru (standard 0,2 mg ml⁻¹). Směs byla promíchána na Vortexu a 5 minut vařena v termobloku. Po zchladnutí byl standard uchovávan v mrazničce při teplotě -18 °C. Stejně byl připraven i standard 1 mg ml⁻¹, pouze navážka byla v tomto případě 1 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy. Příprava standardů probíhala stejně jako příprava vzorků, což je důležité pro výpočet.

3.3.6 Příprava vzorků

Vzorek jehlic, přibližně 60 mg, byl rozdrčen v třecí misce spolu s mořským pískem. Následně byly přidány 2 ml TRIS pufru. Takto byl vzorek asi 30 sekund homogenizován. Výsledná suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 1 minutu odstředována. Ze získaného extraktu bylo odpipetováno 0,5 ml supernatantu do mikrozkušavky Eppendorf a bylo přidáno 0,5 ml vzorkového pufru. Tato směs byla promíchána na Vortexu a 5 minut vařena v termobloku. Po zchladnutí byly vzorky uchovány v mrazničce při teplotě -18 °C.

3.3.7 Elektroforéza

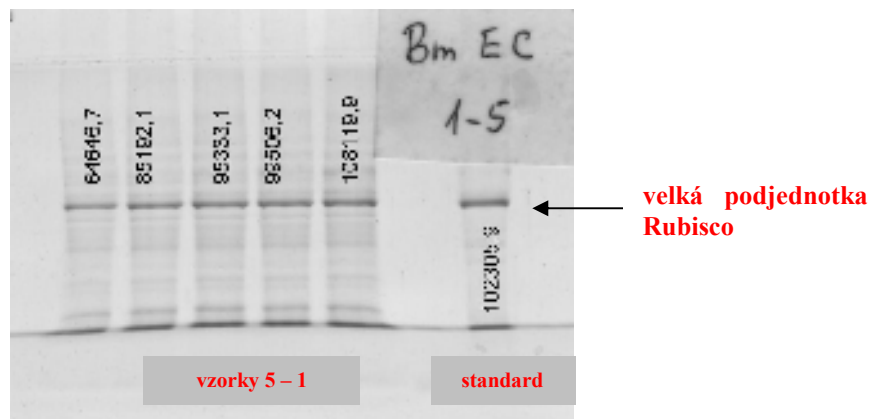
Skla s připraveným ztuhlým gelem byla vytažena ze stojanu a očištěna od zbytků gelu. Opatrně byl odstraněn hřebínek a skla byla vložena do stojanu pro elektroforézu a to tak, aby větší sklo bylo směrem ven. Do vnitřního prostoru stojanu byl nalit elektrodový pufr a počkalo se, jestli pufr neprotéká. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby a vnější prostor byl naplněn asi do poloviny elektrodovým pufrem. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do první jamky naneseo 10 µl standardu Rubisco. U červnových vzorků byl použit standard 0,2 mg ml⁻¹ a u vzorků v září byl použit standard 1 mg ml⁻¹. Do následujících jamek byly naneseo jednotlivé vzorky o objemu 10 µl. Takto připravená aparatura byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno konstantní napětí 140 V. V průběhu analýzy bylo nutné sledovat, zda pufr nevytéká z vnitřního prostoru, případně jej doplnit. Elektroforéza probíhala asi 45–60 minut, až čelo vzorku dostoupilo asi 2 cm od spodního okraje gelu.

3.3.8 Vizualizace bílkovin

Po skončení elektroforézy byla skla vyjmuta ze stojanu a ponořena do misky s destilovanou vodou, menším sklem směrem dolů. Pomocí špachtle bylo sejmuto horní sklo a následně bylo vyjmuta i sklo spodní. Voda z misky byla vylita a gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Následně byl roztok slit a převrstven barvicím roztokem, kterým byl barven 30 minut na třepačce. Po uplynutí této doby byl roztok slit a gel byl promyt použitým odbarvovacím roztokem. Poté byl roztok odbarvován čistým odbarvovacím roztokem 90 minut na třepačce. Po slití odbarvovacího roztoku byl gel promyt destilovanou vodou, položen na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie, která ho chrání před vyschnutím. Hotové gely byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C. Celá práce byla prováděna v ochranných gumových rukavicích, z důvodu vysoké toxicity akrylamidu.

3.3.9 Vyhodnocení gelů

Hotové gely byly naskenovány, kvantifikace velké podjednotky byla provedena pomocí HP Scanjet programem AIDA (Advanced Image Data Analyser, verze 3.23.001, Raytest, Germany). Zóny velkých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha (obr. 23). Obsah enzymu Rubisco ve vzorcích byl vypočítán porovnáním plochy zóny jednotlivých vzorků a plochy zóny standardu. Protože poměr velikosti plochy a obsahu je ovlivněn mnoha faktory, bylo nutné nanést standard Rubisco na každý gel.



Obr. 23 Hotový a vyhodnocený gel vzorků Bm EC_1-5 (červen)

Vzorový příklad výpočtu obsahu:

Tab. 4 Stanovení obsahu Rubisco u vzorků Bm EC_1-5 (červen)

vzorek	plocha [m ²]	plocha zóny	c [g m ⁻²]
standard		102305,9	
Bm EC_1	0,000244	108119,9	3,4650
Bm EC_2	0,000249	99506,2	3,1249
Bm EC_3	0,000230	95333,1	3,2412
Bm EC_4	0,000254	85192,1	2,6227
Bm EC_5	0,000220	64646,7	2,2978

Pro stanovení byl použit standard o koncentraci 0,2 mg ml⁻¹.

Obsah Rubisco v 1 ml extraktu:

$$c = \frac{108119,9 \cdot 0,2 \cdot 2}{102305,9} = 0,42 \text{ mg ml}^{-1}$$

Hmotnost Rubisco ve 2 ml extraktu (celkový objem):

$$m = 0,42 \cdot 2 = 0,85 \text{ mg}$$

Obsah Rubisco vztažený na jednotkovou plochu jehlice ($S = 0,000244 \text{ m}^2$):

$$c = \frac{0,85}{0,000244 \cdot 1000} = 3,4650 \text{ g m}^{-2}$$

3.4 Stanovení specifické aktivity Rubisco

Specifická aktivita se vypočítá z podílu aktivity a obsahu Rubisco.

Vzorový výpočet pro vzorek EC_1 (červen):

Počáteční aktivita: $6,52 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$

Obsah: $3,47 \text{ g m}^{-2}$

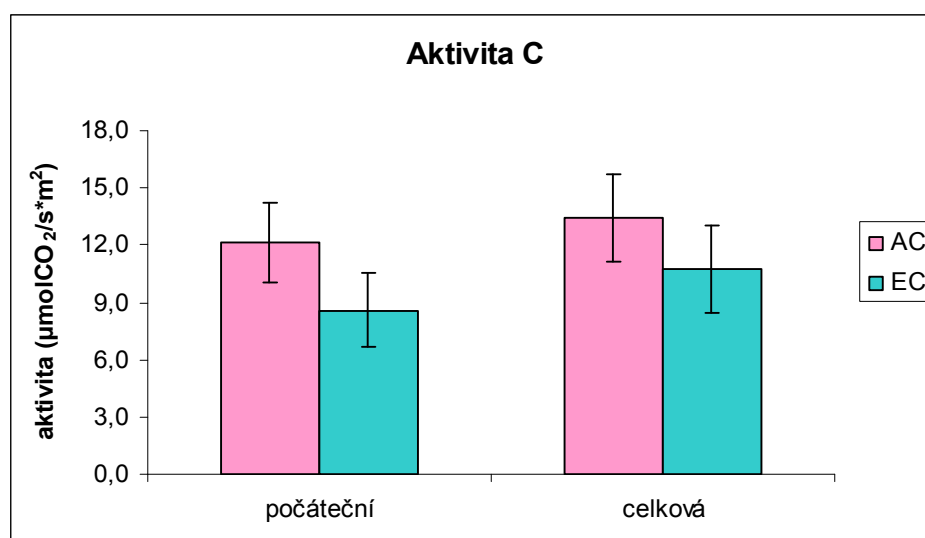
$$a = \frac{6,52}{3,47} = 1,88 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$$

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Výsledky

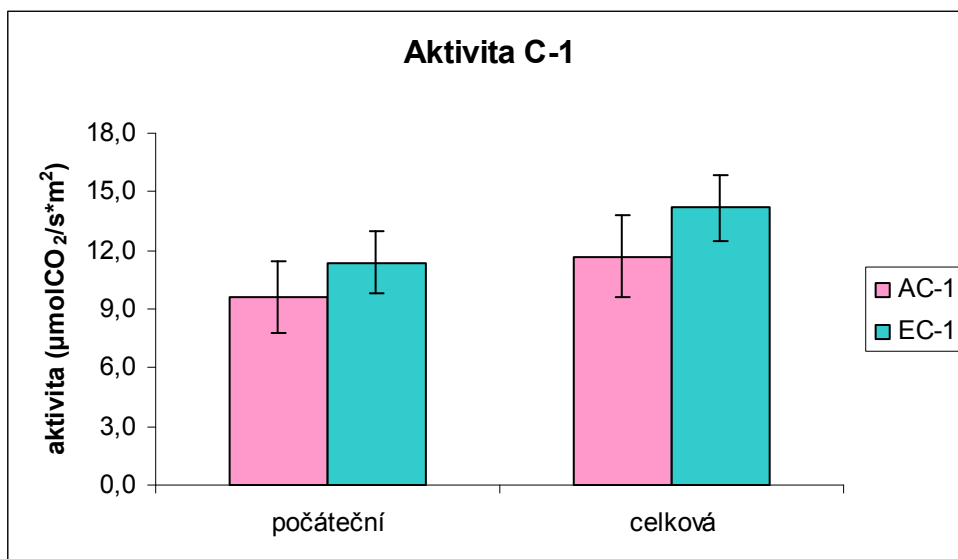
Tab. 5 Výsledky aktivity a obsahu Rubisco u smrku ztepilého u mladých a rok starých jehlic v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂. AC – mladé jehlice, normální koncentrace CO₂, EC – mladé jehlice, zvýšená koncentrace CO₂, AC-1 – rok staré jehlice, normální koncentrace CO₂, EC-1 – rok staré jehlice, zvýšená koncentrace CO₂ (n = 10).

vzorky	odběr 12. 6. 2008				odběr 29. 9. 2008			
	AC	EC	AC-1	EC-1	AC	EC	AC-1	EC-1
počáteční aktivita [μmol CO ₂ s ⁻¹ m ⁻²]	12,15	8,58	9,65	11,40	8,47	8,30	5,09	10,85
celková aktivita [μmol CO ₂ s ⁻¹ m ⁻²]	13,41	10,77	11,70	14,17	10,36	10,52	7,19	13,27
obsah [g m ⁻²]	3,02	2,61	4,70	4,37	15,21	9,61	8,70	6,31
specifická počáteční aktivita [μmol CO ₂ s ⁻¹ g ⁻¹]	3,99	3,11	2,18	2,67	0,62	0,89	0,60	1,72
specifická celková aktivita [μmol CO ₂ s ⁻¹ g ⁻¹]	4,43	3,82	2,59	3,33	0,76	1,13	0,86	2,11



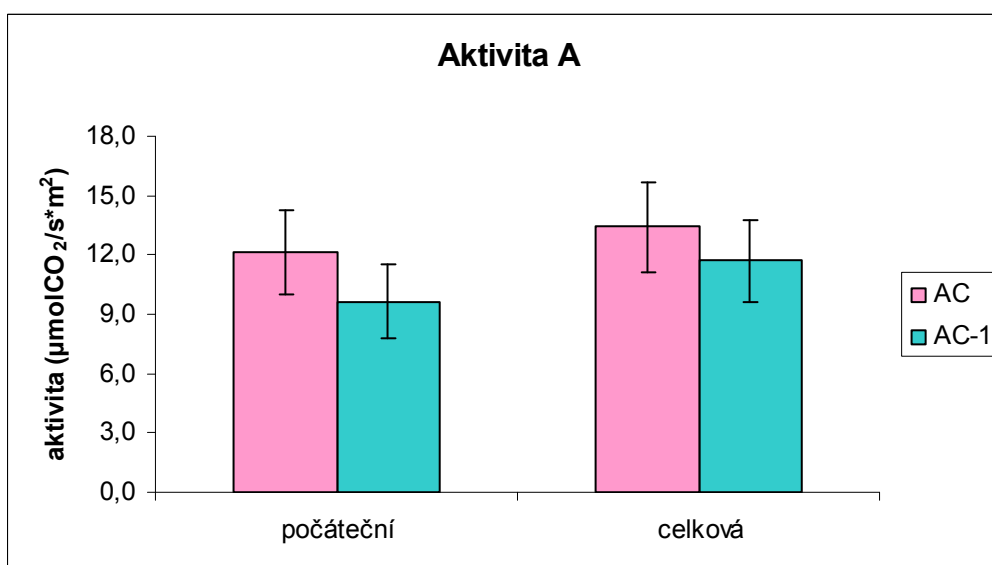
Obr. 24 Počáteční a celková aktivita Rubisco u mladých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 12. 6. 2008 (n = 10)

Počáteční aktivita Rubisco mladých jehlic byla v A o 42 % vyšší než v E, a celková aktivita Rubisco byla v A o 25 % vyšší než v E (obr. 24). Tento rozdíl nebyl statisticky významný.



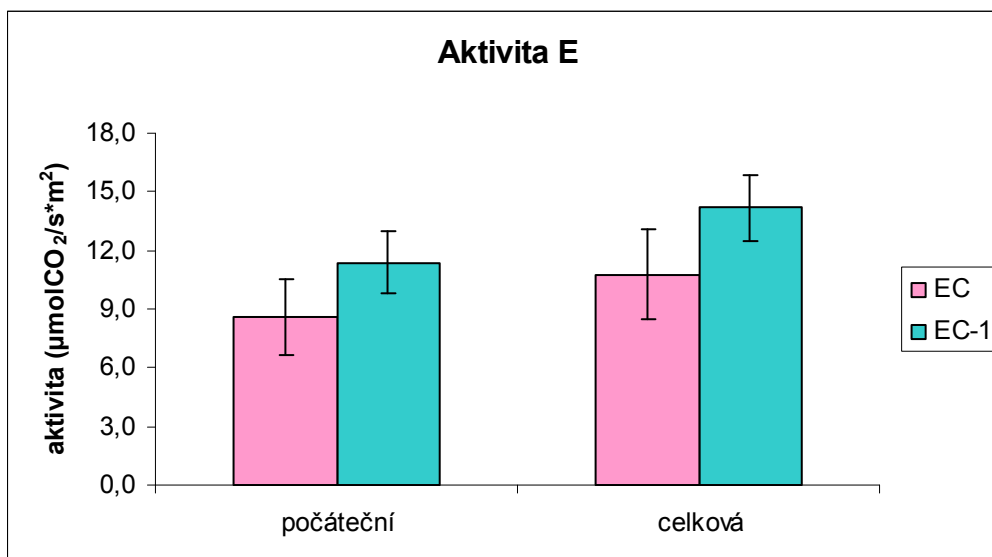
Obr. 25 Počáteční a celková aktivita Rubisco u rok starých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 12. 6. 2008 (n = 10)

Počáteční aktivita Rubisco rok starých jehlic byla v A o 15 % nižší než v E, a celková aktivita Rubisco byla v A o 17 % nižší než v E (obr. 25). Tento rozdíl nebyl statisticky významný.



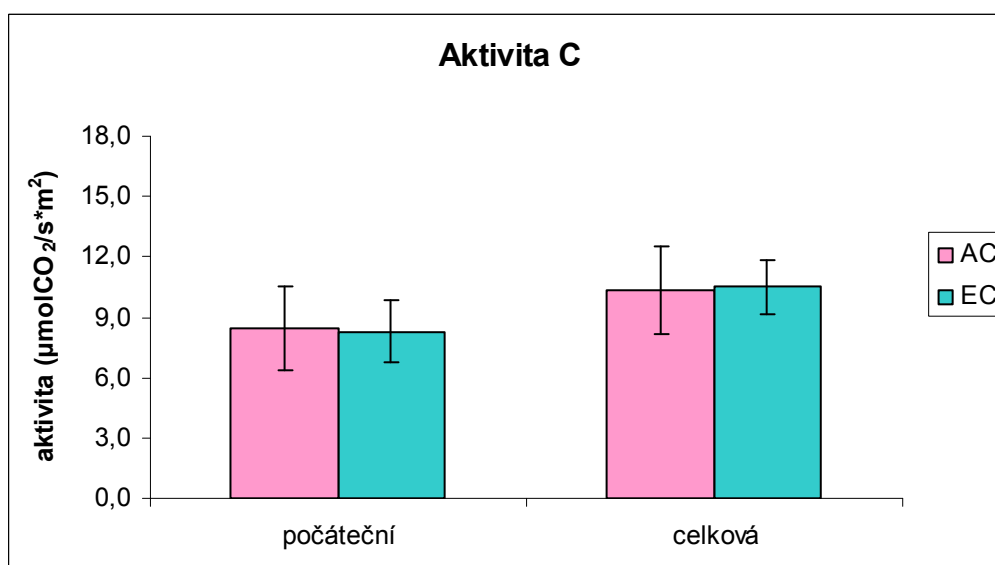
Obr. 26 Počáteční a celková aktivita Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého v normální koncentraci CO₂, odběr 12. 6. 2008 (n = 10)

Počáteční aktivita Rubisco byla v AC o 26 % vyšší než v AC-1 a celková aktivita Rubisco byla v AC o 15 % vyšší než v AC-1 (obr. 26). Tento rozdíl nebyl statisticky významný.



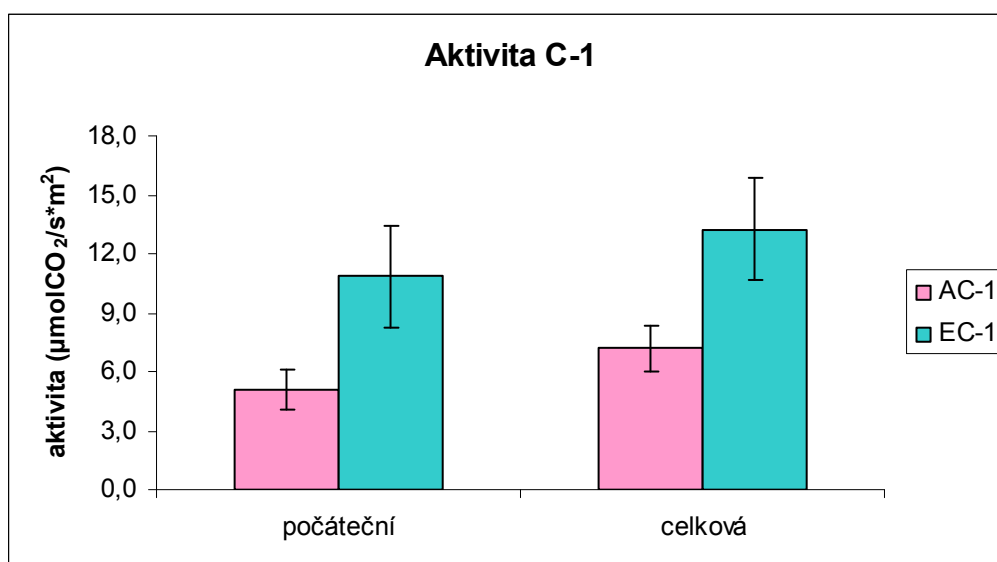
Obr. 27 Počáteční a celková aktivita Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého ve zvýšené koncentraci CO₂, odběr 12. 6. 2008 (n = 10)

Počáteční aktivita Rubisco byla v EC o 25 % nižší než v EC-1 a celková aktivita Rubisco byla v EC o 24 % nižší než v EC-1 (obr. 27). Tento rozdíl nebyl statisticky významný.



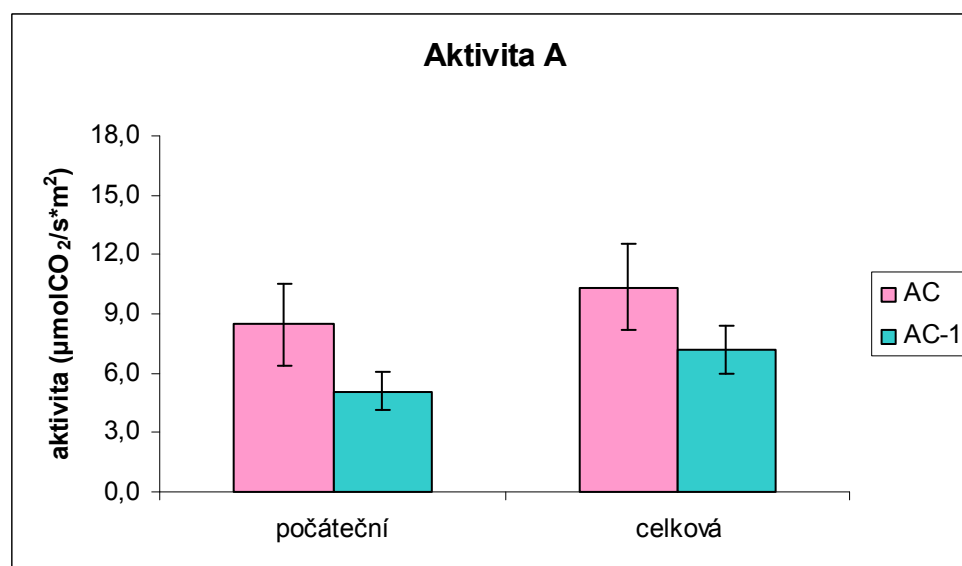
Obr. 28 Počáteční a celková aktivita Rubisco u mladých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 29. 9. 2008 (n = 10)

Počáteční aktivita Rubisco mladých jehlic byla v A o 2 % vyšší než v E, a celková aktivita Rubisco byla v A o 2 % nižší než v E (obr. 28). Tento rozdíl nebyl statisticky významný, vzorky byly téměř totožné.



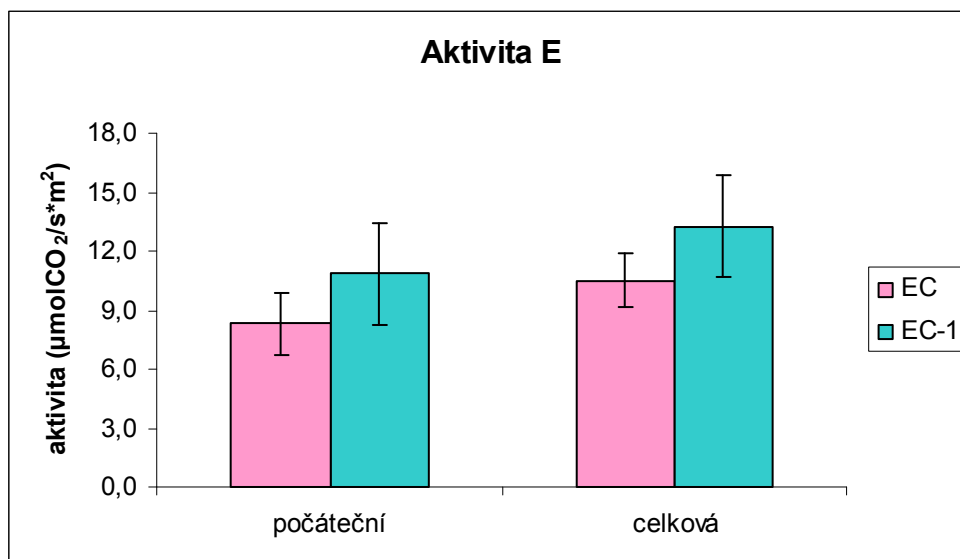
Obr. 29 Počáteční a celková aktivita Rubisco u rok starých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 29. 9. 2008 (n = 10)

U zářijových vzorků byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v počáteční i celkové aktivitě Rubisco mezi A a E u rok starých jehlic. Počáteční aktivita Rubisco rok starých jehlic byla v A o 53 % nižší než v E, a celková aktivita Rubisco byla v A o 46 % nižší než v E (obr. 29).



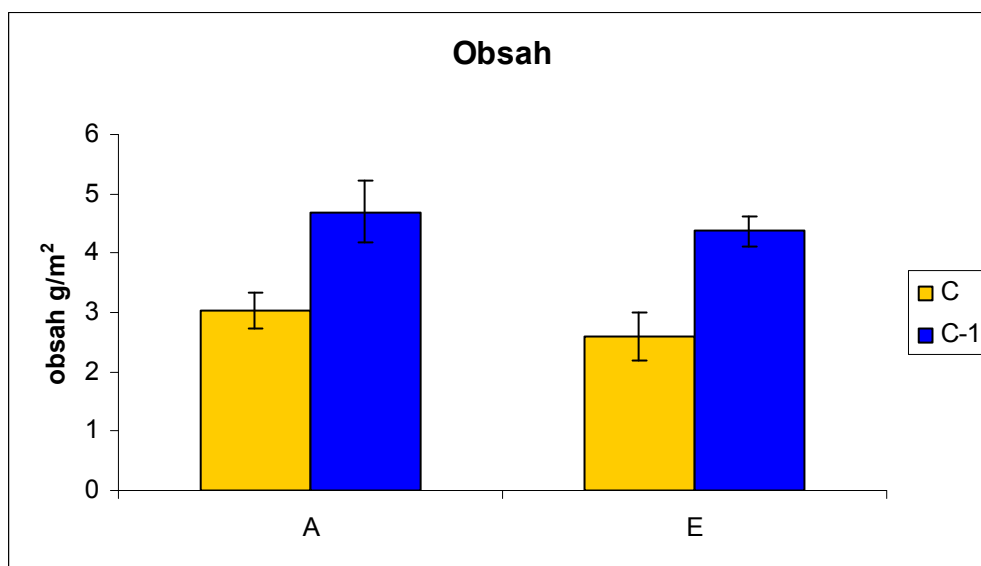
Obr. 30 Počáteční a celková aktivita Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého v normální koncentraci CO₂, odběr 29. 9. 2008 (n = 10)

Celková aktivita Rubisco byla v AC o 44 % vyšší než v AC-1. Tento rozdíl nebyl statisticky významný. Byl však zaznamenán statisticky významný rozdíl v počáteční aktivitě Rubisco mezi mladými a rok starými jehlicemi v normální koncentraci CO₂. Počáteční aktivita Rubisco byla v AC o 66 % vyšší než v AC-1 (obr. 30).



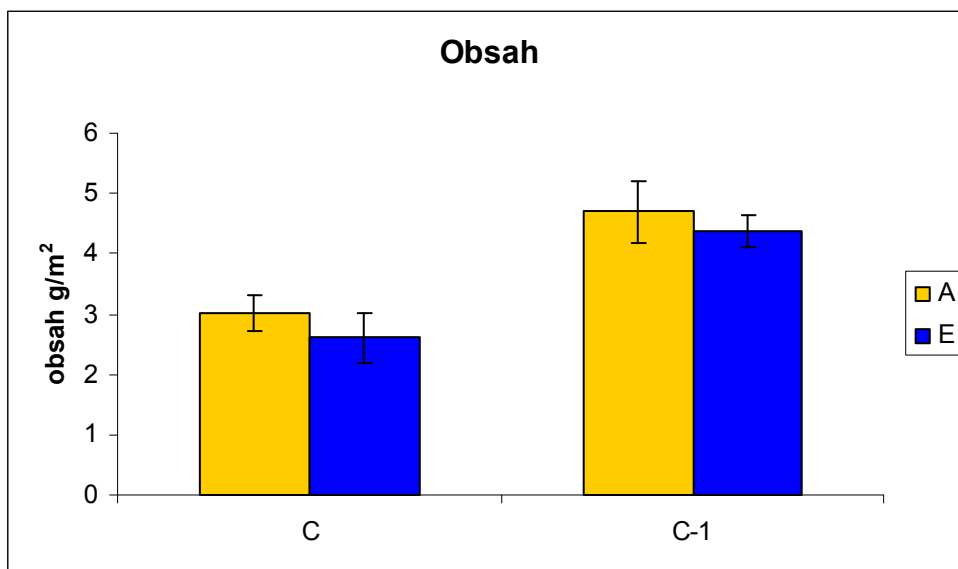
Obr. 31 Počáteční a celková aktivita Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého ve zvýšené koncentraci CO₂, odběr 29. 9. 2008 (n = 10)

Počáteční aktivita Rubisco byla v EC o 23 % nižší než v EC-1 a celková aktivita Rubisco byla v EC o 21 % nižší než v EC-1 (obr. 31). Tento rozdíl nebyl statisticky významný.



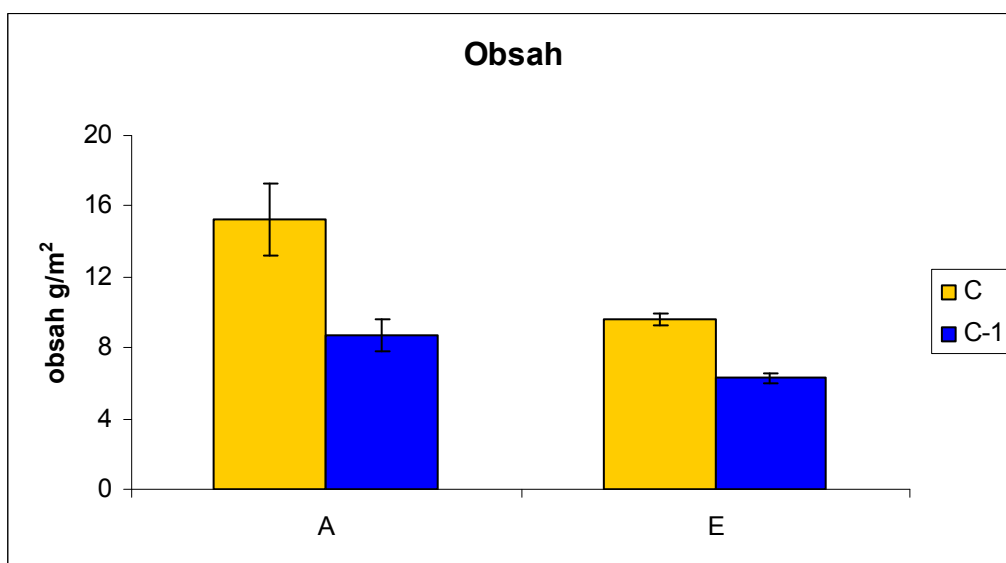
Obr. 32 Obsah Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 12. 6. 2008 (n = 10)

U červnových vzorků byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi mladými a rok starými jehlicemi v A i E. Obsah Rubisco byl v jehlicích AC-1 o 56 % vyšší než v jehlicích AC a obsah Rubisco v jehlicích EC-1 byl o 68 % vyšší než v jehlicích EC (obr. 32).



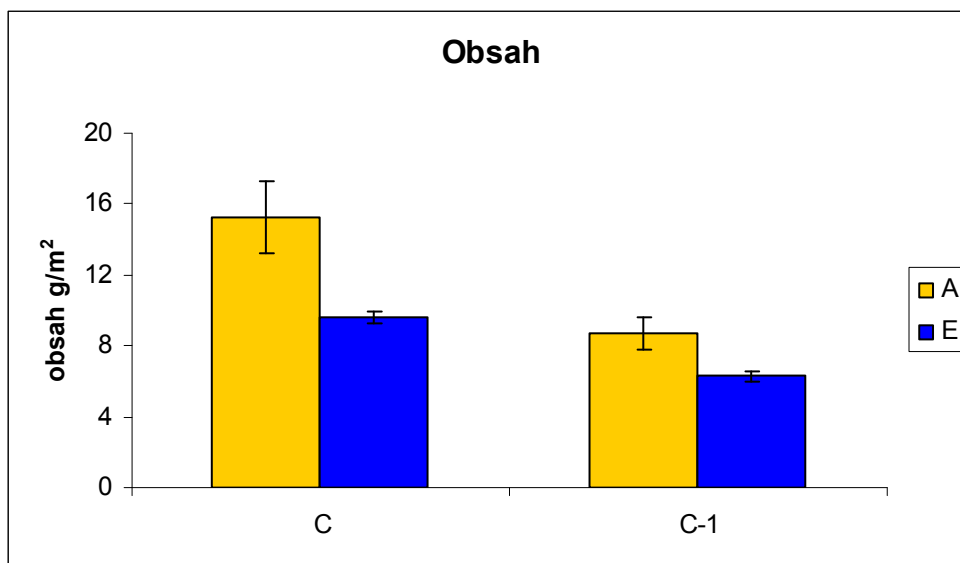
Obr. 33 Obsah Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 12. 6. 2008 (n = 10)

Obsah Rubisco byl u mladých jehlic v E o 14 % nižší než u jehlic v A a obsah Rubisco u rok starých jehlic byl v E o 7 % nižší než u jehlic v A (obr. 33). Tento rozdíl nebyl statisticky významný.



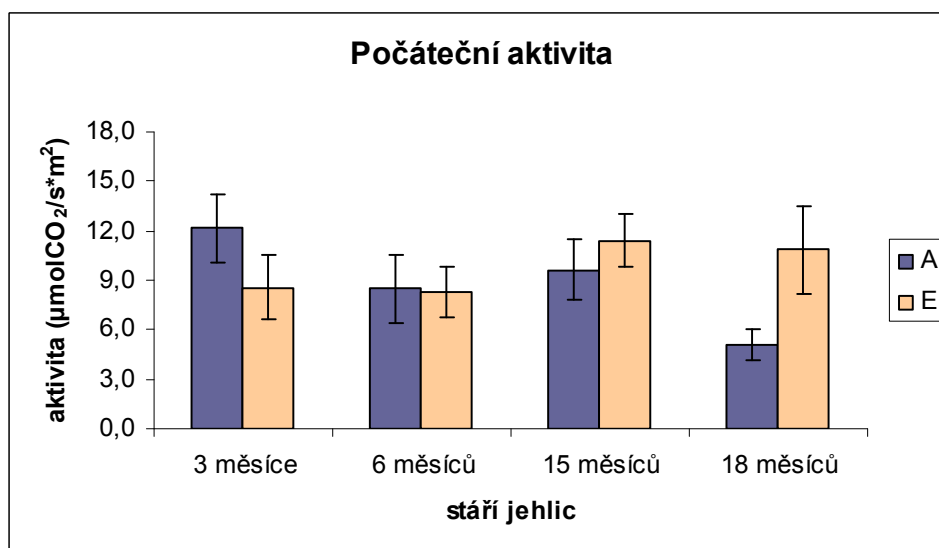
Obr. 34 Obsah Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 29. 9. 2008 (n = 10)

U zářijových vzorků byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi mladými a rok starými jehlicemi v A i E. Obsah Rubisco byl v jehlicích AC-1 o 43 % nižší než v jehlicích AC a obsah Rubisco v jehlicích EC-1 byl o 34 % nižší než v jehlicích EC (obr. 34).



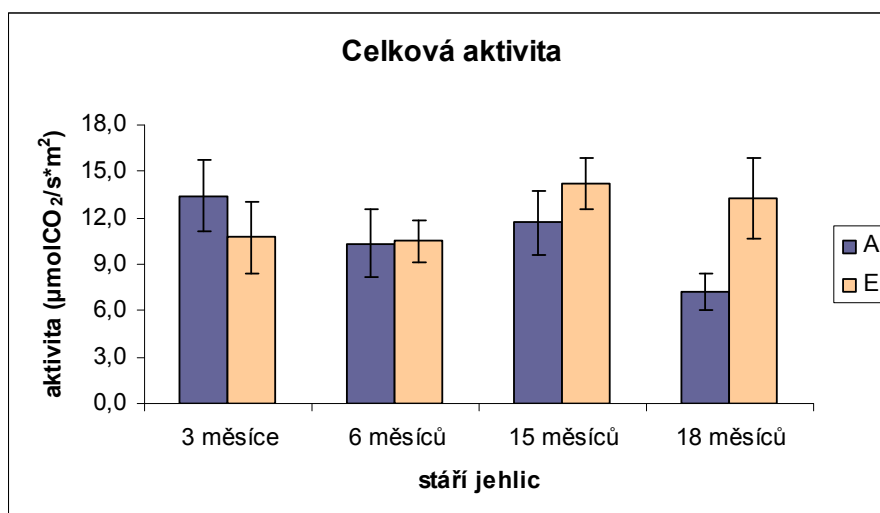
Obr. 35 Obsah Rubisco u mladých a rok starých jehlic smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂, odběr 29. 9. 2008 (n = 10)

U zářijových vzorků byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi A a E u mladých a rok starých jehlic. Obsah Rubisco byl u mladých jehlic v E o 37 % nižší než u jehlic v A, a obsah Rubisco u rok starých jehlic byl v E o 27 % nižší než u jehlic v A (obr. 35).



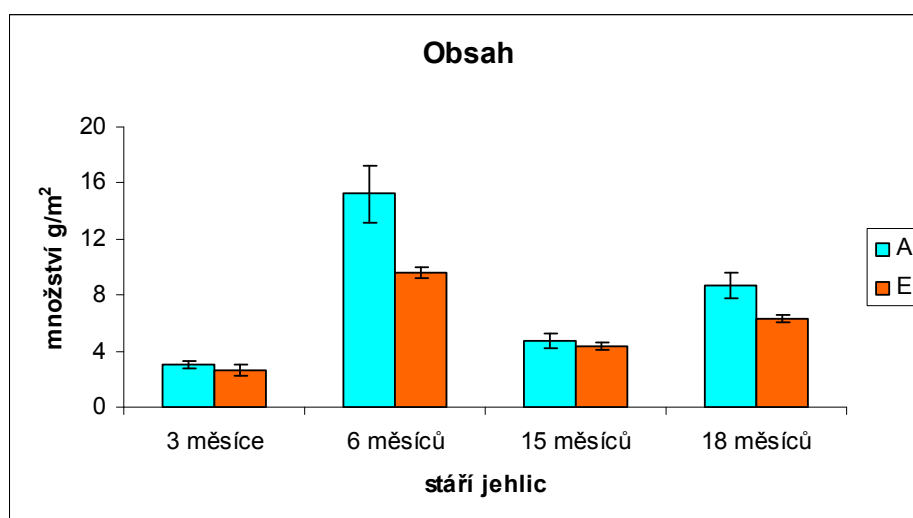
Obr. 36 Počáteční aktivita Rubisco u smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂ v závislosti na stáří jehlic (n = 10)

S rostoucím stářím jehlic se zvyšuje počáteční aktivita v E ve srovnání s A (obr. 36). Kromě 18 měsíců starých jehlic nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi vzorky.



Obr. 37 Celková aktivita Rubisco u smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂ v závislosti na stáří jehlic (n = 10)

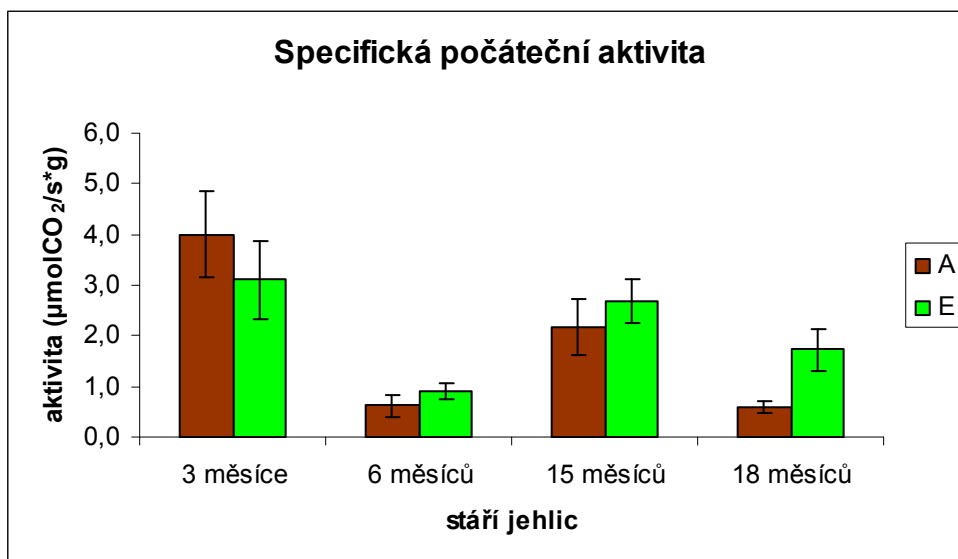
Obdobně jako u počáteční aktivity se s rostoucím stářím jehlic zvyšuje i celková aktivita v E ve srovnání s A (obr. 37). Kromě 18 měsíců starých jehlic nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi vzorky.



Obr. 38 Obsah Rubisco u smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂ v závislosti na stáří jehlic (n = 10)

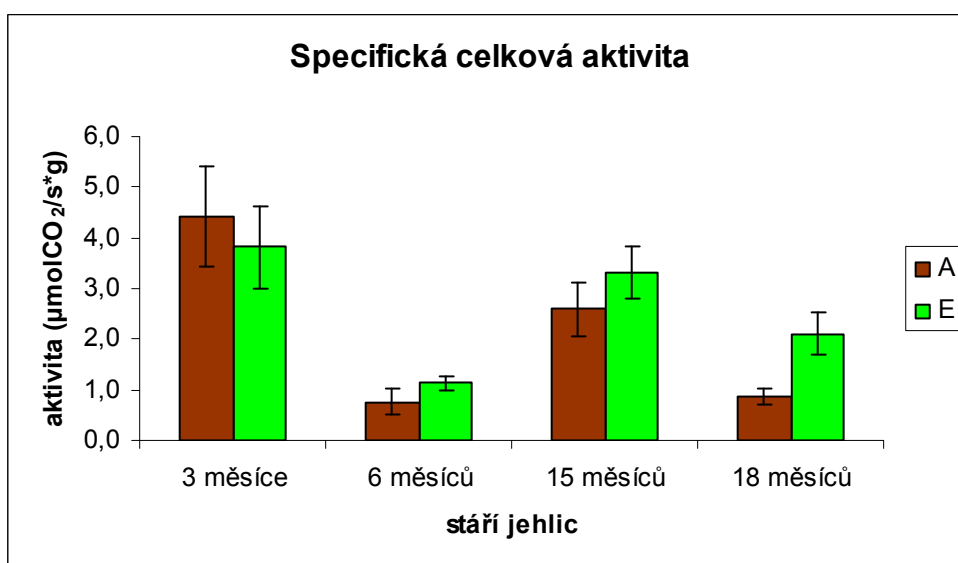
Ve vzorcích z 29. 9. 2008 byl u jehlic starých 6 měsíců naměřen nejvyšší obsah Rubisco. Obsah Rubisco v jehlicích AC byl v září 5x vyšší než v červnu a v jehlicích EC byl v září 3,7x vyšší než v červnu. Obsah Rubisco v jehlicích AC-1 byl v září asi 1,9x vyšší než v červnu a v jehlicích EC-1 byl v září asi 1,4x vyšší než v červnu (obr. 38). Rozdíly byly statisticky významné.

Na základě srovnání obr. 36, 37 a 38 vyplývá, že s délkou působení CO₂ (přes zimu se CO₂ nesyť) klesá obsah Rubisco v E vzhledem k A, zato aktivita v E je „vybičována“ vysoko, aby vyhověla vysoké nabídce CO₂.



Obr. 39 Specifická počáteční aktivita Rubisco u smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂ v závislosti na stáří jehlic (n = 10)

S rostoucím stářím jehlic se zvyšuje specifická počáteční aktivita v E ve srovnání s A (obr. 39). Kromě 18 měsíců starých jehlic nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi vzorky.



Obr. 40 Specifická celková aktivita Rubisco u smrku ztepilého v normální a zvýšené koncentraci CO₂ v závislosti na stáří jehlic (n = 10)

Obdobně jako u specifické počáteční aktivity se s rostoucím stářím jehlic zvyšuje i specifická celková aktivita v E ve srovnání s A (obr. 40). Kromě 18 měsíců starých jehlic nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi vzorky.

4.2 Diskuse

Aktivita a obsah enzymu Rubisco byly měřeny v průběhu vegetační sezóny dvakrát, a to v polovině června a na konci září. Hodnoty aktivit byly stanoveny v rozmezí 8,3–13,4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ pro mladé jehlice a pro rok staré jehlice v rozmezí 5,1–14,2 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Aktivity u vzorků mladých jehlic v červnu byly v A vyšší než v E, kdežto u zářijových vzorků byly aktivity téměř shodné. Aktivity u rok starých jehlic byly jak v červnu tak v září v E vyšší než v A. V červnu byl rozdíl mezi vzorky A a E kolem 15 %, v září už byl rozdíl kolem 50 %. U rok starých jehlic byla aktivita v E vyšší než v A. Pokles aktivity u zářijových vzorků byl výraznější u vzorků A.

Aktivita Rubisco závisí ovšem na mnoha faktorech, které se mění v závislosti na čase odběru a na druhu rostliny. Proto je velmi obtížné srovnat aktivity jednotlivých autorů. Tissue et al. [48] prezentovali aktivitu u borovice kadidlové (*Pinus taeda*) v rozmezí 1,3–9,8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Zatímco Myers et al. [65] uvedli aktivitu u stejného druhu mezi 10,1–22,2 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Turnbull et al. [66] uvedli aktivitu u borovice montereyské (*Pinus radiata*) v rozmezí 4,7–10,1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ a Griffin et al. [67] prezentovali aktivitu u stejného druhu v rozmezí 15,8–22,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Tissue et al. [68] uvedli aktivitu u borovice těžké (*Pinus ponderosa*) v rozmezí 9,5–15,3 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Hrstka et al. [69] naměřili u smrku ztepilého (*Picea abies*) hodnoty aktivit v rozmezí 1,0–3,1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ a Urban a Marek [70] prezentovali aktivity měřené *in vivo* v rozmezí 4,0–7,2 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ u vzorků odebíraných ve stejné lokalitě jako Hrstka et al. [69].

Rozdílnost letních a podzimních aktivit může být způsobena také odlišnou dobou odběru, protože se aktivita velmi rychle mění v horizontu 5–20 minut. Při zářijovém odběru se vzorky odebíraly kolem poledne a pokles mohl být způsoben tzv. polední depresí, která může mít několik možných příčin. Např. při vysoké radiaci dochází ke zvýšení excitace, ale současně dochází ke snížení počtu otevřených reakčních center, v nichž může být excitace účinně přeměněna. Proto se s rostoucí ozářeností snižuje účinnost přeměny pohlceného záření, tj. snižuje se podíl pohlcených fotonů, jejichž energie se zachová v podobě rozdělených nábojů a zvyšuje se podíl těch, jejichž energie se přemění v teplo nebo ve fluorescenci [22]. Prudké (polední) sluneční světlo obsahuje velké množství krátkovlnných modrých paprsků pohlcovaných PS II. Fotosystém II tudíž pohlcuje více světla a vznikající elektrony nestačí být odebírány fotosystémem I. Nadbytečné elektrony pak redukují plastochinon na plastochinol a ten aktivuje kinasu. Kinasa katalyzuje fosforylaci zbytků threoninu v bílkovinně světlosběrného komplexu (LHC). Fosforylovaný LHC přechází do nevrstevných thylakoidů, kde se připojí k PS I, kam soustředí více světla. Dojde-li k přetížení tohoto mechanismu nadměrným světelným tokem, hrozí vznik kyslíkových radikálů, které pak mohou poškodit PS II. Rostliny proto autoproteolyticky rozloží bílkovinu D1 a také se uvolní skupina iontů Mn^{2+} v OEC, které nemohou dále vytvářet kyslík. Při poklesu ozáření je bílkovina D1 velmi rychle syntetizována a zabudována do komplexu nepoškozených bílkovin. [4]

Rogers a Ellsworth [71] potvrdili aklimační depresi na úrovni aktivity Rubisco u rok starých jehlic borovice kadidlové, u mladých jehlic toto tvrzení nepotvrdili. Ke stejnému závěru dospěli také Turnbull et al. [66] a Griffin et al. [67], ovšem u jehlic borovice montereyské.

Podle našich měření nejenže aktivita Rubisco nevykazuje aklimační depresi na zvýšenou koncentraci CO₂, ale naopak dlouhodobé působení zvýšené koncentrace CO₂ vede ke zvýšení počáteční, celkové a specifické aktivity vzhledem k A.

Hodnoty obsahu byly stanoveny v rozmezí 2,6–15,2 g m⁻² pro mladé jehlice a 4,4–8,7 g m⁻² pro rok staré jehlice. Obsah Rubisco byl jak u mladých tak i u rok starých vzorků jehlic v A vyšší než v E a to jak v červnu tak i v září. V červnu byl rozdíl mezi vzorky A a E kolem 10 %, v září už byl rozdíl kolem 30 %. Vzhledem k tomu, že tyto rozdíly byly statisticky významné, lze konstatovat existenci aklimační deprese na úrovni obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂. Obsah enzymu u zářijových vzorků byl mnohem vyšší než u červnových vzorků.

Rogers a Ellsworth [71] uvádějí, že obsah Rubisco se během sezóny snižuje. Je to opak našich měření, kdy u zářijových vzorků byl obsah Rubisco mnohem vyšší než u červnových. Tissue et al. [48] prezentovali obsah Rubisco u borovice kadidlové (*Pinus taeda*) v rozmezí 0,03–0,22 g m⁻². Turnbull et al. [66] uvedli obsah Rubisco u borovice montereyské (*Pinus radiata*) v rozmezí 1,2–1,4 g m⁻². Zatímco Griffin et al. [67] uvedli obsah Rubisco u stejného druhu v rozmezí 0,37–0,52 g m⁻². Tissue et al. [68] uvedli obsah Rubisco u borovice těžké (*Pinus ponderosa*) v rozmezí 0,2–0,4 g m⁻². Hrstka et al. [72] prezentovali obsah Rubisco u smrku ztepilého (*Picea abies*) v rozmezí 1,4–3,1 g m⁻².

Turnbull et al. [66] potvrdili aklimační depresi na úrovni obsahu Rubisco u rok starých jehlic borovice montereyské, u mladých jehlic toto tvrzení nepotvrdili.

Na základě výsledků se zdá, že průběhy aktivit a obsahu v závislosti na stáří jehlic jsou antiparalelní, tzn. pokles obsahu je doprovázen vzrůstem aktivity a naopak.

Dlouhodobé působení zvýšené koncentrace CO₂ vede u smrku ztepilého ke snížení obsahu enzymu Rubisco (aklimace) a naopak ke zvýšení počáteční, celkové a specifické aktivity.

Obsah Rubisco u smrku ztepilého ve srovnání s obsahem u buku lesního (*Fagus sylvatica*) je odlišný. Zatímco u buku byl obsah v červnu výrazně vyšší než v září (ústní sdělení), u smrku je to naopak. To ukazuje na odlišné budování asimilačního aparátu. U opadavých stromů je asimilační aparát budován pouze na 1 rok, proto je obsah nejvyšší v červnu (v době plného rozvíjení listů) a potom postupně klesá [73]. U jehličnanů se asimilační aparát buduje na několik let, proto také dochází k jinému průběhu změn obsahu Rubisco.

5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo srovnat aktivitu a obsah enzymu Rubisco u mladých a jeden rok starých jehlic v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂ a potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco, popř. popsat její průběh.

Stromky smrku ztepilého byly kultivovány v minisférách na Experimentálním ekologickém pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech. V jedné minisféře byla atmosféra s normální koncentrací CO₂, což je asi 350 μmol CO₂ mol⁻¹, je označována A – ambient. Ve druhé minisféře byla atmosféra se zvýšenou koncentrací CO₂, což je 700 μmol CO₂ mol⁻¹, je označována E – elevated.

Vzorky jehlic byly odebírány ve dvou termínech. Dne 12. 6. 2008, v čase od 14:30 do 15:35 hod byly odebírány vzorky pro stanovení aktivity a v čase od 15:50 do 16:40 hod byly odebírány vzorky pro stanovení obsahu. Dne 29. 9. 2008, v čase od 12:00 do 12:30 hod a od 12:50 do 13:20 hod byly odebírány vzorky pro stanovení aktivity. A v čase od 12:30 do 12:50 hod a od 13:20 do 13:45 hod byly odebírány vzorky pro stanovení obsahu.

U všech vzorků byly stanoveny počáteční a celkové aktivity Rubisco pomocí spektrofotometrické metody, která vycházela z metody Lilleyho a Walkera [43] s extrakcí podle Besforda [44]. Tato metoda byla dále upravena pro stanovení počáteční aktivity Heringovou [61]. U všech vzorků byl stanoven také obsah Rubisco metodou SDS-PAGE. Elektroforetické stanovení vycházelo z metod Damervalové et al. [62] a Rogerse et al. [40] a metoda byla dále upravena Floriánem [63] a Zachovou [64].

V aktivitě jehlic kultivovaných v A a E nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly, s výjimkou 18 měsíců starých jehlic, u kterých byla aktivita v E vyšší než v A. Na základě našich měření je tedy nutno zamítnout hypotézu o vzniku aklimační deprese aktivity Rubisco v podmínkách dlouhodobé kultivace smrku ztepilého při zvýšené koncentraci CO₂.

V září, u jehlic starých 6 měsíců a 18 měsíců, však byla zjištěna výrazná aklimační deprese obsahu Rubisco u jehlic kultivovaných při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého.

Zdá se, že průběhy aktivit a obsahu v závislosti na stáří jehlic jsou antiparalelní, tzn. pokles obsahu je doprovázen vzrůstem aktivity a naopak.

Dlouhodobé působení zvýšené koncentrace CO₂ vede u smrku ztepilého ke snížení obsahu enzymu Rubisco (aklimace) a naopak ke zvýšení počáteční, celkové a specifické aktivity.

U jehličnanů je budování asimilačního aparátu značně odlišné od budování u opadavých stromů. U opadavých stromů se asimilační aparát buduje na 1 rok, kdežto u jehličnanů je to na několik let.

6. LITERATURA

- [1] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 1999. 506 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] KLOUDA, P. *Základy biochemie*. 1. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2000. 155 s. ISBN 80-86369-00-5.
- [3] GLOSER, J. *Fyziologie rostlin* [online]. 2003, poslední revize 9.3.2004 [cit. 29.12.2008]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/part_02.pdf.
- [4] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1990. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [5] WILDMAN, S., BONNER, J. The proteins of green leaves. Isolation, enzymatic properties, and auxin content of spinach cytoplasmatic proteins. *Arch. Biochem.*, 1947, roč. 14, s. 381–413.
- [6] CALVIN, M., MASSINY, P. The path of carbon in photosynthesis. XX. The steady state. *Experientia*, 1952, roč. 8, s. 445–457.
- [7] QUAYLE, J. R., FULLER, R. C., BENSON, A. A., CALVIN, M. Enzymatic carboxylation of ribulose diphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, roč. 76, s. 3610–3611.
- [8] WEISSBACH, A., SMYRNIOTIS, P. Z., HORECKER, B. L. Pentose phosphate and CO₂ fixation with spinach extracts. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, roč. 76, s. 3611–3612.
- [9] BOWES, G., OGREN, W. L., HAGEMAN, R. H. Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, roč. 45, s. 716–722.
- [10] ANDREWS, T. J., LORIMER, G. H., TOLBERT, N. E. Ribulose diphosphate oxygenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction-1 protein of leaves. *Biochemistry*, 1973, roč. 12, s. 11–18.
- [11] LORIMER, G. H., ANDREWS, T. J., TOLBERT, N. E. Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction products and mechanism of action. *Biochemistry*, 1973, roč. 12, s. 18–23.
- [12] ŠÍPAL, Z., AZENBACHER, P., PEČ, P., POSPÍŠIL, J., RŮŽIČKA, I. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1992. 480 s. ISBN 80-04-21736-2.
- [13] LEEGOOD, R. C., SHARKEY, T. D., von CAEMMERER, S. *Photosynthesis: Physiology and metabolism*. 1. vyd. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 624 s. ISBN 0-7923-6143-1.

- [14] SPREITZER, R., SALVUCCI, M. E. Rubisco: Structure, regulatory interactions and possibilities for better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, roč. 53, s. 449–475.
- [15] *Calvinův cyklus a pentosafosfátová dráha* [online]. Poslední revize 6.11.2006 [cit. 29.12.2008]. Dostupné z: <http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bch/09.ppt>.
- [16] HAŠLEROVÁ, L. *Rubisco: Struktura a funkce nejhojnějšího enzymu na světě* [online]. Poslední revize 3.10.2008 [cit. 1.1.2009]. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>.
- [17] HARTMAN, F. C., HARPEL, M. R. Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, roč. 63, s. 197–234.
- [18] ANDERSSON, I., TAYLOR, T. C. Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, roč. 414, s. 130–140.
- [19] PORTIS, A. R. Jr. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Journal of Experimental Botany*, 1995, roč. 46, s. 1285–1291.
- [20] GRIFFIN, K. L., SIMS, D. A., SEEMANN, J. R. Altered night-time CO₂ concentration affects the growth, physiology and biochemistry of soybean. *Plant, Cell Environment*, 1999, roč. 22, s. 91–99.
- [21] HRSTKA, M. *Dlouhodobý účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu enzymu ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenasy u smrku ztepilého*. Disertační práce. Brno: VUT, FCH, 2004. 76 s.
- [22] ŠETLÍK, I., SEIDLOVÁ, F., ŠANTRŮČEK, I. *Fyziologie rostlin* [online]. Poslední revize 21.2.2007 [cit. 29.12.2008]. Dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/kap06.pdf>.
- [23] DIETZ, K. J. An evaluation of light and CO₂ limitation of leaf photosynthesis by CO₂ gas-exchange analysis. *Planta*, 1986, roč. 167, s. 260–263.
- [24] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV, 2000. 257 s. ISBN 80-85866-62-5.
- [25] CANNELL, M. G. R., THORNLEY, J. H. M. Temperature and CO₂ responses of leaf and canopy photosynthesis: a classification using non-rectangular hyperbola model of photosynthesis. *Ann. Bot.*, 1998, roč. 82, s. 883–892.
- [26] DEMMERS-DERKS, H., MITCHELL, R. A. C., MITCHELL, V. J., DRISCOLL, S. P., GIBBARD, C., LAWLOR, D. W. Sugar beet under climatic change: photosynthesis and production. *Appl. Biol.*, 1996, roč. 45, s. 163–169.

- [27] van OOSTEN, J. J., BESFORD, R. T. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ through feedback regulation of gene expression: Climate of opinion. *Photosynth. Res.*, 1996, roč. 48, s. 353–365.
- [28] DRAKE, B. G., GONZALES-MELER, M. A., LONG, S. P. More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, roč. 48, s. 609–639.
- [29] IDSO, S. B., KIMBALL, B. A., AKIN, D. E., KRIDLER, J. A general relationship between CO₂-induced reductions in stomatal conductance and concomitant increases in foliage temperature. *Environ. Exp. Bot.*, 1993, roč. 33, s. 443–446.
- [30] WOODWARD, R. I., KELLY, C. The influence of CO₂ concentration on stomal density. *New Phytol.*, 1995, roč. 131, s. 311–327.
- [31] GONZALES-MELER, M. A., RIBAS-CARBÓ, M., SIEDOW, J. N., DRAKE, B. G. Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂. *Plant Physiol.*, 1996, roč. 112, s. 1349–1355.
- [32] ACOCK, B., ACOCK, M. C., PASTERNAK, D. Interactions of CO₂ enrichment and temperature on carbohydrate production and accumulation in muskmelon leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1990, roč. 115, s. 525–529.
- [33] HÄTTENSCHWILLER, S., MIGLIETTA, F., RASCHI, A., KÖRNER, C. Thirty years of in situ tree growth under elevated CO₂: a model for future forest responses? *Global Change Biol.*, 1997, roč. 3, s. 463–471.
- [34] SAXE, H., ELLSWORTH, D. S., HEATH, J. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytol.*, 1998, roč. 139, s. 395–436.
- [35] OSBORNE, C. P., DRAKE, B. G., LAROCHE, J., LONG, S. P. Does long-term elevation of CO₂ concentration increase photosynthesis in forest floor vegetation? *Plant Physiol.*, 1997, roč. 114, s. 337–344.
- [36] PARRY, M. A. J., ANDRALOJC, P. J., PARMAR, S., KEYS, A. J., HABASH, D., PAUL, M. J., ALRED, R., QUICK, W. P., SERVAITES, J. C. Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant, Cell and Environment*, 1997, roč. 20, s. 528–534.
- [37] JIANG, C. Z., RODERMEL, S. R., SHIBLES, R. M. Photosynthesis, Rubisco Activity and Amount, and Their Regulation by Transcription in Senescing Soybean Leaves. *Departments of Agronomy and Botany*, 1993, roč. 101, s. 105–112.
- [38] GUTTERIDGE, S., GATENBY, A. A. Rubisco Synthesis, Assembly, Mechanism, and Regulation. *The Plant Cell*, 1995, roč. 7, s. 809–819.

- [39] WALBOT, V. Heavy metal impurities impair the Spectrophotometric assay of ribulose biphosphate carboxylase activity. *Plant Physiol.*, 1977, roč. 59, s. 107–110.
- [40] ROGERS, A., ELLSWORTH, D. S., HUMPHRIES, S. W. Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO₂. *Journal of Experimental Botany*, 2001, roč. 52, s. 1555–1561.
- [41] ŠESTÁK, Z., ČATSKÝ, J., JARVIS, P. Plant photosynthetic production. Manual of methods. Dr. W. Junk, Publishing, The Hague, 1971.
- [42] *Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy gazometricky* [online]. Poslední revize 29.3.2007 [cit. 29.12.2008]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/fotosynteza.htm>.
- [43] LILLEY, R. M., WALKER, D. A. An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase. *Biochem Biophys. Acta*, 1974, roč. 358, s. 226–229.
- [44] BESFORD, R. T., Some properties of ribulose biphosphate carboxylase extracted from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1984, roč. 35, s. 495–504.
- [45] DU, Y. C., NOSE, A., KAWAMITSU, Y., MURAYAMA, S., WASANO, K., UCHIDA, Y. An improved spectrophotometric determination of the activity of ribulose-1,5- biphosphate carboxylase. *Jpn. J. Crop. Sci.*, 1996, roč. 65, s. 714–721.
- [46] GERARD, V. A., DRISCOLL, T. A spectrophotometric assay for Rubisco activity: Application to the kelp *Laminaria saccharina* and implications for radiometric assays. *J. Phycol.*, 1996, roč. 32, s. 880–884.
- [47] LI, J. H., DIJKSTRA, P., HINKLE, C. R., WHEELER, R. M., DRAKE, B. G. Photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂ concentration in the Florida scrub-oak species *Quercus geminata* and *Quercus myrtifolia* growing in their native environment. *Tree Physiol.*, 1999, roč. 19, s. 229–234.
- [48] TISSUE, D. T., THOMAS, R. B., STRAIN, B. R. Long-term effects of elevated CO₂ and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant, Cell and Environment*, 1993, roč. 16, s. 859–865.
- [49] REID, C. D., TISSUE, D. T., FISCUS, E. L., STRAIN, B. R. Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. *Physiol. Plant.*, 1997, roč. 101, s. 398–404.
- [50] KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní cvičení z biochemie*. 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000. 203 s. ISBN 80-7182-104-7.

- [51] COUFAL, P. *High performance liquid chromatography, HPLC* [online]. Poslední revize 28.7.2004 [cit. 21.3.2009].
Dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
- [52] ANTONOV, Y. A., SOSHINSKY, A. A. Interactions and compatibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from alfalfa with pectin in aqueous medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2000, roč. 27, s. 279–285.
- [53] LUO, S., WANG, Z. Y., KOBAYASHI, M., NOZAWA, T. The Dimerization of Folded Monomers of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, roč. 10, s. 7023–7026.
- [54] KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. listy*, 1997, roč. 91, s. 320–329.
- [55] WARREN, C. R. The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO₂ movement is increased by nutrient supply. *Journal of Experimental Botany*, 2004, roč. 55, s. 2313–2321.
- [56] WARREN, C. R., ADAMS, M. A., CHEN, Z. L. In photosynthesis related to concentrations of nitrogen and Rubisco in leaves of Australian native plants? *Aust. J. Plant Physiol.*, 2000, roč. 27, s. 407–416.
- [57] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy* [online]. 2007, poslední revize 8.1.2008 [cit. 29.12.2008]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.help.htm
- [58] NASSOURY, N., FRITZ, L., MORSE, D. Circadian Changes in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Distribution Inside Individual Chloroplasts Can Account for the Rhythm in Dinoflagellate Carbon Fixion. *The Plant Cell*, 2001, roč. 13, s. 923–934.
- [59] KOBZA, J., SEEMANN, J. R. Mechanisms for the light-dependent regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, roč. 85, s. 3815–3819.
- [60] POSPÍŠIL, D. *Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR v.v.i.* [online]. Poslední revize 29.1.2009 [cit. 21.3.2009].
Dostupné z: <http://www.usbe.cas.cz/lefr/soubory/prezentace/lefld.ppt>.
- [61] HERINGOVÁ, P. *Aktivita enzymu Rubisco u smrku ztepilého v průběhu dne*. Diplomová práce. Brno: VUT, FCH, 2004. 50 s.
- [62] DAMERVAL, C., DE VIENNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, roč. 7, s. 52–54.

- [63] FLORIÁN, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Diplomová práce. Brno: VUT, FCH, 2006. 47 s.
- [64] ZACHOVÁ, L. *Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na množství a aktivitu enzymu Rubisco*. Diplomová práce. Brno: VUT, FCH, 2008. 56 s.
- [65] MYERS, D. A., THOMAS, R. B., DELUCIA, E. H. Photosynthetic capacity of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) trees during the first year of carbon dioxide enrichment in a forest ecosystem. *Plant, Cell and Environment*, 1999, roč. 22, s. 473–481.
- [66] TURNBULL, M. H., TISSUE, D. T., GRIFFIN, K. L., ROGERS, G. N. D., WHITEHEAD, D. Photosynthetic acclimation to long-term exposure to elevated CO₂ concentration in *Pinus radiata* D. Don. is related to age of needles. *Plant, Cell and Environment*, 1998, roč. 21, s. 1019–1028.
- [67] GRIFFIN, K. L., TISSUE, D. T., TURNBULL, M. H., WHITEHEAD, D. The onset of photosynthetic acclimation to elevated CO₂ partial pressure in field-grown *Pinus radiata* D. Don. after 4 years. *Plant, Cell and Environment*, 2000, roč. 23, s. 1089–1098.
- [68] TISSUE, D. T., GRIFFIN, K. L., BALL, J. T. Photosynthetic adjustment in field-grown ponderosa pine trees after six years of exposure to elevated CO₂. *Tree Physiology*, 1999, roč. 19, s. 221–228.
- [69] HRSTKA, M., URBAN, O., MAREK, M. V. Long-term effect of elevated CO₂ on spatial differentiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in Norway spruce canopy. *Photosynthetica*, 2005, roč. 43, s. 211–216.
- [70] URBAN, O., MAREK, M. V. Seasonal changes of selected parameters of CO₂ fixation biochemistry of Norway spruce under the long-term impact of elevated CO₂. *Photosynthetica*, 1999, roč. 36, s. 533–545.
- [71] ROGERS, A., ELLSWORTH, D. S. Photosynthetic acclimation of *Pinus taeda* (loblolly pine) to long-term growth in elevated pCO₂ (FACE). *Plant, Cell and Environment*, 2002, roč. 25, s. 851–858.
- [72] HRSTKA, M., URBAN, O., PETRŮ, E., BABÁK, L. Diurnal regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and its content in Norway spruce needles. *Photosynthetica*, 2007, roč. 45, s. 334–339.
- [73] MAKINO, A., MAE, T. Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant Cell Physiol.*, 1999, roč. 40, s. 999–1006.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3-KABP	3-keto-D-arabinitol-1,5-bisfosfát
ADP	adenosindifosfát
AIDA	Advanced Image Data Analyser
ATP	adenosintrifosfát
BICIN	N,N'-bis-2-hydroxyethylglycin
BSA	bovinní sérový albumin
CA1P	2-karboxyarabinitol-1-fosfát
CABP	2-karboxy-D-arabinitol-1,5-bisfosfát
cDNA	komplementární DNA
CE-SDS	kapilární elektroforéza za použití SDS
DMPN	dimethylaminopropionitril
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethynsulfonová
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IRGA	infračervený analyzátor plynů
LHC	světlosběrný komplex
Lys 201	Lysin 201
MOPS	kyselina morfolinopropansulfonová
NADH	nikotinamidadeninnukleotid
NADPH	nikotinadeninnukleotidfosfát
Na ₂ EDTA	ethylendiamintetraoctan disodný
OEC	kyslík vyvíjející komplex
PQ _A	plastochinon A
PQ _B	plastochinon B
PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
R5P	ribosa-5-fosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylovém gelu za použití SDS
TEMED	N,N,N'-N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	xylulosa-1,5-bisfosfát