



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 LISTOVÉHO DUSÍKU A NESTRUKTURNÍCH
SACHARIDŮ NA OBSAH A AKTIVITU ENZYMU
RUBISCO
V PODMÍNKÁCH NORMÁLNÍ A ZVÝŠENÉ
KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO

INFLUENCE OF TOTAL LEAF NITROGEN AND NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES ON
RUBISCO CONTENT AND ITS ACTIVITY UNDER AMBIENT
AND ELEVATED CONCENTRATIONS OF CARBON DIOXIDE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

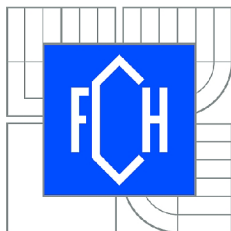
Bc. MAGDA VIČÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0579/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Magda Vičíková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Vliv listového dusíku a nestruturních sacharidů na obsah a aktivitu enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého

Zadání diplomové práce:

V teoretické části práce pojednat o základních procesech fotosyntézy, enzymu Rubisco, vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na rostliny a vlivu obsahu listového dusíku a nestruturních sacharidů na obsah a aktivitu enzymu Rubisco.

V experimentální části studovat závislost obsahu, aktivity a aktivace enzymu Rubisco na obsahu listového dusíku a nestruturních sacharidů v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

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

Bc. Magda Vičíková
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vlivem obsahu listového dusíku a nestrukturních sacharidů na aktivitu a obsah enzymu Rubisco v podmínkách normální ($A = 385 \mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) a zvýšené ($E = 700 \mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) koncentrace oxidu uhličitého u smrku ztepilého (*Picea abies* L.). Aktivita Rubisco byla stanovena spektrofotometricky, obsah Rubisco metodou SDS-PAGE, obsah nestrukturních sacharidů anthronovou metodou a celkový dusík byl stanoven metodou dle Kjeldahla.

Aktivita Rubisco u smrku ztepilého nevykazovala aklimaci na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého, ale naopak byla zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého v průběhu vegetační sezóny stimulována. U obsahu enzymu Rubisco byla prokázána aklimační deprese, u jehlic kultivovaných při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého byl obsah významně nižší.

U smrků kultivovaných při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého byl statisticky významně nižší obsah celkového dusíku než u smrků rostoucích v normální atmosféře. Naopak obsah nestrukturních sacharidů byl u jehlic kultivovaných při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého významně vyšší než u varianty A. Sezónní průběh obsahu Rubisco závisel na obsahu nestrukturních sacharidů, se stoupajícím obsahem nestrukturních sacharidů klesal obsah Rubisco a naopak. Mezi sezónními změnami obsahu celkového dusíku a obsahem Rubisco nebyla prokázána žádná závislost.

ABSTRACT

This diploma thesis examines influence of content of leaf nitrogen and non-structural carbohydrates on Rubisco activity and its content under impact of ambient ($A = 385 \mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) and elevated ($E = 700 \mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) concentrations of carbon dioxide in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). The Rubisco activity was determined spectrophotometrically, the Rubisco content by using SDS-PAGE, the content of non-structural carbohydrates by using the anthron method and total leaf nitrogen was determined by using the Kjeldahl method.

The Rubisco activity in needles of Norway spruce did not show acclimation on elevated concentration of carbon dioxide, but the activity was elevated concentration of carbon dioxide stimulated during the growing season. The acclimation was proved by Rubisco content, its content was significantly lower in needles cultivated under elevated carbon dioxide.

Content of total leaf nitrogen was statistically significantly lower in needles of Norway spruce cultivated under elevated carbon dioxide than in needles cultivated under ambient concentration of carbon dioxide. On the contrary, the content of non-structural carbohydrates was significantly higher in needles cultivated under elevated concentration of carbon dioxide than in variant A. Seasonal changes of Rubisco content depended on content of non-structural carbohydrates, the Rubisco content decreased with increasing content of non-structural carbohydrates. No dependence was detected between seasonal changes of the total leaf content and the Rubisco content.

KLÍČOVÁ SLOVA

Smrk ztepilý, aktivita a obsah Rubisco, nestrukturní sacharidy, listový dusík, aklimace

KEYWORDS

Norway spruce, Rubisco activity and content, non-structural carbohydrates, leaf nitrogen, acclimation

VIČÍKOVÁ, M. *Vliv listového dusíku a nestrurních sacharidů na obsah a aktivitu enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 70 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracovaná samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu a cenné připomínky při psaní diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	FOTOSYNTÉZA	10
2.1.1	Chloroplasty	10
2.1.2	Reakce závislé na světle	11
2.1.3	Reakce nezávislé na světle	14
2.2	RIBULOSA-1,5-BISFOSFÁT KARBOXYLASA/OXYGENASA	15
2.2.1	Historie	16
2.2.2	Struktura	16
2.2.3	Aktivace	17
2.2.4	Karboxylace a oxygenace	19
2.3	VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO ₂	21
2.3.1	Rychlost fotosyntézy	22
2.3.2	Rychlost fotorespirace	23
2.3.3	Vodivost průduchů	23
2.3.4	Rychlost dýchání	23
2.3.5	Teplota	24
2.3.6	Minerální výživa	24
2.3.7	Složení sušiny	25
2.3.8	Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na dřeviny	26
2.4	METODY STANOVENÍ AKTIVITY RUBISCO	26
2.4.1	Gazometrické stanovení (in vivo)	26
2.4.2	Radiometrické stanovení (in vitro)	27
2.4.3	Spektrofotometrické stanovení (in vitro)	27
2.5	METODY STANOVENÍ OBSAHU RUBISCO	28
2.5.1	SDS-PAGE	28
2.5.2	Kapilární elektroforéza	29
2.5.3	HPLC	29
2.5.4	Radioimunosrážecí metoda	30
2.5.5	ELISA	30
2.6	METODY STANOVENÍ NESTRUKTURNÍCH SACHARIDŮ	30
2.6.1	Polarimetrie	30
2.6.2	Anthronová metoda	31
2.6.3	HPLC	31
2.7	STANOVENÍ LISTOVÉHO DUSÍKU	31
2.7.1	Metoda podle Kjeldahla	31
2.7.2	Spektrofotometrické stanovení dusíku Nesslerovým činidlem	32
2.7.3	Metoda podle Dumase	33
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1	MATERIÁL	34
3.2	METODY	34
3.2.1	Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco	34

3.2.2	Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco	39
3.2.3	Stanovení nestrurních sacharidů anthronovou metodou	43
3.2.4	Stanovení listového dusíku podle Kjeldahla	46
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
4.1	VÝSLEDKY	49
4.1.1	Aktivita enzymu Rubisco	49
4.1.2	Obsah enzymu Rubisco	54
4.1.3	Obsah nestrurních sacharidů	55
4.1.4	Obsah celkového dusíku	56
4.1.5	Vliv nestrurních sacharidů na obsah Rubisco	58
4.1.6	Vliv celkového listového dusíku na obsah Rubisco	59
4.2	DISKUZE	60
5	ZÁVĚR	62
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	70

1 ÚVOD

Enzym ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa, neboli Rubisco má klíčovou roli v koloběhu oxidu uhličitého na Zemi. Katalyzuje vazbu molekuly CO_2 do organické molekuly (karboxylaci) a představuje tak vstupní bránu anorganického uhlíku do biosféry. Kromě karboxylace Rubisco katalyzuje také oxygenaci, neboli fixaci molekuly O_2 do té samé organické molekuly. Schopnost enzymu Rubisco katalyzovat fixaci oxidu uhličitého nebo kyslíku na stejnou molekulu spočívá ve strukturní podobnosti těchto dvou molekul, které spolu soutěží o aktivní místo enzymu.

Významnou vlastností Rubisco je jeho malá účinnost. Typický enzym přemění až 1000 molekul substrátu za sekundu, zatímco Rubisco necelé 3 molekuly substrátu. Právě kinetika enzymu Rubisco je limitujícím faktorem fotosyntézy, proto se v rostlinách vyskytuje ve velkém množství, aby byla zachována její dostatečná rychlost. Z tohoto důvodu je Rubisco předmětem rozsáhlého výzkumu, který se zaměřuje na jeho účinnější aktivaci a také na snahu vytvořit efektivnější Rubisco genovými manipulacemi. Tím by se dosáhlo zvýšení rychlosti fotosyntézy a následně zvýšení výnosu hospodářských plodin.

Zvýšení produkce hospodářských plodin by také mohl zajistit současný vzestup koncentrace oxidu uhličitého. Podle studie Hönlische et al. [1] je za posledních 2,1 milionu let koncentrace oxidu uhličitého nejvyšší. Průměrně se koncentrace CO_2 za toto období pohybovala okolo $280 \mu\text{mol mol}^{-1}$, zatímco v roce 2008 to bylo $385 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Tento nárůst koncentrace začal od poloviny 18. století a je spojen s rozvojem průmyslu. Bylo vypočítáno, že při zachování současného trendu zhruba kolem roku 2050 dosáhne koncentrace CO_2 hodnoty $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Tento vývoj může zvýšit výnos hospodářských plodin až o 33 %, ale zároveň může mít negativní vliv na kvalitu potravin. Snížení kvality potravin souvisí se snížením obsahu a kvality lepku. Působením zvýšené koncentrace oxidu uhličitého dochází k vyšší produkci nestrukturních sacharidů a tím ke zředění bílkovin, tedy i lepku. Proto je důležité sledovat vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na naše ekosystémy.

Vlivem zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny se u nás zabývá Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i., které je podpořeno projektem LM2010007 CzeCOS/ICOS - Národní infrastruktura sledování uhlíku. V rámci této diplomové práce bylo využito experimentální kultivační zařízení této instituce v Moravskoslezských Beskydách na Bílém Kříži. Na tomto pracovišti byly vybudovány kultivační sféry s normální a zvýšenou koncentrací CO_2 . Právě zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého jsou modelovány atmosférické podmínky očekávané v průběhu několika příštích desetiletí.

V mnoha pracích bylo potvrzeno, že při krátkodobém zvýšení koncentrace CO_2 dojde ke vzestupu rychlosti fotosyntézy, avšak při dlouhodobějším působení dojde k poklesu tohoto přírůstku. Zároveň u mnoha rostlin dochází k poklesu obsahu Rubisco, celkového dusíku a rozpustných bílkovin. Tento projev rostlin na zvýšenou koncentraci CO_2 je popsán jako aklimace nebo aklimační deprese. Příčiny aklimace jsou neustálým předmětem mnoha výzkumů a diskuzí. Pokles obsahu Rubisco přisuzují někteří autoři zvýšenému obsahu nestrukturních sacharidů, což vede k represí exprese genů pro Rubisco, jiní autoři vidí příčinu v poklesu obsahu listového dusíku.

V předložené diplomové práci jsem se pokusila odpovědět na následující otázky: (1) Dochází u smrku ztepilého k aklimační depresi obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 ?

(2) Je předpokládán pokles obsahu Rubisco u smrku ztepilého důsledkem zvýšené koncentrace nestruturních sacharidů v listech, nebo důsledkem poklesu obsahu listového dusíku?

2 TEORETICKÁ ČÁST

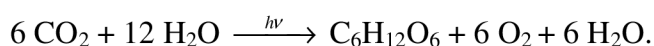
2.1 Fotosyntéza

Většina rostlin na Zemi získává veškerou energii pro své metabolické děje z primárního energetického zdroje – slunečního záření a veškerý uhlík z anorganické sloučeniny – oxidu uhličitého. Jedná se tedy o fotoautotrofní organismy. Díky těmto schopnostem mají důležité postavení v celé biosféře, protože ostatní heterotrofní složky ekosystému, včetně člověka, využívají energeticky bohaté organické sloučeniny vytvořené právě rostlinami.

Procesy, kterými dochází k vazbě CO₂ do organických sloučenin s využitím radiační energie, se označují jako fotosyntetická asimilace CO₂, tedy fotosyntéza. Obecně ji lze definovat jako souhrn procesů spojených s přeměnou energie fotonů (kvant záření) do volné chemické energie, která je dále využita při biologických syntézách [3].

Rostliny a sinice shromažďují světelnou energii a ukládají ji do chemických vazeb při přeměně jednoduchých anorganických sloučenin CO₂ a H₂O na sacharidy. Vzniklé sacharidy jsou pak využívány nejen samotnými rostlinami, ale i organismy, které se jimi živí. Důležitou součástí fotosyntézy je i produkce kyslíku, který je pro atmosféru naší planety nezbytný.

Z fyzikálního hlediska fotosyntéza představuje přeměnu energie slunečního záření na energii chemickou. Chemicky představuje fotosyntéza převedení uhlíku z nejméně oxidované formy o nízké energii, oxidu uhličitého, na redukovaný materiál o vysoké energii – sacharidy. Potřebná energie pro tento endergonický děj je získávána z absorbovaného elektromagnetického záření a elektrony potřebné pro redukci jsou nejčastěji získávány z vodíku vody [2]. Fotosyntéza, při které je donorem vodíku voda, se nazývá oxygenní a vystihuje ji souhrnná rovnice



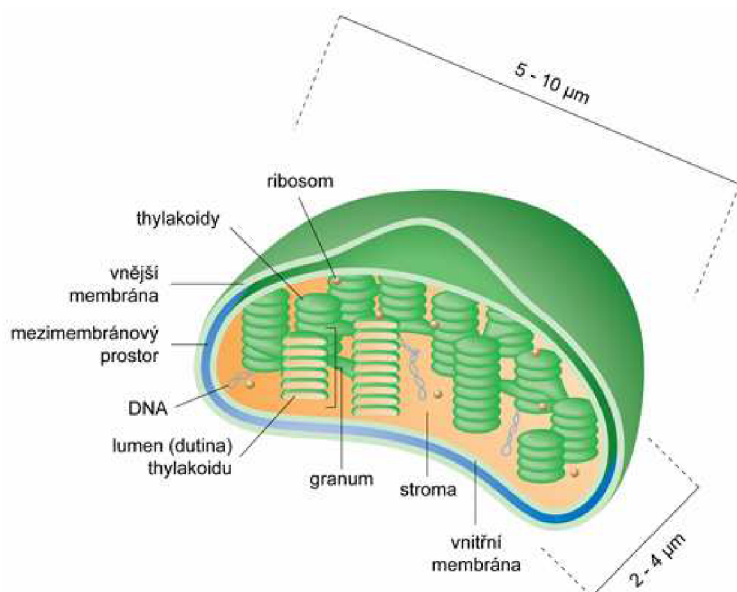
Tato rovnice však nevyovídá nic o energetice přeměně ani o složitém mechanismu.

Fotosyntéza neprobíhá v jediné reakci, ale v souboru dílčích dějů, které zahrnují:

- Fyzikální procesy, jež souvisejí s absorpcí záření fotoreceptory a s rezonačním přenosem energie k reakčním centrům.
- Primární fotochemické a redoxní procesy, jež jsou spojeny s fotolýzou vody a s přenosem elektronů redoxními systémy, které slouží k redukci NADP⁺ a ke vzniku ATP.
- Sekundární biochemické reakce, ve kterých dochází k navázání oxidu uhličitého k akceptoru a k jeho redukci vodíkem, který vzniká při fotolýze vody. Tento děj zahrnuje tvorbu vlastních organických sloučenin [3].

2.1.1 Chloroplasty

U eukaryot probíhá fotosyntéza ve specializovaných plastidech zvaných chloroplasty. Tato buněčná organela je velmi bohatá na membrány, které umožňují dokonalou souhru všech fotosyntetických reakcí. Jejich rozmanitý tvar, velikost a počet závisí na druhu rostlin. Nejběžnější chloroplasty mají elipsoidní tvar, jsou asi 5–10 μm dlouhé a jejich tloušťka je asi 2–4 μm [2].



Obr. 2.1 Struktura chloroplastu. Převzato z [75].

Chloroplasty jsou orgány s dvojitou povrchovou membránou. Vnější membrána je vysoce propustná, vnitřní membrána je mnohem méně propustná, semipermeabilní a jsou v ní zanořeny membránové transportní proteiny [3]. Mezi nimi je úzký mezimembránový prostor. Uvnitř se nachází další, vysoce specifický membránový systém, označovaný jako tylakoidy. Tylakoid je pravděpodobně jediný, mnohonásobně poskládaný plochý váček, který se však jeví jako soustava terčovitých váčků poskládaných ve sloupci. Tyto útvary se nazývají grana a jsou navzájem propojené stromálními tylakoidy. Průměrný chloroplast obsahuje 10–100 gran [4].

Vnitřní prostor chloroplastu je vyplněn koncentrovaným roztokem enzymů – stromatem, v němž jsou obsaženy i molekuly DNA, RNA a ribosomy, na kterých dochází k syntéze chloroplastových bílkovin. Dutina tylakoidů se nazývá lumen a je vyplněna vodou s rozpuštěnými solemi.

2.1.2 Reakce závislé na světle

Veškeré reakce závislé na světle (primární procesy) probíhají v tylakoidech, a to především v jejich membránách. Tyto membrány mají velmi vysoký obsah bílkovin, tvoří 60–65 % celkové hmotnosti. Na většinu z nich se váže velké množství asimilačních barviv – chlorofylů a karotenoidů a vytvářejí tzv. světlosběrné antény, neboli LHC. Součástí membrán jsou také látky s redukujícími vlastnostmi, které slouží jako přenašeče elektronů [3].

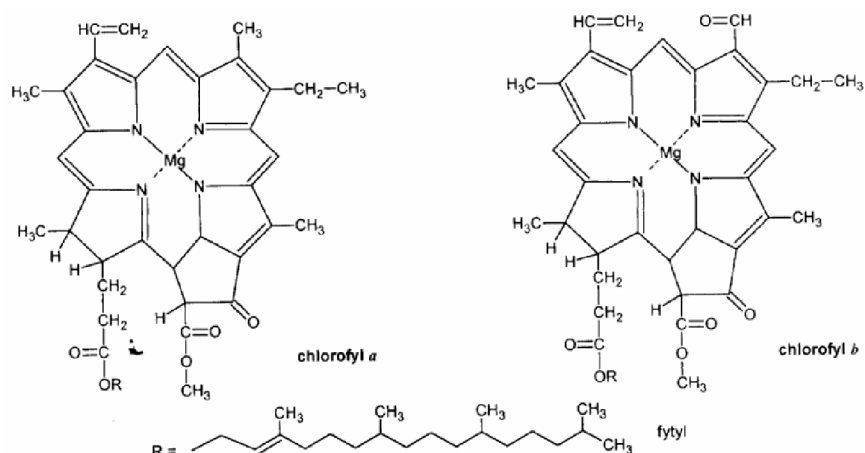
2.1.2.1 Fotoreceptory

Existují tři typy fotosyntetických fotoreceptorů:

- Chlorofyly – porfyriny
- Fykobiliny – porfyriny s otevřeným tetrapyrrolovým řetězcem
- Karotenoidy – isoprenoidy

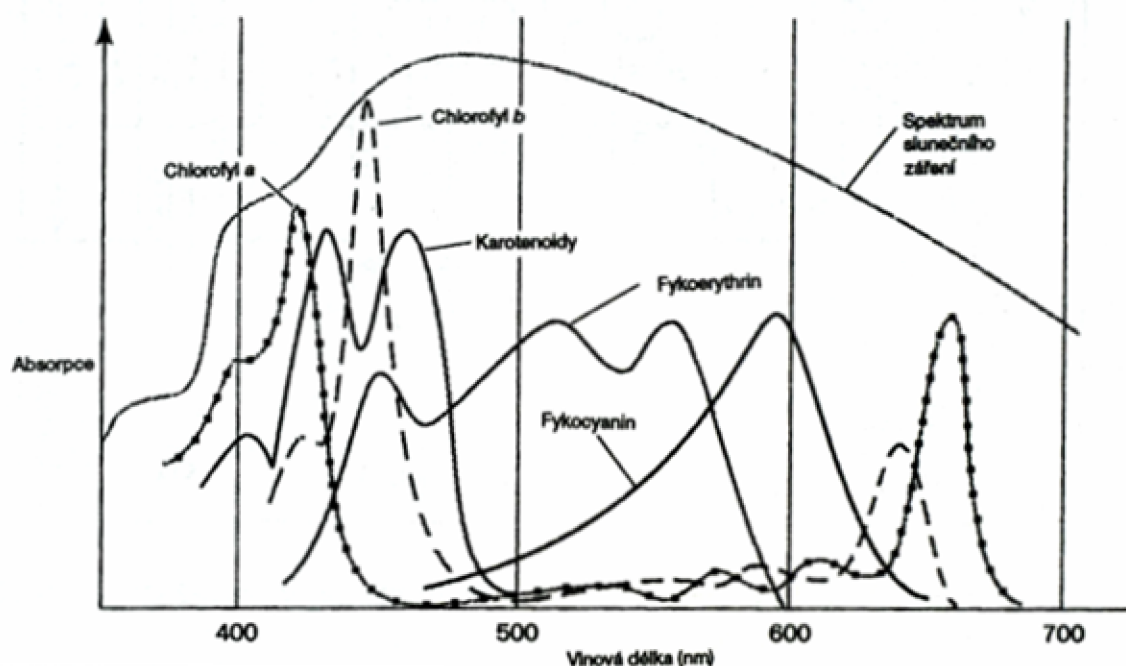
Chlorofyly jsou nejdůležitějšími fotosyntetickými pigmenty, tvoří asi 1 % sušiny zelených částí rostlin [2]. Chemicky se jedná o tetrapyrroly spojené methinovými můstky s centrálním hořečnatým iontem (Mg^{2+}). Za absorpci fotonů jsou odpovědné převážně π -elektrony systému konjugovaných dvojných vazeb, které se v chlorofylu nacházejí. Hlavní postavení má modrozelený chlorofyl *a*, žlutozelený chlorofyl *b* má pouze doplňkovou (akcesorickou)

funkci. Liší se od sebe substitucí na jednom z pyrrolových kruhů a posunutím absorpčního spektra, takže se vzájemně doplňují v pokrývání viditelné oblasti elektromagnetického záření. Největší absorpci mají v modré oblasti (400 – 500 nm) a v červené oblasti (600 – 700 nm) [3].



Obr. 2.2 Molekula chlorofylu. Převzato z [6].

Ostatní pigmenty mají ve fotosyntéze pouze doplňkovou funkci. Doplní a rozšiřují spektrum fotosynteticky účinného záření. Mezi pomocná barviva patří fykobiliny, které rozšiřují fotosynteticky účinné záření o modrou a červenou oblast, a karotenoidy, které doplňují záření ve žlutozelené části spektra (Obr. 2.3) [5].



Obr. 2.3 Absorpční spektra fotosyntetických pigmentů. Převzato z [5].

2.1.2.2 Absorpce záření

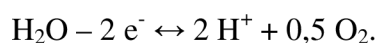
Prvním stupněm fotosyntézy je absorpce záření chlorofylovými molekulami, které jsou většinou vázány na molekuly speciálních proteinů. Ty je udržují optimálně nasměrované, aby mohly navzájem předávat absorbovanou energii až na molekulu chlorofylu *a* v reakčním centru.

2.1.2.3 Fotosystém I a II

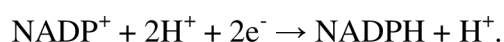
Při fotosyntéze spolupracují dva fotosystémy. První (fotosystém I, P_I) vyrábí silné redukční činidlo, které redukuje NADP⁺ na NADPH. Druhý (fotosystém II, P_{II}) produkuje z vody silné oxidační činidlo O₂. Oba fotosystémy s příslušnými soubory oxidoreduktas jsou na každém tylakoidu umístěny odděleně a jsou propojeny řetězcem přenašečů elektronů. Propojení P_I a P_{II} vytváří elektronovou pumpu, při které dochází k přenosu elektronů z vody na NADPH. Dochází také ke zvyšování koncentrace protonů v tylakoidech, což umožňuje pohon enzymového komplexu ATP-syntasy při produkci ATP z ADP [2,6].

Fotosystém I (P_I) se nachází na tylakoidních membránách, které přímo komunikují se stromatem. Obsahuje převážně molekuly chlorofylu *a*, jeho absorpční maximum je asi 700 nm. Přenosem fotonů ze sběračových chlorofylových molekul dojde k uvolnění elektronů z molekuly chlorofylu v reakčním centru (označovaná jako P₇₀₀) a k jejímu přechodu do excitovaného stavu P₇₀₀^{*}. Uvolněné elektrony jsou pak pomocí oxidoreduktasy ferredoxin přeneseny na NADP⁺ za vzniku NADPH. Potřebné protony pocházejí z fotolýzy vody, spřažené s fotosystémem II.

Fotosystém II (P_{II}) je lokalizován v granálních membránách tylakoidů, nekomunikují tedy přímo se stromatem. Obsahuje molekuly chlorofylu *a* i *b*, absorpční maximum P_{II} je asi 680 nm. Molekula chlorofylu v reakčním centru (označovaná jako P₆₈₀) přejde ozářením do excitovaného stavu P₆₈₀^{*}. Elektrony se pak přenášejí systémem oxidoreduktas (cytochromový komplex, plastochinony a plastocyany) a převedou excitovanou molekulu chlorofylu v reakčním centru P₇₀₀ fotosystému I do základního stavu. Uvolněním elektronů z P₆₈₀^{*} a jejich přechodem na P₇₀₀ vznikne oxidovaná forma chlorofylu P₆₈₀, která oxiduje vodu za uvolnění O₂



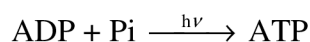
Elektrony, které se uvolnily při fotolýze vody, redukují P₆₈₀ a protony jsou použity při redukcí NADP⁺ ve fotosystému I

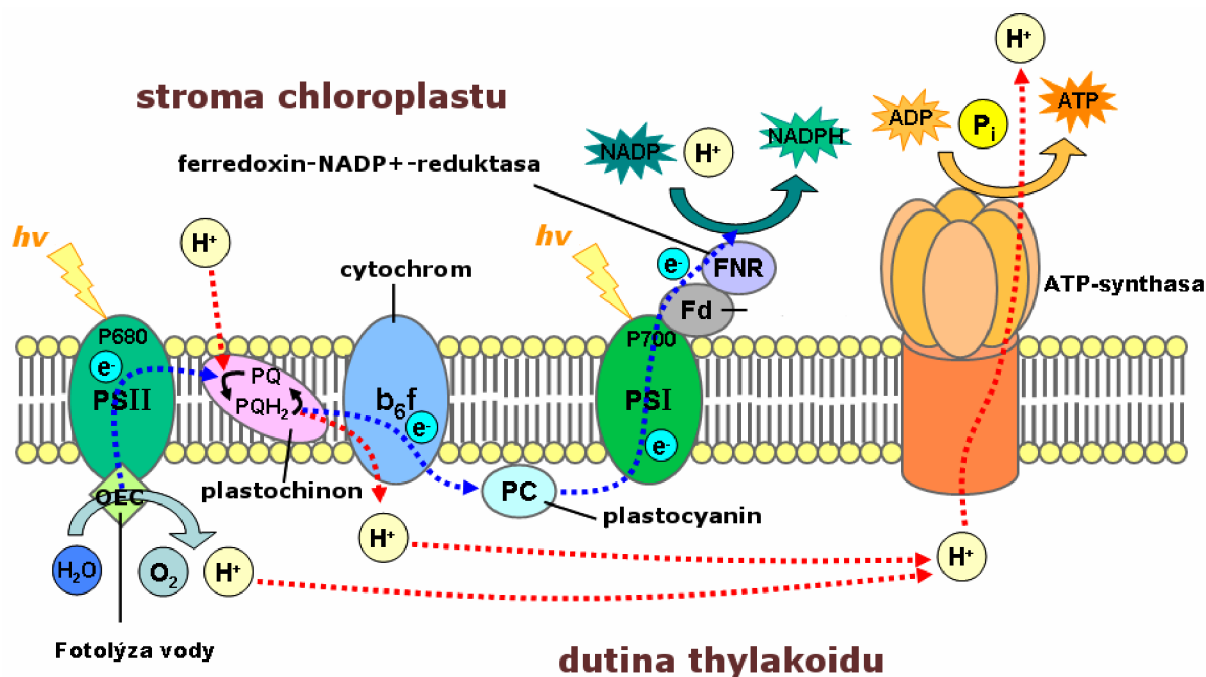


Pro elektrony pocházející z excitovaného centra P₇₀₀^{*} existuje ještě druhá alternativa - cyklická fotofosforylace. Je mnohem kratší, není spojená s fotosystémem II, s fotolýzou vody a nevzniká při ní NADPH. Excitované elektrony jsou převáděny přes systém oxidoreduktas fotosystému I zpět na molekulu chlorofylu do reakčního centra, která se tím regeneruje zpět do základního stavu. Tato alternativa probíhá, když je poměr NADPH k NADP⁺ v buňce vysoký, takže není potřeba produkovat další redukovaadlo [3].

2.1.2.4 Transport elektronů a výroba ATP

Při procesech, probíhajících ve fotosystému I a II, dochází k nahromadění velkého množství vodíkových iontů v lumen tylakoidu. Při probíhající fotosyntéze je koncentrace H⁺ v lumen tisíckrát vyšší než ve stromatu [5]. Energie tohoto protonového gradientu je využita k tvorbě ATP pomocí ATP-syntetasy, což je enzymový komplex složený ze dvou základních složek CF₁ a CF₀ a je součástí tylakoidní membrány. Tvoří kanál pro prostup protonů přes tylakoidní membránu.





Obr. 2.4 Fotosyntéza – reakce závislé na světle. Převzato z [7].

2.1.3 Reakce nezávislé na světle

Na výše popsané procesy v tylakoidních membránách navazuje vlastní asimilace CO₂ do organických sloučenin. Přesněji jde o biosyntézu sacharidů z CO₂ za pomoci redukčního činidla NADPH a energie ATP. K tomu slouží celý komplex biochemických reakcí probíhající tentokrát ve stromatu chloroplastu a v cytosolu. Reakce jsou spojeny do uzavřeného cyklu, který se souhrnně označuje hexosafosfátový – pentosafosfátový cyklus, nebo také podle objevitele Calvinův cyklus. Tento proces nepotřebuje světelnou energii a probíhá, dokud se nevyčerpají zásoby ATP a NADPH.

2.1.3.1 Calvinův cyklus

Tento cyklický děj lze rozdělit na tři etapy:

1. Karboxylace – fixace oxidu uhličitého v organické podobě
2. Redukce aktivovaného oxidu uhličitého
3. Regenerace akceptoru oxidu uhličitého

Fixace CO₂ slouží k převedení nereaktivní, energeticky chudé molekuly oxidu uhličitého na aktivní redukovatelnou formu. Dojde k jeho napojení na cukerný fosfát ribulosa-1,5-bisfosfát, který přejde na nestabilní šestiuhlíkatý meziprodukt. Prvním stálým produktem této reakce jsou dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Tato část cyklu probíhá bez dodání energie. V této fázi hraje důležitou roli enzym Rubisco, který katalyzuje inkorporaci oxidu uhličitého do ribulosa-1,5-bisfosfátu.

V druhé, redukční fázi, se na 3-fosfoglycerát váže další fosfátová skupina, pocházející z hydrolýzy ATP. Vzniká tak 1,3-bisfosfoglycerát, který se pomocí NADPH redukuje na glyceralddehyd-3-fosfát. Z něho pak izomerací vzniká dihydroxyacetonfosfát. Při fixaci oxidu uhličitého vznikají dvě molekuly 3-fosfoglycerátu, na jejich redukci jsou tedy potřeba dvě molekuly ATP a dvě molekuly NADPH.

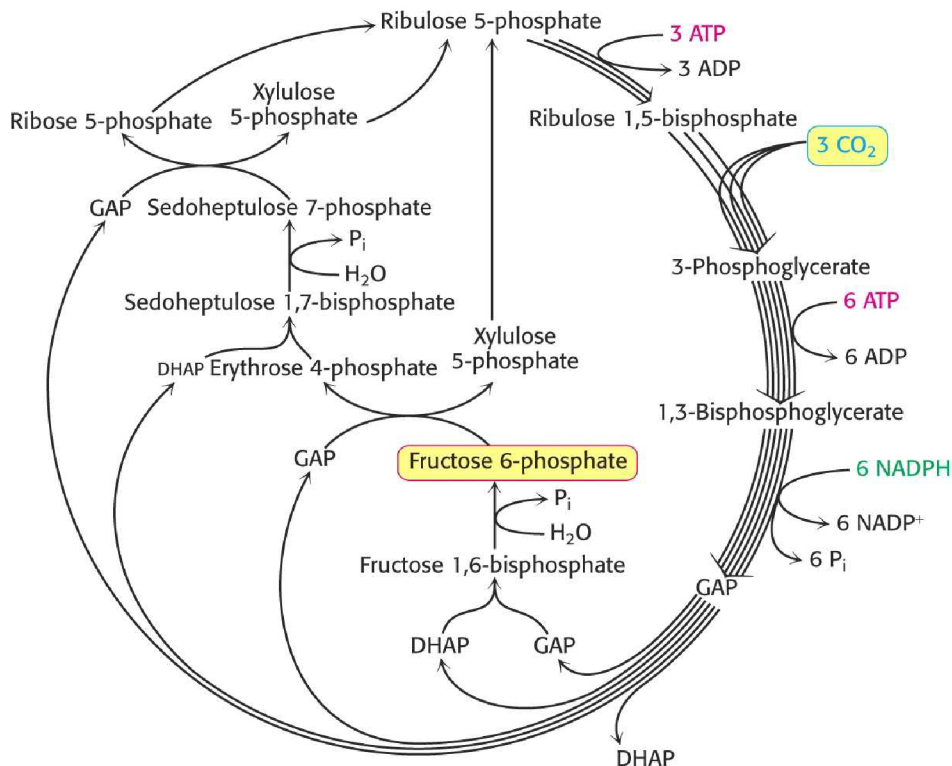
Část vzniklých trios přechází přes vnější chloroplastovou membránu do cytosolu, kde se aldolovou kondenzací přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát a po odštěpení fosforylové skupiny

a izomeraci na glukosa-6-fosfát. Z glukosy pak vznikají rezervní sacharidy, sacharosa a škrob. Část triosafosfátu se využívá na tvorbu lipidů a aminokyselin nezbytných pro růst rostlin.

Třetí fáze uzavírá Calvinův cyklus. Dochází zde k procesu regenerace ribulosa-5-fosfátu, který zahrnuje řadu reakcí vzájemných přeměn cukrů – transglykosylačních reakcí zbývajících trios. Regenerace pentos v Calvinově cyklu je obráceným sledem reakcí probíhajících v regenerační fázi pentosového cyklu.

Během jednoho cyklu vzniká z pentosy hexosa a spotřebuje se jeden atom uhlíku asimilovatelného oxidu uhličitého. Aby se z molekuly CO_2 vytvořila hexosa, musí cyklus proběhnout šestkrát. Při tom se regeneruje šest molekul ribulosa-5-fosfátu.

Výše popsaný proces fixace oxidu uhličitého využívá většina rostlin a řas. Označují se jako C_3 -rostliny, protože prvním stabilním produktem asimilace je tříuhlíkatá sloučenina 3-fosfoglycerát. Tropicke a subtropicke rostliny jsou schopné CO_2 fixovat odlišným způsobem. Primárním akceptorem oxidu uhličitého je fosfoenolpyruvát a prvním stabilním meziproduktem je čtyřuhlíkatá sloučenina oxalacetát. Jedná se tedy o C_4 rostliny. Je znám ještě další typ asimilace označovaný CAM. Při tomto typu asimilace se uplatňují C_3 i C_4 -karboxylační systémy. Mezi CAM-rostliny se řadí rostliny z čeledi tučnolistých [2,3].



Obr. 2.5 Schéma Calvinova cyklu. Počet čar v jednotlivých šípkách udává, kolik molekul musí v daném kroku reagovat, aby proběhla jedna úplná otočka cyklu, která ze tří molekul CO_2 vytvoří jednu molekulu glyceraldehdfosfátu (GAP). Glyceraldehdfosfát přechází izomerací na dihydroxyacetonfosfát (DHAP). Převzato z [8].

2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa

Rubisco, neboli ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa je nejdůležitější enzym na Zemi. Katalyzuje první krok fotosyntetické asimilace oxidu uhličitého a fotorespirační

oxidaci uhlíku. Jako vstupní bod oxidu uhličitého do biosféry je Rubisco ústředním enzymem pro zachování života na Zemi.

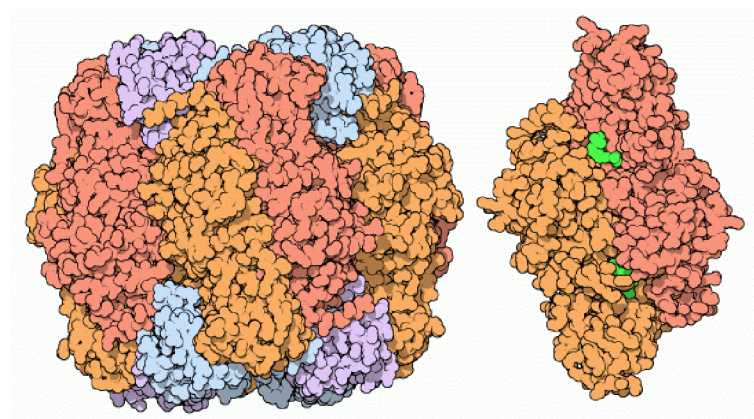
Enzym Rubisco je známý svou velmi nízkou katalytickou rychlostí, nízkou afinitou k atmosférickému CO₂ a využíváním kyslíku jako alternativního substrátu pro kompetitivní proces fotorespirace. Z těchto důvodů je považován za jeden z nejméně účinných enzymů fixujících CO₂ [9]. Jeho katalytická konstanta je $k_{kat} = 2-12s^{-1}$ [11]. Neúčinnost je pravděpodobně kompenzována jeho vysokým obsahem v rostlinách, tvoří asi 50 % rozpustných proteinů v zelených listech [10].

2.2.1 Historie

První zmínky o enzymu Rubisco sahají k roku 1947, kdy Wildman a Bonner [12] pomocí elektroforetického stanovení objevili v listovém extraktu protein, který u některých rostlin tvořil až polovinu celkové hmotnosti listů. Pojmenovali jej Frakce I. Teprve další studie provedené později prokázaly, že protein Frakce I vykazuje katalytickou aktivitu a katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu za vzniku dvou molekul 3-fosfoglycerátu. Tyto studie provedli Weissbach et al. [13], Calvin a Massini [14] a Quayle et al. [15]. Protein Frakce I tak získal název ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa. Další katalytická aktivita enzymu byla objevena v šedesátých letech ve studiích [16], [17] a [18]. Bylo zjištěno, že ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa katalyzuje nejen karboxylaci RuBP, ale také její oxygenaci, která vede k tvorbě molekul fosfoglycerátu a fosfoglykolátu. Název byl tedy změněn na dnešní podobu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa.

2.2.2 Struktura

V přírodě se vyskytuje několik strukturních forem enzymu, z nichž nejvýznamnější je forma I a forma II (Obr. 2.6).



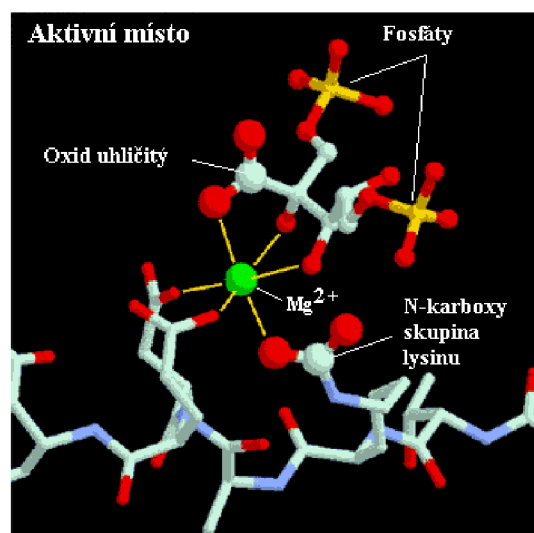
Obr. 2.6 Struktura Rubisco – forma I a forma II. Převzato z [24].

Forma I (na obrázku vlevo) se skládá z osmi velkých podjednotek, značených oranžovou a červenou barvou a z osmi malých podjednotek, označených modře a fialově. Forma II (na obrázku vpravo) se skládá ze dvou podjednotek.

Forma I představuje hexadekamer L₈S₈. Převážně se vyskytuje u autotrofních rostlin (zelené řasy, vyšší rostliny). Jeho relativní molekulová hmotnost je přibližně 560 kDa, díky níž se řadí k největším enzymům. Má globulární strukturu a skládá se z osmi velkých a osmi malých podjednotek. Velká podjednotka (L, 55 kDa) je kódována chloroplastovými *rbcL*

geny a je syntetizována přímo v chloroplastu [9,4]. Obsahuje dvě hlavní domény – malou N-terminální doménu a velkou C-terminální doménu. Malá N-doména je složena z pěti úseků s β -strukturou a dvěma úseky α -helix a vytváří tzv. α - β tunely. Velká C-doména má soudkovitý tvar a skládá se z osmi β/α struktur [10]. Malá podjednotka (S, 15 kDa) je kódovaná jadernými *rbcS* geny a je syntetizována v cytosolu. Po posttranslačních úpravách obou podjednotek, které probíhají za pomoci chaperonů, jsou S-podjednotky dopraveny z cytosolu do chloroplastu a s L-podjednotkami vytváří holoenzym [4, 9].

Aktivní místo (Obr. 2.7) se nachází na rozhraní N-terminální a C-terminální domény dvou velkých podjednotek. Z tohoto důvodu nemůže mít samotná podjednotka katalytickou aktivitu [10].



Obr. 2.7 Aktivní místo enzymu Rubisco. Převzato z [25].

Fosfáty jsou součástí molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu, molekula CO_2 na C_2 ribulosa-1,5-bisfosfátu je substrát, molekula CO_2 na ϵ -aminoskupině lysinu má funkci aktivátoru.

Forma II je složena z dimeru velkých podjednotek L_2 , které jsou z 30% podobné L podjednotkám formy I. Tato forma se nachází u některých prokaryot a obrněnek a její relativní molekulová hmotnost je 110 kDa [4, 10].

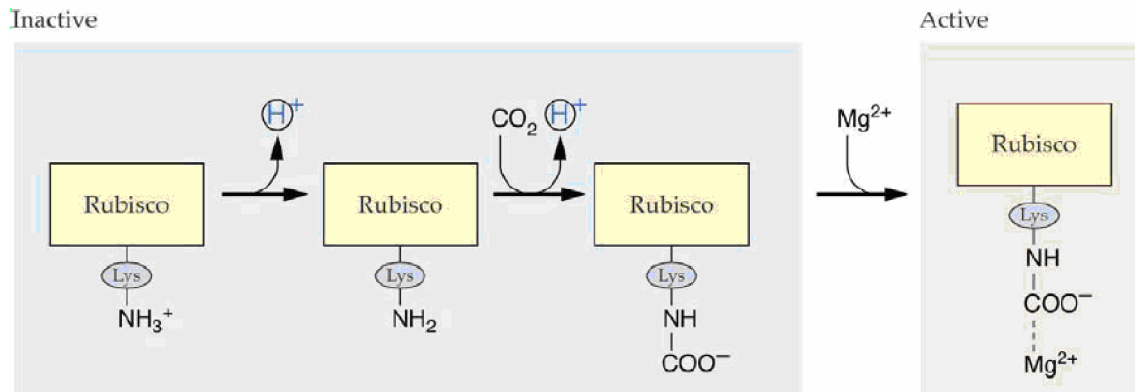
2.2.3 Aktivace

Aby mohl enzym Rubisco vykonávat svou funkci, tedy katalyzovat karboxylaci nebo oxygenaci ribulosa-1,5-bisfosfátu, je nutné aktivovat jeho katalytické místo. Aktivace může probíhat spontánně nebo pomocí aktivas.

2.2.3.1 Spontánní aktivace

Součástí spontánní aktivace je reverzibilní karbamylace. Ta je zahájena vazbou oxidu uhličitého na ϵ -aminoskupinu lysinu 201, nacházejícího se na velké podjednotce enzymu Rubisco (Obr. 2.8). Na vzniklý karbamát se váže koordinační vazbou bivalentní kovový ion Mg^{2+} , který molekulu karbamátu stabilizuje. Aktivní místo je schopno přeměnit molekulu substrátu na produkty pouze tehdy, je-li karbamát stabilizován kovovým iontem. Karbamylace je pomalý proces určující rychlost aktivace [20]. Navázaný CO_2 při aktivaci je

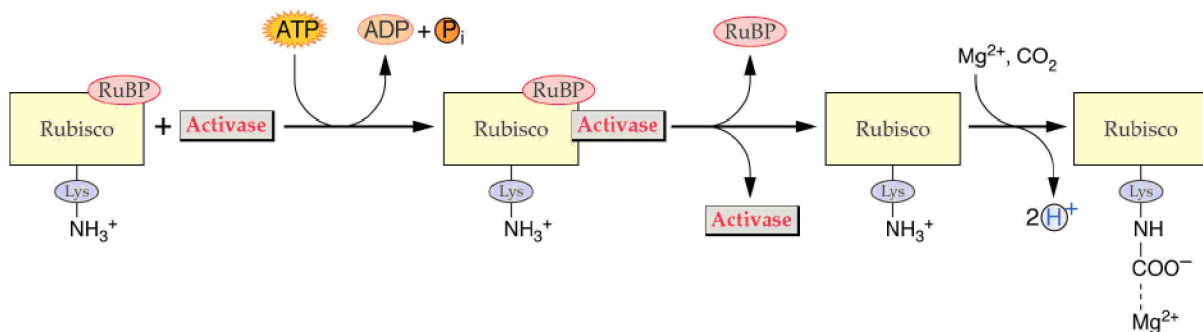
odlišný od CO_2 , který je fixován během karboxylace [21]. Enzym Rubisco je zcela aktivován za dostatečného osvětlení a vyšší koncentrace oxidu uhličitého [11].



Obr. 2.8 Spontánní aktivace Rubisco. Převzato z [26].

2.2.3.2 Aktivace pomocí aktivasy

Spontánní aktivace Rubisco *in vivo* není možná, protože koncentrace oxidu uhličitého a iontů Mg^{2+} ve stromatu chloroplastů není dostačující. Aby mohl být Rubisco plně karbamylován *in vivo*, je potřeba, aby byl přítomný další protein. Tento protein byl poprvé identifikován u mutantů *Arabidopsis thaliana* a byl nazván aktivasa Rubisco [10]. Aktivasa je kódována jaderným genomem a patří do skupiny chloroplastových proteinů. Její hlavní funkcí je usnadnění aktivace Rubisco při fyziologických koncentracích oxidu uhličitého. Aby aktivasa konala svou úlohu, musí přejít z neaktivní formy na aktivní. To se děje pomocí hydrolýzy ATP. Aktivovaná aktivasa se poté naváže na Rubisco, dojde ke změně polohy fosfátových zbytků a Rubisco se stává aktivní (Obr. 2.9). Aktivasa je převedena na neaktivní formu a celý děj se opakuje. Pro aktivasu je také důležitá přítomnost RuBP a 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfátu, což je noční inhibitor [10, 11].



Obr. 2.9 Aktivace pomocí aktivasy. Převzato z [26].

2.2.3.3 Vliv inhibitorů

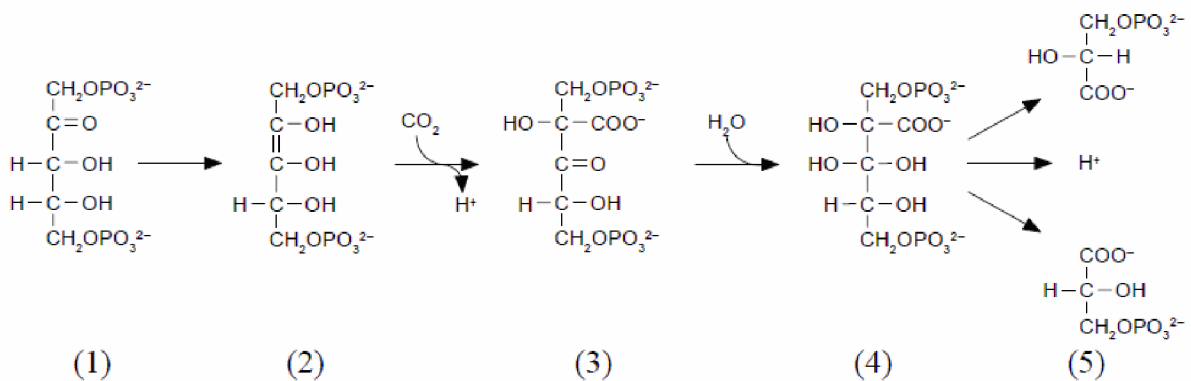
Inhibitory mohou blokovat aktivní místo enzymu Rubisco a nelze je odstranit aktivací *in vitro*. Mezi tyto inhibitory patří 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát (CA1P), D-xylulosa-1,5-bisfosfát (XuBP) a 3-keto-D-arabinitol-1,5-bisfosfát (3-KABP).

CA1P patří mezi inhibitory vyskytující se při malém ozáření a v noci. Váže se nevratně na karbamylované aktivní místo a tím dojde k zastavení katalýzy. Je velmi podobný 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Liší se od něj nepřítomností fosfátové skupiny na C₅ uhlíku.

XuBP a 3-KABP patří mezi denní inhibitory a jsou to analogy ribulosa-1,5-bisfosfátu (RuBP). D-xylulosa-1,5-bisfosfát je epimer RuBP a 3-keto-D-arabinitol-1,5-bisfosfát je ketoisomer. Oba se mohou tvořit v listech za určitých podmínek [17, 22, 23].

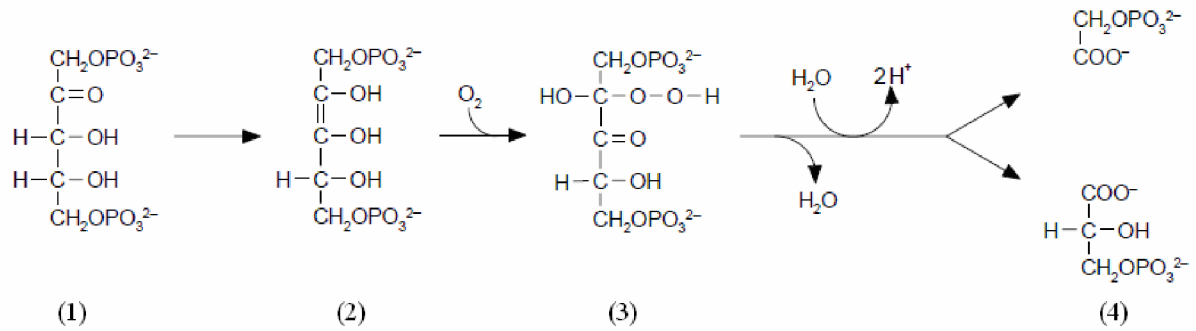
2.2.4 Karboxylace a oxygenace

Aktivovaný enzym katalyzuje buď karboxylaci nebo oxygenaci ribulosa-1,5-bisfosfátu. Karboxylace probíhá v pěti krocích (Obr. 2.10). Nejdříve dochází k navázání ribulosa-1,5-bisfosfátu na lysin enzymu (1) a dochází k deprotonaci molekuly RuBP za vzniku 2,3-endiolu (2). K tomuto meziproductu váže Rubisco oxid uhličitý za vzniku šestiuhlíkatého meziproductu 3-keto-2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu, který je nestabilní (3). Na něj se naváže OH⁻ z vody (4) a produkt se rozpadá na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu (5) [19, 27].



Obr. 2.10 Průběh karboxylace ribulosa-1,5-bisfosfátu. Převzato z [27].

Rubisco může vázat na stejný substrát, tj. ribulosa-1,5-bisfosfát, i kyslík (Obr. 2.11). Tento proces se nazývá fotorespirace a jeho začátek je stejný jako u karboxylace. Nejdříve dojde k deprotonaci ribulosa-1,5-bisfosfátu, vzniká enolický meziproduct (2) a na ten váže Rubisco molekulu kyslíku. Vzniká 3-keto-2-peroxyarabinitol-1,5-bisfosfát (3) a po hydrolýze (4) vzniká fosfoglykolát a fosfoglycerát (5). Dále se z fosfoglykolátu odštěpuje fosfátová skupina a vzniká glykolát, který je transportován z chloroplastu do peroxisomů. Tam dochází k jeho oxidaci na glyoxylát a procesem transaminace vzniká glycin. Tento děj probíhá v peroxisomu. Na tyto reakce pak navazují děje v mitochondriích – ze dvou molekul glycinu vzniká jedna molekula serinu. Při této reakci se uvolní jedna molekula oxidu uhličitého a amoniaku. Serin poté může být využíván k syntéze dalších aminokyselin a bílkovin, a nebo může být transportován zpět do peroxisomů, kde transaminací a redukcí vzniká glycerát. Ten se pak v chloroplastech pomocí jedné molekuly ATP fosforyluje na 3-fosfoglycerát, který může být využit k regeneraci původního substrátu, ribulosa-1,5-bisfosfátu. Tím se uzavírá celý cyklus [19].

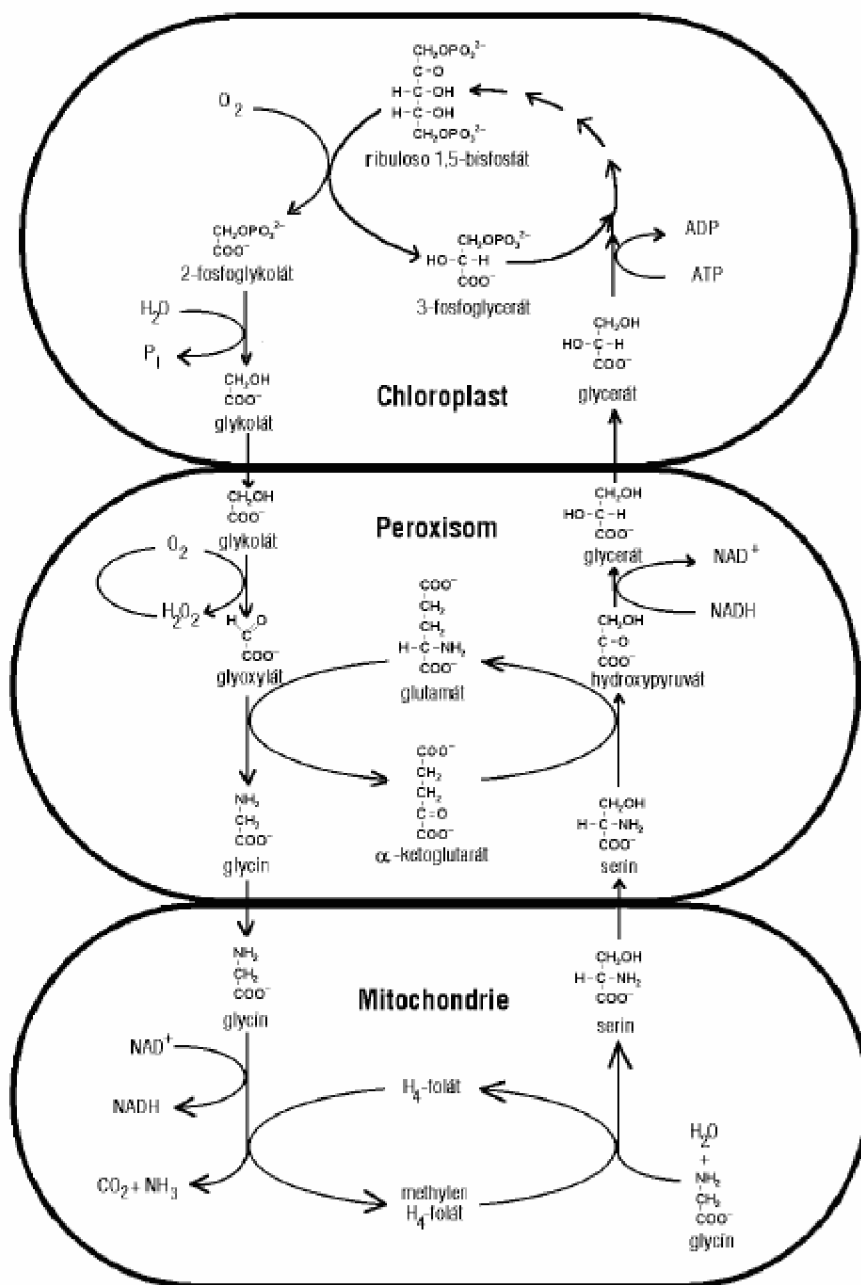


Obr. 2.11 Oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu. Převzato z [27].

Schopnost enzymu Rubisco přenášet CO_2 i O_2 na tentýž substrát, má obvykle za následek významné snížení fotosyntetické fixace oxidu uhličitého. Poměr mezi oxygenační a karboxylační aktivitou enzymu závisí především na poměru mezi koncentrací obou plynů v atmosféře. Za normálního složení atmosféry (tj. 21 % obj. O_2 a 0,035 % obj. CO_2) je poměr rychlosti karboxylace a oxygenace 2 : 1 až 3 : 1. Znamená to tedy, že jedna čtvrtina primárního substrátu využitelného v Calvinově cyklu podléhá fotorespiračním procesům a tedy i ztrátám uhlíku a energie.

Při zvyšování teploty listu dochází k poklesu poměru CO_2 a O_2 v chloroplastech, protože oxid uhličitý je ve vodě za vyšších teplot méně rozpustný než kyslík. Důsledkem menší rozpustnosti CO_2 je pak zvýšení oxygenace a tím i fotorespiračních ztrát.

I když má oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu negativní vliv na celkovou efektivitu fixace CO_2 , pro celkový metabolismus je tento proces velmi důležitý. Fotorespirace je prospěšná při odvádění přebytků ATP a redukčního potenciálu při silném záření a nedostatku CO_2 a také se touto cestou se syntetizuje nejvíce glycinu a serinu [3].



Obr. 2.12 Znárodnění fotorespiračního cyklu. Reakce probíhají ve třech organelách fotosyntetizující buňky. Převezto z [27].

2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO₂

Zvýšená koncentrace CO₂ v atmosféře se projevuje změnami rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, vodivosti průduchů a mitochondriální respirace. Kromě těchto přímých účinků působí zvýšená koncentrace CO₂ na rostliny také nepřímým způsobem tím, že zvyšuje teplotu, mění dostupnost minerálních látek a vody.

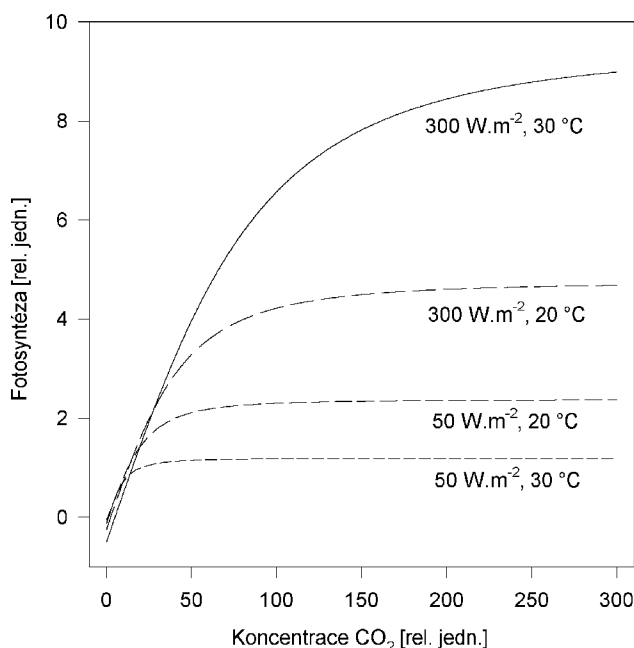
Významné jsou také interakce mezi uvedenými procesy. Například snížení obsahu dusíku vede ke změně dýchání. Pokles vodivosti průduchů zlepšuje vodní bilanci rostlin a může oddálit nebo zabránit vzniku vodní nedostatečnosti v poledních hodinách. Pokles rychlosti transpirace rostlin a zvýšená účinnost využití vody mění její obsah v půdě. Mění se i energetická bilance listů - snižuje se výdej energie transpirací a naopak se zvyšuje výdej

tepla vedením do okolního vzduchu, což může být příčinou vzrůstu teploty nad kontinenty [28].

Velké rozdíly v různých parametrech rostlin, které byly pěstovány při odlišné koncentraci CO_2 popsali ve své práci Griffin et al. [29].

2.3.1 Rychlost fotosyntézy

Při krátkodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého dojde ke vzrůstu rychlosti fotosyntézy. Po dlouhodobé kultivaci ve stejných podmínkách se však velmi často rychlost fotosyntézy sníží a dojde i k poklesu množství a aktivity enzymu Rubisco. Tento jev, který se označuje jako aklimace, lze pozorovat i u dalších enzymů Calvinova cylu. Obecně lze aklimaci definovat jako soubor fyziologických změn vznikajících při dlouhodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 . Nejnápadněji se aklimace projevuje postupným poklesem rychlosti čisté fotosyntézy. Tento jev byl mnohokrát pozorován a popsán. Demmers-Derks et al. [30] pozorovali pokles rychlosti fotosyntézy u rostlin kultivovaných ve zvýšené koncentraci CO_2 . Popsali také pokles obsahu a aktivity Rubisco a dalších enzymů. Marek et al. [31] prokázali, že po přechodném zvýšení rychlosti fotosyntézy dochází po dlouhodobé kultivaci v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 , k poklesu rychlosti fotosyntézy a obsahu chlorofylů.



Obr. 2.13 Závislost fotosyntézy na koncentraci oxidu uhličitého. Převzato z [27].

Redukci aktivity fotosyntetického aparátu vysvětlili ve své práci Oosten a Besford [32] tak, že při kultivaci rostlin v normální atmosféře CO_2 rychlost tvorby asimilátů odpovídá kapacitě transportních drah, kdežto při kultivaci ve zvýšené koncentraci oxidu uhličitého rychlost tvorby asimilátů převyšuje schopnost jejich transportu. To vede k hromadění sacharosy v cytosolu, která je po transportu do vakuoly invertázou rozštěpena na hexosy glukosu a fruktosu. Ty jsou pak zpětně transportovány do cytosolu, kde se jejich koncentrace zvyšuje a způsobují represí exprese fotosyntetických genů. Při dvojnásobném zvýšení stávající koncentrace CO_2 stačí pouze 65 % Rubisco pro zachování příslušné rychlosti karboxylace [28, 33].

2.3.2 Rychlost fotorespirace

Fotorespirace je zcela inhibována snížením koncentrace O_2 na 5 % a méně, a nebo dvojnásobným zvýšením koncentrace CO_2 . Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého působí dvojnásobným způsobem:

- zvyšuje rychlost karboxylace, a tedy fotosyntézy,
- zvyšuje hodnotu poměru koncentrací CO_2/O_2 , a tím snižuje fotorespiraci, tedy ztráty CO_2 , což vede opět ke zvýšení rychlosti fotosyntézy [28].

2.3.3 Vodivost průduchů

Změna koncentrace CO_2 v okolí listu ovlivňuje míru otevřenosti průduchů, která zase přizpůsobuje jejich vodivost. Reakce průduchů na změny koncentrace CO_2 nejsou však zcela prokázány.

Obecně lze říci, že zvýšená koncentrace CO_2 vyvolává u většiny rostlin přivření průduchů. Tuto skutečnost prokázali Drake et al. [33] ve své práci. Zjistili, že průměrné snížení vodivosti průduchů při zdvojnásobení atmosférické koncentrace činí 20 %.

Pokles vodivosti způsobený zvýšením koncentrace CO_2 v okolí listů však nemusí vést ke snížení rychlosti fotosyntézy. Současně se totiž zvyšuje gradient koncentrace oxidu uhličitého mezi okolní atmosférou a místem karboxylace, což fotosyntézu stimuluje.

Se snížením vodivosti průduchů je spojen pokles rychlosti transpirace. Tím dochází k modifikaci jednotlivých složek energetické bilance listu, což se projevuje i ve změně jejich teploty. Idso et al. [34] zjistili, že vzestup teploty listu je přímo úměrný poklesu vodivosti průduchů.

Aklimace vodivosti průduchů během dlouhodobé kultivace rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 však nebyla prokázána. Je jí pouze přisuzován pokles hustoty průduchů na listech. S tímto projevem se můžeme setkat v práci Knappa et al. [35]. Woodward a Kelly [36] shrnuli výsledky 122 prací a zjistili, že aklimace byla prokázána u 74 % rostlinných druhů a průměrné snížení hustoty průduchů bylo 14,3 %. Domnívají se, že snížení frekvence průduchů je tím větší, čím je samotná hodnota frekvence průduchů při obvyklé koncentraci oxidu uhličitého vyšší.

2.3.4 Rychlost dýchání

Vliv oxidu uhličitého na rychlost mitochondriálního dýchání může být buď přímý, při krátkodobé expozici zvýšené koncentraci CO_2 , a nebo nepřímý, při dlouhodobé kultivaci rostlin. Přímý vliv se projevuje poklesem rychlosti dýchání, kdežto nepřímý vliv není zcela jednoznačně prokázán.

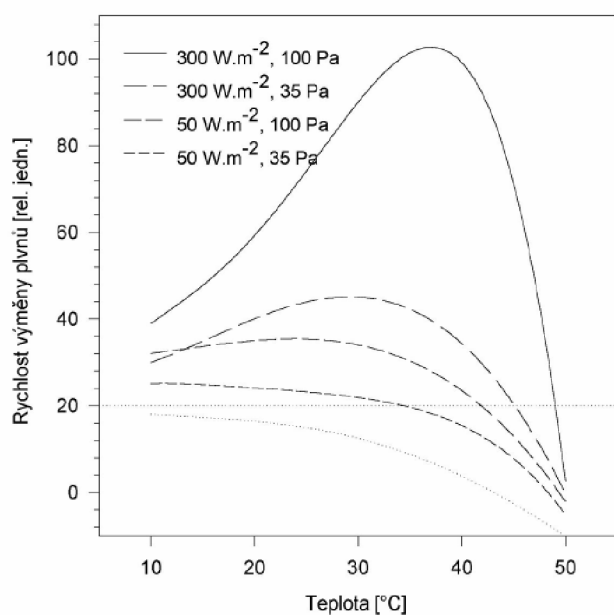
Dosavadní publikace nejsou v názoru na vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na rychlost dýchání jednotné. Nejnovější publikace se kloní k přesvědčení, že dýchání je vyššími koncentracemi oxidu uhličitého inhibováno. Tuto skutečnost prokázali Drake et al., kdy při zdvojnásobení koncentrace CO_2 došlo k poklesu rychlosti dýchání o 15 % až 18 % [33]. V podobném smyslu vyznívají i pokusy McDowella et al. [37], Kohen et al. [38] a Idsoa a Kimballa [39]. Naproti tomu den Hertog et al. [40] a Amthor [41] zjistili pozitivní vliv na rychlost dýchání.

Jednu z mála prací prokazujících přímý vliv zvýšené koncentrace CO_2 na dýchání rostlin uveřejnili Gonzáles-Meler et al. [42]. Ti prokázali, že zdvojnásobení koncentrace oxidu uhličitého snížilo rychlost příjmu kyslíku mitochondriemi o 10 % až 15 %.

2.3.5 Teplota

Při současné změně teploty má působení koncentrace oxidu uhličitého v metabolismu rostliny několik styčných bodů.

- Mění se energetická bilance listu nebo porostu. Zvýšená koncentrace CO_2 snižuje vodivost průduchů, tím klesá rychlost transpirace a zvyšuje se teplota rostliny. Pokud paralelně dochází ke vzrůstu teploty v okolí, je tímto působením účinek zvýšené koncentrace CO_2 zesílen, nebo naopak při paralelním poklesu teploty může být účinek oxidu uhličitého anulován.
- Je ovlivněná bilance příjmu a výdeje CO_2 rostlinou. Se zvyšující se teplotou rychlost fotosyntézy stoupá. Avšak při vyšších teplotách jsou tyto přírůstky malé, vytvoří se maximum a nakonec začne rychlost fotosyntézy klesat. Rychlost fotosyntézy se snižuje při teplotách, kdy ještě nedochází k poškození fotosyntetického aparátu. Na rychlost fotosyntézy má také vliv doba expozice vysoké teploty a koncentrace CO_2 (Obr. 2.14).
- Teplota má silný vliv na rychlost dýchání. Její změna bývá podstatně větší než změna rychlosti fotosyntézy v příslušném teplotním rozmezí. Se zvýšením teploty klesá poměr rychlosti fotosyntézy k rychlosti dýchání [28].



Obr. 2.14 Závislost rychlosti fotosyntézy na teplotě při různém ozáření a různé koncentraci CO_2 . Přezato z [27].

2.3.6 Minerální výživa

Minerální živiny tvoří nezbytnou součást fotosyntetických struktur a enzymů a existuje vzájemný vztah mezi nimi a fotosyntézou. Rychlost fotosyntézy podmiňuje v určité míře příjem minerálních živin a dostupnost minerálních živin naopak rozhoduje o její rychlosti.

Určitý vztah lze pozorovat i mezi minerálními živinami v rostlině a zvýšenou koncentrací CO_2 . Právě dostupnost minerálních živin má vliv na velikost působení zvýšené koncentrace CO_2 na fotosyntézu a produkci rostlin a naopak účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého ovlivňuje obsah živin.

2.3.6.1 Dusík

Mimořádné postavení mezi biogenními živinami zaujímá dusík. Je přítomen ve všech bílkovinách, tedy i enzymech a vyskytuje se v rostlinách ze všech minerálních živin v největším množství (1,5 % až 6 % sušiny) [28].

Při kultivaci rostlin v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ omezuje nedostatečné množství dusíku produkci sušiny a může vést k urychlenému rozkladu enzymů, zejména pak enzymu Rubisco. Tento enzym představuje největší podíl ze všech enzymů nacházejících se v listech a je v něm obsažena podstatná část veškerého listového dusíku. Zvýšení koncentrace CO₂, které umožňuje vyšší rychlost fixace CO₂, bude vyžadovat menší množství enzymu Rubisco, a tedy i menší množství dusíku. Účinnost jeho využití může být definovaná dvěma způsoby. Buď jako rychlost fotosyntézy vztahovaná na obsah dusíku v listech, nebo jako obsah sušiny rostliny vztahované na celkový obsah dusíku. Zvýšení koncentrace CO₂ vede k poklesu obsahu dusíku v listech o 15 až 20 %, což je dáno poklesem obsahu fotosyntetických bílkovin [28, 43].

2.3.7 Složení sušiny

Jeden z charakteristických důsledků pěstování rostlin při zvýšené koncentraci CO₂ je vyšší hodnota poměru C/N jejich sušiny. Rozdílů ve složení sušiny je však mnohem více. V této souvislosti jsou důležité výsledky Poortera et al. [44], kteří sledovali chemické složení rostlin pěstovaných při okolní a zvýšené koncentraci oxidu uhličitého. Největší vyvolaná změna spočívala ve zvýšení obsahu celkových nestrukturních sacharidů. K malému poklesu došlo u obsahu organických sloučenin dusíku a minerálních látek, beze změny zůstaly strukturní sacharidy, lignin a lipidy (tab. 1) [28].

Tabulka 1. Obsah [mg g⁻¹ sušiny] látek rostlin pěstovaných při obvyklé a zvýšené koncentraci CO₂ uvedené Poortere et al. [44]. Převzato z [28].

Látka	Koncentrace [$\mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$]	
	350	700
Nestrukturní sacharidy	137	211
Lignin	40	40
Lipidy	57	53
Organické kyseliny	74	68
Strukturní sacharidy	142	132
Minerální látky	91	75
Proteiny	270	219
Nerozpustné cukry	104	161
Rozpustné cukry	31	46
Celkový obsah C	432	434
Obsah NO ³⁻	18	14
Celkový obsah N	48	38
Poměr C/N	9,2	11,8

2.3.8 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na dřeviny

Přes velké množství prováděných pokusů sledujících vliv zvýšení koncentrace CO₂ na polní plodiny dlouho chyběly obdobné údaje pro lesní porosty. Tento fakt byl způsoben náročností měření. Jestliže několikaměsíční měření u bylin postihlo celou jejich dobu vegetace, tak pro většinu stromů by odpovídající pokus trval desetiletí. S technickým rozvojem nejrůznějších měřících systémů se však situace změnila a začalo přibývat dat i u dřevin.

Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého má největší vliv na vývoj především v počátečních fázích růstu. Například Hattenschwiler et al. [45] sledovali tloušťku letokruhu dubu rostoucího v atmosféře oxidu uhličitého o koncentraci 650 $\mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Šířka letokruhů byla u těchto stromů o 12 % větší ve srovnání se stromy rostoucí ve standardní koncentraci CO₂. Tato skutečnost však byla prokázána jen u mladých stromů, u stromů ve stáří 25–30 roků se rozdíly neprojevíly.

Co se týká vodivosti průduchů, stromy na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého reagují mnohem méně než byliny. U stromu je průměrný pokles vodivosti průduchů při zdvojnásobení koncentrace odhadován na 20 %, zatímco u bylin přibližně na 40 % (Saxe et al. [46]). Relativně malé snížení vodivosti průduchů totiž může být plně nahrazeno rozvojem větší listové plochy, takže výdej vody transpirací vůbec nemusí být zvýšenou koncentrací CO₂ ovlivněn.

Specifickou otázkou je aklimace rostlin na zvýšenou koncentraci oxidu uhličitého postupným poklesem rychlosti fotosyntézy. Saxe et al. [46] tento projev aklimace u dřevin jednoznačně odmítají. Řadou pokusů dokazují, že zvýšená rychlost fotosyntézy zůstává zachována i při víceleté kultivaci stromů v atmosféře s vyšší koncentrací oxidu uhličitého. Naproti tomu existuje řada prací, které aklimaci prokazují (Roden et al. [47], Osborne et al. [48], Marek et al. [49]).

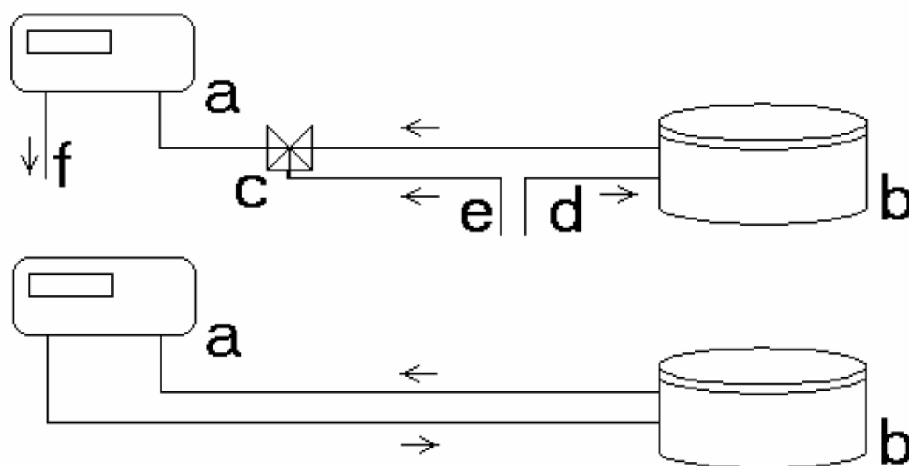
2.4 Metody stanovení aktivity Rubisco

Metody využívané ke stanovení aktivity enzymu Rubisco se dělí na přímé (*in vivo*) a nepřímé (*in vitro*). Mezi nepřímé metody se řadí gazometrické stanovení, mezi přímé metody patří stanovení radiometrické a spektrofotometrické. Hodnoty aktivit *in vivo* jsou vyšší nežli hodnoty stanovené *in vitro*. Tento rozdíl je podle Rogerse et al. [50] daný nedostatečnou extrakcí enzymu Rubisco u stanovení *in vitro* (autoři uvádějí, že po extrakci a následné centrifugaci do supernatantu přechází pouze 33 % z celkového množství Rubisco).

Aktivitu rozlišujeme na specifickou a nespecifickou. Nespecifická aktivita vyjadřuje látkové množství přeměněného CO₂ za minutu na jednotkovou hmotnost nebo plochu jehlic a udává se v [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$] nebo [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$]. Specifickou aktivitou se rozumí látkové množství asimilovaného oxidu uhličitého za minutu na jednotkovou hmotnost enzymu Rubisco. Taktéž se udává v [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$] [11].

2.4.1 Gazometrické stanovení (*in vivo*)

Gazometrické metody se využívají při měření rychlosti fotosyntézy. Zelené části rostliny můžou podléhat dvěma reakcím. Buď fotosyntetické reakci, kdy dochází k fixaci CO₂ a uvolnění O₂, nebo fotorespiraci, kdy se uvolňuje oxid uhličitý a spotřebovává se kyslík. Rychlost fotosyntézy se tedy stanovuje na základě výměny CO₂, O₂ a nebo obou plynů současně mezi okolní atmosférou a zelenou částí rostliny. Gazometrické metody jsou založeny na principu měření rychlosti spotřeby CO₂/O₂ rostlinami při fotosyntetické reakci.



Obr. 2.15 Otevřený a uzavřený systém gazometrické metody. a – IRGA, b – asimilační komora, c – přepínací trojcestný ventil, d – vstup vzduchu do komory, e – odběr vzduchu z okolí, f – výstup vzduchu z IRGA. Převzato z [55].

Princip měření je znázorněn na obrázku 2.15 nahoře. Fotosyntetizující část rostliny je umístěna do asimilační komory (b), která je vzduchotěsná, termostabilní a je v ní zajištěno proudění vzduchu. Pokles koncentrace CO_2 v okolí rostliny se měří pomocí infračerveného analyzátoru plynů (a).

Podle zapojení infračerveného analyzátoru plynů (IRGA) do měřicího systému rozlišujeme gazometrické metody uzavřené (cirkulační typ) a otevřené (průtočný typ) (Obr. 2.15) [51, 52, 53, 54].

2.4.2 Radiometrické stanovení (*in vitro*)

Principem radiometrické metody je asimilace molekuly $^{14}\text{CO}_2$ do molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu. V reakční směsi nesmí být přítomen oxid uhličitý a další uhličitany. Do reakční směsi se přidá dané množství radioaktivně značeného $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ a reakce se spustí známým množstvím aktivovaného enzymu. Po 1 minutě se reakce ukončí inaktivací Rubisco pomocí přidavku HCl a uvolněný $^{14}\text{CO}_2$ se kvantitativně odstraní. Změřená radioaktivita produktů odpovídá množství asimilovaného $^{14}\text{CO}_2$ [56].

2.4.3 Spektrofotometrické stanovení (*in vitro*)

Spektrofotometrické stanovení aktivity Rubisco je založeno na měření změny absorbance při 340 nm, ke které dochází při oxidaci NADH v prvních třech krocích Calvinova cyklu [57]. V reakční směsi jsou obsaženy enzymy a substráty, které 3-fosfoglycerát přemění na glycerinaldehyd-3-fosfát. V posledním kroku dochází k oxidaci NADH, čímž dojde k poklesu absorbance.

Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu Rubisco vychází z metody Lilleyho a Walkera [58] s extrakcí podle Besforda [59]. Tento způsob extrakce a následného spektrofotometrického stanovení aktivity enzymu Rubisco je podrobněji popsán v kapitole 3.2.1.

Další typ extrakce popisuje ve své práci Tissue et al. [60]. Tento způsob je vhodnější pro jehličnany, protože obsahují větší množství terpenů a fenolických látek. Tyto látky mohou při zmrazení v kapalném dusíku narušit strukturu enzymu Rubisco, a tím snížit jeho aktivitu.

Podstatou jejich extrakce je okamžitá homogenizace čerstvě ustřižených jehlic ve 100 mmol dm⁻³ HEPES, 5 mmol dm⁻³ EDTA s přidavkem polyvinylpolypyrrolidinu při 0 °C. Následně se extrakt centrifuguje a supernatant zamrazí v kapalném dusíku.

2.5 Metody stanovení obsahu Rubisco

2.5.1 SDS-PAGE

K nejpoužívanějším metodám pro stanovení obsahu enzymu Rubisco patří gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE) s přidavkem dodecylsírany sodného (SDS). Metoda se řadí mezi elektromigrační (elektroforetické) metody, jejichž podstatou je pohyb ionizovaných částic v elektrickém poli.

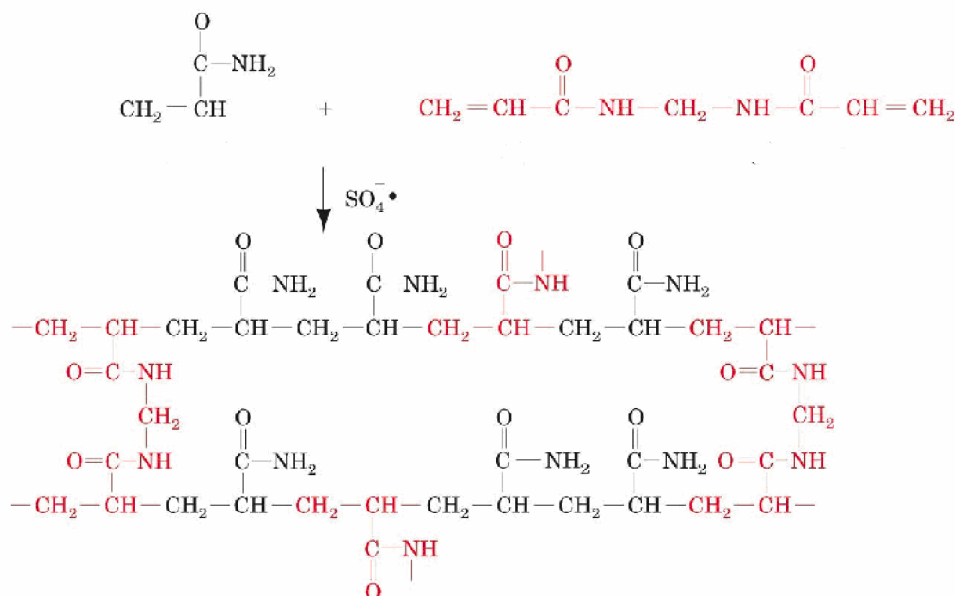
Při této metodě dochází k navázání SDS na bílkovinu, čímž jí je udělen uniformní záporný náboj a částečnou denaturací se narovná její řetězec. Velikost náboje je úměrná hmotnosti bílkoviny. Na takto vzniklé ionty působí elektrická síla F_E a odporová síla F_t

$$F_E = q \cdot E$$
$$F_t = -3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d \cdot v,$$

kde q je náboj iontu, E je síla elektrického pole, η je viskozita prostředí, d je průměr částic a v je rychlost částic. Výsledkem je rychlé ustavení rovnováhy mezi oběma silami a výsledná rychlost pohybu částic je závislá na velikosti molekuly, a tím dochází k separaci jednotlivých bílkovin.

SDS, který se váže na bílkoviny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny, udává molekulám i podobný válcovitý tvar. Přidáním SDS a 2-merkptoethanolu ke směsi se naruší nekovalentní interakce a disulfidické můstky mezi podjednotkami a lze stanovit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek [61].

Polyakrylamidový gel se připravuje kopolymerací monomerů akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu. Iniciátorem zesíťování je peroxodisíran amonný. Jeho molekuly se vlivem světla rozkládají na volné radikály, které zahájí vlastní polymeraci monomerů. Jako stabilizátor volných radikálů se do směsi přidává TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin). Stanovení obsahu enzymu Rubisco výše uvedenou metodou je podrobněji popsáno v kapitole 3.2.2.



Obr. 2.16 Struktura polyakrylamidového gelu. Převzato z [62].

Metoda SDS-PAGE pro stanovení obsahu Rubisco byla použita např. v pracích Ferreiry et al. [63], Besforda [64], Nieho et al. [65] a Hrstky et al. [66].

2.5.2 Kapilární elektroforéza

Podstatou kapilární elektroforézy je podobně jako u SDS-PAGE ustavení rovnováhy mezi odporovou a elektrickou silou působící na nabitou částici v elektrickém poli. U této metody má na složky analyzovaného materiálu vliv i elektroosmotický tok, působící ve směru pohybu částic a třecí síla, působící proti směru pohybu částic.

Elektroforéza probíhá v tenkých skleněných, křemenných nebo plastových kapilárách, které jsou naplněny elektrolytem a jejich konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem. Díky dobrému odvodu tepla může být při stanovení použito elektrické pole s vysokým napětím, čímž se zkrátí doba dělení [61, 67].

Tento způsob stanovení použil ve své práci Warren [68].

2.5.3 HPLC

HPLC, neboli vysokotlaká kapalinová chromatografie, je typ chromatografie, kde dochází k dělení složek analytu díky čerpání elučního činidla pod vysokým tlakem. Podstatou stanovení pomocí HPLC je vznik slabých vazebných interakcí mezi složkami mobilní fáze (MF), která obsahuje vzorek, a pevnou fází (SF), tvořící náplň kolony. V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech dvojice MF – SF jsou jednotlivé složky analyzovaného vzorku k pevné fázi vázány různě velkými silami. Kolonou tedy procházejí dříve ty složky analytu, které jsou poutány ke stacionární fázi menšími silami. Naopak nejdéle jsou v koloně zadržovány ty složky, které se stacionární fází reagují za vzniku pevnějších vazeb. Separované složky analytu poté putují do detektoru, který poskytuje kvantifikovanou odezvu na charakteristickou vlastnost dané složky. Odezva je přímo úměrná množství analytu v určitém rozsahu koncentrací. Výsledkem detekce jednotlivých složek analytu je soubor chromatografických píků, neboli chromatogram.

Kvalitativní charakteristika látky je poloha píku na časové ose chromatogramu, kvantitativní charakteristika je daná plochou píku pod křivkou a u symetrických zón i výškou píku [69].

Pro stanovení enzymu Rubisco se metoda HPLC používá méně často než ostatní uvedené metody. Používá se gelová kolona, kde dochází k dělení částic v závislosti na jejich velikosti. Malé molekuly analytu pronikají hlouběji do pórů gelu, proto jsou v koloně zadržovány déle, naproti tomu velké molekuly procházejí kolonou bez zadržení [70].

2.5.4 Radioimunosrážecí metoda

Podstatou metody je inkubace enzymu Rubisco v přítomnosti aktivátorů Mg^{2+} a HCO_3^- , radioaktivně značeného 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu a protilátkového séra, které má specifickou afinitu k enzymu. Výsledkem je sraženina komplexu Rubisco- ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát-protilátka, která je odstraněna filtrací přes polysulfonový filtr a zbavena nadbytečného ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu promytím. Množství enzymu je pak přímo úměrné radiaci, kterou sraženina vyzařuje. Je nutná kalibrace na standard Rubisco [71]. Tato metoda je hojně využívána [72, 73, 74].

2.5.5 ELISA

Enzyme-Linked Imunno Sorbent Assay (ELISA) patří mezi analytické metody využívané ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů, a to i ve velmi malých koncentracích protilátky a antigenu, které ještě nevytvářejí precipitát. ELISA, někdy označovaná jako EIA (enzymová imunoanalýza - Enzym Imunoassay), je založená na specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednu z těchto látek je kovalentně vázaná vhodná značka. Ke značení se využívají enzymy, nejčastěji alkalická fosfatasa a peroxidasa, které katalyzují chemickou přeměnu substrátu přítomného v reakční směsi. Konečný produkt enzymové reakce je buď barevný a stanovuje se spektrofotometricky nebo fluoreskuje a stanovuje se fluorimetricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky v analyzovaném vzorku. Toto značení umožňuje jednoduché a citlivé stanovení [61].

Tento způsob stanovení množství použili ve své práci Nassoury et al. [76] a Metodiev a Demirevska-Kepova [77].

2.6 Metody stanovení nestrukturních sacharidů

Sacharidy se stanovují řadou fyzikálních, chemických, fyzikálně-chemických a biochemických metod.

2.6.1 Polarimetrie

Polarimetrie je fyzikální metoda, která je založená na měření stočení lineárně polarizovaného světla při průchodu opticky aktivní látkou. Sacharidy díky obsahu chirálních atomů jsou opticky aktivní látky a mají tedy schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla doprava či doleva. Úhel stočení polarizovaného světla závisí nejen na charakteru látky, na vlnové délce světla a na teplotě, ale i na množství opticky aktivních látek, se kterými se paprsek polarizovaného záření setká.

$$\alpha = k \cdot l \cdot c ,$$

kde α je úhel stočení polarizovaného světla, k je konstanta úměrnosti, l tloušťka vrstvy a c je koncentrace.

Stanovení se provádí na polarimetrech, které se skládají ze zdroje monochromatického záření, polarizátoru, kyvety se vzorkem a analyzátoru [78, 79].

2.6.2 Anthronová metoda

Tato metoda je založena na reakci sacharidů s anthronem za vzniku barevného komplexu. Škrob je extrahován ze vzorku chloralhydrátem, dehydratován koncentrovanou kyselinou sírovou za vzniku kondenzačních derivátů s reakčním činidlem – anthronem. Vzniklé zelené kondenzační produkty furfural-anthrony se stanovují spektrofotometricky. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci zkoumaného sacharidu. Anthron je hojně využíván jako účinné činidlo pro kolorimetrická stanovení. Tato metoda stanovení nestrukturních sacharidů je podrobněji popsána v kapitole 3.2.3.

Tato metoda byla poprvé použita Dreywoodem [80], na kterého poté navázala řada autorů, z nichž nejznámější jsou Viles a Silverman [81], Yemm a Willis [82] a Grospietsch [83]. Jejich stanovení se však týkalo pouze škrobu. Simultánní stanovení obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu pomocí anthronové metody bylo provedeno Teslovou et al. [84].

2.6.3 HPLC

Základní princip vysokotlaké kapalinové chromatografie byl popsán v kapitole 2.5.3. Důležitým krokem při stanovení sacharidů pomocí HPLC je příprava roztoku a extraktu vzorku, který pak lze dávkovat na kolonu kapalinového chromatografu. Je potřeba z roztoku odstranit všechny složky snižující účinnost kolony a rušící stanovení. K tomu se používá celá řada předkolonek a předfiltrů, které jsou zapojeny mezi dávkovač a vlastní chromatografickou kolonu [85].

Nejběžnějším detektorem využívaným při chromatografii sacharidů je refraktometrický detektor. Pracuje jako diferenciální měřič změny indexu lomu mobilní fáze. Měří rozdíl indexu lomu mobilní fáze, která je uzavřena v referenční cele a eluentem vycházejícím z kolony [69]. Výhodou těchto detektorů je jejich univerzálnost, ale nejsou selektivní, jsou málo citlivé a nedají se využít při gradientové eluci. Mobilní fáze musí být dokonale zbavena rozpuštěných plynů, které zcela ruší detekci [85]. Aby bylo dosaženo reprodukovatelných výsledků, musí být refraktometrické detektory temperovány, protože index lomu je závislý na teplotě [69].

S metodou HPLC s refraktometrickou detekcí se setkáme u Steinbachové-Vojtíškové et al. [86], Lipavské et al. [87], Konrádové et al. [88], Cabálkové et al. [89] a Svobodové et al. [90].

2.7 Stanovení listového dusíku

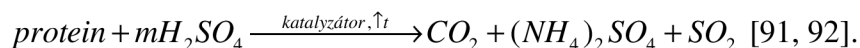
Dusík má v rostlinách mimořádné postavení díky jeho přítomnosti ve všech bílkovinách, tedy i enzymech [28]. K jeho stanovení se používá řada metod, z nichž nejvýznamnější jsou metoda podle Kjeldahla, podle Dumase a spektrofotometrické stanovení Nesslerovým činidlem.

2.7.1 Metoda podle Kjeldahla

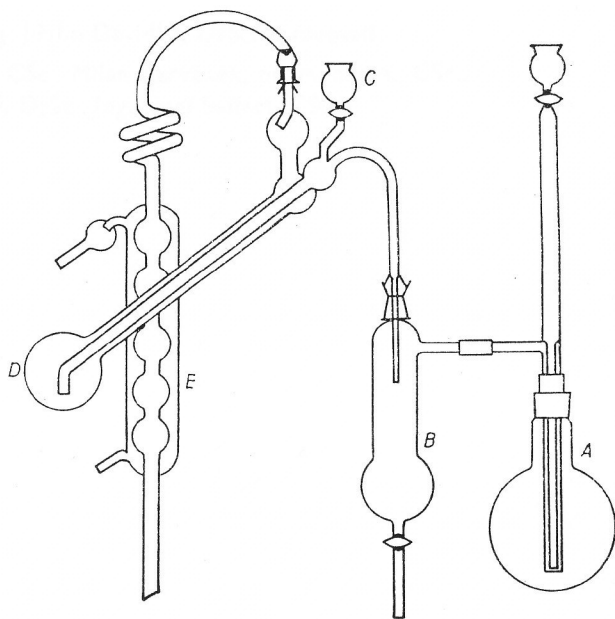
Tato metoda byla poprvé použita Kjeldahlem v roce 1883 při studování změny proteinu u obilí. Od jeho první publikace prošla metoda mnoha změnami. Jedná se o mineralizaci vzorku v koncentrované kyselině sírové v přítomnosti Weiningerova katalyzátoru. Dusíkaté

látky jsou převedeny na síran amonný, z něhož se za přídavku hydroxidu sodného uvolní amoniak. Vzniklý amoniak se pak předestiluje s vodní parou do standardizovaného roztoku kyseliny sírové a její přebytek se pak stanoví alkalimetry. Podrobněji je tato metoda popsána v kapitole 3.2.4.

Stanovení probíhá podle reakce



Stanovení dusíku podle Kjeldahla se provádí v destilačním přístroji podle Parnase-Wagnera (Obr. 2.17).



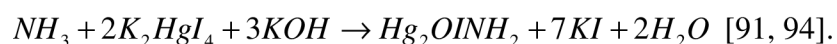
Obr. 2.17 Destilační aparatura podle Parnase-Wagnera. A – vypíječ páry, B – kondenzační baňka, C – nálevka, D – destilační baňka, E – chladič. Převzato z [92].

Moderní zařízení na stanovení dusíku Kjeldahlovou metodou se nazývají KjeltecTM Systems. Tyto přístroje zajišťují přesné, spolehlivé a bezpečné analýzy.

2.7.2 Spektrofotometrické stanovení dusíku Nesslerovým činidlem

Tato metoda převážně navazuje na Kjeldahlovo stanovení. Po mineralizaci vzorku s kyselinou sírovou jsou dusíkaté sloučeniny převedeny na amonnou sůl, která se spektrofotometricky stanoví po reakci s Nesslerovým činidlem. Amonné sloučeniny reagují v alkalickém prostředí s K_2HgI_4 za vzniku žluté až červenohnědé komplexní sloučeniny Hg_2OINH_2 . Intenzita zabarvení se pak měří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm.

Stanovení probíhá podle reakce:



Stanovení dusíku pomocí Nesslerova činidla bylo popsáno ve studii Williamse [93].

2.7.3 Metoda podle Dumase

V klasické Dumasově metodě, která byla poprvé popsána v roce 1831, je organická látka smíchána s práškovým oxidem měďnatým a je umístěna do spalovací trubice, která je naplněna drátkovým CuO a Cu. Trubice se zahřívá v proudu kyslíku. Zkoumaný vzorek se rozkládá na elementární uhlík, oxid uhličitý, vodu, elementární dusík a oxidy dusíku. Na vrstvě rozžhavené mědi se redukují oxidy dusíku na elementární dusík. Po selektivní absorpci ostatních produktů pyrolýzy je dusík stanoven tepelně vodivostním detektorem.

Dumasova metoda patří mezi stanovení přímé, tedy bez nutnosti mineralizace, což je její výhoda. Ke stanovení se používají analyzátory firmy LECO. [91, 95].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Na experimentálním pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR na Bílém Křížu v Moravskoslezských Beskydech byl sledován vliv listového dusíku na aktivitu a množství enzymu Rubisco. Osmileté sazenice smrku ztepilého (*Picea abies* L.) byly kultivovány ve skleněných kopulích s nastavitelnými okny [96] v podmínkách s normální ($A = 385 \mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) a zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého ($E = 700 \mu\text{molCO}_2 \text{ mol}^{-1}$) (Obr. 3.1). Sazenice byly výše definovaným podmínkám vystaveny tři vegetační období.

Slunné jehlice vyrostlé v roce 2010 byly odebrány ve čtyřech termínech, a to 22. 6. 2010, 22. 7. 2010, 26. 8. 2010 a 29. 9. 2010. Jehlice byly promíchány a z tohoto směšného vzorku byly navažovány analytické vzorky o hmotnosti 70–110 mg pro stanovení aktivity a obsahu Rubisco i obsahu nestrukturních sacharidů. Každá navážka byla vložena do mikrozkuhavky Eppendorf a zmrazena v tekutém dusíku. Do samotné analýzy byly vzorky uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro stanovení obsahu dusíku byl odebrán asi 1 g jehlic. Odebrané jehlice smrku ztepilého byly předsušeny při teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 hodiny z důvodu inaktivace enzymů. Poté byly vzorky dosušeny v sušárně při téže teplotě na konstantní hmotnost (asi 48 hodin).



Obr. 3.1 Kultivační sféry Experimentálního ekologického pracoviště ÚSBE AV ČR na Bílém Křížu (Česká republika, $49^\circ 30' \text{N}$ $18^\circ 32' \text{E}$, 908 m n.m). Převzato z [97].

3.2 Metody

3.2.1 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco

Aktivita enzymu Rubisco byla stanovena podle Lilleyho a Walkera [58] s extrakcí podle Besforda [59]. Substrát potřebný k proběhnutí reakce byl ribosa-5-fosfát, který se během reakce přeměňuje působením enzymů obsažených v extraktu a dodaného ATP na ribulosa-1,5-bisfosfát (reakce I, II). Dále byl do reakční směsi přidáván KHCO_3 a MgCl_2 . Oxid

uhlíčitý, uvolněný z KHCO_3 , slouží jako druhý substrát reakce a současně s Mg^{2+} aktivuje enzym Rubisco. Do reakční směsi byly rovněž přidány enzymy, které katalyzují reakce III - V, a dále NADH. Konečným produktem reakcí III - V je glycerinaldehyd-3-fosfát. V reakční směsi dochází k hromadění ADP, který inhibuje enzym fosfoglycerátkinasu. Proto se do reakční směsi přidává enzym kreatinfosfokinasa, jež regeneruje ADP na ATP (reakce VI).

- 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^+ $\xrightarrow{\text{glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa}}$ glyceraldehyd-3-fosfát + NAD^+ + HPO_4 V.
- 2-fosfokreatin + 2 ADP $\xrightarrow{\text{kreatinfosfokinasa}}$ 2-kreatin + 2ATP VI.

Aktivita Rubisco byla počítána z úbytku absorbance při oxidaci NADH podle Lambertova-Beerova zákona.

3.2.1.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO[®] VZ Hradec Králové. Parametry: nejmenší dílek 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML

Centrifuga MLW T52.1

pH metr HI 221

Spektrofotometr HELIOS

3.2.1.2 Chemikálie

3-Fosfoglycerátkinasa; Sigma ALDRICH

ATP – adenosin-5-trifosfát; Sigma ALDRICH

BSA – bovinní sérový albumin; Sigma ALDRICH

DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH

Fosfokreatin; Sigma ALDRICH

Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa; Sigma ALDRICH

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

Hydrogenuhlíčan draselný; Sigma ALDRICH

Hydroxid draselný; Penta

Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH

Chlorid hořečnatý; Sigma ALDRICH

Na_2EDTA – ethylendiamintetraoctan disodný; Sigma ALDRICH

NADH – β -nikotinamidadeninukleotid; Sigma ALDRICH

Polyvinylpolypyrrolidon – Sigma ALDRICH

R5P – ribosa-5-fosfát; Sigma ALDRICH

3.2.1.3 Příprava roztoků

Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8

Ve 400 ml vody bylo rozpuštěno 5,96 g HEPES a 0,186 g Na₂EDTA a upraveno pH pomocí 3M KOH na 7,8. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě.

Zásobní roztok 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0

Ve 400 ml vody bylo rozpuštěno 5,96 g HEPES a 0,219 g Na₂EDTA a upraveno pH pomocí 3M KOH na 8,0. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě.

Extrakční roztok

V zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 7,8 bylo rozpuštěno 0,4 g BSA, 0,156 g DTT a 0,096 g MgCl₂. Roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 200 ml.

Takto připravený roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na₂EDTA, 0,2% BSA, 5 mM DTT a 5 mM MgCl₂.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Aktivační roztoky

V zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 0,2285 g MgCl₂. Roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml.

V zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 0,3003 g KHCO₃. Roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě.

Roztok glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6 mg glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

Roztok kreatinfosfokinasy

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 2 mg kreatinfosfokinasy

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

Roztok R5P

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6,2 mg ribulosa-5-fosfátu.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

Roztok 2-fosfoglycerátkinasy

Byl použit komerčně vyráběný roztok.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Pracovní roztok

V odměrné baňce o objemu 25 ml bylo v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 rozpuštěno:

0,0475 g ATP

0,0325 g fosfokreatinu

0,02 g DTT

0,005 g NADH

47,5 μ l 3-fosfoglycerátkinasy

250 μ l roztoku glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

250 μ l roztoku kreatinfosfokinasy.

Připravený pracovní roztok po přidání 50 μ l aktivačních roztoků obsahoval 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 20 mM $MgCl_2$, 25 mM $KHCO_3$, 3,5 mM ATP, 0,25 mM NADH, 5 mM fosfokreatinu, 1 mM Na_2EDTA , 5 mM DTT, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy a 80 nkat kreatinfosfokinasy.

Pracovní roztok se uchovává při laboratorní teplotě a je stálý maximálně 5 hodin.

3.2.1.4 Extrakce enzymu

Navážka smrkových jehlic byla rozetřena v třecí misce s mořským pískem. Byl přidán polyvinylpyrrolidon a 5 ml extrakčního roztoku. Vzorek byl asi 30 sekund homogenizován, poté byla suspenze přelita do centrifugační zkumavky a asi 1 minutu odstředována při 3000 otáčkách/min. U získaného supernatantu obsahujícího enzym Rubisco byla měřena počáteční a celková aktivita. Bylo nutné pracovat co nejrychleji z důvodu rychlého stárnutí extraktu.

3.2.1.5 Měření aktivity

Počáteční aktivita

Při měření počáteční aktivity bylo do optické kyvety o objemu 1 ml napipetováno 50 μ l aktivačního roztoku $MgCl_2$, 50 μ l aktivačního roztoku $KHCO_3$, 20 μ l extraktu, 850 μ l pracovního roztoku a 30 μ l roztoku R5P. Roztok byl promíchán a ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 340 nm v 30 s intervalech.

Celková aktivita

Při měření celkové aktivity bylo do optické kyvety o objemu 1 ml napipetováno 50 μ l aktivačního roztoku $MgCl_2$, 50 μ l aktivačního roztoku $KHCO_3$ a 20 μ l extraktu. Roztok byl promíchán a inkubován 15 minut. Poté bylo do kyvety přidáno 850 μ l pracovního roztoku a 30 μ l roztoku R5P. Po promíchání byla měřena absorbance při vlnové délce 340 nm v 30 sekundových intervalech.

3.2.1.6 Výpočet aktivity

Celkem bylo u každého odběru měřeno 5 vzorků ($n = 5$), z toho každý vzorek byl měřen po dobu 5 minut a 30 sekund. U každého vzorku bylo získáno celkem dvanáct hodnot absorbance A. Z těchto hodnot byl vypočítán úbytek absorbance za 30 sekund ΔA .

Tabulka 2. Měření počáteční aktivity ve vzorku A2 – ambient, 22. 7. 2010

t [s]	ΔA
0	0,0000*
30	0,0010*
60	0,0030
90	0,0030
120	0,0030
150	0,0040
180	0,0030
210	0,0040
240	0,0030
270	0,0040
300	0,0040
330	0,0040
Průměr ΔA	0,0035

*vyřazené chybné hodnoty z důvodu projevu tzv. lag fáze

Po vyřazení chybných hodnot byla ze změn absorbance vypočítána aktivita enzymu Rubisco z Lambert-Beerova zákona:

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

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] a c je koncentrace vzorku [mol dm^{-3}].

Aktivita enzymu byla vypočítána z rychlosti úbytku substrátu CO_2 :

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

kde ΔA je průměrný úbytek absorbance po vyřazení chybných hodnot [min^{-1}], V je objem reakční směsi v kyvetě [μl], ε je molární absorpční koeficient [$\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$] a l je délka optické dráhy [cm]. Hodnota ε je pro NADH je $6300 \text{ cm}^2 \text{mmol}^{-1}$ a délka optické kyvety je 1 cm.

Aktivita v kyvetě, což odpovídá 20 μl extraktu:

$$\Delta n = \frac{2 \cdot \Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l} = \frac{2 \cdot 0,0035 \cdot 1000}{2 \cdot 6300 \cdot 1} = 5,5556 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1}$$

Aktivita v celém objemu extraktu (5 ml):

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 5,5556 \cdot 10^{-4}}{0,02} = 0,1389 \mu\text{mol CO}_2 \text{ min}^{-1}$$

Aktivita enzymu vztažená na 1 g jehlic:

$$\Delta n = \frac{0,1389}{0,081} = 1,7147 \mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$$

3.2.1.7 Výpočet specifické aktivity

Specifická aktivita je aktivita vztažená na 1 g enzymu Rubisco. Byla vypočítána jako podíl aktivity enzymu Rubisco a obsahu enzymu Rubisco.

Př. Výpočet specifické počáteční aktivity u varianty A_{červen}:

$$A_{\text{sp}} = \frac{\Delta n_{(\text{A červen})}}{c_{(\text{A červen})}} = \frac{1,4941 \mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}}{16,1347 \text{ mg g}^{-1}} \cdot 1000 = 92,6014 \mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$$

3.2.2 Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco

Stanovení obsahu enzymu Rubisco vycházelo z metod Damervalové [98] a Rogerse et al. [50], postup byl dále upraven Floriánem [99] a Hlaváčkem [100].

3.2.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO[®] VZ Hradec Králové. Parametry: nejmenší dílek 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML

Centrifuga MLW T52,1

Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga (Lotyšsko)

Třepačka – LT2 Kavalier a.s.

Vortex – Stuart SA8

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 od firmy BIO-RAD (USA)

3.2.2.2 Chemikálie

2-Merkaptoethanol; Sigma ALDRICH

Akrylamid; SERVA

Brilantní modř G 250 – Coomasie; SERVA

Bromfenolová modř Na sůl; SERVA

Butanol; Lachema

D-ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa – standard Rubisco; Sigma ALDRICH

DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH

Ethanol; Lachema

Glycerol; Sigma ALDRICH

Glycin; SERVA

Kyselina chlorovodíková; Penta

Methanol, PENTA

N,N'-Methylenbisakrylamid; SERVA

Peroxodisíran amonný; SERVA

Octová kyselina; Lachema

SDS – dodesylsulfát sodný; Sigma ALDRICH

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin; Sigma ALDRICH

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma ALDRICH

3.2.2.3 Příprava roztoků

Roztoky na přípravu gelů

Roztok A

30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno ve 100 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok B

18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 8,8. Poté byl roztok doplněn na 100 ml.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok C

18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 6,8. Poté byl roztok doplněn na 100 ml.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok D

10 g SDS bylo rozpuštěno ve 100 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok E

0,1 g peroxidisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1 ml vody.

Roztok je nutno připravit pro každé stanovení čerstvý.

Roztok F

10 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 1 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

TEMED

Komerčně dodávaný roztok.

Pomocné roztoky

Elektrodový pufr

6 g TRIS, 18,8 g glycinu a 2 g SDS bylo rozpuštěno v 1000 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C. Používá se opakovaně.

TRIS pufr

3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,02 g DTT a 50 ml glycerolu bylo rozpuštěno ve 450 ml vody, pH bylo upraveno na 6,8 pomocí koncentrované HCl.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Vzorkový pufr

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.

Roztoky pro vizualizaci bílkovin

Stabilizační roztok

100 ml methanolu se smíchá se 400 ml vody.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Barvicí roztok

0,5 g Coomassie Blue R 250 se smíchá se 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Odbarvovací roztok

250 ml methanolu se smíchá se 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

3.2.2.4 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla omyta, odmaštěna, opláchnuta destilovanou vodou a vyleštěna buničinou namočenou v ethanolu. Skla byla upevněna do stojanu menším sklem dopředu, spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem shora byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byl použit 8% separační a 5% zaostřovací gel. Při přípravě gelů bylo nutné pracovat v rukavicích z důvodu vysoké toxicity akrylamidu.

8% separační gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky napipetovány roztoky podle tabulky 3.

Tabulka 3. Objemy roztoků k přípravě separačního gelu (10 ml)

Roztok	Objem [ml]
Destilovaná voda	4,60
A	2,70
B	2,50
C	---
D	0,10
E	0,14
TEMED	0,006

Roztok E a roztok TEMED byly do roztoku přidány těsně před nalitím roztoku mezi elektroforetická skla. Poté byl roztok dobře promíchán a nalit mezi skla asi 2 cm od horního okraje. Zbýlý roztok byl ponechán v kádince jako kontrola tuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl převrstven butanolem pro vyrovnání hladiny a jako ochrana proti vypařování vody.

5% zaostřovací gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky napipetovány roztoky podle tabulky 4.

Tabulka 4. Objemy roztoků k přípravě zaostřovacího gelu (3 ml)

Roztok	Objem [ml]
Destilovaná voda	2,10
A	1,00
B	---
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po zatuhnutí separačního gelu byl odstraněn butanol a gel byl několikrát vymyt destilovanou vodou. Po přidání roztoku E a roztoku TEMED byl zaostřovací gel dobře promíchán a nalit na vrstvu separačního gelu téměř po okraj. Do prostoru mezi skla byl nasazen elektroforetický hřebínek, který byl odstraněn až před nanášením vzorků. Zbylý roztok byl ponechán v kádince jako kontrola ztuhnutí gelu. Hotový gel bylo možné uchovávat v lednici, ale nejdéle do příštího dne.

3.2.2.5 Příprava vzorků

Navázka jehlic byla rozetřena ve třecí misce s mořským pískem. Byly přidány 2 ml TRIS pufru a vzorek byl asi 30 vteřin homogenizován. Vzniklá suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 1 minutu odstředována při 3000 otáčkách/min. Do mikrozkušavky Eppendorf bylo napipetováno 0,5 ml extraktu a 0,5 ml vzorkového pufru. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut vařena v termobloku. Vzorky uchovávány v mrazničce při teplotě -18 °C.

3.2.2.6 Elektroforéza

Elektroforetická skla s připraveným gelem byla vytažena ze stojanu, očištěna od zbytků gelu a byl opatrně odstraněn elektroforetický hřebínek. Skla byla upevněna do stojanu pro elektroforézu menším sklem směrem dovnitř. Stojan s upevněnými skly byl vložen do elektroforetické nádoby a vnitřní prostor byl až po okraj naplněn elektrodovým pufrem. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do prvních dvou pozic napipetováno 10 µl standardu Rubisco (0,5000 mg v 1 ml vzorkovacího pufru) a do dalších pozic 10 µl vzorku. Vnější prostor byl zaplněn asi do poloviny nádoby. Aparatura byla připojena ke zdroji o konstantním napětí 80 V. V průběhu analýzy bylo nutné kontrolovat hladinu elektrodového pufru ve vnitřním prostoru a popřípadě ho bylo nutné doplnit. Elektroforéza probíhala, dokud čelo vzorku nedostoupilo asi 2 cm od spodního okraje gelu.

3.2.2.7 Zviditelnění bílkovin

Po ukončení elektroforézy byla skla s gelem vyjmuta ze stojanu a ponořena do misky s destilovanou vodou menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle byla skla od sebe oddělena a došlo k uvolnění gelu. Destilovaná voda byla vylita, gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Stabilizační roztok byl slit do zásobní láhve a poté byl gel protřepáván s barvicím roztokem. Po 30 minutách byl gel promyt použitým odbarvovacím roztokem a následně 90 minut protřepáván s čistým odbarvovacím roztokem. Po odbarvení byl gel opět promyt destilovanou vodou, položen na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie zabraňující jeho vysychání. S gelem bylo nutné pracovat v rukavicích z důvodu vysoké toxicity akrylamidu. Hotové gely byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

3.2.2.8 Vyhodnocení

Hotové gely byly naskenovány a kvantifikace velké podjednotky enzymu Rubisco byla provedena programem pro obrazovou analýzu FUJIFILM Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.1. Zóny velkých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Velikost plochy píku vzorku byla porovnána s plochou standardu Rubisco.

3.2.2.9 Výpočet množství

Tabulka 5. Výpočet množství Rubisco

Vzorek	hmotnost [g]	plocha zóny
standard		115850,90
standard		114257,60
A1 červen	0,095	88172,10
	0,095	89512,09
	0,095	90510,51

Obsahu enzymu v 1 ml extraktu:

$$c = \frac{\text{plocha píku vzorku}}{\text{plocha píku standardu}} \cdot c(\text{standardu}) = \frac{88172,1}{115054,3} \cdot 0,5 = 0,3832 \text{ mg ml}^{-1} \rightarrow 2x \text{ zředěný roztok}$$

Nezředěný roztok:

$$m = 0,3832 \cdot 2 = 0,7664 \text{ mg v 1 ml}$$

Přepočet na celý objem extraktu:

$$2 \cdot 0,7664 = 1,5328 \text{ mg ve 2 ml}$$

Množství Rubisco přepočítané na jednotkovou hmotnost čerstvé tkáně (g):

$$c = \frac{1,5328 \text{ mg}}{0,095 \text{ g}} = 16,1347 \text{ mg g}^{-1}$$

3.2.3 Stanovení nestrukturních sacharidů anthronovou metodou

Škrob byl stanoven anthronovou metodou podle [81, 82, 83, 101]. Tato metoda je založená na extrakci nestrukturních sacharidů chloralhydrátem ve spojení s následným kolorimetrickým stanovením pomocí anthronu. Podstatou je tvorba barevného komplexu furfural-antron v prostředí koncentrované kyseliny sírové. Intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky a je úměrná koncentraci glukosy.

3.2.3.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® VZ Hradec Králové. Parametry: nejmenší dílek 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML

Centrifuga MLW T52,1

Spektrofotometr HELIOS

Vařič

3.2.3.2 Chemikálie

Anthron; Sigma ALDRICH

Chloralhydrát; Sigma ALDRICH

D-Glukosa; Lachema

H₂SO₄ - Kyselina sírová 98%

3.2.3.3 Příprava roztoků

Roztok anthronu

V 50 ml koncentrované kyseliny sírové bylo rozpuštěno 0,2 g anthronu. Roztok byl převeden do 100 ml odměrné baňky.

Roztok anthronu se uchovává při laboratorní teplotě a je stálý maximálně 24 hodin.

Roztok 1M chloralhydrátu - rozpouštědlo

Ve 30 ml vody bylo rozpuštěno 8,27 g chloralhydrátu. Roztok byl převeden do 50 ml odměrné baňky.

Roztok je stálý a uchovává se při teplotě 4°C.

Kalibrační roztoky glukosy

Ve 100 ml vody bylo rozpuštěno 0,100 g glukosy. Roztok byl převeden do 200 ml odměrné baňky. Z připraveného kalibračního roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml byly připraveny postupným ředěním kalibrační roztoky o koncentracích 0 mg/ml – 0,4 mg/ml.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě.

3.2.3.4 Extrakce nestrukturních sacharidů

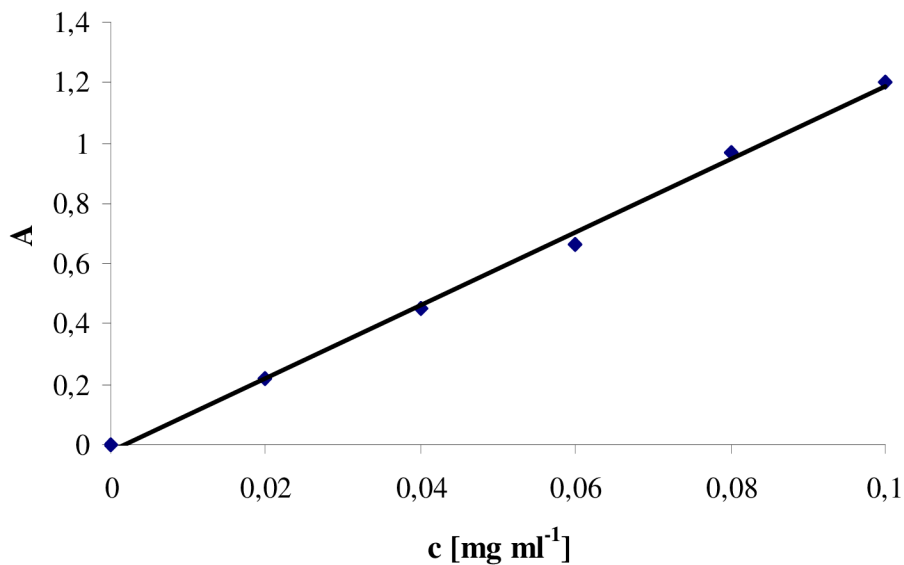
Asi 80–100 mg smrkových jehlic bylo rozetřeno v třecí misce s mořským pískem a 5 ml chloralhydrátu. Suspenze byla inkubována 15 minut ve vroucí vodní lázni. Následně byla suspenze centrifugována 5 minut při 2000–3000 otáčkách/min. Do čisté zkumavky bylo napipetováno 0,2 ml supernatantu a objem byl zředěn vodou v poměru 1 : 9.

3.2.3.5 Měření obsahu nestrukturních sacharidů

Do čistých zkumavek byly napipetovány 3 ml anthronového roztoku. Anthron byl opatrně převrstven 1 ml naředěného supernatantu a zkumavka byla ponořena do studené vody. Pod proudem studené vody byly obě fáze rychlým protřepáním smíseny. Promíchané vzorky byly 5 minut inkubovány ve vroucí lázni, kde došlo k vytvoření barevného komplexu. Po vyjmutí byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a byla změřena absorbance při vlnové délce 625 nm [83].

3.2.3.6 Výpočet obsahu nestrukturních sacharidů

Celkem byly u každého odběru měřeny 3 vzorky ($n = 3$). Obsah nestrukturních sacharidů byl vypočítán z rovnice lineární regrese kalibrační křivky glukosy (Obr. 3.2).



Obr. 3.2 Kalibrační křivka glukosy ($R^2 = 0,9971$)

Rovnice lineární regrese:

$$y = 12,109x - 0,0211$$

$$x = \frac{y + 0,0211}{12,109},$$

kde x představuje koncentraci nestrukturních sacharidů [mg ml^{-1}] a y značí absorbanci jednotlivých vzorků měřenou při $\lambda = 625 \text{ nm}$.

Tabulka 6. Měření množství nestrukturních sacharidů ve vzorku A1-3 červen

Vzorek č.	m [g]	A
1	0,099	0,297
2	0,102	0,354
3	0,100	0,355

Koncentrace nestrukturních sacharidů v 10x zředěném roztoku

$$c_{10x} = \frac{A + 0,0211}{12,109} = \frac{0,297 + 0,0211}{12,109} = 0,02627 \text{ mg ml}^{-1}$$

Koncentrace v nezředěném roztoku:

$$c_n = c_{10x} \times 10 = 0,02627 \cdot 10 = 0,2627 \text{ mg ml}^{-1}$$

Hmotnost nestrukturních sacharidů v 5 ml extraktu:

$$m_{\text{NSS}} = 0,2627 \text{ mg ml}^{-1} \cdot 5 \text{ ml} = 1,3135 \text{ mg}$$

Koncentrace nestrukturních sacharidů vztahovaná na 1g čerstvé hmotnosti jehlic:

$$c = \frac{m_{\text{NSS}}}{m} = \frac{1,3135}{0,099} = 13,2677 \text{ mg g}^{-1}$$

3.2.4 Stanovení listového dusíku podle Kjeldahla

Celkový dusík byl stanoven metodou dle Kjeldahla podle [94]. Tato metoda je založená na převedení dusíkatých látek na síran amonný pomocí mineralizace v koncentrované kyselině sírové v přítomnosti Weiningerova katalyzátoru a následném uvolnění amoniaku v zásaditém prostředí. Vzniklý amoniak je poté predestilován s vodní párou do standardizovaného roztoku kyseliny sírové a její přebytek je stanoven alkalimetrickou titrací.

3.2.4.1 Chemikálie

Fenolftalein

NaOH – hydroxid sodný, Lach:ner

H₂SO₄ - Kyselina sírová 98%; Lach:ner

(COOH)₂·H₂O – kyselina šťavelová dihydrát, Lach:ner

Tashirův indikátor

Weiningerův katalyzátor (90 g síranu sodného, 7 g síranu rtuťnatého, 1,5 g síranu měďnatého a 1,5 g selenu)

3.2.4.2 Přístroje

Destilační přístroj pro destilaci s vodní párou

Mineralizační zařízení

3.2.4.3 Příprava roztoků

Roztok 0,05 M H₂SO₄

3 ml 98 % kyseliny sírové bylo smícháno s 500 ml vody. Roztok byl převeden do 1000 ml odměrné baňky a byl doplněn vodou po rysku.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě v zásobní lahvi.

Roztok 33 % NaOH

V 50 ml vody bylo rozpuštěno 33 g hydroxidu sodného, Roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn po rysku.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě v zásobní lahvi.

Odměrný roztok 0,1 mol dm⁻³ NaOH

V 500 ml vody bylo rozpuštěno 3,9988 g hydroxidu sodného. Roztok byl převeden do 1000 ml odměrné baňky a byl doplněn vodou po rysku.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě v zásobní lahvi.

Odměrný roztok 0,05 mol dm⁻³ (COOH)₂

0,6303 g kyseliny šťavelové bylo rozpuštěno v 50 ml vody. Roztok byl převeden do 100 ml odměrné baňky a byl doplněn po rysku.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

3.2.4.4 Standardizace odměrného roztoku 0,1 mol dm⁻³ hydroxidu sodného

Do titrační baňky bylo napipetováno 10 ml odměrného roztoku 0,05 M kyseliny šťavelové, bylo přidáno pár kapek indikátoru fenolftalein a směs byla titrována odměrným roztokem

0,1 M NaOH do prvního trvalého růžového zbarvení. Titrace byla provedena třikrát a z průměrné spotřeby byla vypočítána přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného.

3.2.4.5 Standardizace odměrného roztoku kyseliny sírové

Do titrační baňky bylo napipetováno 10 ml roztoku kyseliny sírové o koncentraci $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, byly přidány tři kapky Tashirova indikátoru a směs byla titrována standardizovaným roztokem $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ hydroxidu sodného do prvního trvalého žlutého zbarvení. Titrace byla provedena třikrát a z průměrné spotřeby byla vypočítána přesná koncentrace roztoku kyseliny sírové.

3.2.4.6 Příprava vzorků

Odebrané jehlice smrku ztepilého byly sušeny při teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 hodiny z důvodu inaktivace enzymů. Poté byly vzorky dosušeny v sušárně při téže teplotě na konstantní hmotnost (asi 48 hodin).

3.2.4.7 Mineralizace

Do mineralizační trubice byla nasypána navážka smrkových jehlic, bylo k ní přidáno 2 ml koncentrované kyseliny sírové a 0,2 g Weiningerova katalyzátoru. Trubice byla vložena do mineralizačního bloku a nechána mineralizovat po dobu 24 hodin. Mineralizace byla ukončena až byl vzorek čirý.

3.2.4.8 Vlastní stanovení obsahu dusíku

Mineralizát smrkových jehlic byl kvantitativně převeden do destilační baňky, bylo k němu přidáno pár kapek fenolftaleinu a baňka byla připojena k destilačnímu přístroji. Pomocí dělicí nálevky byl ke směsi přidán 33% hydroxid sodný do růžového zbarvení fenolftaleinu. Uvolněný amoniak byl předestilován vodní párou do předlohy s 25 ml standardizované kyseliny sírové. Konec chladiče musel sahat až ke dnu předlohy a destilace musela být regulována tak, aby se vyvíjený amoniak stačil kvantitativně vázat v předloze. Po 25 minutách destilace byla předloha snížena tak, aby konec chladiče nezasahoval do roztoku. Po dalších 5 minutách byla destilace ukončena. K destilátu v předloze byly přidány 3 kapky Tashirova indikátoru a směs byla titrována standardizovaným roztokem do prvního trvalého žlutého zbarvení.

3.2.4.9 Výpočet obsahu listového dusíku

Celkem byly u každého odběru měřeny dva vzorky ($n = 2$). Obsah listového dusíku byl vypočítán ze spotřeby standardizovaného odměrného roztoku NaOH.

Tabulka 1 Standardizace NaOH a H_2SO_4

	Standardizace NaOH	Standardizace H_2SO_4
Spotřeba NaOH [dm^3]	0,0092	0,0101
	0,0092	0,0100
	0,0092	0,0100
Průměr [dm^3]	0,0092	0,0100
Koncentrace [mol dm^3]	0,1087	0,0545

Standardizace odměrného roztoku hydroxidu sodného

- reakce probíhá podle rovnice: $(\text{COOH})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{NaOH} \rightarrow (\text{COONa})_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$

$$\frac{n_{\text{NaOH}}}{n_{(\text{COOH})_2}} = \frac{2}{1}$$

$$c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} = 2 \cdot c_{(\text{COOH})_2} \cdot V_{(\text{COOH})_2} \Rightarrow c_{\text{NaOH}} = \frac{2 \cdot c_{(\text{COOH})_2} \cdot V_{(\text{COOH})_2}}{V_{\text{NaOH}}}$$

$$c_{\text{NaOH}} = \frac{2 \cdot 0,0499 \cdot 0,01}{0,0092} = 0,1087 \text{ mol dm}^{-3}$$

Standardizace kyseliny sírové

- reakce probíhá podle rovnice: $\text{H}_2\text{SO}_4 + 2 \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$

$$\frac{n_{\text{NaOH}}}{n_{\text{H}_2\text{SO}_4}} = \frac{2}{1}$$

$$c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} = 2 \cdot c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \Rightarrow c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2 \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4}}$$

$$c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{0,1087 \cdot 0,0100}{2 \cdot 0,01} = 0,0545 \text{ mol dm}^{-3}$$

Výpočet obsahu celkového listového dusíku

Tabulka 2 Měření množství listového dusíku v jehlicích E1-2 červen

Navážka [g]	Spotřeba NaOH [dm ³]	Množství dusíku [%]
0,1165	0,0238	1,67
0,1069	0,0242	1,26
	Průměr	1,47

$$w_{\text{N}} = \frac{2 \cdot \left[(c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4}) - \left(\frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2} \right) \right] \cdot M_{\text{N}}}{m_{\text{navážka}}}$$

$$w_{\text{N}} = \frac{2 \cdot \left[(0,0545 \cdot 0,025) - \left(\frac{0,1087 \cdot 0,0238}{2} \right) \right] \cdot 14,01}{0,1165} = 0,0167 \Rightarrow 1,67 \%$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výsledky

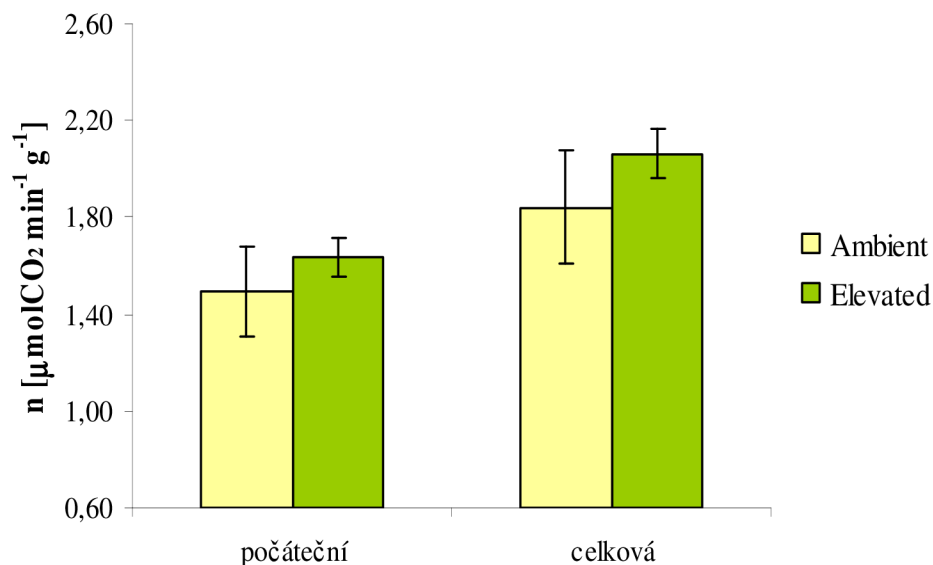
4.1.1 Aktivita enzymu Rubisco

Počáteční a celková aktivita Rubisco byla měřena pomocí metody popsané v kapitole 3.2.1.

Vzorky byly odebírány ve čtyřech termínech, a to 22. 6. 2011, 22. 7. 2011, 26. 8. 2011 a 29. 9. 2011. Při každém odběru bylo získáno celkem 10 vzorků. Z toho 5 vzorků bylo ze stromků kultivovaných při normální koncentraci CO₂ (A) a 5 vzorků ze stromků kultivovaných při zvýšené koncentraci CO₂ (E). Z každých 5 vzorků byla získána průměrná hodnota (n = 5).

Tabulka 9. Hodnoty počáteční a celkové aktivity u vzorků odebíraných 22. 6. 2011

Vzorek	Počáteční aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]	Celková aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]
Ambient	1,49	1,84
Elevated	1,64	2,06

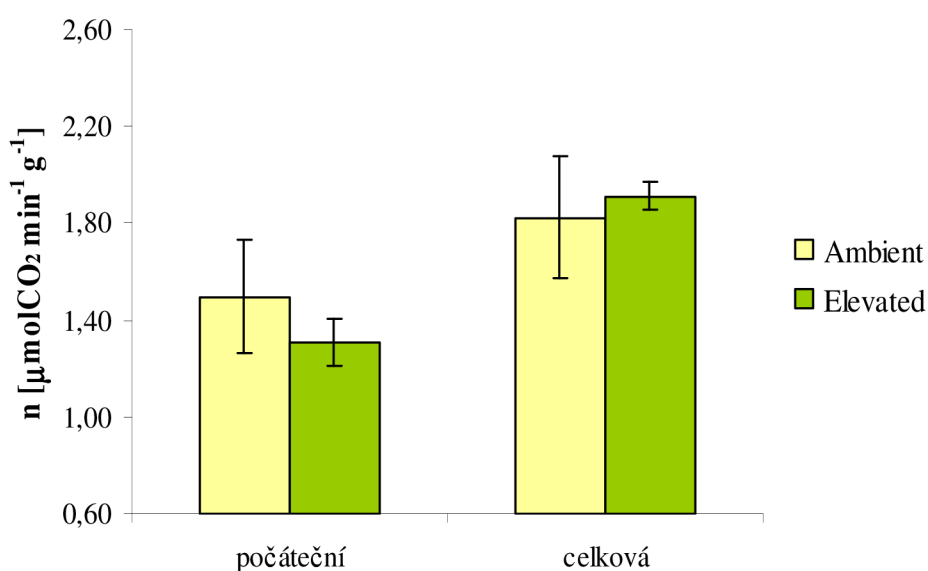


Obr. 4.1 Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco u jehlic smrku ztepilého A a E ze dne 22. 6. 2011.

Z obrázku 4.1 je zřejmé, že při červnovém odběru nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v počáteční ani celkové aktivitě Rubisco mezi variantami A a E.

Tabulka 10. Hodnoty počáteční a celkové aktivity u vzorků odebíraných 22. 7. 2011

Vzorek	Počáteční aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]	Celková aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]
Ambient	1,50	1,83
Elevated	1,31	1,91

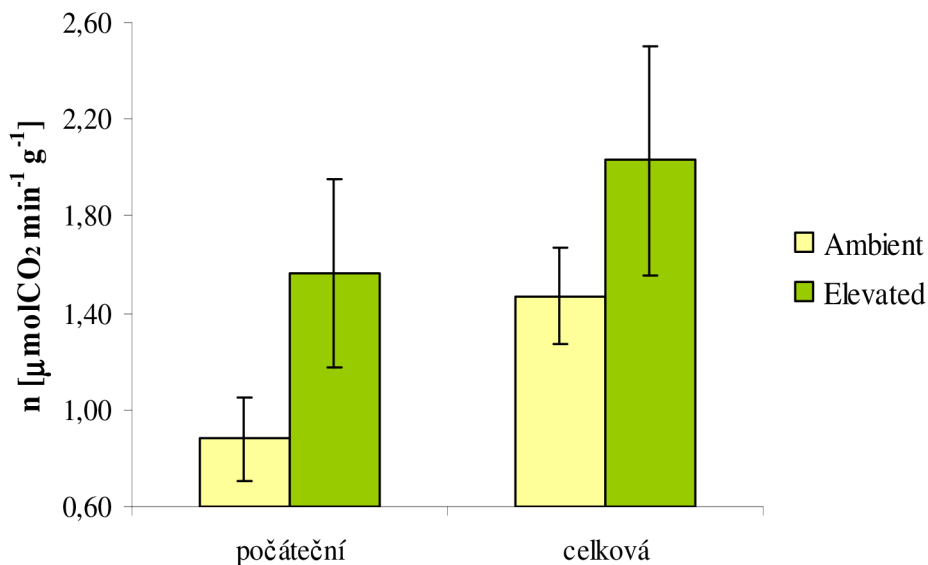


Obr. 4.2 Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco u jehlic smrku ztepilého A a E ze dne 22. 7. 2011.

Stejně jako v červnu, ani při červencovém odběru nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v počáteční a celkové aktivitě mezi variantami A a E (Obr. 4.2).

Tabulka 11. Hodnoty počáteční a celkové aktivity u vzorků odebíraných 26. 8. 2011

Vzorek	Počáteční aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]	Celková aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]
Ambient	0,88	1,47
Elevated	1,57	2,03

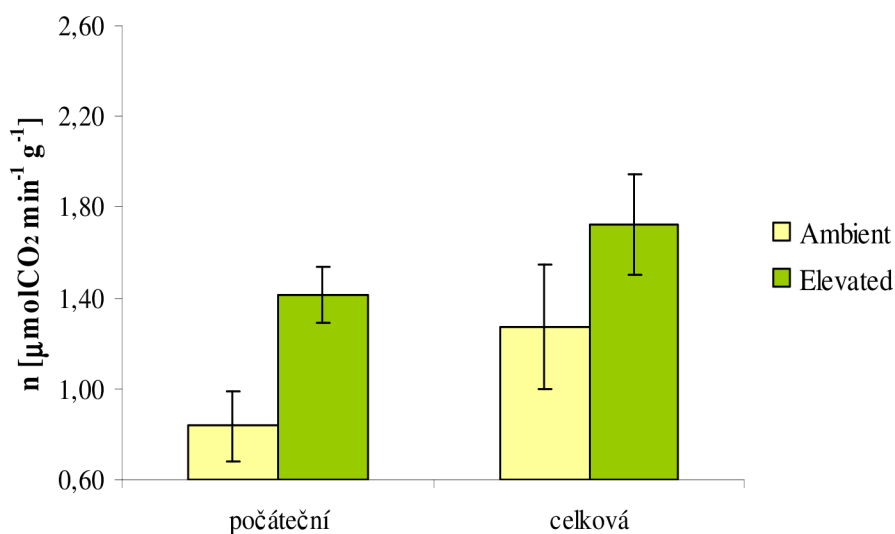


Obr. 4.3 Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco u jehlic A a E ze dne 26. 8. 2011.

Z obrázku 4.3 vyplývá, že počáteční aktivita u jehlic kultivovaných při vyšší koncentraci oxidu uhličitého byla v srpnu statisticky významně vyšší než u jehlic kultivovaných při normální koncentraci CO_2 , a to o 44 %. Naproti tomu celková aktivita nebyla u jehlic E statisticky významně vyšší nežli u jehlic A.

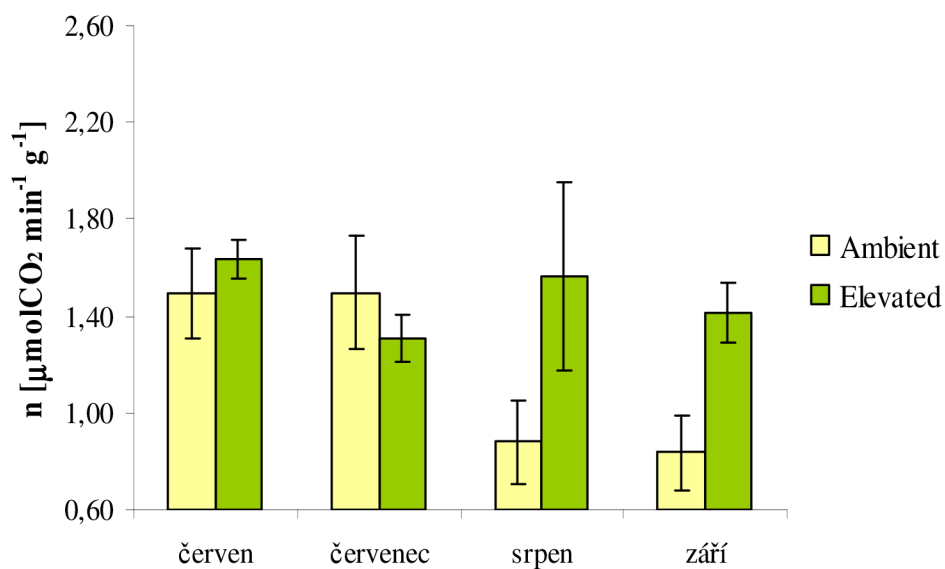
Tabulka 12. Hodnoty počáteční a celkové aktivity u vzorků odebíraných 29. 9. 2011

Vzorek	Počáteční aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]	Celková aktivita [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-2}$]
Ambient	0,84	1,27
Elevated	1,42	1,73



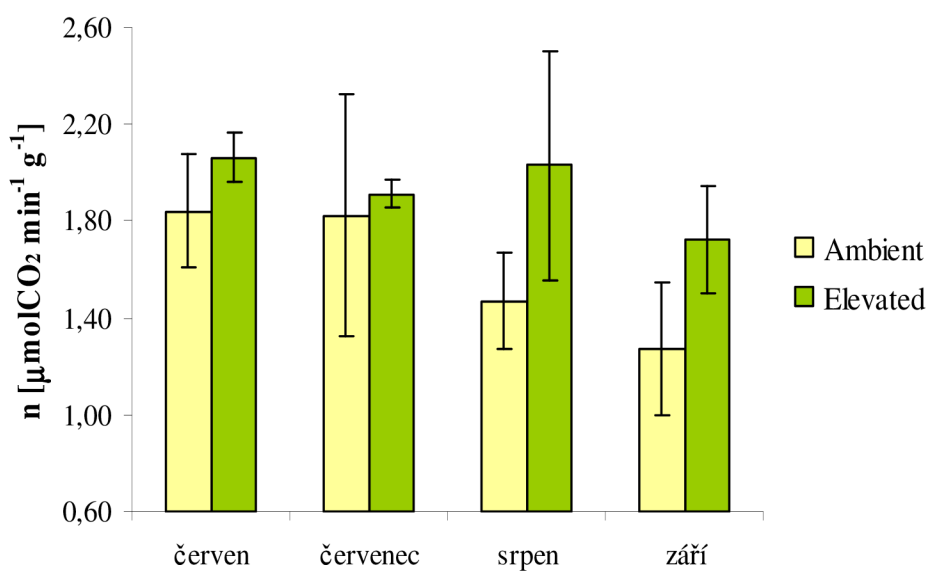
Obr. 4.4 Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco u jehlic A a E ze dne 29. 9. 2011.

Na obrázku 4.4 lze pozorovat podobný průběh jako na obrázku 4.3. Počáteční aktivita u jehlic E byla v září statisticky významně vyšší než u jehlic A, a to o 41 %, avšak u celkové aktivity nebyl mezi variantami A a E prokázán statisticky významný rozdíl.



Obr. 4.5 Srovnání počáteční aktivity enzymu Rubisco u jehlic smrku ztepilého A a E v červnu, červenci, srpnu a září.

Na obrázku 4.5 lze vidět, nápadný pokles počáteční aktivity u varianty A od června do září (o 56 %). Naproti tomu u varianty E nevykazovala počáteční aktivita v průběhu vegetační sezóny statisticky významný pokles.

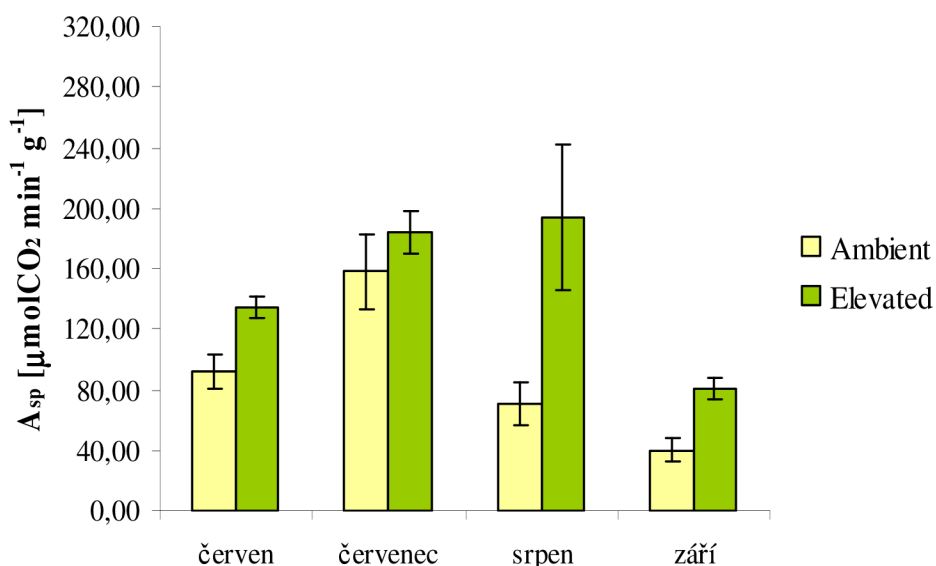


Obr. 4.6 Srovnání celkové aktivity enzymu Rubisco u jehlic A a E v červnu, červenci, srpnu a září.

Celková aktivita Rubisco u varianty A byla v září statisticky významně nižší než v červnu, kdežto u varianty E nedošlo v průběhu vegetační sezóny k významnému poklesu celkové aktivity (Obr. 4.6).

Tabulka 13. Hodnoty specifické počáteční aktivity Rubisco u jehlic smrku ztepilého odebíraných v červnu, červenci, srpnu a září.

Vzorek	A_{sp} [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$]	
	Ambient	Elevated
Červen	91,86	134,69
Červenec	158,20	183,98
Srpen	70,39	193,56
Září	39,96	80,76

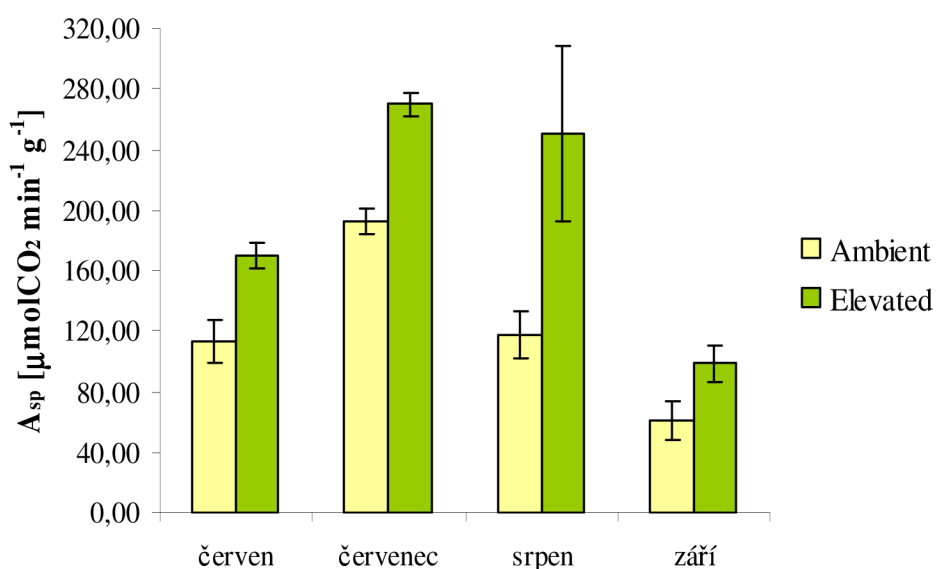


Obr. 4.7 Srovnání specifické počáteční aktivity enzymu Rubisco u jehlic smrku ztepilého A a E v červnu, červenci, srpnu a září.

Na obrázku 4.7 lze vidět, že rozdíl počáteční specifické aktivity mezi jehlicemi A a E nebyl v červenci statisticky významný. V ostatních měsících byla specifická aktivita u varianty E statisticky významně vyšší než u varianty A (v červnu o 32 %, v srpnu o 64 % a v září o 51 %). V průběhu sezóny došlo u jehlic A k významnému nárůstu, o 42 %, a poté k výraznému poklesu. V září u varianty A byla specifická počáteční aktivita o 57 % nižší než v červnu. Co se týká jehlic E, tak na začátku sezóny byla situace podobná jako u jehlic A. Byl zaznamenán významný nárůst, o 27 %, ale k výraznému poklesu došlo mezi srpnem a září. U varianty E byla specifická aktivita v září o 40 % nižší než v červnu.

Tabulka 14. Hodnoty specifické celkové aktivity Rubisco u jehlic smrku ztepilého odebíraných v červnu, červenci, srpnu a září.

Vzorek	A_{sp} [$\mu\text{molCO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$]	
	Ambient	Elevated
Červen	113,13	170,00
Červenec	192,88	269,77
Srpen	117,51	250,89
Září	60,83	98,48



Obr. 4.8 Srovnání specifické celkové aktivity enzymu Rubisco u jehlic smrku ztepilého A a E v červnu, červenci, srpnu a září.

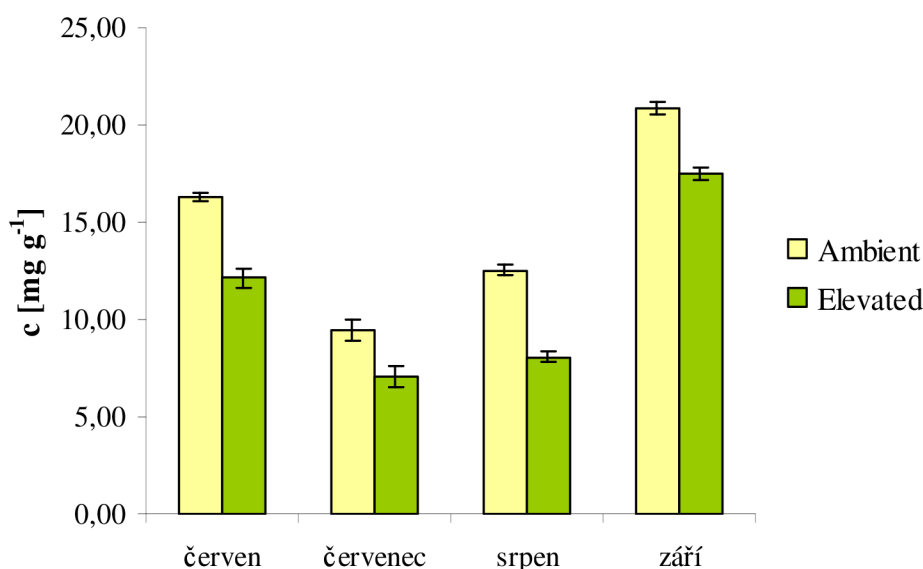
Celková specifická aktivita u jehlic E byla ve všech odebíraných měsících statisticky významně vyšší než u jehlic A. V červnu byl nárůst o 34 %, v červenci o 29 %, v srpnu o 53 % a v září o 38 %. Z hlediska sezónního průběhu došlo v červenci u obou variant k nárůstu specifické celkové aktivity vzhledem k červnu (u jehlic A o 41 % a u jehlic E o 37 %) a pak následovalo snížení. U varianty A byla v září specifická aktivita o 46 % nižší než v červnu a u varianty E o 42 % (Obr. 4.8).

4.1.2 Obsah enzymu Rubisco

Obsah enzymu Rubisco byl stanoven metodou SDS-PAGE, jak bylo podrobně popsáno v kapitole 3.2.2. Vzorky byly odebírány současně se vzorky pro stanovení aktivity Rubisco. Ke každému datu bylo odebráno celkem 6 vzorků. Z toho 3 vzorky byly odebrány z jehlic kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a 3 z jehlic kultivovaných při dvojnásobné koncentraci oxidu uhličitého (E). S každým vzorkem bylo provedeno jedno stanovení, takže u každé varianty byly získány 3 hodnoty ($n = 3$), vypočítána průměrná hodnota, směrodatná odchylka a interval spolehlivosti.

Tabulka 15. Hodnoty množství enzymu Rubisco u jehlic smrku ztepilého odebíraných v červnu, červenci, srpnu a září.

Vzorek	Obsah [mg g^{-1}]	
	Ambient	Elevated
Červen	16,26	12,14
Červenec	9,46	7,09
Srpen	12,52	8,09
Září	20,89	17,52



Obr. 4.9 Srovnání obsahu enzymu Rubisco u jehlic smrku ztepilého A a E v červnu, červenci, srpnu a září.

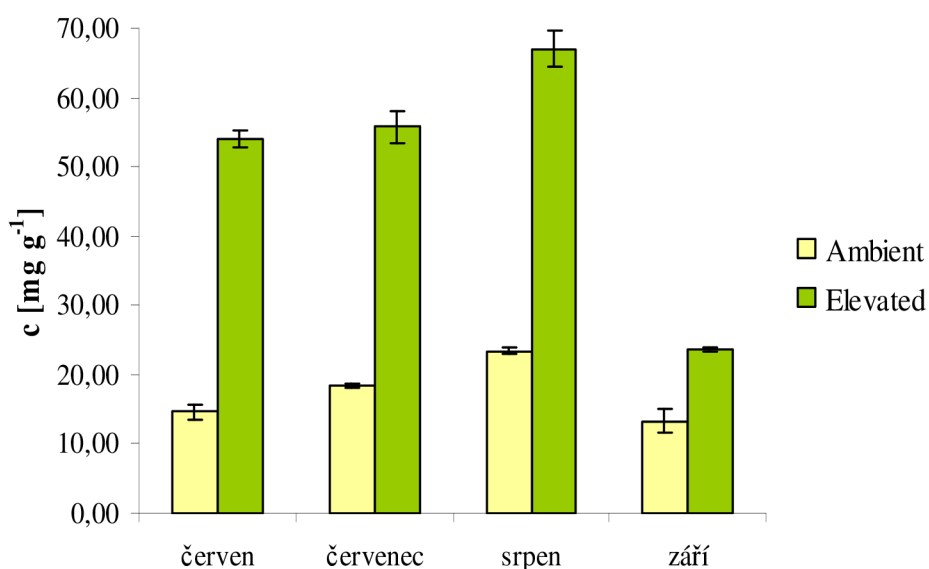
Obsah enzymu Rubisco u jehlic E byl ve všech odebíraných měsících statisticky významně nižší než u jehlic A (v červnu o 25 %, v červenci o 25 %, v srpnu o 35 % a v září o 16 %). Z hlediska sezónního průběhu došlo k velkému poklesu obsahu Rubisco v červenci vzhledem k červnu (o 42 % u varianty A, o 41 % u varianty E), a pak následoval postupný vzrůst. V září byly naměřené hodnoty obsahu Rubisco vzhledem k červnu o 22 % vyšší u varianty A a o 31 % vyšší u varianty E (Obr. 4.9).

4.1.3 Obsah nestrukturních sacharidů

Nestrukturní sacharidy byly stanoveny anthronovou metodou (viz kap. 3.2.3). Vzorky byly odebrány současně se vzorky pro aktivitu a množství enzymu Rubisco. Ke každému datu bylo odebráno celkem 6 vzorků. Z toho 3 vzorky byly odebrány z jehlic kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a 3 z jehlic kultivovaných při dvojnásobné koncentraci oxidu uhličitého (E). Z každých 3 vzorků byla získána průměrná hodnota ($n = 3$), vypočítána směrodatná odchylka a interval spolehlivosti.

Tabulka 16. Hodnoty obsahu nestruturních sacharidů u jehlic smrku ztepilého A a E odebíraných v červnu, červenci, srpnu a září.

Vzorek	Obsah [mg g^{-1}]	
	Ambient	Elevated
Červen	14,66	54,00
Červenec	18,45	55,73
Srpen	23,40	67,07
Září	13,31	23,63



Obr. 4.10 Srovnání obsahu nestruturních sacharidů u jehlic smrku ztepilého A a E v červnu, červenci, srpnu a září.

Na obrázku 4.10 je vidět velký nárůst obsahu nestruturních sacharidů u jehlic kultivovaných při zvýšené koncentraci CO_2 . Tento nárůst je prokazatelný ve všech odebíraných měsících a je statisticky významný. V červnu byl nárůst nestruturních sacharidů v jehlicích E 72 %, v červenci 67 %, v srpnu 65 % a v září 44 % vzhledem k A. V průběhu vegetačního období došlo u jehlic A i E nejprve ke zvýšení obsahu nestruturních sacharidů a poté ke snížení. Toto snížení na konci vegetačního období bylo u jehlic E výrazné.

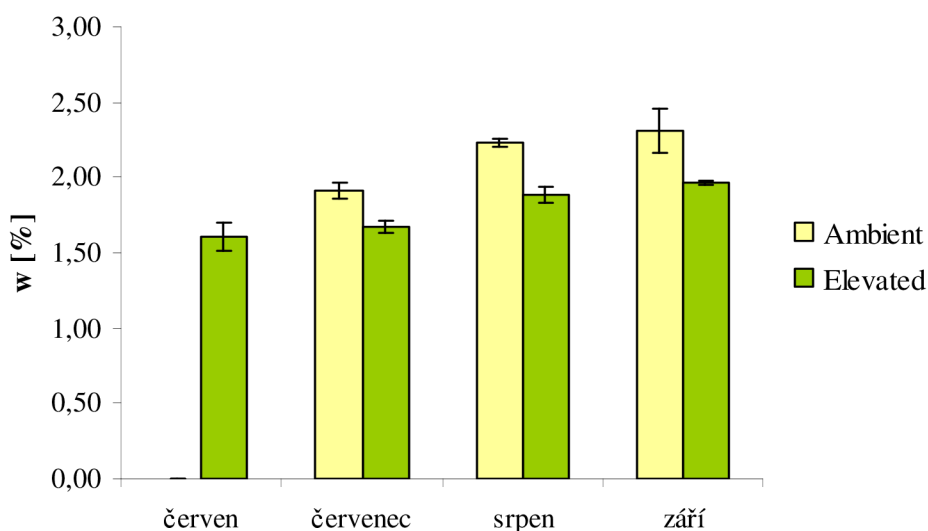
4.1.4 Obsah celkového dusíku

Celkový dusík byl stanoven metodou dle Kjeldahla (kapitola 3.2.4). Vzorky byly odebírány současně se vzorky pro aktivitu, množství Rubisco a nestruturní sacharidy. Ke každému datu byly odebrány celkem 4 vzorky. Z toho dva vzorky byly odebrány ze stromků kultivovaných při normální koncentraci oxidu uhličitého a 2 ze stromků kultivovaných při dvojnásobné koncentraci CO_2 . Z každých dvou vzorků byla získána průměrná hodnota ($n = 2$) a interval spolehlivosti.

Tabulka 17. Hodnoty celkového dusíku u jehlic smrku ztepilého A a E odebíraných v červnu, červenci, srpnu a září.

Vzorek	Množství celkového dusíku [%]	
	Ambient	Elevated
Červen	-*	1,61
Červenec	1,91	1,68
Srpen	2,22	1,89
Září	2,31	1,96

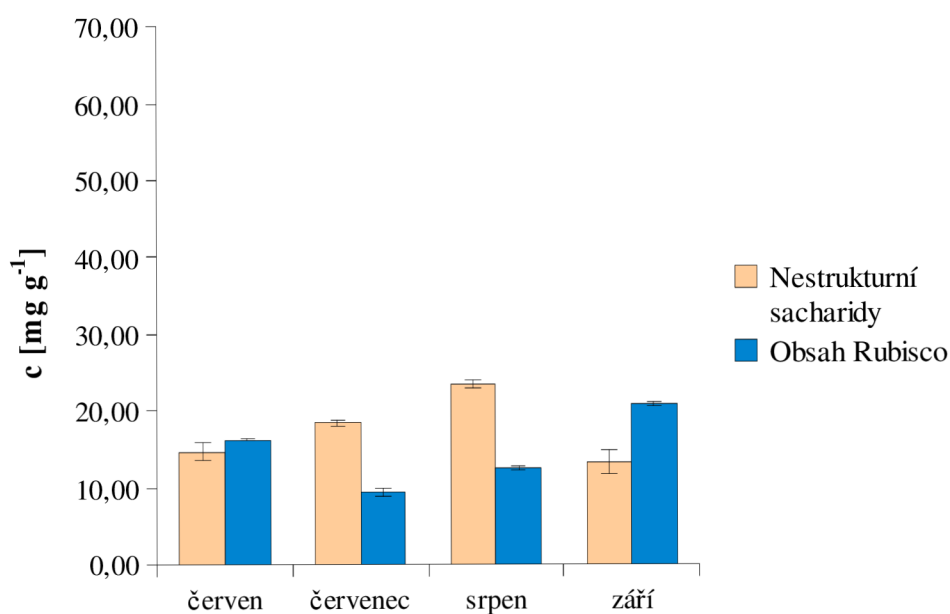
* hodnota A_{červen} byla vyřazena z důvodu chyby při mineralizaci



Obr. 4.11 Srovnání obsahu celkového listového dusíku u jehlic smrku ztepilého A a E v červnu, červenci, srpnu a září.

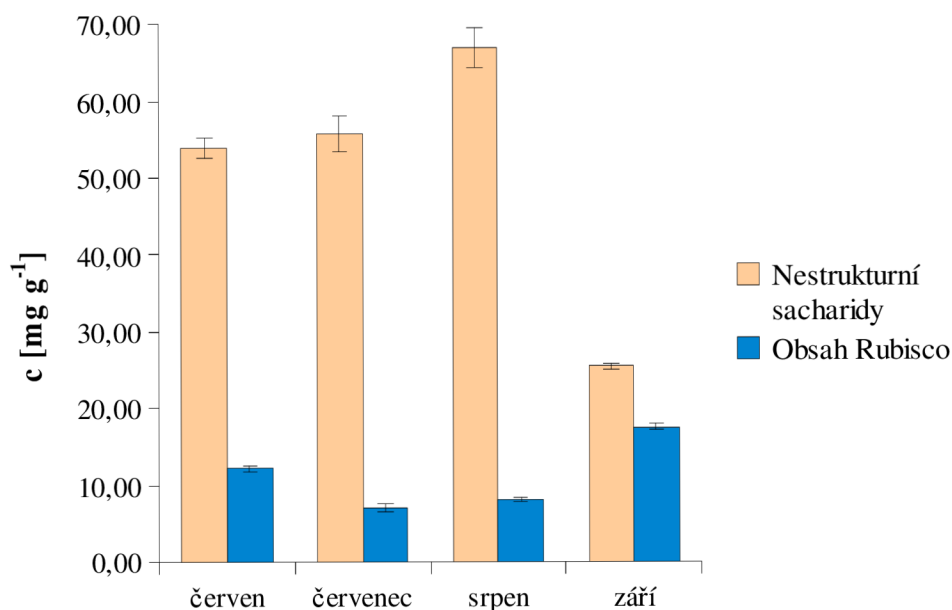
U jehlic kultivovaných při zvýšené koncentraci CO₂ došlo k poklesu obsahu listového dusíku oproti jehlicím, které byly kultivované při normální koncentraci oxidu uhličitého. Tento pokles byl při všech odběrech statisticky významný (Obr. 4.11). Rozdíl mezi variantami A a E činil v červenci 12 %, v srpnu a v září 15 %. Hodnota obsahu dusíku pro jehlice A odebírané v červnu chybí z důvodu chyby při mineralizaci.

4.1.5 Vliv nestrurných sacharidů na obsah Rubisco



Obr. 4.12 Srovnání obsahu nestrurných sacharidů a obsahu Rubisco u jehlic A v červnu, červenci, srpnu a září.

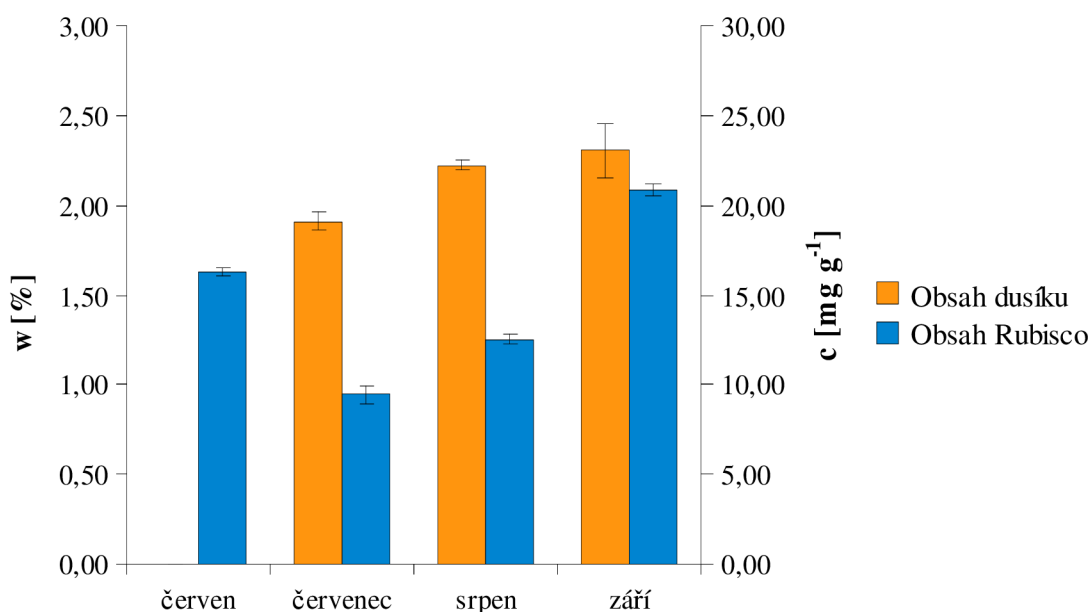
Na obrázku 4.12 lze vidět, že se vzrůstem obsahu nestrurných sacharidů poklesne obsah Rubisco a naopak.



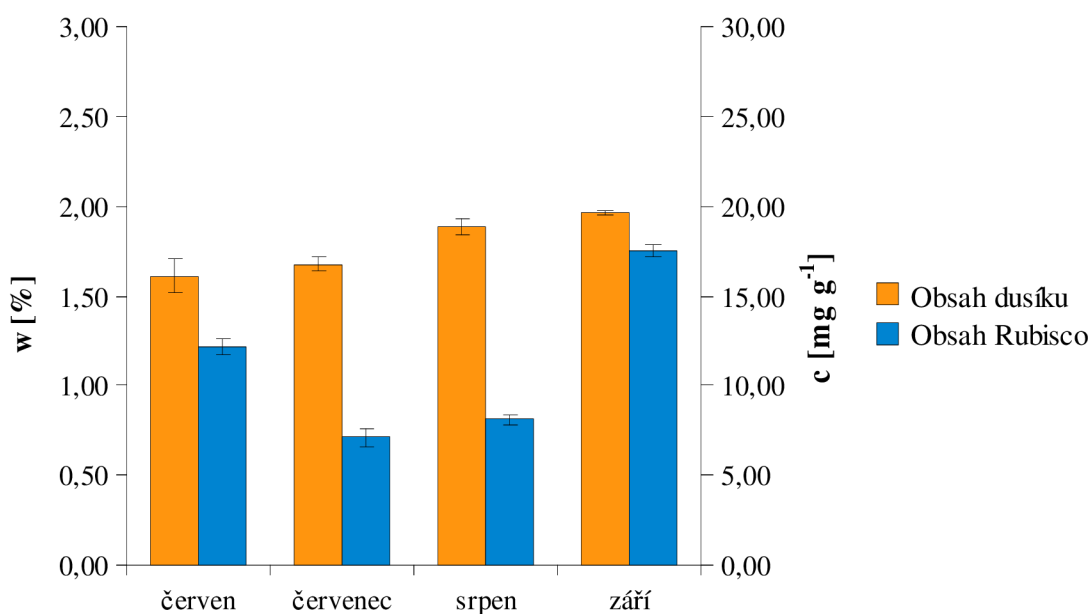
Obr. 4.13 Srovnání obsahu nestrurných sacharidů a obsahu Rubisco u jehlic E v červnu, červenci, srpnu a září.

Na obrázku 4.13 je vidět, že se zvyšující se koncentrací nestrurných sacharidů, klesá koncentrace Rubisco a naopak.

4.1.6 Vliv celkového listového dusíku na obsah Rubisco



Obr. 4.14 Srovnání obsahu listového dusíku a obsahu enzymu Rubisco u jehlic A v červnu, červenci, srpnu a září.



Obr. 4.15 Srovnání obsahu listového dusíku a obsahu enzymu Rubisco u jehlic E v červnu, červenci, srpnu a září.

Závislost obsahu enzymu Rubisco na obsahu celkového listového dusíku nebyla prokázána ani u jehlic kultivovaných při normální koncentraci CO₂, ani u jehlic kultivovaných při dvojnásobné koncentraci CO₂. V obou případech obsah dusíku neustále rostl, ale obsah Rubisco nevykazoval vzrůstající nebo klesající tendenci (Obr. 4.14, 4.15).

4.2 Diskuze

V předložené práci jsem studovala, zda: (1) V podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ dochází u smrku ztepilého k aklimační depresi obsahu a aktivity enzymu Rubisco. (2) Pokles obsahu Rubisco je důsledkem zvýšené koncentrace nestrukturních sacharidů v listech nebo poklesu obsahu listového dusíku.

Experiment byl prováděn u smrků kultivovaných při normální (A = 385 μmol mol⁻¹) a zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého (E = 700 μmol mol⁻¹). V průběhu experimentu byly čtyřikrát (v červnu, červenci, srpnu a září) odebrány vzorky jehlic a změřeny počáteční a celkové aktivity Rubisco, obsah tohoto enzymu, obsah listového dusíku a nestrukturních sacharidů.

Od června do září nastal statisticky významný pokles celkové, ale zejména počáteční aktivity Rubisco u varianty A. Naproti tomu ve stejném období nebyl zjištěn významný pokles aktivit u varianty E. Obdobné výsledky sezónního průběhu aktivit uvádí Bošková [101] u *Picea abies* z téže lokality. Tyto výsledky nás opravňují tvrdit, že u smrku ztepilého nedochází k aklimační depresi aktivity enzymu Rubisco vlivem zvýšené koncentrace CO₂, nýbrž že aktivita Rubisco je naopak vyšší koncentrací CO₂ stimulována. K podobnému závěru došli Tissue et al. [60], Myers et al. [103]. Naproti tomu Turnbull et al. [104] a Griffin et al. [72] u borovice montereyské (*Pinus radiata*), Rogers a Ellsworth [50] u borovice kadidlové (*Pinus taeda*) uvádějí, že došlo k aklimační depresi aktivity Rubisco. Podle Drakea et al. [33] je průměrné snížení aktivity enzymu Rubisco o 15 a 24 %.

Obsah Rubisco byl u všech odběrů významně nižší (o 16–35 %) u varianty E vzhledem k variantě A. Tato skutečnost ukazuje na výraznou aklimační depresi obsahu Rubisco u smrku ztepilého vlivem zvýšené koncentrace CO₂. Redukce obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ byla prokázána i jinými autory, např. Boškovou [101] u *Picea abies* z téže lokality. Tissue et al. [74] prokázali aklimační depresi u borovice těžké (*Pinus ponderosa*), Turnbull et al. [104] u borovice montereyské (*Pinus radiata*). Moore et al. [110] považují snížení obsahu enzymu Rubisco za jeden z nejvýznamnějších projevů fotosyntetické aklimace při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého. Drake et al. [33] zjistili, že průměrné snížení obsahu Rubisco je 15 % až 24 %, což je ve shodě s našimi výsledky.

Nejnižší hodnoty obsahu Rubisco byly naměřeny u obou variant v červenci a v srpnu, nejvyšší hodnoty v září. Pokles obsahu Rubisco v letních měsících mohl být způsoben suchým počasím, kdy dochází k uzavření průduchů, snížení obsahu CO₂ v listech a tím ke snížení intenzity fotosyntézy [65, 105]. Porovnáme-li sezónní změny obsahu Rubisco u smrku ztepilého a buku lesního (*Fagus sylvatica*), který byl předmětem studia mé bakalářské práce [19], mohu konstatovat, že u buku byl nejvyšší obsah enzymu na počátku vegetační sezóny (v červnu), kdy jsou listy v plném rozvinutí a v září byl naopak výrazně nižší. U smrku tomu bylo naopak. Tento jev je dán odlišnou strategií budování asimilačního aparátu u opadavých dřevin a jehličnanů. U jehličnatých stromů se fotosyntetický aparát vytváří na několik let, kdežto u listnatých stromů se buduje pouze na jeden rok [105].

Na základě našich měření lze konstatovat, že při působení zvýšené koncentrace CO₂ se sníží obsah enzymu Rubisco, ale zvýší se jeho aktivita. Tyto dva jevy se tedy zdají být antiparalelní.

Obsah nestrukturních sacharidů, u jehlic E se pohyboval v rozmezí 23,63 – 67,07 mg g⁻¹ a byl tak výrazně vyšší než u vzorků A, kde se obsah pohyboval mezi 13,31 – 23,40 mg g⁻¹. Naše výsledky jsou v souladu s měřením Cabáلكové et al. [89] a Teslové et al. [84], kteří

prezentovali zvýšení obsahu nestrukturních sacharidů při dlouhodobější kultivaci smrku ztepilého (*Picea abies*) při vyšší koncentraci CO₂. Také Poorter et al. [44] ve své práci popsali, že při dvojnásobném zvýšení koncentrace oxidu uhličitého se téměř dvojnásobně zvýší obsah nestrukturních sacharidů. Ke stejnému závěru došli i Würth et al. [106] u tropických druhů stromů.

Jestliže v srpnu byl obsah Rubisco u obou variant významně nižší než v červnu, obsah nestrukturních sacharidů v listech byl naopak významně vyšší. V září byla naproti tomu naměřena nízká hodnota obsahu nestrukturních sacharidů, ale vysoká hodnota obsahu Rubisco. Na základě našich měření lze tedy říci, že sezónní průběh obsahu Rubisco je antiparalelní k průběhu obsahu nestrukturních sacharidů, což podporuje teorii, že zvýšený obsah nestrukturních sacharidů v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ vede k represí exprese genů pro Rubisco a tím dojde k poklesu jeho obsahu [11].

Obsah listového dusíku byl u všech odběrů u varianty E významně nižší (o 12 – 15 %) než u varianty A, což je další významný projev aklimace smrku ztepilého na vyšší koncentraci CO₂. Naše výsledky potvrzují Luo et al. [43], kteří uvádějí pokles listového dusíku v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ o 15 – 20 %. Nižší obsah listového dusíku při zvýšené koncentraci CO₂ lze vysvětlit jednak nižším obsahem enzymu Rubisco, ale hlavně zředěvacím efektem v důsledku vyššího obsahu nestrukturních sacharidů. V průběhu vegetační sezóny obsah listového dusíku u obou variant mírně vzrůstal a nevykazoval žádnou korelaci s obsahem Rubisco. Obsah listového dusíku neměl tedy podle našich měření vliv na obsah enzymu Rubisco.

Jiná situace nastává při nedostatečném zásobení dusíkem. Stitt a Krapp [107] prezentovali, že při nedostatečném zásobení dusíkem dojde k redukci obsahu Rubisco. Makino [108] a Frak et al. [109] zase popsali úzkou závislost mezi obsahem Rubisco a obsahem dusíku při působení zvýšené koncentrace oxidu uhličitého.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo srovnat aktivitu a obsah enzymu Rubisco v jehlicích smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂, potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco, popř. popsat její průběh a zjistit vliv celkového dusíku a nestrukturních sacharidů na průběh obsahu a aktivity Rubisco.

Vzorky jehlic byly odebírány ze smrku ztepilého (*Picea abies* L.) kultivovaného při normální (A = 385 μmol mol⁻¹) a zvýšené (E = 700 μmol mol⁻¹) koncentraci oxidu uhličitého. Minisféry zajišťující podmínky odlišných koncentrací CO₂ se nacházejí na Experimentálním ekologickém pracovišti AV ČR na Bílém kříži v Moravskoslezských Beskydech. Odběry probíhaly v průběhu vegetačního období, a to 22.6.2010, 22.7.2010, 26.8.2010 a 29.9.2010.

U získaných vzorků byla stanovena počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco spektrofotometricky, obsah Rubisco metodou SDS-PAGE, obsah nestrukturních sacharidů anthronovou metodou a obsah listového dusíku metodou podle Kjeldahla.

Rozdíl mezi aktivitami Rubisco v A a E byl v červnu a v červenci statisticky nevýznamný. Zatímco u varianty A aktivita enzymu v průběhu sezóny postupně klesala, u varianty E nedošlo k významnému poklesu, takže v srpnu a v září byla aktivita u varianty E významně vyšší než u varianty A. Aktivita Rubisco u smrku ztepilého tedy v našem experimentu nevykazovala aklimaci na zvýšenou koncentraci CO₂, ale naopak byla zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého v průběhu vegetační sezóny stimulována.

Obsah enzymu Rubisco byl v průběhu celého vegetačního období u jehlic E statisticky významně nižší než u jehlic A, byla tedy prokázána aklimační deprese obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂.

Obsah nestrukturních sacharidů byl v průběhu celé vegetační sezóny významně vyšší u varianty E než u varianty A. Se vzrůstajícím obsahem nestrukturních sacharidů klesal obsah enzymu Rubisco a naopak, což podporuje teorii, že pokles obsahu Rubisco je způsoben hromaděním asimilátů, hlavně sacharidů, které způsobují represi exprese genů pro Rubisco a tím i pokles jeho obsahu.

Obsah listového dusíku byl ve všech odběrech u jehlic E významně nižší než u jehlic A. V průběhu vegetačního období obsah dusíku mírně vzrůstal a nevykazoval žádnou korelaci s obsahem enzymu Rubisco.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HÖNISCH, B., HEMMING, N., G., ARCHER, D., SIDDAL, M., McMANUS, J. F. Atmospheric carbon dioxide concentration across the Mid-Pleistocene transition. *Science*, 2009, **324**, s. 1551–1554.
- [2] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2., opravené vyd. (dotisk) Praha: Academia, 1999. ISBN 80 200-0438-6.
- [3] GLOSER, J. *Fyziologie rostlin*. Brno: Vydavatelství Masarykovy univerzity, 1995. ISBN 80-210-1062-2.
- [4] VOET, D., VOETOVÁ, J.G. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1990
- [5] SOFROVÁ, D., TICHÁ, M., BARTHOVÁ, J. ENTLICHER, G., STIBOROVÁ, M., NOVÁK, F., HUDEČEK, J., HLADÍK, J., KRAJHANZL, A. *Biochemie: základní kurz*. 3., vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-7184-936-7.
- [6] KLOUDA, P. *Základy biochemie*. 2., přepracované vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2005. ISBN 80-86369-11-0.
- [7] Primární proces fotosyntézy. Dostupné z:
<http://www.osel.cz/index.php?clanek=4596>
- [8] Calvinův cyklus. Dostupné z:
<http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/bch/09.ppt>
- [9] SPREITZER, R. J., SALVUCCI, M. E. Rubisco: Structure, Regulatory Interactions and Possibilities for a Better Enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, **53**, s. 449-475.
- [10] HARTMAN, F. C.; HARPEL, M. R. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, **63**, s. 197-234.
- [11] LEEGOOD, R.C., SHARKEY, T.D., VON CAEMMERER, S. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht 2000. ISBN 0-7923-6143-1.
- [12] WILDMAN, S., BONNER, J. The proteins of green leaves. Isolation, enzymatic properties, and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. *Arch. Biochem.*, 1947, **14**, s. 381-413.
- [13] WIESSBACH, A., SMYRNIOTIS, P. Z., HORECKER, B. L. Pentose phosphate and CO₂ fixation with spinach extracts. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, **76**, s. 3611-3612.
- [14] CALVIN, M., MASSINY, P. The path of carbon in photosynthesis. XX. The steady state. *Experientia*, 1952, **8**, s. 445-457.
- [15] QUAYLE, J. R., FULLER, R. C., BENSON, A. A., CALVIN, M. Enzymatic carboxylation of ribulose diphosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, **76**, s. 3610-3611.
- [16] BOWES, G., ORGEN, W. L., HAGEMAN, R. H. Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, **45**, s. 716-722.
- [17] LORIMER, G. H., ANDREWS, T. J., TOLBERT, N. E. Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction product and mechanism of action. *Biochemistry*, 1973, **12**, s. 18-23.

- [18] ANDREWS, T. J., LORIMER, G. H., TOLBERT, N. E. Ribulose disphosphate oxygenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction.1 protein of leaves. *Biochemistry*, 1973, **12**, s. 11-18.
- [19] VIČÍKOVÁ, M. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009, 48 s.
- [20] LORIMER, G. H. Ribulosebisphosphate carboxylase-aminoacid sequence of a peptide bearing the activator carbon dioxide. *Biochemistry*, 1981, **20**, s. 1236-1240.
- [21] LORIMER, G. H., BADEGR, M. R., ANDREWS, T. J. The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry*, 1976, **15**, s. 529-536.
- [22] GUTTERIDGE, S., GATENBY, A. A. Rubisco Synthesis, Assembly, Mechanism, and Regulation. *The Plant Cell*, 1995, **7**, s. 809–819.
- [23] WALBOT, V. Heavy metal impurities impair the Spectrophotometric assay of ribulose bisphosphate carboxylase activity. *Plant Physiol.*, 1977, **59**, s. 107–110.
- [24] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Dostupné z: http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb_11_2.html
- [25] Aktivní místo Rubisco. Dostupné z: <http://www.palaeos.com/Eukarya/Lists/EuGlossary/EuGlossaryP.htm>
- [26] Fotosyntéza, uhlíkový metabolismus. Dostupné z: http://kfr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_07-2009.pdf
- [27] ŠETLÍK, I.; SEIDLOVÁ, F.; ŠANTRŮČEK, J. *Fyziologie rostlin*. Biologická fakulta Jihočeské univerzity, 1998.
- [28] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. ISV Nakladatelství, Praha 2000. ISBN 80-85866-62-5.
- [29] GRIFFIN, K. L., SIMS, D. A., SEEMANN, J. R. Altered night-time CO₂ concentration affects the growth, physiology and biochemistry of soybean. *Plant, Cell Environ.*, 1999, **22**, s. 91–99.
- [30] 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, **45**, s. 163–169.
- [31] MAREK, M. V., ŠPRTOVÁ M., KALINA J.: The photosynthetic irradiance-response of Norway spruce exposed to a long-term elevation of CO₂ concentration. *Photosynthetica*, 1997, **33**, s. 259–268.
- [32] van OOSTEN, J. J., BESFORD, R. T. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ through feedback regulation of gene expression: Climate of opinion. *Phosynth. Res.*, 1996, **48**, s. 353–365.
- [33] 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, **48**, s. 609–639.

- [34] 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, **33**, s. 443–446.
- [35] KNAPP, A. K., COCKE, M., HAMERLYNCK, E. P., OWENSBY C., E. Effect of elevated CO₂ on stomatal density and distribution in a C₄ grass and C₃ forb under field conditions. *Ann. Bot.*, 1994, **74**, s. 595–599.
- [36] WOODWARD, R. I., KELLY, C. The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytol.*, 1995, **131**, s. 311–327.
- [37] McDOWELL, N. G., MARSHALL, J. D., QI, J., MATTSON, K. Direct inhibition of maintenance respiration in western hemlock roots exposed to ambient soil carbon dioxide concentrations. *Tree Physiol.*, 1999, **19**, s. 599–605.
- [38] KOHEN, A. E., PONTAILLER, J.-Y., MOUSSEAU, M. Efect d'un doublement du CO₂ atmosphérique sur la respiration à l'obscurité des parties aériennes de jeunes châtaigniers. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1991, **312**, s. 477–481.
- [39] 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, **33**, s. 443–446.
- [40] HERTOOG, den J., STULEN, I. LAMBERS, H. Assimilation, respiration and allocation of carbon in *Plantago major* as affected by atmospheric CO₂ levels. *Vegetatio*, 1993, **104/105**, s. 369–378.
- [41] AMTHOR, J. S., KOCH, G. W., BLOOM, A. J. CO₂ inhibits respiration in leaves of *Rumex crispus* L. *Plant Physiol.*, 1992, **98**, s. 757–760.
- [42] 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, **112**, s. 1349–1355.
- [43] LUO, Y., FIELD, C. B., MOONEY, H. A.: Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated [CO₂] and interactions among carbon, nitrogen, and growth. *Plant, Cell, Environ.*, 1994, **17**, s. 1195–1204.
- [44] POORTER, H., BERKEL, van Y., BAXTER, R., HERTOOG, den J., DIJKSTRA, P., GIFFORD, R. M., GRIFFIN, K. L., ROUMET, C., ROY, J., WONG, S. C. The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant, Cell, Environ.*, 1997, **20**, s. 472–482.
- [45] HATTENSCHWILLER, 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, **3**, s. 463–471.
- [46] SAXE, H., ELLSWORTH, D. S., HEATH, J. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytol.*, 1998, **139**, s. 395–436.
- [47] RODEN, J. S., EGERTON, J. J., G., BALL, M. C. Effect of elevated (CO₂) on photosynthesis and growth of snow gum (*Eucalyptus pauciflora*) seedlings during winter and spring. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1999, **26**, s. 37–46.
- [48] 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, **114**, s. 337–344.

- [49] MAREK, M. V., KALINA, J., MATOUŠKOVÁ, M. Response of photosynthetic carbon assimilation of Norway spruce exposed to long-term elevation of CO₂ concentration. *Photosynthetica*, 1995, **31**, s. 209–220.
- [50] 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, **52**, s. 1555–1561.
- [51] Gazometrické stanovení fotosyntetických parametru [online], 2008 [cit. 2011–02-23]. Dostupné z: http://kfr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_U05-Gazometrie-2008.pdf.
- [52] ŠESTÁK, Z., ČATSKÝ, D.T., JARVIS, P. *Plant photosynthetic production. Manual of methods*. Dr. W. Junk Publishing, The Hague 1971.
- [53] Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy gazometricky [online], 2009, [cit. 2011–02-23]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/gazometrie.pdf>.
- [54] HNILIČKA, F. *Fyziologie rostlin cvičení: Fotosyntéza-metody* [online], 2005 [cit. 2011–02-24]. Dostupné z: <http://kbfr.agrobiologie.cz/kbfr/hnilicka/prednasky/fyziologie-rostlin/fyznemrostlin/metody/metodyfoto.pdf>.
- [55] Gazometrické metody. Dostupné z: http://www.usbe.cas.cz/upload/UserFiles/File/USBE/USBE-download/EKOFYZIOLOGIE_V.pdf
- [56] REID, C. D., TISSUE, D. T., FISKUS, E. L., STRAIN, B. R. Comparison of spectrophotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. *Physiol. Plant.*, 1997, **101**, s. 398–404.
- [57] PETRŮ E., *Závislost aktivity a množství enzymu Rubisco na ozáření*. Diplomová práce VUT, Brno 2005.
- [58] LILLEY, R.M., WALKER, D.A. An improved spectrophotometric assay for ribulose carboxylase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1997, **358**, s. 226–229.
- [59] BESFORD, R.T. Some properties of Ribulose bisphosphate carboxylase extracted from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1984, **35**, s. 495–504.
- [60] 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 Environ.*, 1993, **16**, s. 859–865.
- [61] KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní cvičení z biochemie*. 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000, 203 s. ISBN 80-7182-104-7.
- [62] Struktura polyakrylamidového gelu. Dostupné z: <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-19.jpg>
- [63] FERREIRA, R. B., ESQUÍVEL, M. G., TEIXEIRA, A. R. An accurate method to quantify ribulose bisphosphate corboxylase content in plant tissue. *Plant, Cell Environ.*, 2000, **23**, s. 1329–1340.

- [64] BESFORD, R. T. The greenhouse effect: Acclimation of Tomato plants growing in high CO₂, relative changes in Calvin cycle enzymes. *J. Plant Physiol. Vol.*, 1990, **136**, s. 458–463.
- [65] NIE, G. Y., LONG, S. P., GARCIA, R. L., KIMBALL, B. A., LAMORTE, R. L., PINTER, P. J., WALL, G. W., WEBBER, A. N. Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant, Cell, Environ.*, 1995, **18**, s. 844–854.
- [66] HRSTKA, M., ZACHOVÁ, L., URBAN, O., KOŠVANCOVÁ, M. Seasonal changes of Rubisco activity and its content in norway spruce exposed to ambient an elevated CO₂ concentration. *Chem. Listy*, 2008, **102**, s. 657–659.
- [67] KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*, 1997, **91**, s. 320–329.
- [68] WARREN, C. R. The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO₂ movement is increased by nutrient supply. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**, s. 2313–2321.
- [69] SOMMER, L. a kolektiv: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. VUT v Brně: nakladatelství VUTIUM, 2000.
- [70] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s.132, ISBN 80-86369-07-2
- [71] KOBZA, J., SEEMANN, J. R. Mechanism for the light regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **85**, s. 3815–3819
- [72] GRIFFIN, K. L., TISSUE, D. T., TURNBULL, M. H., WHITEHEAD, D. The onset photosynthetic acclimation to elevated CO₂ partial pressure in field-grown *Pinus radiata* D. Don. after 4 years. *Plant, Cell and Environ.*, 2000, **23**, s. 1089–1098.
- [73] SHARKEY, T. D., SEEMANN, J. R., BERRY, J. A. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changing partial pressure of O₂ and light in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.*, 1986, **81**, s. 788–791.
- [74] 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, **19**, s. 221–228.
- [75] *Struktura chloroplastu*. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/figures/chloroplast.01.jpg
- [76] NASSOURY, N., LAWRENCE, F., MORSE, D. Circadian Changes in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Distribution Inside Individual Chloroplasts Can amount for the Rhythm in Dinoflagellate Carbon Fixation. *The Plant Cell*, 2001, **13**, s. 923–934.
- [77] METODIEV, M., DEMIREVSKA-KEPOVA, K. Rubisco quantitation in leaves of different barley varieties by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Experimental Botany*, 1992, **43**, s. 155–158
- [78] *Sacharidy* [online]. 2009 [cit. 2011-03-02]. Dostupné z: <http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Carbohydrates.html>
- [79] *Polarimetrie*. Dostupné z: <http://www.kch.zcu.cz/cz/di/sks/07-POLARIMETRIE.pdf>

- [80] DREYWOOD, R. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. in Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1946, **18**, s. 499.
- [81] VILES, F.J., SILVERMAN, L. Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Analytical Chemistry*, 1949, **21**, s. 950–953.
- [82] YEMM, E.W., WILLIS, A.J. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochemical Journal*, 1954, **57**, s. 508–514.
- [83] GROSPIETSCH, M. Stanovení rostlinného škrobu modifikovanou antronovou metodou, s využitím chloralhydrátu jako rozpouštědla. *Methods in Plant Sciences*, 1997, **11**, s. 39–40.
- [84] TESLOVÁ, P., KALINA, J., URBAN, O. Simultánní stanovení obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu v listech vyšších rostlin metodou využívající anthronového činidla. *Chem. Listy*, 2010, **104**, s. 867–870.
- [85] ČOPÍKOVÁ, J. *Chemie a analytika sacharidů*. VŠCHT Praha, 1997, ISBN 80-7080-306-1.
- [86] STEINBACHOVÁ-VOJTÍŠKOVÁ, L., TYLOVÁ, E., SOUKUP, A., NOVICKÁ, H., VOTRUBOVÁ, O., LIPAJSKÁ, H., ČÍŽKOVÁ, H. Influence of nutrient supply on growth, carbohydrate and nitrogen metabolic relations in *Typha angustifolia*. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, **57**, s. 246–257.
- [87] LIPAJSKÁ, H., SVOBODOVÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J., KUMŠTÝŘOVÁ, L., VÁGNER, M., VONDRÁKOVÁ, Z. Carbohydrate status during somatic embryo maturation in norway spruce. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2000, **36**, s. 260–267.
- [88] KONRÁDOVÁ, H., GRIGOVÁ, M., LIPAJSKÁ, H. Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of norway spruce. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2003, **39**, s. 425–427.
- [89] CABÁLKOVÁ, J., WAHLUND, K.-G., CHMELÍK, J. Complex analytical approach to characterization of the influence of carbon dioxide concentration on carbohydrate composition in Norway spruce needles. *Journal of chromatography A*, 2007, **1148**, s. 189–199.
- [90] SVOBODOVÁ, H., LIPAJSKÁ, H., ALBRECHTOVÁ, J. Non-structural carbohydrate status in Norway spruce buds in the context of annual bud structural development as affected by acidic pollution. *Environmental and Experimental Botany*, 2000, **43**, s. 253–265.
- [91] POMERANZ, Y., MELOAN, C. E. *Food analysis: theory and practice*. 3rd Ed. New York: Chapman and Hall, 1994. 778 s. ISBN 04-129-8551-9.
- [92] DAVÍDEK, J. et al. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977.
- [93] WILIAMS, P. C. Determination of total nitrogen in feeding stuffs. *Analyst*. 1964, **89**, s. 276–281.
- [94] HRSTKA, M., VESPALCOVÁ, M. *Praktikum z analytické chemie potravin*. Brno: VUT, 2006, 57 s.
- [95] Bílkoviny [online]. [cit. 2011-03-10]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/zkp/ustav/skripta/AP/02/AP_4.pdf

- [96] URBAN O., JANOUŠ D., POKORNÝ R., MARKOVÁ I., PAVELKA M., FOJTÍK Z., ŠPRTOVÁ M., KALINA J., MAREK M.V. Glass domes with adjustable windows: A novel technique for exposing juvenile forest stands to elevated CO₂ concentration. *Photosynthetica*, 2001, **39**, s. 395–401.
- [97] Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR. Dostupné z: http://www.usbe.cas.cz/lefr/img/galerie/kultivacni_sfery/sfery_1.jpg
- [98] DAMERVAL, C., VIENNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT H. Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis*, 1986, **7**, s. 52–54.
- [99] FLORIÁN, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenazy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Diplomová práce VUT, Brno 2006.
- [100] HLAVÁČEK, V. *Stanovení obsahu enzymu Rubisco v listech*. Bakalářská práce VUT, Brno 2011.
- [101] SCOTT, T.A., MELVIN, E.H. Determination of Dextran with Anthrone. *Analytical Chemistry*, 1954, **25**, s. 1656–1661.
- [102] BOŠKOVÁ, M. *Vliv stáří jehlic na obsah a aktivitu enzymu Rubisco u smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂*. Diplomová práce VUT, Brno 2009.
- [103] 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, Environ.*, 1999, **22**, s. 473–481.
- [104] 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, Environ.*, 1998, **21**, s. 1019–1028.
- [105] MAKINO, A., MAE, T. Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant Cell Physiol.*, 1999, **40**, s. 999–1006.
- [106] WÜRTH, K., R., M., WINTER, K., KÖRNER, CH. Leaf carbohydrate responses to CO₂ enrichment at the top of a tropical forest. *Oecologia*. 1998, **116**, s. 18–25.
- [107] STITT, M., KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environ.*, 1999, **22**, s. 583–621.
- [108] MAKINO, A. Rubisco and nitrogen relationships in rice: Leaf photosynthesis and Plant Growth. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 2003, **49**, s. 319–327.
- [109] FRAK, E., LE ROUX, X., MILLARD, P. et al. Changes in total leaf nitrogen and partitioning of leaf nitrogen drive photosynthetic acclimation to light in fully developed walnut leaves. *Plant, Cell and Environ.*, 2001, **24**, s. 1279–1288.
- [110] MOORE, B.D., CHENG, S.H., SIMS, D., SEEMANN, J.R. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environ.*, 1999, **22**, s. 567–582.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

3-KABP	3-keto-D-arabinitol-1,5-bisfosfát
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
CA1P	2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát
CAM	crassulacean acid metabolism
CF ₀ , CF ₁	podjednotky ATP-synthasa
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EIA	enzym immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GAP	glyceraldehydfosfát
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IRGA	infračervený analyzátor plynů
LHC	light harvesting complex
MF	mobilní fáze
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
Na ₂ EDTA	ethylendiamintetraoctan disodný
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
Pi	anorganický fosfát
P _{I,II}	fotosystém I, II
RNA	ribonukleová kyselina
R5P	ribosa-5-fosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za užití SDS
SF	stacionární fáze
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	D-xylulosa-1,5-bisfosfát