

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vliv atmosférické koncentrace CO₂ na vývoj průduchů

Diplomová práce

Bc. Václav Fiala

Školitel: prof. Ing. Jiří Šantrůček, CSc.

České Budějovice 2015

Fiala, V. 2015: Vliv atmosférické koncentrace CO₂ na vývoj průduchů. [The Impact of Atmospheric Concentration CO₂ on the Development of the Stomata. Mgr. Thesis, in Czech] – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Stomatal density (SD) and stomatal index (SI) are the parameters that are used to reconstruct the paleoclimate. Understanding the environmental factors that affect these values can make the predictive value of the stomata analysis more accurate. In this thesis, I tested the effect of different soil moisture and CO₂ concentration in the stomata.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 10. 12. 2015

.....
Bc. Václav Fiala

Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat svému školiteli prof. Jiřímu Šantrůčkovi nejen za jeho odborné vedení a trpělivost během mé práce, ale především za jeho lidskost a vřelost. Dále chci poděkovat Ing. Marii Hronkové, Mgr. Martině Hrádkové, Mgr. Jitce Neuwirthové a Mgr. Ladislavu Markovi za podnětné rady i praktickou pomoc při práci v laboratoři a ostatním členům katedry experimentální biologie rostlin za vytvoření rodinné atmosféry. V neposlední řadě patří velké poděkování také mé manželce Soně za podporu psychickou.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	1
1. ÚVOD	2
1.1 CHARAKTERISTIKA UHLÍKU A JEHO IZOTOPŮ	2
1.1.1 KOLOBĚH UHLÍKU V PŘÍRODĚ	3
1.1.2 IZOTOPY UHLÍKU, JEJICH DISKRIMINACE A FRAKCIONACE	4
1.2 ATMOSFÉRA ZEMĚ	6
1.2.1 CHARAKTERISTIKA ZEMSKÉ ATMOSFÉRY	6
1.2.2 ZMĚNY VE SLOŽENÍ ATMOSFÉRY V MINULÝCH GEOLOGICKÝCH DOBÁCH	7
1.2.3 VÝVOJ TEPLoty A [CO ₂] NA ZEMI	9
1.2 VZNIK A EVOLUCE PRŮDUCHŮ	12
1.3 STAVBA PRŮDUCHŮ A JEJICH VÝVOJ BĚHEM ONTOGENEZE ROSTLINY	14
1.4 FUNKCE PRŮDUCHŮ	18
1.5 MECHANISMUS POHYBU PRŮDUCHŮ	19
1.6 EKOFYZIOLOGICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRŮDUCHY, JEJICH FUNKCI A VÝVOJ	20
1.6.1 SVĚTLO	20
1.6.2 DOSTUPNOST VODY A VZDUŠNÁ VLHKOST	23
1.6.3 VLIV KONCENTRACE CO ₂	24
1.7 REKONSTRUKCE PALEOKLIMATU	24
1.7.1 ZÍSKÁVÁNÍ A VYUŽITÍ PROXY DAT	26
1.7.2 VYUŽITÍ PRŮDUCHŮ PŘI REKONSTRUKCI PALEOKLIMATU	29
2. CÍLE PRÁCE	31
3. MATERIÁL A METODY	31
3.1 KULTIVACE ROSTLIN	31
3.2 SKLIZEŇ A PŘÍPRAVA VZORKŮ	33
3.3 MIKRORELIÉFOVÉ OTISKY PRŮDUCHŮ	34
3.4 ANALÝZA STABILNÍCH IZOTOPŮ UHLÍKU	35
3.5 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	35

4. VÝSLEDKY	35
4.1 VODNÍ POTENCIÁL	35
4.2 NÁRŮST BIOMASY ROSTLIN V ZÁVISLOSTI NA KONCENTRACI CO₂	36
4.3 ZÁVISLOST SI A SD NA KONCENTRACI CO₂	38
4.4 ANALÝZA STABILNÍCH IZOTOPŮ UHLÍKU	41
5. DISKUZE	44
5.1 VODNÍ POTENCIÁL	44
5.2 NÁRŮST BIOMASY	44
5.3 SI A SD	45
5.4 ANALÝZA STABILNÍCH IZOTOPŮ UHLÍKU	47
6. ZÁVĚR	48
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
8. PŘÍLOHA	58

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Název
ABA	Kyselina abscisová
CAM	<i>Crassulacean acid metabolism</i>
C_i	Koncentrace CO_2 uvnitř listu ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
$[CO_2]$	Atmosférická koncentrace oxidu uhličitého ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
GC	<i>Guard Cell</i> , svěrací buňka
GMC	<i>Guard Mother Cell</i> , mateřská svěrací buňka
MECO	<i>Middle Eocen Climatic Optimum</i>
MMC	<i>Meristemoid Mother Cell</i> , meristemoidní mateřská buňka
PBD	PeeDee Belemnite, standard pro izotopové analýzy uhlíku
PEPC	Fosfoenylpyruvát karboxylázu
PETM	Paleocén-eocén teplotní maximum
RH	<i>Relative humidity</i> , relativní vzdušná vlhkost (%)
RUBISCO	Enzym ribulóza 1-5 bisfosfát karboxyláza oxygenáza
SD	Průduchová hustota
SI	Průduchový index
SLGC	<i>Stomatal lineage ground cell</i>
SWC	<i>Soil Water Capacity</i>
THC	Termohalinní cirkulace
δ	Izotopový poměr, množství izotopu vzhledem ke standardu
$^{12}C, ^{13}C$	Stabilní izotopy uhlíku lišící se 1 neutronem

1. ÚVOD

Od kolonizace souše rostlinami uplynulo více než 400 milionů let. Za tuto dobu získaly rostliny mnoho adaptačních mechanismů, které jim pomáhají vyrovnávat se s neustálými změnami klimatu. V průběhu vývoje Země docházelo k různým událostem, které rostliny přímo či nepřímo ovlivnily. Jeden příklad za všechny, v poslední době velmi diskutovaný, je měnící se koncentrace oxidu uhličitého, CO₂, v atmosféře. Uhlík, jeden z klíčových prvků na Zemi, přijímají rostliny právě z atmosféry. Potřebují ho pro vlastní růst, neboť jej zabudovávají do svého těla. S příjmem CO₂ však rostlina zároveň ztrácí vodu ve formě páry, neboť to se děje stejnou cestou – přes průduchové póry. Rostliny jsou proto vybaveny regulačními mechanismy, a to na úrovni genové (např. gen TMM, *too many mouth*), biochemické (působení hormonu ABA) či morfologické (tvar svěracích buněk). Na změnu koncentrace CO₂ v atmosféře reaguje rostlina např. úpravou velikosti průduchů a jejich počtem.

Tyto skutečnosti nám pomáhají nejen lépe rozumět dějům probíhajícím uvnitř rostliny, ale mají své využití přesahující obor fyziologie rostlin. Jakožto důležitá složka klimatu, je CO₂ studován také klimatologem. Ti se na základě vývoje CO₂ v geologické minulosti Země snaží modelovat další jeho vývoj a vliv na život. Nicméně člověk je zde poměrně krátce, nemohl tak zaznamenávat koncentraci CO₂ v různých geologických epochách. To za nás udělala příroda sama. Po miliony let uchovávala obraz klimatu své doby v různých formách a my je dnes dešifrujeme pomocí sofistikovaných moderních metod. Příkladem je analýza stabilních izotopů kyslíku v ledových jádrech nebo právě průduchy z rostlinných fosilií.

Tato práce tedy propojuje tři samostatná témata: 1) koloběh uhlíku v přírodě s důrazem na CO₂ v atmosféře v minulých geologických dobách a v současnosti; 2) morfologie rostlinných průduchů a ekofyziologické faktory (zejm. CO₂), které je ovlivňují; 3) využití vztahu mezi koncentrací CO₂ a průduchy v paleoklimatologii.

1.1 Charakteristika uhlíku a jeho izotopů

Uhlík (**C**, *Carboneum*) je chemický prvek, který je základem všech organických sloučenin. Patří mezi biogenní prvky, tedy nezbytné pro život. Například na hmotnosti lidského těla se podílí z 18,5 %. V čistém stavu jej můžeme nalézt ve třech různých formách – jako diamant, grafit a fullerén. Tyto tři formy se od sebe liší vnitřním uspořádáním atomů uhlíku, což určuje jejich odlišné vlastnosti.

Uhlík se mnohem častěji vyskytuje vázaný v různých sloučeninách. Pro život mají velký význam jak sloučeniny anorganické (např. CO₂) tak organické (např. aminokyseliny). Uhlíkový cyklus – tok uhlíku v biosféře, atmosféře, hydrosféře a jeho přeměny jsou proto hlavním zájmem biogeochemie.

1.1.1 Koloběh uhlíku v přírodě

Největším zásobníkem uhlíku v přírodě je oceán. Oceán obsahuje 50x více rozpuštěného oxidovaného uhlíku, než atmosféra (Archer & Brovkin, 2008). Uvádí se, že oceány obsahují kolem 38 000 gigatun uhlíku (Gt, miliard tun), zatímco v atmosféře „pouze“ 750 Gt (Metelka & Tolasz, 2009). S koloběhem uhlíku je úzce spojeno oceánické termohalinní proudění¹. Studené vody pohlcují CO₂, který „klesá do těžší a chladnější vody ke dnu a je dopravován po celém světě. V blízkosti rovníku může pomocí teplých zdviží vystupovat a zahřátá voda jej uvolňuje“ (Soukupová, 2013). Uhlík obsažený hluboko v oceánech je součástí dlouhodobého koloběhu (s pomalým obratem), na krátkodobém koloběhu se podílí svrchní část mořského sloupce.

Z hlediska krátkodobých zásobníků uhlíku jsou však nejdůležitější suchozemské ekosystémy. Rostliny absorbují a přeměňují CO₂ v rámci fotosyntézy (část CO₂ se vrací zpět do atmosféry vlivem respirace). Zabudovaný uhlík v rostlinném těle se stává energetickým zdrojem pro živočichy a jiné heterotrofní organismy. Do půdy se dostává uhlík exkrementy a rozkladem rostlinných a živočišných těl (ve formě humusu), část uhlíku je při rozkladu mikroorganismy vrácena zpět do atmosféry (půdní dýchání) ve formě CO₂. V půdě nalezneme uhlík také v anorganických sloučeninách, např. v uhličitanech. Do atmosféry se CO₂ dostává rovněž lidskou činností, tj. intenzivní orbou nebo změnami ve využívání půdy (oboje stimuluje obrat půdní organické hmoty), odlesňováním a spalováním fosilních paliv.

¹ Voda moří a oceánů se pohybuje vlivem přitažlivosti Měsíce a mořskými proudy. Ty mohou být teplé a oteplovat pevninu, nebo studené a ochlazovat vzduch. Tomuto systému oceánického proudění říkáme termohalinní výměník nebo termohalinní cirkulace (THC). Název je odvozen od slov termo- (teplota) a halinní (solný) a poukazuje na skutečnost, že jsou to právě tyto dvě vlastnosti vody (resp. jejich rozdíly), které pohánějí proudění. Kolaps THC mohl být jednou z možných příčin náhlých klimatických změn v minulosti (Higgins & Vellinga, 2004).

1.1.2 Izotopy uhlíku, jejich diskriminace a frakcionace

Prvky jsou charakterizovány protonovým číslem, které je pro daný prvek neměnné. Atom téhož prvku se však může lišit počtem neutronů, takový pak nazýváme izotopem daného prvku. Počet protonů a neutronů (tedy nukleonů) vyjadřujeme nukleonovým (též hmotnostním) číslem. Z toho plyne, že izotopy téhož prvku nemají stejnou atomovou hmotnost. Nejčastějším izotopem uhlíku je stabilní izotop ^{12}C , který je v přírodě zastoupen v 98,892 %. Stabilní izotop ^{13}C je těžší a v přírodě má 1,108% zastoupení. Známý jsou i další izotopy uhlíku (^{14}C , ^{11}C), které jsou radioaktivní.

Již téměř před osmdesáti lety vědci zjistili, že rostlinné tělo je ve srovnání s $^{13}\text{CO}_2$ v atmosféře ochuzeno o izotop ^{13}C . Vzhledem k tomu, že uhlík v rostlinném těle pochází z fotosyntetické asimilace, je zřejmé, že v průběhu fotosyntézy dochází k ochuzení rostlinné biomasy o těžší izotop ^{13}C . Tento proces nazýváme diskriminací izotopu ^{13}C , obecně pak izotopovou frakcionací (Šantrůček *et al.*, 2014a). Proč však rostliny odmítají těžší uhlík a jak?

V první řadě je potřeba mít na paměti, že rostliny mají různé cesty pro fixaci CO_2 . Podle způsobu fixace CO_2 rozlišujeme rostliny na C3, C4 a CAM. Hlavním rozdílem mezi C3 a C4 rostlinami je především primární akceptor CO_2 a jeho následný metabolismus. Tzv. C3 rostliny fixují CO_2 pomocí enzymu ribulóza 1-5 bisfosfát karboxyláza oxygenáza (RUBISCO) v chloroplastech, zatímco C4 rostliny využívají enzym fosfoenylpyruvát karboxylázu (PEPC) už v cytosolu buněk. CAM fixují CO_2 podobně jako C4 rostliny. Zásadně se liší tím, že je fixují v noci. Zajímavá je skutečnost, že míra diskriminace je mezi C3, C4 a CAM rostlinami odlišná.

Rozdíly v izotopovém složení však nejsou příliš velké, vyjadřujeme je proto ve srovnání ke standardu pomocí veličiny δ (malé delta) jako relativní izotopový poměr:

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{vzorek}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \cdot 1000 [\text{‰}] \quad (1)$$

kde R je poměr obsahu (koncentrace) těžšího izotopu k lehčímu, např. pro uhlík $R = [^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$. Je-li hodnota δ negativní, pak má vzorek oproti standardu méně těžších izotopů. Jako standard se při izotopových analýzách uhlíku užívá tzv. PeeDee Belemnite (PBD) jehož izotopový poměr $R_s = 1,1180 \cdot 10^{-2}$. V biologii se však častěji setkáme s veličinou zvanou **izotopová diskriminace**, značenou velkým delta, Δ , protože vyjadřuje

změnu izotopového signálu během určité reakce, v našem případě fotosyntetické asimilace. Δ tedy popisuje změnu v izotopovém složení rostliny (δ_p , index p z anglického *plant* tj. rostlina) oproti atmosféře (δ_a). Vyjádřit ji můžeme vztahem:

$$\Delta (\text{‰}) = \frac{\delta_a - \delta_p}{1 - \frac{\delta_a}{1000}} \cong \delta_a - \delta_p \quad (2)$$

Počátkem osmdesátých let minulého století Farquhar a spolupracovníci odhalili mechanismus, který vede k tomu, že rostlinná hmota je ochuzena o ^{13}C a souhrnně a zjednodušeně jej vyjádřili následujícím vztahem pro izotopovou diskriminaci ^{13}C , Δ :

$$\Delta (\text{‰}) = a + (b-a) \cdot \left(\frac{c_i}{c_a}\right) \quad (3)$$

kde písmenem **a** označujeme diskriminaci $^{13}\text{CO}_2$ během difuze (viz dále), **b** značí diskriminaci během karboxylace a **c** koncentraci (c_i = intracelulární prostory, c_a = atmosféra).

K ochuzení těžšího izotopu uhlíku dochází při kinetické frakcionaci během difuze a následně během karboxylace. Rostlina přijímá $[\text{CO}_2]$ difúzí, přes otevřené průduchy. Jelikož molekuly $^{13}\text{CO}_2$ a $^{12}\text{CO}_2$ mají rozdílnou pohyblivost, difunduje těžší molekula CO_2 pomaleji, což vede k ochuzení vzduchu uvnitř listu o $^{13}\text{CO}_2$. Hodnota tohoto ochuzení (frakcionačního faktoru) je vypočítána na 4,4 ‰ (Šantrůček *et al.*, 2014).

Další „překážkou“ je samotná karboxylace. Molekuly CO_2 rozpuštěné ve vodném prostředí buněk, které doputují k chloroplastům, se za pomoci enzymu RUBISCO vážou na pentózu (ribuloza-1,5-bisfosfát). Zde je molekula $^{13}\text{CO}_2$ opět diskriminována s frakcionačním faktorem 29 ‰. Protože i C_3 rostliny získávají část (asi 10 ‰) uhlíku pomocí enzymu PEPC, u něhož je frakcionační faktor výrazně nižší (2 ‰), je skutečný frakcionační faktor pro fotosyntetickou karboxylaci u C_3 rostlin poněkud nižší (má hodnotu 27 ‰).

Tyto frakcionační faktory jsou neměnnou veličinou bez ohledu na rozmanitost vnějších podmínek. Rostliny jsou ale živé organismy, které na vnější podmínky pružně

reagují, například mírou průduchové vodivosti. Důsledkem je pak zvýšená nebo naopak snížená vnitřní koncentrace CO_2 (c_i). Jsou-li průduchy otevřené a rostlina může hojně přijímat CO_2 , bude si „vybírat“ izotopově lehčí molekulu a o izotop ^{13}C tak bude ochuzena ve srovnání s vnější atmosférou. Naproti tomu v případě, kdy jsou vlivem nedostatku vody průduchy přivřené a uvnitř listu je tak nižší koncentrace CO_2 , je zvýšená pravděpodobnost využití i těžší molekuly. Tento princip má své využití mimo jiné v paleoklimatologii.

1.2 Atmosféra Země

Klima (podnebí) tvoří systém s charakteristickým režimem počasí v dané oblasti. Do tohoto systému náleží řada dílčích složek – atmosféra, pedosféra, biosféra, hydrosféra, jejich vzájemné vazby a interakce, sopečná aktivita a činnost člověka. Klima chápeme jako poměrně stabilní vlastnost prostředí. Mění se totiž za delší časové období, oproti počasí, které je mnohem proměnlivější. Přesto prošlo klima za miliony let historie Země výraznými změnami, které měly vliv na organismy i život samotný. Je zřejmé, že pro pochopení procesů podílejících se na vytváření klimatu je důležitá znalost vývoje a dějů odehrávajících se ve všech složkách klimatického systému. Tato práce se však zabývá koncentrací CO_2 coby složkou atmosféry, proto je atmosféře věnována hlavní pozornost. Ostatní složky jsou zmíněny jen okrajově.

1.2.1 Charakteristika zemské atmosféry

Atmosféra je plynný obal těles ve vesmíru, tedy i Země má svoji atmosféru. Existence atmosféry přesto není samozřejmostí u všech vesmírných těles. Nutným předpokladem je dostatečné gravitační působení tělesa na plynný obal (Schlesinger, 1997). Atmosféru můžeme rozdělit do několika vrstev, které se liší např. složením nebo teplotou.

Atmosféra Země je tvořena směsí plynů. Nejvíce je obsažen dusík (~78%), dále kyslík (~21%), argon (~0,9%) a oxid uhličitý (~0,04%). Toto poměrné zastoupení bývá dosti stabilní do výšky asi 100 kilometrů. Naopak prostorově proměnlivá může být vodní pára, ozon a některé plyny antropogenního původu. Protože v přírodě probíhají neustále různé procesy mezi atmosférou a ostatními klimatickými složkami, čistá atmosféra (bez obsahu jakýchkoli jiných látek) prakticky neexistuje. Některé plyny a částice způsobují tzv. skleníkový efekt. Díky svým vlastnostem (absorpci infračerveného záření) zadržují energii slunečního záření na Zemi a tím ji oteplují. Hlavními skleníkovými plyny jsou vodní pára, oxid uhličitý, metan, ozón a oxid dusný. Metan a oxid uhličitý jsou součástí

přirozeného koloběhu uhlíku na Zemi. Rychlost reakce atmosféry na různé změny je mnohem kratší, než je tomu u ostatních složek klimatického systému. Doba odezvy je v řádu dnů až týdnů a činí tak atmosféru (vůči jiným klimatickým složkám) více proměnlivou a nestabilní (Pexioto & Oort, 1992).

1.2.2 Změny ve složení atmosféry v minulých geologických dobách

Naše planeta prošla od svého vzniku vývojem, který je rozčleněn na mnoho časových úseků, zejména podle významných událostí. Pro lepší pochopení následujícího textu uvádím tabulku (č. 1), jenž podává přehled o základních geologických periodách a jejich délce trvání.

Tabulka 1: Stratigrafická tabulka. Jednotlivé periody bývají často dále členěny na epochy. Například nejmladší epocha kvartéru (čtvrtohor), tj. dnešní epocha, je označována jako holocén. Neogén a paleogén tvoří dohromady terciér neboli třetihory. Fanerozoikum je obdobím, v jehož sedimentech se objevují zbytky organismů. V obecném slova smyslu označuje dobu rozvinutého života na Zemi.

Eon	Éra	Perioda	Stáří (miliony let)
FARNEROZOIKUM	Kenozoikum	Kvartér	0–1,8
		Neogén	1,8–23
		Paleogén	23–65
	Mesozoikum	Křída	65–145
		Jura	145–200
		Trias	200–251
	Paleozoikum	Perm	251–299
		Karbon	299–359
		Devon	359–416
		Silur	416–444
		Ordovik	444–488
		Kambrium	488–542
	PRECAMBRIUM	Proterozoikum	
Archaikum		2500–4500	
Hadaikum		4500–?	

Když se začala formovat planeta Země přibližně před 4,57 miliard let, byla pokryta jen žhavým magmatem. Studie nejstarších známých pozemských minerálů, zirkonů ($ZrSiO_4$) z pohoří Jack Hills v západní Austrálii, poukazují na existenci pevné kontinentální kůry a oceánů již v době před 4,3–4,4 miliardami let (Strasdeit, 2010). Voda v oceánech měla v této době až 70°C a byla značně kyselá (Soukupová, 2013).

Dnešní pohled na složení prvotní atmosféry staví do popředí dusík (N_2), oxid uhličitý (CO_2) a vodní páru jako hlavní složky. Jelikož ještě nebyl vytvořen ozon, UV paprsky mohly dopadat na povrch země. Předpokládá se však, že je účinně rozptylovaly jiné látky přítomné v tehdejší atmosféře, např. sopečný oxid siřičitý (SiO_2). Koncentrace vodíku (H_2) a amoniaku (NH_3) byly nízké. Vodík dosahoval pravděpodobně koncentrace 0,1 %. Zajímavé je, že svítivost Slunce byla o 20–30 % nižší (Strasdeit, 2010).

Prekambrium je období značně nepříznivé. Teplota v atmosféře dosahovala až 85°C . V tuto dobu bylo v atmosféře také nejvíce CO_2 , a to až 38 %. S rozvojem života však koncentrace $[CO_2]$, postupně klesala, v atmosféře se objevil kyslík (až 2 %) a vznikl ozon (Soukupová, 2013). Významnou úlohu sehrály v této době stromatolity – útvary tvořené fotosyntetizujícími mikroorganismy. Díky produkci kyslíku se měnil chemismus oceánů a pevniny (Soukupová, 2013).

Paleozoikum (prvohory), začíná rozpadem Rhodinie. Toto období dělíme tradičně do několika period. **Kambrium** patří mezi nejteplejší a nejstabilnější periodu. V **ordoviku** se již teplá období střídá s chladnými obdobími. Předpokládá se, že koncem ordoviku se již objevují druhy suchozemské. V **siluru** vzrůstá zastoupení kyslíku v atmosféře. Vzniklý ozon umožnil život na souši, prvními organismy na zemi byly zřejmě řasy (Soukupová, 2013). Později se objevují i primitivní rostliny a jejich evoluční novinky (kutikula, kořeny, průduchy). Vývoj suchozemských rostlin pokračuje i v **devonu**, díky zvýšeným srážkám (zejména na konci této periody). Objevují se Psilofyta, plavuně, přesličky, kapradiny a první nahosemenné rostliny. Rozvoj flory byl tak ohromný, že mluvíme o tzv. „devonské explozi“ (Bowman, 2013). Díky suchozemské fotosyntéze se opět zvýšil podíl kyslíku v atmosféře (zhruba 75 % dnešní hodnoty). V **karbonu** probíhá silná sopečná činnost, v ovzduší je tak dostatek CO_2 , který je rostlinami spotřebováván a do atmosféry je uvolňován kyslík (fotolytickým rozkladem vody). Na konci **permu** vzniká Pangea. V této době se vlivem masivní vulkanické činnosti otepluje pevnina a oceány a snižuje se proto schopnost vody vázat kyslík. Současně roste obsah H_2S , který se dostává do ovzduší a narušuje spolu s dalšími látkami ozonovou vrstvu (Meyer *et al.*, 2008), což mohlo být

příčinou jednoho z největších masových vymírání ve fanerozoiku. Nicméně o příčinách a průběhu permského vymírání existuje více hypotéz.

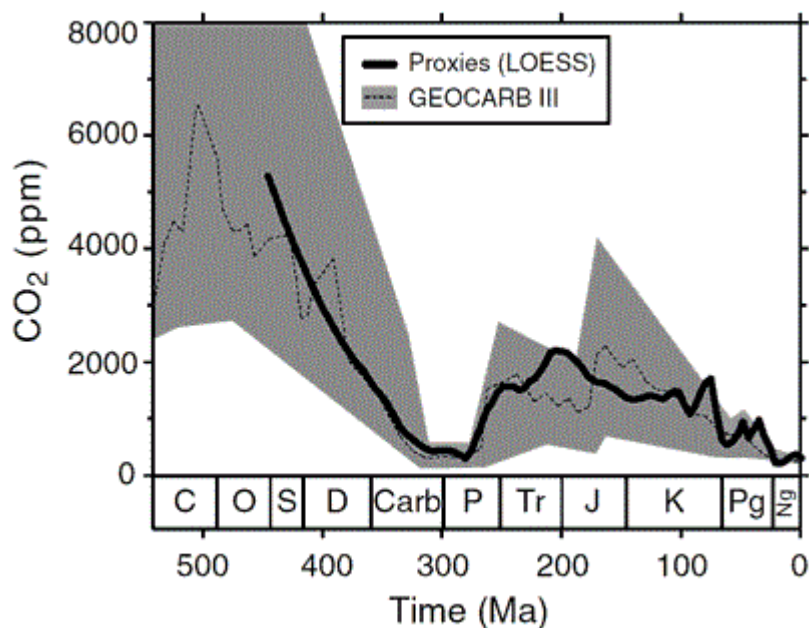
Hromadné vymírání na konci permu mělo nepochybně dlouhodobé následky. Současně vymezuje novou éru, Mezozoikum (druhoohory), s poměrně stabilním klimatem ve všech periodách (trias, jura, křída). Podobně je tomu i v Kenozoiku (třetihory a čtvrtohory). Ačkoli docházelo k různým výkyvům v procentuálním zastoupení jednotlivých atmosférických plynů (např. kolísání koncentrace CO₂, viz následující podkapitola), atmosféra jako taková se již neměnila.

1.2.3 Vývoj teploty a [CO₂] na Zemi

Pokud studujeme teplotu a [CO₂] ve Fanerozoiku, zjistíme, že nízké koncentrace [CO₂] obvykle dobře korelují s obdobím tzv. glaciálů, neboli dob ledových (Royer, 2006). Zdá se, že v každém geologickém období (mimo juru) nastal alespoň jeden glaciál, kdy ledové masy pokrývaly 30–60 % zemského povrchu. Během kvartéru docházelo ke střídání glaciálů a interglaciálů (dob meziledových) v intervalu 100–150 tisíc let (Menzies, 2009).

Pro lepší pochopení vztahů mezi [CO₂] a zvýšenou teplotou provedla D. Royer (2006) výzkum, kde z dostupné literatury analyzovala 490 záznamů o [CO₂] ve fanerozoiku. Pro zajištění nezávislého srovnání porovnávala proxy data CO₂ (neboli nepřímé údaje, viz kap. 1.7) s výstupy na základě geochemického modelu GEOCARB. To umožnilo získat jistotu, že proxy data jsou správná (**obr. 1**).

Maximálních hodnot dosáhla [CO₂] zřejmě v pozdním ordoviku (5600 μmol mol⁻¹). To je zajímavé zjištění vzhledem k faktu, že v té době vládla doba ledová. Jedná se ale o jediný referenční bod z tohoto období. Modely cyklu uhlíku naznačují, že se hladina [CO₂] snížila z 5000 μmol mol⁻¹ na 3000 μmol mol⁻¹. To však vyvolává otázky. Může být hodnota 3000 μmol mol⁻¹ prahovou hodnotou pro zahájení zalednění? Pokud ano, které procesy způsobily tak náhlý pokles [CO₂]?



Obr. 1: Atmosférická koncentrace CO₂ ve fanerozoiku. Na vyhlazení plné čáry (proxy data) byla použita metoda lokálně vážené regrese. Graf dokládá, že proxy data se poměrně dobře shodují s klimatickým modelováním. Maximální hodnoty [CO₂] je dosaženo v ordoviku. Hladina postupně klesá až do středního permu, kdy nápadně vzroste. Vyšší hodnoty (1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ a více) jsou udržovány téměř přes celé Mezozoikum. Na konci křídý můžeme pozorovat opět prudší pokles (převzato z Royer, 2006).

Globální klimatické modely kalibrované do období Kenozoika ukazují, že pro toto období se prahová hodnota pohybuje mezi 560 – 1120 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. V ordoviku, tedy v době asi o 460 milionů let dříve, panovaly jiné podmínky. Zejména sluneční výkon byl asi o 4 % nižší, prahová hodnota zalednění tak musela být vyšší. Analýza radiačního působení naznačuje, že pokud je prahovou hodnotou pro současnou² dobu 500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, pak v pozdním ordoviku dosahoval práh zalednění 3000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Tomu odpovídají také globální klimatické modely a modely energetické bilance, které uvádějí hodnoty v rozmezí 2240 – 3920 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Royer, 2006).

² Tato hodnota je pouze modelová a sama o sobě neznamená, že jejím dosažením bude spuštěn další glaciál. Glaciální cykly jsou výsledkem především změn v poměrech zemské orbity a sklonu zemské osy. Podstatné jsou však i další podmínky. Například geolog Paul K. Link (2009) uvádí, že charakteristickým rysem pro glaciál je nižší úroveň moře, nižší sopečná aktivita, jiný charakter oceánského proudění či pohyb tektonických desek.

Odpovědí na druhou otázku, jaké procesy vedly k takovému poklesu $[\text{CO}_2]$, může být práce S. A. Younga a jeho spolupracovníků (2009). Ti se zabývali poměrem izotopů stroncia ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) v mořských sedimentech, které slouží jako proxy pro míru zvětrávání křemičitanů, z nichž velký podíl má čedičové zvětrávání. Čedičové horniny jsou bohaté na vápenaté a hořečnaté křemičitany zvětrávající působením CO_2 , jehož koncentrace se tak v atmosféře snižuje. Záznamy poukazují na intenzivní zvětrávání a zpočátku i zvýšenou sopečnou činnost v ordoviku, čímž se $[\text{CO}_2]$ udržovala v relativně stálých hodnotách. Pak sopečná činnost postupně ustala, ale zvětrávání probíhalo dál. Tím se začala snižovat $[\text{CO}_2]$ s následným ochlazováním.

Nejdelší a nejrozšířenější glaciály fanerozoika nastaly během karbonu a permu. Toto období dobře odpovídá nízké úrovni $[\text{CO}_2]$. Pro nadcházející období – Mezozoikum nejsou žádné paleoklimatologické důkazy svědčící o trvalém zalednění. Ve skutečnosti je tomu naopak, Země je daleko teplejší než dnes. Toto obecné paradigma globálního „skleníku“ je v souladu se zvýšeným $[\text{CO}_2]$ (nad $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) a vysokým radiačním působením. Pravděpodobně bylo toto teplé klima přerušováno krátkým chladnějším obdobím (nikoli glaciálem), důkazy svědčí např. o střední juře či křídě (Royer, 2006).

V závěru paleocénu (epocha paleogénu, Kenozoikum) teplota prudce stoupla (asi o 8°C). Toto období nazývané paleocén-eocén teplotní maximum (PETM) je z geologického hlediska poměrně krátké. Po něm následuje eocenní klimatické optimum (MECO, *Middle Eocen Climatic Optimum*), které si udrželo vysoké teplotní hodnoty. Výzkumy naznačují, že zvýšená teplota je výsledkem nárůstu atmosférické koncentrace skleníkových plynů (s CO_2 na prvním místě), které zachytí v atmosféře více tepla (Pearson, 2010). Události vedoucí k uvolnění takového množství CO_2 jsou stále předmětem vědeckého bádání.

Během středního miocénu před 15 miliony lety je úroveň $[\text{CO}_2]$ blízká dnešním hodnotám, tedy kolem $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Teplota však byla o $3\text{--}6^\circ\text{C}$ vyšší, dokonce hladina moří byla až o 37 metrů výše než dnes (Tripathi *et al.*, 2009).

Za poslední milion let se střídaly doby ledové a meziledové s poměrně pravidelným intervalem ($\sim 100\,000$ let). V uplynulých 650 000 letech byly hodnoty $[\text{CO}_2]$ okolo $180 \mu\text{mol mol}^{-1}$ v chladných glaciálech a $290 \mu\text{mol mol}^{-1}$ v teplejších interglaciálech (Solomon *et al.*, 2007).

Můžeme tedy říci, že souvislost mezi $[\text{CO}_2]$ a teplotou je nesporná. Zvýšená $[\text{CO}_2]$ ale není jediným hnacím motorem rostoucí teploty, a podle současných výzkumů ani tím hlavním. Globální klima je naopak určeno radiační bilancí Země a jejích změn, které ale

mohou být ovlivněny rostoucí koncentrací skleníkových plynů v atmosféře (Solomon *et al.*, 2007). Proto je potřeba brát diskuzi dotýkající se vlivu [CO₂] na globální oteplování poněkud komplexněji. Např. si můžeme položit otázku, zda je současné klima výrazně neobvyklé v porovnání s historickým klimatem na Zemi. V první řadě je potřeba specifikovat, kterou proměnnou máme na mysli – absolutní hodnotu [CO₂] nebo rychlost její změny? Zaměříme-li se na absolutní hodnotu [CO₂], vidíme z předchozích odstavců, že dnešní hodnoty nejsou ve srovnání s historickými koncentracemi nijak neobvyklé. Ovšem rychlost, jakou změna probíhá, je hodná přinejmenším seriózního zamyšlení (viz **obr. 6**, kap. 1.7). Nicméně i u zmíněných absolutních hodnot je důležité připomenout odlišné podmínky předešlých geologických epoch, jako je pozice kontinentů, úroveň hladiny oceánů, sopečná činnost, míra zalesnění a mnoho dalších.

V této části byla nastíněna složitost klimatických systémů se zaměřením na atmosféru a v ní probíhající děje. Každá změna klimatu (ať už je její příčinou cokoli) má velký dopad na faunu a floru. Důkazem je například hromadné vymírání v permu. Jak jsou rostliny a anatomie jejich listů včetně např. četnosti průduchů ovlivňovány změnami atmosférických parametrů, jako je [CO₂] nebo vzdušná vlhkost? A jak lze těchto znalostí využít při rekonstruování paleoklimatu? Odpovědi na tyto otázky jsou předmětem následujících podkapitol.

1.2 Vznik a evoluce průduchů

Průduchy jsou specializované buňky v rostlinné pokožce (epidermis), které fungují jako brány umožňující výstup plynů z mezibuněčných prostor do vnějšího prostředí a naopak, jejich vstup z vnějšku dovnitř listu (Negi *et al.*, 2013). Jsou dokonalým řešením výzvy spojené s kolonizací souše, a sice jak minimalizovat ztrátu vody při současném zachování přístupu CO₂ (Richardson & Tori, 2013).

Rostliny dobyly souš před více než 400 miliony let a fosilní záznamy odhalují existenci průduchů již v těchto dobách (Raven, 2002; Vatén & Bergmann, 2012). Při úvahách o evoluci průduchů je potřeba mít na paměti měnící se podmínky životního prostředí v různých etapách historie Země a složení atmosféry. Raven & Edwards (2001) poukazují také na skutečnost, že (alespoň v rané evoluci průduchů) nebyla ještě dostatečně vyvinutá půda s odpovídající retencí vody.

V době, která odpovídá zhruba spodnímu devonu, byla hodnota atmosférického CO₂ přinejmenším desetinásobkem dnešního stavu. Takový stav měl jistě významný vliv na výkon fotosyntetických organismů. Ovšem vodní organismy nemusely řešit evoluční

dilemata spojená se vznikem průduchů, jako např. omezování ztrát vody z tkání, zabraňování přehřátí, optimalizování zisku CO₂ na jednotku ztracené vody apod. Pro jejich řešení je totiž nutným předpokladem výskyt kutikuly a mezibuněčného prostoru (Raven, 2002). Kutikula omezuje výměnu plynů (CO₂ a vodní páry) mezi rostlinou a atmosférou. Práce Boyera (2015) ukazuje, že kutikula zamezuje více šíření CO₂ než vodní páry. V pokusu, který prováděl na *Vitis vinifera* a *Helianthus annuus* byla kutikulární vodivost pro CO₂ tak nízká, že u něj můžeme uvažovat pohyb pouze přes průduchy. Kutikula byla nalezena u suchozemských rostlin z doby před 400 miliony let, tedy přibližně v době, kdy rostliny kolonizovaly souš (Edwards, 1993; Bowman, 2011).

Jaký konkrétní selekční tlak vedl ke vzniku průduchů, není přesně známo. Možná se jednalo i o kombinaci mnoha faktorů, se kterými se musely rostliny potýkat při kolonizování souše. Raven (2002) uvádí optimalizaci zisku uhlíku na jednotku vody ztracené transpirací jako nejpravděpodobnější selekční tlak vedoucí ke vzniku průduchů.

Převažujícím názorem je, že průduchy vznikly pouze jednou během evoluce. Při hledání jejich původu byly využity paleobotanické analýzy v kombinaci s analýzami fylogenetickými. Játrovky (*Marchantiophyta*), mechy (*Bryophyta*) a hlevíky (*Anthocerotophyta*) jsou bazální skupinou vyšších rostlin (*Embryophyta*). Játrovky jako jediné průduchy nemají, výměna plynů je umožněna díky epidermálním pórům. Zdá se tedy, že játrovky se „odštěpily“ od ostatních mechorostů před vznikem průduchů (Vatén & Bergmann, 2012). Tuto tezi zastává např. Qiu *et al.* (1998), který považuje játrovky za nejstarší vyšší rostliny. Naproti tomu Renzaglia *et al.* (2000) se domnívají, že nejstarší jsou hlevíky. V takovém případě by musely játrovky ztratit průduchy druhotně (Vatén & Bergmann, 2012).

S rostoucí diverzifikací rostlin se rozvíjela stále komplexnější funkčnost průduchů (Ruszala *et al.*, 2011). Jednou z hypotéz je, že zásadní přechod k aktivní kontrole vodního režimu nastal až po divergenci kapradin před 360 miliony lety. Ukazují to pokusy s kapradinami a plavuněmi, které nereagují na zvýšený obsah kyseliny abscisové³ uzavřením průduchů (Brodribb & McAdam, 2011). Ruszala *et al.* (2011) došel k opačným výsledkům s plavuní *Selaginella uncinata*, kdy se průduchová štěrbina uzavírala v závislosti na koncentraci ABA. Navrhují tak alternativní hypotézu, že aktivní kontrola vodního režimu vznikla již před více jak 400 miliony lety.

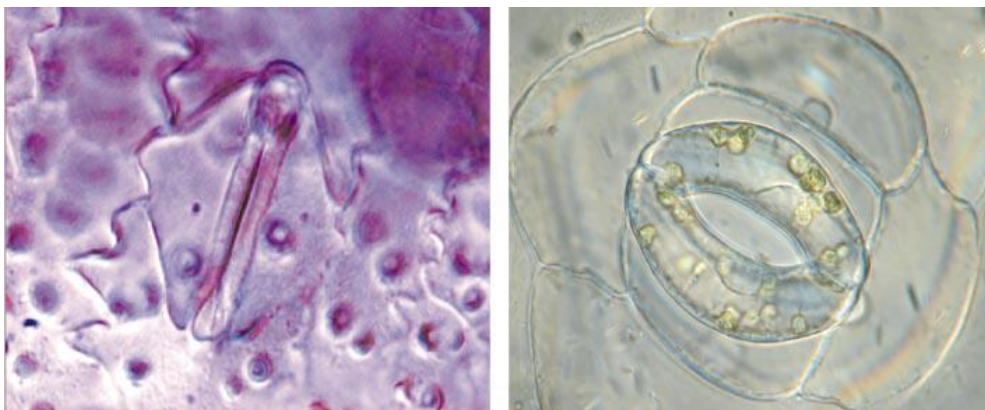
³ Kyselina abscisová (ABA) je rostlinný hormon, který při stresu suchem uzavírá průduchy. Podrobněji viz kapitola 1.5.2

Průduchy se také vyvíjely po morfologické stránce. Tvar průduchů, který najdeme u trav (*Poaceae*), činkovitý, je obecně považován za evolučně pokročilejší formu (oproti ledvinovitému tvaru). Je to podporováno pozorováním trávy rodu *Phleum*, u které se během vývoje přechodně objevují ledvinovité průduchy do doby, než se vyvinou pro trávy typické činkovité průduchy (Hetherington & Woodward, 2003).

1.3 Stavba průduchů a jejich vývoj během ontogeneze rostliny

Průduchy jsou rostlinné buněčné struktury, jejichž anglický název (stoma, stomata *pl.*) je odvozený od řeckého slova pro „ústa“. První záznamy o průduších sahají k roku 1660. Od té doby se na poli výzkumu o struktuře a funkci průduchů udělal značný pokrok. V druhé polovině 19. století odstartovala časná historie průduchové nomenklatury. Vznikl tak systém průduchů založený nejčastěji na ontogenezi či morfologii podpůrných buněk, které jsou součástí průduchového aparátu. Tento systém se v průběhu vývoje poznání mnohokrát měnil. Dnes se obvykle dělí průduchy na 11 podtypů, zejména podle jejich specifických rozdílů, jako např. uspořádání sousedních buněk či jejich ontogenetický vztah k buňkám svěracím (Willmer & Fricker, 1996; Prabhakar, 2004). Pro účely této práce si vystačíme s faktem, že až na tyto drobné rozdíly, je jejich základní morfologie poměrně jednotná. Podle tvaru svěrací buňky můžeme rozlišit dva typy průduchů – typ *Amaryllis* a *Gramineae* (**Obr. 2**).

Průduchy jsou složeny z průduchové štěrbinu a svěracích buněk. Svěrací buňky jsou dvě a obklopují průduchovou štěrbinu. Svěrací buňky jsou poměrně malé, ale je zde velká variabilita velikosti napříč různými druhy. Délka buněk může být od 10 μm do 80 μm , šířka pak od pár mikrometrů k 50 μm . Významným rysem svěracích buněk je uložení celulózních mikrofibril. Ty jsou v buněčné stěně uloženy radiálně, což umožňuje větší protažení dorzální strany svěrací buňky (Willmer & Fricker, 1996; Procházka *et al.*, 1998; Shimazaki *et al.*, 2007). Kolem svěracích buněk bývá jeden až tři páry podpůrných buněk. Tyto buňky jsou složitější z hlediska struktury a funkce než epidermální (dlaždicovité) buňky. Obvykle jsou menší a mají hustší cytoplazmatický obsah s větším počtem buněčných organel (Willmer & Fricker, 1996).



Obr. 2: Typy svěracích buněk *Gramineae* (vlevo) a *Amaryllis* (vpravo). Typ *Gramineae* tvoří dvě buňky činkovitého tvaru. Typ *Amaryllis* je častější a je tvořen dvěma svěracími buňkami ledvinovitého tvaru (Obrázek převzat z Hetherington & Woodward, 2003).

Ačkoliv nejvýznamnější pozici zauímají průduchy na listech, nalezneme je také na ostatních nadzemních částech rostliny. Množství průduchů můžeme určit pomocí dvou charakteristik. Hustota průduchů (*SD-stomatal density*) je počet průduchů na 1 mm² listové plochy. Průduchový index (*SI-stomatal index*) definujeme poměrem počtu průduchů k celkovému počtu všech epidermálních buněk (kromě trichomů) a vyjadřujeme jej v procentech. Bylo prokázáno, že signály určující SD přicházejí k vyvíjejícím se listům od listů dospělých (Pillitteri & Torii, 2012).

Podle umístění průduchů na listech rozlišujeme (podle Procházký *et al.*, 1998):

- listy hypostomatické, které jsou nejčastější, a průduchy na nich nalezneme na abaxiální⁴ straně listu (např. *Ficus sp.*);
- listy epistomatické, které mají průduchy pouze na straně adaxiální⁵ (např. *Nymphaea sp.*);
- a listy amfistomatické s přibližně stejným rozmístěním průduchů na straně adaxiální i abaxiální (např. *Lepidum sativum*).

Vývoj průduchů je přísně regulován prostřednictvím faktorů vnějších a vnitřních, které jsou propojené v signalizační síť (Balcerowicz *et al.*, 2014).

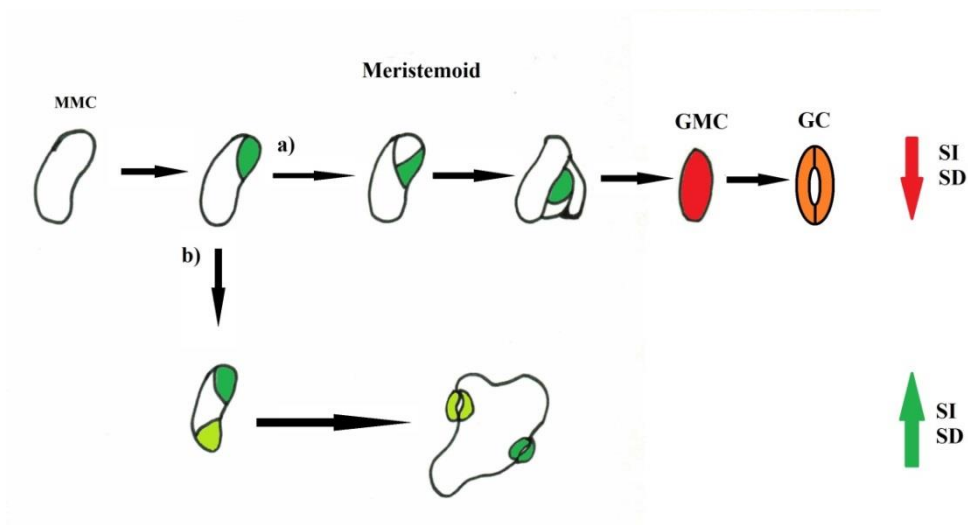
⁴ **Abaxiální** je označení pro spodní stranu listu, podle latinských slov ab axis, tedy od osy. Osou je v tomto případě míněn stonek rostliny.

⁵ **Adaxiální**, podle slov ad axis, pak znamená k ose, tedy stranu svrchní

Listy se zakládají v apikálním meristému v podobě listových primordií. Samotného utváření listu se pak účastní tři typy listových meristémů (apikální, marginální, interkalární), které ovlivňují různé charakteristiky růstu (prodlužování listového základu, růst do šířky apod.). Růst však nezahrnuje pouze změny kvantitativní, ale i kvalitativní, neboť v průběhu růstu dochází k diferenciaci buněk. Zakládání průduchů je mezi hlavními skupinami rostlin odlišné, přesto vykazují jisté podobnosti. V této práci je kladen důraz na vývoj u krytosemenných dvouděložných rostlin. Ostatní formy jsou zmíněny jen okrajově.

Vývoj průduchů dvouděložných rostlin (**Obr. 3**) bývá nejčastěji popisován na modelu *Arabidopsis thaliana*. Protodermální buňka nazývaná meristemoidní mateřská buňka (MMC – *meristemoid mother cell*) se asymetricky dělí za vzniku menší meristemoidní buňky a větší sesterské buňky (označované jako SLGC – *stomatal lineage ground cell*), která se stane buňkou dlaždicovou (nebo se dále dělí za vzniku dalšího meristemoidu). Meristemoid postupuje další jedno až tři asymetrická dělení, a pak se diferencuje v mateřskou buňku svěracích buněk (GMC – *guard mother cell*). Díky těmto dělením se zvětšuje počet sesterských buněk a regeneruje se meristemoid. Je-li vytvořen již dostatek sesterských buněk, může se GMC dále symetricky dělit za vzniku dvou svěracích buněk. Pokud probíhá vývoj tímto způsobem, SD a SI se snižuje. V případě, kdy se SLGC dále asymetricky dělí, čímž vzniká další meristemoidní buňka, SD a SI se zvyšuje (Geisler & Sack, 2002; Bergman, 2006; Vatén & Bergmann, 2012; Richardson & Torii, 2013; Dow & Bergmann, 2014).

Ke vzniku GMC u jednoděložných rostlin vede pouze jedno asymetrické dělení. Následným symetrickým dělením GMC vznikají dvě svěrací buňky (Vatén & Bergmann, 2012). Dělení buněk je navíc u jednoděložných rostlin odlišné, probíhá pouze v bazální části listu, kde se zakládají prekurzory průduchů. Jejich formování pokračuje spolu s růstem listu a dozrávají v blízkosti vrcholu. U jednoděložných rostlin se tak průduchy nacházejí v řadách rovnoběžných s listovou cévou (Bergmann, 2004; Kouwenberg *et al.*, 2003; Vatén & Bergmann, 2012). Takové pravidelné uspořádání u dvouděložných rostlin nenajdeme. Průduchy jsou v těchto rostlinách rozmístěné „náhodně“, přesto je zde patrný určitý řád. Téměř nikdy se nenachází průduchy, které by spolu sousedily tak těsně, až by se dotýkaly, což je dáno pravidlem jedné rozdělovací buňky, *one-cell spacing rule* (Bergmann, 2004; Pillitteri & Torii, 2012).



Obr. 3: Nákres vývoje průduchů u dvouděložné rostliny. Mateřská meristemoidní buňka (MMC) se asymetricky dělí za vzniku meristemoidní buňky (v nákresu vždy zelená) a sousední buňky. Proces se může dále ubírat buď **(a)** následným dělením meristemoidu až ke vzniku mateřské svěrací buňky (GMC), která se rozdělí na dvě svěrací buňky (GC), nebo se může sesterská buňka dále asymetricky dělit **(b)**. Tím vznikne více meristemoidů, které opět vedou ke vzniku svěracích buněk. Druhá cesta tak zvyšuje SI a SD. Nákres Václav Fiala.

Výše popsané události ve vývoji průduchů poukazují na tři přechodné stavy: a) MMC-meristemoid; b) meristemoid-GMC; c) GMC-GC. Každý z těchto přechodů vyžaduje kontrolu transkripčních faktorů (tzv. bHLH → *basic helix-loop-helix*) SPCH, MUTE a FAMA (v daném pořadí). S těmito faktory navíc interagují další, jako SCRM a SCRM2. Nedostatek, nebo naopak nadbytek těchto transkripčních faktorů vede k různým průduchovým anomáliím. Příkladem je ektopická⁶ formace nespárovaných svěracích buněk, jako výsledek nadměrné exprese FAMA (Nadeau, 2009; Vatén & Bergmann, 2012; Richardson & Tori, 2013).

Množství průduchů je ovlivněno převážně negativní zpětnou vazbou, tzn. čím je více produktu určitého genu, tím méně se vyvine meristemoidů a průduchů. Kupříkladu působení tzv. MAP kináz (*mitogen-activated protein*) je nezbytné pro udržování správné průduchové vzdálenosti. Zabraňují totiž tvorbě průduchů, a tak jsou průduchy odděleny minimálně jednou epidermální buňkou (Pillitteri & Torii, 2012; Vatén & Bergmann, 2012). Naopak nedostatek regulátorů z MAP kináz (např. YODA) nebo ztráta jejich funkce, vede

⁶ Ektopie je označení pro výskyt mimo obvyklé místo.

k tvorbě průduchových seskupení (tzv. klastrů). Podobné je to v případě nedostatku faktorů EPF1 a EPF2 (*epidermal patterning factor*) nebo mutace genu TMM (*too many mouth*), který byl vůbec prvním popsáným průduchovým genem v *Arabidopsis* (Yang & Sack, 1995). Výjimkou je gen STOMAGEN, který patří mezi pozitivní regulátory, tedy počet průduchů je přímo úměrný jeho expresi.

Zmínili jsme několik málo genů, které svými proteinovými produkty ovlivňují vývoj průduchů. Tyto geny pracují nejen s informací vnitřní – buněčnou, ale také s informací vnější. Jelikož rostliny jsou organismy přisedlé, musí být schopné přizpůsobit svoji fyziologii a vývoj vnějšímu prostředí. Příkladem je zvýšení SD u mutantů genu HIC (*high carbon dioxide*) jako odpověď na dvojnásobnou koncentraci CO₂ v atmosféře (Gray *et al.*, 2000).

1.4 Funkce průduchů

Jak už bylo zmíněno, hlavní funkcí průduchů je umožnit výměnu plynů mezi rostlinou a vnějším prostředím. S tím souvisí mnoho dalších významných opatření.

Jsou-li průduchy otevřené pro vstup CO₂, dochází zároveň ke ztrátě vody. Průduchy proto regulují svoji otevřenost během fotoperiody tak, aby maximalizovali příjem CO₂ na jednotku ztracené vody (Cowan, 1977). Problém však nastává v případě, kdy je v půdě vody nedostatek. Rostlina si nemůže dovolit velké ztráty vody, a průduchy zavírá. Omezením ztráty vody navíc zpomaluje rychlost, kterou se rostlina dostává k letálnímu vodnímu potenciálu. Pro mnoho rostlin je to při hodnotě $\Psi_w = -10$ MPa, v extrémním případě až $\Psi_w = -22$ MPa. Včasnému uzavření průduchů se tak předchází xylémové embolii (Raven, 2002).

V poslední době se také diskutuje o roli průduchů v aktivní ochraně proti patogenům. Například bylo pozorováno uzavření průduchů v reakci na bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) nebo *Escheichia coli*. Na rozdíl od hub, bakterie nemají schopnost proniknout přímo přes rostlinnou pokožku (Zeng *et al.*, 2010). Pokud se bakterie Pst dostane do rostlinného pletiva, kde se začne zprvu asymptomaticky množit, je to právě přes průduchy (Preston, 2000). Ačkoli není role průduchu v aktivní ochraně proti patogenům zatím úplně objasněna, zdá se, že uzavření průduchů je vyvoláno spuštěním imunitní reakce pomocí PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns* (Zeng *et al.*, 2010).

1.5 Mechanismus pohybu průduchů

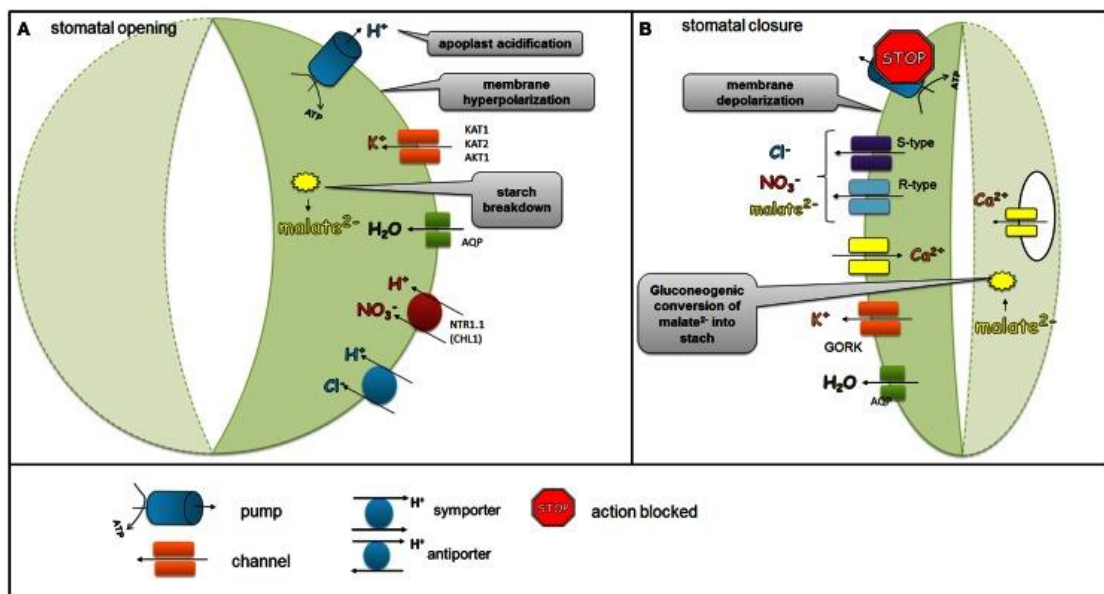
Otevření průduchů (**Obr. 4A**) je závislé na transportu iontů a organických metabolitů přes membrány svěřacích buněk (Negi *et al.*, 2013). Modré světlo aktivuje protonovou pumpu (fosforylací C-terminálu), tzv. H^+ -ATPázu, která zprostředkuje pumpování H^+ ven ze svěřacích buněk a hyperpolarizuje plazmatickou membránu⁷. To vede k příjmu K^+ přes selektivní membránové kanály, které se otevřou. V rostlině *Arabidopsis thaliana* byly tyto kanály označeny jako KAT1, KAT2 a AKT1 (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). H^+ ionty, které opouštějí svěřací buňky, navíc acidifikují apoplast, což jen podporuje proudění K^+ iontů přes tyto kanály.

Příjem K^+ je vyvažován příjmem aniontů (zejména Cl^- , malát²⁻ a NO_3^-). Ionty transportované do svěřacích buněk vytvářejí spolu s vodou transportovanou přes akvaporiny turgor, který je nezbytný pro otevření průduchů (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Turgor zvětšuje objem vakuol ve svěřacích buňkách, které tak rozšiřují průduchovou šterbinu.

Uzavření průduchů (**Obr. 4B**) je pak spojeno s opačným procesem. Inhibice H^+ -ATPázy spolu s aktivací anionových kanálů vede k depolarizaci plazmatické membrány. Anionové kanály (jako např. rychlý R-typ a pomalý S-typ) umožňují odtok Cl^- , malát²⁻ a NO_3^- a zároveň proudí K^+ přes selektivní membránové kanály pryč ze svěřacích buněk (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Hlavní kanál, který je odpovědný za výtok K^+ iontů z buňky je tzv. GORK (Hosy *et al.*, 2003).

Další jev, který doprovází průduchové pohyby je změna koncentrace Ca^{2+} (významný signální přenašeč). Ta je výsledkem uvolňování Ca^{2+} přes kanály umístěné jak v plazmatické membráně tak v tonoplastu (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Tonoplast (membrána obklopující obsah vakuol) hraje v mechanismu průduchových pohybů významnou roli, neboť vakuola je důležitým zdrojem Ca^{2+} (Blatt, 2000). Navíc vakuola může zaujímat až 90 % objemu plně vyvinuté svěřací buňky, a proto většina osmoticky aktivních látek, které projdou plazmatickou membránou, musejí projít také tonoplastem (MacRobbie, 1999; Blatt, 2000). Pohyby svěřacích buněk jsou umožněny díky jejich specifické struktuře (viz kap. 1.3).

⁷ Hyperpolarizace membrány znamená zvyšování membránového potenciálu, tedy posun do zápornějších hodnot. Opačným procesem je pak depolarizace.



Obr. 4: Mechanismus průduchových pohybů. Otevření průduchů (A) je spojeno se vznikem turgoru, kterému předchází hyperpolarizace membrány a tok iontů a vody do svěrací buňky. Dochází také k rozpadu škrobu za vzniku malátu²⁻. Průduchy se uzavírají (B) na základě depolarizace membrány a odtoku iontů s vodou ze svěrací buňky. Podrobnější popis v textu (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013).

1.6 Ekofyziologické faktory ovlivňující průduchy, jejich funkci a vývoj

Jedním ze základních projevů života je růst a reprodukce. Jelikož jsou rostliny pevně zakotvené v půdě, mají vysokou plasticitu, která vede k optimalizaci těchto životních projevů. Důvodem je neustále se měnící prostředí, na které musí rostliny reagovat.

1.6.1 Světlo

Světlo hraje u všech druhů významnou roli ve vývoji a funkci průduchů. Rostliny pěstované ve tmě produkují výrazně méně průduchů, než rostliny pěstované na světle. Zvýšená ozářenost má tedy pozitivní vliv na SD a SI (Pillitteri & Torii, 2012). Světlo také indukuje otevírání průduchů, které je zprostředkováno dvěma odlišnými fotosystémy (Shimazaki *et al.*, 2007).

Rostliny vnímají světlo (intenzitu i kvalitu) pomocí fotoreceptorů. Ty můžeme rozdělit na tři základní skupiny podle toho, ve kterém spektru absorbují světlo (fotoreceptory červeného, modrého/UV-A a UV/B světla)

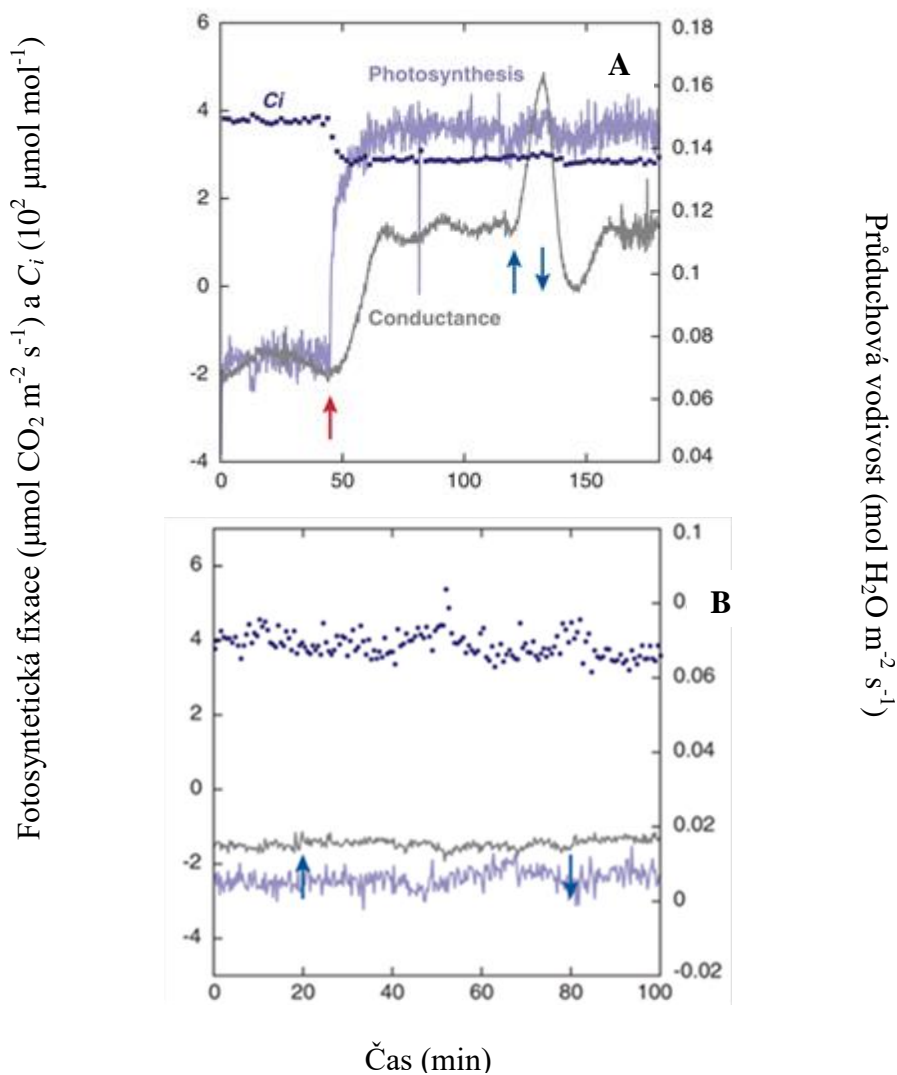
V neporušených listech je otevírání průduchů pod působením modrého světla až 20x účinnější proti světlu červenému. Na tuto skutečnost poukazují pokusy s *Arabidopsis*

thaliana a *Oryza sativa* prováděné týmem vedeným Shimazakim (2007). Když byly listy vystaveny silnému červenému světlu ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), okamžitě došlo k fotosyntetické fixaci CO_2 a prudkému poklesu C_i až na hodnotu 250-270 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Průduchy postupně zvyšovaly vodivost (s mírným zpožděním oproti fotosyntetické fixaci) s dosažením maxima během 20 minut. Při krátkém exponování (10 minut) na slabém modrém světle ($5 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) došlo k trojnásobně rychlejšímu otevření průduchů, než při vystavení pouze na červeném světle (**Obr. 5A**). Dokonce velmi krátká doba osvětlení (30-60 s) indukuje otevření průduchů, které zůstanou otevřené zhruba ještě 10 minut po působení modrého světla. Při působení jen modrého světla se však průduchy prakticky neotevřely (**Obr. 5B**).

Modré světlo je zachycováno receptory phot1 a phot2 (fototropiny z *A. thaliana*) a kryptochromy cry1 a cry2 (Shimazaki *et al.*, 2007). Podle práce vědců z Nagoya University a Okayama University v Japonsku (Ando *et al.* 2013) jsou to spíše fototropiny, které přímo vyvolávají rychlou odpověď průduchů na modré světlo. Zdá se, že kryptochromy ovlivňují otevírání průduchů prostřednictvím jejich funkce světelných receptorů ve fotoperiodických reakcích. Fototropiny navíc zprostředkovávají mobilizaci Ca^{2+} .

Dalšími receptory modrého světla jsou chromofory – flavin a zeaxantin. Citlivost průduchů na modré světlo roste s obsahem zeaxantinu. Mutanty *Arabidopsis thaliana* s nedostatkem zeaxantinu na modré světlo nereagovaly (Shimazaki *et al.*, 2007).

Zdá se, že červené světlo zprostředkovává otevření průduchů redukcí C_i . Receptory červeného světla jsou fytochromy (Shimazaki *et al.*, 2007).



Obr. 5: Průduchová vodivost, fotosyntetická fixace CO₂ a *c_i* v závislosti na světle v listech *Arabidopsis thaliana*. Červená šipka poukazuje na kontinuální ozařování červeným světlem ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), modré šipky nahoru a dolů označují počátek a ukončení ozařování slabým modrým světlem ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Samotné červené světlo (poté, co byly rostliny 1h ve tmě) způsobí poměrně rychlou fixaci CO₂ a mírný nástup vodivosti průduchů. Při krátkém působení slabého modrého světla se průduchy mnohem rychleji otevřou a vodivost prudce vzroste (A). V druhém případě (B), kdy byla rostlina osvětlována pouze slabým modrým světlem bez přítomnosti červeného světla, nedošlo ke zvýšení fixace CO₂ ani vodivosti (Upraveno dle Shimazaki *et al.*, 2007).

1.5.2 Dostupnost vody a vzdušná vlhkost

Dostupnost vody je pro rostliny naprosto klíčová. A nejen pro rostliny, neboť ty hrají zásadní roli také v globálním cyklu vody. Uvádí se, že přes průduchy suchozemské vegetace je transpirováno 35×10^{18} g vodní páry každý rok (Lawson & Blatt, 2014). Průduchy jsou tak hlavními regulátory transpirace ale i vlhkosti atmosféry nad kontinenty, kterou ovlivňují jak velikostí průduchové štěrbin, tak i samotným počtem průduchových buněk.

Během noci, kdy není potřeba CO_2 pro fotosyntézu, má většina C_3 rostlin průduchy zavřené, aby neztrácely vodu. Průduchy se otevírají časně ráno, kdy je sluneční záření bohaté na modré světlo. Díky rychlému otevření průduchů je zajištěn zvýšený příjem CO_2 pro fotosyntézu. Během dne je pak otevření průduchů přísně regulováno, čímž se udrží dostatek vody pro potřebný turgor (Shimazaki *et al.*, 2007; Arve *et al.*, 2013). Tento mechanismus opět poukazuje na snahu rostliny, optimalizovat zisk uhlíku na jednotku ztracené vody.

Na vodní stres reagují rostliny syntézou kyseliny abscisové (ABA, rostlinný hormon) v kořenech, která je xylémem transportována do listů, kde uzavře průduchy (Ando *et al.*, 2013; Arve *et al.*, 2013). V nedávné době publikovali Pantin *et al.* (2013) tzv. koncepční model dvojího účinku ABA. Ten ukazuje, že ABA je v malých, přesto signifikantních koncentracích, produkována také v cévních svazcích a svěracích buňkách a zabraňuje maximálnímu otevření průduchů. K tomu dochází při snížení Ψ listu v důsledku transpirace.

Rostliny pěstované při vysoké relativní vzdušné vlhkosti (RH=90%), mají obvykle velké, nefunkční průduchy. To vede k podstatným ztrátám vody (Arve *et al.*, 2013). Při vysokém RH, nebo po vydatném dešti jsou také náchylnější k bakteriálnímu napadení (Ou *et al.*, 2014). Při vyšším RH jsou však průduchy citlivější k $[\text{CO}_2]$. Pro rostliny rostoucí v podrostu, kam proniká méně světla a je tam současně nižší $[\text{CO}_2]$, by tak citlivost k $[\text{CO}_2]$ při vyšším RH mohla optimalizovat jeho příjem (Talbot, 2003; Casson & Hetherington, 2010).

Vliv RH na počet průduchů není zatím zcela přesně znám. Pokusy, které vedl Lake & Woodward (2008) ukázaly, že s rostoucí rychlostí transpirace roste také počet průduchů. S mírou transpirace však manipulovali nejen prostřednictvím vzdušné vlhkosti, ale také aplikací ABA nebo změnou koncentrace CO_2 . Casson & Hetherington (2010) poukazují na možnost, že vývoj průduchů při různých vlhkostních podmínkách reguluje právě ABA.

1.5.3 Vliv koncentrace CO₂

Pozorování Woodwarda (1987) vedlo ke zjištění, že SD a SI je nepřímo úměrný [CO₂] během vývoje listu. V pozitivní korelaci s [CO₂] je naopak velikost průduchů (délka svěrací buňky vynásobená celkovou šířkou obou svěracích buněk při nízkém turgoru, tedy když jsou zavřené). To je dokázáno jak z fosilních vzorků, tak laboratorně (Casson & Hetherington, 2010).

Na zvýšený obsah CO₂ rostliny reagují sníženou vodivostí, což se děje mj. prostřednictvím regulace míry otevření průduchů (Haworth *et al.*, 2010). Franks & Beerlings (2009) prokázali, že snižování [CO₂] vede ke zmenšení velikosti průduchů a zvýšení jejich hustot. Větší počet malých průduchů zároveň zvyšuje celkovou průduchovou vodivost (g_{max}). Ke stejným závěrům došli také Lammertsma *et al.* (2011), kteří srovnávali historické záznamy devíti druhů převážně dřevin.

Svěrací buňky reagují na vnitřní koncentraci CO₂ (C_i) v listu spíše, než na koncentraci vnější (C_a), kdy se při poklesu C_i otevírají a naopak (Mott, 1988). Zdá se, že C_i by mohlo hrát roli také v dalším regulačním mechanismu rostlin. Při pokusech vedených týmem Šantrůček *et al.* (2014b) bylo rostlinám měněno C_i (manipulací průduchové vodivosti pomocí ABA nebo polyethylenglykolu), zatímco C_a byla udržována konstantní (390 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ukázalo se, že C_i může ovlivňovat také konečné SD pravých listů.

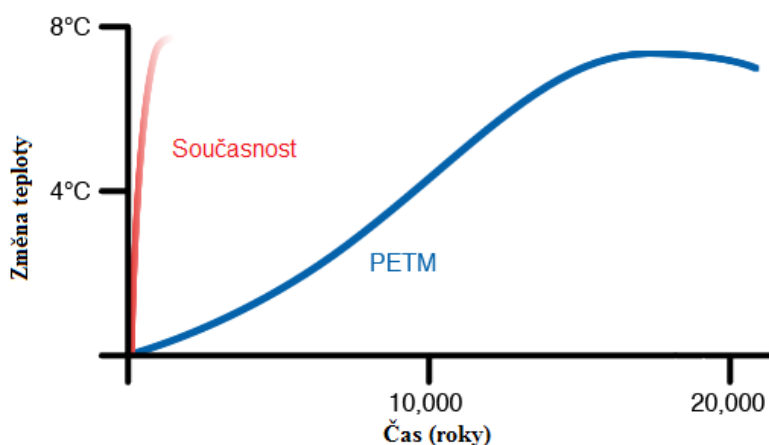
Počet průduchů v závislosti na [CO₂] reguluje negativní zpětnou vazbou gen HIC objevený v *Arabidopsis thaliana* (Grey *et al.*, 2000).

1.7 Rekonstrukce paleoklimatu

Paleoklimatologické výzkumy umožňují charakterizaci struktury a dynamiky procesů, které jsou spojené s klimatickým systémem Země. Jak bylo popsáno v úvodu, tento systém je tvořen mnoha subsystemy, které spolu vzájemně interagují a vytváří tak síť různých vazeb. K pochopení této složité dynamiky nám pomáhají paleoklimatologické rekonstrukce tím, že odhalují reakce systému na velké změny v minulosti (Snyder, 2010).

Díky paleoklimatologickým výzkumům můžeme posuzovat antropogenní změny klimatu v širším kontextu historie klimatu na Zemi. Dobrým příkladem může být kolísání koncentrace CO₂, které je popsáno v kapitole 1.2.3. Paleoklimatologická data se využívají také při vyvíjení klimatických modelů. Ty jsou nástrojem k odhadu vývoje klimatu v minulosti a budoucnosti.

Pro ilustraci výše popsaného uvádím řešení konkrétní otázky za využití paleoklimatologických dat. Jak se bude klima chovat v období tak rychlých změn, které vlivem člověka probíhají v této době? Prozkoumejme blíže některé období vyznačující se podobně rychlými změnami. Je jím např. teplotní maximum na rozhraní paleocénu a eocénu před 56 miliony let. V této době se Země náhle ohřála asi o 6°C a dramaticky vzrostla [CO₂] v průběhu 20 000 let. Tato situace vedla kupříkladu k vymření mnoha hlubinných druhů (Snyder, 2010). Při srovnání se současnou rychlostí nárůstu teploty je patrný výrazný časový nepoměr (**obr. 6**).



Obr. 6: Porovnání rychlosti teplotních změn v období paleocén-eocén teplotní maximum (PETM) se současností. Zatímco nárůst teploty a koncentrace CO₂ probíhala v PETM pozvolna v průběhu 20 000 let, jsou dnešní změny způsobené člověkem velmi rychlé. Obr. dostupný z internetové adresy: <http://www.wunderground.com/climate/PETM.asp>

Paleoklimatologie, podobně jako jiné vědy o naší Zemi, potřebuje velké množství dat (Cane *et al.*, 2006). Údaje používané v klimatologii se dělí na data přímá a nepřímá, tzv. proxy data (zástupné proměnné). Přímá data obsahují klimatickou informaci. Musela tedy být pozorována nebo změřena. Paleoklima je z definice to klima, které bylo na Zemi dříve, než ho začal člověk měřit a zaznamenávat. Z toho vyplývá, že v paleoklimatologii nejsou přímá data použitelná. Metody, kterými se rekonstruuje paleoklima, jsou proto založeny na druhém typu, tj. proxy datech. Jedná se o data, která nepřímo dokládají určité jevy. Obecně známým příkladem může být hodnocení životní úrovně státu pomocí hrubého domácího produktu na obyvatele (HDP), což je vlastně proxy parametr.

1.7.1 Získávání a využití proxy dat

Proxy dat je velké množství, a tak je přirozené je seskupovat do různých kategorií. Ty se mohou u různých autorů lišit⁸. Bradley (1999) vymezil ve svém díle *Paleoclimatology: Reconstructing Climates of the Quaternary* čtyři základní skupiny:

- 1) glaciologická (ledová jádra);
- 2) geologická (mořské a terestriální sedimenty);
- 3) biologická (např. letokruhy, pyl, koráli, hmyz apod.);
- 4) historická (např. fenologické záznamy).

V knize *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments* (2009) uvádí V. Gornitz následující hlavní kategorie:

- 1) litologická/mineralogická (např. písečné duny, uhlí, bauxit apod.);
- 2) geochemická (zahrnující zejména prvky a izotopy, např. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$);
- 3) geofyzická (paleomagnetismus a elektrická vodivost);
- 4) paleontologická (živočichové, kokolity, listy, SI, pyl, letokruhy apod.).

Jednotlivá data se kromě kategorie, metody získávání a způsobu využití liší také časovým dosahem (viz Tab. 2), tj. o jak dávne minulosti mohou vypovídat.

Tabulka 2: Charakteristika paleoklimatologických zdrojů dat. Legenda: T (teplota), P (srážky, vlhkost nebo vodní bilance), $C_{a/w}$ (chemické složení vzduchu/vody), B (biomasa), V (sopečné erupce), M (změny magnetického pole), L (hladina moře), S (sluneční aktivita). Upraveno dle Bradley (1999).

Archiv	Časový dosah (řády let)	Odvozená informace
Letokruhy	$\sim 10^4$	T, P, B, V, M, S
Jezerní sedimenty	$\sim 10^4 - 10^6$	T, B, M, V, M, C_w
Korály	$\sim 10^4$	C_w , L, T, P
Ledová jádra	$\sim 5 \times 10^5$	T, P, C_a , B, V, M, S
Pyl	$\sim 10^5$	T, P, B
Mořské sedimenty	$\sim 10^7$	T, C_w , B, M, L, P

⁸ V této práci není upřednostněno žádné členění, uvedeny jsou pouze nejběžnější metody získávání proxy dat a jejich využití v paleoklimatologii.

Získaná data je potřeba nejprve kalibrovat. Cílem kalibrace je určit vztah mezi proxy indikátorem a meteorologickým prvkem (Brázdil *et al.*, 2005). Proxy parametr pak musí s interpretovanou proměnnou vykazovat statisticky významnou korelaci (Bábek, 2013). Proxy data se kalibrují buď oproti jiným proxy datům, nebo oproti moderním instrumentálním záznamům. V druhém případě je na základě proxy dat stanovený určitý model, např. vývoj teploty od počátku holocénu. Pokud je model správný, pak hodnoty z období, pro které již máme přístrojová měření, budou tomuto modelu odpovídat.

Pro zvýšení spolehlivosti paleoklimatologické rekonstrukce se používají tzv. multi-proxy data, což je v posledních letech velmi využívaná metoda. Například teplotní křivka posledního tisíciletí byla odvozena z kombinace letokruhů, korálů, dírkonožců (Foraminifera), $\delta^{18}\text{O}$ a ledovcových vrtů (Gornitz, 2009).

Jednou z nejpoužívanějších metod jsou **vrtý horských a kontinentálních ledovců (Obr. 7)**. Předpokladem pro využití ledových jader k analýze je permanentní převaha akumulace nad ablací. Takovým příkladem je Antarktida a Grónsko. Z vrtů provedených v roce 2006 v Antarktidě, kdy bylo dosaženo hloubky 3 kilometrů, se odhaduje stáří ledu v této hloubce na jeden milion let (Soukupová, 2012). Záznamy z ledových jader nabízejí velké množství paleoenvironmentálních dat z jediného zdroje (Gornitz, 2009). Například izotopy beryllia ^{10}Be jsou indikátory sluneční aktivity. Z mocnosti přírůstkových vrstev usuzujeme na změnu teplot vzduchu (Soukupová, 2013). O teplotě vypovídá také poměr $\delta^{18}\text{O}$, který je teplotě nepřímo úměrný. Při kondenzaci vodní páry ve vzduchu obsahuje déšť zpočátku relativně více těžšího izotopu ^{18}O , zatímco vodní pára s lehčím izotopem ^{16}O kondenzuje později při teplotě ještě nižší (Delaygue, 2009). Jelikož se teplota mění s nadmořskou výškou, může poměr $\delta^{18}\text{O}$ vypovídat také o změně výškové.

Důležité údaje o složení atmosféry poskytují **vzduchové bubliny v ledových jádrech**, a to díky obsahu skleníkových plynů. Přestože data získaná ze vzduchových bublin v ledu poskytují poměrně dobrý obraz o $[\text{CO}_2]$ během posledních zhruba 800 000 let, nezaznamenávají krátkodobé výkyvy (<200 let). Důvodem je vyhlazení účinku vlivem časového zprůměrování dat (Steinthorsdottir *et al.*, 2013).



Obr. 7: Ledové jádro vyčnívající z vrtací hlavy. Ledová jádra jsou válce o průměru 10 cm. Získávají se provrtáním ledovců nebo ledových příkrovů. Ledová jádra jsou zdrojem mnoha proxy dat, zahrnující koncentraci CO₂, CH₄, N₂O ve vzduchových bublinách, δ¹⁸O a δD v ledu a relativní zastoupení dalších stabilních izotopů. Tyto proxy poskytují vhled do změn v atmosférickém složení a cirkulaci, teplotě, objemu ledu, sopečné činnosti a globálních biogeochemických cyklech (Gornitz, 2009; Raynaud & Parrenin, 2009).

Stratigrafie je věda, která studuje stáří a sled vrstev v zemské kůře. Hlavní klimatické změny jsou zřetelné z kompozičních a litologických změn ve stratigrafických sloupcích. Názorným příkladem je dobře exponovaná karbon-permská vrstva ze svrchní poloviny Velkého kaňonu (Grand Canyon) v Arizoně. Světlejší mořské vápence (*Redwall Limestone*) jsou zde překryty vrstvou červených pískovců a břidlice (*Supai Formation*). Nadloží této vrstvy je břidlice (*Hermit Formation*) uložena řekami, nad níž jsou pískovce (*Coconino Sandstone*) vzniklé aridifikací. Nejsvrchnější pískovcová a vápencová vrstva (*Toroweap Sandstone & Kaibab Limestone*) je tvořena kostmi a schránkami živočichů obývajících teplé moře, což poukazuje na opětovné zatopení mořem (Gornitz, 2009).

Vrstvené **sedimenty jezer a hlubokých moří** často poukazují na změny v mineralogii, typu sedimentu nebo jeho tloušťky, které odrážejí změny v teplotě či srážkách. Problémy nastávají v místech, kde neprobíhá vrstvení ročně, kde se vyskytují eroze nebo ne-klimatické jevy jako je příliv (Smoot, 2009). Avšak pokud mořské dno neleží v geologicky aktivním pásmu, může dobře zachytit průběh klimatických změn (Soukupová, 2013). Mořské organismy odrážejí klima mj. relativním zastoupením určitých druhů (typicky např. rozsivky nebo kokolity). Analýzou stabilních izotopů **korálů** nebo dírkonozců můžeme získat charakteristiku prostředí v době růstu.

Velmi přínosné zdroje klimatických informací poskytují **letokruhy**. Jednotlivý letokruh je ročním přírůstkem složeným z tzv. jarního a letního dřeva. Průměr přírůstku je charakteristickým rysem dřevin, ovládaným různými faktory, včetně klimatu (Feliksik & Wilczyński, 2009). V dendroklimatologii se také užívá analýza stabilních izotopů ve dřevě ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, δD = relativní poměr $^2\text{H}/^1\text{H}$).

Užitečným nástrojem pro rekonstrukci vegetačního krytu daného území je **analýza pylových zrn** (palynologie). Díky takové analýze byly získány např. poznatky o vývoji našich lesů v pozdním glaciálu a postglaciálu (Soukupová, 2013). Výhodou pylových analýz jsou druhově specifické vlastnosti pylu, jako je jejich tvar, velikost, povrchová skulptura apod. Data, která se z pylových analýz získají, jsou prezentována pomocí tzv. pylových diagramů. Z rostlinného materiálu se používají dále **makrofosilie** plodů, semen, listů apod. Makrofosilie mohou poskytnout přesnější rekonstrukci, zejména díky své hmotnosti/velikosti nejsou obvykle přepravovány daleko od mateřských rostlin. Na rozdíl od pylu také umožňují přesnější taxonomické zařazení (Mauquoy, 2010). Většinu rostlin totiž můžeme na základě pylových zrn zařadit pouze do rodu, případně čeledi (Seppä & Bennet, 2003). Pyl i rostlinné makrofosilie jsou dobře konzervovány v rašeliništích, slatiništích, ale i v některých půdních profilech, čehož se využívá ve stratigrafii (Soukupová, 2013). Při rekonstrukci klimatu na základě fosilií uložených v rašelinách je důležité brát v úvahu skutečnost, že změna vegetace nemusí odrážet klimatické změny, nýbrž např. invazi škodlivého hmyzu (Bradley, 1999).

V poslední době se začala využívat také metoda zkoumání **rostlinných průduchů**. Využívají se při tom znalosti průduchových četností v závislosti na vnějších podmínkách. Některé z poznatků byly popsány již v části věnované průduchům. Jak jich lze využít při rekonstrukci paleoklimatu popisuje následující podkapitola.

1.7.2 Využití průduchů při rekonstrukci paleoklimatu

Průduchová metoda poskytuje nejpřesnější časové rozlišení ze všech proxy dat vztahujících se ke koncentraci CO_2 , od několika měsíců po 100 let. Přesnost rekonstrukce paleo-koncentrace CO_2 může být $\sim 10 - 40 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2014). Navíc, jelikož se listy vyvíjejí rok co rok, spolehlivě tak odrážejí změny $[\text{CO}_2]$, které probíhají velmi rychle (Steinthorsdottir *et al.*, 2013).

Na základě metodologie můžeme rozdělit rekonstrukci $[\text{CO}_2]$ do dvou kategorií. V té první porovnáваме fosilní záznam s moderním zástupcem, který má podobné ekologické nároky a/nebo je svému fosilnímu protějšku podobný morfologicky. Příkladem

může být porovnání vyhynulého druhu *Solenites vimineus* patřící mezi Ginkgophyta s „živoucí fosilií“ jinanem dvoulaločným, *Ginkgo biloba* (Yan *et al.*, 2009). Nebo se můžeme vydat cestou regresní analýzy a provádět experimenty laboratorně, kdy předpokládáme, že rostliny reagují na změnu [CO₂] v dnešní době stejným způsobem jako v minulosti (Wang *et al.*, 2014). Zatím se však ukazuje, že v míře odpovědi na [CO₂] je napříč rostlinnými druhy vysoká variabilita, a proto se zdá být metoda studia fosilních materiálů s moderními analogy přesnější (Beerling & Royer, 2002). Ovšem mnohé fosilie představují již zaniklé druhy, je tak nezbytné plně porozumět obecně platným vztahům mezi vývojem průduchů a [CO₂].

Do rekonstrukce [CO₂] lze zapojit tyto parametry: 1) hustota dlaždicových buněk (ED); 2) průduchová hustota (SD); 3) průduchový index (SI); a 4) průduchový poměr (SR). SI a SD jsou hodnoty nám již známe z předchozích podkapitol. ED je principiálně podobné s SD a vyjadřujeme jej jako počet dlaždicových buněk na mm². SR je poměr SI mezi fosilními nálezy a jejich moderními ekvivalenty (Wang *et al.*, 2014).

Z kapitoly věnované vlivu [CO₂] na průduchy víme, že morfologie průduchů (zejména jejich velikost) je s [CO₂] v pozitivní korelaci. Vztah mezi velikostí průduchů a jejich hustotou tak může být dalším parametrem využitelným v paleoklimatologii. Obecně lze říci, že krytosemenné rostliny mají četnější a malé průduchy, zatímco jehličnany a kapradiny mají několik velkých průduchů (Lammertsma *et al.*, 2011).

2. CÍLE PRÁCE

1. Popsat, jak se mění počet průduchů v závislosti na odlišné koncentraci CO₂ a různém zásobování vodou.
2. Testovat hypotézu, že změna průduchové hustoty (SD) koreluje s koncentrací CO₂ uvnitř listu (tzv. C_i).
3. Popsat míru diskriminace ¹³CO₂ při různé koncentraci CO₂ v atmosféře.
4. Zhodnotit výhody a nevýhody používání fosilních listů (zejména jejich hodnot SI a SD) jako proxy indikátor koncentrace CO₂ v paleoatmosféře pomocí vybraného modelového druhu *Lepidum sativum*.

3. MATERIÁL A METODY

Jako pokusnou rostlinu jsem vybral řěřichu zahradní (*Lepidum sativum*, Brassicaceae), kterou jsem pěstoval ze semen pořízených v zahradnictví (výrobce: SEMO, ČR a MoravioSeed, ČR).

Půdu jsem používal speciální pro výsev a množení od výrobce ARGO (jarní fáze pokusu), která je složená z rašeliny a písku a od výrobce Forestina (podzimní fáze pokusu). Druhá jmenovaná půda je obohacená o houbu *Trichoderma virens* (potlačuje houbová onemocnění) a *Metarhizium anisopliae* (prevence před hmyzími škůdci). Nejdříve jsem zjistil obsah vody v půdě, tzv. SWC (Soil Water Capacity), a to vzhledem k různému zásobování rostlin vodou (viz tabulka č. 3). Do každého kelímku jsem navážil 50 g půdy a zavlažil ji tak, aby měla 40, 60 a 80 % půdní vodní kapacity.

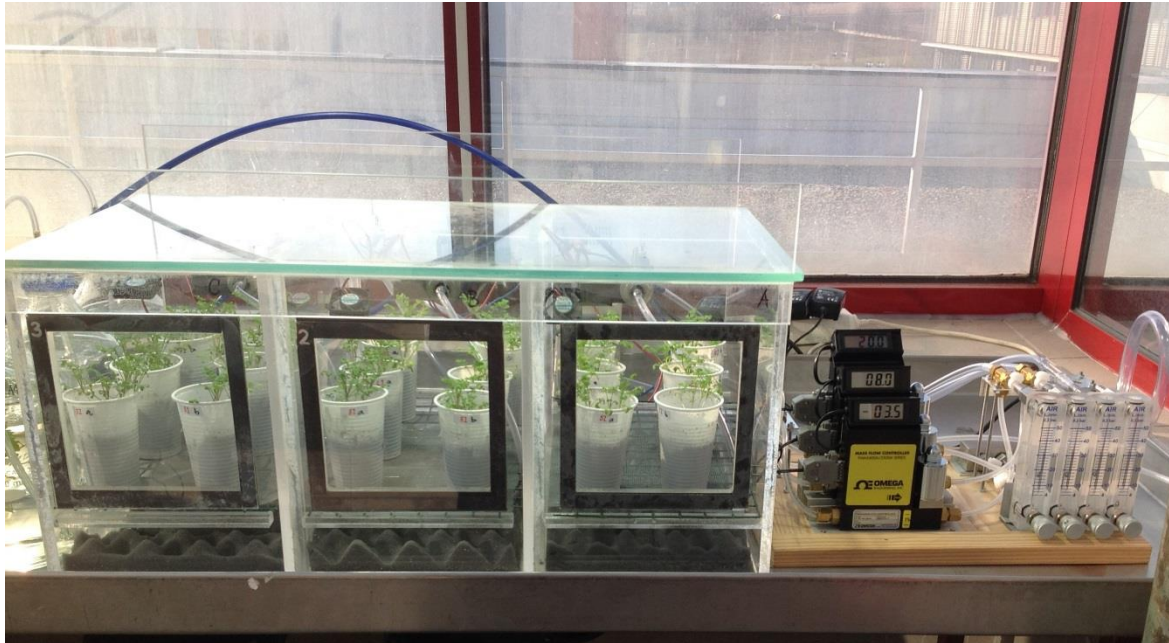
3.1 Kultivace rostlin

Pro pokus byla vybrána řěřichu zahradní (*Lepidum sativum*) zejména pro svoji vysokou klíčivost, rychlý růst a předchozí zkušenosti s jejím pěstováním. Rostliny jsem pěstoval ve speciálním tříkomorovém kultivátoru (obr. 8) vyrobeném na katedře experimentální biologie rostlin. Kultivátor byl umístěn v klimatizované skleníkové kóji na střeše budovy B přírodovědecké fakulty s jižní expozicí. Do každé ze tří samostatných komor jsem umístil 6 kelímků s vysetými 20 semeny řěřichy zahradní; kelímky v každé komoře jsem rozdělil do třech dvojic, z nichž každá měla jinou hodnotu SWC. Komory měly řízenou atmosféru

s různou koncentrací CO₂ (cílové hodnoty cca 200 μmol mol⁻¹, 400 μmol mol⁻¹, 800-1000 μmol mol⁻¹), což bylo ověřováno měřením pomocí přístroje Li-6400 (Li-Cor, Nebraska, USA). Rostliny jsem každý den vážil, úbytek hmotnosti zaznamenal a půdu zavlažil na požadovanou hmotnost (dle SWC). Díky odlišnému zásobení vodou a [CO₂] tak vznikly různé kombinace podmínek, za kterých byly rostliny pěstované, což je vyobrazeno v tabulce 1. Pokus probíhal 2x na jaře (březen-duben) a 2x na podzim (září-říjen) 2015. V každém opakování byly v kultivátoru umístěná čidla a datalogery, které každých 5 minut zaznamenávaly ozáření, teplotu a relativní vlhkost vzduchu. Průměrná ozáření na jaře byla 193,6 μmol·m⁻²·s⁻¹ a teplota 23,2 °C; na podzim pak 153,8 μmol·m⁻²·s⁻¹ a 18,2 °C (viz Tab. P1 v příloze).

Tabulka 3: Varianty podmínek, při kterých byly rostliny pěstované a související označení každé z 18 kultivačních nádob (kelímků) v jednom pokusu. První kombinační znak označuje koncentraci CO₂ (H, M, L) a dále míru zásobení vodou (podle SWC 80-40 %). Jelikož pro každou variantu byly vyčleněny 2 vzorky, poslední znak označuje konkrétní vzorek (a, b).

	1000 μmol mol ⁻¹ (<i>high</i> , H)		400 μmol mol ⁻¹ (<i>medium</i> , M)		200 μmol mol ⁻¹ (<i>low</i> , L)	
SWC 80 %	H80a	H80b	M80a	M80b	L80a	L80b
SWC 60 %	H60a	H60b	M60a	M60b	L60a	L60b
SWC 40 %	H40a	H40b	M40a	M40b	L40a	L40b



Obr. 8: Kultivátor (a) pro pěstování rostlin s různým obsahem CO₂. Vzduch čerpaný z vnitřního prostoru budovy byl pomocí molekulárního síta zbavený CO₂ a vody, rozdělen do tří větví a dále v každé z nich obohacen o CO₂ se známým izotopovým složením ze společné tlakové nádoby pomocí samostatného hmotového regulačního průtokoměru (FMA5500, Omega, USA). Do každé komory byl potom přes kuželkový průtokoměr veden vzduch o cílové koncentraci CO₂ (150-200 μmol mol⁻¹, 380-450 μmol mol⁻¹, 800-1000 μmol mol⁻¹) a stejném izotopovém složení. Kelímky byly umístěny na pevném drátěném sítu, pod nímž byla molitanová kostka. Jelikož vzduch byl v prvním kroku kromě CO₂ zbavený také vodní páry, sloužil molitan k zvlhčování vzduchu (byl pravidelně sycen destilovanou vodou). Vedení přiváděného vzduchu ústilo v blízkosti vlhkého molitanu. Atmosféra uvnitř každého ze tří kultivačních prostorů byla míchána pomocí ventilátorků. Průtok vzduchu každým kultivačním prostorem byl 16-20 L min⁻¹, objem prostoru asi 20 L.

3.2 Sklizeň a příprava vzorků

Rostliny jsem sklízel vždy 21. den od zasetí a prvního zalití semen. Nejprve jsem z každé varianty (obou kelímků) odebral dělohy a pravý list na otisky (viz níže). Dále jsem měřil vodní potenciál (Ψ) Schollanderovou tlakovou bombou. U každé varianty jsem v první sérii pokusů změřil potenciál dvou rostlin. Pro lepší výpovědní hodnotu jsem v druhé sérii měřil vodní potenciál u čtyř rostlin.

Poté jsem připravil vzorky na stanovení izotopu ¹³C a zjištění celkové produkce biomasy (suché hmoty). Předem jsem zvážil ependorfky a označil. Do dvou ependorfeček jsem odštíhl několik listů děloh a pravých (zvlášť), zbylý rostlinný materiál jsem umístil do třetí ependorfky. Připravené vzorky jsem zvážil. Takto jsem postupoval u každé

varianty (kelímku). Nakonec jsem ependorfky umístil do laboratorní sušárny, kde jsem je nechal při 80°C 24 hodin. Po vysušení jsem je opět zvažil, vzorky na měření izotopů jsem dále zpracovával a vzorky se zbylým rostlinným materiálem jsem zlikvidoval. Součtem hodnot sušiny děloh, pravých listů a zbytku rostliny jsem získal informaci o celkovém nárůstu biomasy.

V druhé sérii pokusů jsem stanovoval také nárůst kořenů. Ty jsem opatrně propláchl tak, abych odstranil půdu, ale nepoškodil kořeny. Samotné kořeny jsem poté vysušil (80 °C 24 hodin) a zvažil.

3.3 Mikroreliefové otisky průduchů

Otisky povrchu listů jsou vhodnou metodou pro analýzu pokožkových buněk – jejich tvaru, velikosti, počtu či struktury. Pro otisky jsem vybíral plně vyvinuté listy, vždy jedna děloha a jeden pravý list. List jsem odstříhl, opatrně rozpůlil a připevnil na papír pomocí oboustranné lepenky tak, abych z každého listu měl stranu abaxiální a adaxiální. V případech, kdy byl vhodný list příliš malý, jsem použil listy dva. Listy jsem natřel bezbarvým lakem a po zaschnutí přenesl otisk pomocí lepicí pásky na podložní sklíčko. Pod optickým mikroskopem (Olympus BX61 Japan, zvětšení 500x) jsem vyhotovil 5 snímků (u poškozených listů jen 3) pro každou z možných variant. Dohromady tak vzniklo 1 413 fotografií, které jsem dále zpracovával pomocí programu ImageJ. Na každé fotografii jsem označil počet epidermálních buněk a počet průduchů a jejich hodnoty zaznamenal. Z těchto hodnot jsem pak mohl vypočítat průduchový index (SI) pomocí vztahu:

$$SI = \frac{\text{průduchy}}{\text{dlaždicové buňky} + \text{průduchy}} \cdot 100$$

Pro zjištění průduchové hustoty (SD) jsem si nejprve změřil velikost zorného pole pomocí kalibračního podložního sklíčka s měřítkem a v programu ImageJ zjistil velikost plochy jednoho snímku (0,127 mm²). SD jsem určoval jako počet průduchů na 1 mm².

3.4 Analýza stabilních izotopů uhlíku

Vysušené vzorky děloh a pravých listů jsem pomocí kulového mlýnku (Retsch MM200, Německo; nastavený na 30 otáček za sekundu po dobu jedné minuty) namlel na jemný prášek a do cínových kapslí navážil v předem stanoveném rozmezí (0,100-0,150 mg). Zabalené cínové kapsle byly analyzovány pomocí izotopového poměrového hmotnostního spektrometru IRMS (Delta plus XL, ThermoFinnigan, Bremen, Německo). Vzorky byly spalovány na CO₂ (a další plyny a popeloviny) při teplotě 950 °C v prvkovém analyzátoru (FLASH2000, ThermoFisher Scientific, Německo). Obsah izotopů uhlíku byl vyjádřen jejich poměrem ve vzorku (¹³C:¹²C) vzhledem k mezinárodnímu standardu (V-PDB) jako δ¹³C v ‰ (viz Tab. P2 v příloze).

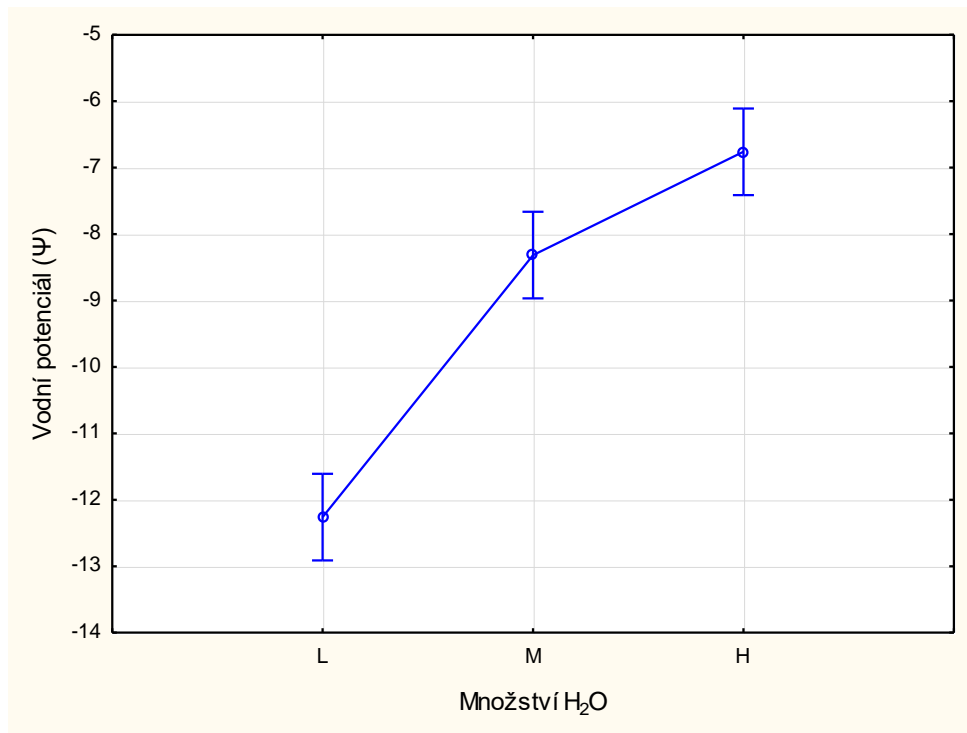
3.5 Statistické vyhodnocení

Data jsem vyhodnotil v programu STATISTICA 12. Pro vyhodnocení vlivu množství vody a [CO₂] na hmotnost sušiny a SD/SI jsem použil vícecestnou ANOVu. Tu jsem použil také pro analýzu závislosti množství ¹³C na [CO₂] a množství dostupné vody. U všech výsledků uvádím střední hodnoty a 0,95 interval spolehlivosti. Pro vyhodnocení vlivu vnitřní koncentrace CO₂ (C_i) na SD jsem použil regresní rovnici.

4. VÝSLEDKY

4.1 Vodní potenciál

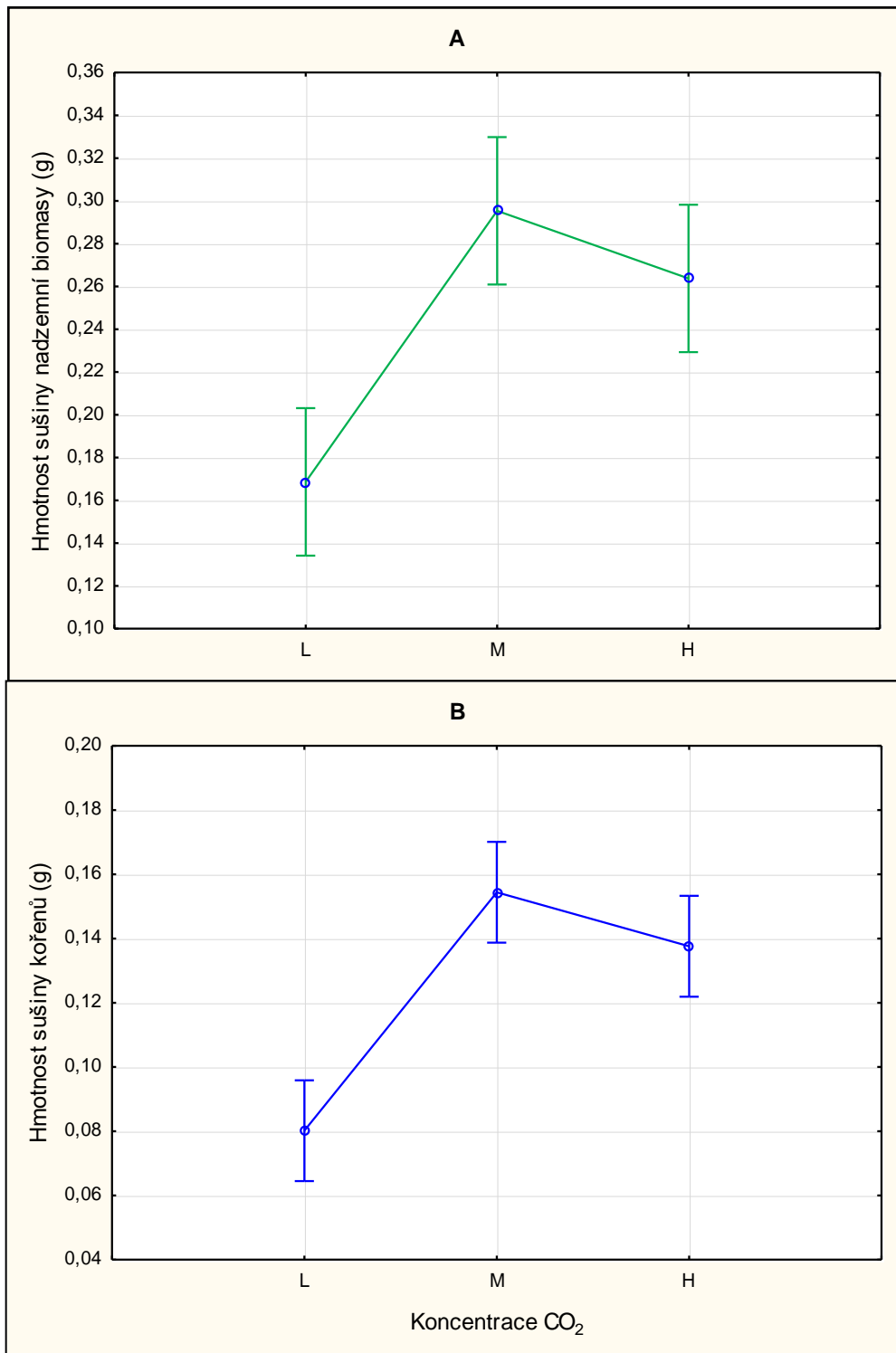
Vodní potenciál (Ψ) používáme ve fyziologii rostlin ke kvantifikaci vody v rostlinách. Výchozím předpokladem je, že čím hůře je voda dostupná, tím zápornější je hodnota Ψ. Na obrázku 9 je vidět, že rostliny, které jsem vodou zásoboval nejméně (RWC 40 %), měly vodní potenciál nejnižší (nejvíce záporný) (Ø -12,3), při střední hodnotě RWC (60 %) prudce vzrostl (Ø -8,3). Při ještě vyšším zásobení vodou byl vzrůst už jen mírný (Ø -6,8). Koncentrace CO₂ neměla na vodní potenciál žádný významný vliv.



Obr. 9: Závislost vodního potenciálu na množství dostupné vody. Graf je vytvořen ze souhrnných dat obsahujících všechna opakování ve všech variantách růstové koncentrace CO₂ ($n=108$). Body a úsečky znázorňují střední hodnoty a 0,95 interval spolehlivosti. Označení L, M a H znamená v pořadí nízkou, střední a vysokou zásobenost vodou.

4.2 Nárůst biomasy rostlin v závislosti na koncentraci CO₂

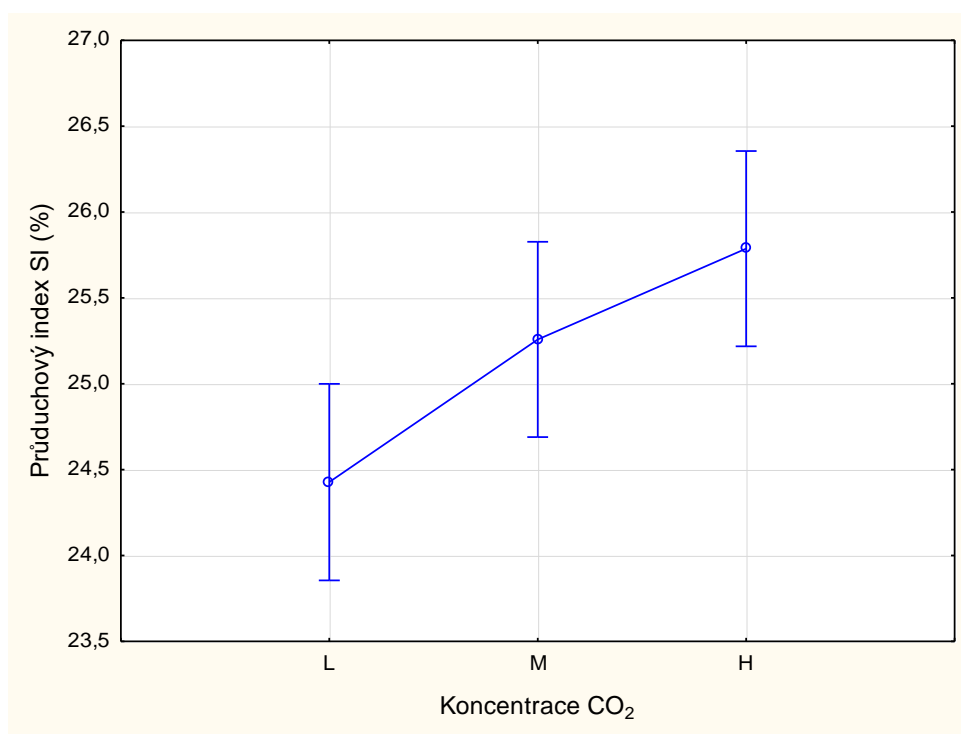
Základním předpokladem je, že při dostatečném zavlažování a přísunu CO₂ bude rostlina více asimilovat CO₂ než při nedostatku vody v půdě a CO₂ v ovzduší. Dále lze předpokládat, že rychlost fotosyntetické asimilace bude úměrná produkci biomasy. V tomto pokusu byl největší nárůst zaznamenán u střední hodnoty koncentrace CO₂ (~400 μmol mol⁻¹), při nejvyšší koncentraci CO₂ (~900 μmol mol⁻¹) pak rostliny vytvořily o něco méně biomasy (obr. 10). Tak tomu bylo u třech opakování ze čtyř. Poslední opakování přineslo neobvyklý pokles biomasy při středním zásobování CO₂ a v obr. 10 není zahrnuto.



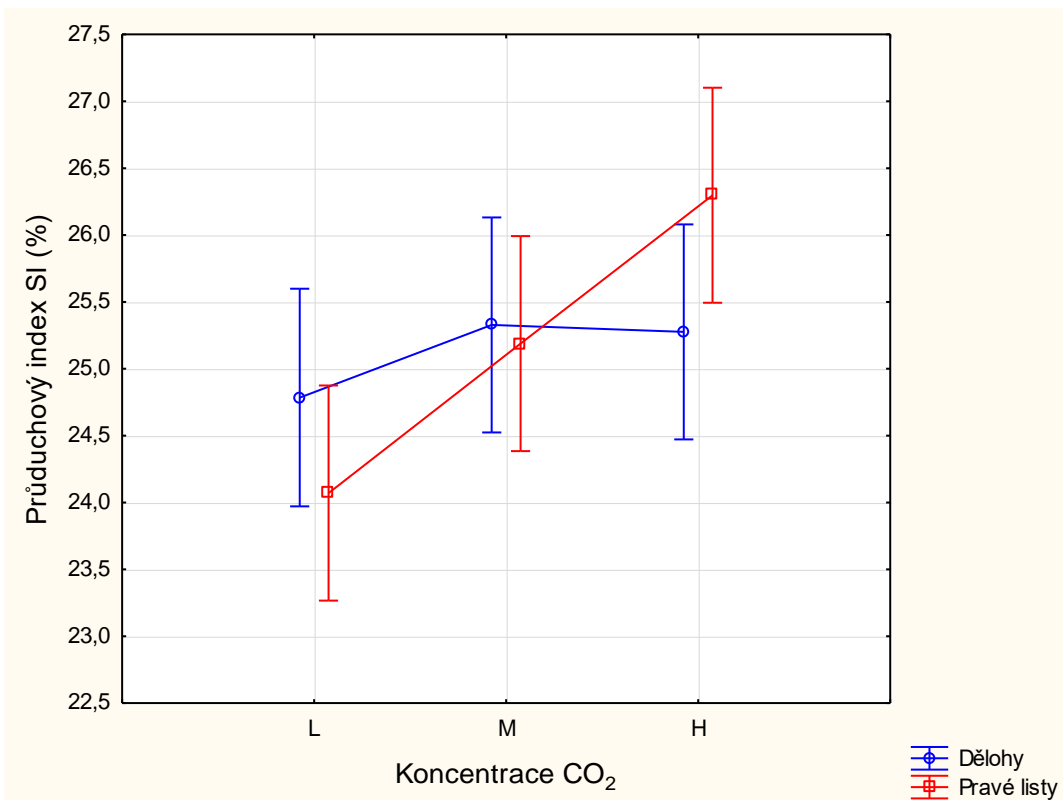
Obr. 10: Závislost množství biomasy rostlin (suché hmoty všech rostlin v kultivační nádobě v dané variantě) na koncentraci CO₂ v atmosféře. Body a úsečky znázorňují střední hodnoty a 0,95 interval spolehlivosti. L, M, H označuje nízkou, střední a vysokou koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu. Jak v případě nadzemní biomasy (**A**, $n=54$), tak u kořenů (**B**, $n=18$) je dosaženo nejvyšší hmotnosti při střední koncentraci CO₂. Při nejvyšší koncentraci CO₂ oproti očekávání množství sušiny mírně klesá. Rozdíly mezi L a M jsou statisticky významné (nadzemní biomasa $p=0,0001$; kořeny $p=0,0025$). Graf nezahrnuje poslední opakování.

4.3 Závislost SI a SD na koncentraci CO₂

Průduchový index (tj. podíl průduchů mezi všemi epidermálními buňkami, SI) statisticky významně rostl s množstvím CO₂ v atmosféře (viz obr. 11). Na adaxiální straně byl SI nižší oproti straně abaxiální (SI_{adax} = 24,2–25,2; SI_{abax} = 25,2–26,1), přičemž patrnější je to u pravých listů. Pravé listy vykazují také vyšší závislost SI na množství CO₂ (obr. 12). Dostupnost vody neměla na SI žádný zřejmý vliv. S rostoucí koncentrací CO₂ rostla také hodnota SI u všech variant s různým vodním režimem.

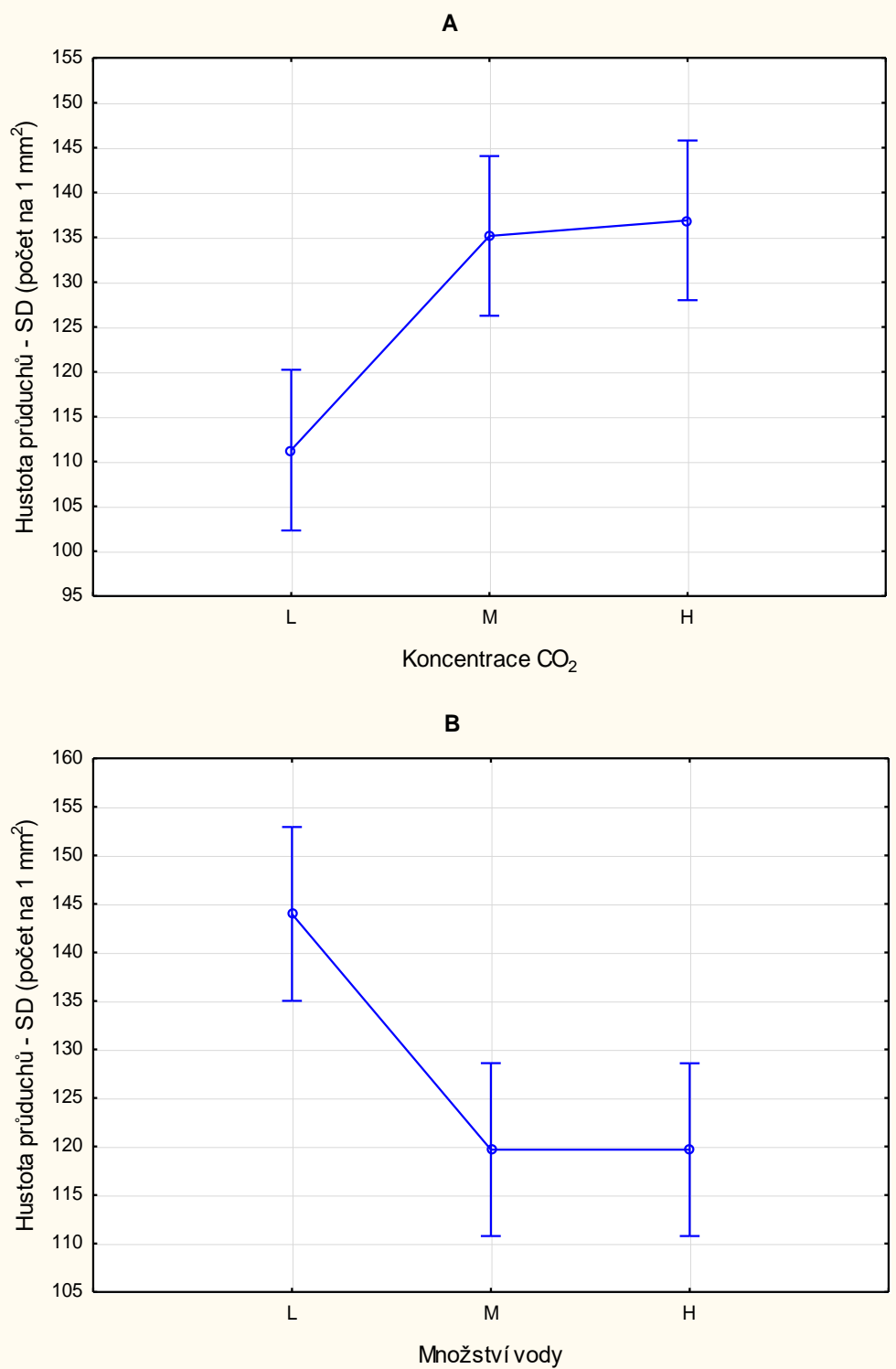


Obr. 11: Závislost průduchového indexu (SI) na koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu rostlin (L, M, H=nízká, střední a vysoká koncentrace). Graf je vytvořen ze souhrnných dat pro obě strany listu, všechny varianty dostupnosti vody a všechna opakování ($n=288$). Body a úsečky znázorňují střední hodnoty a 0,95 interval spolehlivosti. L, M, H označuje nízkou, střední a vysokou koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu. SI statisticky významně ($p=0,0042$) roste při vyšší koncentraci CO₂.



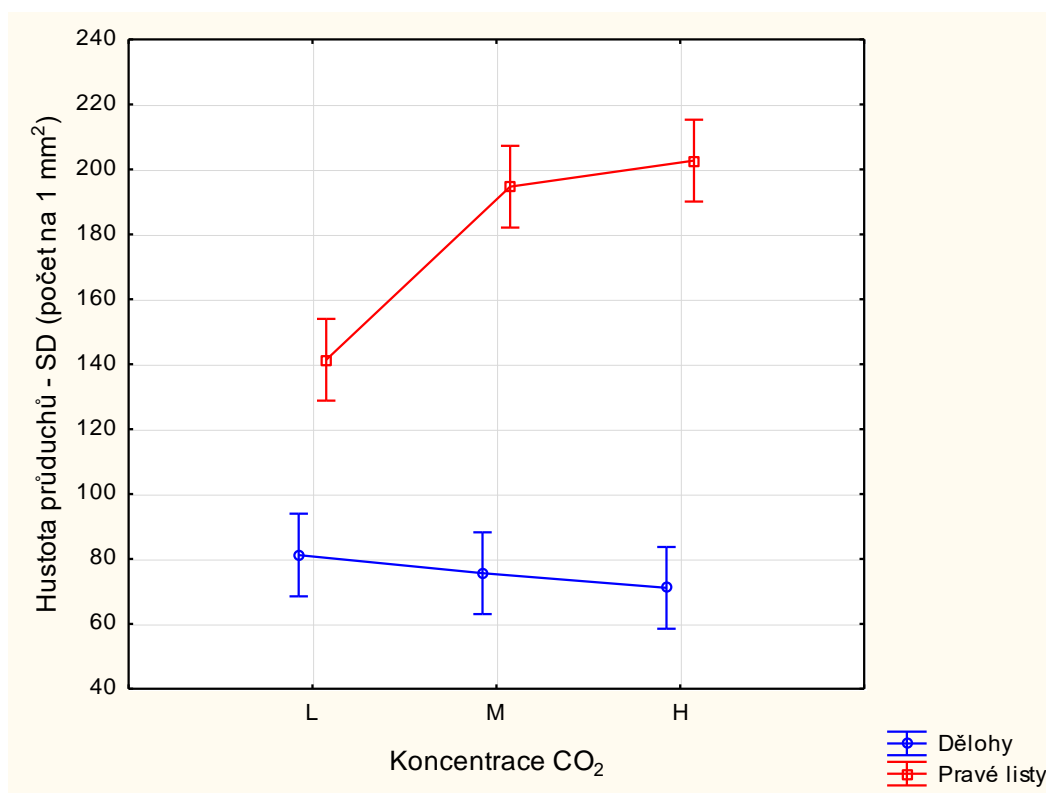
Obr. 12: Rozdíl závislosti SI na koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu děloh a pravých listů. Graf je vytvořen ze souhrnných dat obsahujících všechna opakování ($n=288$). Body a úsečky znázorňují střední hodnoty a 0,95 interval spolehlivosti. L, M, H označuje nízkou, střední a vysokou koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu. Mezi pravými listy je rozdíl v SI pro koncentrace CO₂ statisticky významný s patrným lineárním vzrůstem u vyšších koncentrací CO₂. U děloh byl vztah SI a koncentrace CO₂ nevýznamný.

Hustota průduchů (počet průduchů na jednotku plochy listu, SD) se oproti SI významně lišila v závislost jak na množství CO₂ tak i vody. Zatímco nízká koncentrace CO₂ vedla ke sníženému SD v porovnání se střední a vysokou úrovní CO₂, efekt vody byl přesně opačný (obr. 13). Při nízké dostupnosti vody bylo SD vyšší u všech koncentrací CO₂. Podobně jako u SI byla SD nižší na straně adaxiální.



Obr. 13: Závislost průduchové hustoty (SD) na koncentraci CO₂ a množství vody. Graf je vytvořen ze souhrnných dat obsahujících všechna opakování ($n=288$) a obě strany listu. Body a úsečky znázorňují střední hodnoty a 0,95 interval spolehlivosti. L, M a H v případě koncentrace CO₂ i obsahu vody v půdě znamenají nízké, střední a vysoké hodnoty. Hustota průduchů byla při nižší hodnotě CO₂ snížena oproti střední a vysoké koncentraci CO₂ (A). Opačný vliv na SD měla dostupnost vody (B). Dosažená hladina významnosti rozdílů mezi L a M byla $p=0,00007$ pro závislost SD na CO₂ a $0,0001$ pro závislost SD na množství vody.

Typu závislosti SD na CO₂ z obrázku 13A odpovídají více pravé listy. U děloh s rostoucí koncentrací CO₂ SD mírně (neprůkazně) klesalo (obr. 14).



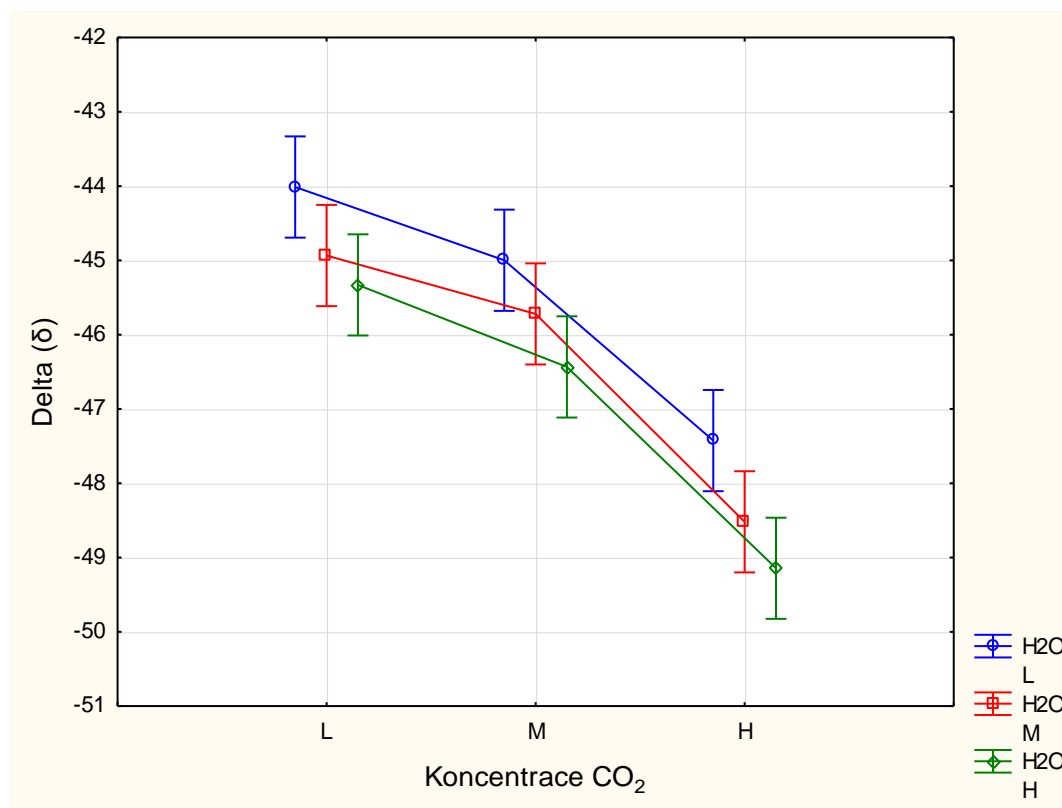
Obr. 14: Závislost SD na koncentraci CO₂ u děloh a pravých listů. Graf je vytvořen ze souhrnných dat obsahujících všechna opakování ($n=288$) a obě strany listu. Body a úsečky znázorňují střední hodnoty a 0,95 interval spolehlivosti. L, M, H označuje nízkou, střední a vysokou koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu. U děloh je patrný opačný trend závislosti SD na CO₂.

4.4 Analýza stabilních izotopů uhlíku

V pokusu jsem stanovoval relativní obsah stabilního izotopu uhlíku, $\delta^{13}\text{C}$ (dále jen δ), v sušině děloh a pravých listů rozemletých na jemný prášek. Pravé listy měly vždy nižší (více zápornou) hodnotu δ v porovnání s dělohami (viz Obr. P1 v příloze). Z hodnot δ jsem vypočítal vnitřní koncentraci (C_i) CO₂ na základě vztahu (3).

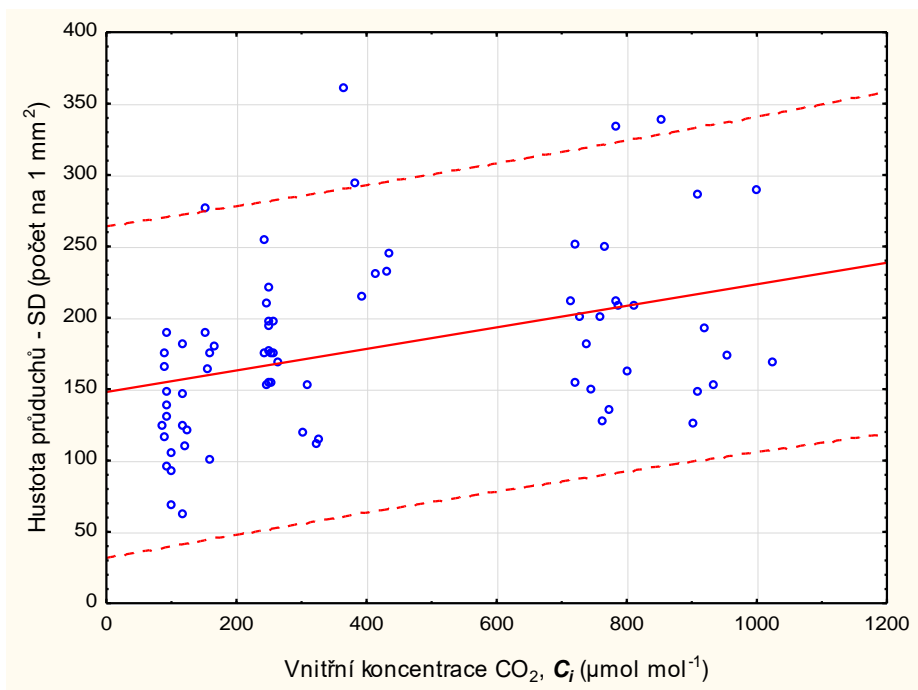
Závislost obsahu ^{13}C na koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu byla statisticky významná ($p < 0,05$). S rostoucí koncentrací CO₂ hodnota δ klesala, rostliny se tedy stávaly ochuzenější o ^{13}C . Určitý trend je patrný také při porovnání δ v závislosti nejen na

koncentraci CO₂, ale také na množství vody (obr. 15): se zvyšující se mírou sucha se rostliny stávaly obohacenějšími o ¹³C (stoupala δ).

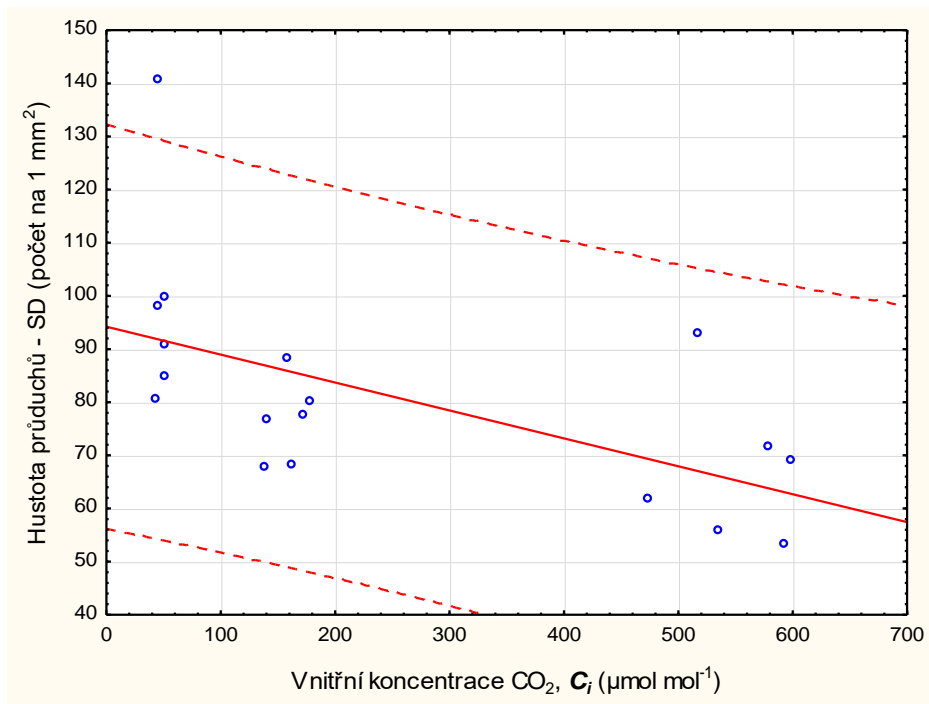


Obr. 15: Závislost relativního obsahu izotopu ¹³C v sušině prýtů rostlin (δ) na koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu a na množství vody v půdě. Graf je vytvořen ze souhrnných dat obsahujících všechna opakování (*n*=144). Body a úsečky označují střední hodnoty a konfidenční intervaly. L, M a H v případě koncentrace CO₂ i obsahu vody v půdě znamenají nízké, střední a vysoké hodnoty. Zatímco vliv samotné koncentrace CO₂ je statisticky významný, v případě rozdílném zásobení vodou můžeme pozorovat jistý trend, ovšem statisticky neprůkazný. Z grafu vyplývá, že s rostoucí koncentrací CO₂ hodnota δ klesá (L= -44,7; M= -45,7; H= -48,4). Hodnota δ má tendenci se snižovat také s rostoucí mírou zavlažení rostlin.

Vnitřní koncentrace CO₂ (*C_i*) statisticky významně ovlivnila průduchovou hustotu. Překvapivě a podobně jako v případě vlivu *C_a*, s rostoucí hodnotou *C_i* se zvyšovala také průduchová hustota. Tento trend je patrný u pravých listů (obr. 16). Dělohy vykazovaly opačnou závislost a to jen v jednom opakování (obr. 17).



Obr. 16: Závislost SD u pravých listů na vnitřní koncentraci CO₂ během růstu. Body v grafu představují jednotlivá měření ze všech čtyř opakování pokusu ($n = 72$). Čárkovane je naznačen 95% konfidenční pás. Je z něj patrné, že s rostoucí hodnotou C_i mírně roste také SD ($p=0,001$). Regresní rovnice: $y = 148 + 0,08 \cdot x$.



Obr. 17: Závislost SD u děloh na vnitřní koncentraci CO₂ během růstu. Graf je vytvořen pouze z jednoho ze čtyř opakování experimentu ($n = 18$) a zahrnuje 95% konfidenční pás. Je z něj patrné, že s rostoucí hodnotou C_i mírně klesá SD ($p=0,0011$). Regresní rovnice: $y = 94,22 - 0,053 \cdot x$.

5. DISKUZE

Rostliny se během evoluce adaptovaly ve své morfologii, anatomii i životních funkcích podmínkám prostředí, v kterém rostly. Suchozemské rostliny se musely vypořádat hlavně s téměř permanentním deficitem vody způsobeném nároky atmosféry na výpar i nedostatkem vody v půdě. Mimo to oxid uhličitý v atmosféře, jako jediný primární zdroj anorganického uhlíku, se během fanerozoika stával téměř nepřetržitě stále nedostatkovější komoditou. Jeho nedostatek byl patrně nejvýznamnějším selekčním tlakem mnoha adaptací asimilačních orgánů a v nich probíhajících fotosyntetických procesů. Mezi nejznámější takové adaptace patří např. polyfyletický vznik CO_2 koncentračního mechanismu C_4 rostlin ale i usnadnění vstupu CO_2 do listu zmnožením počtu průduchů na listu, tedy adaptace ve vývoji průduchů. To, že průduchy reagují svým vývojem a četností na koncentraci CO_2 v okolní atmosféře ukázal už Woodward před téměř 30 lety (Woodward 1987). Od té doby se z tohoto pozorování vyvinul výzkumný směr podporující rekonstrukci paleoklimatu na základě měření hustoty průduchů na paleozbytcích a otiscích listů rostlin. Dosud se ale málo při podobných rekonstrukcích zohledňuje vliv ostatních faktorů prostředí, jako je ozáření fotosynteticky aktivní radiací (světlo), vlhkost atmosféry, dostupnost vody v půdě, teplota vzduchu nebo jeho turbulence (vítr). Rovněž mezidruhová variabilita v reakci na CO_2 se obecně poněkud podceňuje. Moje práce měla přispět k doplnění znalostí o těchto „druhotných“ vlivech, které mohou výpovědní hodnotu průduchové analýzy snížit nebo dokonce zcela znehodnotit.

5.1 Vodní potenciál

Hodnota vodního potenciálu rostlin dosahovala podle očekávání nejzápornějších hodnot při nízkém přísunu vody. Koncentrace CO_2 ve vnější atmosféře tento vztah nijak statisticky významně nenarušila, což je vzhledem k pokusu očekávaný výsledek.

5.2 Nárůst biomasy

U tří opakování ze čtyř byl nárůst biomasy nejvyšší vždy při střední $[\text{CO}_2]$ a poté mírně klesl. Stejný trend vykazuje také hmotnost kořenů. Výsledky jsou to překvapivé v tom, že jsem očekával největší nárůst biomasy v komoře s nejvyšší koncentrací CO_2 .

Je zřejmé, že rostliny s nízkým zásobením CO_2 (L) byly limitované deficitem CO_2 jako substrátu pro enzym Rubisco, proto asimilovaly méně. S nárůstem $[\text{CO}_2]$ vzrostla jeho

dostupnost, čímž se zvýšila asimilace a hmotnost biomasy (kořenů i prýtů). Následný pokles asimilace při nejvyšší koncentraci CO₂ je zřejmě způsoben limitací světlem (průměr ozáření během fotoperiody za všechny pokusy byl 173,7 μmol m⁻² s⁻¹). Domnívám se, že přírůstek substrátu pro karboxylaci nemohla rostlina využít v důsledku nedostatku energie v podobě produktů primárních fotosyntetických procesů (ATP, NADPH).

5.3 SI a SD

Ve způsobu, jakým se projevuje závislost SD a SI na měnící se [CO₂] nepanuje zatím přílišná shoda. Základním předpokladem je, že jsou nepřímo úměrné, tedy vyšší obsah CO₂ vede ke snížení SD a SI a naopak (Woodward, 1987). Při nízkých koncentracích CO₂ je pro rostlinu výhodný větší počet menších průduchů (tedy vyšší hodnota SD) vzhledem k úsilí rostliny dosáhnout maximální vodivosti pro CO₂ (Franks & Beerlings, 2009). Menší průduchy mohou mít díky většímu poměru membránového povrchu k objemu také rychlejší dobu odezvy ve srovnání s velkými průduchy. V kombinaci s vyšším počtem průduchů by tak mohly rychleji snížit vodivost při nepříznivých podmínkách, což zatím nebylo potvrzeno (Drake *et al.*, 2013)

V mém pokusu však se vzrůstající hodnotou [CO₂] rostly rovněž hodnoty SI a SD, přičemž statisticky významně byla závislost v obou případech patrná u pravých listů. Při porovnání strany listu byly hodnoty SD a SI nižší na straně adaxiální ale obě strany reagovaly na [CO₂] kvalitativně stejně. Jedná se o velmi nečekaný výsledek, který byl způsobený zřejmě již zmíněným nízkým působením fotosynteticky aktivního záření (viz dále). K pozitivní závislosti mezi SD/SI a [CO₂] však došli i jiní autoři. Práce D. Royer (2001) analyzovala všechna publikovaná data (do roku 2001), čítajících 285 případů vztahujících se k SD a 145 k SI a ukázala, že pozitivní závislost (= přímo úměrná) SD/SI se projevila u 12 % z celkového počtu publikovaných studií. V poslední době se proto intenzivně pátrá po možných faktorech ovlivňující „směr“ závislosti SD/SI na měnící se [CO₂].

Především se ukázalo, že vztah mezi SI a [CO₂] je druhově specifický (Wang *et al.*, 2015). Zásadní je rozdíl mezi C3 a C4 rostlinami. C4 jsou obecně považovány za nevhodné pro paleo-rekonstrukce. Ovšem rozdíly panují i v rámci samotných C3 rostlin. Např. hypostomatické druhy podporují nepřímo úměrný vztah mezi SI/SD a [CO₂] častěji než amfistomatické (kam patří i pokusný druh *Lepidium sativum*). Ukazuje to analýza

publikovaných dat zmíněných výše. Hypostomatické druhy dokládaly nepřímo úměrný vztah SD v 56 % a SI dokonce v 68 % případů (Royer, 2001).

SI se uvádí jako obecně vhodnější indikátor změn v [CO₂], neboť není závislý na dalších ekologických parametrech, jako je půdní vlhkost, vlhkost vzduchu a teplota (Wang *et al.*, 2015). Tuto teorii potvrdily také mé výsledky, kdy se hodnota SI v rámci různé půdní vlhkosti neměnila. SD byla v průměru výrazně vyšší při nízké půdní vlhkosti (Ø 205,2) oproti hodnotám střední a vysoké půdní vlhkosti (Ø 168,5 a 167,5). Důvodem je snížení velikosti epidermálních buněk, které způsobí nahloučení většího počtu menších průduchů blíže k sobě (Wang *et al.*, 2014).

Značnou výhodou průduchové metody pro paleorekonstrukci [CO₂] je jejich přesnější časové datování (Royer, 2001; Wang *et al.*, 2014). Přesto by výběr rostlinného zástupce a použité metody měl vyhovovat určitým kritériím.

Studujeme-li fosilní druhy, měli bychom je porovnávat s druhy ze současné flóry, které se označují jako *nejbližší žijící ekvivalent*. Často využívanými druhy jsou např. *Ginkgo biloba* nebo *Quercus robur*. Výhodou stromů je skutečnost, že absorbují více slunečního záření, oproti bylinným druhům rostoucím v podrostu. Je dobře známo, že dostatečná ozáření má pozitivní vliv na průduchy. Na základě pokusů, při kterých byl druh *Lepidum sativum* pěstován při různých ozářeních včetně úplné tmy se ukázalo, že s nižší ozáření se výrazně snižují také hodnoty SD/SI (Aubrechtová 2013, diplomová práce; Šantrůček, nepublikovaná data). V mírných a boreálních lesích dominují jehličnaté stromy, jejich využití pro paleorekonstrukci by mohlo zvýšit zejména prostorové pokrytí těchto rekonstrukcí. Nepočtené studie ukazují, že jehličnany snižují SD s rostoucí [CO₂]. Kouwenberg *et al.* (2003) tuto závislost potvrdil u druhů *Picea glauca*, *Picea marina*, *Larix laricina* a *Tsuga heterophylla*. Ukazuje se však, že u nahosemenných rostlin klesá SD výrazně více oproti rostlinám krytosemenným (Lammertsma *et al.*, 2011). Ovšem studium fosilních listů přináší i jistá rizika. Např. Beerling a Woodward (1997) ukázali, že vysoká [CO₂] selektuje rostliny s nižší průměrnou SD/SI. Proto jsou průměrné hodnoty SD/SI u rostlin z dob vysokých [CO₂] nižší oproti jejich modernímu ekologickému ekvivalentu.

V experimentálních podmínkách se využívají tzv. *open top chambers*. Jedná se o otevřené komory umístěné na vegetaci, do kterých je pomocí ventilátoru vháněn vzduch obohacený o CO₂. Nicméně většina takových komor má menší kontrolu vlhkosti a teploty. Rostliny pěstované v těchto komorách vykazují přímo úměrný vztah pro SD a SI méně (13

%) (Royer, 2001). Další nevýhodou experimentálních podmínek je tzv. jednokrokové navýšení $[\text{CO}_2]$, např. z $200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ rovnou na $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. V přirozených podmínkách k takovému navýšení nedochází. Kouwenberg *et al.* (2003) uvádí, že $[\text{CO}_2]$ se přirozeně mění v hodnotách $1\text{--}2 \mu\text{mol mol}^{-1}$ za rok či růstovou sezónu.

V některých studiích se můžeme setkat s tzv. „stropem odpovědi na CO_2 “, kde se předpokládá, že jednotlivé druhy reagují (změnou SD/SI) pouze v určitém rozmezí $[\text{CO}_2]$. Strop je pak představován nejvyšší možnou koncentrací v daném rozmezí. Mnozí autoři se však rozcházejí v rozsahu CO_2 , na který konkrétní druhy reagují. Je také zcela možné, že u některých druhů takový strop vůbec neexistuje (Royer, 2001), a proto je potřeba toto dále prozkoumat.

5.4 Analýza stabilních izotopů uhlíku

Uhlík je u C3 rostlin fixován v mezofilu při hodnotě C_i (intercelulární koncentrace CO_2) přibližně 70 % z hodnoty C_a (koncentrace CO_2 ve volné atmosféře okolo listu) (Royer, 2001). Podobné hodnoty dosahovala střední hodnota C_i vypočítaná na základě změřeného izotopového složení sušiny ($\delta^{13}\text{C}$) pravých listů také v mé práci (L (CO_2) = 0,61; M (CO_2) = 0,63; H (CO_2) = 0,74).

Šantrůček *et al.* (2014b) poukázali na možný mechanismus, kdy SD reaguje na hodnotu intracelulární CO_2 . Výsledky mé práce tuto skutečnost potvrzují. Hustota průduchů u pravých listů statisticky významně koreluje s mírou intracelulární koncentrace CO_2 . Dělohy vykazovaly závislost jen ve 25 % případů. Nicméně v mé práci se na rozdíl od výše citované práce spolu s C_i měnila i C_a . Nepodařilo se zde vyčlenit soubor pozorování s neměnnou C_i při proměnlivé C_a , jak jsme původně zamýšleli. Proto na základě mých pokusů nelze jednoznačně potvrdit ani vyloučit to, zda průduchy během svého vývoje reagují na koncentraci CO_2 vně nebo spíše uvnitř listu.

6. ZÁVĚR

- Průduchy jsou citlivé na změny $[\text{CO}_2]$. Očekával jsem nepřímo úměrný vztah mezi průduchovou hustotou (SD), případně průduchovým indexem (SI), a koncentrací CO_2 . Hodnoty SD/SI měly s rostoucí $[\text{CO}_2]$ klesat, jak to vychází ve většině vědeckých prací. V mém pokusu jsem závislost potvrdil (statisticky významně pouze u pravých listů), avšak v opačném směru—tedy s rostoucí $[\text{CO}_2]$ hodnoty SD a SI rostly. To není úplně ojedinělý výsledek. Některé studie ukázaly, že pozitivní (přímo úměrná) závislost je častější u amfistomatických listů, kam se řadí i má pokusná rostlina *Lepidum sativum*. Příčinou pozitivní korelace byla v případě mých pokusů pravděpodobně nízká ozářenost fotosynteticky aktivním zářením během růstu rostlin.
- Průduchy jsou citlivé na změny v dostupnosti vody v půdě. Při nejnižší dostupnosti vody byla hustota průduchů statisticky významně vyšší v porovnání se střední a vysokou dostupností vody. Na adaxiální straně listu byly hodnoty SD vždy nižší oproti straně abaxiální.
- Hypotézu, že hustota průduchů (SD) koreluje s intracelulární koncentrací CO_2 (C_i) jsem ověřil. U děloh hodnota SD klesala (avšak statisticky nevýznamně) se vzrůstající CO_2 , zatímco u pravých listů hodnota SD významně rostla (zřejmý vliv nízké ozářenosti, viz výše). Je třeba ale dodat, že se v těchto pokusech současně s C_i měnila i C_a . Proto nelze jednoznačně prohlásit, zda průduchy reagují spíše na C_i nebo C_a .
- Využívání fosilních listů pro rekonstrukci klimatu je v paleoklimatologii užitečným nástrojem. Nespornou výhodou je nejpřesnější časové rozlišení ze všech proxy dat vztahujících se k $[\text{CO}_2]$. Je však nezbytné uvážit, jaké listy se použijí. Především by se mělo jednat o druhy, které nerostou v podrostu. Kvantita ozářenosti totiž významně ovlivňuje závislost SD/SI na $[\text{CO}_2]$, jak ukázaly i mé výsledky. Fosilní druhy by se také měly porovnávat s moderními druhy označovanými jako nejbližší žijící ekvivalent. I laboratorní experimenty by měly být prováděné s ohledem na určitá pravidla, mají-li být použita pro zkvalitnění průduchové metody. Tato práce přinesla výsledky, které poukazují na význam faktorů, jako je míra ozářenosti nebo vlhkost. Ty se v mnohých studiích ne zcela nebo dokonce vůbec nezohledňují.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ando E, Ohnishi M, Wang Y, Matsushita T, Watanabe A, Hayashi Y, Fujii M, Feng Ma J, Inoue S, Kinoshita T. 2013. TWIN SISTER of FT, GIGANTEA, and CONSTANS have a positive but indirect effect on blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **162**, 1529–1538.

Archer D, Brovkin V. 2008. The millennial atmospheric lifetime of anthropogenic CO₂. *Climatic change* **90**, 283-297.

Arve L, Terfa MT, Gislørød HR, Olsen JE, Torre S. 2013. High relative air humidity and continuous light reduce stomata functionality by affecting the ABA regulation in rose leaves. *Plant, Cell and Environment* **36**, 382–392.

Aubrechtová M. *Vývoj průduchů: vliv spektrálního složení, ozáření a koncentrace CO₂ uvnitř listu.* České Budějovice, 2014. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Jiří Šantrůček.

Bábek O. *Moderní metody stratigrafické analýzy.* Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. 64 pp.

Balcerowicz M, Ranjan A, Rupprecht L, Fiene G, Hoecker U. 2014. Auxin represses stomatal development in dark-grown seedlings via Aux/IAA proteins. *The Company of Biologists* **141**, 3165–3176.

Beerling DJ, Woodward FI. 1997. Changes in land plant function over the Phanerozoic: reconstructions based on the fossil record. *Botanical Journal of the Linnean Society* **124**, 137-153.

Beerling DJ, Royer DL. 2002. Reading a CO₂ signal from fossil stomata. *New Phytologist* **153**, 387-397.

Bergmann DC. 2004. Integrating signals in stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 26–32.

Bergmann DC. 2006. Stomatal development: from neighborly to global communication. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 478–483.

Blatt MR. 2000. Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annual Review of Cell and Development Biology* **16**, 221–241.

Bowman JL. 2011. Stomata: Active Portals for Flourishing on Land. *Current Biology* **21**, 540–541.

Bowman JL. 2013. Walkabout on the long branches of plant evolution. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 70-77.

Boyer JS. 2015. Turgor and the transport of CO₂ and water across the cuticle (epidermis) of leaves. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2625–2633.

Bradley RS. *Paleoclimatology: Reconstructing Climates of the Quaternary*. San Diego: Academic Press, 1999. 610 pp.

Brázdil R, Pfister CH, Wanner H, Storch H, Luterbacher J. 2005. Historical climatology in Europe – the state of the art. *Climatic change* **70**, 363-430.

Brodribb T, McAdam SAM. 2011. Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science* **331**, 582–585.

Cane MA, Braconnot P, Clement A, Gildor H, Joussaume S, Kageyama M, Khodri M, Paillard D, Tett S, Zorita E. 2006. Progress in paleoclimate modeling. *American Meteorological Society* **19**, 5031-5057.

Casson SA, Hetherington AM. 2010. Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 90–95.

Cowan IR. Stomatal behaviour and environment. In *Advances in Botanical Research*, **4**. London: Academic Press, 1977, 117-228.

Daszkowska-Golec A, Szarejko I. 2013. Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 138.

Delaygue G. Oxygen Isotopes. In *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments*. Dordrecht: Springer 2009, s. 666-675.

Dow GJ, Bergmann DC. 2014 Patterning and processes: how stomatal development defines physiological potential. *Current Opinion in Plant Biology* **21**, 67-74.

Drake PL, Froend RH, Franks PJ. 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* **64**, 495-505.

Feliksik E, Wilczyński S. 2009. The effect of climate on tree-ring chronologies of native and nonnative tree species growing under homogenous site conditions. *Geochronometria* **33**, 49-57.

Franks PJ, Beerlings DJ. 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Science* **106**, 10343-10347.

Geisler MJ, Sack FD. 2002. Variable timing of developmental progression in the stomatal pathway in *Arabidopsis* cotyledons. *New Phytologist* **153**, 469-476.

Gornitz V. Paleoclimate proxies, an introduction. In *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments*. Dordrecht: Springer 2009, 716-721.

Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodward FI, Schuch W, Hetherington AM. 2000. The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* **408**, 713 - 716.

Haworth M, Heath J, McElwain JC. 2010. Differences in the response sensitivity of stomatal index to atmospheric CO₂ among four genera of *Cupressaceae* conifers. *Annals of Botany* **105**, 411-418.

Hetherington AM, Woodward FI. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**, 901-908.

Higgins P, Vellinga M. 2004. Ecosystem responses to abrupt climate change: teleconnections, scale and the hydrological cycle. *Climatic change* **64**, 127-142.

Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F*, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Véry A, Simonneau T, Thibaud JB, Sentenac H. 2003. The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Science* **9**, 5549-5554.

Kouwenberg L, McElwain JC, Kürschner WM, Wagner F, Beerling DJ, Mayle FE, Visscher H. 2003. Stomatal frequency adjustment of four conifer species to historical changes in atmospheric CO₂. *American Journal of Botany* **90**, 610-619.

Lake JA, Woodward FI. 2008. Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist* **179**, 397-404.

Lammertsma EI, Boerb HJ, Dekkerb SC, Dilcher DL, Lottera AF, Wagner-Cremera F. 2011. Global CO₂ rise leads to reduced maximum stomatal conductance in Florida vegetation. *Proceedings of the National Academy of Science* **108**, 4035-4040.

Lawson T, Blatt MR. 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiology* **164**, 1556-1570.

Link PK. “Icehouse” (Cold) Climates. In *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments*. Dordrecht: Springer 2009, s. 463-471.

MacRobbie EAC. 1997. Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. *Journal of Experimental Botany* **48**, 515-528.

Mauquoy D, Hughes PDM, van Geel B. 2010. A protocol for plant macrofossil analysis of peat deposits. *Mires and Peat* **7**, 1-5.

Menzies J. Glacial geomorphology. In *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments*. Dordrecht: Springer 2009, s. 361-374.

Metelka L, Tolasz R. *Klimatické změny: fakta bez mýtů*. Praha: Univerzita Karlova, Centrum pro životní otázky, 2009. 35 pp.

Meyer KM, Kump LR, Ridgwell A. 2008. Biogeochemical controls on photic-zone euxinia during the end-permian mass extinction. *Geology* **36**, 747-750.

Nadeau JA. 2009. Stomatal development: new signals and fate determinants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 29-35.

Negi J, Hashimoto-Sugimoto M, Kusumi K, Iba K. 2013. New approaches to the biology of stomatal guard cells. *Plant Cell Physiology* **55**, 241-250.

Ou X, Gan Y, Chen P, Qiu M, Jiang K, Wang G. 2014. Stomata prioritize their responses to multiple biotic and abiotic signal inputs. *Public Library of Science* **9**.

Pantin F, Monnet F, Jannaud D, Costa JM, Renaud J, Muller B, Simonneau T, Genty B. 2013. The dual effect of abscisic acid on stomata. *New Phytologist* **197**, 65-72.

Pearson P. 2010. Increased atmospheric CO₂ during the middle eocene. *Science* **330**, 763,764.

Pexioto JP, Oort AH. *Physics of Climate*. New York: Springer-Verlag, 1992. 520 pp.

Pillitteri LJ, Torii K. 2012. Mechanism of stomatal development. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 591-614.

Prabhakar M. 2004. Structure, delimitation, nomenclature and classification of stomata. *Acta Botanica Sinica* **46**, 242-252.

Preston GM. 2000. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the Right Pathogen, of the Right Plant, at the Right Time. *Molecular Plant Pathology* **1**, 263-275.

Procházka P, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J, Šantrůček J, Nátr L, Tesařová M, Havel L, Sladký Z, Gloser J, Prášil I, Vyskot B. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia 1998. 488 pp.

Qiu Y, Cho Y, Cox JC, Palmer JD. The gain of three mitochondrial introns identifies liverworts as the earliest land plants. *Nature* **394**, 671-673.

Raven JA, Edwards D. 2001. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of Experimental Biology* **52**, 381-401.

Raven JA. 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist* **153**, 371-386.

Raynaud D, Parrenin F. Ice cores, Antarctica & Greenland. In *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments*. Dordrecht: Springer 2009, s. 453-457.

Renzaglia KS, Duff RJ, Nickreut DL, Garbary DJ. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **355**, 769-793.

Richardson LG, Torii K. 2013. Take a deep breath: peptide signalling in stomatal patterning and differentiation. *Journal of Experimental Botany* **64**, 5243-5251.

Royer DL. 2001. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology* **114**, 1-28.

Royer DL. 2006. CO₂-forced climate thresholds during the Phanerozoic. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**, 5665-5675.

Ruszala EM, Beerling DJ, Franks PJ, Chater C, Casson SA, Gray JE. 2011. Land plants acquired active stomatal control early in their evolutionary history. *Current Biology* **21**, 1030-1035.

Seppä H, Bennett KD. 2003. Quaternary pollen analysis: recent progress in palaeoecology and palaeoclimatology. *Progress in Physical Geography* **27**, 548-579.

Schlesinger WH. *Biogeochemistry: An analysis of global change.* 2nd edition. Durham: Academic Press, 1997. 588 pp.

Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T. 2007. Light regulation of stomatal development. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 219-247.

Smoot JP. Sedimentary indicators of climate change. In *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments.* Dordrecht: Springer 2009, s. 902-907.

Snyder CW. 2010. The value of paleoclimate research in our changing climate. An editorial comment. *Climatic change* **100**, 407–418

Solomon S, Qin D, Manning M, Marquis M, Averyt K, Tignor M, Miller H. Jr, Chen Z (eds.). Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, 2007.

Soukupová J. *Metody paleoklimatologie a historické klimatologie a vývoje klimatu na Zemi.* Fakulta životního prostředí, ČZU, 2013. 170 pp.

Steinthorsdottir M, Wohlfarth B, Kylander ME, Blaauw M, Reimer PJ. 2013. Stomatal proxy record of CO₂ concentrations from the last termination suggests an important role for CO₂ at climate change transitions. *Quaternary Science Reviews* **68**, 43-58.

Strasdeit H. 2010. Chemical evolution and early Earth's and Mars' environmental conditions. *Paleodiversity* **3**, 107-116.

Šantrůček J, Šantrůčková H, Kaštovská E, Květoň J, Tahovská K. Stabilní izotopy a jejich použití v biologii a ekologii. České Budějovice, 2014 (a). Vysokoškolské skriptum. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Šantrůček J, Vráblová M, Šimková M, Hronková M, Drtinová M, Květoň J, Vrábl D, Kubásek J, Macková J, Wiesnerová D, Neuwirthová J, Schreiber L. 2014 (b). Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO₂ concentration. *Annals of Botany* **114**, 191-202.

Talbott LD, Rahveh E, Zeiger E. 2003. Relative humidity is a key factor in the acclimation of the stomatal response to CO₂. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2141-2147.

Tripati AK, Roberts CH, Eagle R. 2009. Coupling of CO₂ and ice sheet stability over major climate transitions of the last 20 million years. *Science* **326**, 1394-1397

Vatén A, Bergmann DC. 2012. Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view. *Evolutionary Developmental Biology* **3**.

Wang Y, Huang C, Sun B, Quand C, Wu J, Line Z. 2014. Paleo-CO₂ variation trends and the Cretaceous greenhouse climate. *Earth-Science Reviews* **129**, 136-147.

Wang Y, Momohara A, Wang L, Lebreton-Anberrée J, Zhou Z. 2015. Evolutionary history of atmospheric CO₂ during the late Cenozoic from fossilized metasequoia needles. *Public Library of Science* **10**.

Willmer C, Fricker M. *Stomata*. 2nd edition. London: Champan & Hall, 1996. 375 pp.

Woodward FI. 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from preindustrial levels. *Nature* **327**, 617-618.

Yan D, Sun B, Xie S, Li X, Wen W. 2009. Response to paleoatmospheric CO₂ concentration of *Solenites vimineus* (Phillips) Harris (Ginkgophyta) from the Middle Jurassic of the Yaojie Basin, Gansu Province, China. *Science in China Series D: Earth Science* **52**, 2029-2039.

Yang M, Sack FD. 1995. The too many mouths and four lips Mutations Affect Stomatal Pnroduction in Arabidopsis. *The Plant Cell* **7**, 2227-2239.

Young SA, Saltzman MR, Foland KA, Linder JS, Kump LR. 2009. A major drop in seawater ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr during the Middle Ordovician (Darriwilian): Links to volcanism and climate? *Geology* **37**, 951-954.

Zeng W, Melotto M, He SY. 2010. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 599-603.

8. PŘÍLOHA

Tab. P1: Průměrné a maximální hodnoty teploty a ozáření pro všechny čtyři pokusy. U každého pokusu je uvedeno období jeho průběhu.

	1 (03-04 2015)	2 (04-05 2015)	3 (09 2015)	4 (10 2015)
max PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	726,8862	765,969	822,5996	514,1909
Ø PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	194,1235	193,03772	174,8148	132,7715
max T (°C)	32,65779	32,65779	34,88517	24,5911
Ø T (°C)	22,64919	23,73752	19,35901	17,07883

Tab. P2: Hodnoty δ , vnitřní koncentrace CO_2 (C_i) a průduchové hustoty (SD) děloh (D) a pravých listů (P) při různé koncentraci CO_2 a půdní vlhkosti. L, M a H v případě koncentrace CO_2 i obsahu vody v půdě znamenají nízké, střední a vysoké hodnoty

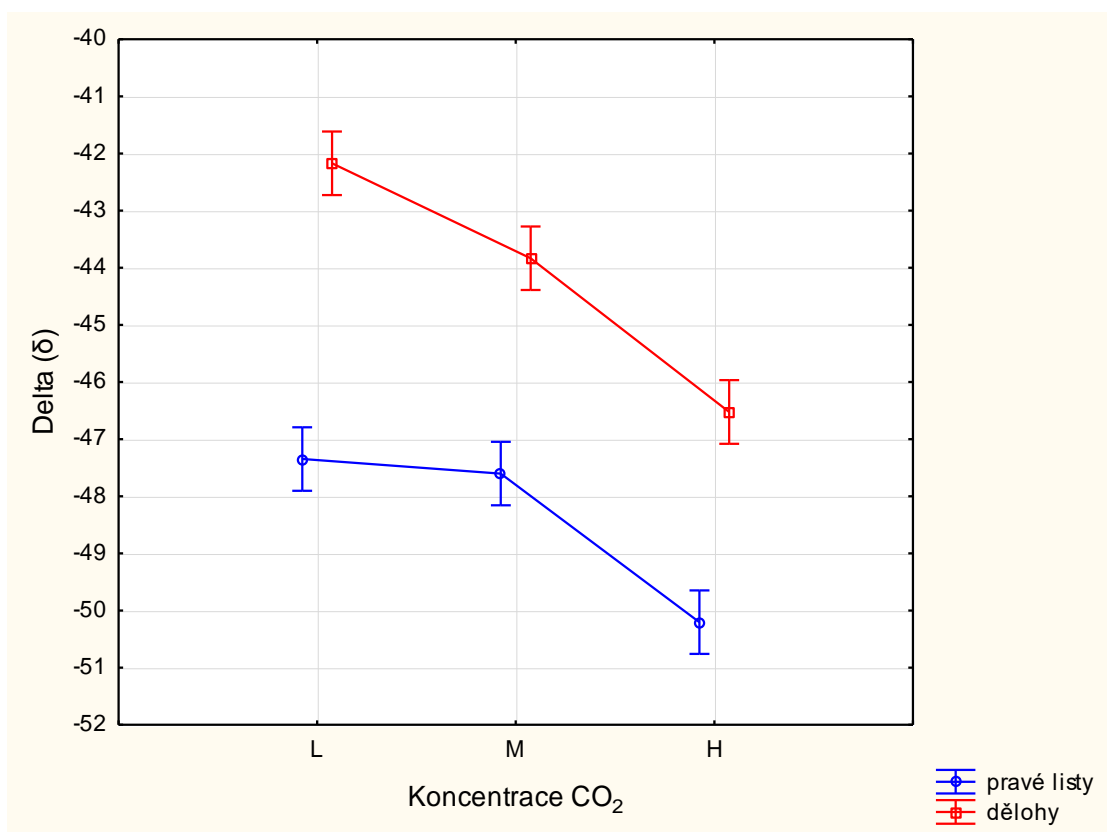
Pokus	Typ	CO_2	H_2O	δ	C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	Ø SD
1	D	L	L	-41,241	56,59684	77,32497
1	D	L	L	-40,834	53,69608	62,69592
1	D	L	M	-41,911	61,37204	79,15361
1	D	L	M	-43,525	72,87529	68,96552
1	D	L	H	-43,515	72,80402	75,23511
1	D	L	H	-43,755	74,51454	58,25496
1	D	M	L	-42,659	202,055	63,2837
1	D	M	L	-42,133	190,699	90,12539
1	D	M	M	-45,074	254,1934	79,9373
1	D	M	M	-45,128	255,3592	65,83072
1	D	M	H	-45,877	271,5296	56,42633
1	D	M	H	-45,191	256,7193	50,94044
1	D	H	L	-45,483	629,8072	102,6646
1	D	H	L	-44,168	561,8275	70,01045
1	D	H	M	-46,708	693,1343	60,34483
1	D	H	M	-46,898	702,9564	76,54127
1	D	H	H	-47,573	737,8509	68,70428
1	D	H	H	-45,984	655,7067	88,558
1	P	L	L	-45,815	89,19651	116,7712

1	P	L	L	-45,570	87,45035	123,8245
1	P	L	M	-46,639	95,0693	95,61129
1	P	L	M	-47,600	101,9185	105,0157
1	P	L	H	-47,475	101,0276	92,47649
1	P	L	H	-47,352	100,151	68,18182
1	P	M	L	-45,543	264,3188	168,6912
1	P	M	L	-45,234	257,6477	173,9812
1	P	M	M	-47,729	311,5132	152,0376
1	P	M	M	-47,428	305,0148	119,906
1	P	M	H	-48,428	326,6041	114,0282
1	P	M	H	-48,348	324,877	110,5016
1	P	H	L	-49,028	813,068	207,2884
1	P	H	L	-47,739	746,4324	149,6865
1	P	H	M	-50,914	910,5659	147,9232
1	P	H	M	-50,802	904,776	126,1755
1	P	H	H	-51,357	933,467	152,8213
1	P	H	H	-51,127	921,577	192,0063
2	D	L	L	-40,789	93,04254	72,49216
2	D	L	L	-41,365	100,1987	115,2691
2	D	L	M	-41,112	97,05546	90,90909
2	D	L	M	-42,517	114,511	96,39498
2	D	L	H	-43,648	128,5625	85,4232
2	D	L	H	-42,486	114,1259	105,7994
2	D	M	L	-44,324	327,3055	73,14525
2	D	M	L	-44,372	328,7306	105,7994
2	D	M	M	-43,084	290,4896	73,66771
2	D	M	M	-44,434	330,5714	89,34169
2	D	M	H	-45,000	347,3761	92,47649
2	D	M	H	-45,076	349,6326	126,9592
2	D	H	L	-44,812	683,0793	82,2884
2	D	H	L	-44,944	690,9117	84,6395
2	D	H	M	-46,738	797,361	80,721
2	D	H	M	-46,644	791,7834	73,66771
2	D	H	H	-47,094	818,4847	56,81818
2	D	H	H	-47,733	856,4006	94,04389
2	P	L	L	-45,787	155,1372	276,2539
2	P	L	L	-45,799	155,2862	188,4796

2	P	L	M	-45,873	156,2056	164,0543
2	P	L	M	-46,163	159,8085	100,3135
2	P	L	H	-46,806	167,7971	179,4671
2	P	L	H	-46,237	160,7279	173,9812
2	P	M	L	-46,259	384,7562	293,8871
2	P	M	L	-45,583	364,6855	360,5016
2	P	M	M	-46,570	393,9898	213,9498
2	P	M	M	-47,228	413,526	229,6238
2	P	M	H	-47,884	433,0028	231,9749
2	P	M	H	-47,988	436,0906	245,2978
2	P	H	L	-47,676	853,0184	339,0805
2	P	H	L	-46,504	783,4763	333,8558
2	P	H	M	-48,652	910,9306	286,0502
2	P	H	M	-49,385	954,4241	173,1975
2	P	H	H	-50,590	1025,924	168,4953
2	P	H	H	-50,143	999,401	289,185
3	D	L	L	-38,691	45,07539	140,8046
3	D	L	L	-38,833	46,26269	97,96238
3	D	L	M	-39,487	51,73093	84,6395
3	D	L	M	-39,499	51,83127	99,79101
3	D	L	H	-38,444	43,01017	80,721
3	D	L	H	-39,534	52,12391	90,64786
3	D	M	L	-42,839	158,8482	88,03553
3	D	M	L	-41,766	140,98	76,80251
3	D	M	M	-41,608	138,3489	67,92059
3	D	M	M	-43,091	163,0446	68,18182
3	D	M	H	-44,078	179,4806	79,9373
3	D	M	H	-43,708	173,3192	77,58621
3	D	H	L	-47,208	598,3643	68,96552
3	D	H	L	-45,310	516,7065	92,99896
3	D	H	M	-44,318	474,0277	61,91223
3	D	H	M	-46,739	578,1865	71,57785
3	D	H	H	-45,735	534,9913	55,64263
3	D	H	H	-47,089	593,2445	53,29154
3	P	L	L	-47,603	119,5907	181,8182
3	P	L	L	-47,375	117,6843	145,5068
3	P	L	M	-47,548	119,1308	124,6082

3	P	L	M	-47,401	117,9017	61,91223
3	P	L	H	-48,140	124,0807	121,4734
3	P	L	H	-47,869	121,8148	108,9342
3	P	M	L	-48,395	251,3694	153,605
3	P	M	L	-48,742	257,1478	197,4922
3	P	M	M	-48,415	251,7025	175,5486
3	P	M	M	-47,892	242,9932	174,7649
3	P	M	H	-48,107	246,5735	152,0376
3	P	M	H	-48,305	249,8707	221,0031
3	P	H	L	-50,509	740,3833	181,8182
3	P	H	L	-51,079	764,9064	126,9592
3	P	H	M	-49,960	716,7636	211,5987
3	P	H	M	-50,106	723,045	154,3887
3	P	H	H	-51,333	775,8342	135,5799
3	P	H	H	-50,052	720,7217	250,7837
4	D	L	L	-43,721	62,963	76,80251
4	D	L	L	-43,988	64,576	56,42633
4	D	L	M	-45,699	74,914	68,18182
4	D	L	M	-45,756	75,258	58,77743
4	D	L	H	-45,892	76,080	48,58934
4	D	L	H	-45,861	75,892	51,72414
4	D	M	L	-43,539	174,263	68,18182
4	D	M	L	-42,960	164,409	76,80251
4	D	M	M	-43,516	173,872	59,56113
4	D	M	M	-44,008	182,245	61,91223
4	D	M	H	-44,321	187,573	59,56113
4	D	M	H	-44,203	185,564	50,94044
4	D	H	L	-46,458	563,464	61,91223
4	D	H	L	-46,529	566,505	68,96552
4	D	H	M	-47,745	618,577	62,69592
4	D	H	M	-47,902	625,300	52,70784
4	D	H	H	-48,582	654,420	50,94044
4	D	H	H	-48,166	636,606	65,83072
4	P	L	L	-48,297	90,610	165,3605
4	P	L	L	-48,483	91,734	174,7649
4	P	L	M	-49,073	95,299	188,8715
4	P	L	M	-49,153	95,782	147,3354

4	P	L	H	-49,066	95,257	130,8777
4	P	L	H	-49,194	96,030	138,7147
4	P	M	L	-47,917	248,775	209,2476
4	P	M	L	-47,702	245,116	254,7022
4	P	M	M	-48,280	254,953	153,605
4	P	M	M	-48,041	250,885	194,3574
4	P	M	H	-48,324	255,702	174,7649
4	P	M	H	-48,106	251,992	196,7085
4	P	H	L	-50,304	728,161	200,627
4	P	H	L	-51,059	760,492	200,627
4	P	H	M	-51,189	766,059	250
4	P	H	M	-51,604	783,831	211,5987
4	P	H	H	-52,070	803,786	162,2257
4	P	H	H	-51,686	787,342	207,6803



Obr. P1: Rozdíl děloh a pravých listů v závislost relativního obsahu izotopu ¹³C v sušinė prýtů rostlin (δ) na koncentraci CO₂ v atmosféře během růstu. Graf je vytvořen ze souhrnných dat obsahujících všechna opakování ($n=144$). Body a úsečky označují střední hodnoty a konfidenční intervaly. L, M a H v případě koncentrace CO₂ i obsahu vody v půdě znamenají nízké, střední a vysoké hodnoty.