

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Zadávací katedra: Katedra biologických disciplin

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Téma bakalářské práce:

Vliv faktorů prostředí na vývoj průduchů

Autor práce: Irena Jelínková

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Šantrůček, CSc.

Odborný konzultant: Mgr. Martina Vráblová

doc. RNDr. Hana Čížková, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu práce doc. Jiřímu Šantrůčkovi za to, že mi umožnil psát svou práci na KFR, jeho ochotu a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala doc. Čížkové za ochotu a rady, Mgr. Láďovi Markovi za provádění izotopových analýz, Martině Drtinové a sestřám Bětce a Olče za pomoc při zpracování dat, Mgr. Danovi Vráblovi a Mgr. Danovi Hisemovi za všeobecnou podporu a pomoc. Největší dík patří konzultantce Mgr. Martině Vráblové za její přátelský přístup, odborné rady, ochotu kdykoli a s čímkoli pomoci a bezmeznou trpělivost.

Abstrakt

Aby mohly rostliny růst a reprodukovat se, musí se přizpůsobovat měnícím se podmínkám prostředí, ve kterém žijí. Jedním z nejdůležitějších environmentálních faktorů je dostupnost vody. Hlavní úlohu při regulaci transpirace mají průduchy - drobné póry, díky nimž je umožněna řízená výměna plynů (zejména CO₂, H₂O, O₂) mezi vnitřním a vnějším prostředím listu. Množství průduchů na listech rostlin ovlivňují vnější faktory prostředí, zejména koncentrace CO₂ v atmosféře, ozáření, vlhkost nebo teplota. Ve své práci jsem se zaměřila na výzkum vlivu koncentrace CO₂ v atmosféře na vývoj průduchů u řeřichy seté (*Lepidium sativum* L.) a vliv ozáření na vývoj průduchů u ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.).

Klíčová slova:

Průduchy, CO₂, světlo, epidermis

Summary

It is necessary for plants to adapt to variable environment conditions to be able to grow and to propagate themselves. One of the most important environmental factors is water availability. The main role in regulation of transpiration play stomata – microscopic pores, which control gas exchange (mainly CO₂, H₂O, O₂) between internal and external leaf environment. Number of stomata at the leaf epidermis is influenced by lots of environmental factors, e.g. atmospheric CO₂ concentration, irradiance, air humidity, temperature etc. In this thesis I was aiming to study the influence of atmospheric CO₂ concentration on stomatal development of *Lepidium sativum* L. and the influence of irradiance on stomatal development in *Hordeum vulgare* L.

Key words:

Stomata, CO₂, light, epidermis

Obsah

1. CÍLE PRÁCE	8
2. ÚVOD	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1. EPIDERMIS	8
3.2. Průduchy	9
3.2.1. Funkce průduchů.....	9
3.2.2. Průduchy jako vstupní brána pro patogenní organismy	14
3.2.3. Vznik průduchů.....	15
3.2.4. Odlišnosti ve vývoji průduchů u jednoděložných rostlin	18
3.2.5. Typy průduchů.....	18
3.2.6. Vnější faktory ovlivňující vývoj průduchů	19
4. MATERIÁL A METODY	23
4.1. VLIV ROZDÍLNÉ KONCENTRACE CO ₂ VE DNE A V NOCI NA VÝVOJ PRŮDUCHŮ	23
4.2. VLIV ROZDÍLNÉ OZÁŘENOSTI NA VÝVOJ PRŮDUCHŮ U JEDNODĚLOŽNÝCH.....	26
5. VÝSLEDKY	28
5.1. VLIV ROZDÍLNÉ KONCENTRACE CO ₂ VE DNE A V NOCI NA VÝVOJ PRŮDUCHŮ	28
5.2. VLIV ROZDÍLNÉ OZÁŘENOSTI NA VÝVOJ PRŮDUCHŮ U JEDNODĚLOŽNÝCH.....	38
6. DISKUZE	40
6.1. VLIV ROZDÍLNÉ KONCENTRACE CO ₂ VE DNE A V NOCI NA VÝVOJ PRŮDUCHŮ	40
6.2. VLIV ROZDÍLNÉ OZÁŘENOSTI NA VÝVOJ PRŮDUCHŮ U JEDNODĚLOŽNÝCH.....	42
7. ZÁVĚR	44
8. POUŽITÁ LITERATURA	45

1. Cíle práce

Zhodnotit vliv vybraných faktorů vnějšího prostředí, zejména ozáření a CO₂, na vývoj průduchů vybraných modelových druhů.

2. Úvod

Při přechodu rostlinných organismů z vodního prostředí na souš se vyskytl problém – smrt v důsledku vyschnutí. Proto byly rostliny nuceny vytvořit si takovou povrchovou strukturu, která nepropouští vodu. Bohužel nepropustnost pro vodu znamenala také nepropustnost pro oxid uhličitý, tedy hlavní zdroj stavebního materiálu. Dilema vyřešila evoluce tím, že na povrchu listů vznikly průduchy, kterými mohou rostliny regulovat výměnu plynů mezi listem a vnějším prostředím (Procházka et al., 1998). Při plném otevření pokrývají průduchové póry asi 0,5-5% povrchu listu (Lawson et al., 2008). Mechanismus průduchové regulace se vyskytuje prakticky u všech rostlinných druhů od jatrovek až po vyšší rostliny (Procházka et al., 1998).

V současné době přibývá šlechtitelských programů zaměřených na účinnost využití vody rostlinami, protože zásoby povrchové i podzemní sladké vody se zmenšují. Schopnost rostliny regulovat výpar a tím ztráty vody, souvisí také s průduchy. Proto je důležité studovat tyto struktury, jejich rozmístění na listech a způsob jejich fungování.

3. Teoretická část

3.1. *Epidermis*

Pokožka rostlin je tvořena jednou vrstvou relativně nespécializovaných tzv. dlaždicových buněk a mezi nimi rozptýlenými buňkami různé stavby a funkce (např. trichomy, průduchy).

Trichomy jsou specializované buňky, které vyčnívají z povrchu epidermis a mohou list chránit před mechanickým poškozením a nadměrnou ozářeností, mohou sloužit jako tepelná izolace, případně jako obranný mechanismus rostliny (žahavé, žlaznaté

trichomy). Mohou být jednobuněčné ale i vícebuněčné. Jsou obklopeny speciálními podpěrnými epidermálními buňkami (socket cells).

3.2. Průduchy

Průduchy jsou drobné póry, díky nimž je umožněna řízená výměna plynů (zejména CO₂, H₂O, O₂) mezi vnitřním a vnějším prostředím listu. Objevují se na všech nadzemních částech rostliny, ale nejvíc se jich vyskytuje na listech. Jsou tvořené dvěma svěřacími buňkami ohraničujícími průduchovou štěrbinu. Pod každým průduchovým pórem se nachází velký intercelulární prostor, tzv. podprůduchová dutina. U mnoha rostlinných druhů se kolem svěřacích buněk nacházejí epidermální buňky, které se morfologicky liší od ostatních epidermálních buněk. Tyto buňky nazýváme buňkami podpěrnými.

3.2.1. Funkce průduchů

Primární funkcí průduchů je optimalizovat výměnu CO₂ a vodní páry mezi mezibuněčnými prostory v listu a atmosférou při měnících se vnějších podmínkách (Hashimoto et al., 2006). Velikost průduchové štěrbinu a tím i výměna plynů je regulována turgorem svěřacích buněk (Brownlee, 2001). Akumulace iontů (K⁺, Cl⁻, aniont kys. jablečné) v těchto buňkách zvyšuje osmotický tlak – snižuje vodní potenciál, čímž do nich začne proudit voda z okolního apoplastu, turgor buněk se zvyšuje a průduchová štěrbinu se otevírá (Willmer, Fricker, 1996). Velikost průduchové štěrbinu ovlivňuje mnoho vnitřních i vnějších environmentálních faktorů a může se měnit v čase v řádu sekund až hodin (Lawson, 2008). Podnětem k regulaci velikosti štěrbinu může být dostupnost vody v půdě, množství vodní páry a jiných plynů v atmosféře (např. CO₂, ozón, etylén, oxid dusnatý, oxid uhelnatý, H₂S), množství a spektrální složení dopadajícího světla aj. (Desikan, 2010).

Při stresu suchem se průduchy přivírají na základě poklesu turgoru, vodního potenciálu nebo nízké vlhkosti vzduchu. Přivřením průduchy sníží transpiraci. Při extrémním stresu se dokonce uzavírají úplně (Brownlee, 2001). Některé experimenty ukázaly, že průduchy reagují citlivěji na vlhkost půdy, než na množství vody v listu. Toto nasvědčuje tomu, že průduchy jsou řízeny více chemickými signály (např.

kyselinou abscisovou) z dehydratujících se kořenů, než vlhkostními poměry v listu, které jsou stále ještě konstantní (Chaves et al., 2002). Horko, pokud působí samostatně, má opačný účinek na chování průduchů. Při vysokých teplotách dochází k poškození fotosyntetického aparátu. V teplém a vlhkém prostředí se stomata široce otevírají a tak dochází k ochlazování listu. Naopak při nízkých teplotách mají tendenci se přivírat. Pokud je rostlina vystavena oběma stresovým faktorům současně (sucho i vysoká teplota), snaží se o kompromis mezi velkou ztrátou vody a ochranou před přehřátím, v extrémním případě dochází k otevření průduchů a rostlina obětuje vodu pro udržení příznivé teploty listu (Reynolds-Henne et al., 2010).

Dalším fyziologickým podnětem pro otevírání či zavírání průduchů je oxid uhličitý. Při nízkých koncentracích CO₂ se průduchy otevírají, při vysokých koncentracích se přivírají (Hashimoto et al., 2006; Israelson et al., 2006). Významný podíl na pohybu průduchů jako reakce na koncentraci CO₂ má zřejmě HT1 proteinová kináza (Hashimoto et al., 2006). V nedávné době byla navržena hypotéza, že CO₂ může do svěřacích buněk pronikat přes aquaporiny (Uehlein et al., 2008). To, že CO₂ signalizace sdílí řadu mechanismů transportu iontů s kyselinou abscisovou (ABA) může naznačovat spojitost mezi oběma drahami. Avšak myšlenka absolutní spojitosti odporuje fakt, že mutanty *Arabidopsis ost1* (necitlivé ke kyselině abscisové) vykazovaly pohyby vyvolané CO₂ a že nebyly identifikovány žádné mutanty necitlivé k CO₂ (Israelson et al., 2006).

Pohyby průduchů ovlivňuje i intenzita a spektrální složení světla. Otevírají se po rozednění a na noc se opět zavřou. Vlastní otevření průduchu trvá minuty až desítky minut. Zavření je rychlejší (řádově minuty). Předpokládá se, že existují dva různé fotosenzory. Jeden z nich je citlivý na fotosynteticky aktivní světlo (PAR) díky fotosyntéze, která probíhá v chloroplastech svěřacích buněk (Procházka et al., 1998). Druhý je ovlivněn modrou složkou světla. Účinek modré části barevného spektra světla na otevírání průduchů je odvozen od faktu, že reakce průduchů na červené světlo je o mnoho slabší v porovnání s účinkem celého spektra světla (Eckert, Kaldenhoff, 2000). Regulace činnosti průduchů modrým spektrem světla je způsobena funkcí kryptochromů a fototropinů (Kang et al., 2009).

Většina rostlinných druhů, u kterých byla studována anatomie průduchů, má ve svěřacích buňkách umístěné chloroplasty. Jejich průměrný počet je 10 – 15 na buňku (Humble, Raschke, 1971), zatímco u buněk palisádového parenchymu se jejich

průměrný počet pohybuje okolo 30 – 70. Chloroplasty svěřacích buněk jsou často menší a méně granálně vrstvené, některé jsou hůře vyvinuté než ty, které se nacházejí v buňkách mezofylu. Ve tmě se v nich hromadí škrob, na světle opět mizí (u mezofylových buněk je to opačně). U některých rostlinných druhů to neplatí, například u *Arabidopsis thaliana* se škrob v chloroplastech akumuluje až během dne. Význam škrobu může spočívat v tom, že se rozštěpí na malát nebo cukry, které fungují jako osmotikum, a tím průduchy otevírají. Další funkcí chloroplastů, která může být spojená s pohyby průduchů, je transport elektronů, který má za následek produkci ATP a / nebo reduktantů, které jsou následně použity opět jako osmotikum (Lawson, 2008).

Otevírání průduchů účinkem modrého světla je pravděpodobně spojeno s aktivací H⁺ATPasy. Dochází k přečerpávání protonů a tím k hyperpolarizaci plasmatické membrány, což vede ke vtoku iontů, odbourávání škrobu a syntéze malátu. Následkem toho do svěřací buňky proudí voda, zvyšuje se tedy její turgor a průduch se otevírá (Eckert, Kaldenhoff, 2000).

Předpokládá se, že ozářenější strana rostlinného orgánu, která má díky otevřenějším průduchům větší ztráty vody transpirací, pomaleji roste, což spolu s nehomogenním rozložením auxinů přispívá k tomu, že se rostlina ohýbá směrem ke zdroji světla (Willmer, Fricker, 1996).

3.2.1.1. Vliv hormonů na funkci průduchů

Mezi fytohormony má zásadní regulační funkci ABA, která ovlivňuje velikost průduchové štěrbin v reakci na stres suchem. Dalšími látkami, které mají podíl na řízení pohybu průduchů, jsou auxiny, cytokininy, etylén, brassinosteroidy, jasmonáty a kyselina salicylová (Acharya, Assmann, 2009).

Kyselina abscisová

ABA je terpenoid, který je syntetizován z prekurzoru karotenoidů. Při stresu suchem může její koncentrace v rostlině stoupnout až třicetinásobně. Její biosyntézu a akumulaci kromě sucha spouští i ostatní druhy stresu, jako salinita nebo nízká teplota. Kromě úlohy klíčového stresového hormonu zastává ještě funkci ve vývojových

procesech rostliny, jako je např. buněčné dělení, dozrávání semen, dormance semen, klíčení a růst klíčnicích rostlin (Procházka et al., 1998).

Vodní deficit spouští biosyntézu ABA, její akumulaci a distribuci xylémem kořenů do celé rostliny (Wilkinson, Davies, 2002). Ztráty vody se sníží tím, že ABA zavře průduchy a zamezí jejich znovuotevření. Modulace průduchové štěrbin je spojená se souborem buněčných biochemických procesů – aktivací G-proteinů (Coursoul et al., 2003), produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) (Pei et al., 2000), syntézou oxidu dusnatého (Bright et al., 2006), zvyšováním cytosolického pH (Irving et al., 1992), zvyšováním obsahu Ca^{2+} , a to jak vtokem přes plasmatickou membránu, tak uvolňováním z cytosolických rezerv (Pei et al., 2000), proteinovou fosforylací i defosforylací a přeskupením cytoskeletu (Hwang, Lee, 2001). Výsledkem těchto událostí je otevření iontových kanálů a odtok K^+ , Cl^- a malátových iontů ze svěracích buněk, a tím uzavření průduchu a zamezení jeho znovuotevření (Li et al., 2006).

V souvislosti s působením kyseliny abscisové produkují svěrací buňky oxid dusnatý (NO). Vnější aplikace donorů oxidu dusnatého u mnoha rostlinných druhů způsobuje zavření průduchů, zároveň aplikace látky vychytávající NO inhibuje zavření průduchu vlivem ABA (Acharya, Assmann, 2009).

Auxiny

Auxin je nejdéle známým rostlinným hormonem. Byl objeven v letech 1926 – 28, kdy bylo zjištěno, že koleoptile ova produkují látku, která stimuluje prodlužovací růst. Jedná se o kyselinu indolyl-3-oxiovou (IAA) a její sloučeniny, kyselinu indolyl-3-máselnou (IBA), 4-chlor-IAA, kyselinu fenyl-oxiovou (PAA) a další synteticky vyráběné sloučeniny. Tyto fytohormony stimuluje prodlužovací růst, což také souvisí s regulací tropizmů (gravitropismus, fototropismus). Gravitace nebo nerovnoměrné osvětlení způsobuje nerovnoměrnou distribuci IAA, což vede k nerovnoměrnému růstu a ohybu rostliny. IAA jsou důležité pro apikální dominanci, opad listů či plodů, stimulaci zakořeňování a dělení buněk (Procházka et al., 1998).

Zjištění vycházející z různých výzkumů jsou protichůdná. V listech okurky a poddélžných člancích dýně bylo zjištěno, že stres suchem provází zvýšený obsah IAA. V jiné studii ale rostliny okurky vystavené půdnímu suchu vykazovaly první 4 dny

snížené hodnoty IAA, které se od pátého dne zvyšovaly. U rajčete nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v obsahu IAA v souvislosti se stresem suchem.

Obecně auxiny regulují otevírání průduchů pozitivně, ačkoli vysoká exogenní koncentrace auxinů může otevření průduchů naopak inhibovat. Reakcí na auxin je aktivace H^+ ATPasy vázané na plasmatickou membránu svěřacích buněk. Odčerpání protonů vede k hyperpolarizaci membrány a usnadňuje příjem K^+ iontů. Nízká aktivita auxinu aktivuje iontové kanály pro vstup K^+ iontů, zatímco vysoká koncentrace aktivuje iontové kanály pro jejich výstup. Antagonistické působení bylo prokázáno mezi ABA a auxiny. Auxiny totiž potlačují zavření průduchu spojené s ABA (prokázáno u oddělené epidermis *Commelia communis*) (Acharya, Assmann, 2009).

Cytokininy

K jejich objevu došlo rozvojem technik tkáňových kultur. Nejbohatším zdrojem cytokininů je autoklávovaná DNA. Jako účinná látka byl identifikován 6-furfurylaminopurin, který v přítomnosti auxinu stimuluje buněčné dělení. Účinek cytokininů ve spojení s auxiny je základem regeneračních procesů. Poměr jejich koncentrací rozhoduje o typu pletiva, které bude regenerovat. Cytokininy způsobují větvení stonku a zpomalují stárnutí (Procházka et al., 1998).

Zvýšená hladina cytokininů v xylému spouští otevírání průduchů a snižuje citlivost k ABA. Stres suchem snižuje syntézu cytokininů v kořenech a jejich transport do prýtu. Odpověď průduchů na exogenní aplikaci cytokininů závisí na jejich koncentraci a druhu. Syntetické i přírodní cytokininy způsobují otevírání průduchů u trávy *Anthephora*. Ve tmě také způsobují otevírání stomat tím, že snižují množství H_2O_2 a NO ve svěřacích buňkách (Acharya, Assmann, 2009).

Etylén

Nejjednodušší uhlovodík s dvojnou vazbou vzniká ve vyšších rostlinách a většinou nižších z L-methioninu. Je to jediný známý plynný hormon. Jeho koncentrace v buňkách je velmi nízká, rychle difunduje do okolní atmosféry a tím může ovlivňovat i okolní rostliny. Jeho nejvýraznější funkcí je stimulace dozrávání plodů – degradace

celulózy, pektinů, škrobu. Zároveň stimuluje také stárnutí a opad listů a květů. Jeho produkce je jednou z prvních reakcí rostliny na stres (Procházka et al., 1998).

U suchozemských rostlin se při zaplavení produkuje etylén a dochází k uzavírání průduchů. U dvouděložných druhů jako je fazol (*Phaseolus vulgaris L.*), bavlník (*Gossypium hirsutum L.*) a růže (*Rosa hybrida L.*) bylo zjištěno, že množství produkovaného etylénu není ovlivňováno vysušováním půdy, přestože u pšenice navození silného stresu suchem k jeho zvýšené produkci vede. U kukuřice se sníženou schopností produkce ABA byla zjištěna vyšší produkce etylénu v souvislosti se snahou snížit následky stresu suchem, ale nebyla prokázána jako reakce na velký vodní deficit. Z těchto poznatků vyplývá, že spojitost mezi stresem suchem a produkcí etylénu je vysoce druhově specifická (Acharya, Assmann, 2009).

Jasmonáty

Kyselina jasmonová a její metylester jsou obsaženy ve všech orgánech mnoha rostlinných druhů. Účinkem kyseliny jasmonové je urychlování stárnutí listových segmentů, inhibice růstu listových pochev, hypokotylů, brzdí růst kalusu sóji a inhibuje klíčení a růst kořenů i přesto, že často aktivuje jejich iniciaci. Nejvýznamnější je zřejmě jejich úloha jako signál při reakci na dotyk u rostlin s úponky, na patogeny a na poranění (Procházka et al., 1998).

Předpokládá se, že kyselina jasmonová může způsobovat zavírání průduchů během stresu suchem, a to svou akumulací. Avšak pohyb svěřacích buněk způsobený jasmonáty vyžaduje přítomnost kyseliny abscisové. U sóji exogenní aplikace metylesteru kyseliny jasmonové neovlivňuje vnitřní koncentraci ABA, ale u suchem stresovaných klíčnicích rostlin ječmene, které byly předem ošetřeny kyselinou jasmonovou, vykazují více jak čtyřnásobný nárůst koncentrace ABA oproti stresovaným rostlinám bez ošetření (Acharya, Assmann, 2009).

3.2.2. Průduchy jako vstupní brána pro patogenní organismy

Mnoho bakterií, včetně rostlinných a lidských patogenů, je schopno přežívat na povrchu rostlin. Aby se staly vlastním patogenem, musí nejdřív vstoupit do rostlinného pletiva. Narozdíl od hub, které jsou schopny narušit epidermis, bakterie jsou závislé na

přirozených otvorech nebo poškozeních, kterými mohou do hostitelské rostliny vstoupit. Rostliny se však umí tomuto napadení bránit. U *Arabidopsis* při rozpoznání specifických molekul bakteriálního obalu dochází ke spuštění řetězce reakcí způsobujících uzavření průduchu. Avšak bakterie, které jsou rostlinnými patogeny, vyvinuly specifické virulentní faktory, které způsobují znovuootevření průduchu a tím zpřístupňují vnitřní prostředí rostliny dalším patogenům (Melotto et al., 2006).

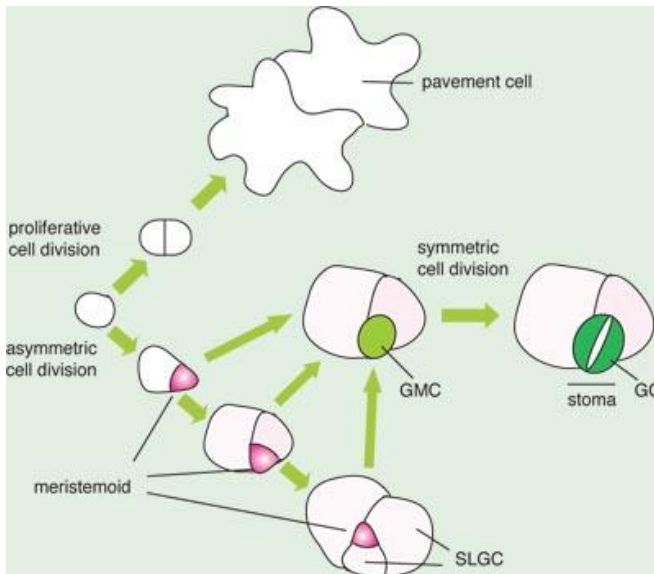
3.2.3. Vznik průduchů

Průduchy jsou nezbytné pro přežití většiny suchozemských rostlin, proto byla evoluce genů kódujících jejich vývoj klíčovou událostí. Hlavním rysem vzoru, podle kterého jsou průduchy na listu rozmístěny, je pravidlo jedné vmezežené buňky (One-cell spacing rule), tzn., že průduchy jsou jeden od druhého odděleny minimálně jednou epidermální buňkou. Četnost případů, kdy se jeden průduch dotýká druhého je mnohem nižší, než by tomu bylo při náhodném rozmístění (Larkin et al., 1997). Toto rozmístění umožňuje, aby co nejmenší počet průduchů zajistil co nejefektivnější výměnu plynů, tedy aby se pomyslné objemy vzduchu pro jednotlivé průduchy nepřekrývaly (Bird, Gray, 2003).

Průduchy, které leží na okrajích listu, ve srovnání s těmi, které leží ve středu listu, mají užší průduchovou štěrbinu a zavírají se rychleji. I když ty, které leží blízko hlavních žilek, mají také tendenci se méně se otevírat. Pravděpodobně je to kvůli odlišné dostupnosti a ztrátám vody v těchto různých částech pletiva (Willmer, Fricker, 1996).

Vývoj průduchu u dvouděložných rostlin je charakteristický sérií asymetrického dělení buněk následovanou jedním symetrickým dělením (Obr.1). Vstupní dělení nastartuje běh událostí vedoucí ke vzniku průduchu vytvořením dvou různě velkých buněk – menší nazývanou meristemoidem a větší sesterské buňky, která dává základ dlaždicové epidermální buňce, případně může později podstoupit další asymetrické dělení. Meristemoid podstupuje další sérii asymetrických (amplifikačních) dělení (Bergmann, 2006), obvykle jedno až tři, ale může se dělit i pětkrát (Bird, Gray, 2003). Účelem těchto dělení není jen regenerace meristemoidu, ale také se tím zvyšuje počet větších sesterských buněk, tudíž i počet buněk epidermálních. Buňky se zároveň dělí tak, aby tato větší buňka byla vždy situovaná mezi dvěma průduchy, nebo mezi

průduchem a jeho prekurzorem (Bergmann, 2006). V momentě, kdy je meristemoid obklopen dostatečným množstvím dlaždicových buněk, přemění se na mateřskou buňku svěracích buněk (guard mother cell), změní svůj tvar z trojúhelníkového na oválný a podstupuje symetrické dělení. Vznikají dvě sesterské svěrací buňky, které ohraničují průduchový pór (Bird, Gray, 2003).



Obrázek 1: Dělení meristemoidu (Torii, 2006)

Průduchy obvykle chybí okolo žilek cévních svazků a některé rostliny nevytvářejí průduchy ani nad místy s různými speciálními buňkami mezofyly. Serna a Fenoll (2000) také uvádějí, že většina stomat se u *Arabidopsis thaliana* nachází nad místem, kde se setkává několik mezofylových buněk (nad tzv. „uzlem“) a jen 10 % meristemoidů a 6 % dospělých stomat je umístěno pouze nad jednou mezofylovou buňkou. Z toho se dá usuzovat, že polohu průduchů ovlivňuje buď pozice vnitřních buněk listu, a nebo že se obě části listu vyvíjejí společně (Larkin et al., 1997).

U děložních listů huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) je 52% epidermis tvořeno dlaždicovými buňkami, které neprošly asymetrickým dělením. Existence těchto buněk může také přispívat k předcházení vytváření průduchových klastrů (Von Groll, Altmann, 2001).

Správné rozmístování průduchů zajišťuje velké množství genů. Řada z nich byla nalezena sledováním mutantů, které mají některou fázi normálního vývoje zablokovanou. Ze zatím známých genů má asi největší vliv na regulaci tvorby průduchů

gen *TMM* (*TOO MANY MOUTHS*). Jeho mutace způsobuje na děložních i pravých listech seskupování průduchů do velkých klastrů. U huseníčku mají rostliny s defektem *TMM* genu v porovnání s divokými typy více meristemoidů na děložních listech, abaxiální straně kališních listů i na listech v listové růžici. Ostatní části rostliny (lodyha, adaxiální epidermis kališních listů a vrchol šesule) postrádají průduchy i meristemoidy i přesto, že u divokých typů rostliny se na těchto částech vyskytují (Larkin et al., 1997).

Dalšími geny potřebnými k inhibici nadměrného dělení meristemoidů jsou *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION (SDD-1)* a genová rodina *ERECTA*. *SDD-1* ovlivňuje distribuci průduchů také negativně, zároveň však pro svou funkci vyžaduje funkčnost genu *TMM* (Kylee et al., 2010). Rostliny s mutací *SDD-1* genu mají zvýšenou hustotu průduchů a vykazují větší počet průduchů v klastrech (Brownlee, 2001). *ERECTA (ER)* kóduje receptoru podobný protein, který obsahuje extracelulární doménu s repeticí bohatou na leucin (LRR) – jednoduchou transmembránovou doménu a cytoplasmatickou kinázu (receptoru podobnou kinázu – RLK). Tento protein má velký účinek na růst a vývoj rostliny, a reakce na biotický i abiotický stres. Jeho mutanty se projevují velkým nárůstem počtu průduchů na všech orgánech, které je běžně vytvářejí (Bergmann, 2006).

Asymetrické dělení meristemoidu negativně reguluje MAPKKK a její gen *YODA* (Gan et al., 2010). Fenotyp *yoda* mutantů je podobný mutantům skupiny genů *ERECTA* – celková výška rostliny je nižší, internodia jsou zkrácená a produkce svěřacích buněk je zvýšená (Bergmann, 2006). *FOUR LIPS* a jeho homolog *MYB88* kontrolují symetrické dělení svěřacích buněk. Jejich mutace může způsobit průduchové klastry různých velikostí a frekvence (Gan et al., 2010).

Geny *KATI* a *KST1* u *Arabidopsis thaliana* usměrňují funkci K^+ iontových kanálů, které mají rozhodující funkci při otevírání průduchů. Tomu pravděpodobně také napomáhá PEPC (fosfoenolpyruvát karboxyláza), jako jeden z klíčových enzymů (Von Groll, Altmann, 2001).

Jako gen, který hraje určitou roli v regulaci množství průduchů formujících se na listu, byl u *Arabidopsis* identifikován *HIGH CARBON DIOXIDE (HIC)*. Tento gen ovlivňuje počet průduchů formujících se na listu, ale neovlivňuje vzor jejich rozmístování, tzn. u mutantů tohoto genu nedochází k poruchám rozmístování stomat např. tvorbě klastrů (Gray et al., 2000). Mechanismus jeho funkce není zatím znám.

Podle jednoho z modelů HIC inhibuje počet satelitních průduchů, které se tvoří kolem jednoho meristemoidu. Tak by exprese *HIC* genu ve svěrací buňce znamenala produkci specifického VLCFA-derivát inhibitoru, který ostatní typy epidermálních buněk nevytváří a který by interagoval s okolními epidermálními buňkami jako součást kutikulárních vosků. Alternativou by mohl být difusibilní inhibitor, produkováný svěrací buňkou a šířící se kutikulou, inhibující okolní buňky (Bird, Gray, 2003).

3.2.4. Odlišnosti ve vývoji průduchů u jednoděložných rostlin

Vývoj průduchů u jednoděložných rostlin je odlišný od vývoje dvouděložných rostlin. U jednoděložných rostlin probíhá buněčné dělení jen v bazální části listu. Tam se také vytvářejí základní buňky průduchů a prodlužováním listu se tyto buňky dělí jednou asymetricky. Vytvoří se dvě odlišně velké buňky. Větší buňka je situovaná bazálně. Menší buňka, situovaná apikálně, podstupuje symetrické dělení, čímž vytvoří pár svěracích buněk (Larkin et al., 1997).

3.2.5. Typy průduchů

Existují dva typy průduchů. Nejběžnější typ se nazývá Amaryllis – ledvinovitý typ – svěrací buňky mají tvar ledviny či fazole, a bývají obklopeny souborem podpůrných buněk. Antiklinální buněčná stěna svěrací buňky, vně póru, je konvexní, tenká a pružná. Vnitřní buněčná stěna, směřující do středu póru, je tenká v místě spojení dvou svěracích buněk, avšak v místě průduchového póru je nerovnoměrně ztlustlá, celulózové mikrofibrily směřují od středu k obvodu buněk. Toto uspořádání buněčné stěny a celulózových mikrofibril zamezuje zvětšení buňky směrem do prostoru póru při příjmu vody buňkou. Naopak, tenká dorzální stěna se snadno prodlužuje a může „zatăhnout“ silnější stěnu, která tak otevírá pór. V momentě úbytku vody a poklesu turgoru se buňky „zhroutí“ směrem k sobě a průduchový pór se tak uzavře. Tento mechanismus průduchu je typický pro dvouděložné rostliny, ale vyskytuje se i u některých jednoděložných.

Druhým typem průduchu je typ Gramineae - činkovitý, vyskytující se u čeledí *Poaceae* a *Cyperaceae*. Svěrací buňky mají tvar činky – jejich konce jsou vypouklé, s tenkou buněčnou stěnou a radiálním uspořádáním celulózových mikrofibril. Střední části buněk jsou prodloužené a extrémně tlustostěnné, takže lumen v této části buňky je

velmi úzký. Pokud svěrací buňky nasají vodu, jejich tenkostěnné konce nabobtnají a zatáhnou ztlustlé středové stěny a tím otevřou pór. Tento typ průduchu má vždy soubor podpůrných buněk.

3.2.6. Vnější faktory ovlivňující vývoj průduchů

Aby mohly rostliny růst a reprodukovat se, musí se přizpůsobovat měnícím se podmínkám prostředí, ve kterém žijí. Jedním z nejdůležitějších environmentálních faktorů je dostupnost vody. Hlavní úlohu při regulaci výparu z rostliny mají průduchy. Ovlivňují transpiraci nejen velikostí průduchové štěrby, ale také vlastním počtem průduchů v epidermis na nově se vyvíjejících listech (Casson, Hetherington, 2010).

Je dokázáno, že hustota průduchů (počet průduchů na jednotku plochy) a průduchový index (poměr počtu průduchů a počtu všech buněk, tedy průduchů i epidermálních buněk) na vyvíjejícím se listu je řízen signály z již dospělých listů. Podstata těchto signálů zatím není známá a je nejasné, jakým způsobem jsou tyto signály vyvolávány (Miyazawa, Livingston et al., 2006).

Snížení průduchové hustoty má za následek snížení průduchové vodivosti. Tuto veličinu však kromě vlastní hustoty průduchů ovlivňuje i velikost průduchových pórů. Obecně platí, že čím víc je průduchů na listu, tím se jejich velikost zmenšuje (Wagner et al., 1996).

3.2.6.1. Světelná regulace vývoje průduchů

Rostliny vyvinuly několik systémů fotoreceptorů, kterými monitorují kvalitu, množství i směr světla. U huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) se jedná o kryptochrom 1 a 2, fototropiny a fytochromy (Kang et al., 2009). Zvýšená ozáření pozitivně ovlivňuje počet průduchů u rostlin a to jak jejich hustotu (počet průduchů na jednotku plochy), tak průduchový index (poměr počtu průduchů a celkového počtu všech buněk epidermis, tj. průduchů a epidermálních buněk) (Salisbury, 1928). Množství světla tedy ovlivňuje „rozhodnutí“ protodermální buňky, zda se z ní stane průduch či dlaždicová buňka. Nutno zdůraznit, že tyto změny neporušují pravidlo vmezeření alespoň jedné dlaždicovité buňky mezi jednotlivými průduchy (tzv. one cell spacing rule) (Casson, Hetherington, 2010).

Jak již bylo zmíněno, o vývinu průduchů na novém listu rozhodují vnější podmínky listu staršího, již dospělého. Podle Schocha et al. (1980) jsou rozhodující podmínky šest dní před objevením se listu. Při pokusech s vignou čínskou (*Vigna sinensis* L.) zjistili, že u rostliny adaptované na stinné podmínky stačí, aby byla vystavena vyšší ozáření jeden z těchto šesti dnů na to, aby se zvýšil počet průduchů na očekávaném listu. Při zastínění dospělých listů tabáku a současném vystavení nových, vyvíjejících se listů vysoké ozáření, byl zjištěn 12,7% pokles průduchového indexu oproti kontrole vystavené pouze vysoké ozáření. Naopak zastínění tvořících se listů jinak intenzivně ozářené rostliny způsobilo 24,2% nárůst průduchového indexu (Thomas et al., 2003).

Rostliny pěstované při vyšší ozáření monochromatickým červeným světlem vykazují zvýšený průduchový index ve srovnání s rostlinami pěstovanými při ozáření nižší. Ozáření dlouhovlnným červeným světlem (far-red) při západu slunce na konci dne (stačí 30 minut) naopak způsobuje snížení průduchového indexu. Efekt far-red světla lze vyvrátit, pokud okamžitě následuje 30 minutové působení červeného světla. Opačný efekt světla těchto vlnových délek ukazuje, že tato reakce je vyvolána fotoreceptory fytochromu. Výzkumy naznačují, že dominantním fotoreceptorem rozhodujícím o osudu epidermální buňky v souvislosti s množstvím světla je fytochrom B (Casson, Franklin, 2009). Fytochrom B je po aktivaci fotonem translokován z cytoplazmy do jádra, kde může interagovat s interakčními faktory (PIFs), u kterých se ukázalo, že hrají určitou roli při několika dějích ovlivňovaných světlem (Monte et al., 2007).

3.2.6.2. Vliv koncentrace CO₂ na vývoj průduchů

Již dlouho je známo, že změny v koncentraci CO₂ mají vliv na množství průduchů, které se formují na nových listech (Woodward, 1987). Se zvyšující se koncentrací CO₂ v atmosféře se u většiny druhů hustota průduchů a průduchový index snižuje, a to jak v geologickém čase (dlouhodobě), tak v laboratorních podmínkách (krátkodobě).

Při zdvojnásobení koncentrace CO₂ se hustota průduchů na listu sníží v průměru o 22%, tato hodnota je však vysoce druhově specifická. Hodnota byla vypočítána na základě pozorování 110 druhů rostlin. Bylo také zjištěno, že větší rozdíl v hustotě průduchů v ambientních a změněných podmínkách vykazují amfistomatické druhy rostlin oproti hypostomatickým. Vliv na intenzitu reakce má také základní hustota

průduchů. Intenzivněji reagují rostliny, které mají při běžné koncentraci CO₂ větší hustotu průduchů na listu (Woodward, Kelly, 1995).

Stejně jako světlo, i CO₂ ovlivňuje rozmístění průduchů na formujícím se listu signálem z již vyvinutých dospělých listů. U *Arabidopsis* byly prováděny pokusy, kdy byla pomocí kyvetového systému aplikována na dospělé a mladé vyvíjející se listy rozdílná koncentrace CO₂. Růst vyvíjejících se listů při ambientní koncentraci CO₂ při současném vystavení dospělých listů zvýšené koncentraci způsobuje snížení průduchového indexu. Kupodivu, při opačném experimentu, kdy byly dospělé listy vystavené ambientním podmínkám a vyvíjející se listy byly vystaveny zvýšené koncentraci CO₂, byl průduchový index u nových listů zvýšen (Lake et al., 2001).

Výzkumy prováděné na rostlinách s panašovanými listy ukázaly, že při zvýšené koncentraci CO₂ se zvyšuje množství průduchů jak na pokožce zelených tak i bílých částí listů. To dokazuje, že regulace počtu průduchů nesouvisí s intenzitou fotosyntézy (Beerling, Woodward, 1995). Při pokusech prováděných na olši (*Alnus glutinosa*) pěstované při zvýšené koncentraci CO₂ v atmosféře bylo zaznamenáno zlepšení sledovaných růstových parametrů v porovnání s jedinci pěstovanými v ambientních podmínkách. Počet větviček na jednotlivých rostlinách se ve změněných podmínkách zvýšil. Naproti tomu, listová plocha jednotlivých listů byla ve srovnání s kontrolou nižší. Absolutní listová plocha, počet listů a celková výška rostlin se však nezměnila (Poole et al., 2000). To podporuje tvrzení McKeeho et al., (1995), že zvýšení atmosférické koncentrace CO₂ podporuje růst rostliny komplexně.

Poole et al. si také povšimli korelace mezi hustotou průduchů a průduchovým indexem u rostlin ze změněných i ambientních podmínek a zároveň negativní korelace mezi hustotou epidermálních buněk a průduchovým indexem pouze u rostlin v atmosféře s vyšší koncentrací CO₂. Pozitivní korelace byla průkazná i mezi hustotou průduchů a hustotou epidermálních buněk. Tyto výsledky poukazují na to, že jedním z faktorů ovlivňujících variabilitu průduchového indexu je míra expanze epidermálních buněk.

Počet stomat utvořených na listu u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) ovlivňuje *HIGH CARBON DIOXIDE* gen (*HIC*), jak již bylo zmíněno (kap. 3.2.2). Tento gen funguje pouze v návaznosti na změněné podmínky prostředí, hlavně koncentrace CO₂.

3.2.6.3. *Vlhkost a teplota*

Zatímco u těchto faktorů prostředí je velmi dobře znám jejich účinek na otevřenost průduchového póru, jen velmi málo se doposud ví o jejich schopnosti regulovat počet průduchů tvořících se na listech. Stres suchem způsobený nízkou vlhkostí půdy způsobuje redukci průduchového indexu u blatouchu bahenního (*Caltha palustris*) a pšenice (*Triticum aestivum*) (Casson, Gray, 2008). Avšak u podzemnice olejné (*Arachis hypogea*) nemá sucho na průduchový index vliv (Clifford et al., 1995). U ladoňky (*Scilla nutans*) bylo dokonce zjištěno, že průduchový index klesá při zvýšené vlhkosti (Salisbury, 1928).

Je možné, že ABA jako rostlinný hormon regulující otevírání a zavírání průduchů, může také ovlivňovat vývoj průduchů v návaznosti na vlhkostní poměry prostředí (Casson, Hetherington, 2010).

4. Materiál a metody

4.1. Vliv rozdílné koncentrace CO₂ ve dne a v noci na vývoj průduchů

Materiál

Pokusnou rostlinou byla zvolena řeřicha setá (*Lepidium sativum* L.) z čeledi *Brassicaceae*, zejména pro své růstové schopnosti. Klíčivost semen je velmi vysoká a rostliny velmi rychle rostou. Již třetí den po výsevu jsou děložní listy zelené a po týdnu jsou již plně vyvinuté. Po 14-ti dnech růstu jsou již vyvinuté pravé listy a začínají se objevovat 2. pravé listy.

Podmínky pěstování

Rostliny byly pěstovány ve dvou skleněných exsikátorech (objem 0,7 l). Použitým substrátem byl perlit, který byl přiklopen keramickou destičkou s 24 otvory pro jednotlivé rostliny. Kvůli snížení výparu na minimum byl střední otvor destičky přikryt hliníkovou folií. Exsikátory s rostlinami ve fázi dospělých děložních listů (6. den po zasetí) byly hermeticky uzavřeny víkem (styčná plocha víka a exsikátoru byla natřena silikonovou pastou), do kterého byla nainstalována přívodová a odvodová hadička pro plyn.

Použitým plynem byla směs dusíku (79 %), kyslíku (21 %) a oxidu uhličitého (400 ppm), která byla zvlhčována průchodem přes promývačku naplněnou destilovanou vodou a generátor vlhkosti (relativní vlhkost se pohybovala kolem 80%). Tato směs byla beze změny přiváděna k rostlinám v kontrolním exsikátoru po celou dobu trvání pokusu. V plynu přiváděném do pokusného exsikátoru byla měněna koncentrace CO₂ buď ve dne, nebo v noci. Koncentrace CO₂ v jednotlivých exsikátorech během jednotlivých opakování pokusu je pro přehlednost znázorněna v následující tabulce (Tab.1).

Tabulka 1: Koncentrace CO₂ ve dne a v noci v jednotlivých exsikátorech během jednotlivých opakování.

1. opakování (koncentrace CO ₂)				2. opakování (koncentrace CO ₂)			
exsikátor č.0		exsikátor č.1		exsikátor č.0		exsikátor č.1	
den	noc	den	noc	den	noc	den	noc
400 ppm	400 ppm	400 ppm	0 ppm	400 ppm	400 ppm	200 ppm	400 ppm

Směs plynů byla míchána z 50 l tlakových lahví O₂, N₂, CO₂ (Messer, ČR, plyny čistoty 3.5 (O₂) nebo 4.6 (ostatní)) systémem průtokoměrů s počítačovým řízením (Easy Control Ltd., ČR a Tylan, USA). Průtok plynu činil 500 ml . min⁻¹ do každého exsikátoru. Koncentrace CO₂ byla upravována pomocí SODALIME (Sigma, D).

Oba exsikátory byly umístěny v klimaboxu (Fitotron, Sanyo, UK). Teplota byla ve dne 23 °C, v noci 21 °C. Ozářenost se pohybovala kolem 500 μmol.m⁻².s⁻¹ s fotoperiodou 12 hodin. Rostliny byly podle potřeby zalévány vodou z vodovodního řadu jednou za dva dny.

Po dvoutýdenním růstu byly rostliny „sklizeny“, tj. ustřiženy těsně nad substrátem a zváženy v čerstvém stavu. Část rostlin byla usušena na analýzu zastoupení izotopu uhlíku ¹³C. Ze zbylých rostlin byly sejmuty otisky epidermis, vždy z děložních i 1. pravých listů.

Výše uvedený postup popisuje pokus prováděný v roce 2011. Podobný postup byl prováděn i při pokusu v roce 2010, ale rostliny byly v měnicích se podmínkách hned od zasetí a byly sklizeny po sedmi dnech, tedy ve fázi děložních listů.

Otisky listů

Po ustřižení rostliny těsně nad substrátem a zvážení byly děložní a první pravé listy otrhány a připevněny na list papíru pomocí oboustranné lepicí pásky tak, aby od každého typu listu (děložní, pravé) byl jeden přilepen rubem a jeden lícem. Listy byly ihned natřeny bezbarvým lakem na nehty (Rimmel – Lycra Pro, UK), označeny pořadovým číslem a vyfoceny s měřítkem pro výpočet plochy listu. Vrstva laku musí

být tenká a musí se natřít co nejrychleji po utržení listu, než buňky ztratí turgor. Po zaschnutí se lak z listu přenese pomocí průhledné lepicí pásky na podložní sklíčko. Při pozorování v mikroskopu jsou vidět povrchové nerovnosti listu otištěné do laku – tedy obrysy epidermálních buněk, průduchů, popř. trichomů apod.

Z každého listu bylo pod mikroskopem (Olympus BX61, Japan) vyfoceno 5 polí o velikosti cca 0,13 mm² při zvětšení 500x. V těchto polích byly počítány průduchy a epidermální buňky, jejich počty byly následně přepočítávány na 1 mm² a na plochu celého listu. Plocha listu byla vypočítána v programu MideBMP (Ordiales-Plaza, ES) podle fotky listu nalepeného na oboustranné lepicí pásce s přiloženým měřítkem. Výsledná data byla zpracována v programu STATISTICA 6 (StatSoft, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft, USA).

Analýza stabilních izotopů uhlíku

Rostliny byly ustřiženy těsně nad substrátem a ihned byla stanovena jejich čerstvá hmotnost. Poté jim byly odstřiženy děložní a 1. pravé listy a byly vloženy do označené mikroskopavky (1 pár děložních do jedné, 1 pár pravých do druhé). Takto odebrané listy ze 4 – 5 rostlin z každého exsikátoru byly usušeny do konstantní hmotnosti (sušení 4,5 hodiny, 70 °C).

Po usušení byly vzorky znovu zváženy pro výpočet obsahu sušiny. Poté byly do každé mikroskopavky přidány 2 nerezové kuličky. Takto připravené mikroskopavky se vzorky a kuličkami byly vloženy do kulového mlýnku (Retsch, MM 200, DE) a homogenizovány (při frekvenci třepání 30 ot.s⁻¹ po dobu 20 s). Do cínových kapslí 8x5 mm (SerCon, UK) byla zabalena navážka v rozmezí 0,35 – 0,45 mg vzorku (na vahách Mettler Toledo MT 5, d = 1 µg).

Vlastní analýza byla prováděna na izotopovém poměrovém hmotnostním spektrometru Delta^{XL} plus (Finnigan, DE) spojeném s jednotkou ConFloIII (Finnigan, DE) zajišťující kontinuální tok nosného plynu (helium) čistoty 4.6. V prvkovém analyzátoru Vario MicroCube (Elementar Analysen systeme, DE) byly vzorky spalovány na CO₂ při teplotě 950°C. Jako pracovní standard byla při analýze použita celulóza (IAEA-C3) (International Atomic Energy Agency, A), která byla měřena vždy před a po sérii deseti vzorků. Obsah izotopů uhlíku byl vyjádřen pomocí jejich poměru ve vzorku $R_{\text{vzorek}} = {}^{13}\text{C}:{}^{12}\text{C}$ a následně jako hodnoty diskriminace ¹³C vztažené k

mezinárodnímu standardu VPDB (Vienna PeeDee Belemnite)

$$\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{Vzorek}} / R_{\text{Standard}} - 1) \cdot 1000 [\text{‰}].$$

4.2. Vliv rozdílné ozáření na vývoj průduchů u jednoděložných

Materiál

Zvolenou rostlinou pro tento pokus byl ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Listy ječmene přirůstají velmi rychle. V podmínkách tohoto pokusu se list prodloužil v průměru o 5 – 6 cm za den.

Podmínky pěstování

Semena ječmene byla zaseto do 3 květináčů (2x objem 2 l, 1x 1,2 l) naplněných komerčně připraveným substrátem (Zahradnický substrát, ASB-Grünland sro, CZ). Do větších květináčů bylo zaseto po 12 semenech a do menšího květináče 7 semen. Menší květináč sloužil jako kontrola. Po sedmi dnech (rostliny byly ve fázi druhého listu), byly dva větší (pokusné) květináče zastíněny čtyřmi vrstvami bílého tylu (Tab.2). Při objevení třetího listu byl tento list odebrán u 4 rostlin z velkých květináčů a u jedné rostliny z květináče kontrolního, zároveň byla odstraněna jedna vrstva tylu a další odběr listů byl proveden za 24 hodin. Báze rostoucích listů byla označena fixem s inkoustem na bázi alkoholu (Whiteboard marker), aby bylo možné rozlišit přírůstky v jednotlivých dnech. V následující tabulce jsou rozepsány jednotlivé hodnoty ozáření v souvislosti s počtem vrstev tylu:

Tabulka 2: Hodnoty ozáření podle vrstev stínění listů ječmene setého.

Den v pořadí	Počet vrstev tylu	Ozáření ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
1.	4	300
2.	3	314
3.	2	346
4.	1	381
5.	0 = kontrola	485

Otisky listů

Každý odebraný úsek listu byl ihned po odtržení rozdělen podél hlavní žilky na dvě poloviny. Jedna polovina byla nalepena na papír pomocí oboustranné lepicí pásky a adaxiální strana byla natřena bezbarvým lakem na nehty (stejně jako výše popsaná technika u řeřichy, viz. Kap. 4.1). Druhá polovina listu byla rozřezána na úseky jednotlivých dní (část úseku, která byla znečištěna od fixu, byla odstraněna), usušena a použita jako vzorek pro analýzu stabilních izotopů uhlíku (metodika stejná jako u řeřichy, viz. Kap. 4.1).

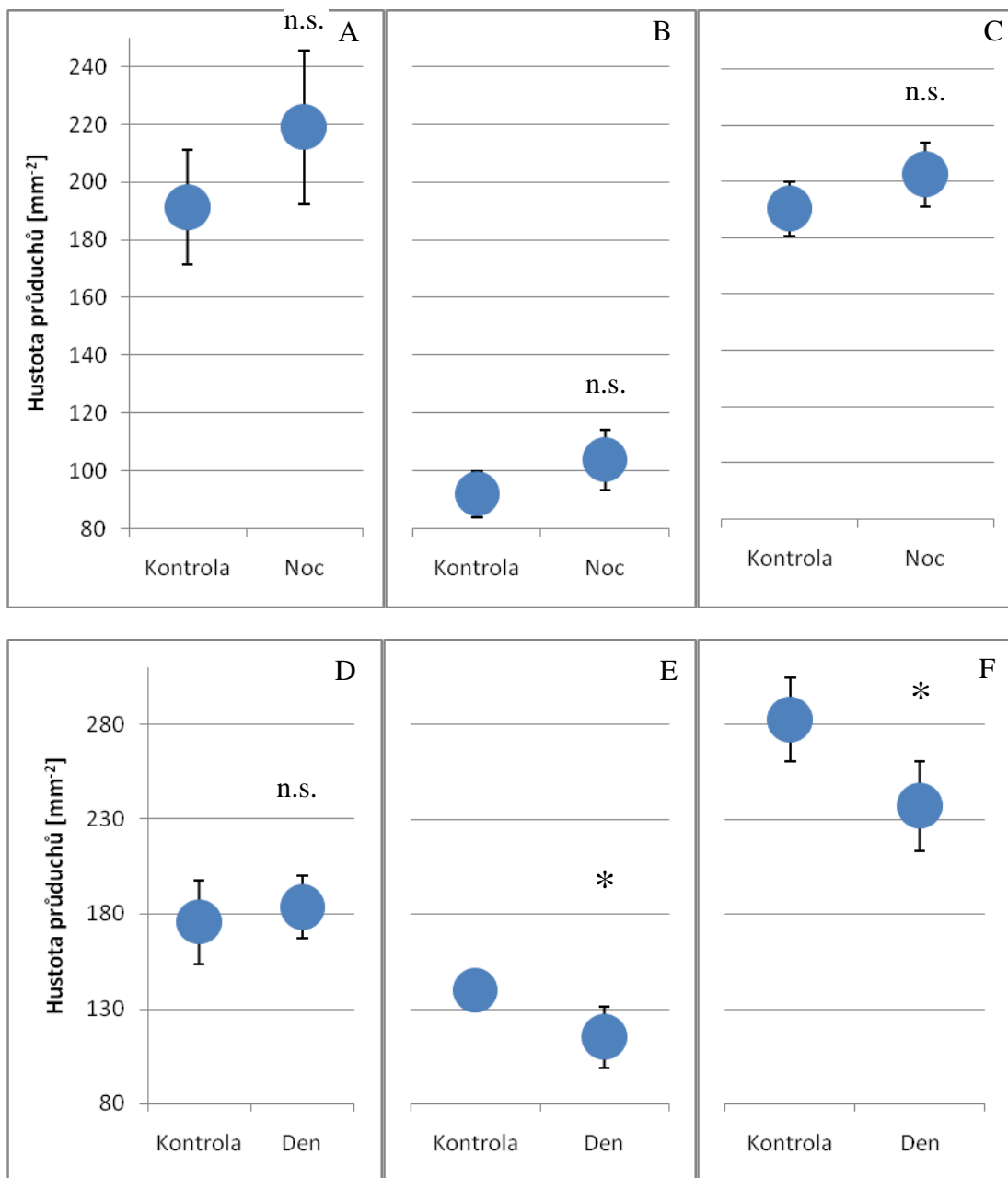
Otisky byly foceny v mikroskopu (BX61, Olympus, Japan) s použitím objektivu s 20-ti násobným zvětšením. Z každého úseku listu bylo vyfoceno 5 ploch o velikosti $0,325\text{ mm}^2$, ve kterých bylo následně počítáno množství průduchů. Tento počet průduchů byl následně přepočítán na jednotku plochy. Výsledná čísla byla porovnávána v programu STATISTICA 6 (StatSoft, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft, USA).

5. Výsledky

5.1. Vliv rozdílné koncentrace CO₂ ve dne a v noci na vývoj průduchů

Cílem tohoto pokusu bylo sledování vlivu snížené koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře ve dne či v noci na vývoj průduchů na listu řeřichy seté. U tohoto amfistomatického druhu se liší počet průduchů na adaxiální a abaxiální straně listu. Obecně platí, že na straně abaxiální je průduchů asi o 30 % více. Trend sledující změnu hustoty průduchů či epidermálních buněk při zásahu je však u obou stran stejný. Proto je možné při interpretaci výsledků počítat s průměrem mezi oběma stranami listu. Grafická zobrazení v této práci znázorňují právě tyto průměry, při vyhodnocování zdrojových dat však byly brány v úvahu všechny možnosti a statisticky byly zpracovávány abaxiální a adaxiální strany listu zvlášť.

V následující skupině grafů (obr.2) jsou znázorněny průměrné hodnoty hustoty průduchů na mm² listu. Část rostlin byla pěstována v ambientní atmosféře s koncentrací CO₂ 400 ppm ve dne i v noci (označeno jako „Kontrola“), další rostliny byly pěstovány v atmosféře přes den ambientní (400 ppm CO₂) a v noci se sníženou koncentrací CO₂ (0 ppm CO₂) (označeno jako „Noc“, obr.2 A-C). Ve druhé části pokusu byla část rostlin pěstována opět v ambientní atmosféře („Kontrola“) a část rostlin v atmosféře ambientní v noci a se sníženou koncentrací CO₂ (200 ppm) ve dne („Den“, obr.2 D-F).

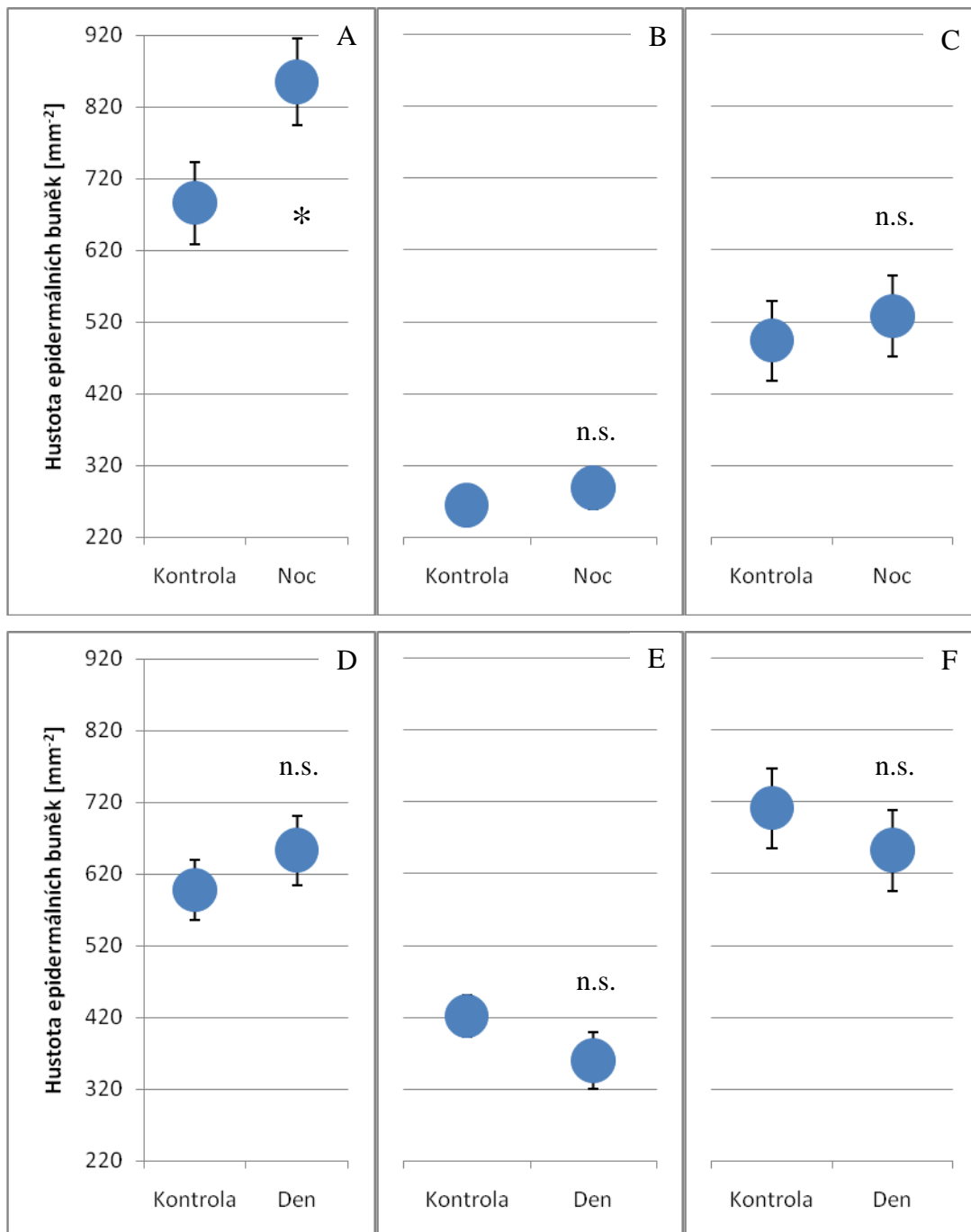


Obrázek 2: Hustota průduchů na listech a dělohách řerichy u kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných rostlin (snížená koncentrace CO₂ v noci („Noc“) nebo ve dne („Den“)); A a D: počet průduchů na mm² děloh 7 dní starých; B a E: počet průduchů na mm² děloh pěstovaných 14 dní; C a F: počet průduchů na mm² prvních pravých listů; uveden průměr z 6 – 10 listů a směrodatná odchylka.

V první části pokusu, kdy byla koncentrace CO₂ snižována v noci, byla hustota průduchů na mm² děloh sklizených po 7 dnech růstu, vyšší, než u děloh rostoucích 14 dnů (obr.1A,B). Sedm dní staré pravé listy mají velmi podobnou hodnotu průduchové

hustoty jako sedmidenní dělohy (Obr. 2C,A), což je způsobeno tím, že na rozdíl od starších listů dosud nedošlo k expanzi epidermálních buněk a tím k oddálení průduchů od sebe. U všech tří skupin listů je zjevný trend zvyšující se hustoty průduchů v důsledku snížené noční koncentrace CO₂ i když efekt není statisticky průkazný.

V druhé části pokusu, kdy byla koncentrace CO₂ snižována ve dne, byla hustota průduchů na mm² sedmidenních děloh vyšší, než u čtrnáctidenních děloh a nelišila se významně u kontroly i zásahu sedmidenní dělohy nebo byla významně snížena u čtrnáctidenní dělohy. U děloh a prvních pravých listů čtrnáctidenních rostlin lze pozorovat statisticky průkazný pokles hustoty průduchů vyvolaný sníženou denní koncentrací CO₂ oproti kontrole.



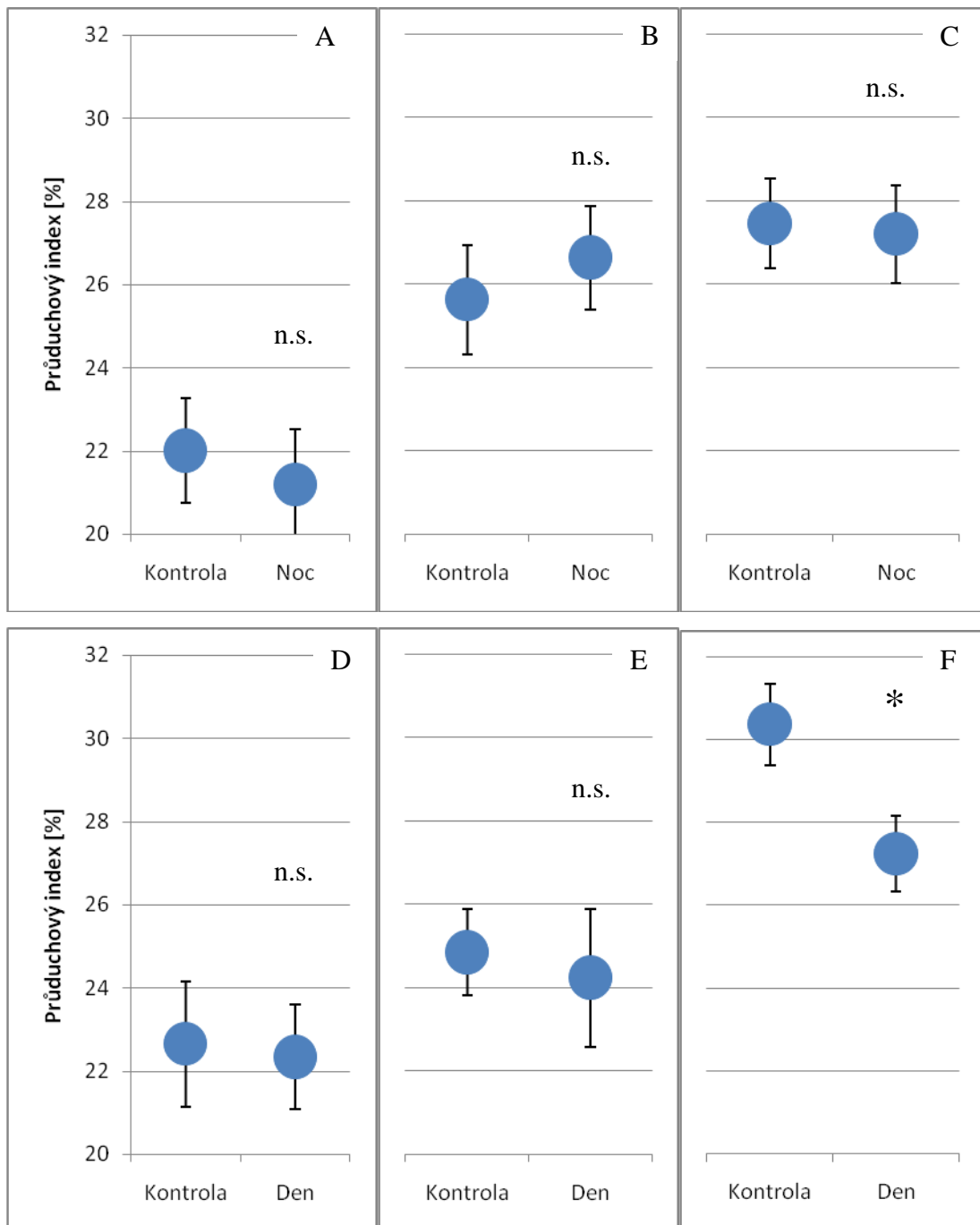
Obrázek 3: Hustota epidermálních buněk na listech a dělohách u kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných rostlin (snížená koncentrace CO₂) v noci („Noc“) nebo ve dne („Den“); A + D) počet epidermálních buněk na mm² listu u děloh pěstovaných 7 dní; B + E) počet epidermálních buněk na mm² listu u děloh pěstovaných 14 dní; C + F) počet epidermálních buněk na mm² listu u 1.pravých listů; uveden průměr z 6 – 10 listů a směrodatná odchylka.

Průměrné hodnoty hustoty epidermálních buněk na mm² listu se pohybovaly v rozmezí 220 – 900 (Obr.3). V první části pokusu (koncentrace CO₂ snižována v noci) byla hustota epidermálních buněk na mm² děloh sklizených po 7 dnech růstu, vyšší než

u děloh rostoucích 14 dnů (obr.3A,B), stejně jako tomu bylo při pozorování hustoty průduchů. Děložní listy rostoucí na sníženém nočním CO₂ měly statisticky průkazně vyšší hustotu epidermálních buněk na mm² než jejich kontrola. Podobný, ale neprůkazný trend lze vidět u starších děloh a pravých listů (Obr. 3B,C).

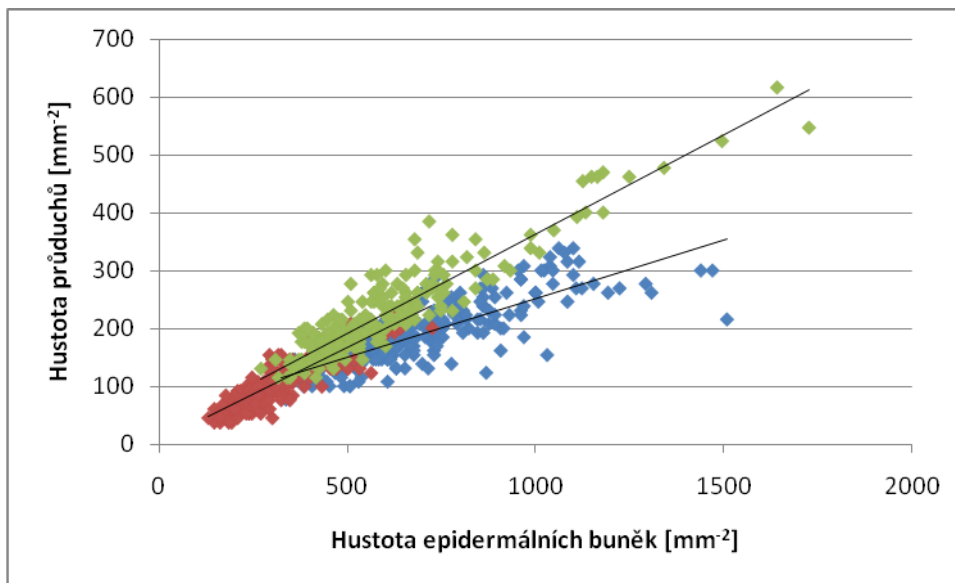
V druhé části pokusu (koncentrace CO₂ snižována ve dne) byla hustota epidermálních buněk na mm² mladých děloh nepatrně vyšší, než u kontroly (Obr. 3D). U starších děloh a pravých listů lze pozorovat klesající trend hustoty epidermálních buněk zásahu oproti kontrole, který však není statisticky průkazný.

Počet průduchů byl dále vyjádřen jako průduchový index (tj. poměr počtu průduchů k počtu průduchů a epidermálních buněk na jednotku plochy) u jednotlivých skupin listů (obr.4).



Obrázek 4: Průduchový index u kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných rostlin (snížená koncentrace CO₂) v noci („Noc“) nebo ve dne („Den“); A + D) průduchový index u děloh pěstovaných 7 dní; B + E) průduchový index u děloh u děloh pěstovaných 14 dní; C + F) průduchový index u děloh u 1.pravých listů; uveden průměr z x měření a směrodatná odchylka.

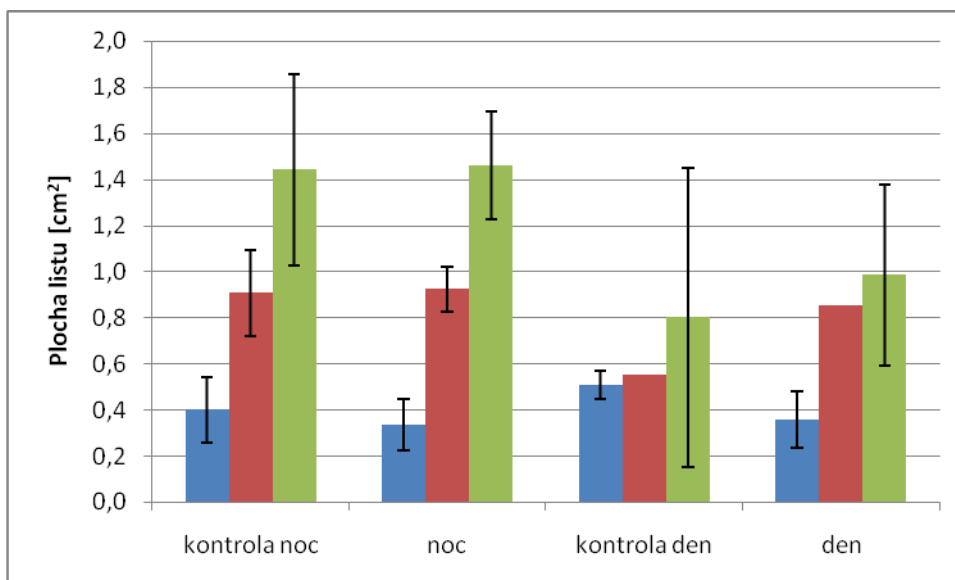
Při snížené koncentraci CO₂ ve dne je u pravých listů statisticky prokazatelně nižší průduchový index než u kontroly. V ostatních skupinách listů se od sebe příslušné zásahy a kontroly statisticky nelišily. Nejnižší průduchový index měly mladé dělohy.



◆ mladší dělohy
 ◆ starší dělohy
 ◆ 1.pravé listy

Obrázek 5: Korelace hustoty epidermálních buněk a hustoty průduchů na jednotku plochy

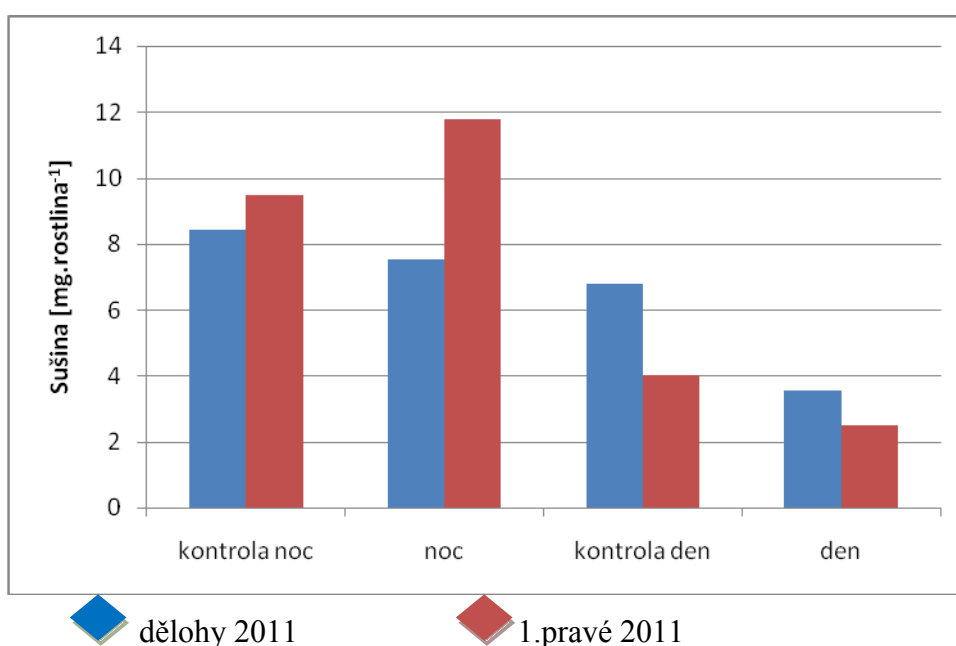
Mezi hustotou průduchů a epidermálních buněk byla nalezena lineární závislost (obr.5). Korelační vztah mezi hustotou průduchů a hustotou epidermálních buněk je velmi podobný u starších děloh a pravých listů. Lineární regrese pravých listů jakoby navazovala na regresi starších děloh. Mladší dělohy se odklání od předchozích skupin díky nižšímu počtu průduchů na jednotku plochy.



◆ Mladší dělohy
 ◆ starší dělohy
 ◆ 1.pravé listy 2011

Obrázek 6: Průměrná plocha děloh a listů u kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných (snížená koncentrace CO₂ v noci nebo ve dne) rostlin řetichy seté. Uveden průměr z 6-10 listů a směrodatná odchylka.

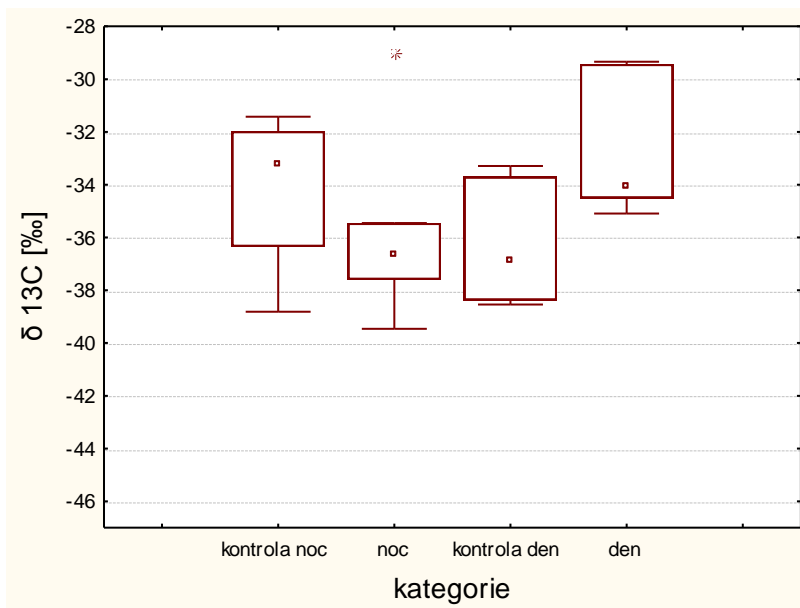
Plochy listů zásahu v noci se nijak neliší od ploch listů kontroly, a to ani u mladších a starších děloh ani u pravých listů (obr.6). Listy z druhé části pokusu (koncentrace CO₂ byla snižována ve dne) jsou celkově menší, než listy z části první (koncentrace CO₂ byla snižována v noci). Mladší dělohy mají přibližně stejnou plochu ve všech kategoriích. Starší dělohy jsou si svou velikostí také hodně podobné, jen kontrola z druhé části pokusu (tj. u zásahu byla snižována koncentrace CO₂ ve dne) je poměrně menší, než listy ostatních kategorií. Plocha 1.pravých listů se v první části pokusu neliší, v druhé části pokusu mají pravé listy rostlin zásahu, tj. ve dne se sníženou koncentrací CO₂, o něco větší plochu, než jejich kontrola.



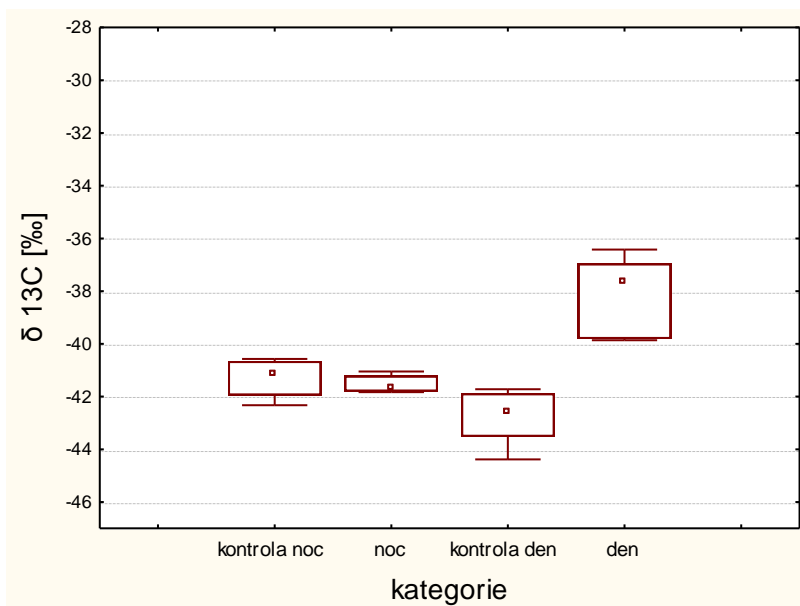
Obrázek 7: Obsah sušiny v mg přepočtený na jednu rostlinu u kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných rostlin (snížená koncentrace CO₂) v noci nebo ve dne. Uveden průměr z 6 měření.

Stejně jako plocha listů, tak i obsah sušiny je vyšší v rostlinách z první části pokusu (snížené CO₂ v noci + kontrola), než v rostlinách z části druhé (snížené CO₂ ve dne + kontrola). Nejmenší obsah sušiny mají pravé listy pěstované v atmosféře se snižovanou koncentrací CO₂ ve dne. Největší obsah sušiny mají pravé listy pěstované v atmosféře se snižovanou koncentrací CO₂ v noci.

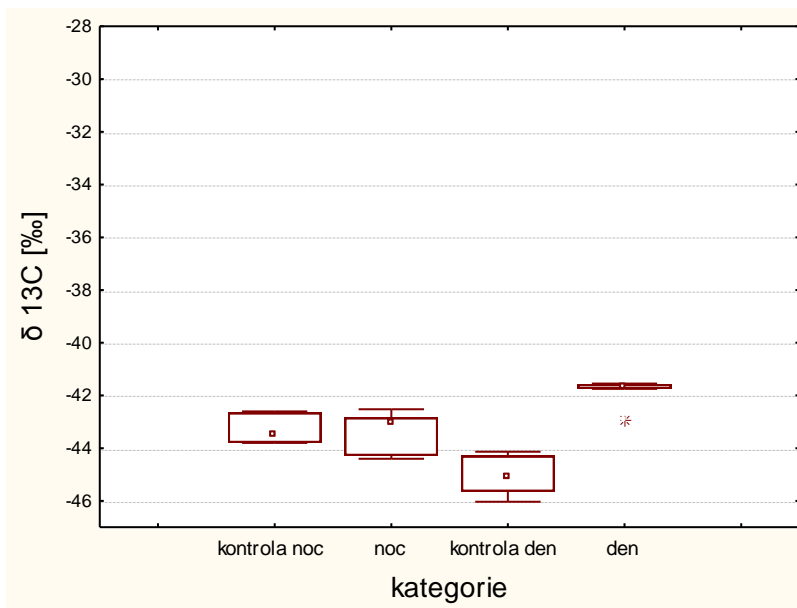
Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ se u jednotlivých skupin listů pohybují v rozmezí od -46 do -29 ‰ (obr.8 až 10). Tyto velmi nízké hodnoty jsou způsobeny nízkým signálem použitého zdrojového plynu (-30 ‰).



Obrázek 8: Diskriminace izotopu ^{13}C v sedmidenních dělohách kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných (snížená koncentrace CO_2 v noci nebo ve dne) rostlin řěřichy seté. Uveden průměr z 6 měření, směrodatná odchylka, rozptyl



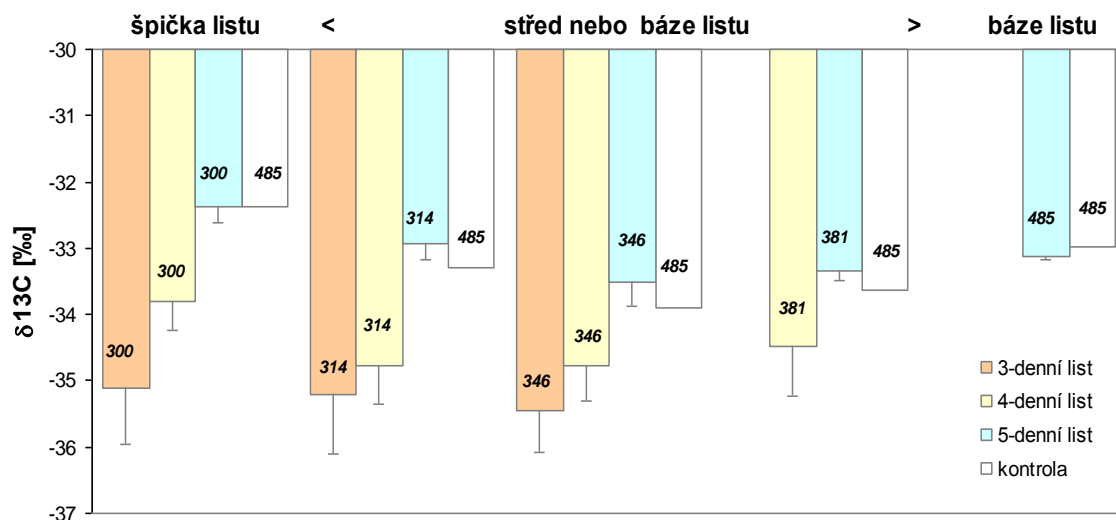
Obrázek 9: Diskriminace izotopu ^{13}C ve čtrnáctidenních dělohách kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných (snížená koncentrace CO_2 v noci nebo ve dne) rostlin řěřichy seté. Uvedeny průměry z 6 měření, směrodatná odchylka, rozptyl



Obrázek 10: Diskriminace izotopu ^{13}C v pravých listech kontrolních (ambientní atmosféra) a pokusných (snížená koncentrace CO_2 v noci nebo ve dne) rostlin řerichy seté. Uveden průměr z 6 měření, směrodatná odchylka, rozptyl

Sedmidenní dělohy se při jednotlivých zásazích v izotopovém signálu od sebe průkazně nelišily (obr.8). U starších děloh a pravých listů je zjevné, že snížená koncentrace CO_2 v noci neovlivnila diskriminaci ^{13}C , protože v noci neprobíhá asimilace CO_2 (obr.9,10). Naopak, snížená koncentrace CO_2 v atmosféře ve dne způsobila menší diskriminaci (vyšší zastoupení) těžšího izotopu oproti kontrolním rostlinám, jinými slovy obohacení listů o ^{13}C . Trend vývoje u děloh je stejný jako u pravých listů, ale je posunutý přibližně o 2 ‰.

5.2. Vliv rozdílné ozáření na vývoj průduchů u jednoděložných



Obrázek 11: Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ stejně starých úseků listů ječmene setého při postupně rostoucí ozáření a prodlužování listu. Čísla uvedená u jednotlivých sloupců označují hodnoty ozáření, při které daný úsek listu vyrostl. Jednotlivé úseky listu jsou řazeny zleva do skupin od špičky po bázi listu. Uveden průměr z 3-4 měření a směrodatná odchylka.

Jednotlivé sloupce grafu (Obr.11) znázorňují průměrné hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ úseků, které vyrostly ve stejný čas na listu ustřiženém ve stejný den. Každá skupina sloupců popisuje úseky listů (rostoucích různě dlouho), které vyrostly při stejné ozáření a kontrole.

Třídenní listy (označeny tmavě oranžovou barvou) byly ustřiženy a rozstříhány na úseky podle značek, které byly vyznačeny každý večer na bázi. U hodnot $\delta^{13}\text{C}$ jednotlivých dílků vyrostlých při zvyšující se ozáření můžeme pozorovat mírně sestupný trend.

U listů, které rostly o jeden den déle (světle oranžová barva), můžeme pozorovat, že hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ jsou vyšší, a to i u úseků, které rostly ve stejný den a při stejné ozáření jako úseky u třídenního listu.

Listy, které rostly 5 dní (modrá barva), vykazují nejvyšší hodnoty $\delta^{13}\text{C}$, ve všech úsecích, i v těch, které rostly ve stejných podmínkách jako úseky listů ustřižených o jeden nebo dva dny dříve. Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ kontrolních listů, tedy listů, které rostly celou

dobu při nejvyšší ozáření, jsou shodné s $\delta^{13}\text{C}$ listů, které rostly při snížené, postupně se zvyšující ozáření (poslední den tedy byla jejich ozáření stejná jako u kontroly).

Pro jednotlivé úseky listů byla počítána hustota průduchů. Mezi jednotlivými úseky však nebyl statisticky významný rozdíl. Data nejsou uvedena.

6. Diskuze

6.1. Vliv rozdílné koncentrace CO₂ ve dne a v noci na vývoj průduchů

Výsledky mého pokusu naznačují, že snížená koncentrace oxidu uhličitého v noci mírně zvyšuje hustotu průduchů na listu, z čehož se dá usuzovat, že buňky se dělí celý den a rostlina reaguje na denní i noční koncentraci CO₂ v atmosféře. V literatuře je uváděno, že snížená koncentrace CO₂ v atmosféře všeobecně počet průduchů na listu zvyšuje (Woodward, 1987). Z výsledků mého pokusu však vyplývá, že v případě, že je koncentrace CO₂ nižší pouze ve dne, je hustota průduchů na listu naopak nižší. Trend hustoty průduchů u rostlin s nízkou koncentrací CO₂ ve dne, který se u starších (2-týdenních) děloh a pravých listů snižuje a u týdenních děloh mírně zvyšuje, odpovídá trendu plochy listů, která se u starších děloh a pravých listů zvyšuje a u mladších děloh snižuje. Snižující se hustota průduchů při zvyšující se ploše listů je způsobena expanzí epidermálních buněk, které tak odtlačují průduchy od sebe.

Změny hustoty epidermálních buněk na listu jsou shodné se změnami hustoty průduchů, tzn. že podmínky prostředí ovlivňují stejně dělení i diferenciaci buněk epidermis. Hustota průduchů vždy koreluje s hustotou epidermálních buněk, jak je vidět na obrázku 5, to odpovídá i tvrzení Poolea et al., (2000). Z toho vyplývá, že v literatuře často upřednostňovaný průduchový index není dobrým ukazatelem pro popis vlivu podmínek prostředí na vývoj průduchů. Důkazem tohoto tvrzení mohou být data získaná pro 7-mi denní dělohy s nízkou denní i noční koncentrací CO₂, které mají oproti své kontrole nižší plochu listu, podle čehož se dá předpokládat (skutečný výsledek odpovídá tomuto předpokladu), že hustota epidermálních buněk a průduchů na jednotku plochy bude vyšší než u kontroly, neboť epidermální buňky ještě zcela neexpandovaly. Avšak průduchový index těchto listů se oproti kontrole snížil. Proto je nutné věnovat pozornost vývoji hustoty průduchů, epidermálních buněk i plochy listu komplexně.

Diskriminace těžšího izotopu uhlíku ¹³C u děloh i pravých listů vykazuje stejný trend. Pokud je koncentrace CO₂ v atmosféře snížena v noci, δ ¹³C je shodná s δ ¹³C kontrolních rostlin, protože v noci nedochází k asimilaci CO₂ a tudíž ani k jeho diskriminaci. Snížená koncentrace CO₂ v atmosféře ve dne snižuje diskriminaci ¹³C, což je

pravděpodobně způsobeno limitací množství CO₂ v listovém pletivu. Diskriminace ¹³C je přímo úměrná poměru c_i/c_a, tj. poměru koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině a koncentrace CO₂ v atmosféře (Farquhar, 1980).

Obsah sušiny v listu odpovídá míře diskriminace ¹³C. V našich pokusech listy s nejnižším obsahem sušiny nejméně diskriminují těžký izotop uhlíku. Při snížení koncentrace CO₂ v atmosféře během světlé části fotoperiody dochází ke snížení suché hmotnosti listů (děložních i pravých) v důsledku limitace substrátem pro fotosyntetickou asimilaci. Plocha listů přitom v tomto případě roste. Větší plocha a naopak nižší obsah sušiny děložních i pravých listů při snížené koncentraci CO₂ pravděpodobně poukazuje na adaptaci rostlin ztenčením listů pro usnadnění difuze CO₂ v listu.

Pokus prováděný v roce 2010 pouze na mladých děložních listech, kdy byla do daných podmínek prostředí umístěna již semena, neprokázal výrazný efekt snížené koncentrace CO₂ ve dne ani v noci na hustotu průduchů. Stejně tak data z analýzy stabilních izotopů uhlíku nenaznačovala výrazněji změnu v difúzi a asimilaci CO₂ při snížené koncentraci CO₂ v atmosféře oproti kontrole. Neprůkazný rozdíl v δ¹³C jsem si vysvětlovala nedostatečně dlouhou dobou působení daných podmínek na mladé listy, které byly z velké části „postaveny“ ze zásobních látek ze semene. Semena řeřichy seté přitom měla izotopový signál uhlíku -27.7 ‰. Tato hodnota je však jen průměrem měření několika semen. δ¹³C každého semene může být mírně odlišná, protože tato hodnota je proměnlivá v závislosti na tom, z jaké konkrétní rostliny byla semena odebrána, nebo dokonce z jaké části prýtu. Izotopový signál zdrojového CO₂ pro fotosyntézu se přitom pohyboval okolo -30 ‰. Diskriminace těžkého uhlíku u C3 rostlin (Δ¹³C) rostoucích ve volné atmosféře s δ¹³CO₂ okolo -8 ‰ se pohybuje přibližně okolo 20 ‰ (Vogel, 1980), a proto relativní izotopový poměr v sušině těchto rostlin (δ¹³C) dosahuje hodnot cca -28 ‰. Při diskriminaci vzhledem k substrátu (Δ¹³C) přitom nezáleží na signálu zdrojového plynu. Uhlík zabudovávaný při fotosyntéze proto musí mít i v našem případě hodnotu o mnoho zápornější, než je hodnota δ¹³C zdrojového plynu. Toho však při prvním opakování pokusu dosaženo nebylo. Navíc mezi kontrolami a rostlinami pěstovanými při sníženém CO₂ ve dne nebo v noci nebyly statisticky prokazatelné rozdíly. Variabilita δ¹³C rostlin v rámci skupin byla nečekaně velká, pravděpodobně způsobená právě tím, že rostliny ještě nefixovaly dostatečné množství uhlíku na to, aby mohly „naředit“ signál semen, jak již bylo zmíněno.

Tyto nesrovnalosti byly důvodem k opakování pokusu a k pozměnění metodiky. Podruhé byly rostliny pěstovány až do fáze prvních pravých listů, čímž měl být eliminován vliv $\delta^{13}\text{C}$ semen. Rostliny byly z důvodu finanční nákladnosti první týden pěstovány v ambientních podmínkách a navíc jsem předpokládala, že se variabilní izotopový signál jednotlivých rostlin vyrovná a následně, po rozdělení na skupinu kontrol a rostlin se sníženou koncentrací CO_2 v noci nebo ve dne, se u prvních pravých listů začne měnit podle nových podmínek, v kterých se rostliny „ocitly“. Zároveň jsem očekávala, že hustota průduchů na děložních listech už se s novými podmínkami nebude měnit nijak výrazně, tedy že bude u všech 4 skupin děložních listů stejná. Děložní listy však reagovaly stejně jako prvé pravé listy, a to jak v $\delta^{13}\text{C}$, tak v hustotě průduchů a epidermálních buněk.

Dalším faktem, který považuji za nutné komentovat, byla odlišnost získaných dat pro kontrolní rostliny. Kontrola byla pěstována současně s rostlinami se sníženou koncentrací CO_2 v noci a o dva týdny později i s rostlinami se sníženou koncentrací CO_2 ve dne. Podmínky pěstování byly nastaveny v obou opakováních pokusu stejně, přesto se kontroly od sebe lišily jak v hustotě průduchů, tak i v hustotě epidermálních buněk, obsahu sušiny a v izotopovém signálu. Tento jev může být vysvětlen tím, že se pěstební podmínky změnilы vlivem nějakého dalšího, neznámého faktoru. Další možnou variantou vysvětlení může být i to, že soubor rostlin, ze kterého byla data získávána, je moc malý na to, aby se dal statisticky průkazně zpracovávat.

6.2. Vliv rozdílné ozáření na vývoj průduchů u jednoděložných

Podle dat získaných pro kontrolní listy, tedy listy, které byly po celou dobu svého růstu vystaveny stejné, nejvyšší ozáření ($485 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), je patrné, že hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ se směrem od špičky ke středu listu snižují (střed čepele je ochuzenější o ^{13}C) a od středu listu k bázi se opět mírně zvyšují. Stejný trend hodnot $\delta^{13}\text{C}$ opisují i ostatní listy, u kterých se ozáření postupně zvyšovala (z počátečních $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ až na konečných $485 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a zároveň se posouvají v grafu tím níž, čím rostly kratší dobu. To odpovídá faktu, že diskriminace těžšího izotopu uhlíku je u slunných listů obecně menší, než u listů stinných, protože intenzita fotosyntézy u slunných listů stoupá

a snižuje tak poměr c_i/c_a (poměr koncentrace CO_2 v podprůduchové dutině ke koncentraci CO_2 v okolní atmosféře) (Duursma, Marshall, 2006).

Nedá se tedy říct, že každá část listu, která se růstem postupně posouvá směrem od báze, se už dál nemění a nevyvíjí. Izotopový signál již fixovaného uhlíku se během růstu „ředí“ signálem odpovídajícím stávající atmosféře. Buňky listového meristému se sice dělí a vznikají nové stále jen u báze, ale po celé délce se list ještě rozšiřuje a prodlužuje a v celém listu neustále probíhá fotosyntéza, při které se tvoří rozpustné cukry, které také mohou ovlivnit izotopový signál listu. Tomu odpovídá i fakt, že kontrola vykazuje stejné výsledky jako listy, které měly stejnou ozářenost jako kontrola pouze poslední den.

7. Závěr

Výsledky pokusu, při kterém jsem testovala vliv snížené koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře ve dne nebo v noci na vývoj průduchů na listu řeřichy seté naznačují, že pokud se koncentrace sníží pouze v noci, hustota průduchů se mírně zvyšuje. Pokud se koncentrace CO₂ sníží pouze ve dne, hustota průduchů na listu klesne. To je překvapivé a nové zjištění vzhledem k původní hypotéze, že o vývoji průduchů rozhoduje výhradně denní vnitřní listová koncentrace CO₂.

Ve druhém pokusu jsem testovala vliv zvyšující se ozářenosti na vývoj průduchů na listu ječmene setého. Zjistila jsem, že pokud se ozářenost mění v rámci jednoho listu, nelze tyto podmínky zpětně „vyčíst“ z hustoty průduchů na listu, ani z hodnot diskriminace ¹³C.

8. Použitá literatura

- ACHARYA, B. R., ASSMANN, S. M. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology*, 2009, vol. 69, p. 451–462.
- BEERLING, D. J., WOODWARD, F. I. Leaf stable carbon-isotope composition records increased water-use efficiency of C-3 plants in response to atmospheric CO₂ enrichment. *Functional Ecology*, 1995, vol. 9, no. 3, p. 394–401.
- BERGMANN, D. Stomatal development: from neighborly to global communication. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, vol. 9, p. 478–483.
- BIRD, S. M., GRAY, J. E. Signals from cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytologist.*, 2003, vol. 157, p. 9–23.
- BRIGHT, J., DESIKAN, R., HANCOCK, J. T., WEIR, I. S., NEILL, S. J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal*, 2006, vol. 45, p. 113–122.
- BROWNLEE, C. The long and the short of stomatal density signals. *Trends in Plant Science*, 2001, vol. 6, no. 10, p. 441–442.
- CASSON, S. A., FRANKLIN, K. A. et al. Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. *Current Biology*, 2009, vol. 19, p. 229–234.
- CASSON, S. A., HETHERINGTON, A. M. Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, vol. 13, p. 90–95.
- CASSON, S., GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, 2008, vol. 178, p. 9–23.
- CLIFFORD, S. C. et al. Effect of elevated atmospheric CO₂ and drought on stomatal frequency in groundnut (*Arachis Hypogea*). *Journal of experimental botany*, 1995, vol. 288, p. 847–852.
- COURSOL, S., FAN, L. M., LE STUNFF, H., SPIEGEL, S., GILROY, S., ASSMANN, S. M. Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, 2003, vol. 423, p. 651–654.
- DESIKAN, R. Sniffing stomata?. *New phytologist*, 2010, vol. 188, p. 910–913.

- DUURSMA, R. A., MARSHALL, J. D. Vertical canopy gradients in $\delta^{13}\text{C}$ correspond with leaf nitrogen content in a mixed-species conifer forest. 2006, vol. 20, p. 496–506.
- ECKERT, M., KALDENHOFF, R. Light-induced stomatal movement of selected Arabidops. *Journal of Experimental Botany*, 2000, vol. 51, no. 349, p. 1435–1442.
- FARQUHAR, G. D.; Von CAEMMERER, S.; BERRY, J. A. A Biochemical Model of Photosynthetic CO_2 Assimilation in Leaves of C_3 species. *Planta* **1980**, 149, 78–90.
- GAN, Y.; SHEN, Z. J.; SHEN, Z. X.; ZHANG, Y.; WANG, G. Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants. *Botanical Studies* **2010**, 51, 325–336.
- GRAY, J. E., et al. The HIC signalling pathway links CO_2 perception to stomatal development.. *Nature*, 2000, vol. 408, p. 713–716.
- HASHIMOTO, M. et al. Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO_2 . *Nature Cell Biology*, 2006, vol. 8, no. 4, p. 391–397.
- HUMBLE, G. D., RASCHKE, K. Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. Evidence from electron probe analysis. *Plant Physiology*, 1971, vol. 48, p. 294–302.
- HWANG, J. U., LEE, Y. Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology*, 2001, vol. 125, p. 2120–2128.
- CHAVES, M. M. et al. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 2002, vol. 89, p. 907–916.
- IRVING, H. R. et al. Changes in cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology*, 1992, vol. 89, p. 1790–1794.
- ISRAELSSON, M.; SIEGEL, R. S.; YOUNG, J.; HASHIMOTO, M.; IBA, K.; SCHROEDER, J. I. Guard cell ABA and CO_2 signaling network updates and Ca^{2+} sensor priming hypothesis. *Current Opinion in Plant Biology* **2006**, 9, 654–663.

- KANG, C. Y. et al. Cryptochromes, Phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2009, , no. 21, p. 2624–2641.
- LAKE, J. A. et al. Plant development. Signals from mature to new leaves. *Nature*, 2001, vol. 411, p. 154.
- LARKIN, J. C., MARKS, M. D., NADEAU, J., SACK, F. Epidermal cell fate and patterning in leaves. *The Plant Cell*, 1997, vol. 9, p. 1109–1120.
- LAWSON, T. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist*, 2008, vol. 181, p. 13–34.
- LI, A.; ASSMANN, S. M.; ALBERT, R. Predicting essential components of signal transduction networks a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS Biology* **2006**, 4, e312.
- McKEE, I. F., FARAGE, P. K., LONG, S. P. The interactive effects of elevated CO₂ and O₃ concentration on photosynthesis in spring wheat. *Photosynth. Res.*, 1995, vol. 45, p. 111–119.
- MELOTTO, M. et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, 2006, vol. 126, p. 969–980.
- MIYAZAWA, S., LIVINGSTON, N. J. et al. Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*). *Journal of Experimental Botany*, 2006, vol. 57, no. 2, p. 373–380.
- MONTE, E., AL-SADY, B., LEIVAR, P., QUAIL, P. Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2007, , no. 58, p. 3125–3133.
- PEI, Z. M. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 2000, vol. 406, p. 731–734.
- PETERSON, K. M., RYCHEL, A. L., TORII, K. U. Out of the mouths of plants: The molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *The Plant Cell*, 2010, vol. 22, p. 296–306.

- POOLE, I., LAWSON, T., WEYERS, J. D. B., RAVEN, J. A. Effect of elevated CO₂ on the stomatal distribution and leaf physiology of *Alnus glutinosa*. *New Phytologist*, 2000, vol. 145, p. 511–521.
- PROCHÁZKA, S. et al. *Fyziologie rostlin*. 1st ed. Praha: Academia, 1998.
- REYNOLDS-HENNE, Ch. E.; LANGENEGGER, A.; MANI, J.; SCHENK, N. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany* **2010**, 68, 37–43.
- SALISBURY, E. J. On the causes and ecological significance of stomatal frequency, with special reference to the woodland flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1928, 216 B, 1-65.
- SERNA, L., FENOLL, C. Stomatal development and patterning in Arabidopsis leaves. *Physiologia Plantarum*, 2000, vol. 109, p. 351–358.
- SCHOCH, P. G., ZINSOU, C., SIBI, M. Dependence of the Stomatal Index on Environmental Factors during Stomatal Differentiation in Leaves of *Vigna sinensis* L.. *Journal of Experimental Botany*, 1980, vol. 31, no. 124, p. 1211–1216.
- THOMAS, P. W. F., WOODWARD, F. I., QUICK, W. P. Systemic irradiance signalling in tobacco. *New phytologist*, 2003, vol. 161, p. 193–198.
- TICHÁ, L. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. 7. Stomata density and sizes. *Photosynthetica*, 1982, no. 16, p. 375–471.
- TORII, K. Stomatal patterning and differentiation: Emerging role of cell-cell signaling. *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, 2006, vol. 51, no. 2, p. 145–154.
- VOGEL, J. C. *Fractionation of the carbon isotopes during photosynthesis*. Springer-Verlag, 1980.
- VON GROLL, U., ALTMANN, T. Stomatal cell biology. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, vol. 4, p. 555–560.
- WAGNER, F., BELOW, R., DEKLERK, P. et al. A natural experiment on plant acclimation: Lifetime stomatal frequency response of an individual tree to annual atmospheric CO₂ increase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, vol. 93, no. 21, p. 11705–11708.

WILKINSON, S., DAVIES, W. J. ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*, 2002, vol. 25, p. 195–210.

WILLMER, C., FRICKER, M. *Stomata*. 2nd ed. London: Chapman&Hall, 1996. ISBN 0 412 57430 6.

WOODWARD, F. I., KELLY, C. K. The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytologist*, 1995, vol. 131, p. 311–327.

WOODWARD, F. I., LAKE, J. A., QUICK, W. P. Stomatal development and CO₂: ecological consequences. *New Phytologist*, 2002, vol. 153, p. 477–484.

WOODWARD, F.I. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre industrial levels. *Nature*, 1987, vol. 327, p. 617-618.