

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

# **Diplomová práce**

**2014**

**Bc. Markéta Aubrechtová**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Vývoj průduchů: vliv spektrálního složení, ozáření a  
koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř listu**

Diplomová práce

**Bc. Markéta Aubrechtová**

Školitel: Doc. Ing. Jiří Šantrůček, CSc.

České Budějovice 2014

Aubrechtová, M., 2014: Vývoj průduchů: vliv spektrálního složení, ozářenosti a koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř listu. [Development of stomata: the influence of the spectral composition, irradiance and leaf internal CO<sub>2</sub> concentration. Mgr. Thesis, in Czech] – 52p, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

The effect of irradiance by „monochromatic“ red and blue light on stomatal density (SD), pavement cell density (PCD) and stomatal index (SI), was studied using garden cress *Lepidium sativum* L. (Brassicaceae) as a model plant. The influence of leaf internal CO<sub>2</sub> concentration (C<sub>i</sub>) on the epidermal cell development was also studied. C<sub>i</sub> was manipulated by variation of irradiance and inferred from carbon isotopes discrimination.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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.

## **Poděkování**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, CSc. za jeho bezmeznou trpělivost, vstřícnost a velmi cenné odborné rady. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Láďovi Markovi za provádění izotopových analýz a podporu, Mgr. Martině Drtinové za její pomoc a zaškolení se všemi potřebnými přístroji. Velké poděkování patří i MSc. Pavlovi Matosovi za jeho rady při vyhodnocování grafů a trpělivost. V neposlední řadě také Ing. Martinovi Janouchovi za technické a grafické úpravy. Děkuji samozřejmě i celé své rodině, bez jejichž podpory bych se neobešla.

# Obsah

1	Úvod a cíle práce .....	1
2	Teoretická část.....	3
2.1	Struktura a funkce průduchů.....	3
2.2	Zastoupení průduchů u různých skupin rostlin.....	4
2.3	Anatomie a funkce průduchů.....	5
2.4	Rozmístění průduchů (angl. stomatal pattern).....	6
2.5	Vývoj průduchů .....	7
2.6	Molekulární podstata vývoje průduchů .....	9
2.7	Vliv vnějších faktorů na vývoj průduchů .....	11
2.7.1	Vliv koncentrace CO <sub>2</sub> na vývoj průduchů.....	12
2.7.2	Vliv ozáření na vývoj průduchů.....	14
2.8	Signály .....	17
2.9	Kaskáda senzorickeho přenosu modrého světla vedoucí k otevření průduchů.....	17
3	Materiál a metody.....	19
3.1	Materiál.....	19
3.2	Kultivace rostlin.....	19
3.2.1	Založení experimentu .....	19
3.2.2	Světelné, teplotní a atmosférické podmínky kultivace.....	20
3.3	Odběr a následné vyhodnocení otisků průduchů .....	23
3.4	Analýza stabilních izotopů uhlíku .....	23
4	Výsledky.....	26
4.1	Charakteristika růstu a alokace asimilátů .....	26
4.1.1	Závislost produkce suché hmoty na ozáření .....	26
4.1.2	Závislost poměru hmotnost kořen/prýt na ozáření.....	28

4.1.3	Závislost transpiračního poměru (spotřebovaná voda/vyprodukovaná sušina) na ozáření.....	28
4.2	Závislost SD, PCD a SI pravých listů na ozáření.....	29
4.2.1	Vliv ozáření na SD a PCD .....	29
4.2.2	Vliv ozáření na SI u pravých listů.....	32
4.3	Závislost SD, PCD a SI dělohy na ozáření .....	34
4.3.1	Vliv ozáření na SD a PCD u děloh .....	34
4.3.2	Vliv ozáření na SI děloh .....	36
4.4	Závislost SD, PCD a SI pravých listů na koncentraci CO <sub>2</sub> uvnitř listu (C <sub>i</sub> ).....	38
4.4.1	Vliv vnitřní koncentrace C <sub>i</sub> na SD a PCD u pravých listů .....	39
4.4.2	Účinek koncentrace C <sub>i</sub> na SI pravých listů .....	40
5	Diskuze .....	42
5.1	Charakterizace růstu rostlin na monochromatickém světle .....	42
5.2	Charakteristiky vývoje průduchů na pravých listech a dělohách při pěstování v monochromatickém světle: 1. efekt ozáření .....	43
5.3	Charakteristiky vývoje průduchů na pravých listech a dělohách při pěstování v monochromatickém světle: 2. efekt koncentrace CO <sub>2</sub> uvnitř listu .....	44
6	Závěr.....	46
7	Seznam citované literatury .....	47

# 1 Úvod a cíle práce

Vývoj listu všech suchozemských rostlin je doprovázen vývojem průduchů. Výsledkem je pokožka dospělého listu s určitou četností výskytu dvojic specializovaných tzv. svěracích buněk tvořících průduch a četností ostatních, tzv. dlaždicových buněk. Více než 50 let je z experimentů známo, že počet průduchů na jednotce plochy listu (hustota průduchů) a jejich velikost je ovlivňována koncentrací  $\text{CO}_2$  v atmosféře okolo listu. Koncem 80-tých let se navíc zjistilo, že zmíněný vztah platí i pro volně v přírodě rostoucí rostliny a začal být využíván jako alternativní způsob rekonstrukce paleokoncentrace  $\text{CO}_2$ . Z hlediska fyziologie funkce průduchů má ale zmíněný přístup slabiny. Např. není pravděpodobné, že by vyvíjející se list reagoval na vnější atmosférickou koncentraci  $\text{CO}_2$  za situace, kdy jsou listová primordia „izolována“ od volné atmosféry rychle rostoucími tkáněmi a orgány produkujícími velké množství respiračního  $\text{CO}_2$ . Tuto slabinu odstranilo překvapivé zjištění, že signál o  $\text{CO}_2$  v atmosféře se transportuje z dospělých listů do mladých primordií. Látková podstata ani mechanismus percepce  $\text{CO}_2$  signálu ale dosud nejsou známy. Není ani jasná odpověď na otázku jaký mechanismus se bude uplatňovat při vývoji průduchů na prvních asimilačních orgánech rostliny, na dělohách. Předchozí experimenty prováděné v laboratoři školitele naznačily, že četnost a velikost průduchů spíše než na vnější atmosférické koncentraci  $\text{CO}_2$  závisí na koncentraci  $\text{CO}_2$  uvnitř listu: při stálé atmosférické koncentraci  $\text{CO}_2$  a proměnné vnitřní listové koncentraci byla zachována  $\text{CO}_2$  závislost hustoty průduchů. Koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř listu se přitom měnila nejčastěji pomocí změn v ozáření listu v oblasti PAR, a tedy rychlostí fotosyntetické fixace  $\text{CO}_2$ . Výsledky tedy napovídaly, že vývoj průduchů je prostřednictvím koncentrace  $\text{CO}_2$  uvnitř buněk spřažen s rychlostí fotosyntézy. Protože se ale k emisi fotonů v experimentech používaly zdroje s více-méně spojeným nebo polychromatickým spektrem, nelze vyloučit ani možnost účasti nechlorofylových receptorů.

Tuto práci jsem vypracovala jako pokračování výše zmíněných experimentů a jejími hlavními cíli bylo:

1. Zjistit zda vývoj průduchů závisí spíše na kvantitě světla (hodnotě ozáření), nebo na světelné kvalitě (vlnové délce).
2. Pokud se prokáže vliv kvality světla (chromatičnosti) pokusím se rozlišit její účinek na hustotu průduchů u pravých a děložních listů.
3. Testovat hypotézu, že děložní listy, jakožto první asimilační orgán rostliny, nereagují ve vývoji průduchů na změny ve vnitřní listové koncentraci  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) na rozdíl od pravých listů.

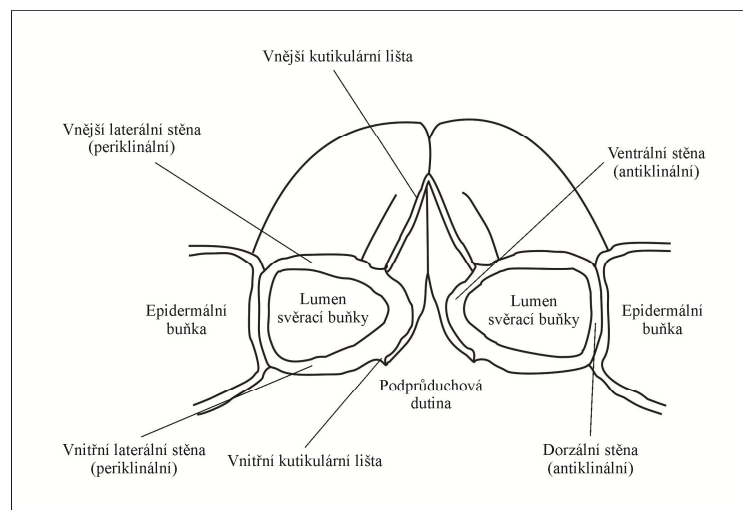


## 2 Teoretická část

### 2.1 Struktura a funkce průduchů

Kolonizace souše rostlinami byla provázena vývojem nových strategií k získání a zadržení vody. Vyvinul se kořenový a cévní systém. Na povrchu, vzduchu exponovaných orgánů jako např. listů, došlo k syntéze vosků a vodě-nepropustné kutikuly. Ta neslouží pouze jako prevence před ztrátou vody, ale také jako bariéra vstupu nejrůznějších látek a mikroorganismů z atmosféry (Kerstiens, 1996). Snížení permeability (tj. propustnosti) povrchu listů pro vodu ale zároveň snížilo příjem oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) jako substrátu pro fotosyntetickou asimilaci uhlíku. K udržení rovnováhy mezi dostatečným příjmem uhlíku z atmosféry a přijatelnou ztrátou vody do atmosféry přispěl zásadním způsobem vývoj průduchů, (angl. *stomat*). Prostřednictvím průduchů dochází k výměně plynů (hlavně oxidu uhličitého, vodní páry, částečně i kyslíku, dalších složek atmosféry a volatilních produktů metabolismu) mezi rostlinou a okolní atmosférou. Vstup CO<sub>2</sub> skrz průduchy je důležitý pro fotosyntézu a výstup vodní páry je často prezentován jen jako nevyhnutelný doprovodný jev. Výpar vody z listů (transpirace) s sebou ale přináší i dvě velice důležité funkce. Transpirace umožňuje ochlazování povrchu listu a výpar ze submikroskopických interfibrilárních pórů stěn mezofylových buněk pohání transpirační tok, který je stěžejní pro distribuci vody a rozpuštěných látek v rostlině (MacAlister & Bergmann, 2007).

Průduchy se obvykle nacházejí na spodní (abaxiální) zastíněné straně listu. U rostlin, které mají průduchy pouze na spodní straně listu (tzv. hypostomatické listy) je horní (adaxiální) povrch pokryt celistvou kutikulou. U listových povrchů, které obsahují stomata, kutikula pokrývá vnější stěny epidermálních buněk, periklinální stěny svěracích buněk, rozšiřuje se dolů k ventrálním stěnám a lemuje průduchovou a podprůduchovou dutinu (viz. Obr. 1) (Appleby & Davies, 1983b; Jeffrey, Osborn, & Taylor, 1990; Pesacreta & Hasenstein, 1999; Wullschleger & Oosterhuis, 1989).



Obrázek 1: Příčný řez typickým průduchem znázorňující polohu svěracích buněk k epidermálním nebo podpůrným buňkám a rozdílnou tloušťku stěn svěracích buněk. Převzato a upraveno z (Colin & Fricker, n.d.).

Za příznivých vnějších podmínek se uskutečňuje přes průduchy 94-99,7 % výměny všech plynů (Körner, 1994). Avšak při stresu suchem když jsou průduchy uzavřeny, přežití rostlin závisí na transportních vlastnostech kutikuly, které účinně omezují ztrátu vody. Kutikula rostlinných druhů adaptovaných na suchá stanoviště má o řád až dva nižší propustnost pro vodu než kutikula mezofytů z vlhčích klimatických podmínek (Schreiber & Riederer, 1996). Přímá odpověď průduchů na vzdušnou vlhkost předpokládá vyšší propustnost kutikuly pokrývající stěny svěracích buněk a průduchové dutiny (Appleby & Davies, 1983a, 1983b).

## 2.2 Zastoupení průduchů u různých skupin rostlin

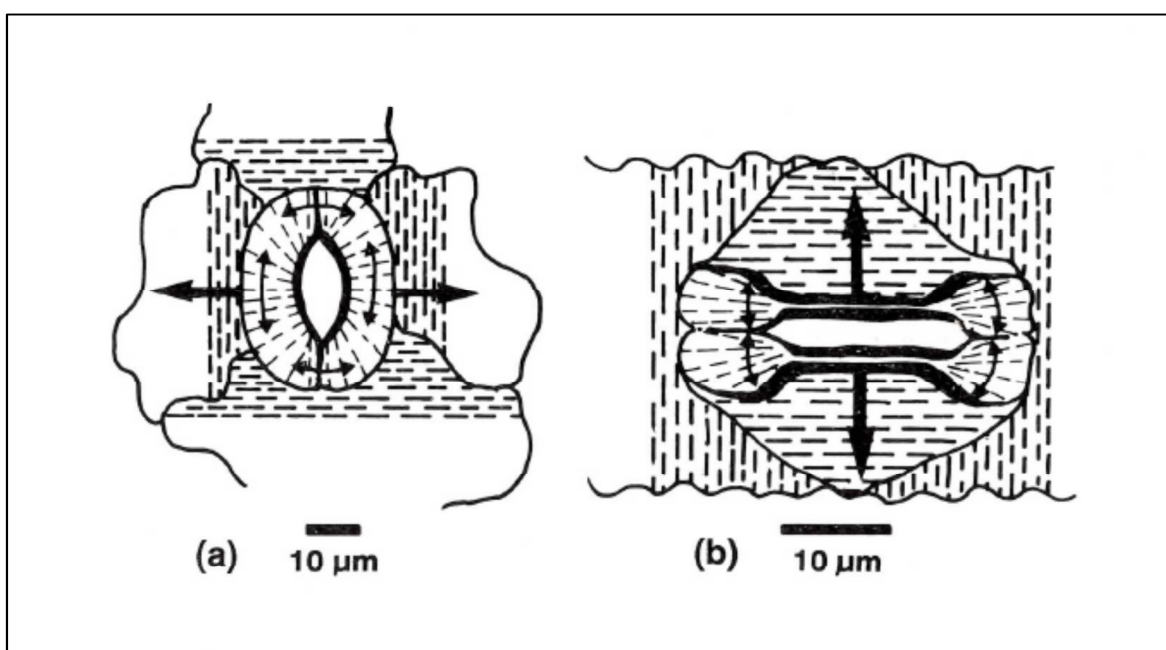
Průduchy jsou struktury, známé z fosilních nálezů 400 milionů let starých vyskytující se napříč celým systémem suchozemských rostlin (Edwards, Kerp, & Hass, 1998). Zachování si těchto struktur během celého evolučního vývoje svědčí o jejich významnosti. Kromě játrovek (*Marchantiophyta*), které jako jediné průduchy postrádají, je můžeme najít u relativně primitivních mechů (*Bryophyta*) či hlevíků (*Anthocerotopsida*) až po semenné rostliny (*Spermatophyta*). U některých skupin rostlin došlo k sekundární ztrátě průduchů u druhů rostoucích na trvale vlhkých stanovištích či ponořených ve vodě.

U druhů, které mají průduchy, je nacházíme pouze na epidermálních povrchích přímo vystavených okolní atmosféře. Proto je nenacházíme na kořenech, potopených listech vodních rostlin, ani na hlízách (MacAlister & Bergmann, 2007).

## 2.3 Anatomie a funkce průduchů

Nejjednodušší průduch se skládá z průduchové štěrbině obklopené dvěma epidermálními svěřacími buňkami, které regulují otevírání a zavírání póru v závislosti na vnějších (environmentálních) a vnitřních signálech, včetně světla, koncentrace CO<sub>2</sub> a fytohormonů (Assmann & Wang, 2001; Kang, Lian, Wang, Huang, & Yang, 2009; Schroeder, Allen, Hugouvieux, Kwak, & Waner, 2001).

Dospělé svěřací buňky (SB) jsou odlišné tvarem (ledvinovitě, nebo činkovitě) s odlišným zesílením stěny (viz. Obr. 2). SB vznikají dělením mateřské svěřací buňky (ang. Guard Mother Cell, GMC).



Obrázek 2: Schémata ledvinovitých (a) a činkovitých (b) svěřacích buněk s vyznačeným zesílením stěn a s přerušovanými čarami, naznačujícími orientaci mikrofibril. Šipky poukazují na směr expanze a pohybu SB při otevírání průduchů. Převzato z (Weyers & Meidner, 1990).

U některých rostlin jsou průduchy funkčně spojené s podpůrnými specializovanými epidermálními buňkami (Angl. Subsidiary cells), sousedícími s buňkami svěřacími a tvořícími s nimi tzv. průduchový komplex. Svěřací buňky jsou vysoce specializované, co se týče morfologie a metabolismu. U dvouděložných rostlin mají ledvinovitý tvar a jejich cytoskelet a buněčné stěny jsou polarizované. Organizované paprsky mikrotubulů a mikrofibril vycházejí z ventrální stěny průduchu (tj. obrácené směrem ke štěrbině, viz obr.

1). Tato stěna je také signifikantně silnější a tužší než stěna dorzální (tj. obrácená směrem k epidermální buňce, viz. Obr. 1). Svěrací buňky nejsou součástí kontinua symplastu v listu a rostlině (tj. chybějí jim plasmodesmata spojující je s ostatními buňkami).

Tyto strukturní modifikace jsou významné pro funkci SB, jakožto turgorem řízeného „ventilu“. Průduchy se díky tomuto systému mohou otevírat a zavírat a tím aktivně reagovat na podněty vnějšího prostředí jako je například světlo nebo sucho. Dnes se v základních rysech zná mechanismus otevírání a zavírání průduchů na subbuněčné úrovni. Světlo stimuluje transport protonů ven ze svěracích buněk, což vyžaduje aktivní adenosin trifosfatázu (ATPázu). Nově vzniklý gradient náboje přes membránu stimuluje otevření draselných ( $K^+$ ) kanálů pro tok  $K^+$  iontů dovnitř buněk a vysoká koncentrace  $K^+$  iontů ve SB vede k přítoku vody z okolních epidermálních buněk. Vysoký osmotický tlak vytvořený uvnitř SB zapříčiní rozšíření (expanzi) buňky. Jelikož je buněčná stěna směřující do průduchové štěrbině zesílená, dochází primárně k expanzi tenčí vnější stěny SB, která tvaruje ventrální stěny do tvaru půlměsíce a tím otevře průduch. Jakmile SB ztratí turgor, elastické vnitřní stěny zaujmou svůj původní tvar a průduch se zavře (MacAlister & Bergmann, 2007).

Podobně jako funkce, i vývoj průduchů v ontogenezi rostliny a listu je komplexní a je ovlivněn jak environmentálními faktory (kvalita i kvantita světla, koncentrace  $CO_2$ ), tak geneticky založenými vývojovými programy (Gray et al., 2000; Hetherington & Woodward, 2003; Lake, Quick, Beerling, & Woodward, 2001).

## **2.4 Rozmístění průduchů (angl. stomatal pattern)**

Přestože nemůžeme u dvouděložných rostlin stanovit přesný model rozmístění průduchů, můžeme říci, že jejich výskyt není náhodný. Nejvíce studií na toto téma bylo prováděno na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Dva blízké průduchy se jen velmi vzácně nacházejí v přímém kontaktu (signifikantně méně častěji než by vyžadovalo čistě náhodné rozmístění) (Larkin, Marks, Nadeau, & Sack, 1997) a namísto toho jsou oddělené alespoň jednou epidermální buňkou. Tento model rozmístění průduchů byl popsán jako „pravidlo jedné vymezené buňky“, neboli „one cell spacing rule“ (Geisler, Nadeau, & Sack, 2000; T. Sachs, 1991). Takové rozmístění umožňuje, aby co nejmenší počet průduchů zajistil co nejefektivnější výměnu plynů, tedy aby se pomyslné objemy vzduchu (a izočáry koncentrací vody a  $CO_2$ ) pro sousedící průduchy nepřekrývaly (Bird & Gray, 2003).

Průduchy obvykle chybí kolem žil cévních svazků a u některých rostlin se nevytvářejí ani nad místy s různými speciálními buňkami mezofylu (J Croxdale, Smith, Yandell, & Johnson, 1992; Larkin et al., 1997; Rasmussen, 1986). Podle práce (Serna, Torres-Contreras, & Fenoll, 2002) se většina stomat u *Arabidopsis thaliana* nachází nad místem, kde se setkává několik mezofylových buněk (nad tzv. „uzlem“) a jen 10 % meristemoidů (buněčných primordií budoucích průduchů) a 6 % dospělých stomat je umístěno pouze nad jednou mezofylovou buňkou. Avšak známy jsou i mutanti, kteří mají zmíněné pravidlo porušené a vytvářejí shluky (klastry) průduchů (např. *tmm*, *sdd*, *flp*; viz. popsáno níže).

## 2.5 Vývoj průduchů

Ke vzniku průduchů dochází časově až po dalších specializovaných epidermálních buňkách, jako jsou trichomy („chlupy“). SB se vyvíjejí podle režimu růstu orgánů, který je v listech nižších cévnatých rostlin, nahosemenných rostlin a jednoděložných rostlin polarizovaný a u dvouděložných rostlin mozaikový.

Pojmem průduch nazýváme jeden pár svěracích buněk a pór mezi nimi, zatímco průduchový (stomatální) komplex zahrnuje i epidermální buňky funkčně spojené s buňkami svěracími. Tyto buňky se nazývají buňkami přídatnými. Odlišují se od ostatních epidermálních (tzv. dlaždicových) buněk velikostí, tvarem a jsou pravidelně umístěny kolem průduchu. Sdílejí mechanickou vazbu s buňkami svěracími, a jakmile dojde k poškození jedné buňky, další typ buňky se rozprostře do nově vzniklého prostoru. K takovému propojení nedochází mezi epidermálními buňkami, ani epidermální a přídatnou buňkou (MacAlister & Bergmann, 2007).

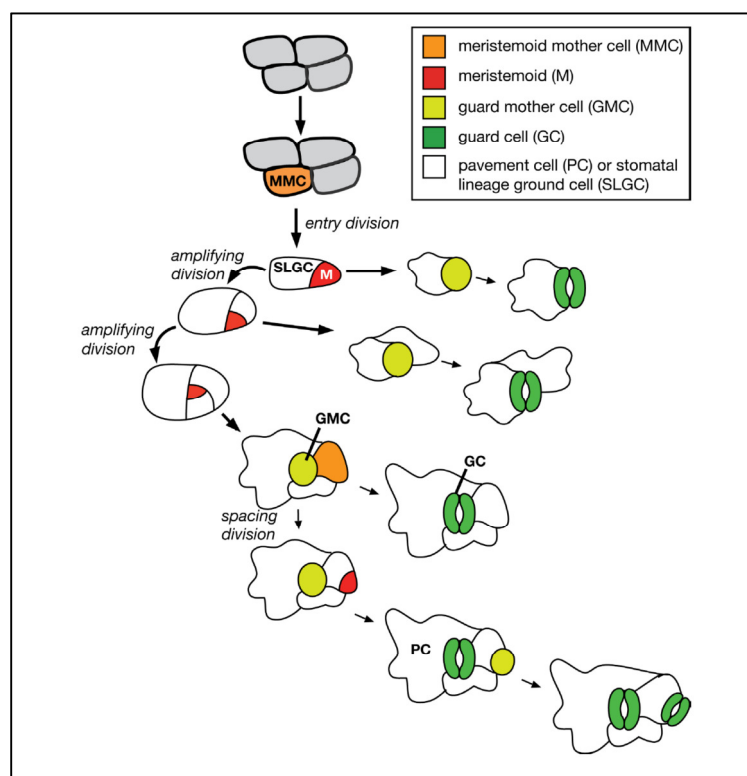
Průduchy vznikají ve specializované epidermální vývojové linii, ve které dochází k několika po sobě následujícím buněčným dělením a každé mezistádium prokazuje změny v morfologii buňky a v lokalizaci proteinů (Dong, MacAlister, & Bergmann, 2009; Zhao & Sack, 1999). Sled buněčných dělení při vývoji průduchu ukazuje schéma na obr. 3, (viz. níže). Pomocí mechanismu, který není stále zcela objasněn, se podmnožina protodermálních buněk stává tzv. mateřskými meristemoidními buňkami, (ang. meristemoid mother cells, MMC), které „vstupním“ asymetrickým dělením vytvářejí malou trojúhelníkovitou buňku nazývanou meristemoid a větší sesterskou buňku nazývanou stomatal-lineage ground cell (SLGC).

SLGC se může finálně diferenciovat v buňku dlaždicovou, neboli pavement cell (PC), popřípadě se asymetricky dělit za vzniku satelitního meristemoidu umístěného vzdáleně od existujícího primárního meristemoidu nebo průduchu (Pillitteri & Dong, 2013).

Povaha dělení MMC je závislá na sousedních buňkách. Pokud MMC nesousedí s žádným již existujícím stomatem či prekurzorem, plán dělení (tj. určení která část buněk se stane meristemoidem) je vybírán zcela náhodně. Avšak pokud MMC těsně sousedí se dvěma či více stomaty (nebo jejich prekurzory, tj. meristemoidy nebo mateřskou svěrací buňkou, GMC) dochází k inhibici dělení a MMC se nemohou vyvíjet stomatální vývojovou cestou (MacAlister & Bergmann, 2007). Pokud dvě sousední MMC buňky vytvoří meristemoidy v bezprostředním kontaktu, dojde k pozdější opravě, kdy se jeden z meristemoidů prostorově oddělí od výchozí vývojové linie (Geisler et al., 2000; Hara et al., 2009; Hara, Kajita, Torii, Bergmann, & Kakimoto, 2007; Tsvi Sachs, 1991).

Všechny meristemoidy (primární i satelitní) mají charakter kmenových buněk. Dělení meristemoidu je nazýváno tzv. amplifikačním dělením a může proběhnout více jak čtyřikrát po sobě (Pillitteri & Dong, 2013). Počet dělení meristemoidu závisí jednak na vývojové informaci (specifickém orgánu a věku rostliny, tak na environmentálních podnětech; (MacAlister & Bergmann, 2007). Při každém dělení vzniká jeden meristemoid a zvyšuje se, neboli amplifikuje celkový počet SLGC produkovaných jednotlivou vývojovou linií. Celkově lze říci, že asymetrické dělení meristemoidů je zodpovědné za produkci většiny buněk utvářejících povrch listu. Zhruba polovina dlaždicových buněk a tři čtvrtiny celkového počtu epidermálních buněk mají svůj původ v meristemoidech (MacAlister & Bergmann, 2007).

Konečná přeměna meristemoidu na mateřskou svěrací buňku (GMC) je provázena výraznými změnami tvaru buněk a kapacitou buněčného dělení. GMC je v epidermis jednoduše rozpoznatelná svým oválným tvarem, odrážejícím konečný vzhled svěracích buněk. Mateřská svěrací buňka (GMC) se symetricky rozdělí na dvě buňky, ze kterých se nakonec vytvářejí diferenciované svěrací buňky SB (angl. guard cells, GC). Protože finální dělení vedoucí k produkci svěracích buněk je symetrické, obě dceřinné buňky jsou totožné svou velikostí a následným vývojem. Avšak asymetrické dělení hraje v dřívějších stádiích stomatálního vývoje klíčovou roli. Rozmístění stomat v prostoru kontroluje signální dráha a mezibuněčná komunikace zajišťující vymezení alespoň jedné epidermální buňky mezi dvě průduchové buňky (Geisler et al., 2000; Hara et al., 2009, 2007).



Obrázek 3: Diagram vývoje průduchů u *Arabidopsis*. Protodermální buňky jsou vyznačeny šedě, mateřské meristemoidní b. (MMC) oranžově, meristemoid červeně, mateřská svěrací b. (GMC) žlutě a svěrací buňky (GC) zeleně. Převzato z (Pillitteri & Dong, 2013).

## 2.6 Molekulární podstata vývoje průduchů

Správné rozmístování průduchů zajišťuje velké množství genů. Řada z nich byla objevena sledováním mutantů, které mají některou fázi normálního vývoje zablockovanou. Ze zatím známých genů mají největší vliv na regulaci tvorby průduchů geny: *TOO MANY MOUTHS* (*TMM*), *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1* (*SSD1*), *YODA*, *ERECTA* (*ER*) a *ERECTA-LIKE* (*ERL1* a *ERL2*).

Mutace v genu *TOO MANY MOUTHS* (*TMM*) způsobuje u děložních i pravých listů nárůst hustoty průduchů a jejich seskupení do velkých klastrů. Oproti divokému typu dochází u mutantních rostlin asymetrickým dělením k náhodnému rozmístění satelitních meristemoidů a buňky sousedící se dvěma buňkami stomatálními či prekurzory nejsou inhibovány ke vstupu do stomatální vývojové linie. Finální stádium stomatální vývojové cesty - přeměna z GMC na svěrací buňky průduchu – není ovlivněna a jsou vytvářeny funkční párové svěrací buňky (MacAlister & Bergmann, 2007). Efekt *TMM* se však výrazně liší v závislosti na typu

orgánu. 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 ružici. Ostatní části rostliny (lodyha, adaxiální epidermis kališních listů a vrchol šešule) postrádají průduchy i meristemoidy, přestože se u divokých typů rostliny na těchto částech vyskytují (Geisler et al., 2000; Larkin et al., 1997). *TMM* kóduje receptoru podobný protein s extracelulární doménou deseti repetitivních bohatých na leucin (leucine-rich-repeat -LLR) a transmembránový region (MacAlister & Bergmann, 2007; Shpak, McAbee, Pillitteri, & Torii, 2005). Nepřítomnost cytoplasmatické domény u *TMM* naznačuje, že uvolnění signálu do cytoplasmy a ovlivnění dělení buněk závisí na účasti minimálně jednoho dalšího proteinu, se kterým by mohl interagovat.

Nedávné objevení klastrování průduchů a defekt nadměrné proliferace u trojitých mutantů *erecta* (*er*) a genů *erecta-like* (*erl1* a *erl2*) naznačují, že tyto geny mohou hrát významnou roli jakožto partneři pro *TMM* (Shpak et al., 2005). Tyto proteiny se skládají nejen z extracelulární LRR domény, ale obsahují navíc ještě cytoplasmatickou katalytickou kinázovou doménu. Kombinací mutací *TMM* a dalších členů *ER* rodiny byla odhalena komplexní síť genetických interakcí. Funkce genu *ERECTA* není limitována pouze na efekt rozmístění průduchů, ale má také velký vliv na růst a vývoj rostliny a její reakci na biotický a abiotický stres. Jeho mutanti se projevují nárůstem počtu průduchů ve všech orgánech (Bergmann & Sack, 2007; Shpak et al., 2005).

Další gen podílející se na rozmístění průduchů je gen *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1* (*SDD1*). Mutantní rostliny *sdd1* taktéž zapřičiňují vstup většího množství buněk do stomatální vývojové linie, ale jejich fenotyp není totožný s mutanty *tmm*. *sdd1* mutanti zvyšují hustotu průduchů ve všech orgánech produkujících průduchy a defekt v rozmístění se projevuje primárně jako „zdvojení“ průduchů, nežli shlukování do velkých klastrů, jako je pozorováno u mutantů *tmm*, nebo *er*, *erl1* či *erl2* (MacAlister & Bergmann, 2007).

Asymetrické dělení meristemoidu negativně reguluje kinázová kaskáda MAPKKK a transkripční faktor *YODA*. Fenotyp *yoda* mutantů je podobný jako u *er*, *erl1*, *erl2* mutantů a zahrnuje redukci celkové výšky rostliny, zkrácení internodií a zvětšenou produkci svěřacích buněk (Bergmann & Sack, 2007).

Finální přeměna ve vývoji průduchů (tj. konverze z GMC na pár funkčních svěřacích buněk prostřednictvím symetrického dělení) je kontrolována trojicí transkripčních faktorů. *FOUR*



LIPS (FLP), MYB88 a helix loop helix (bHLH). Dva myb-type transkripční faktory, kooperativně fungující při regulaci počtu dělení GMC. U *flp* mutantních rostlin následují na rozdíl od divokého typu dvě dělení, což dává vznik průduchu s buňkami navíc. Název ‚four lips‘ neboli ‚čtyři pysky‘ odkazuje na nejběžnější fenotyp vyskytující se u těchto mutantů – stomata obklopené čtyřmi přilehlými svěřacími buňkami. Toto se stává zhruba u 20 % buněk (Lai et al., 2005). Třetím transkripčním faktorem vyžadovaným k přeměně GMC na svěřací buňky je basic helix loop helix (bHLH) obsahující protein FAMA. Na rozdíl od *flp* nebo *flp;myb88*, *fama* klastry nemají charakteristiky svěřacích buněk a nevytváří pór. Pozorování *fama* mutantů naznačuje, že FAMA hraje roli spíše v dřívějších stádiích, nebo má širší uplatnění a aktivně podporuje buněčnou diferenciaci, stejně tak jako inhibici buněčného dělení (Bergmann, D. C., Lukowitz, W., Somerville, 2004).

Dalším nedávno objeveným pozitivním signálním faktorem ovlivňujícím vývoj průduchů je STOMAGEN. Nadměrná exprese *STOMAGEN* genu zvyšuje počet průduchů a jeho suprese jejich počet naopak snižuje (Kondo et al., 2010; Shimada, Sugano, & Hara-Nishimura, 2011).

## **2.7 Vliv vnějších faktorů na vývoj průduchů**

Experimentálními pokusy zaměřenými na „vývojové geny“, které v epidermis hrají klíčovou roli při kontrole buněčné identity a vývoji dělení, bylo identifikováno mnoho autonomních buněčných faktorů, které jsou potřebné pro vývoj a rozmístění průduchů. Nicméně interakce vnějšího prostředí a tkáně nacházející se pod průduchy (mezofylu), má na finální hustotu průduchů (tj. počet průduchů na jednotku plochy), jejich rozmístění a průduchový index (tj. poměr počtu průduchů a počtu všech buněk epidermis) taktéž vliv. Tyto signály přenášené mezi tkáněmi se mohou projevovat regulací aktivity genů, jako jsou *TMM*, *YODA*, *SDD1* a *ER* genová rodina, nebo mohou přímo ovlivňovat mechanismus buněčného cyklu či další cílové pochody (Obr. 5, viz. níže). Samotné snížení průduchové hustoty by mělo za následek pokles průduchové vodivosti. Tuto veličinu však kromě vlastní hustoty průduchů ovlivňuje i velikost průduchových pórů. Obecně platí, že s rostoucím počtem průduchů se jejich velikost, a tedy i velikost průduchového póru, zmenšují (Franks & Beerling, 2009; Wagner et al., 1996).

Paleontologové a ekofyziologové si již dávno povšimli korelace mezi hustotou průduchů a environmentálními parametry jako jsou teplota, půdní i vzdušná vlhkost, ozáření (hustota

toku fotonů fotosynteticky aktivního záření, PPF PAR), či koncentrace oxidu uhličitého (Obr. 5, viz. níže) (Woodward 1987).

### 2.7.1 Vliv koncentrace CO<sub>2</sub> na vývoj průduchů

Rostliny ovlivňují a jsou zároveň ovlivňované prostředím, které je obklopuje. Současná kyslíkatá atmosféra je výsledkem oxygenní fotosyntézy. Změny složení atmosféry přinášené lidskou činností a vedoucí k nárůstu koncentrace oxidu uhličitého CO<sub>2</sub> mají významný vliv na růst rostlin. Fotosyntetickou fixací CO<sub>2</sub> se v globálním měřítku odčerpá přibližně 1/7 celkového atmosférického uhlíku ročně, zatímco transpirací se recykluje celkové množství obsahu atmosférické vody každých šest měsíců (Hetherington & Woodward, 2003). Nové výzkumy přicházejí s detekcí přímého vlivu koncentrace CO<sub>2</sub> na celosvětové hydrologické cykly. Při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> v atmosféře dochází k částečnému uzavírání průduchů (Morison, 1998) a potlačení transpirace, čímž více vody zůstává v půdě. Konečný přebytek půdní vlhkosti poté vede ke zvýšení odtoku a tím i zvýšení četnosti záplav (Gedney et al., 2006).

Průduchy odpovídají na environmentální změny v krátkodobém měřítku (během desítek vteřin až minut) otevřením nebo uzavřením. Avšak pokud trvá změna prostředí po delší časové období (po dobu života rostliny, či mnoha generací) rostliny jeví schopnost reagovat na okolní prostředí (aklimovat a adaptovat se) a upravit počet a rozmístění průduchů tak, aby výměna plynů byla vhodná pro převládající environmentální podmínky.

Studie fosilních a recentních rostlin ukazují silnou korelaci mezi atmosférickou koncentrací CO<sub>2</sub> a hustotou průduchů (tj. počtem průduchů na jednotku plochy listu) - při zvýšeném množství CO<sub>2</sub> se snížila hustota průduchů a naopak (Woodward, 1987). Amfistomatické druhy rostlin (tj. s průduchy na spodní i horní straně listu) vykazují v ambientních a změněných podmínkách větší rozdíl v hustotě průduchů oproti rostlinám hypostomatickým (tj. s průduchy na spodní straně listu). Vliv na intenzitu reakce má také základní hustota průduchů. Intenzivněji reagují rostliny, které mají při běžné koncentraci CO<sub>2</sub> větší hustotu průduchů (Woodward & Kelly, 1995). Výzkumy prováděné u rostlin s panašovanými listy prokázaly, že zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňuje hustotu průduchů na pokožce jak zelených tak bílých částí listů. Což nepřímo ukazuje na to, že regulace počtu průduchů nesouvisí s rychlostí fotosyntézy (Beerling & Woodward, 1995). Poole a jeho kolegové při pokusech prováděných na olši (*Alnus glutinosa*) dospěli k závěru, že jedinci pěstovaní při zvýšené

koncentraci CO<sub>2</sub> v porovnání s jedinci za ambientních podmínek, vykazují zlepšení sledovaných růstových parametrů. Počet větviček na jednotlivých rostlinách se ve změněných podmínkách zvýšil, ačkoliv absolutní listová plocha, počet listů a celková výška rostlin zůstává nezměněna. S tvrzením, že zvýšení atmosférické koncentrace CO<sub>2</sub> podporuje komplexní růst rostliny přišli i jiní (McKee, Farage, & Long, 1995). U rostlin pěstovaných při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub> v atmosféře, na rozdíl od rostlin rostoucích v ambientních podmínkách, dochází k negativní korelaci mezi hustotou epidermálních buněk a průduchovým indexem. Průkazná je i pozitivní korelace 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 (Jelínková Irena, 2011; Poole, Lawson, Weyers, & Raven, 2000).

V posledních letech se podařilo identifikovat genetickou složku vývoje průduchů reagující na zvýšenou koncentraci atmosférického CO<sub>2</sub> (Gray et al., 2000). U pokusných rostlin *Arabidopsis* pěstovaných při dvojnásobné koncentraci CO<sub>2</sub> docházelo k produkci menšího počtu průduchů na jednotku plochy, než u rostlin pěstovaných při standardní okolní koncentraci CO<sub>2</sub> (Lake et al., 2001). Tato odpověď závisí na aktivitě genu *HIGH CARBON DIOXIDE (HIC)*, kódující enzym potřebný pro syntézu dlouhého řetězce mastných kyselin, které jsou součástí kutikuly. *HIC* gen ovlivňuje počet průduchů formujících se na listu, ale neovlivňuje jejich rozmístění. U mutantů *hic* nedochází k žádným poruchám v rozmístění průduchů, jako např. tvorbě klastrů (Gray et al., 2000). Bohužel od té doby, kdy bylo toto průlomové zjištění publikováno, se neobjevily další zprávy, které by jej podpořily nebo vyvrátily.

Vývoj průduchů je řízen už od časných fází vývoje listu (Donnelly, Bonetta, Tsukaya, Dengler, & Dengler, 1999; Woodward & Bazzaz, 1988). U mnoha rostlin mladé listy obklopují vrcholový meristém a jsou kryty staršími listy. Paradoxně tkáň kde se průduchy vyvíjejí v reakci na vnější prostředí, nejsou vystaveny přímému kontaktu s tímto prostředím. Toto zjištění vedlo Lake a kolegy k hypotéze, že starší listy slouží jako environmentální senzory k přenosu signálu na dlouhou vzdálenost až do nových listů. Tato hypotéza se ukázala být pravdivou pomocí jednoduchého, ale elegantního experimentu, ve kterém byla sestrojena komora s vysokou koncentrací CO<sub>2</sub>, těsně obepínající pouze jeden list rostliny *Arabidopsis*, zatímco zbytek rostliny zůstal růst v okolní atmosféře (Lake et al., 2002). Jakmile byla komora umístěna kolem dospělého listu, hustota průduchů nově rašících listů byla totožná s listy rostoucími přímo při vysoké koncentraci CO<sub>2</sub>. A opačně vystavení pouze

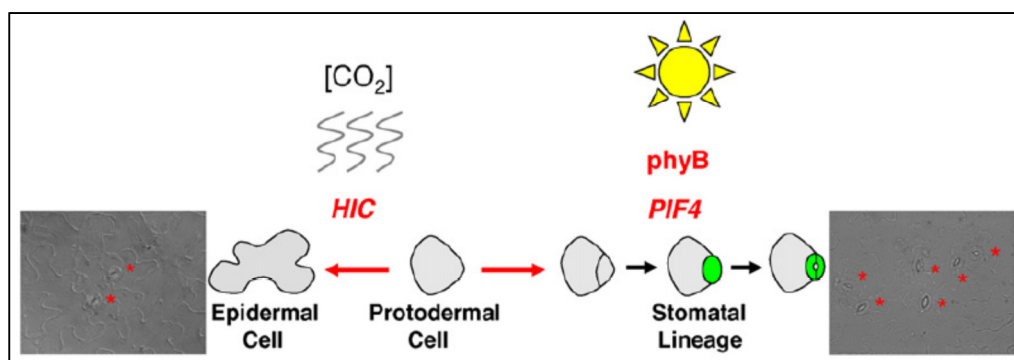
mladých listů vysoké koncentraci CO<sub>2</sub> mělo za následek totožnou stomatální hustotu jako u rostlin rostoucích za běžných okolních podmínek. Další novější studie rozšířily tyto výsledky na další rody a druhy rostlin včetně topolu (*Populus*) (Miyazawa, Livingston, & Turpin, 2006). Výsledky těchto studií ukazují, že vnímání vnějších okolních podmínek dospělými listy a odpověď na tyto podmínky listy mladými, je univerzální. Zatím není známo jaký typ látkového nebo energetického signálu se z dospělých do mladých listů předává. Jeden rys, který velmi dobře koreluje s hustotou průduchů u nových listů, je míra vypařené vody skrz průduchy dospělých listů (Miyazawa et al., 2006), naznačující, že vytvoření nových průduchů by mohlo být spojené s mírou funkční účinnosti starých listů (MacAlister & Bergmann, 2007).

### **2.7.2 Vliv ozáření na vývoj průduchů**

Zvýšení ozáření listu (hustoty toku fotonů v oblasti fotosynteticky aktivní radiace 400-700 nm, PPFD) pozitivně ovlivňuje změny v počtu průduchů. Rostliny rostoucí při vysoké PPFD produkují více průduchů, než rostliny při nedostatečném ozáření (Schoch, Jacques, Lecharny, & Sibi, 1984). Výsledkem je nejen nárůst hustoty průduchů SD (tj. počet průduchů na jednotku plochy listu, např. mm<sup>2</sup>), ale obvykle dochází také ke zvýšení průduchového indexu SI (tj. poměru počtu průduchů k celkovému počtu všech epidermálních buněk, tedy průduchů a dlaždicových buněk, na jednotce plochy listu:  $SI = SD / (SD + PCD)$  kde PCD je hustota dlaždicových buněk). Přestože množství světla ovlivňuje „rozhodnutí“ protodermální buňky v jejím osudu, tyto změny neporušují pravidlo vymezení alespoň jedné dlaždicovité buňky mezi jednotlivé průduchy (tzv. one cell spacing rule) (Casson & Hetherington, 2010).

Rozdílné vlnové délky světla mají kontrastní efekt na hustotu průduchů. Vysoká ozáření červeným světlem o kratší vlnové délce (red) zvyšuje průduchový index, zatímco ozáření dlouhovlnným červeným světlem (far-red) průduchový index snižuje. Rostliny pěstované při vyšší ozáření monochromatickým červeným světlem (o vlnové délce 665 nm) prokazovaly, v porovnání s rostlinami rostoucími při nižší ozáření, zvýšený průduchový index (Casson et al., 2009). Ozáření dlouhovlnným červeným světlem (far-red), při západu slunce na konci dne, průduchový index opět snížilo (Boccalandro et al., 2009). Skutečnost, že k této reakci dochází při působení červeného světla a dá se vyvrátit vlivem far-red, naznačuje, že nutným fotoreceptorem je fytochrom. Následné práce prokazují, že

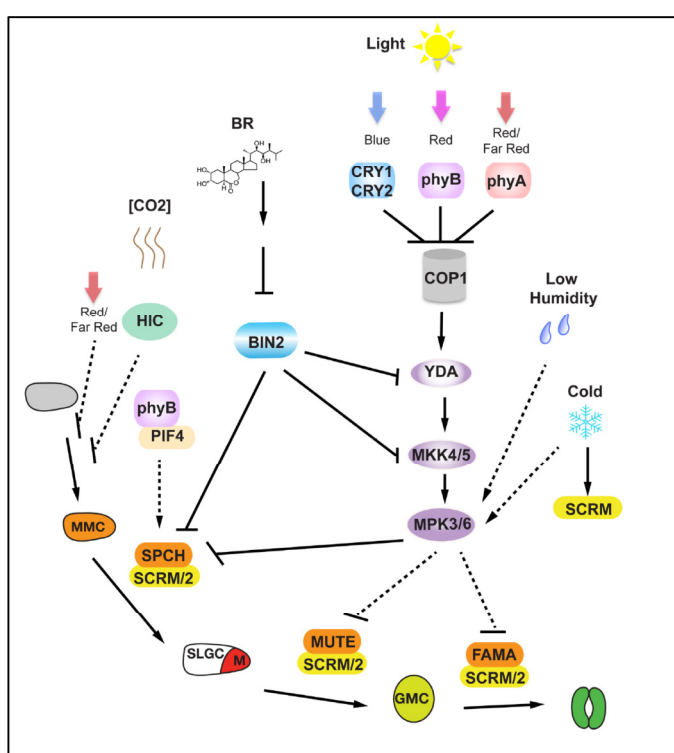
dominantním fotoreceptorem rozhodujícím o osudu epidermální buňky v souvislosti se světelnou kvalitou je fytochrom B (Casson et al., 2009). Rostliny s absencí *phyB* za vyšší intenzity červeného světla neprodukuje více stomat. Fotoaktivovaný fytochrom B je translokován z cytoplasmy do jádra, kde může interagovat s fytochromovými interakčními faktory (PIFs), což je malá rodina bHLH transkripčních faktorů, hrajících významnou roli při několika světelně ovlivňovaných dějích (Monte, Al-Sady, Leivar, & Quail, 2007). *Pif4* mutanti jeví za vyšší fotonové ozáření redukcí SI, což vedlo k možnosti, že by PIF4 mohl být zapojený v regulaci vývoje průduchů závislé na světelných podmínkách (Casson et al., 2009). Analýzou dvojitého mutanta *phyB* a *pif4*, bylo v dalších výzkumech potvrzeno, že PIF4 a *phyB* fungují ve stejné regulační dráze. Zajímavé je, že PIF4 se ukázal být stěžejním také při odpovědi rostliny na zvýšenou teplotu, což naznačuje, že by mohl být centrem odpovědi rostlin na vnější prostředí (Casson & Hetherington, 2010; Koini et al., 2009).



Obrázek 4: Environmentální kontrola stomatálního vývoje. Převzato z (Casson & Hetherington, 2010).

Kromě fytochromu B podporují vznik průduchů při velké ozáření i receptory modrého světla, jako jsou CRYPTOCHROM 1 (CRY1), CRYPTOCHROM 2 (CRY2) a red/far-red fotoreceptor fytochrom A (*phyA*) (Kang et al., 2009). Propojení mezi světelnými signály a vývojem průduchů vede přes E3 ubiquitin-protein ligázu a represor světelně závislého vývoje CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1). COP1 představuje hlavní směr CRY signalizace a *cop1* mutanti jeví, za jakýchkoliv světelných podmínek (světla i tmy), nápadnou nadprodukcí průduchů a klastrovitý fenotyp. Tento fenotyp se silně podobá *yda* mutantu, který vykazuje ve vývoji průduchů negativní vliv na COP1 (Liu et al., 2008; Yang, Tang, & Cashmore, 2001). Genetické analýzy naznačují, že COP1 se spolu s TMM podílejí na regulaci aktivity YDA. Mechanismus jejich regulace není doposud znám, ale bylo

zjištěno, že YDA MAPK negativně ovlivňuje SPCH (Lampard, Macalister, & D.C., 2008) tak, že se počet průduchů za různých světelných podmínek mění. Detailním sledováním časové škály při dělení průduchové linie u dalšího ubiquitin-protein ligázového mutantu, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 10 (COP10), bylo objeveno několik klastrovitých fenotypů způsobených proliferací a defekty v prostorovém dělení (Delgado, Ballesteros, Torres-Contreras, Mena, & Fenoll, 2012). Ačkoliv nebyla zatím objevena žádná další dráha, všechny důkazy naznačují, že světelně závislá dráha může být doladována dalšími, které zahrnují SDD1 (Coupe et al., 2006; Pillitteri & Dong, 2013).



Obrázek 5: Souhrn hormonální a environmentální signalizace podléjící se na vývoji průduchů.

Jednotlivá stádia vývoje z protodermální buňky až po buňky svěřací jsou zakresleny v dolní části obrázku. Šipky naznačují pozitivní regulaci, zatímco slepé úsečky regulaci negativní. Experimentálně potvrzené genetické interakce jsou vyznačeny plnou čarou, spekulované informace jsou naznačeny čarou přerušovanou. Převzato z (Pillitteri & Dong, 2013).

Jak již bylo uvedeno, o vývinu průduchů na novém listu rozhodují vnější podmínky listu staršího, již dospělého listu. Rozhodujících je šest dní před objevením se listu (Schoch et al., 1984). Při pokusech u rostliny Vigny čínské (*Vigna sinensis L.*) bylo zjištěno, že u rostliny adaptované na stinné podmínky stačí, aby byla vystavena vyšší ozáření alespoň 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 nově vyvíjejících se listů, jinak intenzivně ozářených rostlin, způsobilo 24,2% nárůst průduchového indexu (Thomas, Woodward, & Quick, 2003).

## 2.8 Signály

Stomata vnímají a reagují na červené a modré světlo pomocí chlorofylu a receptoru modrého světla, zeaxanthinu (Zeiger & Zhu, 1998). Fytochrom, který také vnímá červené světlo a je zapojen do cirkadiálního rytmu aktivity průduchů, se však neúčastní pohybů průduchů jako takových. Průduchová vodivost koreluje s fotosynteticky aktivní radiací (PAR) a asimilací z fotosyntézy. Chlorofyl ve svěřacích buňkách sice absorbuje červené a modré světlo, nicméně k následnému otevření dochází pomocí receptoru modrého světla. Světlo aktivuje protonovou pumpu v plasmatické membráně a kaskáda iontových pohybů začíná. Médium obklopující protoplasty svěřacích buněk, se pod ozáření modrým světlem stává kyselejší. Další experimenty potvrdili, že modré světlo vytváří v plasmatické membráně svěřací buňky elektrické proudění a míra pumpování protonů závisí na míře modrého světla. Červené světlo také stimuluje pumpování protonů, zablokované inhibitory fotosyntézy, naznačuje, že tuto odpověď zprostředkovává chloroplast. Kromě chlorofylu a zeaxanthinu nejsou známy jiné signální receptory svěřacích buněk na světlo (Croxdale, 2007).

## 2.9 Kaskáda senzorického přenosu modrého světla vedoucí k otevření průduchů

Excitace zeaxanthinu modrým světlem zapříčiní fotochemickou reakci, pravděpodobně izomeraci z trans na cis (Frechilla, Talbott, Bogomolni, & Zeiger, 2000), která je prvním krokem v kaskádě. Několik zatím neznámých dalších kroků přeneše tento signál přes obal chloroplastu a aktivuje serin/threoninovou kinázu, která fosforyluje C-konec  $H^+$  ATPázy a aktivuje enzym (Kinoshita & Shimazaki, 1999). 14-3-3 protein se naváže na fosforylovanou  $H^+$  ATPázu a stabilizuje jí. Délka čerpání protonů je závislá na délce fosforylace, která je určena koncentrací zeaxanthinu ve svěřacích buňkách chloroplastu a množstvím dopadajících modrých fotonů (Kinoshita & Shimazaki, 1999; Zeiger & Zhu, 1998).

Čerpáním protonů dochází k příjmu rozpuštěných látek a otevření průduchů. Defosforylací disociuje 14-3-3 protein a deaktivuje se H<sup>+</sup> ATPáza (Zeiger, 2000).



## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Pokusnou rostlinou byla Řeřicha zahradní (*Lepidium sativum* L.) z čeledi Brukvovitých (*Brassicaceae*).

Tyto konkrétní rostliny jsme zvolili hlavně proto, že:

- 1) na nich byly prováděny předchozí měření (a byly publikovány jejich výsledky), známe, jak se vyvíjí jejich průduchy na „bílém“ světle.
- 2) rychle rostou a vyvíjejí se tak, že lze během 7-21 dnu dosáhnout ustálené hodnoty hustoty průduchů na děložních i pravých listech.
- 3) lze je dobře kultivovat v řízených podmínkách a malých prostorech, které poskytuje komerční Multi-Cultivator fi. PSI, při malých objemech protékajícího vzduchu.

### 3.2 Kultivace rostlin

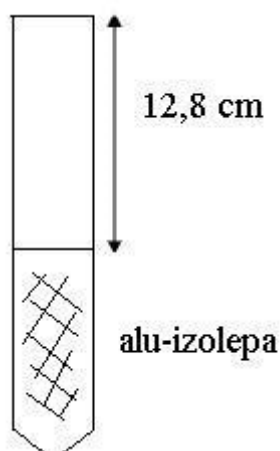
Rostliny jsem pěstovala ze semen v laboratoři v řízených podmínkách v upraveném kultivátoru (Multi-Cultivator MC 1000, PSI s.r.o., CZ) určeném výrobcem pro kultivaci řas a sinic. Rostliny byly pěstovány individuálně v osmi oddělených skleněných kyvetách ponořených ve vodní lázni s řízenou teplotou (viz Obr. 9) a ventilovaných vzduchem čerpaným z volné atmosféry mimo budovu. Detaily světelných, teplotních a atmosférických podmínek uvedu později.

#### 3.2.1 Založení experimentu

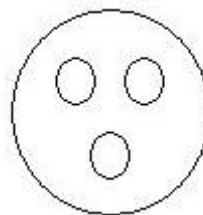
Osm skleněných kyvet jsem důkladně vymyla detergentním přípravkem, poté destilovanou vodou a nechaly se vysušit v laboratorní sušárně na 3 hodiny při teplotě 60 °C. Po vysušení byla spodní část kyvet, ve vzdálenosti 12,8 cm od horního okraje, oblepena alu-izolepou.

Do každé kyvety jsem navázila cca 3 g jemného perlitu, aby „hladina“ perlitu odpovídala hraně tvořené alu-izolepou. Poté jsem do každé kyvety přidala 25 ml živného roztoku (0,5 g

komerčního KRISTALONU START rozpuštěného v 1litru destilované vody) a pomocí buničiny pečlivě začištila vnitřní stěny kyvet.



Obrázek 6: Kyveta s naznačeným umístěním alu-izolepy



Obrázek 7: Terčík na semínka

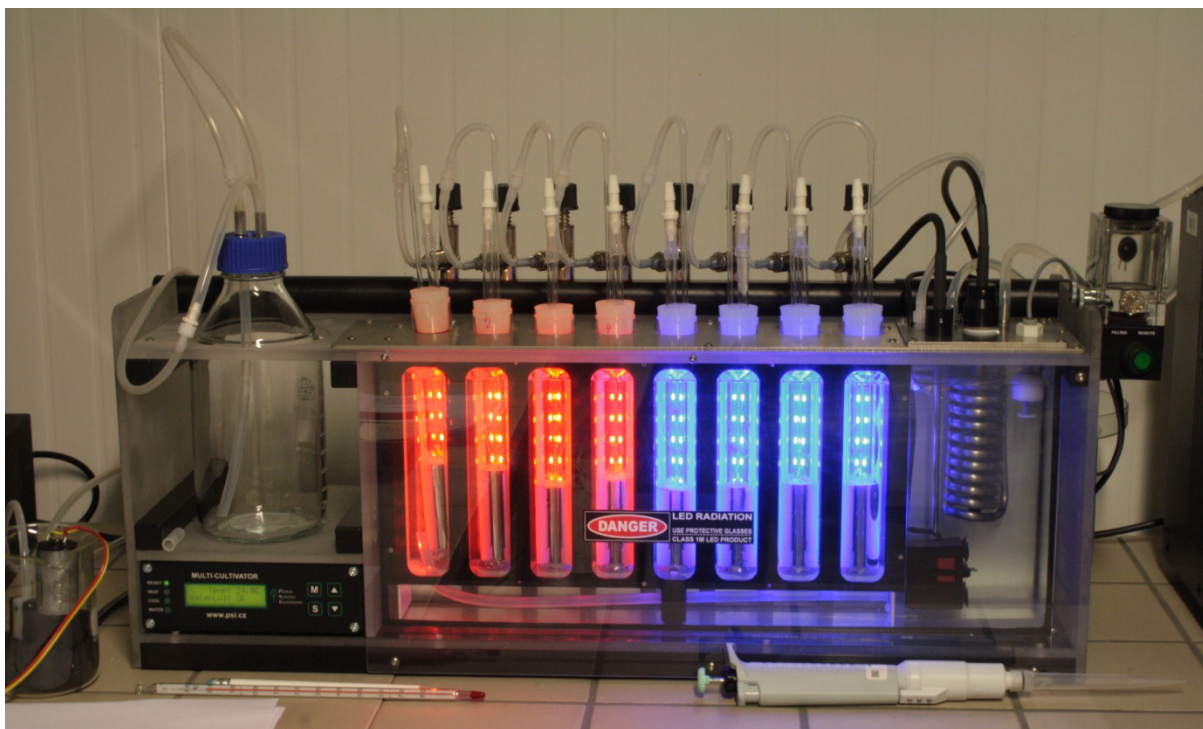
Na živnou půdu byly položeny plastové terčíky a do tří otvorů pro rostliny zasejena po jednom semenu Řeřichy zahradní (osivo od firmy SEMO a.s.). Terčíky byly následně zatíženy „závažím“ (v podobě 20 Kč mince), které bylo po 2 dnech vytaženo magnetem. Závaží umožňuje klíčícím semenům získat kontakt s perlitem a kořínku vrůst do něj.

### 3.2.2 Světelné, teplotní a atmosférické podmínky kultivace

Takto připravené kyvety byly vloženy do vodní lázně barevného kultivátoru (Multi-Cultivator MC 1000, PSI s.r.o., CZ) ze zadní strany osazené panelem s LED diodami emitujícími fotony, úzkého pásu červeného ( $\lambda=632$  nm) nebo modrého světla ( $\lambda=462$  nm) o nastavitelné hustotě toku fotonů (Obr. 8). U všech kyvet byla nastavena 10-ti hodinová temnotní perioda (od 20<sup>00</sup> do 6<sup>00</sup> hod SEČ) s teplotou lázně 19 °C a 14-ti hodinová světelná perioda (od 6<sup>00</sup> do 20<sup>00</sup>) s teplotou lázně 24°C. Přechod z tmy do světla a naopak byl skokový („pulzní amplituda“ v terminologii software přístroje). Spektrální složení obou typů světla je znázorněno na Obr. 10 AB. U kyvet č. 1, 2, 3, 4 bylo při světelné fázi emitováno červené světlo s amplitudou 850, 700, 400, 100 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Kyvety č. 5, 6, 7, 8 byly při světelné fázi ozářeny modrým světlem s amplitudou 100, 300, 500, 700 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Ke kultivátoru byla připojena externí chladicí jednotka (AC-90) zajišťující cirkulaci chladicí vody. Membránová vzduchová pumpa (KNF Neuberger) čerpala vzduch z volné atmosféry

na střeše budovy a tím bylo zajištěno stálé izotopové složení a koncentrace CO<sub>2</sub> na vstupu kyvet. U každé kyvety byl samostatně regulován průtok vzduchu kyvetou a pohyboval se v rozmezí od 50 do 200 ml/min podle stáří rostlin a ozáření.

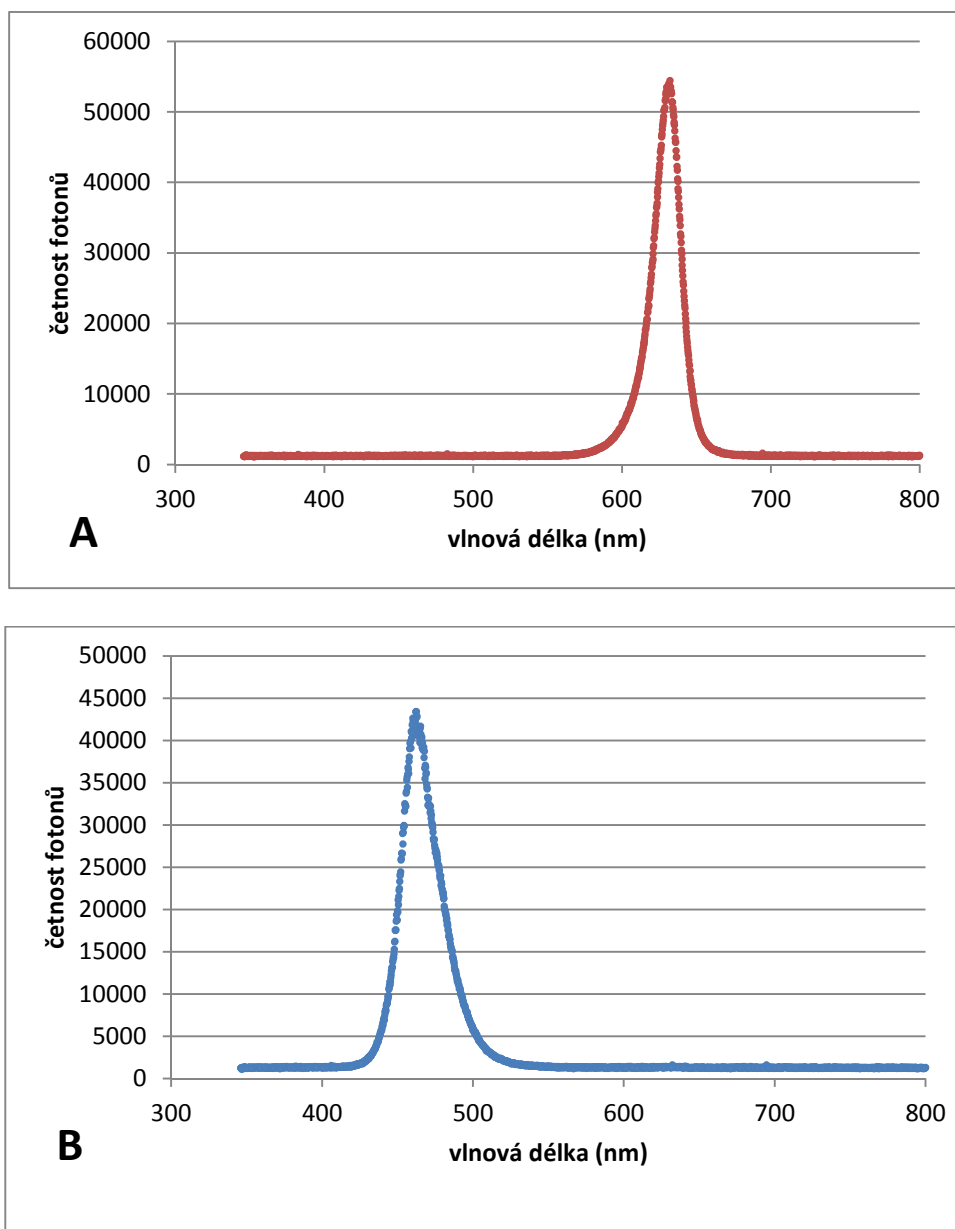


Obrázek 8: Barevný kultivátor (Multi-Cultivator MC 1000, PSI s.r.o., CZ) s pokusnými rostlinami *Lepidium sativum* L. (fotografie Mgr. Martina Drtinová 2014)



Obrázek 9: Kyveta s pokusnou rostlinou *Lepidium sativum* L.

V červeném spektru měly LED diody absorpční maximum kolem 632 nm, zatímco v modrém kolem 462 nm.



Obrázek 10: Změřená absorpční maxima červeného (A) a modrého (B) záření emitovaného LED diodami kultivátoru (Multi-Cultivator MC 1000)

V intervalech 2-3 dnů byla pomocí přenosného otevřeného gazometrického systému LI-6400 (LI-COR, Nebraska, USA) měřena koncentrace  $\text{CO}_2$  [ $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ] ve vstupním vzduchu (společném pro všech osm kyvet) a ve vzduchu proudícím z každé jednotlivé kyvety.

Po týdnu od založení jsem vyjednotila rostliny (v každé kyvetě jsem nechala pouze jednu nejvitalnější rostlinu). V průběhu pokusu jsem průběžně do všech kyvet dopipetovávala destilovanou vodu tak, aby se hmotnost kyvet neměnila a aby rostliny netrpěly suchem. Množství přidávané vody jsem zaznamenávala. Pokusné rostliny byly takto pěstovány po dobu 21 dnů a celý pokus byl opakován 3x (v termínech 6.11.2013-27.11.2013; 29.11.2013-20.12.2013 a 24.1.2014-14.2.2014).

### **3.3 Odběr a následné vyhodnocení otisků průduchů**

3-týdenní pokusné rostliny jsem vyjmula z kyvet. Kořenový systém rostlin pečlivě propláchla v destilované vodě, zbavila všech částí perlitu a připravila k další analýze. Od každé rostliny jsem odebrala vždy jeden děložní a jeden první pravý list, sloužící k sejmutí otisků. Jelikož *Lepidium* patří mezi amfistomatické druhy rostlin (s průduchy na abaxiální i adaxiální straně listu), byly odebrány otisky vždy z horní i spodní strany listu.

Čerstvě odebrané listy jsem připevnila na list papíru pomocí oboustranné lepicí pásky tak, aby od každého typu listu (děložní, pravé), byla polovina přilepena rubem a druhá polovina lícem. Na povrch listu jsem nanasla kapku komerčního bezbarvého laku na nehty (Rimmel London-Lycra, UK) a jedním směrem rozetřela štětečkem. Po zaschnutí (řádově několik minut), se lak pomocí průhledné pásky opatrně přenesl na podložní sklíčko. Takto připravené otisky jsou stálé a lze je prohlížet v mikroskopu i po delší době. Při pozorování v mikroskopu je možné vidět povrchové nerovnosti listu otištěné do laku, jako obrysy epidermálních buněk, průduchů, popřípadě trichomů apod.

Z každé strany listu jsem pod mikroskopem (Olympus BX61, Japan) s připojeným digitálním zrcadlovým fotoaparátem (Canon EOS 1000D, Japan) pořídila 10 fotografií různých částí listu, při zvětšení 50x. V těchto polích jsem pomocí volně dostupného programu ImageJ, počítala průduchy a epidermální buňky. Jejich počty jsem následně vyhodnotila v programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft, USA) a průměrnou hodnotu přepočítána na  $1\text{mm}^2$ .

### **3.4 Analýza stabilních izotopů uhlíku**

Po odebrání otisků listů jsem pomocí analytických vah (KERN 770-14) stanovila hmotnost všech pokusných rostlin. Do předem zvážených a označených mikrozkupek, byly zvlášť

separovány kořeny, děložní a pravé listy jednotlivých rostlin, rostoucích za různé světelné intenzity. Vzorky byly vloženy do laboratorní sušárny a sušeny po dobu 48 hodin při teplotě 80°C.

Po usušení následovalo opětovné zvážení pro výpočet obsahu sušiny. Do každé mikrozkuřavky jsem přidala 2 nerezové kuličky, pečlivě očištěné v 70% etanolu, aby se předcházelo kontaminaci. Takto připravené mikrozkuřavky se vzorky a kuličkami byly vloženy do kulového mlýnku (Retch, MM 200, DE) a homogenizovány (při frekvenci třepání 30 ot.s<sup>-1</sup> po dobu 1min 30s). Do cínových kapslí 8x5mm (SerCon, UK) byla zabalena navážka v rozmezí 0,200-0,300 mg vzorku (na vahách Mettler Toledo MT 5, d=1 µg).

Vlastní analýza byla prováděna na izotopovém poměrovém hmotnostním spektrometru Delta<sup>XL</sup> 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 CO<sub>2</sub> při teplotě 950°C. Jako pracovní standard byla při analýze použita sacharóza (IAEA-CH-6) (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  $R_{VZOREK} = {}^{13}\text{C}:{}^{12}\text{C}$  a následně jako hodnoty diskriminace  ${}^{13}\text{C}$  vztažené k mezinárodnímu standardu VPDB (Vienna PeeDee Belemnite).

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

### Výpočet vnitřní listové koncentrace CO<sub>2</sub>

Pro stanovení vnitřní listové koncentrace CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) jsme použili δ listové sušiny. Diskriminace  ${}^{13}\text{C}$  během fotosyntetické fixace CO<sub>2</sub>, Δ, se dá vyjádřit vztahem (Farquhar, Ehleringer, & Hubick, 1989):

$$\Delta = a + (b - a) \cdot \frac{C_i}{C_a}$$

Kde *a* a *b* jsou konstanty, přičemž *a*=4.4 ‰ a *b*=27 ‰. A *C<sub>a</sub>* je ambientní listová koncentrace CO<sub>2</sub>.

### **Statistické vyhodnocení**

V barevném kultivátoru (Multi-Cultivator MC 1000) bylo, za ozáření červeným ( $\lambda=632$  nm) a modrým světlem ( $\lambda=462$  nm), po dobu 21 dnů, pěstováno 8 rostlin Řeřichy zahradní (*Lepidium sativum* L.). V červeném světle byly amplitudy 850, 700, 400, 100 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), v modrém pak 100, 300, 500, 700 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Pokus byl takto opakován třikrát, data byla následně zpracována a statisticky vyhodnocena v programu Microsoft Excel 2007.

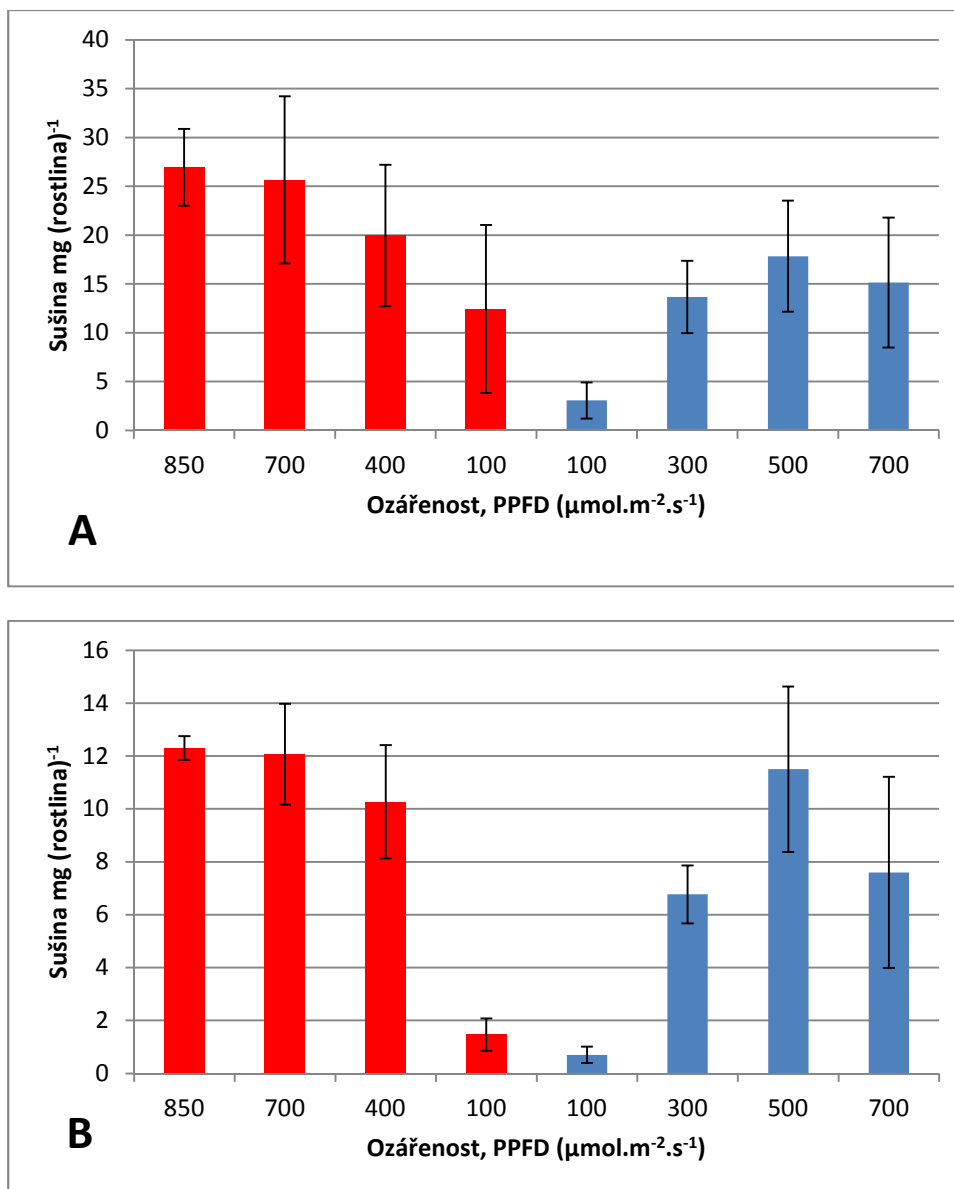
## 4 Výsledky

### 4.1 Charakteristika růstu a alokace asimilátů

#### 4.1.1 Závislost produkce suché hmoty na ozáření

V experimentu byl zkoumán vliv rozdílné světelné kvantity (ozáření) a kvality (červené a modré světlo) na množství sušiny. Kyvety 1, 2, 3, 4 byly ozařovány zdrojem červeného světla s maximem 632 nm a hustoty toku fotonů (PPFD) 850, 700, 400, 100 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Zatímco kyvety 5, 6, 7, 8 byly ozařovány světlem modrým s maximem emise kolem 462 nm a PPFD 100, 300, 500, 700 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Zvlášť byla analyzována sušina nadzemní části rostliny, obsahující veškerou nadzemní biomasu včetně děložních listů (viz. Obr. 11A) a zvlášť sušina kořenů (viz. Obr. 11B). Výsledky jsou průměrem třech nezávislých měření.



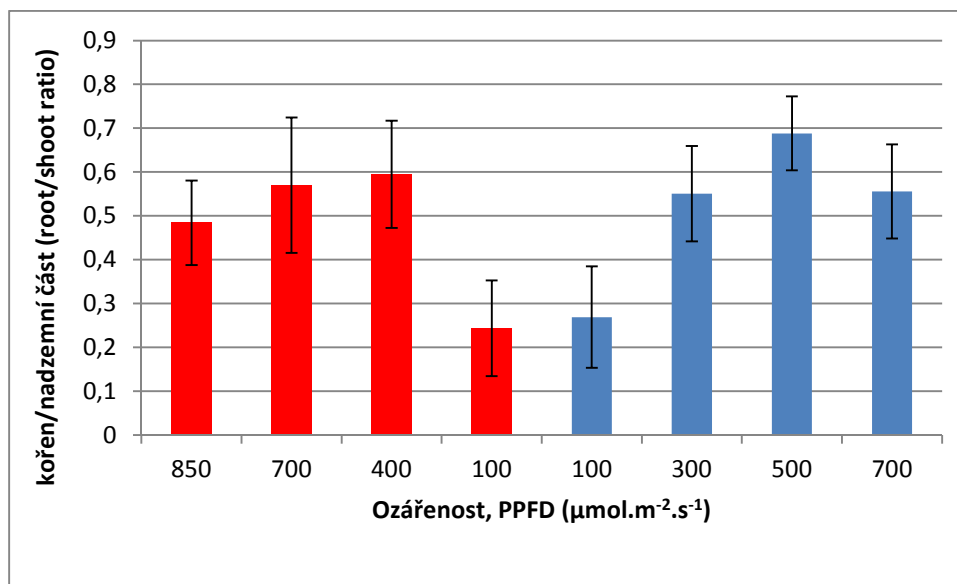


Obrázek 11: Množství sušiny nadzemní části rostliny (A) a kořenů (B) v závislosti na rozdílné ozáření červeným a modrým světlem. Je uveden průměr ze třech měření a standardní chyba. Inverzní orientace ozáření červeným a modrým světlem na horizontální ose je zvolena ve shodě s prostorovým rozmištěním kyvet v kultivátoru.

Výsledky uvedené v Obr. 11 A,B naznačují, že se vzrůstající ozáření, jak červeným, tak modrým světlem, stoupá množství rostlinné biomasy. A to jak v případě nadzemní rostlinné části, tak kořenů. Signifikantně významný je rozdíl mezi nejnižší ozáření  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  v porovnání s druhou nejnižší ozáření na červeném světle  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a na světle modrém s  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Zdá se, že ozáření výrazněji ovlivňuje biomasu kořenů, než nadzemních rostlinných částí. U vyšších ozáření než  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na červeném a  $300 (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$  na modrém světle nedocházelo k průkazné změně.

#### 4.1.2 Závislost poměru hmotnost kořen/prýt na ozáření

V následujícím grafu (Obr. 12) je vynesena poměr hmotnosti kořenů k nadzemní části rostliny (root/shoot ratio) v závislosti na světelné kvantitě a kvalitě. Výsledky jsou průměrem třech nezávislých měření.

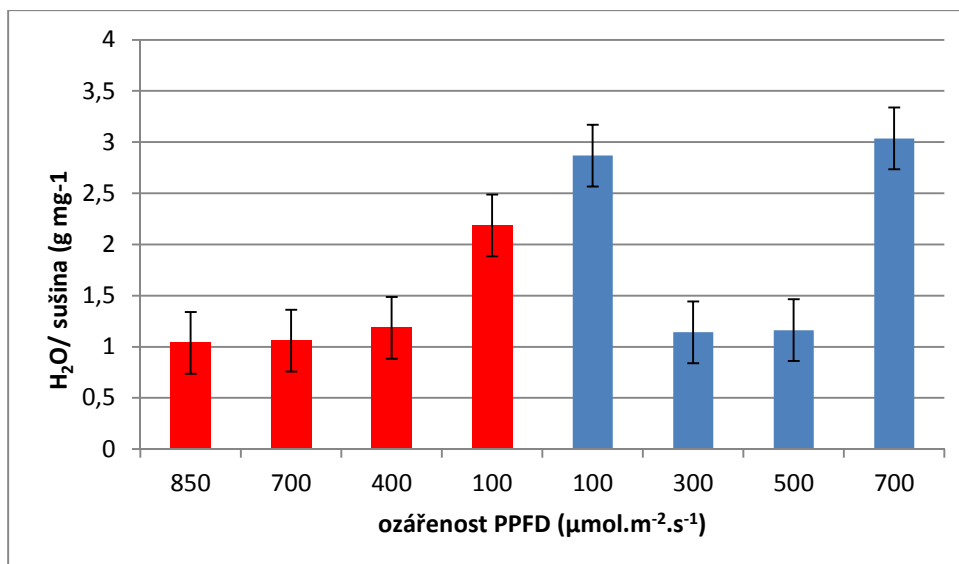


Obrázek 12: Poměr hmotnosti kořenů a nadzemní části rostliny (root/shoot ratio) v závislosti na rozdílné ozáření červeným a modrým světlem. Je uveden průměr ze třech měření a standardní chyba. Inverzní orientace hodnot ozáření v grafu podle barvy světla je zvolena proto, aby ukazovala rozmístění kyvet v kultivátoru.

Z grafu reprezentujícího poměr kořenů k nadzemní biomase (Obr. 12) je patrné, že rostliny při nejnižší ozáření  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  relativně více investují do tvorby nadzemních částí než kořenů. Platí to jak pro červené tak i modré světlo.

#### 4.1.3 Závislost transpiračního poměru (spotřebovaná voda/vyprodukovaná sušina) na ozáření

V grafu na Obr. 13 je znázorněno množství spotřebované vody během celého růstu jedince na mg vytvořené sušiny v závislosti na kvantitě a kvalitě dopadající fotosynteticky aktivní radiace. Výsledky jsou průměrem třech nezávislých měření.



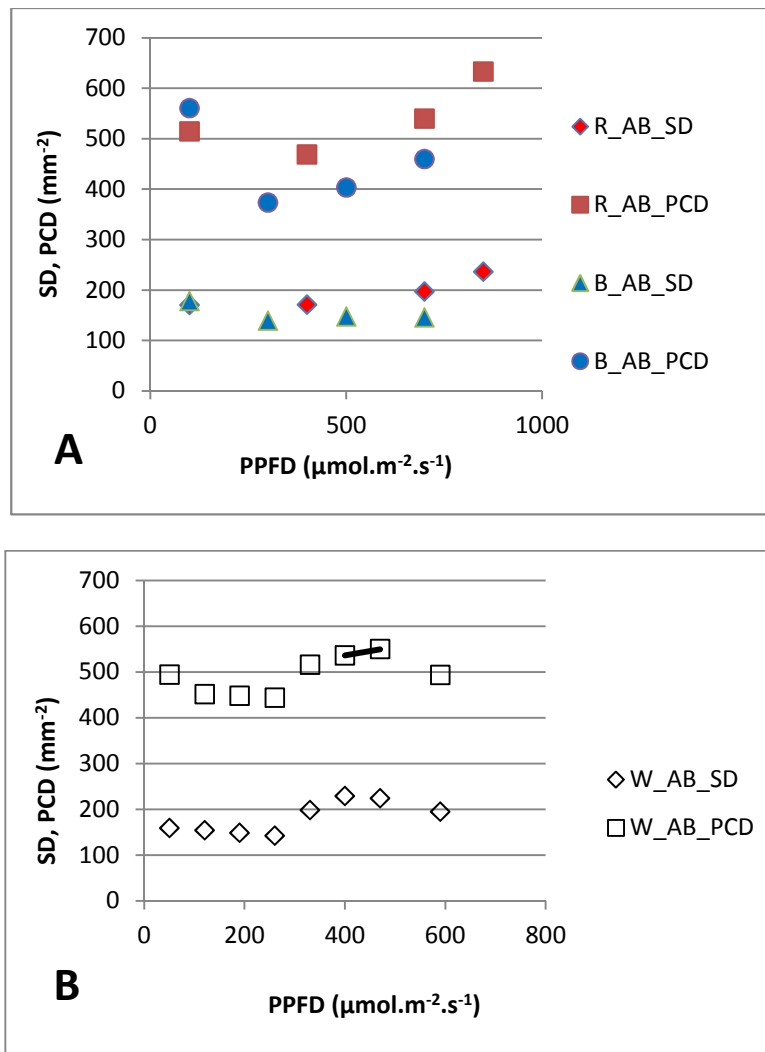
Obrázek 13: Množství spotřebované vody v g v poměru k vyprodukované sušině v mg ( $\text{g H}_2\text{O}/\text{mg sušiny}$ ) v závislosti na rozdílné ozárénosti červeným nebo modrým světlem. Je uveden průměr ze třech měření a standardní chyba.

Nejvíce spotřebované vody na mg sušiny jeví (až na výjimku nejvyšší ozárénosti modrým světlem při 700 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )) jedinci, rostoucí za nejnižší ozárénosti. Rostliny, rostoucí při nejvyšší ozárénosti modrým světlem s amplitudou 700 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), vykazovaly téměř ve všech případech rozdílnou závislost, než byl celkový trend.

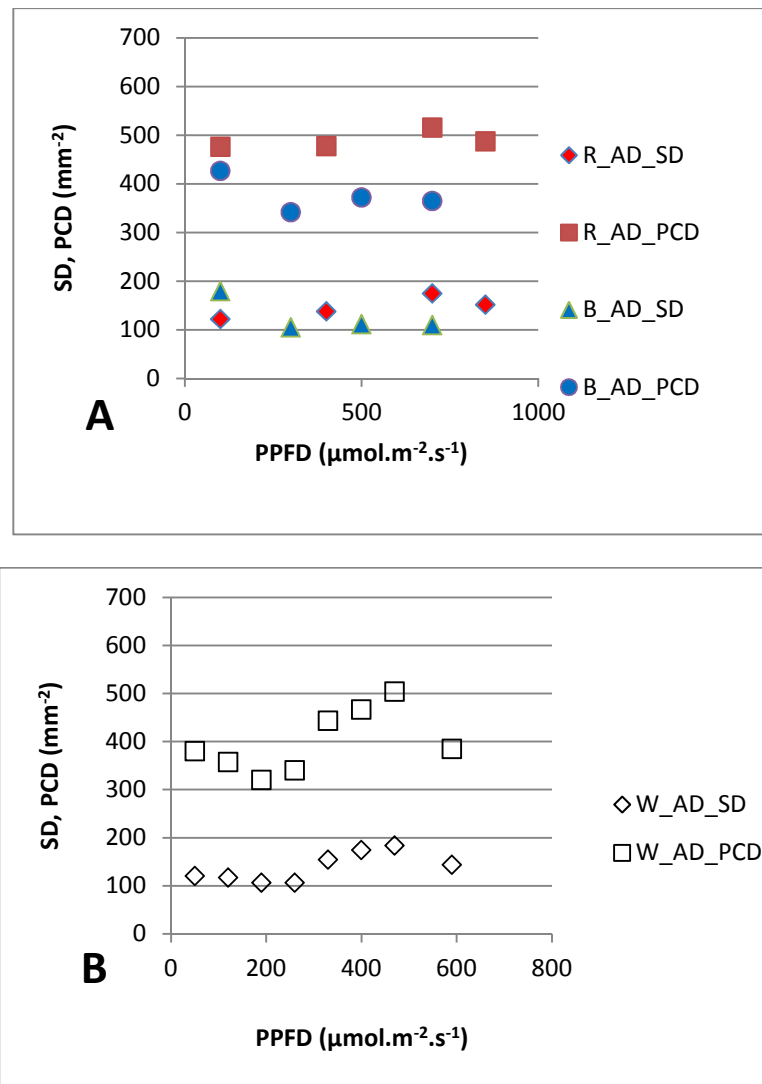
## 4.2 Závislost SD, PCD a SI pravých listů na ozárénosti

### 4.2.1 Vliv ozárénosti na SD a PCD

Obr. 14,15 AB ukazují závislost hustoty průduchů (SD) a hustoty dlaždicových epidermálních buněk (PCD) pravých listů na fotosynteticky aktivní radiaci PAR v červené a modré (Obr. 14A) oblasti spektra. Pro porovnání jsem zařadila i výsledky získané z obdobných pokusů, kde zdrojem fotonů byly LED emitující „bílé“ světlo (Obr. 14B, detaily v Šantrůček et al. 2014). Na (Obr. 14 AB) je znázorněna abaxiální, neboli spodní strana listu a na (Obr. 15 AB) adaxiální, neboli horní.



Obrázek 14: Vliv ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) na hustotu průduchů (SD, stomatal density v  $\text{mm}^{-2}$ ) a hustotu dlaždicových epidermálních buněk (PCD, pavement cells density v  $\text{mm}^{-2}$ ) za ozáření červeným (R) a modrým (B) světlem (A) a bílým (W) světlem (B) na ABAXIÁLNÍ straně pravých listů. U barevného světla je uveden průměr ze třech měření, u bílého průměr ze sedmi.



Obrázek 15: Vliv ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) na hustotu průduchů (SD, stomatal density v  $\text{mm}^{-2}$ ) a hustotu dlaždicových epidermálních buněk (PCD, pavement cells density v  $\text{mm}^{-2}$ ) za ozáření červeným (R) a modrým (B) světlem (A) a bílým (W) světlem (B) na ADAXIÁLNÍ straně pravých listů. U barevného světla je uveden průměr ze třech měření, u bílého průměr ze sedmi.

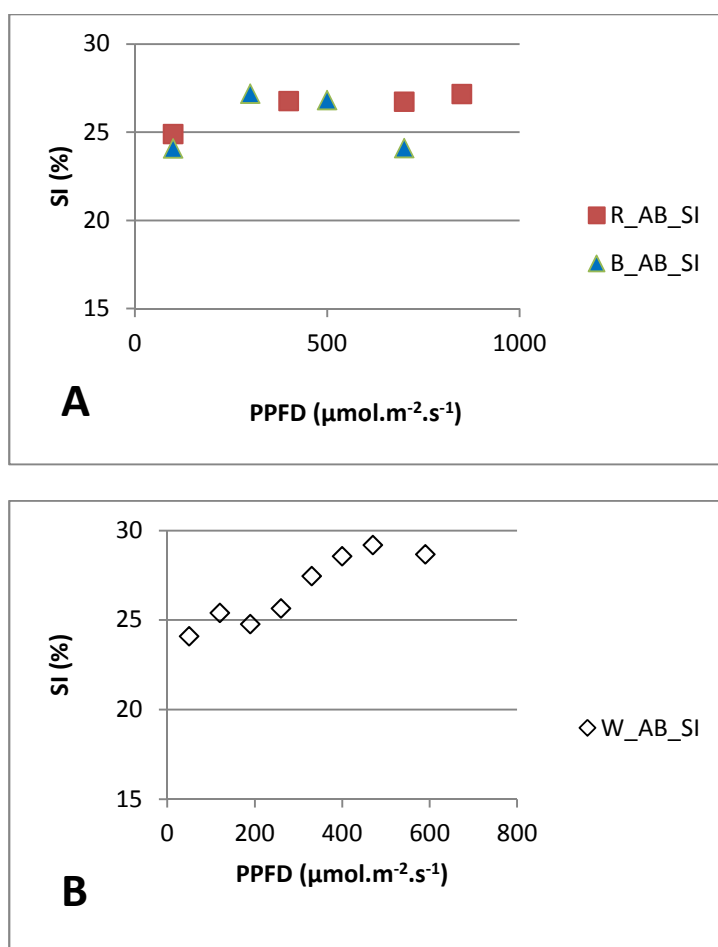
S výjimkou nejnižší hodnoty ozáření, se stoupající ozáření (PAR) roste hustota průduchů (SD) a dlaždicových epidermálních buněk (PCD). Tato závislost je zřetelnější na ABAXIÁLNÍ straně listu, než na straně ADAXIÁLNÍ, což naznačuje, že mechanismus řídící vývoj průduchů je na ABAXIÁLNÍ straně listu.

Celkový počet buněk (průduchových i dlaždicových) je na jednotku plochy listu větší na červeném než na modrém světle (opět s výjimkou nejnižší ozáření).

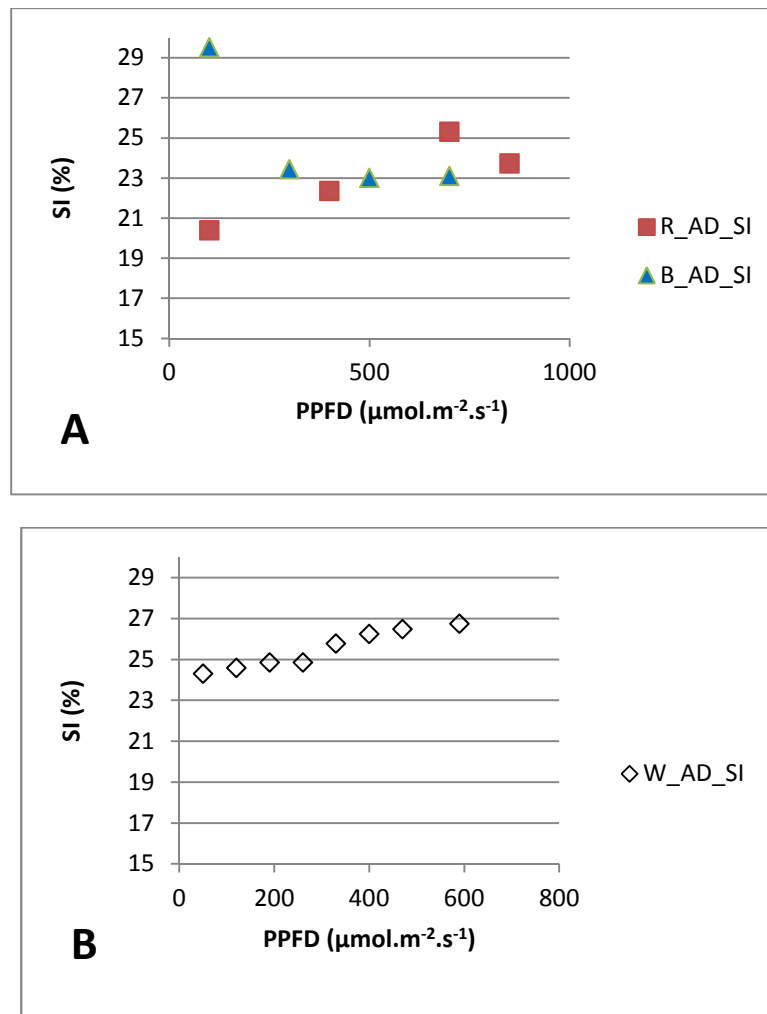
"Bílé" světlo má na změny hustoty průduchů (SD) s ozáření kvalitativně podobný vliv jako "monochromatická" světla.

#### 4.2.2 Vliv ozáření na SI u pravých listů

V následujících grafech (Obr. 16,17 AB) je vynesena závislost průduchového indexu (angl. Stomatal index (SI)) na ozáření PAR červeným, modrým (Obr. 16,17A) a bílým světlem (Obr. 16,17B) u pravých listů. K porovnání s bílým světlem byly použity výsledky z (Šantrůček et al., 2014). Na (Obr. 16 AB) je znázorněna abaxiální, neboli spodní strana listu a na (Obr. 17 AB) adaxiální, neboli horní.



Obrázek 16: Závislost průduchového indexu (SI, %) na ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) za ozáření červeným a modrým světlem (A) a bílým světlem (B) na ABAXIÁLNÍ straně pravých listů. U barevného světla je uveden průměr ze třech měření, u bílého průměr ze sedmi.



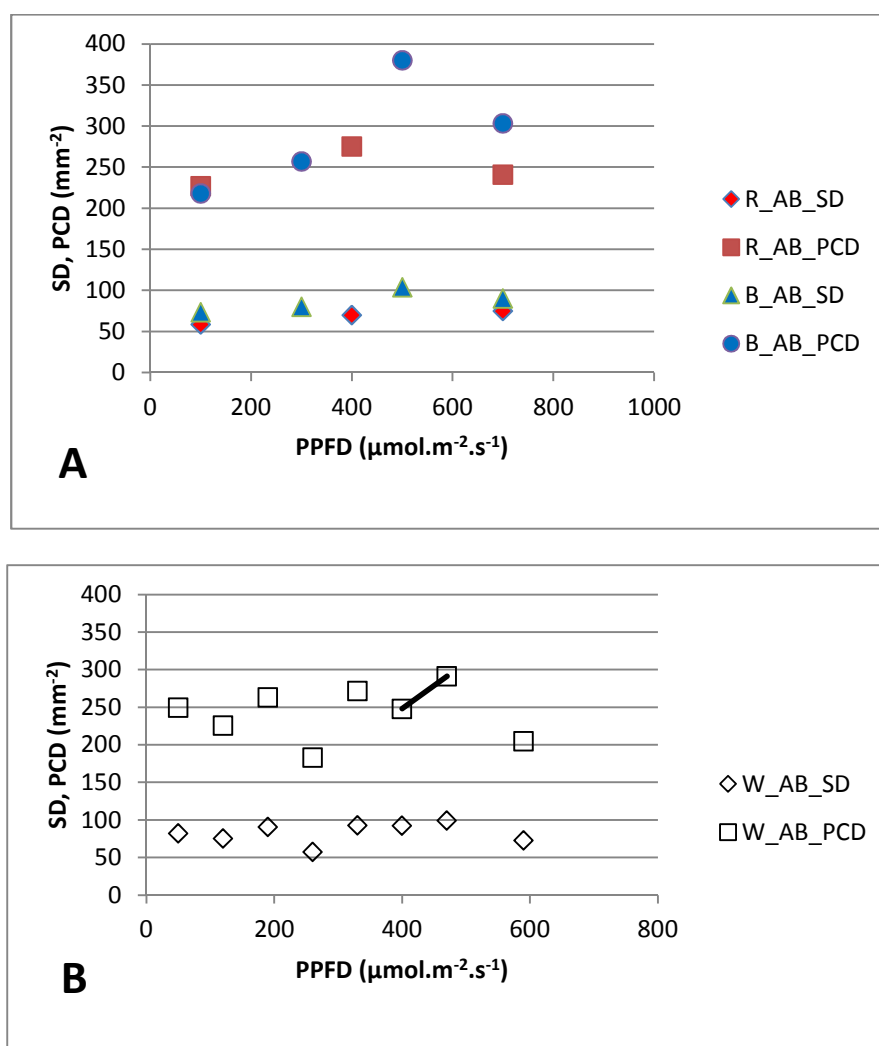
Obrázek 17: Závislost průduchového indexu (SI, %) na ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) za ozáření červeným a modrým světlem (A) a bílým světlem (B) na ADAXIÁLNÍ straně pravých listů. U barevného světla je uveden průměr ze třech měření, u bílého průměr ze sedmi.

Z grafů vyplývá, že průduchový index (SI) na červeném světle roste, zatímco závislost průduchového indexu na modrém světle je nejasná, či dokonce s vyšší fotosynteticky aktivní radiací klesá.

### 4.3 Závislost SD, PCD a SI dělohy na ozáření

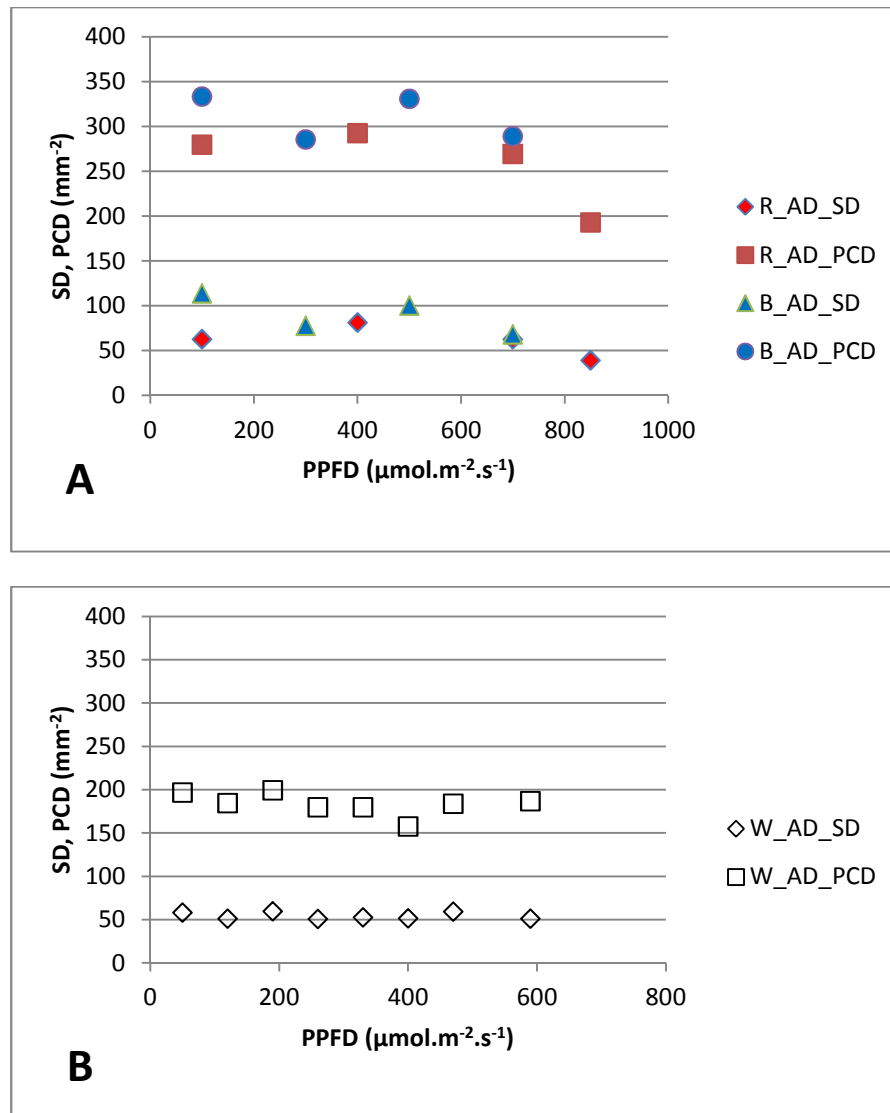
#### 4.3.1 Vliv ozáření na SD a PCD u děloh

U následujících grafů (Obr. 18,19 AB) je stejně jako u grafů předchozích zanesen vliv PAR na SD a PCD pod červeným a modrým osvětlením (Obr. 18A) a osvětlením bílým (Obr. 18B), tentokrát u děloh. Na Obr. 18 AB je znázorněna abaxiální, neboli spodní strana listu a na Obr. 19 AB adaxiální, neboli horní.



Obrázek 18: Vliv ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na hustotu průduchů (SD, stomatal density v  $\text{mm}^{-2}$ ) a hustotu dlaždicových epidermálních buněk (PCD, pavement cells density v  $\text{mm}^{-2}$ ) za ozáření červeným (R) a modrým (B) světlem (A) a bílým (W) světlem (B) na ABAXIÁLNÍ straně děloh. U bílého světla je uveden průměr ze sedmi opakování, u barevného světla je počet opakování variabilní (1-3).





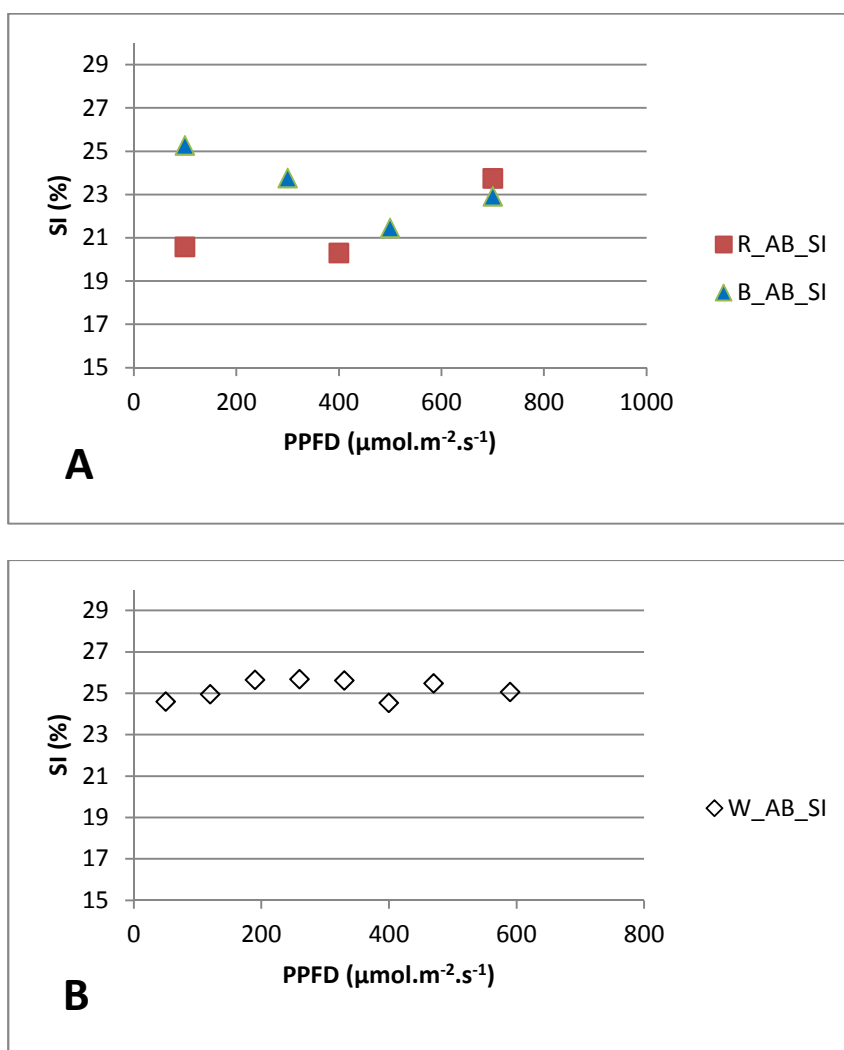
Obrázek 19: Vliv ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) na hustotu průduchů (SD, stomatal density v  $\text{mm}^{-2}$ ) a hustotu dlaždicových epidermálních buněk (PCD, pavement cells density v  $\text{mm}^{-2}$ ) za ozáření červeným (R) a modrým (B) světlem (A) a bílým (W) světlem (B) na ADAXIÁLNÍ straně děloh. U bílého světla je uveden průměr ze sedmi opakování, u barevného světla je počet opakování variabilní (1-3).

Pro malý počet opakování ( $n=1-3$ ) nemůžeme o vlivu barevného světla na dělohy interpretovat žádný spolehlivý závěr. Nicméně nezdá se, že by hustota průduchů a hustota dlaždicových epidermálních buněk, v červeném a modrém světle, vykazovaly nějakou systematickou závislost na ozáření. Obdobné výsledky jeví dělohy na světle bílém.

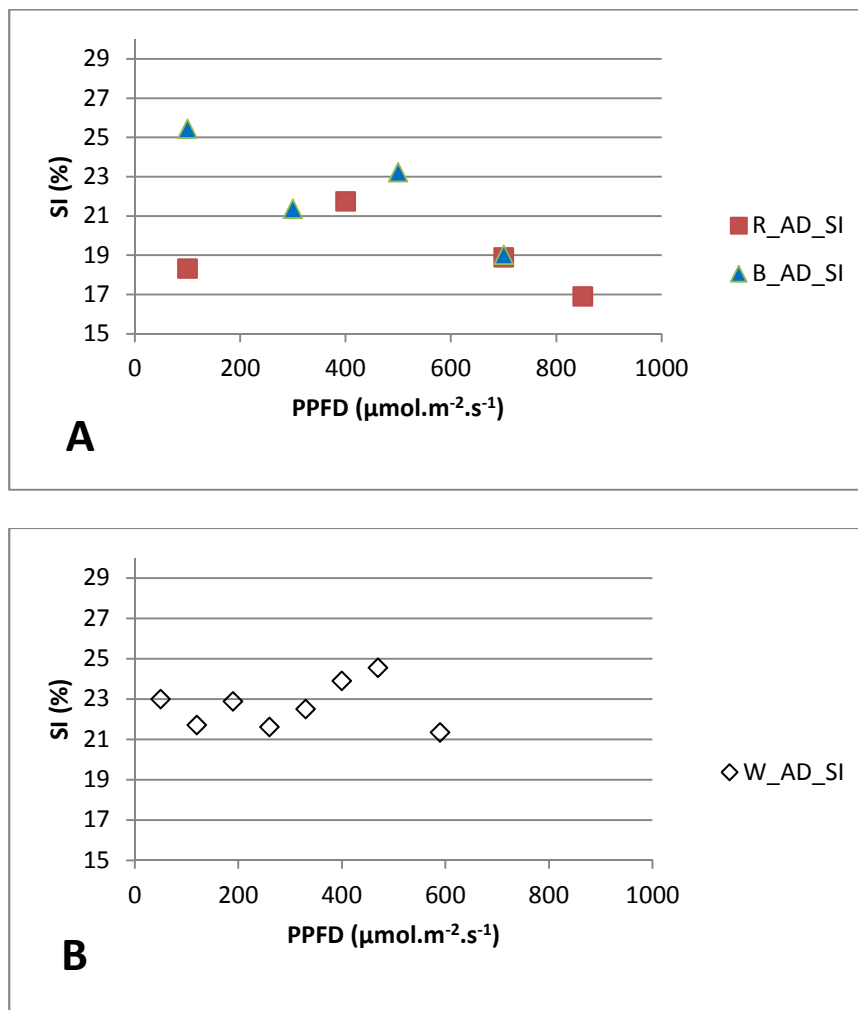
Hustota dlaždicových epidermálních buněk na ADAXIÁLNÍ straně děloh byla v obou monochromatických světlech asi o 50% vyšší než na ADAXIÁLNÍ straně ve světle bílém.

### 4.3.2 Vliv ozáření na SI děloh

Obrázek 20 a 21 ukazuje závislost SI na PAR pod monochromatickým osvětlením (Obr. 20,21A) a osvětlením bílém (Obr. 20,21B), u děloh. Na Obr. 20AB je znázorněna abaxiální strana listu a na Obr. 21AB adaxiální.



Obrázek 20: Závislost průduchového indexu (SI, %) na ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) za ozáření červeným a modrým světlem (A) a bílým světlem (B) na ABAXIÁLNÍ straně děloh. U barevného světla je uveden průměr ze třech měření, u bílého průměr ze sedmi.



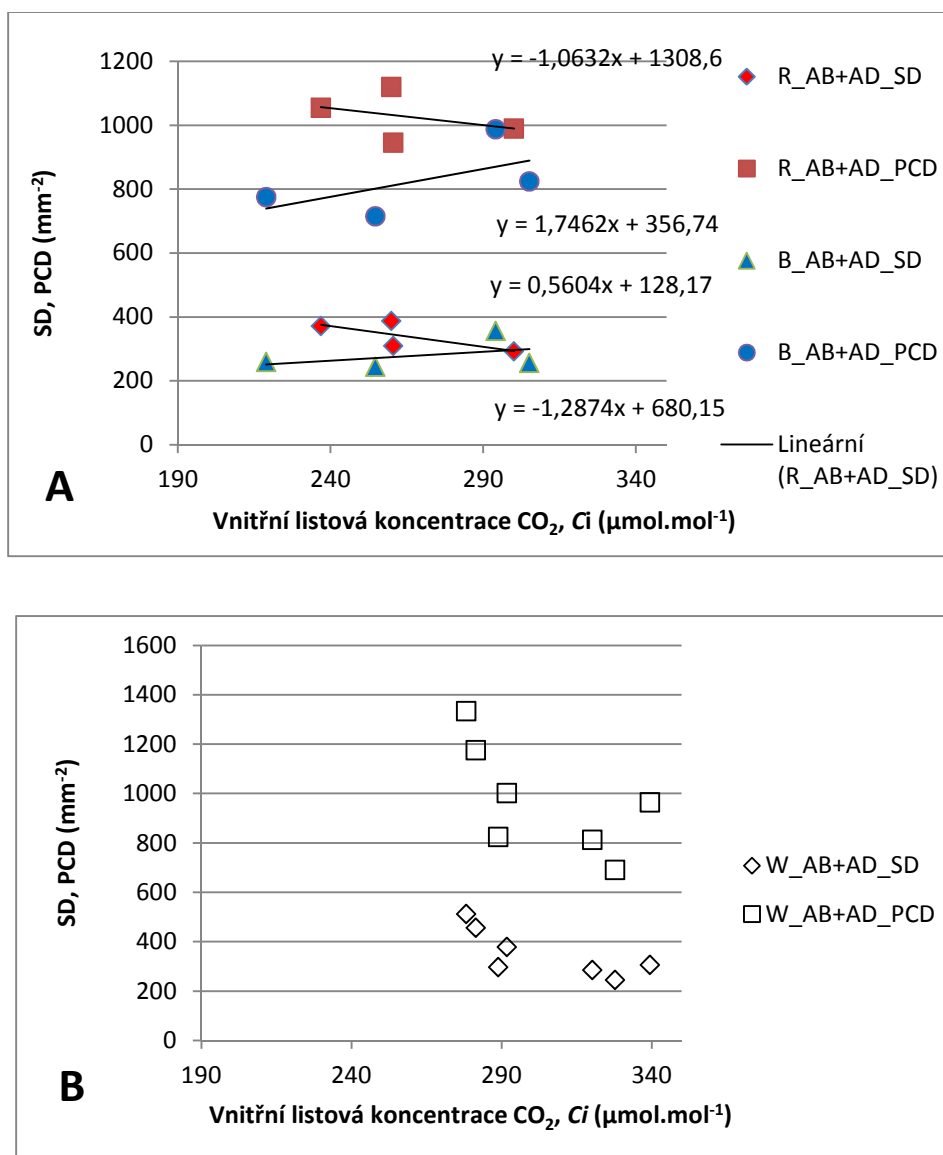
Obrázek 21: Závislost průduchového indexu (SI, %) na ozáření (PPFD, photosynthetic photon flux density,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) za ozáření červeným a modrým světlem (A) a bílým světlem (B) na ADAXIÁLNÍ straně pravých listů. U barevného světla je uveden průměr ze třech měření, u bílého průměr ze sedmi.

Stejně jako pro SD a PCD nelze, u děložních listů za monochromatického světla, pro příliš velký rozptyl hodnot a malý počet opakování ( $n=1-3$ ) stanovit, jakýkoliv spolehlivý závěr, potvrzující závislost průduchového indexu SI na množství fotosynteticky aktivní radiace.

#### **4.4 Závislost SD, PCD a SI pravých listů na koncentraci CO<sub>2</sub> uvnitř listu (C<sub>i</sub>)**

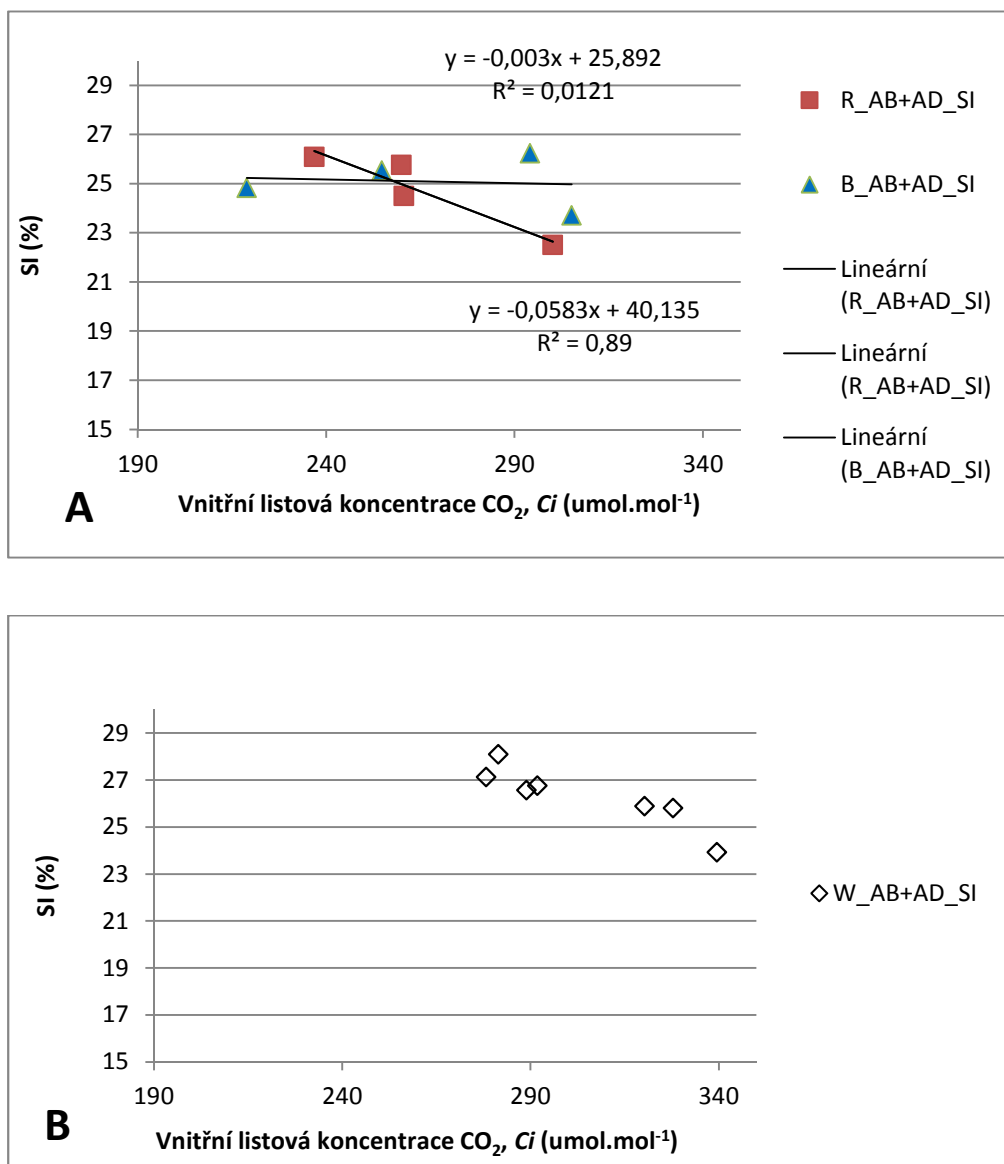
V grafech na obr. 22,23 AB jsou vyneseny závislosti hustoty průduchů a hustoty dlaždicových epidermálních buněk pravých listů rostlin pěstovaných v červeném, modrém (Obr. 22A) a bílém světle (Obr. 22B) na koncentraci CO<sub>2</sub> v intercelulárních vzdušných prostorech (C<sub>i</sub>) počítané z izotopového složení sušiny listů. V grafech na Obr. 23AB pak závislost průduchového indexu na C<sub>i</sub> červeným, modrým (Obr. 23A) a bílým světlem (Obr. 23B). U všech grafů (Obr. 22,23 AB) jsou vyneseny hodnoty SD a PCD jako součty z obou stran (abaxiální + adaxiální) pravých listů.

#### 4.4.1 Vliv vnitřní koncentrace $C_i$ na SD a PCD u pravých listů



Obrázek 22: Závislost hustoty průduchů (SD, stomatal density) a hustoty dlaždicových epidermálních buněk (PCD, pavement cells density) na vnitřní listové koncentraci  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) zjištěné výpočtem z izotopového poměru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  v sušině rostlin pěstovaných na červeném, modrém světle (A) a bílém světlem (B). U obou grafů (AB) jsou vynesena data jako součet ABAXIÁLNÍ+ADAXIÁLNÍ strany pravých listů. U bílého světla je uveden průměr ze sedmi opakování, u barevného světla je průměr ze třech opakování.

#### 4.4.2 Účinek koncentrace $C_i$ na SI pravých listů



Obrázek 23: Závislost průduchového indexu (SI, %) na vnitřní listové koncentraci  $CO_2$  ( $C_i$ ) zjištěné výpočtem z izotopového poměru  $^{13}C/^{12}C$  v sušině rostlin pěstovaných na červeném, modrém světle (A) a bílém světle (B). V grafech jsou vyneseny hodnoty dohromady z ABAXIÁLNÍ+ADAXIÁLNÍ strany pravých listů. U bílého světla je uveden průměr ze sedmi opakování, u barevného světla je průměr ze třech opakování.

Výsledky naznačují negativní regresní závislost mezi hustotou průduchů a vnitřní listovou koncentrací  $CO_2$ , obdobně jako mezi průduchovým indexem a vnitřní listovou koncentrací u rostlin pěstovaných v červeném světle. Podobná závislost byla nalezena dříve pro bílé světlo (viz. Obr. 22B,23B). Tato závislost je konsistentní spíše s reakcí na červené světlo, než na modré.

Hustota průduchů SD i průduchový index SI se u pravých listů, v závislosti na vzrůstající vnitřní listové koncentraci  $C_i$ , při červeném světle snižují, zatímco při modrém se zvyšují (viz. Obr. 22A,23A). V modrém světle četnost průduchů ani epidermálních buněk s klesající vnitřní listovou koncentrací  $C_i$  nestoupá, ale naopak má tendenci klesat.

Průduchový index SI se při modrém světle v závislosti na vnitřní listové koncentraci  $C_i$  nemění.

## 5 Diskuze

Má práce by měla navazovat na předchozí studie (Šantrůček et al., 2014) a rozšířit dosavadní poznání růstu listu a vývoje průduchů na „bílém“ světle o světla barevná, „monochromatická“, emitující proud fotonů v úzkém pásu červeného nebo modrého světla.

### 5.1 Charakterizace růstu rostlin na monochromatickém světle

Výsledky mého experimentu potvrzují očekávání, že se vzrůstající ozářeností listů PAR stoupá i množství (podzemní i nadzemní) rostlinné biomasy. Nejsignifikantněji se projevuje rozdíl mezi nejnižší a následnou vyšší ozářeností, v případě červeného světla mezi 100 a 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a v případě světla modrého mezi 100 a 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Rostliny rostoucí za nejnižší ozářenosti jeví výrazně sníženou fitness (měřeno kumulací suché hmoty na jednu rostlinu). Rozdíl mezi ozářeností 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  v červeném a 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ve světle modrém, oproti ozářenostem vyšším se nezdál být pro růst rostlin (tj. celkovou kumulaci biomasy za 21 dnů) signifikantně významný. Fotony červeného světla byly pro tvorbu rostlinné biomasy využity efektivněji, protože stejná hustota toku dopadajících fotonů v červené oblasti vedla k větší kumulaci biomasy než v oblasti modré (Obr. 11AB), což podporuje i mnoho dalších publikací (Ponton, Dupouey, Bréda, & Dreyer, 2002; Samuolienė, Brazaitytė, & Urbonavičiūtė, 2010). Nicméně nacházejí se i práce podporující naopak výsledky opačné (Muneer, Kim, Park, & Lee, 2014). Ze sledovaného poměru suché hmoty kořenů ku nadzemní rostlinné biomase vyplývá, že rostliny v červeném i modrém světle při nízké ozářenosti investovaly více asimilovaného uhlíku do růstu nadzemní části, než kořenů. Preferenční alokace uhlíku do listů je typická pro rostliny vystavené zastínění (Cruz, 1997; Naidu & Delucia, 1997).

Co se týče spotřeby  $\text{H}_2\text{O}$  na mg sušiny, největší hodnoty vykazovali (až na výjimku nejvyšší ozářenosti modrým světlem při 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  jedinci rostoucí za nejnižší ozářenosti 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . To naznačuje, že při nedostatku zářivé energie, a to jak na červeném, tak modrém světle, na jednotku sušiny rostlina spotřebuje vyšší množství vody (viz Obr. 13). Účinnost využití vody rostlinou ( $\text{WUE}=1/\text{transpirační poměr}$ ) byla tedy při malé ozářenosti nižší než při vysoké ozářenosti, což mimo jiné ukazuje na to, že rostliny byly dostatečně zásobené vodou ale limitující pro jejich růst byla zářivá energie. V literatuře je možno nalézt



řadu měření hodnot WUE pro kontrastní ozáření a dostupnost pudní vody, které tuto závislost potvrzují (Ponton et al., 2002).

## **5.2 Charakteristiky vývoje průduchů na pravých listech a dělohách při pěstování v monochromatickém světle: 1. efekt ozáření**

Naměřené výsledky potvrzují dříve zjišťovaný korelační vztah mezi hustotou průduchů (SD) nebo hustotou dlaždicových epidermálních buněk (PCD) a ozářeními pravých listů (Lake et al., 2001; Schoch et al., 1984; Ticha, 1982). Tento efekt ozáření na vývoj buněk epidermis byl v mých měřeních patrný hlavně při kultivaci rostlin v červeném, méně pak v modrém světle (viz obr. 14A). Srovnání s předchozími měřeními řeřichy v „bílém“ světle (Šantrůček et al. 2014) naznačuje, že bílé světlo má na změny hustoty průduchů s ozářeními podobný vliv jako červené světlo: s rostoucí ozářeními rostl také počet buněk na jednotce plochy epidermis, buňky epidermis (průduchy i dlaždicové buňky) se stávaly menší a četnější. Výsledky získané na modrém světle byly podobné pro dlaždicové buňky ale nejednoznačné pro průduchy (viz obr. 14A). Výraznější závislost SD a PCD na ozáření se projevila na spodní (abaxiální) straně listu, z čehož vyplývá, že spodní epidermis pravých listů reaguje na fotosynteticky aktivní radiaci citlivěji než horní epidermis. Hustota průduchů u červeného i modrého světla ve všech případech koreluje s hustotou dlaždicových epidermálních buněk, tak jako to bylo prokázáno v jiných pracích (Poole et al., 2000).

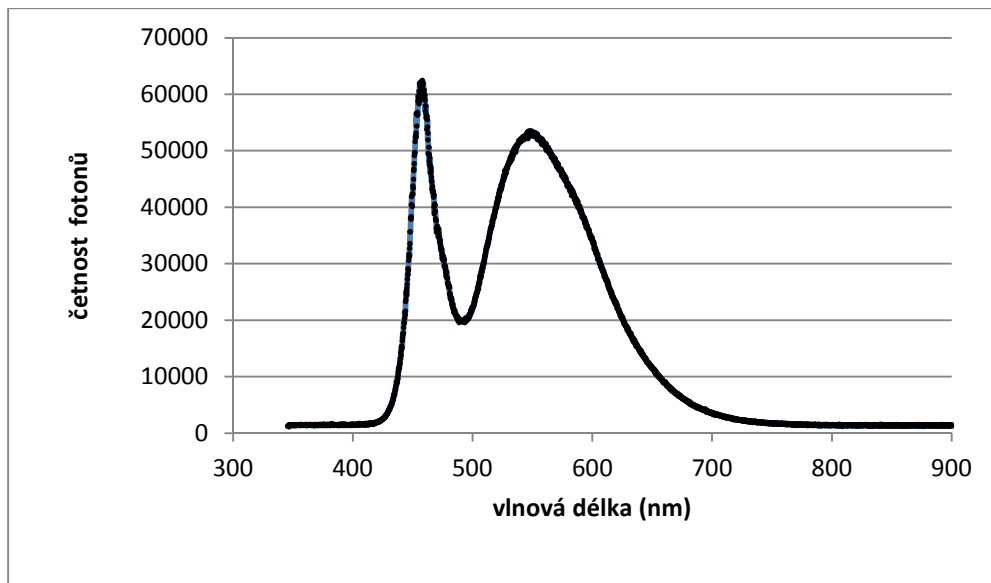
Z výsledků vyplývá, že celkový počet buněk (průduchů i dlaždicových) na jednotku plochy pravého listu (je s výjimkou nejnižší ozáření) větší na červeném, než na modrém světle. S ozářeními červeným světlem průduchový index (SI) roste (podobně jako v bílém světle), zatímco na světle modrém je závislost nejasná, či jeví známky negativní korelace.

Pro dělohy mohu obtížně vyvodit jakýkoliv závěr, jelikož jsou výsledky zatíženy malým počtem opakování (n=1-3), způsobeným technickou náročností odběrů otisků. Nicméně nezdá se, že by hustota průduchů a dlaždicových epidermálních buněk vykazovaly nějakou systematickou závislost na ozáření. Obdobný trend byl opět prokázán při ozáření „bílým“ světlem (Šantrůček et al., 2014). Pozoruhodné je, že hustota dlaždicových buněk byla na adaxiální straně děloh v obou „monochromatických“ světlech asi o 50% vyšší než na adaxiální straně ve světle „bílém“.

Obdobně jako u SD a PCD nemohu u závislosti průduchového indexu děloh na ozáření stanovit jakýkoli spolehlivý závěr, jelikož je rozptyl hodnot příliš velký (malý počet opakování,  $n=1-3$ ).

### **5.3 Charakteristiky vývoje průduchů na pravých listech a dělohách při pěstování v monochromatickém světle: 2. efekt koncentrace CO<sub>2</sub> uvnitř listu**

Výsledky mého experimentu naznačují, že negativní závislost mezi hustotou průduchů SD i dlaždicových buněk PCD a vnitřní listovou koncentrací CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), stejně tak jako mezi průduchovým indexem SI a  $C_i$ , nalezené dříve pro „bílé“ světlo, odpovídají u pravých listů spíše reakci na červené než na modré světlo. Hustota průduchových buněk i dlaždicových epidermálních buněk se vzrůstající koncentrací CO<sub>2</sub> v mezibuněčných prostorech a v chloroplastech klesá v červeném i bílém světle, zatímco v modrém světle se zvyšuje. Tedy odpověď na modré světlo jeví opačný trend, než odpověď na světlo červené, nebo „bílé“. Stejně tak průduchový index, který při zvyšující se vnitřní koncentraci  $C_i$  v červeném i „bílé“ světle klesá, zůstává v modrém světle konstantní. Přitom citlivost SD a PCD na změny  $C_i$  je podstatně vyšší v bílém než v červeném světle. Což by mohlo naznačovat, že při vývoji epidermálních buněk v závislosti na  $C_i$  budou hrát významnější roli fotoreceptory červeného světla, než modrého. Z předchozího lze také vyvodit, že účinek  $C_i$  na SD a PCD v bílém světle není součtem obou účinků v monochromatických světlech. Tento závěr je pozoruhodný protože emisní spektrum zdroje bílého světla má bimodální rozdělení s maximy v podobných oblastech jako použité červené a modré LED zdroje. Pro srovnání přikládám ještě graf bílého spektra LED zdroje s maximy v 458 nm a 549 nm (Obr. 24).



Obrázek 24: Změřená absorpční maxima bílého záření emitovaného LED diodami kultivátoru (Multi-Cultivator MC 1000)

## 6 Závěr

Z výsledků pokusů, které jsem prováděla na rostlinách řeřichy zahradní (*Lepidium sativum* L.) vyplývá, že vývoj průduchů závisí nejen na světelné kvantitě, vyjádřené množstvím fotosynteticky aktivní radiace dopadající na list, ale i jeho kvalitě, neboli vlnové délce. Se zvyšující se ozářeností rostla u pravých listů jak hustota průduchů (SD), tak dlaždicových buněk (PCD). Při růstu rostlin v červeném světle docházelo, oproti světlu modrému (s výjimkou nejnižší ozářenosti), k tvorbě většího celkového počtu buněk (průduchů i dlaždicových) na jednotku plochy pravého listu. Se zvyšující se ozářeností červeným světlem, na rozdíl od světla modrého, rostl i průduchový index, tedy podíl buněk epidermis, které se staly svěracími buňkami průduchů. Abaxiální (spodní) strana listu reagovala na změny fotosynteticky aktivní radiace citlivěji než adaxiální (horní) strana.

U děložních listů jsme z důvodu malého počtu opakování nemohli stanovit žádnou prokazatelnou závislost. Ale nezdá se, že by ozářenost či rozdílná chromatičnost hrála při vlivu na hustotu průduchů u děloh nějakou zásadní roli.

Výsledky našich experimentů dále prokázaly rozdílný vztah hustoty průduchů, hustoty dlaždicových buněk a průduchového indexu ke koncentraci  $\text{CO}_2$  uvnitř listu  $C_i$  v závislosti na tom zda rostliny rostly v červeném a modrém světle. Hustota průduchových buněk, dlaždicových epidermálních buněk a průduchový index se vzrůstající koncentrací  $\text{CO}_2$  uvnitř listu ozářeností na červeném světle klesá, zatímco pod modrým zůstává konstantní, nebo se zvyšuje.

## 7 Seznam citované literatury

- Appleby, R. F., & Davies, W. J. (1983a). A possible evaporation site in the guard cell wall and the influence of leaf structure on the humidity response by stomata of woody plants. *Oecologia*, *56*, 30–40.
- Appleby, R. F., & Davies, W. J. (1983b). The structure and orientation of guard cells in plants showing stomatal response to changing vapour pressure difference. *Annals of Botany*, *52*, 459–468.
- Assmann, S. M., & Wang, X. Q. (2001). From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*(5), 421–428.
- Beerling, D. J., & Woodward, F. I. (1995). Leaf stable carbon-isotope composition records increased water-use efficiency of C3 plants in response to atmospheric CO2 enrichment. *Functional Ecology*, *9*(3), 394–401.
- Bergmann, D. C., & Sack, F. D. (2007). Stomatal development. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 163–181. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.104023
- Bergmann, D. C., Lukowitz, W., Somerville, C. R. (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, *304*, 1494–1497.
- Bird, S. M., & Gray, J. E. (2003). Signals from the cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytologist*, *157*(1), 9–23. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00543.x
- Boccalandro, H. E., Rugnone, M. L., Moreno, J. E., Ploschuk, E. L., Serna, L., Yanovsky, M. J., & Casal, J. J. (2009). Phytochrome B Enhances Photosynthesis at the Expense of Water-Use Efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *150*(June), 1083–1092. doi:10.1104/pp.109.135509
- Casson, S. A., Franklin, K. A., Gray, J. E., Grierson, C. S., Whitlam, G. C., & Hetherington, A. M. (2009). Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. *Current Biology*, *19*(3), 229–234. doi:10.1016/j.cub.2008.12.046
- Casson, S. A., & Hetherington, A. M. (2010). Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(1), 90–5. doi:10.1016/j.pbi.2009.08.005
- Coupe, S. a, Palmer, B. G., Lake, J. a, Overy, S. a, Oxborough, K., Woodward, F. I., ... Quick, W. P. (2006). Systemic signalling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Experimental Botany*, *57*(2), 329–341. doi:10.1093/jxb/erj033
- Croxdale, J. (2007). Stomata. In K. Roberts (Ed.), *Handbook of Plant Science* (pp. 144–148). Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.

- Croxdale, J., Smith, J., Yandell, B., & Johnson, J. B. (1992). Stomatal patterning in *Tradescantia*: an evaluation of the cell lineage theory. *Developmental Biology*, *149*(1), 158–167.
- Cruz, P. (1997). Effect of shade on the carbon and nitrogen allocation in a perennial tropical grass, *Dichanthium aristatum*. *Journal of Experimental Botany*, *48*(306), 15–24.
- Delgado, D., Ballesteros, I., Torres-Contreras, J., Mena, M., & Fenoll, C. (2012). Dynamic analysis of epidermal cell divisions identifies specific roles for COP10 in *Arabidopsis* stomatal lineage development. *Planta*, *236*(2), 447–461. doi:10.1007/s00425-012-1617-y
- Dong, J., MacAlister, C. a, & Bergmann, D. C. (2009). BASL controls asymmetric cell division in *Arabidopsis*. *Cell*, *137*(7), 1320–1330. doi:10.1016/j.cell.2009.04.018
- Donnelly, P. M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R. E., & Dengler, N. G. (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, *215*(2), 407–419. doi:10.1006/dbio.1999.9443
- Edwards, D., Kerp, H., & Hass, H. (1998). Stomata in early land plants : an anatomical and ecophysiological approach. *Journal of Experimental Botany*, *49*(March), 255–278.
- Farquhar, G. D., Ehleringer, I. J. R., & Hubick, K. T. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Psysiol. Plant Mol. Biol.*, *40*, 503–537.
- Franks, P. J., & Beerling, D. J. (2009). Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(25), 10343–10347. doi:10.1073/pnas.0904209106
- Frechilla, S., Talbott, L. D., Bogomolni, R. a, & Zeiger, E. (2000). Reversal of blue light-stimulated stomatal opening by green light. *Plant & Cell Physiology*, *41*(2), 171–176.
- Gedney, N., Cox, P. M., Betts, R. a, Boucher, O., Huntingford, C., & Stott, P. A. (2006). Detection of a direct carbon dioxide effect in continental river runoff records. *Nature*, *439*(7078), 835–838. doi:10.1038/nature04504
- Geisler, M., Nadeau, J., & Sack, F. D. (2000). Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in *Arabidopsis* are disrupted by the too many mouths mutation. *The Plant Cell*, *12*(11), 2075–2086. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=150159&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gray, J. E., Holroyd, G. H., van der Lee, F. M., Bahrami, A. R., Sijmons, P. C., Woodward, F. I., ... Hetherington, A. M. (2000). The HIC signalling pathway links CO<sub>2</sub> perception to stomatal development. *Nature*, *408*(6813), 713–716. doi:10.1038/35047071

- Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C., & Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, *21*(14), 1720–1725. doi:10.1101/gad.1550707
- Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K. M., ... Kakimoto, T. (2009). Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in *Arabidopsis* leaves. *Plant & Cell Physiology*, *50*(6), 1019–1031. doi:10.1093/pcp/pcp068
- Hetherington, A. M., & Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change, *424*(August), 901–908.
- Jeffrey, M. ., Osborn, & Taylor, T. N. . (1990). Morphological and Ultrastructural Studies of Plant Cuticular Membranes . I . Sun and Shade Leaves of *Quercus velutina* ( Fagaceae ). *Botanical Gazette*, *151*(4), 465–476.
- Jelínková Irena. (2011). *Vliv faktorů prostředí na vývoj průduchů*. Bakalářská práce. Zemědělská fakulta. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. 49pp.
- Kang, C.-Y., Lian, H.-L., Wang, F.-F., Huang, J.-R., & Yang, H.-Q. (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *21*(9), 2624–2641. doi:10.1105/tpc.109.069765
- Kerstiens, G. (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of Experimental Botany*, *47*, 1813–1832.
- Kinoshita, T., & Shimazaki, K. I. (1999). Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *The EMBO Journal*, *18*(20), 5548–5558. doi:10.1093/emboj/18.20.5548
- Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitlam, G. C., & Franklin, K. A. (2009). High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology*, *19*, 408–413.
- Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., ... Sakagami, Y. (2010). Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. *Plant & Cell Physiology*, *51*(1), 1–8. doi:10.1093/pcp/pcp180
- Körner, C. (1994). Scaling from species to vegetation: the usefulness of functional groups. In E. D. Schulze & H. A. Mooney (Eds.), *Biodiversity and Ecosystem Function*. (pp. 117–140). Berlin: Springer.
- Lai, L. B., Nadeau, J. A., Lucas, J., Lee, E., Nakagawa, T., & Zhao, L. (2005). The *Arabidopsis* R2R3 MYB Proteins FOUR LIPS and MYB88 Restrict Divisions Late in the Stomatal Cell Lineage, *17*(October), 2754–2767. doi:10.1105/tpc.105.034116.)
- Lake, J. A., Quick, W. P., Beerling, D. J., & Woodward, F. I. (2001). Signals from mature to new leaves. *Nature*, *411*, 154.

- Lampard, G. R., Macalister, C. A., & D.C., B. (2008). Arabidopsis Stomatal Initiation Is Controlled by MAPK-Mediated Regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science*, 322, 1113–1116.
- Larkin, J. C., Marks, M. D., Nadeau, J., & Sack, F. (1997). Epidermal cell fate and patterning in leaves. *The Plant Cell*, 9(7), 1109–1120. doi:10.1105/tpc.9.7.1109
- Liu, L.-J., Zhang, Y.-C., Li, Q.-H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.-L., ... Yang, H.-Q. (2008). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(2), 292–306. doi:10.1105/tpc.107.057281
- MacAlister, C. A., & Bergmann, D. C. (2007). Stomatal Patterning. In K. Roberts (Ed.), *Handbook of Plant Science* (pp. 452–459). Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- McKee, I. F., Farage, P. K., & Long, S. P. (1995). The interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> concentration on photosynthesis in spring wheat. *Photosynthesis Research*, 45(2), 111–119.
- Miyazawa, S.-I., Livingston, N. J., & Turpin, D. H. (2006). 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*, 57(2), 373–380. doi:10.1093/jxb/eri278
- Monte, E., Al-Sady, B., Leivar, P., & Quail, P. H. (2007). Out of the dark: how the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3125–3133. doi:10.1093/jxb/erm186
- Morison, J. I. L. (1998). Stomatal response to increased CO concentration, 49(March), 443–452.
- Muneer, S., Kim, E. J., Park, J. S., & Lee, J. H. (2014). Influence of Green, Red and Blue Light Emitting Diodes on Multiprotein Complex Proteins and Photosynthetic Activity under Different Light Intensities in Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4657–70. doi:10.3390/ijms15034657
- Naidu, S. L., & Delucia, E. H. (1997). Growth , Allocation and Water Relations of Shade-grown *Quercus rubra* L . Saplings Exposed to a Late-season Canopy Gap. *Annals of Botany*, 80, 335–344.
- Pesacreta, T. C., & Hasenstein, K. H. (1999). The Internal Cuticle of *Cirsium horridulum* ( Asteraceae ) Leaves. *American Journal of Botany*, 86(7), 923–928.
- Pillitteri, L. J., & Dong, J. (2013). Stomatal development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 11(12), 1–26. doi:10.1199/tab.0162
- Ponton, S., Dupouey, J.-L., Bréda, N., & Dreyer, E. (2002). Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment



- interactions. *Tree Physiology*, 22(6), 413–422. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11960766>
- Poole, I., Lawson, T., Weyers, J. D. B., & Raven, J. A. (2000). Effect of elevated CO on the stomatal distribution and leaf physiology of *Alnus glutinosa*. *New Phytologist*, 145, 511–521.
- Rasmussen, H. (1986). Pattern formation and cell interactions in epidermal development of *Anemarrhena asphodeloides* (Liliaceae). *Nordic Journal of Botany*, 6(4), 467–477.
- Sachs, T. (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants, 83–93.
- Sachs, T. (1991). *Pattern formation in plant tissues* (pp. 205–206). Cambridge University Press.
- Samuolienė, G., Brazaitytė, A., & Urbonavičiūtė, A. (2010). The effect of red and blue light component on the growth and development of frigo strawberries. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97(2), 99–104.
- Serna, L., Torres-Contreras, J., & Fenoll, C. (2002). Clonal analysis of stomatal development and patterning in *Arabidopsis* leaves. *Developmental Biology*, 241(1), 24–33. doi:10.1006/dbio.2001.0506
- Shimada, T., Sugano, S. S., & Hara-Nishimura, I. (2011). Positive and negative peptide signals control stomatal density. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68, 2081–2088. doi:10.1007/s00018-011-0685-7
- Shpak, E. D., McAbee, J. M., Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2005). Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science*, 309, 290–293.
- Schoch, P. G., Jacques, R., Lecharny, A., & Sibi, M. (1984). Dependence of the Stomatal Index on Environmental Factors during Stomatal Differentiation in Leaves of *Vigna sinensis* L. II. EFFECT OF DIFFERENT LIGHT QUALITY. *Journal of Experimental Botany*, 35(10), 1405–1409.
- Schreiber, L., & Riederer, M. (1996). International Association for Ecology Ecophysiology of Cuticular Transpiration : Comparative Investigation of Cuticular Water Permeability of Plant Species from Different Habitats. *Oecologia*, 107(4), 426–432.
- Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). Guard Cell Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 627–658.
- Šantrůček, J., Vráblová, M., Šimková, M., Hronková, M., Drtinová, M., Květoň, J., ... Schreiber, L. (2014). Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO<sub>2</sub> concentration. *Annals of Botany*, *In Press*.
- Thomas, P. W., Woodward, F. I., & Quick, W. P. (2003). Systemic irradiance signalling in tobacco. *New Phytologist*, 161(1), 193–198. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00954.x

- Ticha, I. (1982). Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. *Photosynthetica*, 16, 375–471.
- Wagner, F., Below, R., Klerk, P. D., Dilcher, D. L., Joosten, H., & Kurschner, W. M. (1996). A natural experiment on plant acclimation: Lifetime stomatal frequency response of an individual tree to annual atmospheric CO<sub>2</sub> increase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(October), 11705–11708.
- Woodward, F. I. (1987). Stomatal numbers are sensitive to increases in CO<sub>2</sub> from pre-industrial levels. *Nature*, 327, 617–618.
- Woodward, F. I., & Bazzaz, F. A. (1988). The Responses of Stomatal Density to CO<sub>2</sub> Partial Pressure. *Journal of Experimental Botany*, 39(12), 1771–1781.
- Woodward, F. I., & Kelly, C. K. (1995). The influence of CO<sub>2</sub> concentration on stomatal density. *New Phytologist*, 131, 311–327.
- Wullschleger, S. D., & Oosterhuis, D. M. (1989). The occurrence of an internal cuticle in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf stomates. *Environmental and Experimental Botany*, 29(2), 229–235. doi:10.1016/0098-8472(89)90054-3
- Yang, H., Tang, R., & Cashmore, A. R. (2001). The Signaling Mechanism of *Arabidopsis* CRY1 Involves Direct Interaction with COP1, 13(December), 2573–2587. doi:10.1105/tpc.010367.like
- Zeiger, E. (2000). Sensory transduction of blue light in guard cells. *Trends in Plant Science*, 5(5), 183–185.
- Zeiger, E., & Zhu, J. (1998). Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light – CO interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany*, 49(March), 433–442.
- Zhao, L., & Sack, F. D. (1999). Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *American Journal of Botany*, 86(7), 929–939.