



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO NA OBSAH ENZYMU RUBISCO U BUKU LESNÍHO A SMRKU ZTEPILÉHO

IMPACT OF ELEVATED CARBON DIOXIDE CONCENTRATION ON RUBISCO CONTENT IN
FAGUS SYLVATICA AND PICEA ABIES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

DOMINIKA HAMŘÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2013



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0727/2012** Akademický rok: **2012/2013**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Dominika Hamříková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)
Vedoucí práce **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah enzymu Rubisco u buku lesního a smrku ztepilého

Zadání bakalářské práce:

V teoretické části pojednat o základních procesech fotosyntézy, úloze enzymu Rubisco a vlivu zvýšené koncentrace CO₂ a expozice (slunný/stinný list) na obsah enzymu Rubisco.

V experimentální části vyhodnotit působení zvýšené koncentrace CO₂ na obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního a smrku ztepilého.

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

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

Dominika Hamříková
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byl sledován obsah enzymu Rubisco u buku lesního (*Fagus sylvatica*) a smrku ztepilého (*Picea abies*) pěstovaných v podmínkách normální (A), tj. $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ a zvýšené (E), tj. $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ koncentrace oxidu uhličitého a dále obsah Rubisco ve stinných (sh) a slunných (ex) listech, resp. jehlicích. Obsah enzymu byl stanoven metodou SDS-PAGE. Významný pokles obsahu Rubisco byl prokázán v podmínkách E proti A u stinných listů buku. V ostatních případech nebyl pokles tak významný. Při srovnání slunných a stinných jehlic se také neprokázal statisticky významný rozdíl, avšak ve stinných listech buku oproti slunným byl obsah Rubisco významně nižší a zvláště pak v podmínkách E.

ABSTRACT

In this bachelor's thesis content of Rubisco in beech (*Fagus sylvatica*) and Norway spruce (*Picea abies*) was studied. The plants were cultivated in conditions with ambient carbon dioxide concentration ($350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) and elevated carbon dioxide concentration ($700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). The content of Rubisco in exposed and shaded leaves or needles was compared. The content of Rubisco was determined by SDS-PAGE method. A significant decrease in Rubisco content was demonstrated in conditions E versus A in shaded beech leaves. In other cases, the decrease was not so significant. A comparison of exposed and shaded needles also did not show a statistically significant difference, but in shaded beech leaves against exposed leaves Rubisco content was significantly lower, especially in conditions E.

KLÍČOVÁ SLOVA

fotosyntéza, ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa, SDS-PAGE, zvýšená koncentrace oxidu uhličitého, obsah Rubisco

KEYWORDS

photosynthesis, ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase, SDS-PAGE, elevated carbon dioxide concentration

HAMŘÍKOVÁ, D. Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah enzymu Rubisco u buku lesního a smrku ztepilého. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 50 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, podporu a veškerou pomoc při psaní této práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Fotosyntéza	8
2.1.1	Základní princip fotosyntézy	8
2.1.2	Světelná fáze.....	10
2.1.3	Temnostní fáze	11
2.2	Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco).....	13
2.2.1	Struktura	13
2.2.2	Katalýza	14
2.2.3	Aktivace a inaktivace.....	16
2.2.4	Obsah Rubisco	20
2.3	Vliv zvýšené koncentrace CO ₂ na C ₃ rostliny.....	21
2.3.1	Zvyšování koncentrace CO ₂	21
2.3.2	Rychlost fotosyntézy	22
2.3.3	Rychlost fotorespirace	24
2.3.4	Vodivost průduchů	24
2.3.5	Rychlost dýchání	25
2.3.6	Účinky zvýšené koncentrace CO ₂ na dřeviny	25
2.4	Metody stanovení obsahu Rubisco	25
2.4.1	SDS-PAGE	25
2.4.2	ELISA	27
2.4.3	Kapilární elektroforéza	28
3	Experimentální část	30
3.1	Materiál	30
3.2	Stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE	31
3.2.1	Přístroje.....	31
3.2.2	Chemikálie.....	31
3.2.3	Příprava roztoků	31
3.2.4	Příprava gelů.....	32
3.2.5	Příprava standardu	33
3.2.6	Příprava vzorků.....	33
3.2.7	Elektroforéza	34
3.2.8	Vizualizace bílkovin.....	34

3.2.9	Vyhodnocení gelů.....	34
3.2.10	Příklad výpočtu obsahu enzymu Rubisco.....	34
3.2.11	Statistické zpracování výsledků.....	35
4	Výsledky.....	36
5	Diskuse.....	43
6	Závěr.....	44
7	Seznam použitých zdrojů.....	45
8	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	50

1 ÚVOD

Fotosyntéza je jednou z nejdůležitějších metabolických drah v živé přírodě. Pomocí světelné energie se zde oxid uhličitý vázaný ze vzduchu přeměňuje na sacharidy, které slouží jako zdroj energie pro různé organismy. Nejdůležitější úlohou je však produkce kyslíku, jenž je neodmyslitelnou součástí našeho života. Kyslík se uvolňuje z molekuly vody při oxidaci, nikoli z molekuly CO_2 .

Klíčovým enzymem fotosyntézy je ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco). Tento enzym katalyzuje fixaci atmosférického oxidu uhličitého do organických sloučenin a propojuje tak uhlík vázaný v anorganických sloučeninách s biosférou. Je to nejrozšířenější protein na Zemi. V rostlinách je přítomen ve velkém množství, vzhledem k jeho nízké účinnosti – z hlediska afinity k substrátu i rychlosti přeměny substrátu. Kromě CO_2 je enzym schopen vázat i kyslík. Jeho dvojí funkce je dána podobnou strukturou obou molekul, díky níž se mohou vázat do aktivního místa enzymu.

Mnoho faktorů v současnosti zvyšuje koncentraci oxidu uhličitého v atmosféře. Při vyšší koncentraci CO_2 dochází ke zvýšení rychlosti fotosyntézy, ovšem při dlouhodobém působení zvýšené hladiny CO_2 se u mnoha druhů rostlin rychlost snižuje a nastává aklimační deprese. Ve fotosyntetických tkáních se hromadí sacharidy a dochází nejen ke snížení fotosyntézy, ale i ke snížení množství enzymu Rubisco, obsahu dusíku a rozpustných proteinů v listech.

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením obsahu enzymu Rubisco u buku lesního a smrku ztepilého pěstovaných v atmosféře se zvýšenou a normální koncentrací CO_2 elektroforézou v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE). Cílem bylo potvrdit nebo zamítnout hypotézu o aklimaci obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 u smrku ztepilého a buku lesního a rovněž sledovat vliv typu asimilačního aparátu (slunný/stinný) na obsah Rubisco za těchto podmínek.

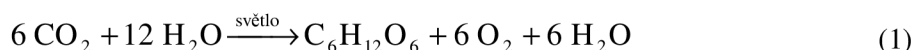
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosyntéza

2.1.1 Základní princip fotosyntézy

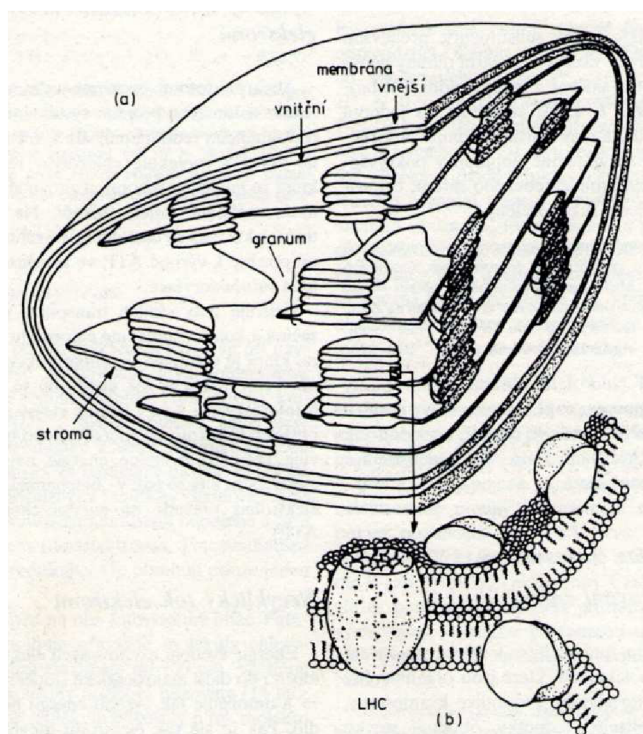
Fotosyntéza je soubor biochemických procesů, ve kterém dochází k přeměně světelné energie na energii chemickou. Jednoduché anorganické sloučeniny oxid uhličitý a voda se přitom mění na sacharidy a ty mohou být využívány jako zdroj energie samotných rostlin, ale také jiných organismů, jež se fotosyntetickými organismy živí. Schopnost fotosyntézy mají rostliny a sinice a kromě přeměny CO₂ a vody je s fotosyntézou úzce spjata produkce kyslíku. Veškerý kyslík v atmosféře Země vznikl právě fotosyntézou [1].

Fotosyntéza je redukční proces. Uhlík v CO₂ je v oxidovaném stavu a v průběhu fotosyntézy je převáděn na redukovaný stav v sacharidech. Potřebné elektrony jsou odebírány z molekul vody a při oxidaci vody vzniká kyslík. Celý proces lze shrnout následující rovnicí [1]:



2.1.1.1 Chloroplasty

Chloroplast (Obr. 1) je místem, kde celá fotosyntéza probíhá. Jde o buněčnou organelu bohatou na membrány, která je rozmanitá co do velikosti i tvaru (nejběžnějším tvarem je elipsoid) [2].



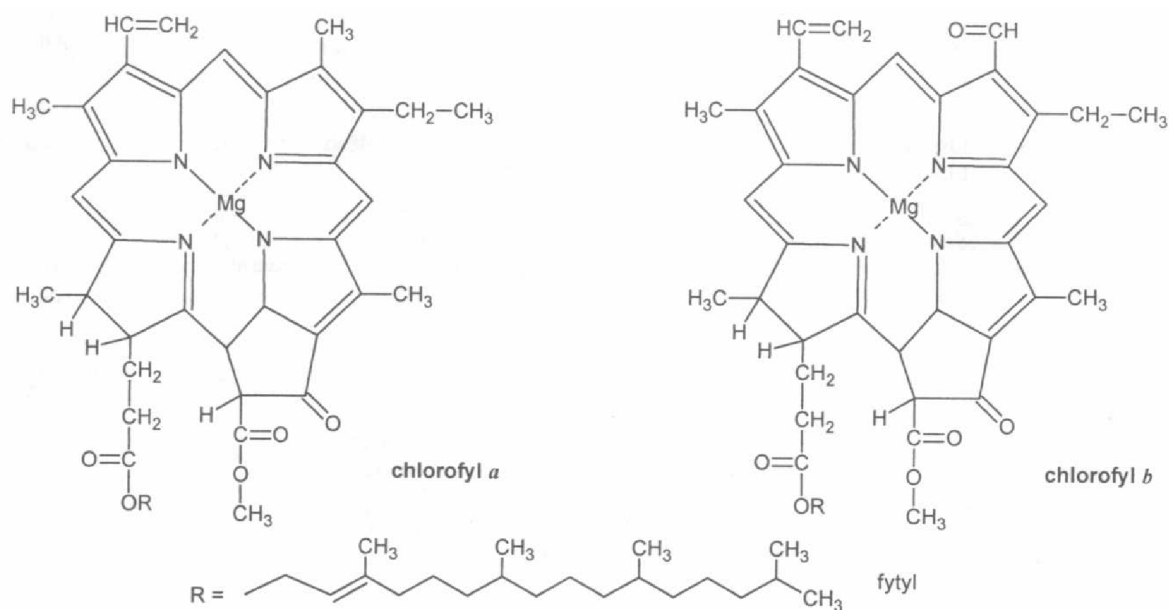
Obr. 1 Schéma struktury chloroplastu. (a) Řez výsekem organely. (b) Místo styku dvou thylakoidových membrán v granu se zakotveným komplexem chlorofylových sběračů světla vázaných na bílkoviny (LHC) (Light-Harvesting Complex) [3].

Prostor obklopený vnitřní membránou obsahuje stroma, což je koncentrovaný roztok enzymů, v němž jsou molekuly DNA, RNA a ribosomy. Ve stromatu je uložena další soustava membrán – thylakoidy. Thylakoid je mnohonásobně poskládaný, plochý váček nebo se také jeví jako soustava terčovitých váčků poskládaných do sloupců. Tyto útvary se nazývají grana. Chloroplast běžně obsahuje 10-100 gran. Reakce závislé na světle probíhají právě v thylakoidní membráně. Reakce nezávislé na světle probíhají u eukaryotních organismů ve stromatu chloroplastů jako cyklický sled enzymových reakcí [2].

2.1.1.2 Fotosyntetické pigmenty

Existují tři kategorie fotosyntetických pigmentů. Jsou to chlorofyly (porfyriny), fykobiliny (porfyriny s otevřeným tetrapyrrolovým řetězcem) a karotenoidy (isoprenoidy) [4].

Nejdůležitějšími fotosyntetickými pigmenty (fotoreceptory), které absorbují světelné záření, jsou u eukaryot a sinic chlorofyl *a* a chlorofyl *b* (Obr. 2). Tyto látky patří mezi pyrrolová barviva, jež v centru tetrapyrrolového kruhu obsahují hořčnatý kation. Po absorpci fotonů elektromagnetického záření jsou molekuly chlorofylu převedeny do excitovaného stavu. Mnoho konjugovaných dvojných vazeb v molekule posouvá absorpční maximum k vyšším vlnovým délkám. Absorpční spektrum chlorofylu má dvě maxima, avšak pro fotosyntézu jsou významnější jen vlnové délky v červené oblasti spektra (640-700 nm) [4]. Komplementární barvou k absorbovanému červenému záření je zelená [1].



Obr. 2 Chlorofyl *a* a chlorofyl *b* [1]

Univerzální rozšíření chlorofylu *a* u organismů s oxygenním typem fotosyntézy ukázalo, že pouze chlorofyl *a* je vlastním transformátorem energie ve fotosyntéze, který se bezprostředně účastní primárního fotochemického děje (přeměna elektromagnetického záření na energii chemickou) [4].

Ostatní pigmenty zastávají pouze pomocnou funkci. Zachycují dopadající záření a energii excitovaného stavu přenáší na chlorofyl *a* [4].

2.1.2 Světelná fáze

2.1.2.1 Pohlcení světla

Elektromagnetické záření se šíří v kvantech (fotonech), jejichž energie je dána vztahem

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2)$$

kde h je Planckova konstanta, c rychlost světla, ν frekvence záření a λ jeho vlnová délka. Červené světlo ($\lambda = 700 \text{ nm}$) má energii 171 kJ/mol fotonů. Molekuly mají mnoho elektronových kvantových stavů, které se liší energií. Rozdíl energií mezi základním a vybuzeným stavem elektronu musí přesně odpovídat energii pohlceného fotonu. Množství pohlceného světla je popsáno Lambertovým-Beerovým zákonem [2].

Molární absorpční koeficienty chlorofylů při jejich maximální absorpci přesahují $10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [2] a patří k nejvyšším známým hodnotám u organických molekul. Významné rozdíly v absorpčních spektrech chlorofylů jsou způsobeny malými rozdíly v jejich struktuře. To má význam pro jejich funkci.

Vybuzená molekula je schopná přeměnit excitační energii různými způsoby. Mezi nejdůležitější patří vnitřní přeměna, fluorescence, přenos excitonu a fotooxidace. U vnitřní přeměny jde o přechod na kinetickou energii tedy teplo. Při fluorescenci excitovaná molekula vyzáří foton, aby přešla do základního stavu. Přenos excitonu (rezonanční přenos energie) se uskuteční tehdy, jestliže vybuzená molekula přenáší svou excitační energii na blízkou molekulu s podobnými elektronovými vlastnostmi, která je v základním stavu. Přenos excitonu má význam pro soustředění světelné energie do fotosyntetických reakčních center. Děj, při němž se excitovaná donorová molekula (chlorofyl) oxiduje přenesením elektronu na molekulu akceptoru a redukuje ho tím, se nazývá fotooxidace [2].

Většina molekul chlorofylu pouze shromažďuje světlo, tzn. fungují na principu světlosběrné antény. Zde dochází k přenosu excitonu (předávání energie z jedné molekuly na druhou) až do reakčního centra, kde se energie zachytí. Chlorofyly reakčního centra mají o něco nižší energii excitovaného stavu [2]. Při přenosu energie ve světlosběrných systémech nedochází k separaci nábojů. Reakční centrum obsahuje dvojici molekul chlorofylu navázaných na protein, která se po přijetí fotonu excituje. Pouze tato reakce je závislá na světle.

2.1.2.2 Přenos elektronů se dvěma reakčními centry

Rostliny a sinice používají redukční ekvivalenty, získané oxidací vody k tvorbě NADPH. Dílčími reakcemi tohoto procesu jsou [2]:



Fotosyntetizující bakterie pracují s jedním fotosystémem, oxygenní typ fotosyntézy obsahuje dva fotosystémy a tudíž dvě reakční centra [4].

První vyrábí silné redukční činidlo (ferredoxin), které redukuje NADP^+ . Druhý má zase na starosti produkci silných oxidů O_2 z vody. Oba fotosystémy jsou umístěny odděleně a jsou propojeny řetězcem transelektronas.

Ve fotosystému I (PSI) dochází přenosem fotonů ze světlosběrných antén k redistribuci elektronů molekuly chlorofylu reakčního centra a k její excitaci. Excitované elektrony se poté přesunou na oxidoreduktasu ferredoxin, vázaný na thylakoidovou membránu. Ten přeneše elektrony na rozpustný ferredoxin. Jeho redukováná forma pak předá elektrony na NADP^+ prostřednictvím flavoproteinu. Vzniká NADPH [3].

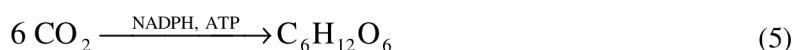
S transportem elektronů je spojen i přenos protonů, které jsou přenášeny napříč membránou díky molekulám hydrofobních plastochinonů za spoluúčasti komplexu cytochromů *b* a *f* [4]. Protony jsou získávány z oxidace vody za současného uvolnění O_2 . Vzniklé protony jsou využity v PSI. Pokud je poměr NADPH k NADP^+ vysoký a není třeba vyrábět další redukovaadlo, přes thylakoidovou membránu vzniká protonový gradient, který je základem pro vznik ATP. Nevzniká tedy ani NADPH, ani se neuvolňuje O_2 . Tyto procesy jsou spjaty s fotosystémem II [3].

2.1.2.3 Fotofosforylace

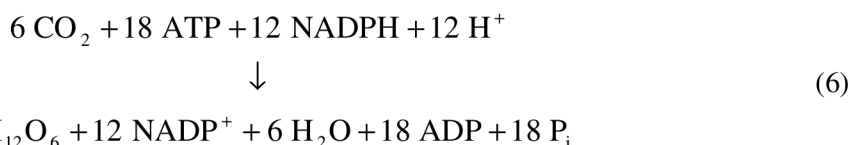
Rozdíl pH přes thylakoidní membránu může být až 3,5 jednotek a má 3 příčiny: uvolnění 4 protonů do thylakoidní dutiny při vzniku molekuly O_2 , komplex cytochromů *b*/*f* transportuje 4 elektrony a s tím je spojeno přemístění 8 protonů ze stromatu do thylakoidní dutiny. Čtyři protony se ve stromatu vážou při redukcí 2 molekul NADP^+ na $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Dohromady se ze stromatu do thylakoidní dutiny přeneše 12 protonů. Chloroplastová ATP-synthasa vytváří jednu molekulu ATP za každé 3 protony vynesené z thylakoidní dutiny [2].

2.1.3 Temnostní fáze

Reakce fotosyntézy navazující na fotochemické procesy světelné fáze je možné shrnout jednoduchou rovnicí [4]:



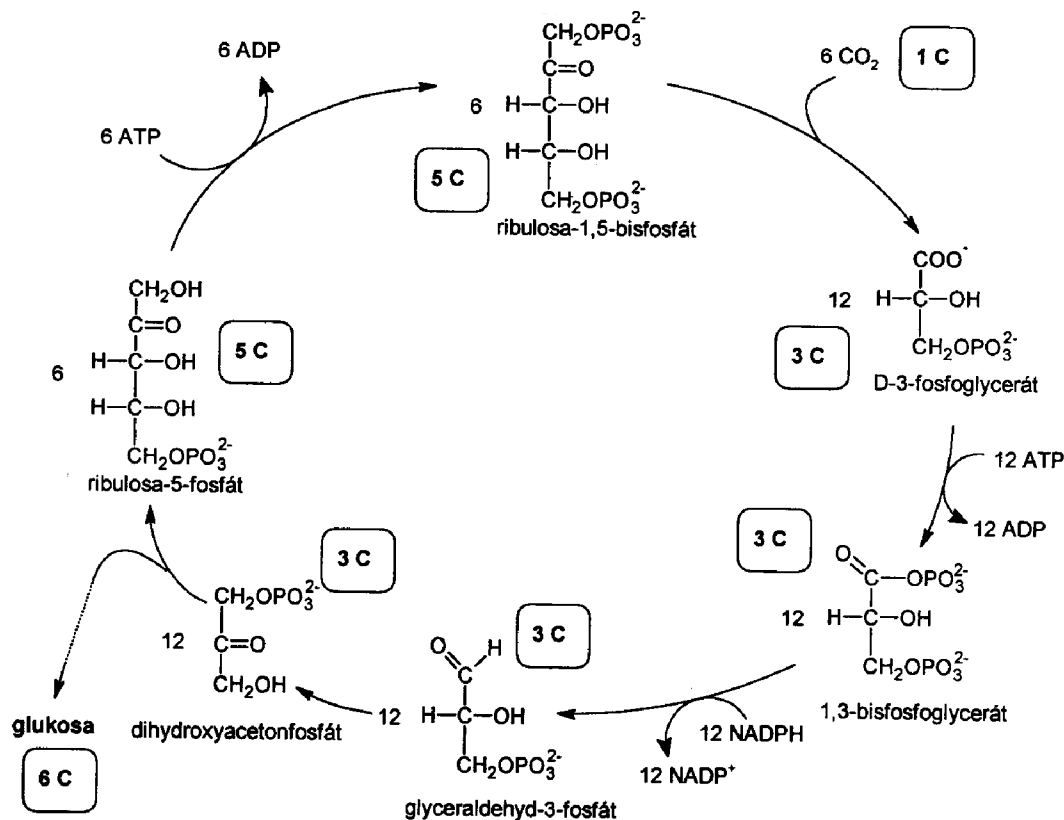
nebo také [5]:



Temnostní fáze zahrnuje řadu enzymových reakcí, které vyžadují ATP a koenzym NADPH. Produktem je molekula sacharidu vzniklá z anorganické sloučeniny CO_2 . Tento děj se nazývá fixace (asimilace) vzdušného oxidu uhličitého. Z hlediska spotřeby ATP na jeden mol vázaného CO_2 je ze všech cest fixace CO_2 tato nejnákladnější [5].

Název temnostní fáze je zavádějící, neboť evokuje myšlenku, že tato část fotosyntézy neprobíhá na světle. Fixace oxidu uhličitého je však sled reakcí probíhajících na světle i ve tmě tak dlouho, dokud je k dispozici dostatek ATP a NADPH z přeměny světelné energie prostřednictvím fotosystémů [4].

Metabolickou dráhu, kterou rostliny přetvářejí CO₂ na sacharidy, objasnili v letech 1946–1953 Melvin Calvin, James Bassham a Andrew Benson. Jejich experiment byl založen na pozorování, ve kterých meziproductech fotosyntézy se postupně objeví radioaktivita ze ¹⁴CO₂ a vypracovali schéma celé dráhy, jež je známá pod názvem Calvinův cyklus (Obr. 3).



Obr. 3 Calvinův cyklus [1]

Tento cyklický děj se skládá ze tří částí: fixace oxidu uhličitého v organické formě, redukce aktivovaného oxidu uhličitého a regenerace akceptoru CO₂ [3].

V první části se aktivuje CO₂ jeho inkorporací do ribulosa-1,5-bisfosfátu jako karboxyl za rozpadu vzniklé nestálé sloučeniny na dvě tříuhlíkaté molekuly 3-fosfoglycerátu. Fixace slouží k převedení energeticky chudé, nereaktivní molekuly na aktivovanou redukovatelnou formu. Není to jednoduchý děj a k jeho uskutečnění je zapotřebí zvláštní cukerný fosfát (ribulosa-1,5-bisfosfát). Jeho molekula po přijetí oxidu uhličitého přejde na nestabilní šestiuhlíkatý meziproduct, který se hned štěpí na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu [3]. Reakce je katalyzována pomocí enzymu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy, kterému se věnuje další kapitola.

3-fosfoglycerát se redukuje s NADPH za spotřeby 2 ATP přes 1,3-bisfosfoglycerát na glyceraldehyd-3-fosfát. Izomerací tohoto meziproductu poté vzniká dihydroxyacetonfosfát. Část trios přechází vnější chloroplastovou membránou do cytosolu buňky a tam se aldolovou kondenzací, katalyzovanou aldolasou, přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát. Z něho se pak v poloze 1 odštěpí fosforylové skupiny a izomerací vznikne glukosa-6-fosfát. Tato reakce je analogická biosynthese hexos u heterotrofů. Pouze NADH je nahrazeno NADPH. Z glukosy

vzniknou rezervní sacharidy, sacharosa a škrob. Část triosafosfátu se využije na výrobu lipidů a aminokyselin nezbytných pro růst rostlin. Během jednoho cyklu vznikne z pentosy hexosa a využije se jeden atom uhlíku asimilovaného z CO₂. Aby z molekul oxidu uhličitého vznikla hexosa, musí cyklus proběhnout šestkrát. Při tom se regeneruje šest molekul ribulosity [3].

Regenerace akceptoru je obrácenou regenerační fází pentosového cyklu. Dochází k ní procesem zahrnujícím řadu reakcí vzájemných přeměn sacharidů – transglykosidační reakce. Transketolasa katalyzuje přenos glykolaldehydu a glyceraldehydu pomocí thiamindifosfátu jako kofaktoru z ketos na aldosity a transaldolasa katalyzuje reakce dihydroxyacetonfosfátu s fosforečnými estery aldolů [3].

V Calvinově cyklu je každá reakce katalyzována specifickým enzymem. Nejdůležitějším enzymem je v tomto případě ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa, která katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu oxidem uhličitým.

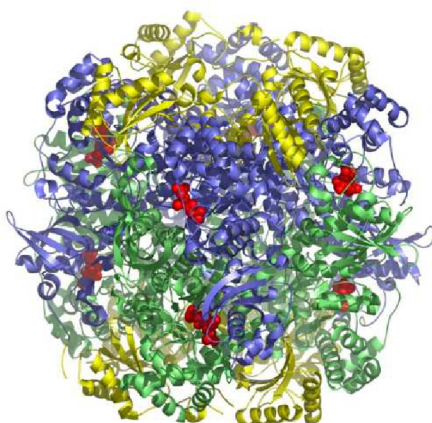
2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)

V roce 1947 Wildman a Bonner [6] objevili při elektroforéze extraktu rostlinných listů mohutně zastoupený protein, který pojmenovali Protein frakce I. Na jeho funkci přišli o pár let později Calvin a Massini [7], Quayle et al. [8] a Weissbach et al. [9], když zjistili, že tento protein katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu, čímž vznikají dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Poté trvalo několik dalších let, než byla objevena druhá funkce tohoto proteinu (Bowes et al. [10]; Andrews et al. [11]; Lorimer et al. [12]). Tou je oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu, kdy vzniká molekula fosfoglykolátu a fosfoglycerátu. Enzym dostal název ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa (E.C. 4.1.1.39) a postupně se pro něj vžila zkratka Rubisco.

Rubisco je nejhojnější protein na zemi. Tvoří až 16 % veškerých bílkovin v chloroplastech. Fixuje asi 10¹¹ tun CO₂ ročně. Nevýhodou je jeho malá katalytická účinnost z hlediska nasycení substrátem a to vyžaduje obrovskou investici do množství enzymu na podporu přijatelné rychlosti fotosyntézy [5].

2.2.1 Struktura

Existují dvě analogické formy Rubisco, které se liší svou strukturou. Forma I (Obr. 4) je haxadekamer L₈S₈. Vyskytuje se u vyšších rostlin, řas a cyanobakterií. Skládá se z osmi velkých podjednotek (L), jež mají každá relativní molekulovou hmotnost 50–55 kDa, a z osmi malých podjednotek (S) s relativní molekulovou hmotností 12–18 kDa [13]. Každá molekula má ve velkých podjednotkách osm vazebných míst pro protilátku a osm vazebných míst pro RuBP.



Obr. 4 Hexadekamer s velkými podjednotkami zobrazenými modře a zeleně a s malými podjednotkami zobrazenými žlutě. Substrát RuBP je červeně. [14]

Velké podjednotky jsou kódovány genomem chloroplastů a dimerují „hlavou k patě“. Jsou syntetizovány na ribosomech chloroplastů. Malé podjednotky jsou kódovány genomem jádra a syntetizují se v cytosolu. Po translaci jsou přeneseny do chloroplastu a za pomoci chaperonů vytvoří s podjednotkami L holoenzym [15].

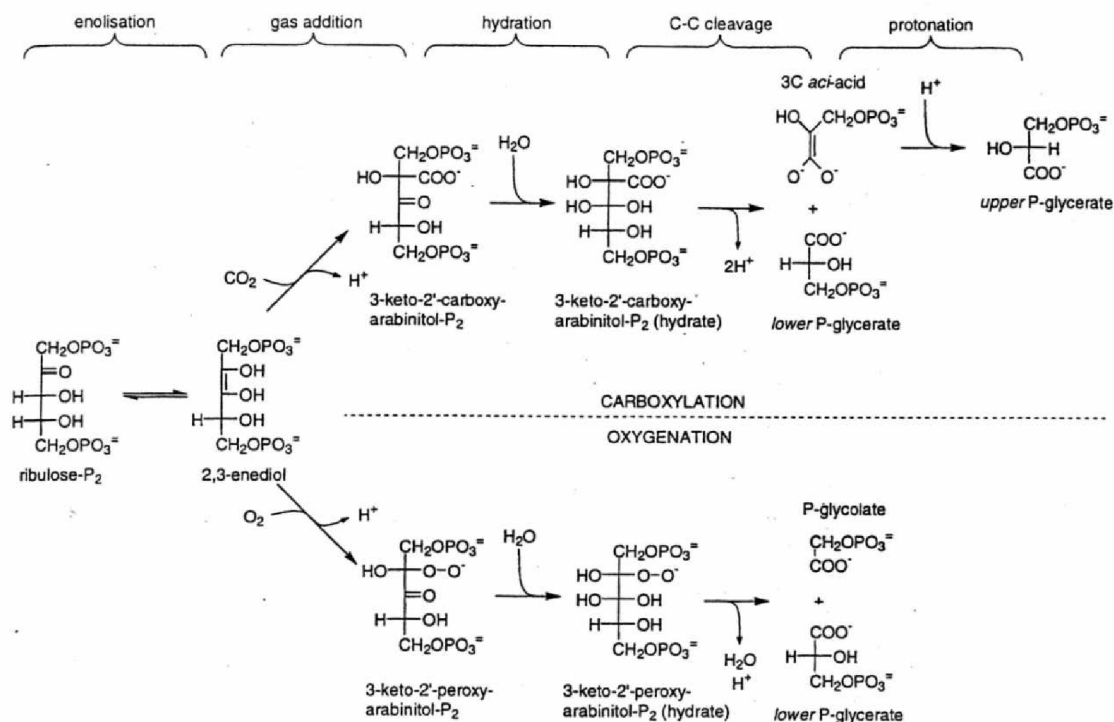
Forma II je homodimer L_2 tvořený dvěma velkými podjednotkami. Vyskytuje se u anaerobních purpurových bakterií. Její relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 100–110 kDa. Tyto dvě velké podjednotky jsou z 30 % [2] homologní s podjednotkami vyšších rostlin.

U vyšších rostlin je v rámci velké podjednotky sekvence aminokyselin téměř shodná. Každá velká podjednotka obsahuje menší N-terminální doménu tvořenou pěti úseky s β -strukturou a dvěma α -helixy, tzv. α - β tunely. Dále má větší C-terminální doménu soudkovitého tvaru, složenou z osmi stočených struktur α/β . Malá podjednotka se skládá ze čtyř vláknových antiparalelních β -struktur, které jsou z jedné strany překryté dvěma α -helixy [13].

Velké podjednotky obsahují aktivní a regulační místo. Aktivní místo se nachází mezi N-terminální doménou jedné a C-terminální doménou druhé podjednotky. Podjednotky S zvyšují katalytickou aktivitu Rubisco.

2.2.2 Katalýza

Enzym Rubisco má dvě funkce. Buď může katalyzovat karboxylaci, tedy navázání CO_2 , nebo oxygenaci, kdy dochází k vázání O_2 na ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP). Tato dvojí funkce je dána afinitou k oběma molekulám. Karboxylace je součástí Calvinova cyklu. K oxygenaci dochází při fotorespiraci (tzv. světelné dýchání).



Obr. 5 Sled katalytických meziproduktů zapojených do karboxylace a oxygenace [5]

Na začátku obou reakcí se musí RuBP přeměnit na endiolát a pak teprve dojde k bimolekulární reakci endiolátu s oxidem uhličitým nebo s kyslíkem (Obr. 5) [16].

Při karboxylaci se přechodný meziprodukt 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát stabilizuje vlivem komplexu karbamátu s kovovým iontem Mg²⁺. Na další meziprodukt se aduje voda, štěpí se vazba mezi druhým a třetím uhlíkem a vzniká jedna molekula 3-fosfoglycerátu. Pak dojde k protonaci karbaniontu za vzniku další molekuly 3-fosfoglycerátu. Z molekul 3-fosfoglycerátu následně vznikají molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu a z nich je utvořen sacharid [5].

Oxygenace probíhá za nepřítomnosti redox-aktivních kovů nebo organických kofaktorů. Po začlenění molekuly kyslíku pomocí Rubisco vzniká nestabilní peroxosloučenina 2-peroxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát. Ve vodném prostředí se uvolní 3-fosfoglycerát a 2-fosfoglykolát. Z fosfoglykolátu se odštěpí fosfátová skupina a vznikne glykolát, který je transportován z chloroplastu do peroxisomů, kde se uskutečňují další reakce. Postupným navázáním dvou molekul O₂ se uvolní molekula CO₂. Fotorespirace je energeticky nevýhodná, protože dojde ke ztrátě jednoho uhlíku v podobě CO₂ a spotřebuje se jedna molekula ATP. Tímto způsobem fotorespirace snižuje výtěžek fotosyntézy. Její rychlost je ale za normálních podmínek 4 krát menší než rychlost karboxylace [15].

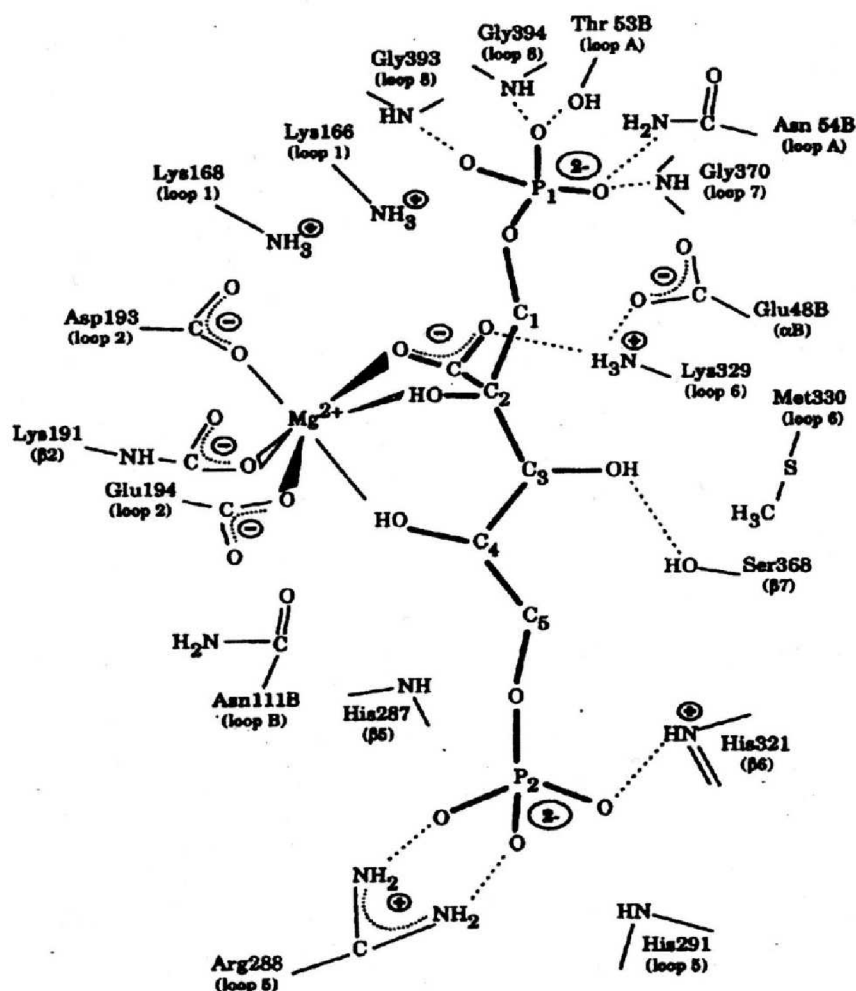
Poměr rychlosti karboxylace ku rychlosti oxygenace při stejných rovnovážných koncentracích CO₂ a O₂ udává tzv. specifitní faktor Ω

$$\Omega = \frac{v_c}{v_o} \cdot \frac{[O_2]}{[CO_2]} = \frac{V_c}{V_o} \cdot \frac{K_o}{K_c} \quad (7)$$

kde v_c je rychlost karboxylace, v_o je rychlost oxygenace, V_c je maximální rychlost karboxylace, K_c je rychlostní konstanta karboxylace, K_o je rychlostní konstanta oxygenace a V_o je maximální rychlost oxygenace. Pokud se zvýší parciální tlak CO_2 , bude se přednostně vázat na enzym Rubisco. V důsledku toho se potlačí fotorespirace a zvýší se rychlost fotosyntézy [15].

2.2.3 Aktivace a inaktivace

2.2.3.1 Aktivní místo



Obr. 6 Aktivní místo enzymu Rubisco [15]

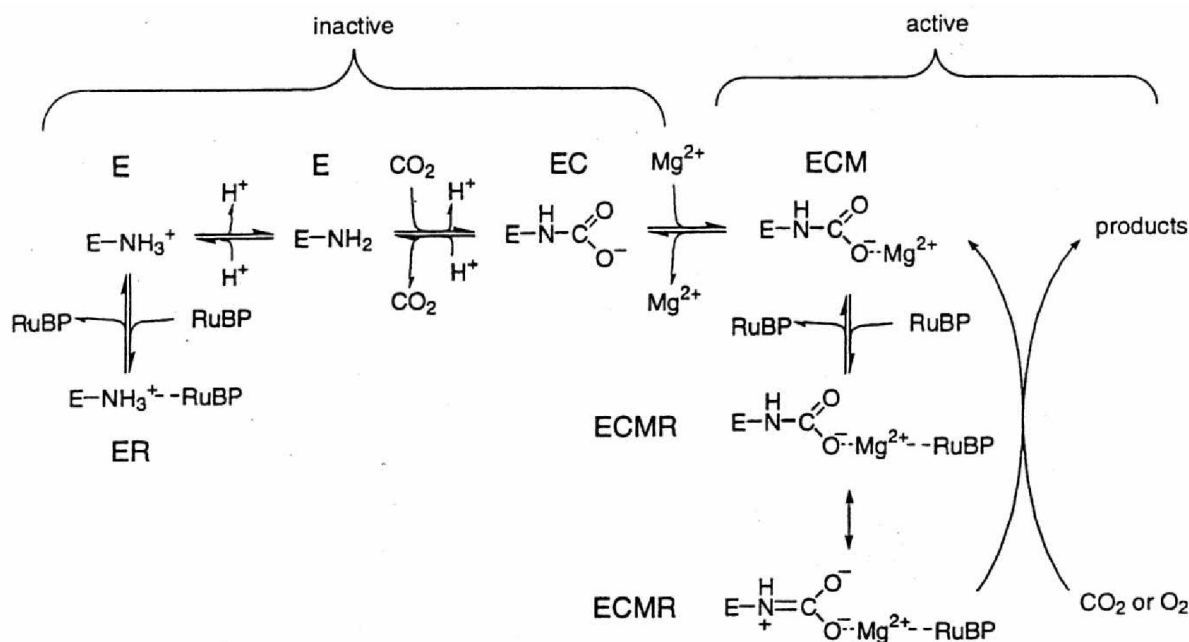
Aktivní místo enzymu Rubisco je zobrazeno na Obr. 6. N-terminální doména je tvořena Glu48, Thr53, Asn53 a Asn111, všechny ostatní zbytky jsou umístěny v β/α – stočené doméně přiléhající podjednotky. Na obrázku je také vidět interpodjednotka solného můstku mezi Glu48 a Lys329. Většina zbytků aktivních míst je iontových a polárních, jen Met330 je hydrofobní. Součástí aktivního místa je hořčičnatý ion, který je důležitý při aktivaci a katalýze. Je rozhodující pro správnou orientaci substrátu v aktivním místě, protože CABP se váže k neaktivovanému enzymu v převráceném tvaru. Nejdůležitější je Lys191. Jeho ϵ -aminoskupina je karbamylována oxidem uhličitým a vzniklý karbamát se stabilizuje pomocí

Mg^{2+} . Na toto karbamylované aktivní místo se váže RuBP a na jeho druhý uhlík se váže molekula vzdušného CO_2 . V aktivním místě jsou také fosfátové ligandy. Ligandy pro P_1 fosfát jsou polární. Zahrnují Gly370, Gly393, Gly394, Thr53 a Asn54. P_2 fosfát je zakotven v Arg288 a His321 [15]. Funkce ostatních zbytků aktivního místa nemusí být určeny strukturou.

2.2.3.2 Aktivita Rubisco

Aktivita Rubisco závisí na konverzi neaktivní formy (E) na aktivní formu (ECM), vázání inhibitorů CA1P a RuBP na ECM a E a na katalytické tvorbě inhibičních cukrů (bisfosfátů) z meziprojektu endiolátu. Ke karboxylaci RuBP dochází pouze s enzymem ve formě ECM-RuBP. V rostlinách C3 se předpokládá poměr mezi E a ECM asi 1:2, z čehož vyplývá nízká afinita E formy pro CO_2 a Mg^{2+} [17]. Za normálních podmínek (předpoklad nasycení a velkého množství RuBP) bude rovnováha ve stromatu posunuta ve prospěch vysoké tvorby ECM-RuBP.

2.2.3.3 Spontánní aktivace



Obr. 7 Aktivace Rubisco karbamyací [5]

Jak jsem zmínila v kapitole o struktuře Rubisco, enzym má osm vazebných míst. Pro jejich schopnost katalýzy je důležité, aby byl vytvořen komplex s CO_2 a iontem Mg^{2+} . Součástí celého procesu aktivace enzymu je tzv. karbamylace (Obr. 7) [5]. Při tomto ději molekuly CO_2 reagují s ϵ -aminoskupinou lysinu 201 velké podjednotky. Molekula CO_2 účastní se aktivačního procesu je jiná než molekula CO_2 , která slouží jako substrát vázaný při karboxylaci. Hořečnatý iont dále reaguje s karbamátem koordinační vazbou, a tím karbamát stabilizuje. Platí, že aktivní místo je schopno zpracovat RuBP, pokud se karbamát stabilizuje kovem. Karbamylace je děj pomalý a proto určuje rychlost celého procesu.

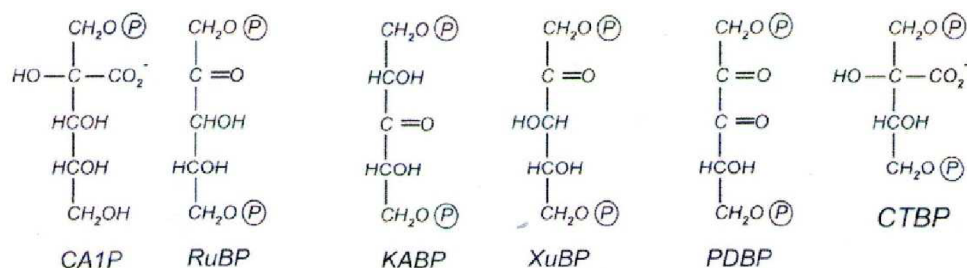
2.2.3.4 Aktivace pomocí aktivasy

Úplná samovolná aktivace není *in vivo* možná. Příčinou je nedostatečná koncentrace CO₂ a hořčnatých iontů ve stromatu chloroplastů. Aktivaci enzymu při fyziologických koncentracích CO₂ usnadňuje aktivasa Rubisco, což je protein kódovaný v jádře chloroplastů [15]. Patří do skupiny AAA proteinů (tj. ATPasy spojené s různými buněčnými aktivitami). Jde o oligomer skládající se ze 14 či 16 podjednotek, které spontánně asociují. Čím větší je stupeň asociace, tím je vyšší její enzymová aktivita. Pro její funkci je důležitá hydrolýza ATP, RuBP a noční inhibitor 2-korboxy-D-arabinitol-1-fosfát. Podle Portise [17] je hydrolýza ATP Rubisco aktivasou nutná kvůli obnovení aktivity inhibovaných forem Rubisco. Regulace změnami v poměru ATP:ADP je pak prostředkem, jímž může být rychle signalizováno enzymu Rubisco omezení sinku, a pokles P_i vede k poklesu poměru ATP:ADP v chloroplastu, který snižuje aktivitu Rubisco aktivasy. Na aktivovanou aktivasu se pak může vázat Rubisco a specifickým přesunutím fosfátových zbytků se Rubisco aktivuje. Aktivasa se současně vrací do neaktivní formy [5].

Při osvětlení je aktivasa aktivovaná větším množstvím ATP a z aktivního místa se uvolňuje RuBP. Enzym poté může projít procesem karbamylace. Vzniklý komplex se pak stabilizuje vazbou RuBP. Pokud je přítomen RuBP a je dostatek světla, probíhá rychlá aktivace Rubisco prostřednictvím aktivasy. Pokud je však tma, aktivasa aktivaci enzymu neovlivňuje [15].

2.2.3.5 Inaktivace

Řada přirozeně se vyskytujících cukerných fosfátů (Obr. 8), které se vážou pevnou vazbou na Rubisco, způsobuje, že aktivní místo karbamylovaného nebo dekarbamylovaného Rubisco zaujímá uzavřenou konformaci [18], a má dopad na regulaci Rubisco.

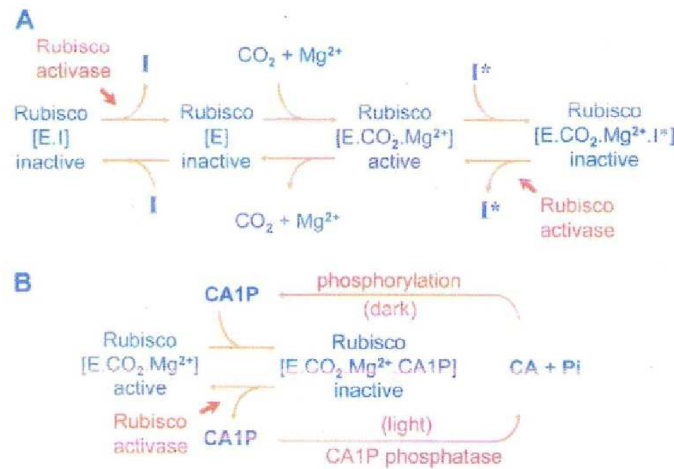


Obr. 8 Struktury přirozeně se vyskytujících inhibitorů enzymu Rubisco (CA1P – 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát, RuBP – ribulosa-1,5-bisfosfát, KABP – 3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát, XuBP – D-xylulosa-1,5-bisfosfát, PDBP – D-glycero-2,3-pentodiulosa-1,5-bisfosfát, CTBP – 2-karboxytetritol-1,4-bisfosfát) [18]

Další cukerné fosfáty a některé anorganické anionty také interagují s katalytickým místem *in vitro* a ovlivňují karbamylicí. To jsou efekторы, které mají při vyšších koncentracích ve vztahu k RuBP charakter kompetitivních inhibitorů. Buď zvyšují (kladné efekторы, např. 6-fosfoglukonáf, NADPH a anorganické orthofosforečnany), nebo snižují (negativní efekторы, např. ribosa-5-fosfát a fruktosa-6-fosfát) rozsah karbamylicí při koncentraci CO₂ a Mg²⁺ pod bodem nasycení.

Komplikací rovnováhy jednoduché karbamylicí je fakt, že každá ze tří hlavních forem enzymu je předmětem inaktivace vázáním cukerného fosfátu. Portis [17] nazývá tyto tři

formy inhibice katalytická inaktivace, vázání CA1P do aktivované formy Rubisco a inaktivace pomocí RuBP. Všechny procesy regulace aktivity enzymu jsou zobrazeny na obr. 9.



Obr. 9 (A) Principy regulace aktivity Rubisco. [E] – dekarbamylovaný enzym Rubisco; [E.I] – dekarbamylovaný enzym se substrátem (RuBP) nebo produktem XuBP vázaným v aktivním místě enzymu, oba jsou inhibitory (I); [E.CO₂.Mg²⁺] – ternární komplex s aktivním místem; [E.CO₂.Mg²⁺.I] – karbamylovaný enzym Rubisco s inhibítoem pevně vázaným v aktivním místě (CA1P, PDBP, KABP). (B) Vratná inhibice prostřednictvím CA1P – odstranění závislé na světle a defosforylace, zprostředkované Rubisco aktivasou a CA1P fosfatasou, CA může být znovu fosforylován na CA1P v následujícím období tmy [18].

První inaktivační proces probíhá během katalytické reakce a je často nazýván „fallover“ (hromadění produktu se odchyluje od očekávaného lineárního časového průběhu, když je RuBP přidán do plně aktivovaného enzymu – EMC - *in vitro*). Podle studií je tvorba XuBP a KABP zodpovědná za akumulaci neaktivního enzymu. XuBP (zřejmě i KABP) se pevně váže na Rubisco a pomalá disociace po jeho vzniku v aktivním místě může způsobovat pomalou ztrátu katalytické aktivity bez poklesu karbamylace. Parry et al. [18] uvádějí, že se XuBP nejen pevně váže na dekarbamylovaný enzym Rubisco, ale také se uvolňuje z katalytického místa a působí jako substrát (i když špatný). Je pomalu karboxylován za vzniku 3-fosfoglycerátu karbamylovaným Rubisco. KABP pravděpodobně vzniká rozdělením nestabilního peroxidového meziprojektu z oxygenační reakce. Katalytická inaktivace, která je charakteristická pro Rubisco vyšších rostlin, je kontinuální proces, jenž se musí eliminovat, aby byla rychlost katalýzy maximální.

Druhý inaktivační proces zahrnuje vytvoření a pevné vázání CA1P do ECM formy Rubisco (Obr. 9) [17]. Regulace ze strany inaktivace prostřednictvím CA1P je ale obvykle omezena svým rozsahem. Mnoho druhů rostlin (např. špenát, pšenice) obsahuje tak málo CA1P, že nemůže hrát významnou roli. Naopak několik druhů (nejvíce studovaný je *Phaseolus vulgaris*) obsahuje tolik CA1P, že na úsvitu téměř všechnen enzym existuje jako ECM-CA1P. Inaktivaci prostřednictvím CA1P můžeme nejnáze pozorovat po několika hodinách tmy a následně při limitující intenzitě světla před polednem [17]. V krátkých časových intervalech je jeho účinek v regulaci sporný.

Poslední inaktivační proces je znázorněn na Obr. 9 A vlevo. Zde se RuBP váže na E formu Rubisco, ke kterému má mnohem větší afinitu než k ECM. Tento proces má význam pro regulaci za následujících podmínek. Ve tmě a za nepřítomnosti CA1P většina Rubisco není karbamylována a existuje v podobě E kvůli hodnotám pH, CO₂ a Mg²⁺ pod hodnotou optima. Při přechodu na světlo se RuBP rychle hromadí. Váže se na E, vytváří E-R a blokuje jinak rychlou konverzi E na ECM [17]. Tento typ inaktivace se dále uplatňuje během přechodů mezi různými intenzitami světla. Po jeho rychlém poklesu nejdříve RuBP klesne na limitující koncentraci kvůli snížené rychlosti regenerace. Pak se opět pomalu vrací zpět ve shodě s dekarbamylovací enzymu. Za ustálených podmínek, když se nemění intenzita světla, počet neaktivních míst koreluje s množstvím RuBP vázaného na protein (E-R). Koncentrace RuBP, která dostačuje pro vazbu na E, je nedostatečná pro navázání na ECM. Při nedostatku RuBP proto dochází k rychlé přeměně ECM i ECM-R na E-R a v důsledku toho po snížení intenzity světla poklesne karbamylování a aktivita.

2.2.4 Obsah Rubisco

2.2.4.1 Výživa dusíkem

Většina dusíku v listech je vázána ve fotosyntetických složkách chloroplastů. V rostlinách se přibližně 25 % dusíku investuje do samotného enzymu Rubisco [5]. Seneweera et al. [19] uvádějí rozmezí 15–35 %. Dusík je často vzácnou komoditou, a proto obsah Rubisco v listech klesá se stářím listů, když je dusík uvolňován do mladých rozvíjejících se listů. V mnoha studiích byly zkoumány změny rychlosti asimilace CO₂ se stářím listů. Obsah Rubisco v listech se s rozvíjením listů zvyšuje, a pak klesá, jak listy stárnou [5]. Zde je obvykle silná korelace mezi rychlostí asimilace CO₂ a aktivitou nebo obsahem Rubisco a jiných fotosyntetických složek. Nakano et al. [20] uvádí, že aklimace fotosyntézy v listech při zvýšeném parciálním tlaku CO₂ je spojena s nespecifikovaným snížením koncentrace dusíku v listu. Vztah mezi enzymem Rubisco a dusíkem v listech je obvykle lineární a liší se mezi jednotlivými druhy [5]. Nicméně mechanismus, kterým dostupnost dusíku působí na obsah proteinu Rubisco, je do značné míry neznámý. Seneweera et al. [19] píšou, že rozdělení dusíku do buněčné expanze a zóny dozrávání (dospívání) může být klíčem k syntéze fotosyntetických proteinů a k aklimaci fotosyntézy v listech při zvýšeném parciálním tlaku CO₂.

2.2.4.2 Stáří listů

Podle Seneweery et al. [19] je koncentrace Rubisco v čepelích listů také určena rovnováhou mezi syntézou proteinu a jeho degradací, která se mění během vývoje listů. Například v rýži se koncentrace rychle zvyšuje při expanzi listů a dosahuje maxima, když je list plně rozvinutý. Změny v koncentraci Rubisco v průběhu fáze vývoje listů jsou dobře synchronizované s množstvím *rbcL* a *rbcS* mRNA. V rýži je velmi malá syntéza Rubisco po plném vyvinutí listových čepelí a koncentrace postupně klesá, jak listy stárnou. Stále však není známo, zda syntéza Rubisco a jeho degradace hrají roli při aklimaci fotosyntézy v listech za zvýšeného parciálního tlaku CO₂.

2.2.4.3 Vliv ozáření

Rostliny rostoucí ve špatných světelných podmínkách mají také nižší obsah Rubisco než rostliny pěstované při vysokém osvětlení. Chloroplasty zastíněných rostlin vykazují řadu

adaptivních změn, jako je zvýšený vývin thylakoidů a zvýšené rozdělení thylakoidních bílkovin do světlo zachycujících složek mimo dosah elektronového transportu meziproduktů, jako *b/f* komplex cytochromu a ATPáza [5]. Seemann et al. [21] zjistili, že vztah mezi dusíkem v listech a obsahem Rubisco je nezávislý na nárůstu intenzity záření u rodů *Phaseolus* a *Alocasia*. Nicméně kapacita elektronového transportu, která je silně korelována s obsahem cytochromu *b/f*, také obvykle souvisí s kapacitou Rubisco a obě jsou sníženy téměř paralelně při nízké intenzitě osvětlení [5]. I když mnoho druhů rostlin snižuje množství Rubisco při nízkém osvětlení, většina druhů při nízkém osvětlení nesnižuje obsah Rubisco dostatečně pro optimální rozdělení dusíku v listech.

Mechanismy, které ovlivňují množství Rubisco, zahrnují změnu rychlosti genové transkripce, translaci mRNA, post-translační regulaci mRNA a fluktuaci proteinu [5].

2.2.4.4 Zvýšená koncentrace CO₂

Zvýšení parciálního tlaku atmosférického oxidu uhličitého může posílit fotosyntézu v listech C₃ rostlin a to může vést ke zvýšenému růstu rostlin a výnosu zrn. Počáteční stimulace fotosyntézy však není obvykle udržována dlouho a klesá, dokud se neustálí na nižší rychlosti. Tento proces známý jako aklimace fotosyntézy na zvýšený parciální tlak CO₂ je v literatuře často zmiňován [5, 18, 19]. Aklimace na zvýšenou koncentraci CO₂ je z velké části připisována snížené koncentraci dusíku a Rubisco v listech [19].

Někdy je proces snížení rychlosti asimilace spojený s poklesem množství fotosyntetických bílkovin nazýván tzv. „down-regulation“. Jedním z vysvětlení tohoto jevu je, že zpětná vazba regulace fotosyntézy způsobuje akumulaci sacharidů ve fotosyntetických pletivech. To vyplývá z řady důkazů [5]:

- Sacharidy se často hromadí v listech rostlin pěstovaných při zvýšené koncentraci CO₂, což naznačuje, že schopnost pletiv sinků využívat nadbytečné produkty fotosyntézy je, přinejmenším u některých druhů, omezená.
- Manipulace s poměrem zdroj/sink buď odstraněním plodů, nebo zvýšením síly sinku odstraněním listů mění rychlost fotosyntézy a množství enzymu Rubisco. Experimenty s odstraněním plodů u sóji identifikovaly nerozpustnou formu Rubisco o vysoké molekulové hmotnosti, která je spojena s aklimací fotosyntézy.
- Omezení transportu sacharidů z listů podvázáním stonků nebo snížení aktivity transportu sacharosy ve floému v transgenních bramborách způsobily fotosyntetickou „down-regulation“ včetně snížení množství proteinu Rubisco.
- Podobná fotosyntetická aklimace nastane po zvýšení koncentrace cukrů v jednotlivých listech (feeding experimenty), což vyvolá represí exprese fotosyntetických genů.

2.3 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na C₃ rostliny

2.3.1 Zvyšování koncentrace CO₂

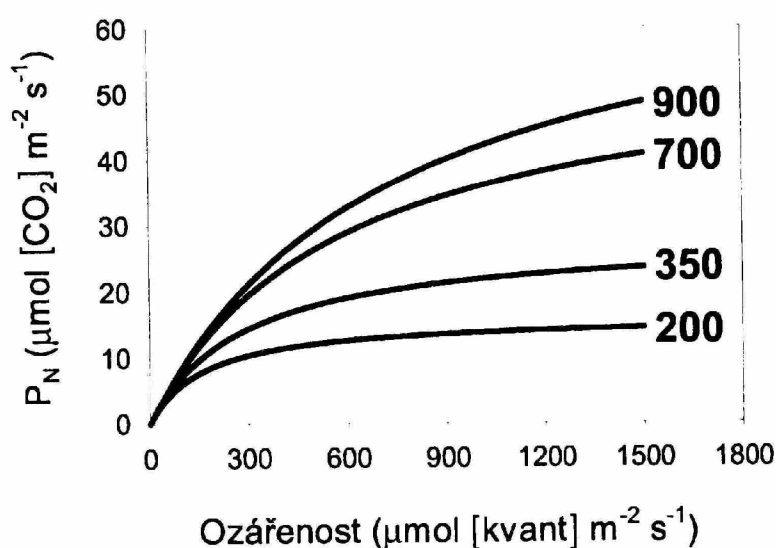
V posledních staletích byla koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře poměrně stálá. Během průmyslové revoluce v 18. a 19. století však množství CO₂ značně vzrostlo. Dalším faktorem ovlivňujícím koncentraci CO₂ je likvidace lesů, čímž dochází k rušení ekosystémů,

kteře pohlcují CO₂. A v neposlední řadě ke zvyšování hladiny CO₂ také přispívá i nárůst populace aj. Složení atmosféry se mění tak rychle, že rostliny nejsou schopny přiměřeně zareagovat přizpůsobením svých vlastností.

Přímé účinky zvýšené koncentrace CO₂ se projevují změnami rychlosti fotosyntézy, fotorespirace a vodivosti průduchů [22]. Ovšem vedle přímých účinků zvýšené koncentrace dochází ještě k významným interakcím mezi danými procesy.

2.3.2 Rychlost fotosyntézy

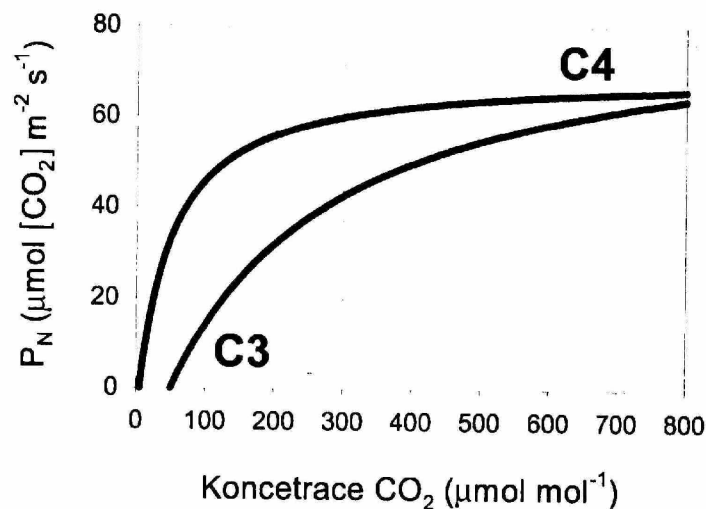
Zvýšení rychlosti fotosyntézy je důsledkem změn rychlosti karboxylace a inhibice fotorespirace způsobených zvýšenou koncentrací CO₂ ve vzduchu obklopujícím fotosyntetické orgány [23]. Tyto procesy ovlivňuje zejména dostupnost zářivé energie, což ukazuje obrázek níže (Obr. 10):



Obr. 10 Závislost rychlosti fotosyntézy na ozáření při různé koncentraci CO₂ ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), kterou udávají čísla u jednotlivých křivek. [22]

Kvantitativně nejvýznamnější je působení na enzym Rubisco, kdy dojde ke zvýšení rychlosti karboxylace, protože při standardní koncentraci CO₂ nejsou C₃ rostliny tímto substrátem saturovány, a k inhibici oxygenasové aktivity enzymu (fotorespirace), která za standardní koncentrace snižuje rychlosti fotosyntézy o 20–50 % [24]. CO₂ je kompetitivní inhibitor oxygenasové aktivity.

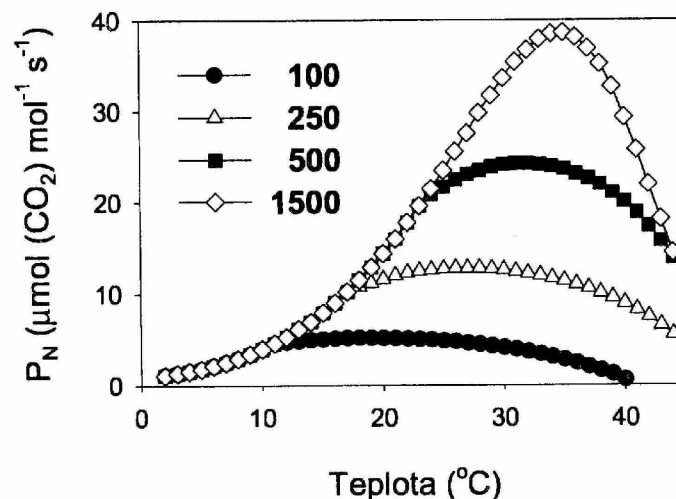
Rozdělení rostlin na typ C₃ a C₄ [22] je založeno na chemické struktuře prvního stabilního produktu karboxylace při fotosyntetické fixaci CO₂. U rostlin C₃ vzniká fosfoglycerát, jenž je složen ze tří atomů uhlíku, na rozdíl od rostlin C₄, u kterých vzniká nejdřív oxalacetát obsahující čtyři atomy uhlíku v molekule. Jeden ze základních rozdílů mezi typem C₃ a C₄ vyplývá z grafu (Obr. 11). Rostliny C₄ jsou při stávající koncentraci CO₂ substrátem nasyceny, ale naopak rostliny C₃ jsou schopny reagovat na další zvýšení koncentrace zvýšením rychlosti fotosyntézy.



Obr. 11 Charakteristika závislosti rychlosti čisté fotosyntézy na koncentraci CO₂ u rostlin C3 a C4 [22]

Podle názoru Theobalda et al. [25] je při zvýšené koncentraci CO₂ maximální rychlost karboxylace úměrná obsahu enzymu Rubisco a při nasycení světlem je úměrná k obsahu tylakoidní ATP-syntasy.

Na rychlost fotosyntézy má také vliv interakce oxidu uhličitého se změnou teploty. Tento jev je znázorněn na obr. 12. Z grafu lze vyčíst, že s vyšší koncentrací CO₂ se teplotní optimum posouvá k vyšším teplotám a toto optimum se značně zužuje. Ke zvýšení teploty dochází buď kvůli zvýšené absorpci dlouhovlnného záření vyvolané zvýšenou koncentrací skleníkových plynů v atmosféře, nebo kvůli poklesu vodivosti průduchů s následným poklesem rychlosti transpirace [22].



Obr. 12 Závislost rychlosti fotosyntézy na teplotě při ozáření, jejichž hodnoty pro jednotlivé křivky jsou uvedeny v grafu [22]

2.3.2.1 Aklimace na zvýšenou koncentraci CO₂

Aklimace je přizpůsobení rychlosti fyziologických procesů na změněné hodnoty některého faktoru vnějšího prostředí [22]. Tímto jsou myšleny změny, ke kterým dochází při

dlouhodobém pěstování rostlin při změněných podmínkách. Nejčastěji jde o zvýšení koncentrace CO_2 . To znamená, že fotosyntetická charakteristika listů, které se vyvinuly už v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 , se liší od charakteristiky listů rostlin, které byly předtím pěstovány při běžné koncentraci CO_2 [24]. Nejvýznamněji se aklimace projevuje postupným poklesem rychlosti čisté fotosyntézy. Dále se snižuje i obsah dusíku, rozpustných bílkovin a Rubisco v listech.

Podle Oostena a Besforda [26] je možné vysvětlit omezení aktivit fotosyntetického aparátu při pěstování ve zvýšené koncentraci CO_2 tím, že při kultivaci rostlin v běžných podmínkách odpovídá rychlost tvorby asimilátů kapacitě transportních drah a aktivitě příslušných sinků. Při pěstování za zvýšené koncentrace CO_2 je rychlost tvorby asimilátů vyšší než jejich transport a využití v sinku. V cytosolu pak dochází ke zvyšování koncentrace hexos. Signálem pro pokles exprese fotosyntetických genů mohou být přenašeči hexos nebo hexokinasy fosforylující hexosy.

Pro aklimaci jsou dva důvody. Rostlina není schopna využít nadbytečné asimiláty a v důsledku toho reguluje pokles aktivity jejich zdrojů. Druhým důvodem je dostačující menší množství enzymu Rubisco pro fotosyntézu při vyšší koncentraci CO_2 [22].

2.3.3 Rychlost fotorespirace

Základem fotosyntézy a fotorespirace je schopnost enzymu Rubisco navázat na jeden substrát (ribulosa-1,5-bisfosfát) CO_2 při karboxylaci i O_2 při oxygenaci. Navázáním molekuly O_2 vznikne fosfoglykolát, což je počátkem tzv. glykolátové cesty. Během ní se navážou dvě molekuly O_2 a uvolní se jedna molekula CO_2 . V normální atmosféře je u C_3 rostlin poměr fixace $\text{CO}_2:\text{O}_2$ asi 3:1.

Fotorespirace je zpomalena snížením koncentrace O_2 na 5 % a méně nebo také dvojnásobným až trojnásobným zvýšením koncentrace CO_2 [22]. Tato změna způsobuje dva jevy. S vyšší koncentrací CO_2 se zaprvé zvyšuje rychlost karboxylace a tím i celé fotosyntézy. Zadruhé se zvyšuje poměr koncentrace CO_2/O_2 . Tím se snižuje fotorespirace.

2.3.4 Vodivost průduchů

Vodivost průduchů je dána mírou jejich otevřenosti, která je také ovlivňována změnou koncentrace CO_2 obklopující list. U většiny rostlin vyvolává zvýšení koncentrace CO_2 přivření průduchů. Podle pokusů Drakeho et al. [24] činí průměrné snížení vodivosti průduchů při zdvojnásobené koncentraci 20 %.

Pokles vodivosti však neznamena automatické snížení rychlosti fotosyntézy. Současně se totiž zvyšuje gradient koncentrace CO_2 mezi atmosférou a místem karboxylace, a to fotosyntézu podporuje.

Dalším faktorem ovlivňujícím vodivost průduchů je snížená rychlost transpirace (výdej vody povrchem rostlin), která modifikuje jednotlivé složky energetické bilance listu. To se pak promítá ve změně teploty listu. Podle Idsoa et al. [27] je zvýšení teploty listů zvýšenou koncentrací CO_2 přímo úměrné poklesu vodivosti průduchů.

Aklimace vodivosti průduchů během dlouhodobé kultivace rostlin při zvýšené koncentraci CO₂ zatím nebyla prokázána [22]. Na druhou stranu se snižuje hustota průduchů na listech rostlin dlouhodobě pěstovaných při vyšší koncentraci CO₂.

2.3.5 Rychlost dýchání

González-Meler et al. [28] jako jedni z mála prokázali přímý vliv zvýšené koncentrace CO₂ na dýchání rostlin. Zvýšenou koncentrací CO₂ inhibovali oxidaci externě dodaného sukcinátu nebo NADH k suspenzi izolovaných mitochondrií. Přesněji byla inhibována aktivita sukcinátdehydrogenasy a cytochrom-c-oxidasy. Tím zjistili, že část inhibičního účinku CO₂ na dýchání je lokalizována přímo v mitochondriích, protože zdvojnásobení koncentrace snížilo rychlost příjmu O₂ mitochondriemi o 10–15 %.

2.3.6 Účinky zvýšené koncentrace CO₂ na dřeviny

Pro dřeviny je charakteristická zejména tvorba jejich sekundárních pletiv, která poskytuje dostatečnou pevnost i při velkých výškách kmenů. Jde o velkou investici především uhlíku do buněčných stěn. Tyto energetické a materiální náklady jsou kompenzovány dlouhou dobou života těchto rostlin. To vede k enormní adaptabilitě dlouhověkových rostlin.

Zvýšená koncentrace CO₂ má vliv na produkci biomasy, ale rychlost vývoje se zvyšuje zejména v počátečních fázích. Kvůli tomu je pak obtížné srovnání variant s různou koncentrací CO₂, protože jsou ve stejném čase srovnávány vývojově rozdílné rostliny [22].

Na základě sledování tloušťky letokruhů u dubu cesmínového, které rostly 30 let poblíž přirozeného zdroje CO₂, ve srovnání se stromy rostoucími ve standardní atmosféře Hättenschwiller et al. [29] odvodili, že v atmosféře se zvýšenou koncentrací CO₂ může dojít k rychlejší regeneraci lesních porostů.

Saxe et al. [30] na základě řady pokusů tvrdí, že zvýšená rychlost fotosyntézy v důsledku zvýšené koncentrace CO₂ zůstává stejná i při několikaleté kultivaci stromů. Na druhou stranu však byla v některých pokusech aklimace prokázána. Například Osborne et al. [31] sledovali po dobu čtyř let jahodku indickou při zvýšené koncentraci CO₂ a prokázali výraznou aklimaci, která se projevila především sníženým množstvím enzymu Rubisco.

2.4 Metody stanovení obsahu Rubisco

2.4.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE je jednou z elektromigračních metod. Základním principem těchto technik je, že látky rozpuštěné v elektrolytu a umístěné v elektrickém poli, které nesou náboj, se pohybují konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, anionty k anodě, kationty ke katodě. Rychlost závisí na náboji částic a intenzitě elektrického pole [32]:

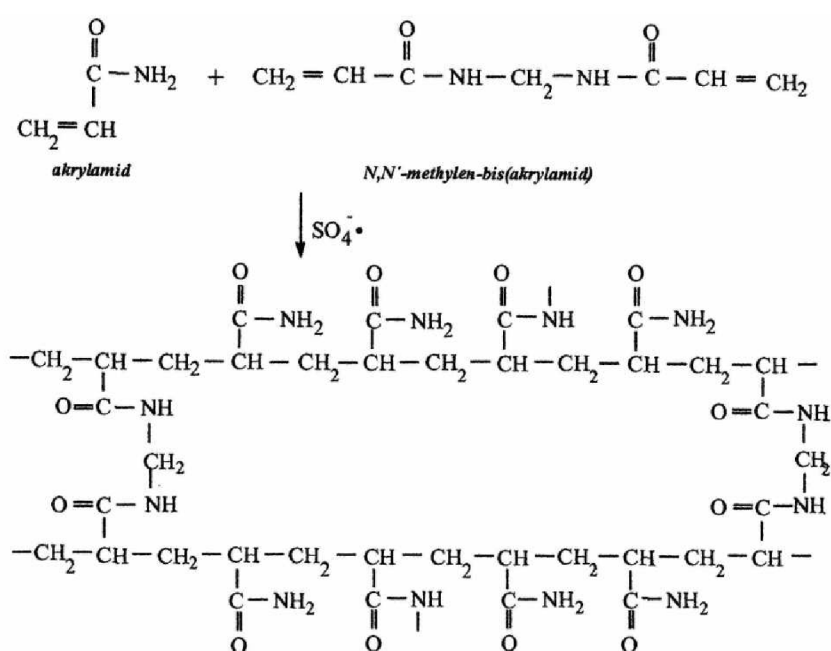
$$F_E = qE \quad (8)$$

Opačně působí brzdící síla vnitřního tření daná Stokesovým zákonem:

$$F_F = -6\pi\eta rv \quad (9)$$

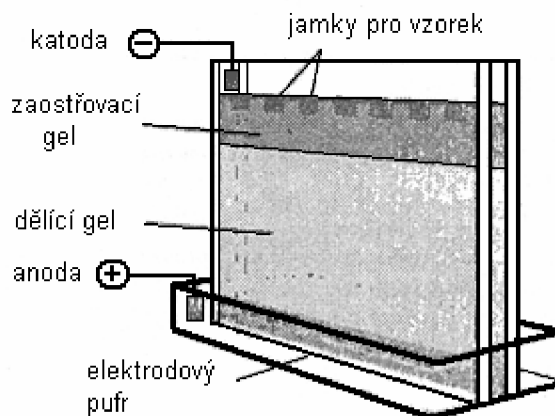
kde η je viskozita roztoku a r je poloměr iontu.

Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody dělení makromolekul. Porézní gely (v tomto případě polyakrylamidový gel) fungují na principu síťového efektu a na základě elektroforetické pohyblivosti. Polyakrylamidový gel je inertní, mechanicky pevný, průhledný a je možné připravit jej s předem určenými vlastnostmi, jako je hustota zesíťování gelu nebo gradient hustoty gelu. Připravuje se ze dvou monomerů kopolymerací (akrylamid a *N,N'*-metylen-bis(akrylamid)) za přítomnosti iniciátoru peroxodisíranu amonného (Obr. 13). Reakce probíhá v roztoku pufru. Iniciátor se rozkládá na radikály a ty zahájí polymerační reakci. Stabilizátorem volných radikálů je tzv. TEMED (tetramethylethylendiamin). Vzniká struktura tvořená otevřenými póry určité velikosti, v níž je kapalina s pufrům. Gel je umístěn mezi dvěma skleněnými deskami. Při průchodu bílkovin gelem se molekuly zachycují v těchto pórech a pak se dělí podle své velikosti.



Obr. 13 Vznik polyakrylamidu [32]

Velmi ostré zóny lze získat při diskontinuální elektroforéze, kde se používají dva gely – dolní dělicí gel a horní zaostřovací gel. V zaostřovacím gelu je nejpohyblivější chloridový aniont, poté následují zóny bílkovin podle elektroforetických pohyblivostí a poslední zónou je glycin. Vytváří se ostře ohraničené těsně za sebou následující zóny iontů a vzniká stupňovitý gradient potenciálu. Samozaostřující efekt znamená, že pokud se nějaký iont zpozdí za svou zónou, vyšší potenciál ho dostatečně urychlí, aby se opět připojil ke své zóně. V dělicím gelu je vyšší pH a mění se pohyblivost iontů a dochází k rozdělení zón od sebe. Pohyb čela indikuje nízkomolekulární barvivo bromfenolová modř.



Obr. 14 Aparatura pro SDS-PAGE [32]

Zkratkou SDS se rozumí elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného, který udílí bílkovinám uniformní náboj překrývající jejich vlastní náboj. Díky tomu se pak bílkoviny dělí pouze na základě rozdílných molekulových hmotností. Některé bílkoviny mají navíc více než jeden polypeptidový řetězec a pomocí SDS se poruší nekovalentní interakce mezi podjednotkami.

Po provedení samotné elektroforézy následují další na sebe navazující kroky. Nejprve je nutná fixace a detekce podoby proteinových pruhů na gelu pomocí roztoku Coomassie Blue. Poté se odbarvuje obarvené pozadí gelů. Hotové gely vyhodnocuje speciální software, jenž převede jednotlivé zóny na píky. Vzorky se pak porovnávají s plochou píků standardů.

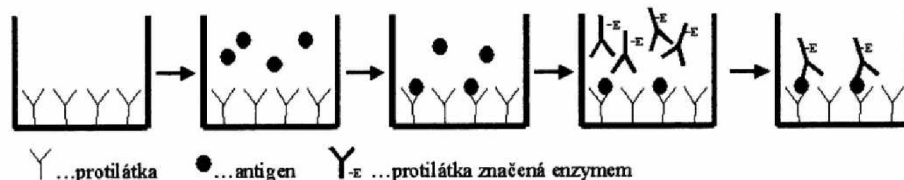
SDS-PAGE je nejpoužívanější metodou pro zjištění obsahu enzymu Rubisco [33].

2.4.2 ELISA

Zkratka ELISA pochází z anglického „enzyme-linked immuno-sorbent assay“. Je to citlivá neprecipitační imunochemická metoda, která je schopná detekovat nízké koncentrace antigenu a protilátky [32]. Pro lepší citlivost stanovení imunokomplexu antigen-protilátka se na jeden z imunoreaktantů váže vhodná značka. V heterogenních imunoanalýzách jsou to nejčastěji enzymy, které umožňují bezpečné, citlivé a poměrně jednoduché stanovení. Mezi nejčastěji používané enzymy patří peroxidasa a alkalická fosfatasa. Ty katalyzují přeměnu substrátu na barevný nebo fluoreskující produkt, od něhož se odvíjí spektrofotometrické nebo fluorimetrické stanovení. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky [34].

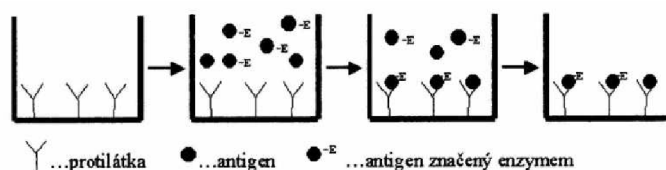
Jako pevný nosič se nejčastěji používají stěny jamek mikrotitračních destiček z tvrzeného polystyrenu. Jsou vhodné pro analýzu většího souboru vzorků, nikoli pro ojedinelé analýzy. Nejcitlivější provedení umožňují stanovit množství analytu $10^{-12} - 10^{-9}$ g [32].

Tuto metodu lze provést jako kompetitivní a nekompetitivní. Při nekompetitivní enzymové imunoanalýze (Obr. 15) nejdříve reaguje protilátka vázaná na pevný nosič s antigenem ve vzorku. Až se ustaví rovnováhy, systém se promyje a na zachycený antigen se váže další protilátka označená enzymem. Po promytí se změří enzymová aktivita zachycená na pevnou fázi.

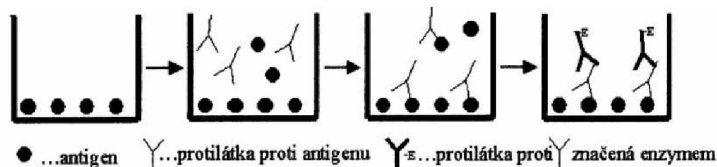


Obr. 15 Nekompetitivní enzymová imunoanalýza [32]

Kompetitivní ELISA má přímé a nepřímé provedení. Při přímé kompetitivní enzymové imunoanalýze (Obr. 16) protilátka vázaná na pevný nosič reaguje zároveň s antigenem ze vzorku a s označeným antigenem, které soutěží o omezený počet vazebných míst protilátky. Po ustavení rovnováhy se systém promyje a změří se enzymová aktivita zachycená na pevné fázi. Čím více antigenu je ve vzorku, tím nižší je zjištěná enzymová aktivita. U nepřímé kompetitivní enzymové imunoanalýzy (Obr. 17) je první část kompetitivní a další je nekompetitivní. Antigen vázaný na pevný nosič soutěží s antigenem ve vzorku o omezený počet vazebných míst protilátky, která se do systému přidává v roztoku. Čím více antigenu obsahuje vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Když se ustaví rovnováha a systém se promyje, množství navázané protilátky se zjišťuje v nekompetitivní fázi. Proti navázané protilátce se použije označená protilátka. Výhodou oproti přímé metodě je univerzálnost použití označené protilátky.



Obr. 16 Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza [32]



Obr. 17 Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza [32]

Metodiev et al. [35] tuto metodu použili pro stanovení obsahu Rubisco z ječmene. Protilátky vytvořili prostřednictvím živých králíků a pro označení antigenu byla použita peroxidasa. Absorbance byla měřena při vlnové délce 492 nm.

2.4.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je elektromigrační metoda, která probíhá v tenkých kapilárách naplněných nosným elektrolytem a ponořených oběma konci do elektrodových nádobek. Kapiláry mohou být z křemene, skla nebo z plastu. Kromě elektroforetického principu se zde uplatňuje elektroosmotický tok [34] (spontánní tok kapaliny v kapiláře v důsledku náboje na stěně kapiláry).

Tenké kapiláry dobře odvádí teplo, a proto může být použito vysoké napětí (100-300 V/cm) [32]. Tím se zkracuje čas, kdy dochází k dělení vzorku. Kapiláry mohou být

naplněny pufrem nebo polymerním gelem. Malý průměr kapilár napomáhá tomu, aby nedocházelo k rozostřování zón. Při použití gelu se látky mohou separovat stejně jako u SDS-PAGE. Metoda má vysokou citlivost, proto stačí malá množství vzorku, a používá se zařízení s automatickým dávkováním vzorku a vyhodnocováním.

Warren et al. [33] použili tuto metodu pro stanovení obsahu Rubisco u *Eucalyptus diversicolor*. Extrakt z listů byl srážen kyselinou trichloroctovou a poté byla provedena kapilární elektroforéza pomocí systému Bio-Rad 3000. Separačním pufrem byl CE-SDS pufr. Křemenná kapilára měla průměr 50 μm , celkovou délku 24 cm a efektivní délku 19,4 cm. Měření probíhalo při teplotě 20 °C a konstantním napětí 15 kV. Detektor byl nastaven na 220 nm. Při vyhodnocení je pak plocha píku funkcí jak času migrace, tak koncentrace.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Vzorky listů buku lesního a jehlic smrku ztepilého byly odebrány na Experimentální ekologické stanici Ústavu systémové biologie a ekologie AVČR Bílý Kříž nacházející se v Moravskoslezských Beskydech. Stanice je položená v nadmořské výšce cca 908 m n. m. V roce 1997 zde byly vybudovány dvě minisféry (Obr. 18) pro sledování vlivu zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na rostliny. V jedné minisféře byly rostliny pěstovány při koncentraci CO_2 $350 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ambient – A) a ve druhé minisféře byla koncentrace CO_2 udržována na $700 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (elevated – E). V práci byl srovnáván obsah enzymu Rubisco ve slunných (ex) a stinných (sh) jehlicích smrku ztepilého (*Picea abies*) a v listech buku lesního (*Fagus sylvatica*) a dále obsah Rubisco v jehlicích resp. listech rostoucích v A a E. Jehlice smrku ztepilého byly odebrány 24. 7. 2012, a to paralelně ex a sh, A a E. Jehlice byly odštířeny od větviček, zváženy (100–130 mg), vloženy do mikrozkuhavky Eppendorf a umístěny do kapalného dusíku. Do analýzy byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu při teplotě $-68 \text{ }^\circ\text{C}$. Odběr listů buku lesního se uskutečnil 25. 7. 2012, opět paralelně ex a sh, A a E. Z čepele listu byla vystřižena část odpovídající ploše 10–20 cm^2 , tato část byla zvážena a její přesná plocha byla změřena na areametry Licor. Další postup byl stejný jako u jehlic smrku.



Obr. 18 Minisféry Experimentální ekologické stanice Akademie věd ČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech [36]

3.2 Stanovení obsahu Rubisco metodou SDS-PAGE

Stanovení bylo provedeno podle metod Damervalové et al. [37] a Rogerse et al. [38] s úpravou podle Floriána [39] a Zachové [40].

3.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO[®] CZ Hradec Králové. Parametry: kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI.

Centrifuga MLW T52.1

Vortex – Stuart firmy MERCI s.r.o.

Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 od firmy BIO-RAD

Zdroj Power Pac 300 od firmy BIO-RAD

Třepačka LT2

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid (SERVA)

N, N'-metylenbisakrylamid (SERVA)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma ALDRICH)

Kyselina chlorovodíková (Penta)

SDS – dodecylsulfát sodný (Sigma ALDRICH)

Peroxodisíran amonný (SERVA)

Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (SERVA)

Glycin (SERVA)

DTT – dithiothreitol (Sigma ALDRICH)

Glycerol (Sigma ALDRICH)

2-merkptoethanol (Sigma ALDRICH)

Methanol (Lach-Ner)

Brilantní modř G 250 – Coomassie Blue (SERVA)

Kyselina octová (Lachema)

Ethanol (Lachema)

Butanol (Lachema)

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

3.2.3 Příprava roztoků

3.2.3.1 Roztoky pro přípravu gelů

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

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

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

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

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

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

TEMED: komerčně dodávaný roztok

3.2.3.2 Roztoky pufrů

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

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

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

3.2.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin

Stabilizační roztok: Bylo smícháno 100 ml methanolu a 400 ml vody.

Barvicí roztok: Bylo smícháno 0,5 g Coomassie Blue G 250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.

Odbarvovací roztok: Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

3.2.4 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla nejdříve omyta vodou a poté odmašťovacím prostředkem. Následně byla opláchnuta destilovanou vodou a vyleštěna buničinou namočenou v ethanolu. Skla byla upevněna do stojanu tak, že větší sklo bylo vzadu. Spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem svrchu byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byly použity 5% zaostřovací gel a 8% separační gel.

3.2.4.1 Separační gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky napipetovány objemy roztoků podle tabulky 1.

Tabulka 1 Objemy roztoků k přípravě 8% separačního gelu

Roztok	V [ml]
destilovaná voda	4,6
A	2,7
B	1,5
D	0,1
E	0,1
TEMED	0,006

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

3.2.4.2 Zaostřovací gel

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

Tabulka 2 Objemy roztoků k přípravě 5% zaostřovacího gelu

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

Po ztuhnutí separačního gelu byl slit butanol a gel byl promyt destilovanou vodou. Roztok E a TEMED byl opět přidáván až před nalitím. Roztok byl nalit na vrstvu separačního gelu až po okraj a ihned byl do prostoru mezi skla vložen elektroforetický hřebínek. Hřebínek se odstraňuje až před nanášením vzorků a samotným stanovením. Takto připravený gel se může uchovávat v lednici, ale pouze do druhého dne.

3.2.5 Příprava standardu

V mikrozkušavce Eppendorf bylo rozpuštěno 0,5 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy v 1 ml vzorkového pufru (standard $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Směs byla promíchána na Vortexu a 5 minut vařena v termobloku. Standard byl uchován v mrazničce při teplotě $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Příprava standardu probíhala stejně jako příprava vzorků, což je důležité pro výpočet.

3.2.6 Příprava vzorků

Vzorek jehlic či listů 100–150 mg byl rozetřen v třecí misce s mořským pískem. Poté byly přidány 2 ml TRIS pufru. Vzorek byl asi 30 sekund homogenizován. Výsledná suspenze byla převedena do centrifugační zkumavky a asi 2 minuty odstředována. Ze získaného extraktu

bylo odpipetováno 0,5 ml supernatantu do mikrozkušavky Eppendorf a bylo přidáno 0,5 ml vzorkového pufru. Tato směs byla promíchána na Vortexu a 5 minut vařena v termobloku. Po vychladnutí byly vzorky uchovány v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.7 Elektroforéza

Skla s připraveným ztuhlým gelem byla vytažena ze stojanu a očištěna od zbytků gelu. Opatrně byl odstraněn hřebínek a skla byla vložena do stojanu pro elektroforézu a to tak, aby větší sklo bylo směrem ven. Do vnitřního prostoru stojanu byl nalit elektrodový pufr a počkalo se, jestli pufr neprotéká. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby a vnější prostor byl naplněn asi do poloviny elektrodovým pufrem. Pomocí automatické pipety s dlouho špičkou bylo do prvních dvou jamek nanášeno po $5\text{ }\mu\text{l}$ standardu Rubisco. Do následujících jamek byly nanášeny jednotlivé vzorky o objemu $5\text{ }\mu\text{l}$. Takto připravená aparatura byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno konstantní napětí 80 V . V průběhu analýzy bylo nutné sledovat, zda pufr nevytéká z vnitřního prostoru, případně jej doplnit. Elektroforéza probíhala asi 90–120 minut, až čelo vzorku dostoupilo asi 1 cm od spodního okraje gelu. Každý vzorek byl analyzován třikrát ($n = 3$).

3.2.8 Vizualizace bílkovin

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

3.2.9 Vyhodnocení gelů

Hotové gely byly naskenovány. Kvantifikace velké podjednotky enzymu Rubisco byla provedena programem FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X. Zóny velkých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Obsah enzymu Rubisco ve vzorcích byl vypočítán porovnáním plochy zóny jednotlivých vzorků a plochy zóny standardu. Protože poměr velikosti plochy a obsahu je ovlivněn mnoha faktory, bylo nutné nanést standard Rubisco na každý gel.

3.2.10 Příklad výpočtu obsahu enzymu Rubisco

Pro stanovení byl použit standard o koncentraci $0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Obsah Rubisco v celkovém objemu extraktu:

$$c = \frac{90935,57 \cdot 0,5 \cdot 8}{51620,31} = 7,05\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$$

Obsah Rubisco vztažený na jednotkovou plochu jehlice:

$$c = \frac{7,05}{0,002682 \cdot 1000} = 2,63 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$$

Obsah Rubisco vztažený na jednotkovou hmotnost listu:

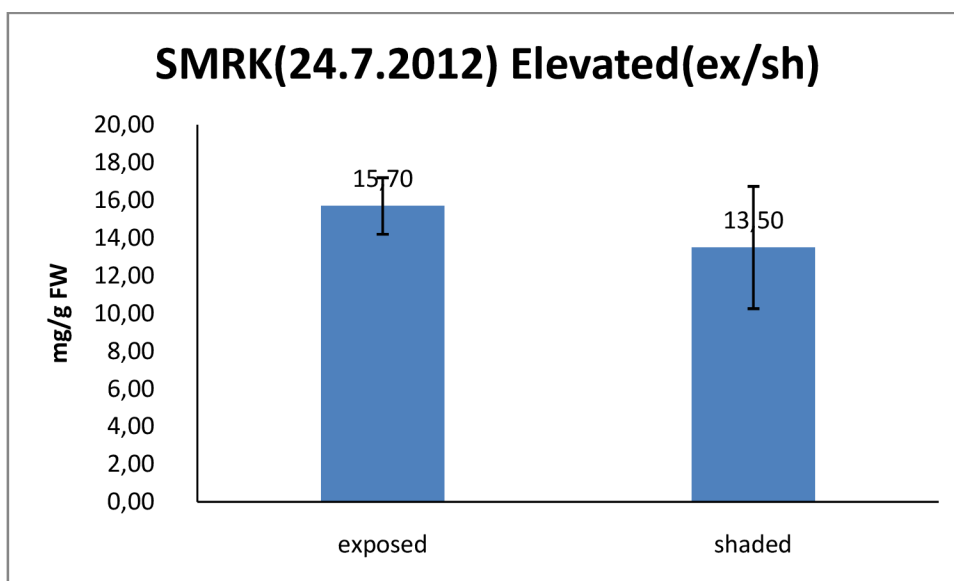
$$c = \frac{7,05 \cdot 1000}{257} = 27,42 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{FW}}^{-1}$$

3.2.11 Statistické zpracování výsledků

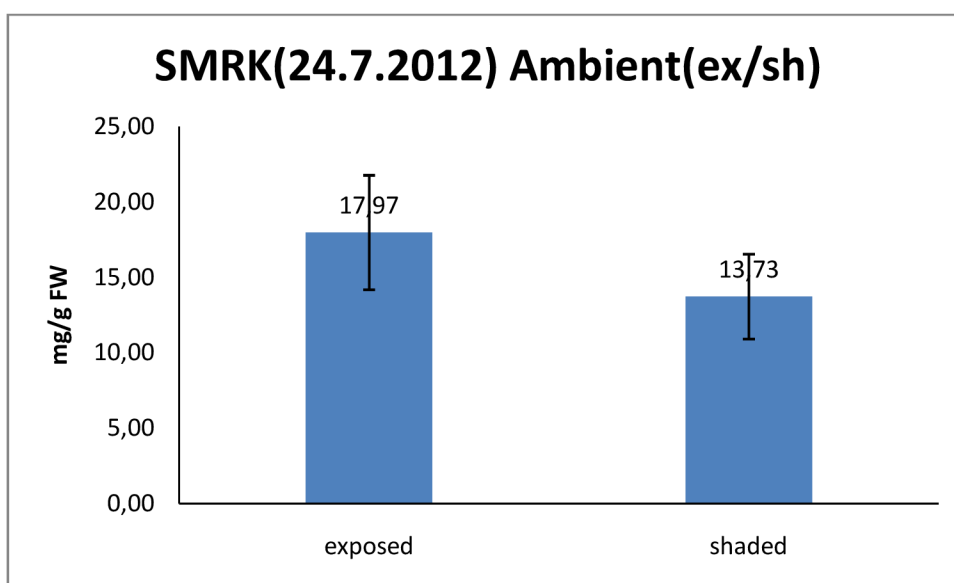
Ze tří stanovených hodnot daného vzorku byl vypočten průměr, který následně sloužil pro výpočet obsahu Rubisco.

Pro statistické vyhodnocení bylo nutné vytvořit tzv. chybové úsečky. Z průměrné hodnoty obsahu Rubisco jednotlivých vzorků, např. slunných listů buku lesního pěstovaného v E byla v programu Microsoft Excel pomocí funkce „SMODCH“ vypočtena standardní odchylka (SD). Poté byla standardní odchylka rozšířena pro interval spolehlivosti (IS) 95 % pomocí funkce „CONFIDENCE“. Tyto hodnoty byly dosazovány do chybových úseček.

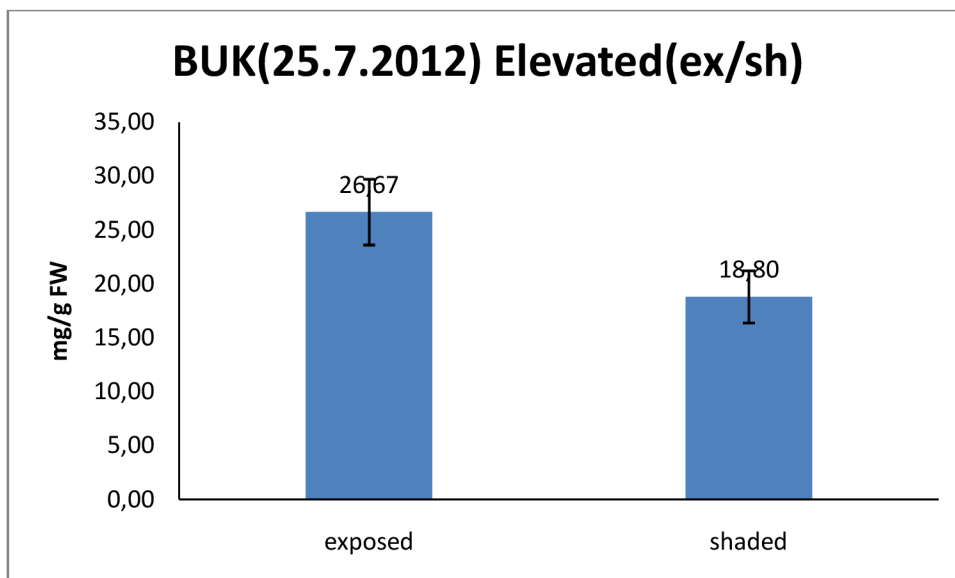
4 VÝSLEDKY



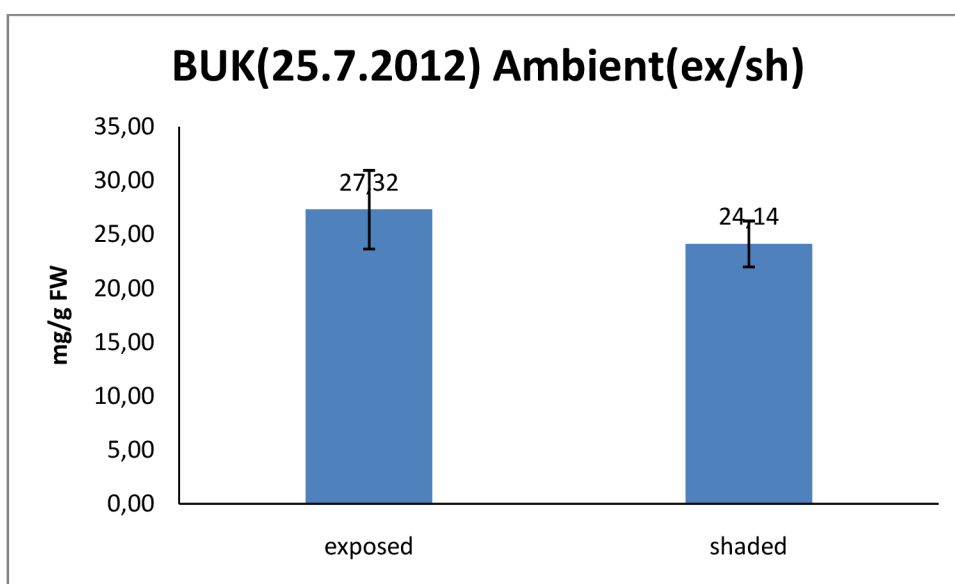
Obr. 19 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u smrku ztepilého kultivovaného při zvýšené koncentraci CO_2 . Vzorčky odebrané 24. 7. 2012, $n = 3$, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



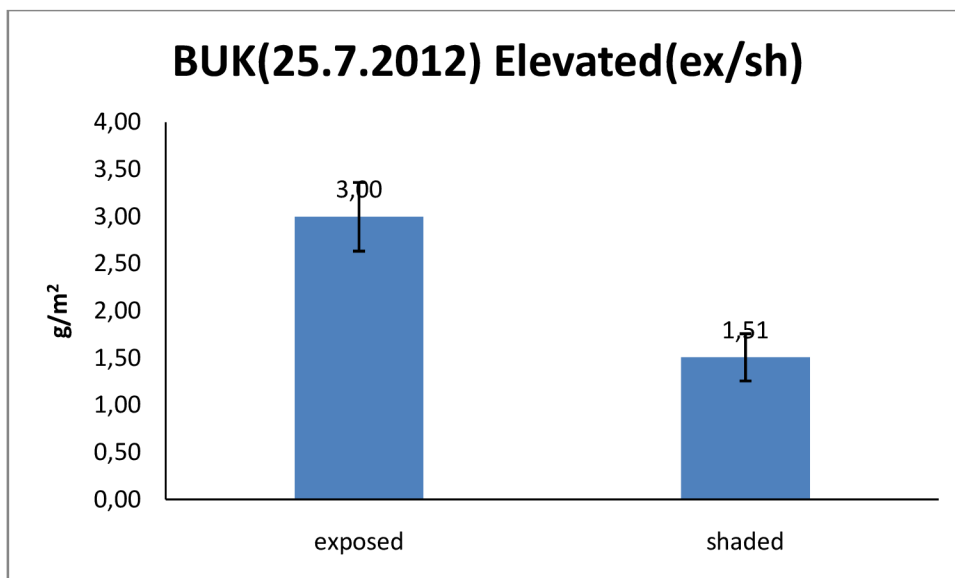
Obr. 20 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u smrku ztepilého kultivovaného při normální koncentraci CO_2 . Vzorčky odebrané 24. 7. 2012, $n = 3$, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



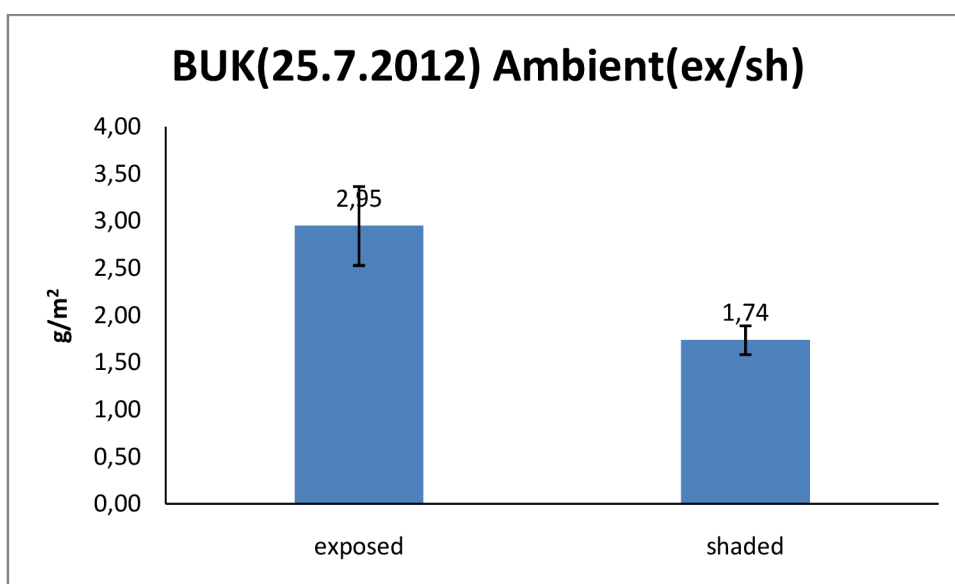
Obr. 21 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u buku lesního kultivovaného při zvýšené koncentraci CO_2 . Vzorky odebrané 25. 7. 2012, $n = 3$, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



Obr. 22 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u buku lesního kultivovaného při normální koncentraci CO_2 . Vzorky odebrané 25. 7. 2012, $n = 3$, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



Obr. 23 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech, vztažené na jednotkovou plochu listu, u buku lesního kultivovaného při zvýšené koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 25. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.

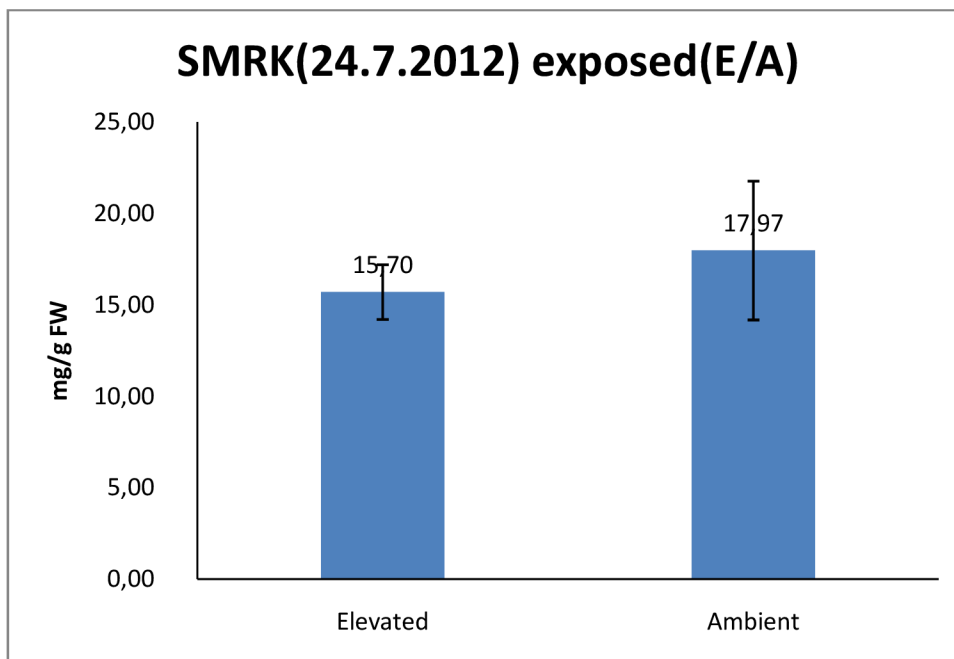


Obr. 24 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech, vztažené na jednotkovou plochu listu, u buku lesního kultivovaného při normální koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 25. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.

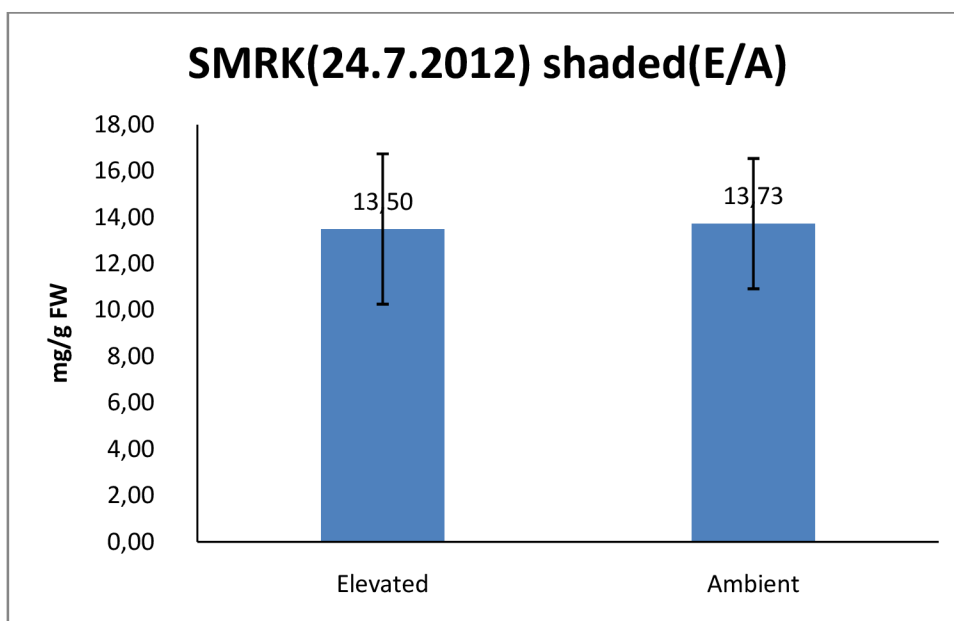
Z obr. 19 a obr. 20 je patrné, že u smrku ztepilého nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích ani při zvýšené, ani při normální koncentraci CO₂. Při zvýšené koncentraci CO₂ činil pokles obsahu Rubisco ve stinných jehlicích oproti slunným jehlicím 14 %, při normální koncentraci CO₂ 24 %.

Z obr. 21–24 lze vyčíst, že pokud byl obsah Rubisco v listech buku lesního vztažen na gram čerstvé hmotnosti jako u smrku, mezi slunnými a stinnými listy v atmosféře se zvýšenou

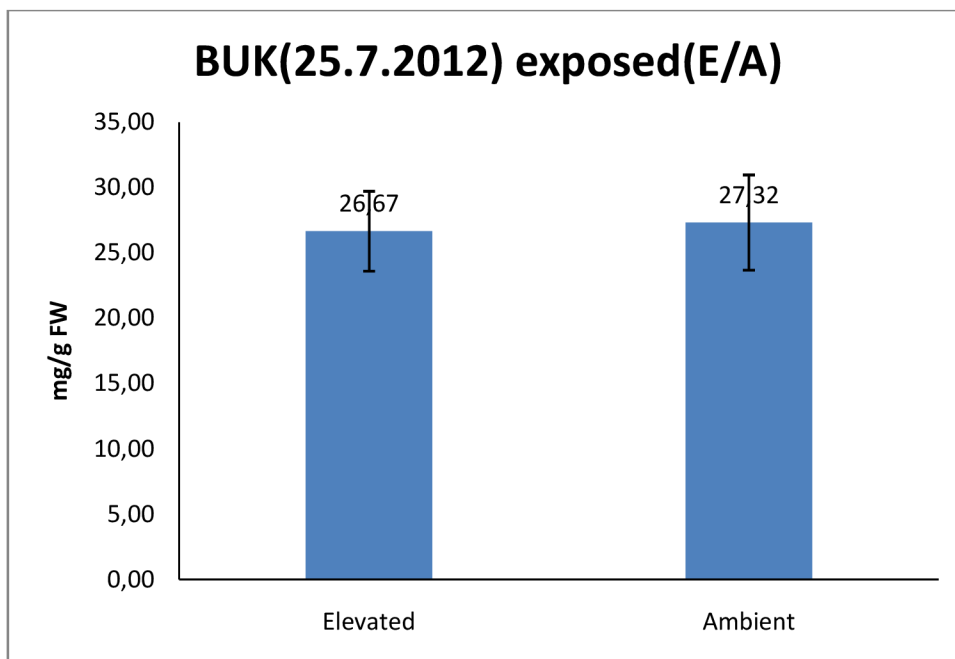
koncentrací CO₂ byl zaznamenán statisticky významný rozdíl, avšak při normální koncentraci CO₂ nikoli. Pokles obsahu Rubisco ve stinných listech oproti slunným činil 30 %, resp. 12 %. Pokles obsahu Rubisco u stinných listů oproti slunným byl výraznější, jestliže byl obsah enzymu vztažen na jednotkovou plochu listu. V tomto případě byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco jak při zvýšené, tak při normální koncentraci CO₂, přičemž tento rozdíl činil 50 %, resp. 41 %.



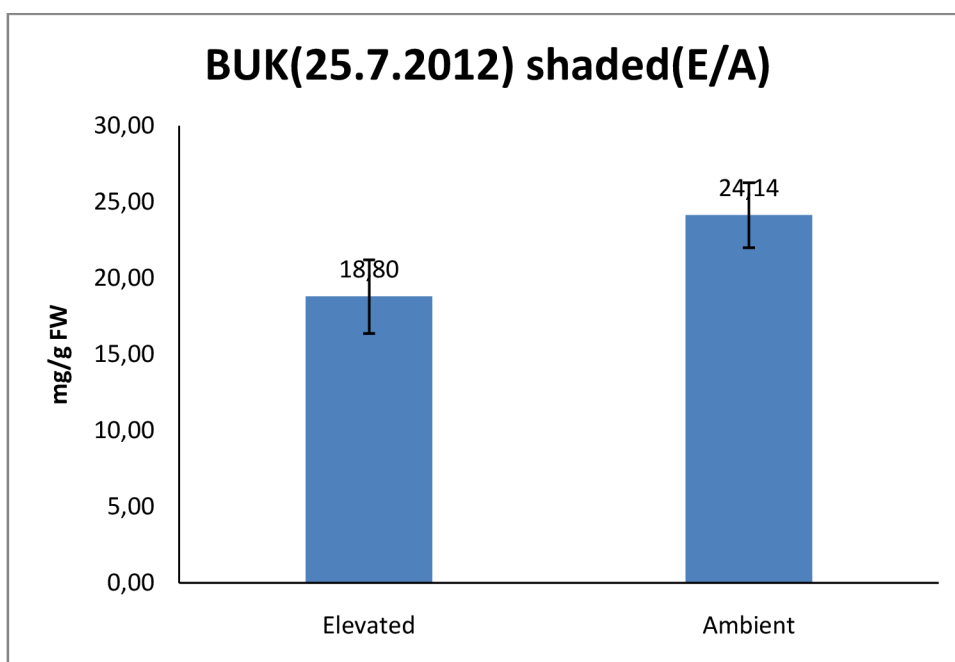
Obr. 25 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných jehlicích, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u smrku ztepilého kultivovaného při zvýšené a normální koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 24. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



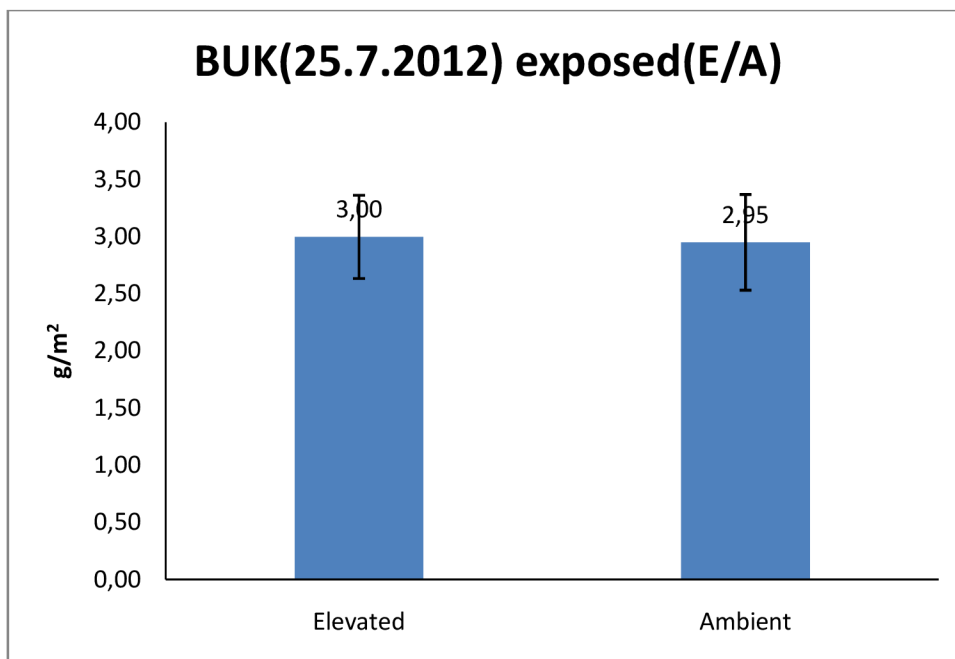
Obr. 26 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve stinných jehlicích, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u smrku ztepilého kultivovaného při zvýšené a normální koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 24. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



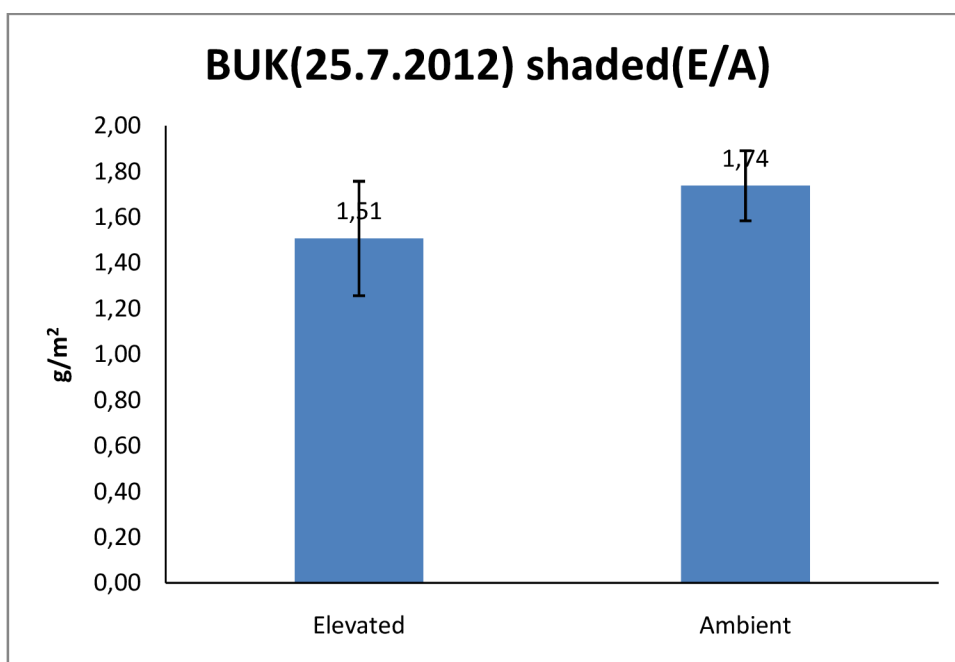
Obr. 27 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných listech, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u buku lesního kultivovaného při zvýšené a normální koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 25. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



Obr. 28 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve stinných listech, vztažené na gram čerstvé hmotnosti, u buku lesního kultivovaného při zvýšené a normální koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 25. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



Obr. 29 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných listech, vztažené na jednotkovou plochu listu, u buku lesního kultivovaného při zvýšené a normální koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 25. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.



Obr. 30 Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve stinných listech, vztažené na jednotkovou plochu listu, u buku lesního kultivovaného při zvýšené a normální koncentraci CO₂. Vzorky odebrané 25. 7. 2012, n = 3, chybové úsečky vyjadřují intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$.

Obr. 25 a obr. 26 zachycují obsah enzymu Rubisco u smrku ztepilého, kde byl porovnáván rozdíl mezi jehlicemi rostoucími v atmosféře se zvýšenou a normální koncentrací CO₂. Z výsledků vyplývá, že jak u slunných, tak u stinných jehlic došlo při zvýšené koncentraci CO₂ k poklesu obsahu Rubisco oproti jehlicím v normální koncentraci CO₂, nicméně tyto

rozdíly nejsou statisticky významné a u stinných jehlic je rozdíl prakticky zanedbatelný. Pokles činil 13 %, resp. 2 %.

Z obr. 27–30 je patrné, že u stinných listů buku lesního došlo při zvýšené koncentraci CO_2 k výraznějšímu poklesu obsahu Rubisco než u listů slunných. Z toho pouze u stinných listů byl pokles obsahu Rubisco vztaženého na čerstvou hmotnost statisticky významný. Rozdíl byl 22 %. Pokles obsahu Rubisco ve stinných listech při zvýšené koncentraci CO_2 vztažený na jednotkovou plochu listu činil 13 %. U slunných listů byl rozdíl zanedbatelný a jeho hodnota je cca 2 %.

5 DISKUSE

Snížení obsahu Rubisco je podle většiny autorů [19, 20, 41] hlavním znakem aklimace C3 rostlin na zvýšenou koncentraci CO₂. Např. Seneweera et al. [19] uvádí ve své studii pokles obsahu Rubisco při zvýšené koncentraci CO₂ u rozvíjejících se listů o 19 %. Pro aklimaci obsahu Rubisco existují dvě teorie:

Moore et al. [41], Leegood et al. [5] a Seneweera a Conroy [42] tvrdí, že je aklimace způsobena specifickou redukcí represí exprese genů pro Rubisco, která je zprostředkována hromaděním rozpustných sacharidů, jež potlačují expresi genů *rbcS* a *rbcL*.

Jiní autoři [19, 43, 44] argumentují, že aklimace obsahu Rubisco je důsledkem nespecifického poklesu obsahu dusíku v listech v důsledku nahromadění většího množství sacharidů při zvýšené intenzitě fotosyntézy. Pro snížení koncentrace dusíku jsou různá vysvětlení, například zředění dusíku vlivem hromadění nadbytku sacharidů [45], snížení transpirace a tedy i transportu dusíku do míst, kde probíhá asimilace [46] a potlačení fotorespirace [47]. Kromě toho Seneweera et al. [19] dokazují, že zvýšená koncentrace CO₂ omezuje transport dusíku do listů a tím ovlivňuje syntézu Rubisco, což vede k aklimaci. Podle [19] přispívá k aklimaci i zrychlené stárnutí listů.

V naší práci se podařilo prokázat statisticky významný pokles obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ pouze ve stinných listech buku. U ostatních variant nebyl pokles obsahu Rubisco v E proti A statisticky významný.

Rovněž statisticky nevýznamný byl rozdíl v obsahu Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi u smrku. Naproti tomu významně nižší byl obsah Rubisco ve stinných listech buku, přičemž rozdíl mezi slunnými a stinnými listy byl největší v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂. To lze vysvětlit tak, že na poklesu obsahu Rubisco u varianty E (ex/sh) se podílí jak aklimace na zvýšenou koncentraci CO₂, tak i malá síla sinku u stinných listů.

Leegood et al. [5] zmiňují snížení obsahu Rubisco u rostlin rostoucích při nižším osvětlení ve své práci. Píší, že chloroplasty těchto rostlin vykazují adaptivní změny projevující se zvýšeným vývinem thylakoidů a zvýšenou podporou světlo zachycujících složek. Nátr [22] uvádí, že při dostatku CO₂ a nízké ozářenosti je rychlost fotosyntézy snížena nedostatečnou rychlostí regenerace substrátu (RuBP), což je přímým důsledkem nedostatku ATP a NADPH, tzn. nedostatečné rychlosti přenosu elektronů v systému thylakoidní membrány.

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vyhodnotit vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého a expozice (ex/sh) na obsah enzymu Rubisco.

Vzorky listů a jehlic buku lesního, resp. smrku ztepilého byly odebírány na Experimentální ekologické stanici Ústavu systémové biologie a ekologie Akademie věd ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech. V jedné minisféře byla udržována koncentrace CO₂ 350 μmol·mol⁻¹, což odpovídá normální koncentraci CO₂ (ambient – A), a ve druhé minisféře byla koncentrace CO₂ udržována na 700 μmol·mol⁻¹ (elevated – E). Vzorky jehlic (ex i sh) smrku ztepilého byly odebrány 24. 7. 2012 paralelně v A a E. Listy buku lesního byly odebrány 25. 7. 2012 také ex i sh paralelně v A a E.

Stanovení obsahu enzymu Rubisco bylo provedeno metodou SDS-PAGE podle Damervalové et al. [37] a Rogerse et al. [38] a dále byla metoda upravena podle Floriána [39] a Zachové [40].

U smrku ztepilého nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly obsahu Rubisco mezi stinnými a slunnými jehlicemi, ani nebyla pozorována aklimace obsahu Rubisco u varianty E vzhledem k A. Naopak u buku lesního došlo k výraznému snížení obsahu Rubisco ve stinných listech. Největší pokles obsahu Rubisco byl zaznamenán u stinných listů rostoucích v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KLOUDA, P. *Základy biochemie*. 1. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2000. ISBN 80-86369-00-5.
- [2] VOET, D., VOETOVÁ J. G. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [3] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [4] SOFROVÁ, D. a kolektiv. *Biochemie: Základní kurz*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-7184-936-7.
- [5] LEEGOOD, R. C, SHARKEY, T. D., VON CAEMMERER, S. *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000, 624 p. ISBN 07-923-6143-1.
- [6] WILDMAN, S., BONNER, J. The proteins of green leaves .1. Isolation, enzymatic properties and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. *Archives of biochemistry*. 1947, roč. 14, č. 3, s. 381-413. ISSN 0096-9621.
- [7] CALVIN, M., MASSINI, P. The path of carbon in photosynthesis. *Experientia*. 1952, roč. 8, č. 12, s. 445-457. ISSN 0014-4754. DOI: 10.1007/BF02139287.
- [8] QUAYLE, J. R., FULLER, R. C., BENSON, A. A., CALVIN, M. Enzymatic carboxylation of ribulose diphosphate. *Journal of the American Chemical Society*. 1954, roč. 76, č. 13, s. 3610-3611. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja01642a089.
- [9] WEISSBACH, A., SMYRNIOTIS, P. Z., HORECKER, B. L. Pentose phosphate and CO₂ fixation with spinach extracts. *Journal of the American Chemical Society*. 1954, roč. 76, č. 13, s. 3611-3612. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja01642a090.
- [10] BOWES, G., OGREN, W.L. HAGEMAN, R.H. Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1971, roč. 45, č. 3, s. 716-722. ISSN 0006291x. DOI: 10.1016/0006-291X(71)90475-X.
- [11] ANDREWS, T. J., LORIMER, G. H., TOLBERT, N. E. Ribulose diphosphate oxygenase. I. Synthesis of phosphoglycolate by fraction-1 protein of leaves. *Biochemistry*. 1973, roč. 12, č. 1, s. 11-18. ISSN 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00725a003.
- [12] LORIMER, G. H., ANDREWS, T. J., TOLBERT, N. E. Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction products and mechanism of action. *Biochemistry*. 1973, roč. 12, č. 1, s. 18-23. ISSN 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00725a004.
- [13] BOŠKOVÁ, M. Vliv stáří jehlic na obsah a aktivitu enzymu Rubisco u smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂. Brno: Vysoké učení

technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 62 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

- [14] *International Society of Photosynthesis Research* [online]. 2010 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://www.photosynthesisresearch.org/Default.aspx?pageId=216516>
- [15] HARTMAN, F. C., HARPEL, M. R. Structure, Function, Regulation, and Assembly of D-Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Annual Review of Biochemistry*. 1994, roč. 63, č. 1, s. 197-232. ISSN 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.bi.63.070194.001213.
- [16] MATULKOVÁ, Z. *Denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 70 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [17] PORTIS, A. R. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Journal of Experimental Botany*. 1995, roč. 46, Special Issue, s. 1285-1291. ISSN 0022-0957.
- [18] PARRY, M. A. J., KEYS, A. J., MADGWICK, P. J., CARMO-SILVA, A. E., ANDRALOJC, P. J. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany*. 2007-06-19, roč. 59, č. 7, s. 1569-1580. ISSN 0022-0957. DOI: 10.1093/jxb/ern084.
- [19] SENEWEERA, S., MAKINO, A., HIROTSU, N., NORTON, R., SUZUKI, Y. New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO₂: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 2011, roč. 71, č. 2, s. 128-136. ISSN 0098-8472. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.11.002.
- [20] NAKANO, H., MAKINO, A., MAE, T. The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant physiology*. 1997, roč. 115, č. 1, s. 191-198. ISSN 0032-0889.
- [21] SEEMANN, J. R., SHARKEY, T. D., WANG, J., OSMOND, C. B. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. *Plant physiology*. 1987, roč. 84, č. 3, s. 796-802. ISSN 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.84.3.796.
- [22] NÁTR, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. 1. vyd. Praha: ISV nakladatelství, 2000, 257 s. ISBN 80-858-6662-5.
- [23] DIETZ, K. J. An evaluation of light and CO₂ limitation of leaf photosynthesis by CO₂ gas-exchange analysis. *Planta*, 1986, roč. 167, s. 260-263.
- [24] DRAKE, B. G., GONZÁ LEZ-MELER, M. A., LONG, S. P. MORE EFFICIENT PLANTS: A Consequence of Rising Atmospheric CO₂ ?. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1997, roč. 48, č. 1, s. 609-639. ISSN 1040-2519. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.609.

- [25] THEOBALD, J. C., MITCHELL, R. A. C., PARRY, M. A. J., LAWLOR, D. W. Estimating the Excess Investment in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Leaves of Spring Wheat Grown under Elevated CO₂. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1998, roč. 118, č. 3, s. 945-955. ISSN 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.118.3.945.
- [26] OOSTEN, J. J., BESFORD, R. T. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ through feedback regulation of gene expression: Climate of opinion. *Photosynthesis Research*. 1996, roč. 48, č. 3, s. 353-365. ISSN 0166-8595. DOI: 10.1007/BF00029468.
- [27] IDSO, S. B., KIMBALL, B. A., AKIN, D. E., KRIDLER, J. A general relationship between CO₂-induced reductions in stomatal conductance and concomitant increases in foliage temperature. *Environmental and Experimental Botany*. 1993, roč. 33, č. 3, s. 443-446. ISSN 00988472. DOI: 10.1016/0098-8472(93)90047-J.
- [28] GONZÁLEZ-MELER, M. A., RIBAS-CARBÓ, M., SIEDOW, J. N., DRAKE, B. G. Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂. *Plant Physiology*. 1996, roč. 112, č. 3, s. 1349-1355. ISSN 0032-0889.
- [29] HATTENSCHWILER, S., MIGLIETTA, F., RASCHI, A., KORNER, Ch. Thirty years of in situ tree growth under elevated CO₂: a model for future forest responses?. *Global Change Biology*. 1997, roč. 3, č. 5, s. 463-471. ISSN 1354-1013. DOI: 10.1046/j.1365-2486.1997.00105.x.
- [30] SAXE, H., ELLSWORTH, D. S., HEATH, J. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytologist*. 1998, roč. 139, č. 3, s. 395-436. ISSN 0028-646x. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1998.00221.x.
- [31] OSBORNE, C. P., DRAKE, B. G., LAROCHE, J., LONG, S. P. Does long-term elevation of CO₂ concentration increase photosynthesis in forest floor vegetation?. *Plant physiology*. 1997, roč. 114, č. 1, s. 337-344. ISSN 0032-0889.
- [32] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [33] WARREN, Ch. R., CHEN, Z. L., ADAMS, M. A. Effect of N source on concentration of Rubisco in Eucalyptus diversicolor, as measured by capillary electrophoresis. *Physiologia Plantarum*. 2000, roč. 110, č. 1, s. 52-58. ISSN 0031-9317. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2000.110107.x.
- [34] KODÍČEK, M. ELISA. *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2013-04-13]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=elisa>
- [35] METODIEV, M., DEMIREVSKA-KEPOVA, K. Rubisco Quantitation in Leaves of Different Barley Varieties by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Experimental Botany*. 1991, roč. 43, č. 2, s. 155-158. ISSN 0022-0957. DOI: 10.1093/jxb/43.2.155.

- [36] Ústav systémové biologie a ekologie Akademie věd ČR: Laboratoř ekologické fyziologie rostlin [online]. 2004 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: http://www.usbe.cas.cz/lefr/kultivacni_sfery.htm
- [37] DAMERVAL, C., DE VIENNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*. 1986, roč. 7, s. 52-54.
- [38] ROGERS, A., ELLSWORTH, D. S., HUMPHRIES, S. W. Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO₂. *Journal of Experimental Botany*. 2001, roč. 52, s. 1555-1561.
- [39] FLORIÁN, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Brno: VUT FCH, 2006. 47 l. Diplomová práce. Vedoucí práce Miroslav Hrstka.
- [40] ZACHOVÁ, L. *Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na obsah a aktivitu enzymu Rubisco*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 56 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [41] MOORE, B. D., CHENG, S. H., SIMS, D., SEEMANN, J. R. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environment*. 1999, roč. 22, č. 6, s. 567-582. ISSN 0140-7791. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1999.00432.x.
- [42] SENEWEERA, S. P., CONROY, J. P. Enhanced leaf elongation rates of wheat at elevated CO₂: is it related to carbon and nitrogen dynamics within the growing leaf blade? *Environmental and Experimental Botany*. 2005, roč. 54, č. 2, s. 174-181. ISSN 00988472. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2004.07.002.
- [43] DEL POZO, A., PEREZ, P., GUTIERREZ, D., ALONSO, A., MORCUENDE, R., MARTINEZ-CARRASCO, R. Gas exchange acclimation to elevated CO₂ in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to nitrogen acquisition and partitioning in wheat grown in field chambers. *Environmental and Experimental Botany*. 2007, roč. 59, č. 3, s. 371-380. ISSN 00988472. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2006.04.009.
- [44] STITT, M., KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment*. 1999, roč. 22, č. 6, s. 583-621. ISSN 0140-7791. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1999.00386.x.
- [45] CONROY, J. P. Corrigendum - Influence of Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations on Plant Nutrition. *Australian Journal of Botany*. 1992, roč. 40, č. 5, s. 445-456. ISSN 0067-1924. DOI: 10.1071/BT9920445c.

- [46] McDONALD, E. P., ERICKSON, J. E., KRUGER, E. L. Can decreased transpiration limit plant nitrogen acquisition in elevated CO₂?. *Functional Plant Biology*. 2002, roč. 29, č. 9, s. 1115-1120. ISSN 14454408. DOI: 10.1071/FP02007.
- [47] BOWES, G. Growth at elevated CO₂: photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant, Cell and Environment*. 1991, roč. 14, č. 8, s. 795-806. ISSN 0140-7791. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1991.tb01443.x.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	minisféra s normální koncentrací oxidu uhličitého
ADP	adenosin-5'-difosfát
Arg	arginin
Asn	asparagin
ATP	adenosin-5'-trifosfát
CA	2-karboxy-D-arabinitol
CA1P	2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát
CABP	2-karboxy-D-arabinitol-1,5-bisfosfát
CE-SDS	kapilární elektroforéza za použití SDS
CTBP	2-karboxytetritol-1,4-bisfosfát
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
E	minisféra se zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)
Glu	glutamin
Gly	glycin
His	histidin
KABP	3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát
LHC	komplex chlorofylových sběračů světla (Light-Harvesting Complex)
Lys	lysin
Met	methionin
mRNA	mediátorová RNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
P _i	anorganický fosfát
PDBP	D-glycero-2,3-pentodiulosa-1,5-bisfosfát
PSI	fotosystém I
RNA	ribonukleová kyselina
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za použití SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Thr	threonin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	D-xylulosa-1,5-bisfosfát