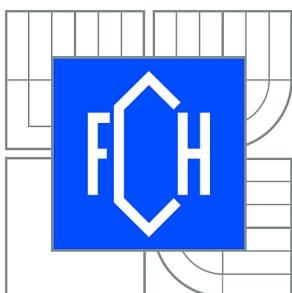




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# DYNAMIKA AKUMULACE NESTRUKTURNÍCH SACHARIDŮ A AKTIVITY ENZYMU RUBISCO PŘI ZVÝŠENÉ KONCENTRACI OXIDU UHLIČITÉHO A MANIPULACI SINKU U BUKU LESNÍHO

THE DYNAMICS OF NON-STRUCTURAL SACCHARIDES ACCUMULATION AND RUBISCO  
ACTIVITY UNDER THE ELEVATED CARBON DIOXIDE CONCENTRATION AND SINK  
MANIPULATION AT BEECH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LUCIE UHROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2012



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0671/2011</b>	Akademický rok: <b>2011/2012</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Lucie Uhrová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Dynamika akumulace nestrukturních sacharidů a aktivity enzymu Rubisco při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého a manipulaci sinku u buku lesního

### Zadání diplomové práce:

V teoretické části pojednat o základních procesech fotosyntézy, úloze enzymu Rubisco, vlivu zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> a zpětnovazebných mechanismech regulace fotosyntézy prostřednictvím akumulace nestrukturních sacharidů a výživy dusíkem u C<sub>3</sub> rostlin.

V experimentální části vyhodnotit interakce působení koncentrace CO<sub>2</sub> a výživy dusíkem na akumulaci nestrukturních sacharidů a aktivitu enzymu Rubisco v experimentu s manipulací sinku („feeding“ sacharosou) u buku lesního kultivovaného v podmínkách přirozené a dvojnásobné atmosférické koncentrace CO<sub>2</sub> a kontrastní výživy dusíkem.

### Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

-----  
Bc. Lucie Uhrová  
Student(ka)

-----  
PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá dynamikou akumulace nestrukturních sacharidů a aktivity enzymu Rubisco při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> u buku lesního (*Fagus sylvatica* L.). Tři roky staré sazenice buku lesního byly kultivovány čtyři měsíce v minisféře s běžnou (385 μmol·mol<sup>-1</sup>, varianta A) a se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (700 μmol·mol<sup>-1</sup>, varianta E).

V každé variantě byla polovina rostlin hnojena dusíkem (varianta N<sup>+</sup>) a druhá polovina byla kontrolní (varianta N<sup>-</sup>). Rostliny použité pro experiment byly nejprve adaptovány na tmu po dobu 12 hodin. Následně byly testované listy odstřiženy, řapík včetně krátkého segmentu větvičky (asi 1 cm) pak vložen do 0,7 M roztoku sacharosy (varianta S) resp. vody (varianta V) a vystaveny záření 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> po dobu 0, 30, 60, 120, 180 min. Poté byla stanovena listová plocha a čerstvá hmotnost listové čepele, vzorky byly fixovány v kapalném dusíku a dále až do samotné analýzy uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C.

Obsah Rubisco byl stanoven metodou SDS-PAGE, aktivita Rubisco spektrofotometricky a obsah nestrukturních sacharidů antronovou metodou a metodou HPLC.

U varianty N<sup>-</sup> byl zjištěn statisticky významně nižší obsah Rubisco, než u varianty N<sup>+</sup>. Rovněž obsah Rubisco u varianty E byl významně nižší než u varianty A, což svědčí o aklimační depresi obsahu Rubisco.

Aktivita Rubisco je s časem u varianty E mírně stimulována, ale rozdíly mezi variantami A a E nejsou statisticky významné. Vliv přídavku sacharosy na aktivitu Rubisco se nepodařilo prokázat.

Antronovou metodou byly zjištěny statisticky významné rozdíly v akumulaci nestrukturních sacharidů mezi variantami S a V, ale nikoliv mezi variantami A a E. Metodou HPLC byl zjištěn statisticky významný nárůst obsahu sacharosy s časem u varianty AS, ale nikoliv u varianty ES.

## ABSTRACT

This diploma thesis deals with dynamic of accumulation of non-structural carbohydrates and activity of Rubisco enzyme at elevated concentration of CO<sub>2</sub> on beech (*Fagus sylvatica* L.). Three years old seedlings of beech were cultivated in minisphere with ambient (385 μmol·mol<sup>-1</sup>, variant A), and with elevated concentration CO<sub>2</sub> (700 μmol·mol<sup>-1</sup>, variant E) for four months. In every variant the first half of plants was fertilized by nitrogen (variant N<sup>+</sup>) and the second half was control (variant N<sup>-</sup>). Plants used for experiment were at first adapted for darkness for 12 hours. Subsequently tested leaves were cut off, leafstalk including short segment of branch (approximately 1 cm) was inserted into 0.7 M solution of sucrose (variant S) or water (variant V) and exposed to radiation 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> for 0, 30, 60, 120, 180 minutes. Then leaf area and fresh mass of leaf blade were established, samples were fixed in liquid nitrogen and stored in deep freezer to analysis in -70 °C.

Rubisco content was determined by SDS-PAGE method, Rubisco activity spectrophotometrically and content of non-structural carbohydrates by anthrone method and HPLC method.

Rubisco content was significantly lower in the N<sup>-</sup> variant than in N<sup>+</sup> variant. Rubisco content was also significantly lower in E than in A variant, which is an evidence of down-regulation.

Rubisco activity is moderately stimulated at E variant with time, but differences between variant A and E are not statistically significant. Influence of sucrose feeding to Rubisco activity was not proved.

Significant differences were detected by anthrone method in non-structural carbohydrates content between variants S and V, but not between variants A and E. Statistically significant increase of sucrose content with time was detected by HPLC method at variant AS, but not at variant ES.

### **KLÍČOVÁ SLOVA**

buk lesní, aktivita enzymu Rubisco, obsah Rubisco, nestrukturní sacharidy, dusík, koncentrace CO<sub>2</sub>, fotosyntéza

### **KEYWORDS**

beech, Rubisco activity, Rubisco content, non-structural carbohydrates, nitrogen, CO<sub>2</sub> concentration, photosynthesis

UHROVÁ, L. *Dynamika akumulace nestrukturních sacharidů a aktivity enzymu Rubisco při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého a manipulaci sinku u buku lesního*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 81 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

*Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. a konzultantovi panu Ing. Karlovi Klemovi, PhD. za odborné vedení, velkou trpělivost, vstřícnost a cenné rady v průběhu psaní této diplomové práce.*

## OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Fotosyntéza.....	9
2.1.1. Struktura a funkce chloroplastů.....	9
2.1.2. Primární pochody fotosyntézy .....	11
2.1.3. Sekundární fáze fotosyntézy .....	12
2.1.4. Regulace fotosyntézy .....	15
2.2. Enzym Rubisco .....	16
2.2.1. Struktura enzymu Rubisco .....	16
2.2.2. Funkce enzymu Rubisco .....	17
2.2.3. Aktivace Rubisco .....	18
2.2.3.1. Aktivace Rubisco světlem .....	19
2.2.3.2. Vliv inhibitorů.....	20
2.3. Vliv zvýšené koncentrace CO <sub>2</sub> na rostliny.....	21
2.3.1. Rychlost fotosyntézy .....	21
2.3.2. Rychlost respirace .....	21
2.3.3. Vodivost průduchů .....	21
2.3.4. Mitochondriální respirace .....	22
2.3.5. Nepřímé účinky CO <sub>2</sub> na rostliny .....	22
2.3.6. Vliv zvýšené koncentrace CO <sub>2</sub> na dřeviny.....	23
2.4. Vliv dusíku na rostliny .....	24
2.5. Metody stanovení aktivity Rubisco.....	24
2.5.1. Gazometrické stanovení .....	24
2.5.2. Spektrofotometrické stanovení.....	24
2.5.3. Radiometrické stanovení .....	25
2.6. Metody stanovení nestrurních sacharidů.....	25
2.6.1. Antronová metoda .....	25
2.6.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	25
2.7. Metody stanovení obsahu Rubisco.....	25
2.7.1. Enzymová imunoanalýza (ELISA) .....	25
2.7.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) .....	26
2.7.3. Kapilární elektroforéza (CE).....	27
3. Experimentální část.....	30
3.1. Materiál .....	30
3.2. Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco.....	31
3.2.1. Přístroje .....	32
3.2.2. Chemikálie .....	32
3.2.3. Příprava roztoků .....	32
3.2.3.1. Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8.....	32
3.2.3.2. Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0.....	32
3.2.3.3. Příprava aktivačních roztoků .....	32
3.2.3.4. Příprava extrakčního roztoku.....	33
3.2.3.5. Příprava roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy .....	33
3.2.3.6. Příprava roztoku kreatinfosfokinasy .....	33
3.2.3.7. Příprava roztoku R5P.....	33

3.2.3.8.	Příprava roztoku 3-fosfoglycerátkinasy .....	33
3.2.3.9.	Příprava pracovního roztoku .....	33
3.2.4.	Extrakce enzymu .....	33
3.2.5.	Měření aktivity .....	34
3.2.5.1.	Počáteční aktivita .....	34
3.2.5.2.	Celková aktivita .....	34
3.2.6.	Výpočet aktivity enzymu Rubisco .....	34
3.3.	Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco .....	36
3.3.1.	Přístroje .....	36
3.3.2.	Chemikálie .....	36
3.3.3.	Příprava roztoků .....	36
3.3.3.1.	Roztoky na přípravu gelů .....	36
3.3.3.2.	Pomocné roztoky .....	37
3.3.3.3.	Roztoky pro vizualizaci bílkovin .....	37
3.3.4.	Příprava gelů .....	37
3.3.4.1.	Separční gel .....	38
3.3.4.2.	Zaostřovací gel .....	38
3.3.5.	Příprava standardu .....	39
3.3.6.	Příprava vzorků .....	39
3.3.7.	Elektroforéza .....	39
3.3.8.	Zviditelnění bílkovin .....	39
3.3.9.	Vyhodnocení gelu .....	39
3.4.	Stanovení nestrukturních sacharidů antronovou metodou .....	41
3.4.1.	Přístroje .....	41
3.4.2.	Chemikálie .....	41
3.4.3.	Příprava roztoků .....	42
3.5.	Stanovení nestrukturních sacharidů pomocí HPLC .....	45
3.5.1.	Přístroje .....	45
3.5.2.	Chemikálie .....	45
3.5.3.	Příprava roztoků .....	46
3.6.	Statistické zpracování výsledků .....	47
4.	Výsledky .....	48
4.1.	Stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco .....	48
4.2.	Stanovení obsahu enzymu Rubisco .....	53
4.3.	Stanovení nestrukturních sacharidů antronovou metodou .....	55
4.4.	Stanovení nestrukturních sacharidů pomocí HPLC .....	63
5.	Diskuse .....	69
6.	Závěr .....	71
7.	Použitá literatura .....	72
8.	Seznam zkratk a symbolů .....	80

## 1. ÚVOD

Rostliny jsou primárními výrobci organické hmoty a kyslíku, akumulátory sluneční energie a poskytují nejbohatší výběr přírodních látek (asi 90 % z 30 000 známých). Pro lidstvo jsou rostliny nepostradatelným zdrojem potravin, stavebním materiálem a poskytují bezpočet chemických sloučenin, které mají nejrůznější důležitá praktická uplatnění. Rostoucí zájem o jejich biochemii a biotechnologii je proto pochopitelný.

Základním procesem udržující život na Zemi je fotosyntéza. Látkově se jedná o přeměnu anorganických látek na látky organické. Z energetického hlediska je to přeměna světelné energie na chemickou. Je to jediný biologický proces, který využívá energii mimozemského původu, sluneční světlo. Proto, aby mohl organismus tuto reakci provádět a stát se tak producentem a autotrofním organismem, potřebuje chloroplasty, světelnou energii,  $\text{CO}_2$ , teplotu 0–60 °C a vodu.

Vstupní branou anorganického uhlíku do biosféry je enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa), který katalyzuje vazbu oxidu uhličitého na organickou molekulu a je tedy klíčovým enzymem fotosyntézy. Může katalyzovat dvě reakce, a to jak karboxylaci, tak oxygenaci. Rubisco je bezpochyby nejdůležitější a nejvíce rozšířený protein na Zemi. Jde o ústřední enzym pro zachování života na planetě, přičemž je pozoruhodně neúčinný; jeho číslo obratu činí asi tři molekuly substrátu za sekundu, zatímco typické enzymy mají asi kolem tisíce molekul substrátu za sekundu. Enzym Rubisco může existovat v aktivní nebo neaktivní formě, proto není aktivita enzymu přímo úměrná jeho obsahu. Aktivita enzymu je závislá na pH, koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  iontů, substrátu nebo množství světla.

V současné době se koncentrace  $\text{CO}_2$  v atmosféře pohybuje kolem  $392 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  a neustále se zvyšuje. Zvýšená koncentrace  $\text{CO}_2$  působí na rostliny jednak přímo a jednak nepřímo. K přímým účinkům patří změny v rychlosti fotosyntézy, fotorespirace, vodivosti průduchů a v mitochondriální respiraci. K nepřímým patří změny teploty, obsahu minerálních látek v půdě, obsahu dusíku a vody. Krátkodobé působení zvýšené koncentrace  $\text{CO}_2$  vede ke zvýšení rychlosti fotosyntézy, při dlouhodobém působení zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  dochází k postupnému poklesu stimulace fotosyntézy, poklesu obsahu Rubisco a jiných fotosyntetických enzymů. Tento jev, který se nazývá aklimace nebo zpětná regulace fotosyntézy, se vysvětluje mimo jiné nahromaděním sacharidů ve fotosyntetizujících tkáních a poklesem síly sinku. Alternativním konceptem vysvětlení aklimace ke zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  je limitace dusíkem, ke které dochází v důsledku intenzivního růstu při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  s následným zředňovacím efektem. Je ovšem zřejmé, že oba procesy jsou úzce propojeny, přičemž při nedostatku dusíku dochází ke snížení kapacity sinku a zvýšené akumulaci sacharidů. Dosud ovšem nebylo prokázáno, zda limitace dusíkem zvyšuje přímo vliv sacharidů na fotosyntézu, nebo zda působí pouze na jejich zvýšenou akumulaci.

V experimentu, z něhož vychází tato práce, byla u listů buku lesního rostoucích v podmínkách normální a zvýšené koncentrace  $\text{CO}_2$ , provedena manipulace sinku prostřednictvím „feedingu“ roztokem sacharosy. Následně byl stanoven obsah nestrukturních sacharidů, obsah a aktivita enzymu Rubisco v listech, s cílem odpovědět na otázku, jaký vliv má manipulace sinku a hnojení dusíkem na obsah nestrukturních sacharidů, obsah a aktivitu enzymu Rubisco v listech buku v podmínkách normální a zvýšené koncentrace  $\text{CO}_2$ .



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Fotosyntéza

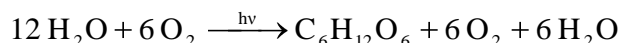
Fotosyntéza je jeden z nejstarších a zároveň nejdůležitějších dějů v živé přírodě. Je to biochemický proces, který má zásadní vliv na udržení života na Zemi. Zachycuje sluneční energii a z nejjednodušší sloučeniny uhlíku, oxidu uhličitého, vyrábí organickou hmotu pro výživu chemotrofů. Bylo odhadnuto, že ročně autotrofní organismy zachytí více než  $10^{71}$  kJ energie, s její pomocí vyrobí asi  $14 \cdot 10^{11}$  t organické hmoty, uvolní do biosféry  $15 \cdot 10^{11}$  t  $O_2$  a fixují asi  $20 \cdot 10^{11}$  t  $CO_2$  ze vzduchu a oceánů. Schopnost fotosyntézy mají nejen eukaryotní organismy, jako vyšší rostliny a zelené a hnědé řasy, ale i organismy prokaryotní, jako jednobuněčné sinice a zelené a purpurové bakterie. Fotosyntéza představuje soubor složitých biochemických reakcí, při nichž za účasti slunečního záření a přítomnosti chlorofylu dochází k přeměně anorganických látek jako  $H_2O$  a  $CO_2$  na látky organické. Fotosyntéza je endergonický redukční proces a je hlavním producentem kyslíku na naší planetě, který je nezbytný pro existenci aerobních forem života na naší planetě.

Složitý proces fotosyntézy lze rozdělit na dvě fáze. První je fáze primární neboli světelná (přenos elektronů), která je závislá na světle a probíhá v membráně thylakoidů v chloroplastech [1], [2].

Fotosyntetický přenos elektronů zahrnuje absorpci světla a využití jeho energie k přenosu elektronů. Toto se odehrává na tzv. fotosystémech, což jsou transmembránové proteinové komplexy v membráně thylakoidů, na které jsou vázány přenašeče elektronů [3].

Současně se světelnou fází probíhají i sekundární procesy. Temnostní fáze se skládá ze série enzymových reakcí, není bezprostředně závislá na světle a využívá se v ní NADPH, který byl nahromaděn v primárních procesech fotosyntézy. Energie uložená v ATP je potřebná k redukci  $CO_2$  na organické produkty.

Vznik monosacharidové jednotky je vyjádřen rovnicí:



U nižších fotosyntetizujících organismů (např. fotosyntetizujících bakterií) jsou donory vodíku místo vody  $H_2S$ ,  $H_2$ , nebo organické kyseliny a nedochází k uvolnění kyslíku. V takovém případě se jedná o anoxygenní fotosyntézu [1].

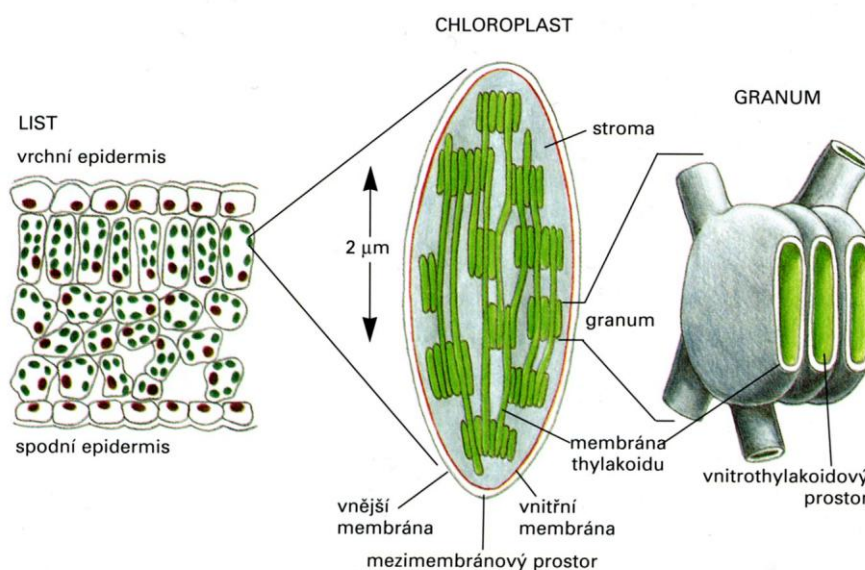
#### 2.1.1. Struktura a funkce chloroplastů

U eukaryotních fototrofů probíhá fotosyntéza v chloroplastech. Velikost, tvar i počet chloroplastů v buňce se liší podle druhu rostliny. Chloroplasty (obr. 2.1) jsou velmi rozmanité co do velikosti i tvaru. Nejběžnější jsou chloroplasty tvaru elipsoidu s délkou pohybující se kolem 5  $\mu m$ . Mají lamelární strukturu se silně propustnou vnější obalovou membránou a téměř nepropustnou vnitřní membránou. Podobají se mitochondriím, které se pravděpodobně z chloroplastů vyvinuly. Výplň chloroplastů tvoří stroma, což je koncentrovaný roztok enzymů, v němž jsou obsaženy molekuly DNA, RNA a ribozomy, na nichž se syntetizují některé z chloroplastových bílkovin. Ve stromatu je uložena třetí soustava membrán, thylakoidy (řecky thylakos, váček). Thylakoidy jsou ploché váčky uspořádány do sloupců. Tyto útvary se nazývají grana a jsou propojeny thylakoidy, které probíhají jednotlivě

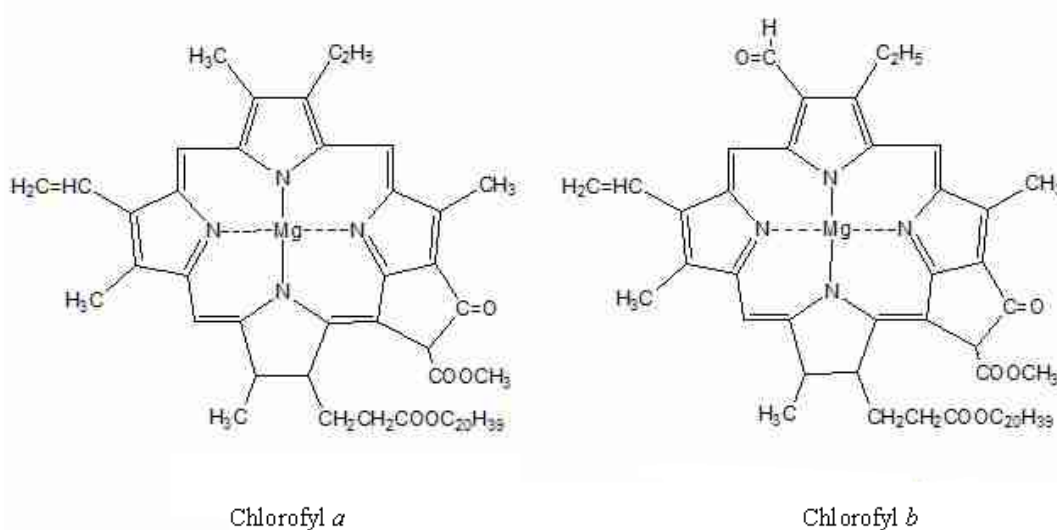
stromatem a nazývají se stromální thylakoidy nebo lamely. Chloroplasty obvykle obsahují 10 až 100 gran. Lipidy, z nichž je thylakoidní membrána složena, jsou neobvyklé povahy, protože obsahují pouze 10 % fosfolipidů, 80 % většinou tvoří nepolární mono- a digalaktosyldiacylglyceroly a zbývajících 10 % tvoří sulfolipidy. Acylové řetězce těchto lipidů mají mnoho nenasycených vazeb, což dodává thylakoidní membráně tekutou povahu.

Na thylakoidních membránách jsou lokalizovány fotosystémy I a II sloužící k zachycení světelné energie. Srdcem fotosystémů jsou chlorofyly *a* a *b* (obr. 2.3), jejichž molekuly jsou schopny absorbovat sluneční záření.

Chloroplasty obsahují i další pigmenty jako karotenoidy, které se také podílejí na absorpci světla a zvyšují tak účinnost zachycování [1], [2], [4].



Obr. 2.1 Průřez listem a detail chloroplastu. Převzato z [5].



Obr. 2.2 Struktura chlorofylu *a* a *b*. Převzato z [6].

### 2.1.2. Primární pochody fotosyntézy

Hlavním fotoreceptorem ve fotosyntéze je chlorofyl. Tento cyklický tetrapyrrol syntetizují buňky z protoporfyrinu IX. Chlorofyl je základní barvivo vyskytující se chloroplastech a jeho funkcí je přijímat světelnou energii pro fotosyntézu. Rozlišujeme více druhů chlorofylu, v závislosti od druhu organismu a zbarvení. Chlorofyl *a* má modrozelenou barvu, *b* žlutozelenou, *c* a *d* mají červené řasy. Všechny druhy chlorofylu mají základ v čtyřech substituovaných pyrrolových kruzích, v centru kruhu jsou koordinačně vázané  $Mg^{2+}$  na 4 atomy dusíku. U vyšších rostlin se vyskytují chlorofyl *a* a *b* v poměru 3:1.

Ve světelné fázi fotosyntézy (obr. 2.2) dochází k absorpci záření chlorofylovými molekulami, které jsou organizovány v thylakoidech. Chlorofyly jsou vázány na molekuly bílkovin, které jsou udržovány optimálně nasměrované tak, aby si mohly předávat absorbovanou energii prostřednictvím sběračů. Nashromážděná energie je přenesena na molekulu chlorofylu v tzv. reakčním centru. Tato molekula má schopnost přeměnit energii fotonů na elektrickou energii. Podstatou této přeměny je přechod některých elektronů molekuly chlorofylu do hladiny o vyšší energii, takže mají negativnější redoxní potenciál [2].

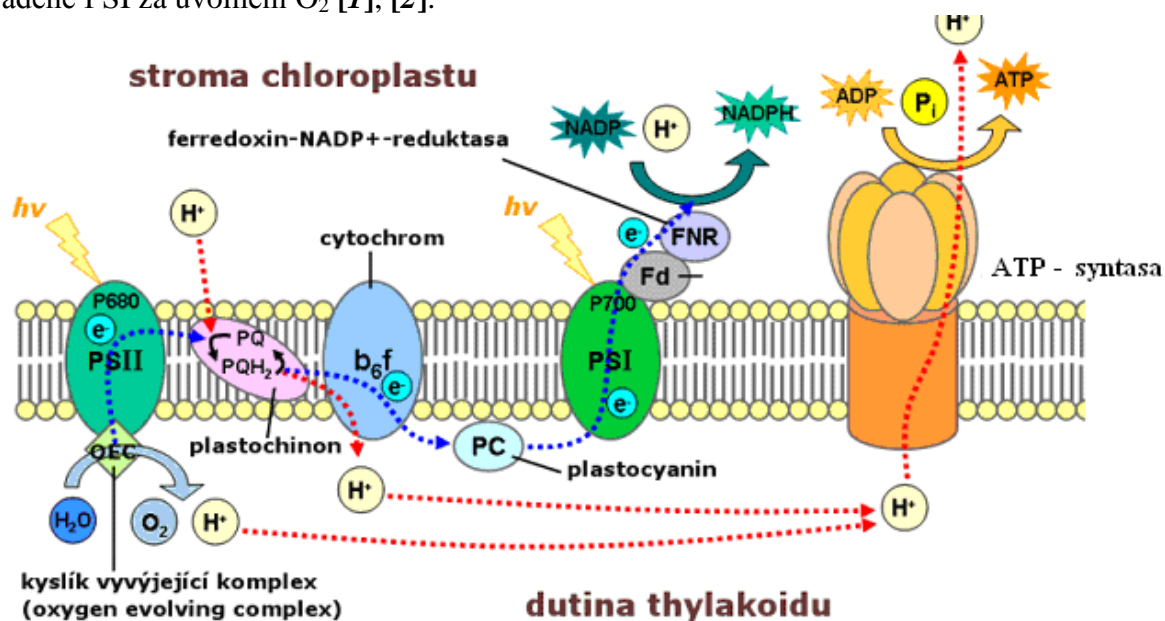
Chlorofyly mají mnoho konjugovaných dvojných vazeb. Takové molekuly silně pohlcují viditelné světlo, tj. oblast spektra, v níž je sluneční záření na povrchu Země nejintenzivnější. Vybuzená molekula může proměnit excitační energii mnoha způsoby. Z nich jsou pro fotosyntézu nejvýznamnější tyto:

- 1) Vnitřní přeměna, běžný způsob zániku excitační energie, která se mění na kinetickou energii pohybu molekul, tj. na teplo. Je to velmi rychlý pochod a mnohé molekuly takto přecházejí do základního stavu. Chlorofylové molekuly přecházejí takto velmi rychle z vyšších do nejnižšího excitovaného stavu.
- 2) Fluorescence, při níž excitovaná molekula vyše foton, čímž přejde do základního stavu. Tento pochod trvá přibližně 10 ns. Fluorescencí se ztrácí 3–6 % světelné energie, kterou rostliny pohltní.
- 3) Přenos excitonu, při němž vybuzená molekula bezprostředně přenáší svou excitační energii na blízkou neexcitovanou molekulu. Dochází k tomu vzájemným působením molekulových orbitalů. Exciton se může postupně přenášet mezi molekulami, tento přenos excitonu má zvláštní význam pro soustředění světelné energie do fotosyntetických reakčních center.
- 4) Fotooxidace, při níž světlem excitovaná donorová molekula se oxiduje tím, že přeneše elektron na molekulu akceptoru, kterou tak redukuje. Ve fotosyntéze je tímto donorem excitovaný chlorofyl. Energie pohlčeného fotonu se tak objeví jako chemická energie v soustavě chemických reakcí.

Při oxigenní fotosyntéze spolupracují dva fotosystémy. Oba fotosystémy jsou umístěny odděleně a jsou propojeny řetězcem transelektronas.

Fotosystém I (PSI) obsahuje převážně molekuly chlorofylu *a*, s absorpčním maximem asi 700 nm. Molekula chlorofylu reakčního centra (označovaná P700) má v základním stavu (ve tmě) redoxpotenciál  $E = 0,45$  V. Přenosem fotonu ze sběračových molekul dochází k redistribuci elektronů molekuly P700 a jejímu přechodu do excitovaného stavu P700\* s potenciálem  $E = 0,55$  V. Excitované elektrony jsou přeneseny z molekuly P700\* na oxidoreduktasu ferredoxin, vázaný na thylakoidovou membránu. Ten přeneše elektrony na rozpustný ferredoxin, jehož redukováná forma předá prostřednictvím flavoproteinu elektrony na  $NADP^+$  za vzniku NADPH. Potřebné protony pocházejí z fotolýzy vody, spřažené s fotosystémem II.

Fotosystém II (PSII) obsahuje molekuly chlorofylu *a* i *b*. Absorpční maximum PSII je asi 680 nm. Molekula chlorofylu reakčního centra (označovaná P680) má ve tmě redoxpotenciál  $E = 0,82$  V. Ozářením přejde do excitovaného stavu P680\* s redoxpotenciálem  $E = 0$  V. Excitované elektrony jsou poté přenášeny systémem oxidoreduktas o stoupajícím redoxpotenciálu a zaplní mezery v molekule chlorofylu reakčního centra PSI, což způsobí přechod zpět do základního stavu. Uvolněním elektronů z P680\* a jejich přechodem na P700 vznikne oxidovaná forma chlorofylu P680. Ta pomocí iontů  $Mn^{2+}$  oxiduje vodu za uvolnění  $O_2$ . Elektrony odebrané vodě redukují P680 a protony jsou použity při redukci  $NADP^+$ , prováděné PSI za uvolnění  $O_2$  [1], [2].

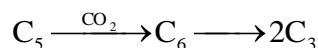


Obr. 2.3 Schéma oxygenní fotosyntézy. Převzato z [7].

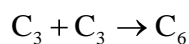
### 2.1.3. Sekundární fáze fotosyntézy

Sekundární neboli temnostní fázi fotosyntézy se rozumí Calvinův cyklus (obr. 2.4). Uskutečňuje se ve stromatu chloroplastů, pro svůj průběh nepotřebuje světelnou energii a může tedy probíhat i ve tmě do vyčerpání zásob ATP a NADPH vzniklých v primární fázi. Je to cyklický děj a skládá se ze tří reakcí:

1) Fixace  $CO_2$  v organické formě - aktivace  $CO_2$  jeho inkorporací do ribulosa 1,5 - bisfosfátu jako karboxyl za rozpadu vzniklé nestálé sloučeniny na dvě tříuhlíkové molekuly 3-fosfoglycerátu



2) Redukční reakce - tříuhlíkatá sloučenina se fosforyluje za spotřeby ATP a bisfosfoglycerát redukuje na fosfoglyceraldehyd za spotřeby NADPH



Tato část odpovídá biosyntéze sacharidů u heterotrofů.

3) Regenerační reakce - triosafosfáty se pak v reakcích izomerizací, transketolasových a transaldolasových mění v fosfopentosu, a to např. pět molekul triosafosfátu ve tři molekuly ribulosa-5-fosfátu. Fosforylací s ATP vzniká ribulosa-1,5-bisfosfát, substrát karboxylace.

Fixace oxidu uhličitého slouží k převedení energeticky chudé, nereaktivní molekuly  $\text{CO}_2$  na aktivovanou redukovatelnou formu. Toho se dosáhne tím, že se  $\text{CO}_2$  zabuduje jako karboxyl do 3-fosfoglycerátu. Není to jednoduchý děj a k jeho realizaci je zapotřebí zvláštní cukerný fosfát (ribulosa-1,5-bisfosfát). Jeho molekula přijme  $\text{CO}_2$  a přejde na nestabilní šestiuhlíkový meziprodukt, který se ihned rozštěpí na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu, který je prvním zachytitelným meziproduktem cyklu. Reakci katalyzuje ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa (Rubisco) [8].

V druhé, redukční fázi, se redukuje 3-fosfoglycerát s NADPH za spotřeby 2 ATP přes 1,3-bisfosfoglycerát na glyceraldehyd-3-fosfát. Z něho pak izomerací vzniká dihydroxyacetonfosfát. Část trios přechází vnější chloroplastovou membránou do cytosolu buňky a tam se aldolovou kondenzací, katalyzovanou aldolase, přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát. Z něho pak po odštěpení fosforylované skupiny v poloze 1 a izomerací vzniká glukosa-6-fosfát. Tato fáze je tedy zcela analogická úseku biosyntézy glukosy u heterotrofů s tím rozdílem, že glyceraldehyd užívá NADPH místo NADH.

Z glukosy vznikají sacharosa a škrob. Část triosafosfátu se využije na výrobu lipidů a aminokyselin nezbytných pro růst rostlin.

Během jednoho cyklu vznikne tedy z pentosy hexosa a využije se jeden atom uhlíku asimilovatelného  $\text{CO}_2$ . Aby se z molekul  $\text{CO}_2$  vyrobila hexosa, musí proběhnout cyklus šestkrát. Při tom se regeneruje šest molekul ribulosa-1,5-bisfosfátu (čímž se cyklus uzavře).

K regeneraci ribulosa-5-fosfátu dochází složitým procesem zahrnujícím řadu reakcí vzájemných přeměn cukrů - transglykosidačních reakcí: transketolasa katalyzuje přenos  $\text{C}_2$  (glykolaldehydu) a  $\text{C}_3$  (glyceraldehydu) pomocí thiamindifosfátu jako kofaktoru z ketos na aldosa a transaldolasa katalyzuje reakce dihydroxyacetonfosfátu s fosforečnými estery aldosa.

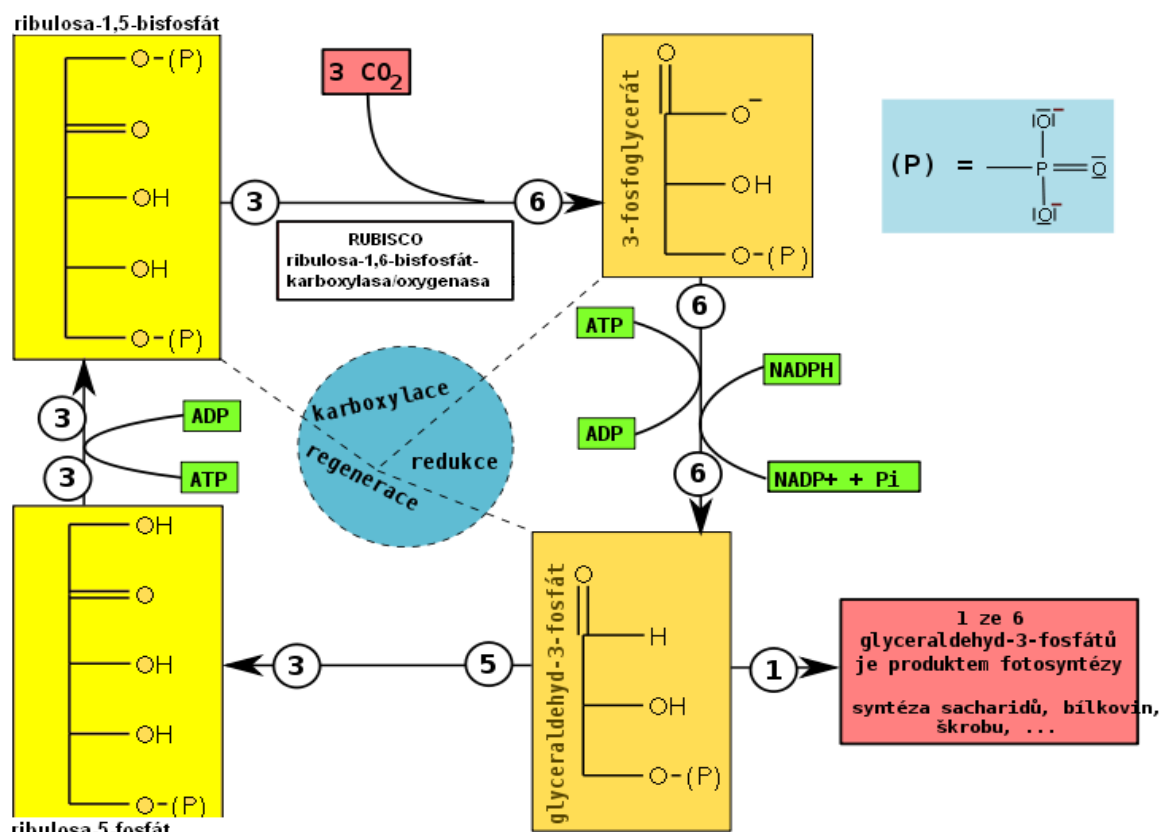
Calvinův cyklus má v metabolismu rostlin ústřední postavení. Má řadu divergentních výstupů a konvergentních vstupů. Vyroběný hexosafosfát se použije v chloroplastech na syntézu škrobu. Část triosafosfátů, resp. fosfoglycerátů, vznikajících v Calvinově cyklu, opouští chloroplasty a v cytoplasmě může být zpracována enzymy glykolýzy za vzniku pyruvátu nebo se z nich může tvořit sacharosa, která je důležitou transportní formou sacharidů. Celulosa vzniká přes GDP-glukosu jako škrob. Pyruvát se může přeměnit oxidační dekarboxylací na acetyl-CoA, z něhož může vycházet syntéza mastných kyselin a isoprenoidních látek.

Pomocí  $\text{CO}_2$  značeného radionuklidem uhlíku bylo zjištěno, že prvním produktem, který se tvoří neobyčejně rychle na světle v zelených listech většiny rostlin, je škrob. Teprve po déle trvající fotosyntéze se objevuje označený  $\text{CO}_2$  také v glykolátu, sacharose, aspartátu, alaninu a tím i v bílkovinách. Nejpozději se tvoří volná glukosa a fruktosa aj. [1], [9].

Znalosti o enzýmech katalyzujících jednotlivé reakční kroky se neustále doplňují novými poznatky. Plných deset enzymů z celkových třinácti je spojeno s regenerací akceptoru  $\text{CO}_2$ , ribulosabisfosfátu. Šest enzymů je regulačních. Pro tyto enzymy obecně platí, že:

- jejich kinetika se neřídí mechanismem Michaelise a Mentenové,
- mají vysokou molekulovou hmotnost a podjednotkové složení,
- katalyzují ireverzibilní reakce,
- jsou strategicky významně umístěny.

Tři enzymy reduktivního pentosafosfátového cyklu potřebují jako koenzymy ATP nebo NADPH, které se regeneruje během světelné reakce na thylakoidech. Z celkového počtu třinácti enzymů jsou pouze tři typické pro reduktivní pentosafosfátový cyklus, ostatní jsou známy jako katalyzátory oxidativního pentosového cyklu.



Obr. 2.4 Schéma Calvinova cyklu. Převzato z [10].

Za dne kryjí rostliny svou spotřebu energie fotosyntetickými reakcemi. V noci však musí podobně jako jiné organismy používat zásoby živin, aby z nich glykolýzou, oxidační fosforylací a pentosafosfátovou drahou vytvořily potřebné ATP a NADPH. Ve stromatu chloroplastu jsou obsaženy enzymy glykolýzy a pentosafosfátové dráhy vedle enzymů Calvinova cyklu. Musí proto existovat světlem ovládaný regulační mechanismus, který zabrání tomu, aby ve tmě Calvinův cyklus spotřeboval katabolicky vytvořené ATP a NADPH k asimilaci CO<sub>2</sub>, která by neměla smysl. Na regulaci se nejvíce podílejí ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa, fruktosabisfosfataasa a seduheptulosabisfosfataasa. Na aktivitu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy mají vliv tyto čtyři faktory závislé na světle [2]:

1. Hodnota pH. Po osvětlení vzroste pH stromatu z hodnoty cca 7,0 na hodnotu okolo 8,0, neboť protony se ze stromatu pumpují do dutiny tylakoidu. Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa má ostré optimum u pH 8,0.
2. Koncentrace hořečnatých iontů. Osvětlení způsobuje tok protonů do dutiny tylakoidu, který je kompenzován odtokem iontů Mg<sup>2+</sup> do stromatu. Vzrůst koncentrace hořečnatých iontů ve stromatu stimuluje aktivitu Rubisco.
3. Koncentrace NADPH. NADPH, který vzniká činností PSI po osvětlení, allostericky aktivuje Rubisco.

4. Množství 2-karboxyarabinitol-1-fosfátu (CA1P). Aktivita Rubisco je silně inhibována CA1P, který mnohé rostliny syntetizují pouze ve tmě [2].

#### 2.1.4. Regulace fotosyntézy

Fotosyntézu reguluje světlo, teplota, pH, výživa rostliny a rychlost využití konečných produktů. Regulace může nastat v kterékoliv fázi fotosyntézy, přičemž podrobný mechanismus mnoha aspektů regulace není ještě zcela znám [11].

Fosfát je používán jako meziprodukt ve většině spojených reakcí v organismech. Regulace pomocí anorganického fosfátu (Pi) se uplatňuje při nadměrném hromadění fosfátu ve fosforylovaném meziproduktu, kterým dochází k inhibici metabolického toku [12], což je možná fotosyntetická regulace. Ve fotosyntéze je fotofosforylace a aktivita ATPasy mimořádně citlivá na koncentraci anorganického fosfátu, který se může stát inhibítoem, pokud klesne jeho koncentrace [13]. Syntéza konečných produktů, jako jsou sacharosa, škrob, nebo aminokyseliny v listu, určují poměr, kterým je anorganický fosfát znovu použit v reakcích fotosyntézy. Otázkou je, jestli tento potenciální regulační mechanismus zpomaluje fotosyntézu *in vivo*. Pieters et al. [14] zjistili, že zpomaluje, a že nejvíce anorganického fosfátu pochází z kultivačního substrátu rostlin. Nízké množství anorganického fosfátu umožňuje regulaci při nízké teplotě a vede ke snížení rychlosti syntézy sacharosy [15]. Uhlík se též zapojuje do regulace fotosyntézy. Hojné zásoby uhlíku mohou vyvolat expresi genů a mohou také potlačit fotosyntetické geny. Regulace fotosyntézy je spojována nejen s metabolismem uhlíku, ale i dusíku [16], [17]. Vysoké množství uhlíku i dusíku vede k potlačení fotosyntézy, možný je též konvergentní mechanismus [16]. Fotosyntéza je částečně důvodem velkých investic dusíku. Při nedostatku dusíku u rostlin dochází k inhibici růstu, akumulaci sacharidů, až k následnému snížení fotosyntézy. S dalším nedostatkem N může být aktivace Rubisco zastavena a dochází k mobilizaci na úrovni celé fotosyntézy [18].

Experimenty s feedingem pomocí cukrů vedou k vysokému obsahu cukrů v listu, avšak ne ke ztrátě fotosyntetické genové exprese, nebo fotosyntetické kapacity [17], [19]. Předpokládá se, že z cukrů je glukosa signální molekulou pro represi fotosyntézy [20], a že akumulace glukosy potlačuje expresi fotosyntetických genů a indukuje stárnutí listů prostřednictvím signální metabolické dráhy, která zahrnuje hexokinasu [21]. Araya et al. [22] objevili, že represe fotosyntézy je nejsilnější v listech, ve kterých se akumuloval škrob, přičemž škrob sám je metabolicky inaktivní a je nepravděpodobné, že by přímo reprimoval fotosyntetické geny. Role ostatních cukrů při limitaci fotosyntézy je stále nejasná, ale všechny dosavadní práce naznačují, že nedostatek dusíku v rostlině zvyšuje akumulaci sacharidů

Fotosyntetická kapacita může být stimulována vysokou koncentrací CO<sub>2</sub> ve vysokém množství dusíku [23]. Souhrnně tyto údaje naznačují, že zásoba uhlíku je důležitou kontrolní silou pro fotosyntetickou genovou expresi, ale důležitost postavení dusíku je hlavním činitelem represe fotosyntézy uhlíkem, alespoň pokud je množství uhlíku vysoké.

Pellny et al. [24] prokázali přítomnost trehalosa-6-P v tabákových listech, které korelují se změnami ve fotosyntetické kapacitě, což je důkaz, že i trehalosa se podílí na regulaci fotosyntézy.

## 2.2. Enzym Rubisco

Nepochybně nejdůležitější enzym na Zemi je ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa neboli Rubisco. Je to nejvíce rozšířený a snad i nejvýznamnější protein na Zemi. Jako vstupní bod oxidu uhličitého do biosféry je Rubisco ústředním enzymem pro zachování života na Zemi.

Rubisco objevili Wildman a Bonner [25] v roce 1947, jako hlavní rozpustnou bílkovinu v extraktu rostlinných listů. Neměli o něm žádné informace a nazývali ho protein Frakce I.

V roce 1965 bylo objeveno, že katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu a o několik let později byla objevena jeho druhá hlavní katalytická aktivita - oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátu. Enzym byl nazván ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa a postupně se pro něj vžila zkratka Rubisco.

Enzym Rubisco byl studován více než všechny ostatní rostlinné enzymy. Posttranskripční úprava enzymu Rubisco probíhá za účasti chaperonů. Struktura byla studována rentgenovou krystalografií. Pomocí dalších technik bylo zjištěno, že Rubisco katalyzuje celou řadu reakcí [26].

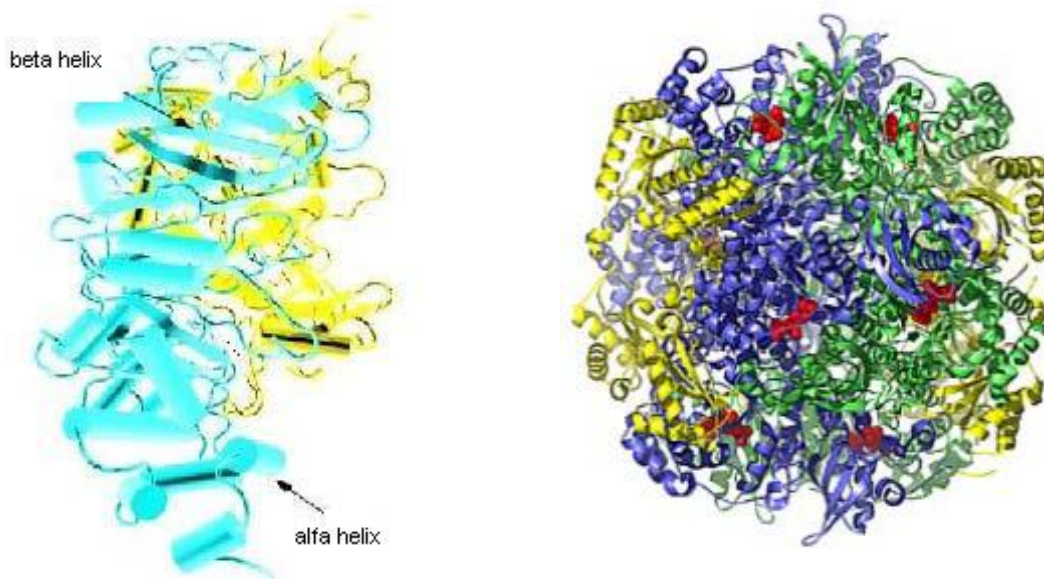
### 2.2.1. Struktura enzymu Rubisco

U zelených řas a vyšších rostlin se Rubisco vyskytuje v chloroplastech a velká podjednotka L je zakódována v chloroplastovém genomu [27]. Malá podjednotka S je syntetizována v cytoplazmatických ribozomech a je importována do chloroplastu. Podjednotka se skládá ze dvou domén – malé N-terminální domény a velké C-terminální domény. Malá N-terminální doména je tvořena pěti úseky s  $\beta$ -strukturou a dvěma  $\alpha$ -helixy umístěnými na jedné straně  $\beta$ -struktury. Velká C-terminální doména má soudkovitý tvar, složený s osmi struktur. Významným strukturním rysem velké C-terminální domény je existence ohebné smyčky (loop 6) [26].

Ačkoliv bylo dlouho známo, že aktivita Rubisco může být zvýšena preinkubací s oxidem uhličitým a  $Mg^{2+}$ , podrobně začal být tento jev studován teprve v polovině 70. let. Aktivace je reverzibilní rovnovážný proces, kde ustavení rovnováhy závisí na rovnovážné koncentraci  $CO_2$ , iontu  $Mg^{2+}$  a protonů [28].

Rubisco má u vyšších rostlin komplexní kvartérní strukturu, vysokou relativní molekulovou hmotnost (560 000), několik vazebných míst pro substrát, kofaktory, inhibitory, protilátky a je složeno z neidentických podjednotek [29]. Je to allosterický enzym z třídy ligas, má globulární strukturu (obr. 2.4) a tři strukturně odlišné, ale funkčně analogické formy. Forma I ( $L_8S_8$ ) tvoří hexadekamer, byla nalezena u vyšších rostlin, řas, cyanobakterií a mnoha autotrofních bakterií a obsahuje osm velkých podjednotek (56 kDa) L a osm malých podjednotek S (14 kDa). Forma II ( $L_2$ ) je dimer a byla nalezena u obrněnek a některých druhů autotrofních bakterií včetně obligátních anaerobů. Rubisco archebakterií je dekamer ( $L_2$ )<sub>5</sub> [26].





Obr. 2.5 Struktura Rubisco - vlevo forma II ( $L_2$ ), vpravo forma I ( $L_8S_8$ ).

Forma II se skládá ze dvou podjednotek, vyznačeny žlutou a modrou barvou. Šipky vyznačují  $\beta$ -strukturu ( $\beta$ -helix) a  $\alpha$ -helix. Převzato z [30].

Forma I se skládá z osmi velkých podjednotek (modrá a zelená barva) a z osmi malých podjednotek (žlutá a světle modrá barva). Aktivní místa jsou vyznačena červenou barvou. Převzato z [31].

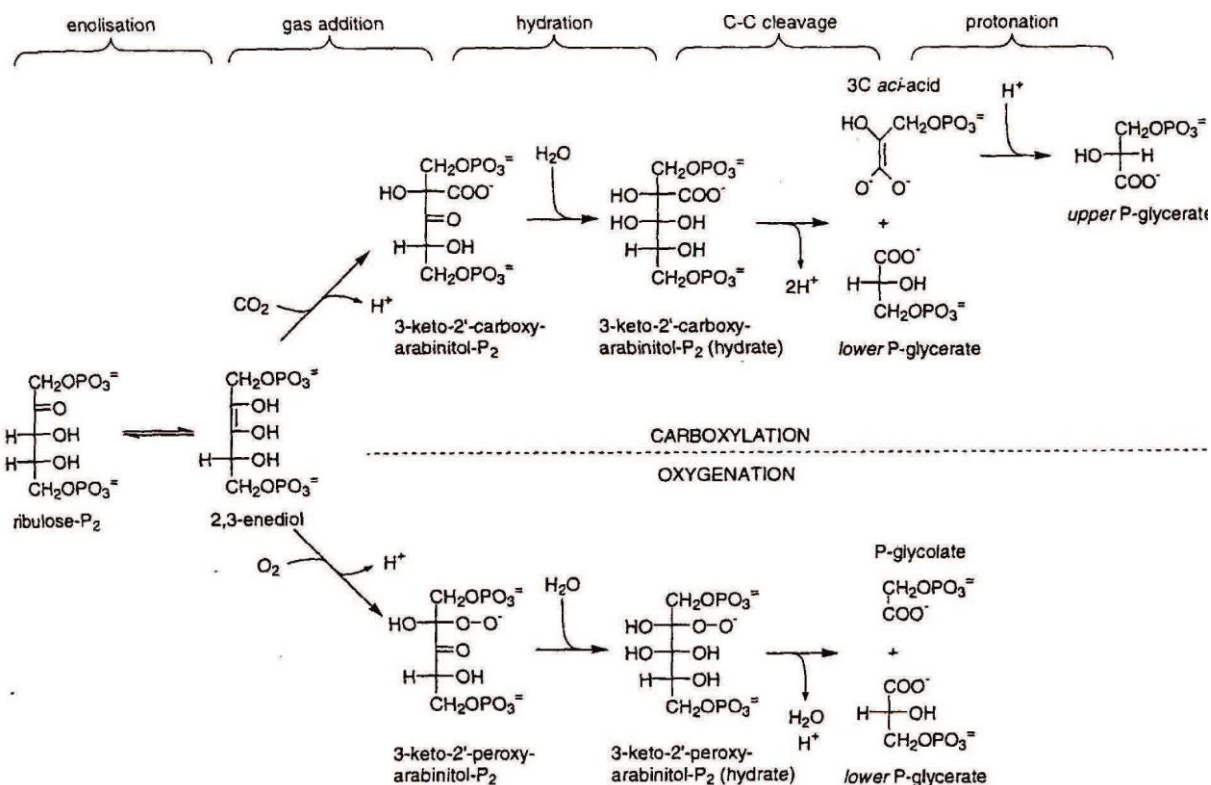
### 2.2.2. Funkce enzymu Rubisco

Aby Rubisco bylo katalyticky aktivní, musí nejprve dojít k aktivaci katalytického centra. Prvním krokem je reverzibilní karbamylace  $\epsilon$ -aminokyseliny postranního řetězce lysinu za vzniku karbamátu a poté vznik koordinační vazby s  $Mg^{2+}$ . Karbamylace probíhá pomalu a určuje rychlost celé aktivace. Tato vazba probíhá pouze v nadbytku  $Mg^{2+}$  a v alkalickém prostředí. Na takto vytvořené aktivní místo se váže substrát ribulosa-1,5-bisfosfát [32]. Aktivní místo leží na rozhraní mezi N-terminální doménou jedné a C-terminální doménou druhé podjednotky, proto samotná velká podjednotka nemůže mít katalytickou aktivitu [9].

Aktivované Rubisco je bifunkční (obr. 2.5), protože může katalyzovat dva druhy reakcí karboxylaci a oxygenaci ribulosa-1,5-bisfosfátu. Příčinou dvojí funkce enzymu je podobná struktura  $CO_2$  a  $O_2$ , které jsou konkurenty při vazbě na aktivní místo (obr. 2.6).

U karboxylace dochází k přesmyku ribulosa-1,5-bisfosfátu na enol-formu. Rubisco váže  $CO_2$  na enol-formu za vzniku nestabilního meziprojektu, který je hydrolyzován na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu. Podstatou celé karboxylace je stabilizace přechodného meziprojektu 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu vlivem komplexu karbamátu s kovovým iontem  $Mg^{2+}$ . Po navázání  $CO_2$  proběhne Calvinův cyklus a ze dvou molekul 3-fosfoglycerátu vznikají dvě molekuly glyceralddehyd-3-fosfátu. Nakonec dochází k regeneraci ribulosa-1,5-bisfosfátu a spojení dvou molekul glyceralddehyd-3-fosfátu za vzniku sacharidu [9].

Při oxygenaci dochází ke štěpení meziprojektu 2-peroxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfátu a přímo se uvolňuje molekula 3-fosfoglycerátu a molekula 2-fosfoglykolátu - začátek glykolátové cesty [33].



Obr. 2.6 Schéma karboxylace a oxygenace RuBP. Převzato z [32].

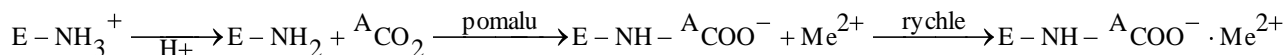
### 2.2.3. Aktivace Rubisco

Od objevu enzymu Rubisco bylo vynaloženo mnoho úsilí na vysvětlení jevu, proč má izolovaný enzym tak velice nízkou afinitu k CO<sub>2</sub> ve srovnání s poměry *in vivo*. Zjistilo se, že při preinkubaci enzymu s ribulosabisfosfátem a po té při zahájení reakce s oxidem uhličitým a ionty hořečnatými se objevuje na počátku katalýzy lagová fáze, avšak při preinkubaci s CO<sub>2</sub> a Mg<sup>2+</sup> se reakce po přidání RuBP rozběhne okamžitě. Enzym je třeba zprvu aktivovat oxidem uhličitým a hořečnatými ionty [8].

Předpokladem pro aktivaci Rubisco je sekvenční vázání CO<sub>2</sub> a bivalentního kovového iontu Mg<sup>2+</sup>. Molekula CO<sub>2</sub> se jako karbamát kovalentně váže k ε-amino skupině specifického lisylového zbytku K201 v aktivním místě a tento karbamát hraje klíčovou roli v katalýze. Pouze pokud je karbamát stabilizován kovem, je aktivní místo schopno přeměnit ribulosa-1,5-bisfosfát na produkty [34].

Přitom platí tyto zákonitosti:

1. Aktivace Rubisco je závislá lineárně na koncentraci CO<sub>2</sub>



Pomocí kinetických dat i spektrometricky se prokázalo, že <sup>A</sup>CO<sub>2</sub> se váže dřív než kationy. Ternární komplex E-COO<sup>-</sup>·Me<sup>2+</sup> katalyzuje karboxylaci i oxygenaci.

2. Aktivace je reversibilní, po odstranění iontů Mg<sup>2+</sup> a oxidu uhličitého se enzym rychle vrací do inaktivní formy.
3. Molekula oxidu uhličitého, která enzym katalyzuje, je jiná než molekula CO<sub>2</sub> jako substrátu <sup>A</sup>CO<sub>2</sub> ≠ <sup>S</sup>CO<sub>2</sub>.

4.  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  a  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  se váží na odlišná místa enzymu.
5. Ze závislosti aktivace na pH vyplynulo, že se  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  váže na skupinu enzymu s výrazně alkalickým pH. Experimentálně se prokázalo, že touto skupinou je  $\epsilon$ -aminoskupina lysylového zbytku v poloze 201 proteinu velké podjednotky.
6. Aktivace je společná pro enzymy z taxonomicky odlišných druhů organismů.
7. Aktivace enzymu je často spojena se změnami jeho struktury.

Rubisco se aktivuje řadou sloučenin (Fru-6-P, Xyl-5-P, Ery-4-P, Rib-5-P, ADP, ATP, Glc-6-P, dihydroxyaceton-P) a inhibuje dalšími (Fru-1-P, Fru-6-P, Glc-1-P).

Při tom platí tyto podmínky:

- a) efektor se uplatní pouze tehdy, přidá-li se během preinkubace,
- b) je-li v mediu nadbytek enzymu Rubisco nebo jeho analog, CABP, efekторы jako NADPH, fosfoglukonát nebo fruktosabisfosfát se nenaváží,
- c) efekторы fungují jako kompetitivní inhibitory,
- d) efekторы (bisfosfofruktosa, 3-fosfoglycerát, sulfát a další) vyvolávají v UV spektru obdobné změny jako navázání substrátu.

Mezi aktivátory Rubisco jsou látky velmi chemicky odlišné (P-glukonát, fruktosabisfosfát, NADPH, fosfát). Účinek je v některých případech závislý na koncentraci efektoru do té míry, že nízké koncentrace např. fosfoglukonátu a fruktosabisfosfátu pochod aktivuje, vyšší inhibuje. U těchto dvou látek se zjistilo, že v nízkých koncentracích se váží s Rubisco a ionty v ternární komplex [2], [8].

Čas, po který je efektor navázán do reakčního centra, je velmi omezený ve srovnání s životností aktivovaného stavu enzymu [8].

### 2.2.3.1. Aktivace Rubisco světlem

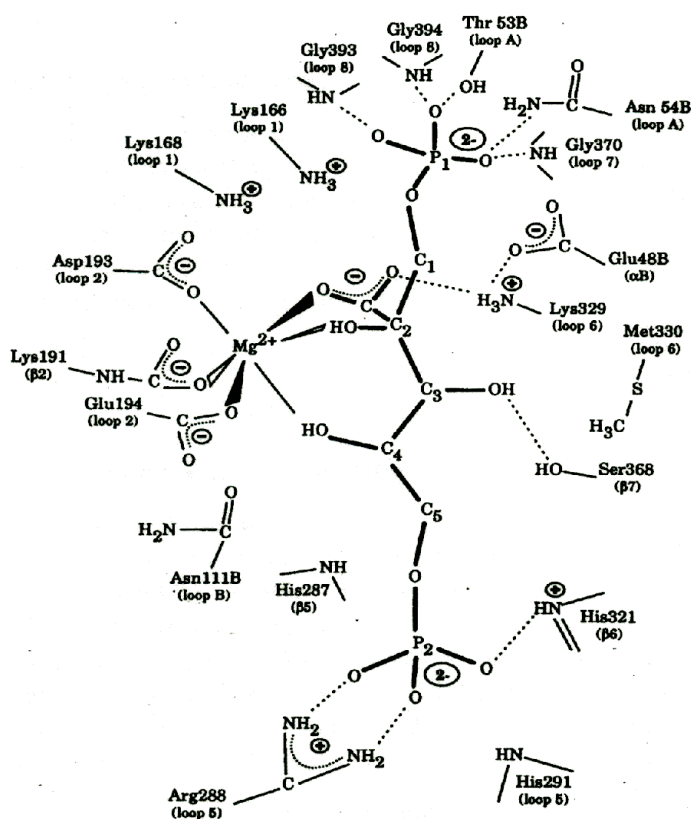
Rozdíly v aktivitě enzymu Rubisco na světle a ve tmě jsou značné. Po dlouhá léta se aktivace Rubisco světlem vysvětlovala pouze vzestupem v koncentraci iontů hořečnatých a pH ve stromatu. Koncentrace hořečnatých iontů potřebná k aktivaci enzymu na poloviční maximální rychlost odpovídá fyziologickým koncentracím  $\text{Mg}^{2+}$  přítomných ve stromatu na světle. Dnes víme, že nezbytným aktivátorem je dále oxid uhličitý potřebný v koncentraci kolem  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Takovéto koncentrace bezpochyby ve stromatu C3 rostlin přítomny nejsou [8].

Rubisco je obvykle plně aktivováno a karbamylováno v běžné koncentraci  $\text{CO}_2$  a vysokém světle. Rubisco by nemuselo být plně karbamylováno *in vivo*. Analýza kinetiky Rubisco *in vitro* ukázala, že rovnováha karbamylování v nepřítomnosti RuBP by byla nižší o 25 % u pH,  $\text{Mg}^{2+}$  a koncentraci  $\text{CO}_2$  vyskytujících se v chloroplastech [35]. Kromě toho, že RuBP byl přítomen při analýze *in vitro*, blokuje karbamylování pevnou vazbou na nekarbamylovaném aktivním místě. Potíže při karbamylování jsou eliminovány *in vivo* přítomností dalších bílkovin, Rubisco aktivasy. Byla poprvé identifikována u mutantů *Arabidopsis thaliana* vyžadujících vysoké koncentrace  $\text{CO}_2$ , které na světle Rubisco slabě aktivovaly. Aktivasa je oligomer, skládající se z 14 nebo 16 podjednotek, které mají tendenci samovolně asociovat. Aktivita aktivasy roste se stupněm asociace. Pro funkci aktivasy je nutná hydrolýza ATP, RuBP a nočního inhibitoru 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát (CA1P). Aktivasa je aktivována hydrolýzou ATP, který rozpozná Rubisco a selektivně se váže na katalytické místo přemístěním fosfátových zbytků. To způsobuje otevření smyčky, uvolnění ligandu a návrat aktivasy v neaktivní formě [33]. Mechanismus je stejný pro všechny ligandy, které se vážou

na aktivní místo Rubisco. Při osvětlení je aktivasa aktivována zvýšenou hladinou ATP a dochází k uvolnění RuBP z aktivního místa. Volný enzym pak může být karbamylací stabilizován vazbou RuBP [32].

### 2.2.3.2. Vliv inhibitorů

Inhibitory jsou látky, které mohou blokovat aktivní místo enzymu Rubisco a nelze je odstranit aktivací *in vivo*. Mezi tyto inhibitory patří 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát (CA1P), D-xylulosa-1,5-bisfosfát (XuBP) a 3-keto-D-arabinitol-1,5-bisfosfát (3-KABP). CA1P patří mezi inhibitory vyskytující se při malém ozáření a v noci. Váže se nevratně na karbamylované aktivní místo a tím dojde k zastavení katalýzy. XuBP a 3-KABP patří mezi denní inhibitory a jsou to analogy ribulosa-1,5-bisfosfátu [36],[37].



Obr. 2.7 Aktivní místo enzymu Rubisco. N-terminální doména je tvořena Glu48, Thr53, Asn53 a Asn111, všechny ostatní zbytky jsou umístěny v  $\beta/\alpha$  – stočené doméně přiléhající podjednotky. Nejdůležitější v aktivním místě je Lys191, jehož  $\epsilon$ -aminoskupina je karbamylována molekulou  $\text{CO}_2$  a vzniklý karbamát se stabilizuje koordinací s  $\text{Mg}^{2+}$ . Na takto karbamylované aktivní místo se navazuje RuBP a na jeho uhlík  $\text{C}_2$  se navazuje molekula vzdušného  $\text{CO}_2$ . Převzato z [33].

### 2.3. Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na rostliny

Působení zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na rostliny lze rozdělit na vlivy přímé a nepřímé. Přímé účinky zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> zahrnují změny v rychlosti fotosyntézy, fotorespiraci, vodivosti průduchů a v mitochondriální respiraci [38].

#### 2.3.1. Rychlost fotosyntézy

Při pěstování rostlin v prostředí s vyšší koncentrací CO<sub>2</sub> se rychlost fotosyntézy nejprve zvyšuje, ale při dlouhodobé expozici naopak dochází ke snížení rychlosti fotosyntézy, snížení aktivity nebo množství enzymu Rubisco a dalších enzymů vázaných na Calvinův cyklus. Tento jev nazýváme aklimace. Jde o soubor fyziologických změn, k nimž dochází při dlouhodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> [38]. To znamená, že fotosyntetická charakteristika listů, které se vyvinuly již v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>, se liší od charakteristiky listů rostlin, které byly v předchozím období kultivovány při okolní koncentraci CO<sub>2</sub>.

Pro aklimaci jsou dva důvody:

(1) Rostlina není schopna využít nadbytečné asimiláty, proto reaguje poklesem aktivity jejich zdrojů.

(2) Pro fotosyntézu při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>, je postačující menší množství Rubisco. Například v přehledu zahrnujícím osm prací s jedenácti druhy se ukázalo, že snížení aktivity Rubisco dosahuje při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub>, asi 24 % [39].

Obecně se předpokládají tři hlavní regulační mechanismy rychlosti fotosyntézy:

- 1) Při nízkých koncentracích CO<sub>2</sub> je limitována rychlost karboxylace
- 2) Při dostatku CO<sub>2</sub> a nízké ozáření je rychlost fotosyntézy snížena nedostatečnou rychlostí regenerace substrátu, tj. ribulosa-1,5-bisfosfátu. To je přímým důsledkem nedostatku ATP a NADPH, tedy nedostatečné rychlosti přenosu elektronů v systému thylakoidní membrány.
- 3) Při vysokých rychlostech fotosyntézy se může projevit ještě limitace anorganickým fosfátem. Při fotosyntéze jsou totiž z chloroplastů exportovány asimiláty především ve formě fosfoglyceraldehydu nebo dihydroxyacetonfosfátu [38].

#### 2.3.2. Rychlost respirace

Poměr fixace CO<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> v současné atmosféře je asi 3:1.

Vzestup koncentrace CO<sub>2</sub> ve vzduchu obklopujícím list působí dvojnásobem:

- a) Zvýšení koncentrace substrátu (CO<sub>2</sub>) zvyšuje rychlost karboxylace, a tedy fotosyntézy.
- b) Zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> zvyšuje hodnotu poměru koncentrace CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, a tím snižuje fotorespiraci, tedy ztráty CO<sub>2</sub>. To představuje další zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy [38].

#### 2.3.3. Vodivost průduchů

Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> vyvolává u většiny rostlin přivření průduchů. Pokles vodivosti průduchů a s tím spojený pokles rychlosti transpirace nemusí být při hodnocení porostu stejný jako při hodnocení jednotlivých listů. Je třeba vzít v úvahu, že snížená rychlost transpirace modifikuje jednotlivé složky energetické bilance listu, což se promítá i ve změně jejich teploty. Například zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> na 550 μmol·mol<sup>-1</sup> zvýšilo teplotu porostu

bavlníku srstnatého o 1 °C. Idso et al. [40] prokázali, že zvýšení teploty listů zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> je přímo úměrné poklesu vodivosti průduchů.

Drake et al. [39] zjistili, že průměrné snížení vodivosti průduchů při zdvojnásobení atmosférické koncentrace CO<sub>2</sub> činí 20 %. Výjimečně se však objevují práce, v nichž obdobný pokles vodivosti průduchů nebyl prokázán.

#### 2.3.4. Mitochondriální respirace

Dýchání je proces významně ovlivňující celkovou bilanci uhlíku v rostlině. Dýchání probíhá nejen v noci, ale i ve dne, třebaže rychlosti denního dýchání jsou patrně nižší než rychlost dýchání v noci. Dýcháním se rozkládají produkty fotosyntézy, nejčastěji cukry, ale současně se vytvářejí uhlíkové skelety, zdroje pohotové energie ve formě ATP a redukčních ekvivalentů ve formě NAD(P)H. Tyto produkty jsou pak bezprostředním substrátem pro syntézu všech struktur i pro zajištění všech funkcí spojených s růstem rostlin.

Při sledování vlivu CO<sub>2</sub> na rychlost mitochondriálního dýchání lze rozlišit

- a) přímý bezprostřední vliv, při němž dochází k poklesu rychlosti dýchání při expozici zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>,
- b) nepřímý vliv projevující se při aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> [38].

#### 2.3.5. Nepřímé účinky CO<sub>2</sub> na rostliny

K nepřímým účinkům patří změny teploty, obsah minerálních látek v půdě a spotřeba vody.

Zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> zvyšuje teplotní optimum fotosyntézy. To znamená, že relativní pokles rychlosti fotosyntézy při teplotách přesahujících teplotní optimum rostlin pěstovaných v okolní koncentraci CO<sub>2</sub> je kompenzován právě posunutím tohoto optima. Přitom tato změna optima může činit až 5 °C při zdvojnásobení okolní koncentrace CO<sub>2</sub>. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> snižuje vodivost průduchů a tím klesá rychlost transpirace a zvyšuje se teplota rostliny. Vyšší teploty podporují spotřebu asimilátů při růstu nebo jejich akumulaci v zásobních orgánech, takže případná inhibice fotosyntézy se ani při dlouhodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> nemusí projevit. Proto může mít zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> příznivý vliv i v podmínkách stresu vyvolaného vysokými teplotami [41].

Příjem iontů minerální výživy je v těle rostliny regulován, jinak by se mohly některé prvky hromadit a působit toxicky a jiných by se mohlo v rostlině naopak nedostávat. Při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> se projevuje nerovnováha mezi aktivitou kořenů a listů, což se projevuje ve zvýšeném poměru C/N v sušině rostlin. Právě zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> je příkladem, že i při dostatku N může dojít k nadměrné produkci asimilátů neboli nedostatečnému zásobení rostlin dusíkem. Při nedostatečném množství dusíku dochází u rostlin kultivovaných při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> k rychlejšímu rozkladu enzymů a to hlavně enzymu Rubisco. Rubisco představuje největší podíl ze všech enzymů nacházejících se v listech. Zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> vede k poklesu obsahu dusíku v listech a to o 15–20 %. To je způsobeno vyšším obsahem sacharidů, ale i poklesem obsahu fotosyntetických bílkovin [2].

Při hospodaření s vodou uvolní rostliny nejvíce vody do ovzduší transpirací, tj. difuzí vodní páry z povrchu buněk do volné atmosféry. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňuje přivření průduchů, což způsobuje zvýšení hodnoty stomatálního odporu proti difuzi vodní páry. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> zvyšuje celkovou biomasu a velikost listové plochy, což vyvolá zvýšený příjem a výdej vody. To může mít nepříznivý dopad především pro ekosystémy na

místech s omezenou dostupností vody. Některé rostliny přizpůsobené na běžné podmínky vystačí s daným množstvím vody až do konce vegetace. Naproti tomu při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> mohou být zásoby vody spotřebovány ještě před koncem vegetace a mohou tak způsobit vyhynutí některých druhů rostlin [38].

### 2.3.6. Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na dřeviny

Saxe et al. [42] se zabývali vztahem dřevin a koncentrace CO<sub>2</sub> a poukázali na skutečnost, že zatímco před 360 miliony až 280 miliony let lesy ovlivňovaly atmosférickou koncentraci oxidu uhličitého jeho hromaděním v produktech, které se přeměnily na současná fosilní paliva, tak jejich dnešním spalováním se zase CO<sub>2</sub> v atmosféře zvyšuje.

Pro dřeviny je charakteristická především tvorba sekundárních pletiv, poskytující jim dostatečnou pevnost i při velkých výškách kmenů, která je způsobena velkou investicí zejména uhlíku do buněčných stěn. Tyto materiální i energetické náklady jsou kompenzovány dlouhou dobou životnosti těchto rostlin. Dřeviny se také vyznačují produkcí velkého množství těkavých látek souvisejících s tzv. sekundárním metabolismem, jako izopren, monoterpeny, aldehydy, alkoholy a karboxylové kyseliny.

Dlouhá doba života i velká výška kmenů komplikuje provádění pokusů se stromy v jejich přirozeném prostředí. Počet pokusů prováděných se stromy je nepřímo úměrný jejich výšce. S tím souvisí i konstatování Ceulemansa a Rousseauové [43], že naše neznalost toho, jak stromy reagují na změnu klimatu, je přímo úměrná jejich velikosti. Velikost stromů má velké důsledky na bilanci C, mnohem více CO<sub>2</sub> je fixováno v biomase dospělého stromu.

Malé až zdánlivě zanedbatelné změny vnějších podmínek mohou vést zejména ve stadiu mladých rostlin k obdobně nepostřehnutelným změnám fyziologie nebo morfologie stromů. Další vývoj může však tyto změny natolik zesílit, že se objeví překvapivé důsledky, jejichž původ se mnohdy těžko zjišťuje.

Stromy nepředstavují homogenní skupinu rostlin, proto jednotlivé druhy mají zcela odlišný průběh roční fotosyntézy, rozdílný obsah dusíku v pletivech apod. [44]. Zdá se, že zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> zvyšuje rychlost vývoje především v počátečních fázích.

Základní otázka většiny dlouhodobých studií dřevin spočívá v tom, zdali lesní ekosystémy jsou schopny při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> zvyšovat také množství ukládaného uhlíku. Je to součást obecného problému, do jaké míry je suchozemská vegetace sinkem či zdrojem CO<sub>2</sub>. Působí-li lesy jako významný sink, lze jimi do značné míry řešit problematiku zvyšující se koncentrace CO<sub>2</sub>. Pozitivní roli v růstu akumulovaného uhlíku v lesních společenstvech však může hrát i přirozená depozice dusíkatých sloučenin, jejichž množství se v posledních dekádách rovněž zvyšuje.

Lesní společenstva hromadí největší množství uhlíku v podzemních orgánech. Dále pak samotné kmeny ukládají 20 až 40 % uhlíku akumulovaného v nadzemní biomase. Také v listech dřevin pěstovaných při vyšší koncentraci CO<sub>2</sub> je zvýšený obsah nestrukturních polysacharidů. Na tomto zvýšení se podílí nejen škrob, ale v řadě případů i jednoduché cukry [38].

## 2.4. Vliv dusíku na rostliny

Všechny biogenní prvky hrají nezastupitelnou roli ve výživě rostlin, a proto jsou stejně významné. Mimořádné postavení ale zaujímá dusík. Je to nejspíš způsobeno tím, že se dusík vyskytuje ze všech minerálních živinách v největším množství a že je přítomen ve všech bílkovinách a enzimech.

Zvýšení koncentrace CO<sub>2</sub> vede k poklesu obsahu dusíku v listech a to o 15–20 % [29], [45], [46]. Conroy [47] vysvětluje tento jev „zředěním“ listového dusíku sacharidy akumulovanými v listech navíc vlivem vyšší intenzity fotosyntézy, Bowes [48] potlačením fotorespirace. Nejčastěji se pokles obsahu listového dusíku vysvětluje tím, že akumulace sacharidů v listech vede k represí exprese genů *rbcS* a *rbcL*, což má za důsledek pokles syntézy enzymu Rubisco [49], [50].

Akumulace sacharidů v listech je zesilována nedostatkem dusíku [16]. Například feeding *Arabidopsis thaliana* cukrem snižoval maximální kvantový výtěžek PSII v listech s nedostatkem dusíku, ale nikoliv v listech, které byly dostatečně zásobeny dusíkem [51]. Ono et al. [52] vysvětlují tento jev tak, že když má rostlina nedostatek dusíku, málo roste a má malou sílu sinku. Za těchto podmínek se pouze malá část sacharidů odvádí do sinku a sacharidy se akumulují v listech.

## 2.5. Metody stanovení aktivity Rubisco

Ke stanovení aktivity enzymu Rubisco se používají metody přímé a nepřímé. Mezi přímé metody patří metody spektrofotometrické a radiometrické. Nejrozšířenější nepřímou metodou je stanovení aktivity Rubisco pomocí gazometrické metody, při níž se měří dynamika výměny plynů při fotosyntéze.

### 2.5.1. Gazometrické stanovení

Při této metodě se používá moderních komerčních přístrojů, které jsou rychlé, nedestruktivní a umožňují měření celkové bilance uhlíku v rostlinách.

Stanovení je založeno na měření výměny CO<sub>2</sub> a vodní páry mezi asimilačním aparátem rostlin a okolní atmosférou. Příjem resp. výdej CO<sub>2</sub> asimilujícím pletivem se projeví změnou koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře obklopující měřený objekt. Změna koncentrace CO<sub>2</sub> je měřena pomocí infračerveného analyzátoru (IRGA). Aby bylo možné stanovit tuto změnu, je nutné umístit asimilující objekt do tzv. asimilační komory neboli listové kyvety. Tato je vzduchotěsně a elektronicky spojena s IRGA [39].

### 2.5.2. Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrické stanovení *in vitro* patří k přímým metodám. Toto stanovení aktivity Rubisco využívá změny absorbance, ke které dochází oxidací NADH na NAD<sup>+</sup> ve spráženém systému prvních tří reakcí Calvinova cyklu [40]. V reakční směsi jsou enzymy, které katalyzují fixaci CO<sub>2</sub> ribulosa-1,5-bisfosfátem za vzniku 3-fosfoglycerátu a redukci 3-fosfoglycerátu na glyceraldehyd-3-fosfát pomocí NADH. Oxidace NADH je provázena poklesem absorbance, z něhož je možno určit aktivitu Rubisco podle Lambertova-Beerova zákona [9], [53]. Přesný postup je popsán v kapitole 3.2.



### 2.5.3. Radiometrické stanovení

Radiometrická metoda patří mezi přímé metody a je založena na zabudování radioaktivní molekuly  $^{14}\text{CO}_2$  do molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu. Reakční směs musí být zbavena veškerého  $\text{CO}_2$  a uhličitánů a reakce je aktivována známým množstvím extraktu aktivovaného enzymu. Reakce je zastavena po 30 až 60 sekundách pomocí přidavku  $\text{HCl}$ , čímž dochází k inaktivaci enzymu Rubisco a uvolnění nadbytečného  $^{14}\text{CO}_2$ , který se kvantitativně odstraní, a poté se změří radioaktivita produktu, která odpovídá množství asimilovaného  $^{14}\text{CO}_2$  [53].

## 2.6. Metody stanovení nestrukturních sacharidů

Sacharidy lze stanovit řadou fyzikálních, chemických, fyzikálně-chemických a biochemických metod. V této práci bylo použito spektrofotometrické stanovení po reakci sacharidů s antronem.

### 2.6.1. Antronová metoda

Tato metoda je založena na reakci sacharidů s antronem za vzniku barevného komplexu. Vzniklé zelené kondenzační produkty furfural-antrony se stanovují spektrofotometricky. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci zkoumaného sacharidu. Tato metoda byla poprvé použita Dreywoodem [54], na kterého poté navázala řada autorů, z nichž nejznámější jsou Yemm a Willis [55].

### 2.6.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jedna z analytických separačních metod. Principem chromatografií obecně je separování složek obsažených ve vzorku, který se vnaší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární a mobilní fázi. Složky vzorku jsou poté separovány podle svých afinitních vlastností k jedné nebo druhé fázi. Podstatou stanovení pomocí HPLC je vznik slabých interakcí mezi složkami mobilní fáze, která obsahuje vzorek, a pevnou fází, tvořící náplň kolony. V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech mezi mobilní a pevnou fází jsou jednotlivé složky analyzovaného vzorku k pevné fázi vázány různě velkými silami. Nejprve jsou detekovány složky, které jsou poutány ke stacionární fázi menší silou a poté teprve složky, které se stacionární fází reaguji za vzniku pevnějších vazeb. Separované složky analytu putují do detektoru, kde poskytují odezvu, která je přímo úměrná množství analytu v určitém rozmezí koncentrací. Výsledkem je chromatogram, který jednotlivé složky zaznamenává jako chromatografické píky [56].

Nejběžnějším detektorem využívaným při chromatografii sacharidů je refraktometrický detektor. Pracuje jako diferenciální měřič změny indexu lomu mobilní fáze. Měří rozdíl indexu lomu mobilní fáze, která je uzavřena v referenční cele a eluentem vycházejícím z kolony. Výhodou těchto detektorů je jejich univerzálnost.

Metodu HPLC s refraktometrickou detekcí použili pro stanovení sacharidů např. Cabálková et al. [57].

## 2.7. Metody stanovení obsahu Rubisco

### 2.7.1. Enzymová imunoanalýza (ELISA)

Heterogenní enzymová imunoanalýza se označuje jako enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), někdy také jako enzymová imunoanalýza (EIA - enzyme immunoassay). Enzymové imunoanalýzy jsou citlivé imunochemické metody, které využívají enzymů ke

značení antigenu nebo protilátky. Jako enzymová značka slouží obvykle peroxidasa nebo alkalická fosfatasa. Antigen nebo protilátka jsou nespecificky adsorbovány na povrch pevné fáze. Jako pevné fáze se užívají různé materiály - zkumavky, jamky mikrotitračních destiček, magnetické částice. Pevná fáze usnadňuje oddělení vázaných a volných značených reaktantů.

Homogenní enzymová imunoanalýza je technika, která nevyžaduje oddělení vázané a volné značené protilátky nebo antigenu. Její provedení je jednoduché a užívá se ke stanovení nízkomolekulárních látek (léků, hormonů a metabolitů). Při imunochemické reakci soutěží nezačtený antigen s konjugátem o navázání na omezené množství protilátky. Při vazbě protilátky na enzym konjugátu se aktivní centrum může zablokovat, nebo nastává konformační změna enzymové molekuly spojená se ztrátou aktivity. Čím je ve vzorku více nezačteného antigenu, tím více molekul protilátky s ním reaguje a tím zůstane zachováno více enzymové aktivity v konjugátu, který nevstoupil do imunochemické reakce.

Imunoanalytické metody využívají obvykle dva způsoby uspořádání - kompetitivní a nekompetitivní.

Kompetitivní enzymová imunoanalýza se provádí vždy v nadbytku antigenu. Se sérem, které obsahuje neznámé množství antigenu, se smíchá známé množství stejného antigenu značeného enzymem (konjugát). Antigen v séru nebo ve standardním roztoku a konjugát soupeří o vazebná místa omezeného množství specifických protilátek vázaných na pevné fázi. Nezačtený antigen ve vzorku a značený antigen se vážou na protilátku ve stejném poměru, jako byl jejich poměr v původní směsi, to znamená, že čím více nezačteného antigenu reakční směs obsahuje, tím méně značeného antigenu se váže na protilátku a opačně. Za těchto podmínek je pravděpodobnost vazby protilátek se značeným antigenem nepřímo úměrná koncentraci nezačteného antigenu. Se zvyšujícím se množstvím nezačteného antigenu zůstává více značeného antigenu nenavázaného. Po inkubaci jsou konjugát a nezačtený antigen, které se nenavázaly na protilátku, společně s dalšími součástmi séra, odstraněny promytím. Intenzita vzniklého zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci antigenu v sérovém vzorku. Výsledky získáme odečtením z kalibrační křivky, která je sestavena na základě standardních vzorků o známé koncentraci antigenu.

Nekompetitivní enzymová imunoanalýza (sendvičové metody) se využívají ke stanovení antigenů nebo protilátek. Využívají pevnou fázi s navázanou protilátkou nebo antigenem, které musí být v nadbytku vzhledem k analyzované látce. Nekompetitivní enzymová imunoanalýza je vhodná pro stanovení velkých antigenů a několika vazebnými místy pro protilátku. Pro provedení metody jsou nezbytné dvě různé protilátky namířené proti různým antigenním determinantám stanovovaného antigenu. První protilátka je v nadbytku navázaná na pevnou fázi. K imobilizované protilátce jsou přidány vyšetřované vzorky nebo standardy obsahující antigen. Dojde k první imunochemické reakci. V průběhu inkubace se navazuje antigen na první protilátku. Vzhledem k tomu, že protilátka je v nadbytku, všechny molekuly antigenu mají možnost se navázat. Po inkubaci jsou odstraněny promytím všechny nezreagované složky séra. V nadbytku se přidá druhá protilátka značená enzymem (odlišná od první protilátky). Ta reaguje s další antigenní determinantou vyšetřovaného antigenu. Vzniká sendvičový komplex - navázaná protilátka na pevné fázi - antigen - protilátka značená enzymem. Absorbance produktu je přímo úměrná množství antigenu [58].

### **2.7.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)**

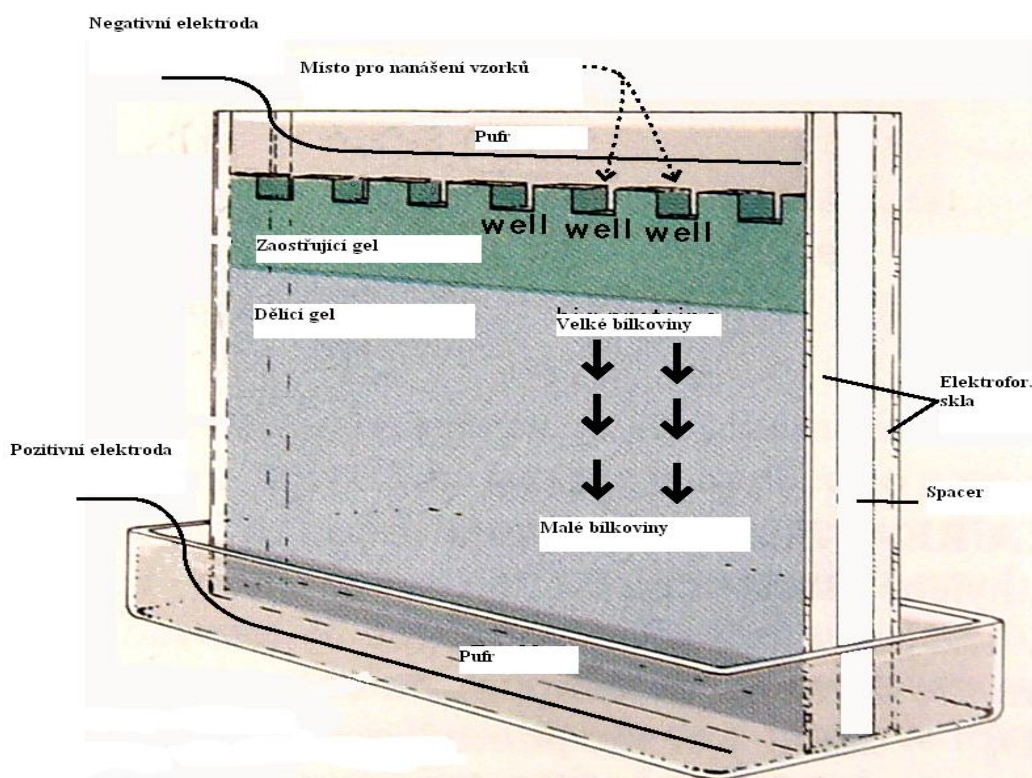
Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného je standardní metoda pro studium chloroplastových proteinů. Je to metoda, která umožňuje

rozdělení molekul na principu síťového efektu. Při SDS-PAGE se dodecylsírán sodný váže na molekuly bílkovin dělených látek, tím jim uděluje jednotný válcový tvar a jednotný záporný náboj. Velikost tohoto náboje je úměrná velikosti molekuly. SDS se na molekuly váže v poměru 1,4 g na 1 g bílkoviny. Na takto vzniklé ionty, pohybující se konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich náboje působí elektrická síla:

$$F_g = q \cdot E$$

kde  $q$  je náboj iontu a  $E$  je síla elektrického pole působící na ionty.

Polyakrylamidový gel používaný při elektroforéze je inertní, mechanicky dostatečně pevný a průhledný. Vzniká kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu. Kopolymerace probíhá v pufru za přítomnosti peroxidisíranu amonného jako iniciátoru, který na světle pomocí volných radikálů umožňuje polymeraci. Molekuly se při průchodu gelem dělí na základě svojí velikosti. Jednou z variant, která používá dva gely různé hustoty, je diskontinuální elektroforéza. Při této variantě se používá separační a zaostřovací gel s velkými póry. V zaostřovacím gelu dochází ke koncentraci bílkovin a v separačním probíhá dělení bílkovin podle molekulové hmotnosti. Zóny bílkovin, které vznikají na gelu při elektroforéze, je možné zviditelnit pomocí barvení. Barvení se provádí pomocí alkoholického roztoku s obsahem barviva Coomasie blue. Přebytek barviva se odstraňuje pomocí odbarvovacího kyselého roztoku. Koncentrace proteinů je přímoúměrná intenzitě zbarvení jednotlivých zón [59].



Obr. 2.8 Aparatura pro elektroforézu. Převzato z [60].

### 2.7.3. Kapilární elektroforéza (CE)

Podstata dělicích metod založená na migraci iontů v elektrickém poli je známa již z minulého století a v biologických vědách je významná hlavně při dělení makroiontů biopolymerů, zejména proteinů a nukleových kyselin.

Kapilární elektroforéza je moderní metoda, která využívá separace v kapilárách o délce 10–70 cm o malém vnitřním průměru 10–100  $\mu\text{m}$ . Vložené napětí se pohybuje mezi 10–60 kV. Princip je založen na elektromigraci, tj. na pohybu látek v elektrickém poli. K separaci dochází díky různé iontové pohyblivosti dosažené změnou pH a kompleťací iontů vhodnými ligandy. Pomocí kapilární elektroforézy lze separovat i neutrální látky po přidání povrchově aktivních látek do elektrolytu. Podstatou separace je jejich částečná „extrakce“ do vytvořených micel. Nabitě micely neutrální látky unášejí a ty jsou separovány na základě jejich rozdílné rozpustnosti v micelách, nebo na základě rozdílů v distribučních koeficientech analytů mezi vodnou a micelární fází. Vnitřní povrch křemenné kapiláry naplněné vodným elektrolytem obsahuje zčásti disociované silanolové skupiny  $-\text{Si}-\text{OH}$  s pH asi 6,2. Na vnitřní stěně vytvořený záporný náboj je kompenzován kationy pufru a vzniká Steinova elektrická dvojvrstva. Po zapnutí elektrického pole se dají tyto kationy do pohybu, a protože jsou hydratovány, způsobují posun celého elektrolytu a tak vytvářejí mohutný elektroosmotický tok, který unáší ke katodě všechny přítomné látky (neutrální i ionty).

Tyto separace jsou usnadněny použitím vysokého elektrického napětí, které může generovat elektroosmotický a elektroforetický tok roztoků pufru a iontových částic uvnitř kapiláry. Elektrická odolnost kapiláry umožňuje aplikaci velmi vysokého elektrického pole a tím krátkou dobu analýzy s vysokou efektivností a rozlišením [59].

Každá volná elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném znaménkem jeho náboje a orientací pole. Rychlost tohoto pohybu je závislá na náboji částice a na odporu prostředí. Tuto vlastnost popisuje veličina zvaná elektroforetická mobilita (pohyblivost), která vyjadřuje rychlost pohybu iontů v jednotkovém elektrickém poli.

Rychlost iontu může být vyjádřena vztahem:

$$v = \mu_e \cdot x \cdot E$$

kde  $v$  je rychlost iontu,  $\mu_e$  je elektroforetická mobilita a  $E$  je intenzita aplikovaného elektrického pole.

Elektroforetická mobilita iontu je dána vztahem:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

kde  $q$  je náboj iontu,  $\eta$  je viskozita roztoku a  $r$  je poloměr iontu.

Elektroosmotický tok (Electro Osmotic Flow - EOF) - elektroosmóza vzniká v důsledku styku kapalného roztoku na vnitřním povrchu kapiláry s pevnou stěnou kapiláry. EOF je tok kapaliny uvnitř kapiláry a je následkem povrchového náboje na vnitřní stěně kapiláry.

Ionizací plochy nebo absorpcí iontových sloučenin na plochu kapiláry dochází k vytvoření negativních nábojů. Pro křemennou kapiláru jsou pravděpodobné oba procesy vzniku negativních nábojů, ačkoliv ionizace silanolových skupin  $\text{SiOH}$  na iontovou formu  $\text{SiO}^-$  při vyšších hodnotách pH převládá. Neiontové materiály jako je teflon si pravděpodobně negativní náboj na vnitřní stěně kapiláry vytvoří absorpcí aniontů z elektrolytu [33].

Aby byla zachována elektroneutralita, shromažďují se u těchto záporně nabitých skupin kationy z elektrolytu a tím vzniká elektrická dvojvrstva. Její pevná část, zvaná Sternova vrstva, je tvořena vnitřní stěnou kapiláry a většinou bývá nabitá plošným elektrickým nábojem, který je „přilepen“ na stěně, a proto je nepohyblivý. Kompenzován je vrstvičkou, asi 10 nm silnou, opačného náboje v kapalně části dvojvrstvy, která se v elektrickém poli může pohybovat. Ke katodě jsou přitahovány kationy druhé části dvojvrstvy tzv. difúzní

vrstvy. Jelikož jsou tyto kationty solvatovány, jejich pohyb vyvolá tok celého roztoku v kapiláře.

Zeta potenciál je potenciálový rozdíl mezi Sternovou vrstvou a nábojem kapiláry. Protože je silně závislý na pH, i velikost EOF se mění s pH. Pod pH 4 je disociace malá a EOF není významný, nad pH 9 jsou silanolové skupiny plně disociovány a EOF je nejsilnější. Unikátní znak EOF, rovný profil toku, je velmi významný, protože nepřispívá přímo k disperzi zón. Další vlastností EOF je skutečnost, že způsobuje pohyb všech částic, bez ohledu na jejich náboj a velikost, ve stejném směru. Za normálních okolností (tj. záporně nabitý povrch kapiláry) se analyty pohybují od anody ke katodě. Kationty migrují nejrychleji, protože elektroforetická přitažlivost směrem ke katodě a EOF jsou ve shodném směru. Všechny neutrální látky putují rychlostí EOF a nejsou od sebe separovány. Anionty migrují nejpomaleji, protože jsou přitahovány k anodě, ale díky vysokému EOF putují ke katodě.

Podle způsobu provedení rozlišujeme čtyři základní varianty kapilární elektroforézy. Jsou to kapilární elektroforéza ve volné kapiláře neboli kapalinová zónová elektroforéza, kapilární gelová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie a kapilární isoelektrická fokusace.

Kapilární elektroforézu ve volné kapiláře použil pro stanovení obsahu Rubisco např. Warren [61].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Materiál

Měření bylo prováděno na listech buku lesního (*Fagus sylvatica*) odebraných na Experimentálním ekologickém pracovišti Centra pro výzkum globální změny AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech. Je to oblast s nízkou teplotou (roční průměr teploty vzduchu je 6,8 °C) vysokou vlhkostí (průměrná roční relativní vlhkost vzduchu je 83 %) a vysokou mírou ročních srážek (průměr za rok 2000 - 2009 je 1356 mm).

Tři roky staré sazenice byly na jaře 2010 vysazeny do kontejnerů o objemu 11 litrů do směsi křemičitého písku a lehké rašeliny, která neobsahovala žádná hnojiva a pH bylo upraveno na 5,5–6,5. Na dně kontejnerů byla cca 2 cm vysoká drenážní vrstva granulovaného jílu. Rostliny byly pěstovány ve vanách Ebb-flow a zvlaha byla zajišťována kapilárním vztlínáním z těchto van. Základní hnojení varianty N<sup>+</sup> bylo provedeno zálivkou okamžitě po výsadbě s využitím hnojiv dusičnanu amonného s vápencem, superfosfátu a síranu draselného na výsledný obsah živin v substrátu: 200 mg N·l<sup>-1</sup>, 100 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·l<sup>-1</sup> a 100 mg K<sub>2</sub>O·l<sup>-1</sup>. Na konci května 2010 a začátkem dubna 2011 bylo provedeno druhé a třetí hnojení dusíkem opět v dávce 200 mg N·l<sup>-1</sup>. U kontrolní varianty N<sup>-</sup> bylo použito pouze fosforu a draslíku ve stejné dávce P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a K<sub>2</sub>O jako v případě N<sup>+</sup> varianty.

Vzorky byly pěstovány od začátku vegetačního období (začátek dubna 2011) v minisférách s běžnou koncentrací CO<sub>2</sub> (A = 385 μmol·mol<sup>-1</sup>) nebo v atmosféře se zvýšeným obsahem CO<sub>2</sub> (E = 700 μmol·mol<sup>-1</sup>). „Feeding“ experiment byl prováděn na přelomu července a srpna 2011, při každém odběru byly odebrány 3 vzorky (n = 3) z každé výživy dusíkem. Samotný feeding sacharosou byl proveden v souladu s metodou popsanou McCormockem et al. [62] Pro experiment byly vybrány stejně sluněné listy s přibližně stejnou velikostí a podobným umístěním na větvičce. Listy použité ve vlastním experimentu byly adaptovány na po dobu 12 hodin. Následně byly pod vodou odstřiženy i s 1 cm segmentem větvičky a s tímto segmentem vloženy do cca 5 ml 0,7 M roztoku sacharosy resp. vody. Koncentrace 0,7 M sacharosy představuje horní hranici běžné koncentrace sacharosy v listovém floému. Listy byly fixovány ve vodorovné poloze k podložce a vystaveny záření PPFD 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> po dobu 0, 30, 60, 120, 180 min. Po této době byla stanovena listová plocha čepele (Li-3000A, Li-Cor, USA) a čerstvá hmotnost. Následně byly vzorky vloženy v označených mikrozkuřkách Eppendorf do tekutého dusíku a poté až do samotné analýzy skladovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -70 °C. Vzorky byly analyzovány na obsah a aktivitu Rubisco a obsah nestruturních sacharidů.



Obr. 3.1 Kultivační minisféry Experimentálního ekologického pracoviště Centra pro výzkum globální změny Akademie věd ČR na Bílém Kříži. Vlevo minisféra s normální koncentrací, vpravo minisféra se zvýšenou koncentrací  $\text{CO}_2$ . Převzato z [63].

### 3.2. Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco

Stanovení aktivity enzymu Rubisco vycházelo z metody Lilleyho a Walkera [64] s extrakcí podle Besforda [65]. Tento postup pro stanovení aktivity Rubisco je založen na spřažení tří reakcí Calvinova cyklu (reakce III - V). Metoda byla modifikována pro stanovení počáteční aktivity podle Heringové [66]. Jako substrát byl použit ribosa-5-fosfát, který se transformuje pomocí enzymů obsaženými v extraktu na ribulosa-1,5-bisfosfát (reakce I a II). Výhodou použití ribosa-5-fosfátu je jeho nižší cena a stabilnější rychlost reakce, protože se substrát uvolňuje ze směsi postupně. Dále byl do směsi přidáván  $\text{KHCO}_3$ , který uvolňuje  $\text{CO}_2$  a aktivuje enzym Rubisco. K aktivaci Rubisco jsou důležité i ionty  $\text{Mg}^{2+}$  ve formě  $\text{MgCl}_2$ . Do reakční směsi byly rovněž přidány enzymy, které katalyzují reakce (III) - (V), NADH a ATP. Konečným produktem reakce je glyceraldehyd-3-fosfát (reakce III - V). Aby se zabránilo hromadění ADP, který inhibuje enzym fosfoglycerátkinasu, je ADP fosforylováno v reakci (VI). Aktivita Rubisco byla vypočítána podle Lambertova-Beerova zákona z úbytku absorbance při oxidaci NADH (reakce V).

- ribosa-5-fosfát  $\xrightarrow{\text{ribosa-5-fosfátisom erasa}}$  ribulosa-5-fosfát (I.)
- ribulosa-5-fosfát + ATP  $\xrightarrow{\text{ribulosa-5-fosfátkina sa}}$  ribulosa-1,5-bisfosfát + ADP +  $\text{H}^+$  (II.)
- ribulosa-1,5-bisfosfát +  $\text{CO}_2$  +  $\text{H}_2\text{O}$   $\xrightarrow{\text{Rubisco}}$  2(3-fosfoglycerát) +  $2\text{H}^+$  (III.)
- 3-fosfoglycerát + ATP  $\xrightarrow{\text{fosfoglyce rátkinasa}}$  1,3-bisfosfoglycerát + ADP (IV.)
- 1,3-bisfosfoglycerát + NADH +  $\text{H}^+$   $\xrightarrow{\text{glyceraldehyd-3-fosfádehy drogenasa}}$  glyceraldehyd-3-fosfát +  $\text{NAD}^+$  +  $\text{HPO}_4$  (V.)
- 2-fosfokreatin + 2 ADP  $\xrightarrow{\text{kreat inf osfokinasa}}$  2-kreatin + 2 ATP (VI.)

### 3.2.1. Přístroje

- Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® CZ Hradec Králové. Parametry:
- kapacita 120 g, nejmenší dílek 0,1 g, atest ČMI.
- pH metr KNICK Portamess, typ 913pH
- Centrifuga MLW T52.1
- Absorpční spektrofotometr Helios  $\gamma$  od firmy Spectronic Unicam. Měřicí rozsah 190–100 nm, spektrální šířka pásu 2 nm.

### 3.2.2. Chemikálie

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

Na<sub>2</sub>EDTA - ethylendiamintetraoctan disodný; Sigma ALDRICH

KOH - hydroxid draselný; Penta

DTT - dithiotreitol; Sigma ALDRICH

MgCl<sub>2</sub> - chlorid hořečnatý; Sigma ALDRICH

BSA - bovinní sérový albumin; Sigma ALDRICH

KHCO<sub>3</sub> - hydrogenuhličitan draselný; Sigma ALDRICH

Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa; Sigma ALDRICH

Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH

R-5-P - ribosa-5-fosfát; Sigma ALDRICH

Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH

ATP - adenosin-5'-trifosfát; Sigma ALDRICH

NADH -  $\beta$ -nikotinamidadeninukleotid; Sigma ALDRICH

Fosfokreatin; Sigma ALDRICH

### 3.2.3. Příprava roztoků

#### 3.2.3.1. *Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8*

V asi 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,372 g Na<sub>2</sub>EDTA. Po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí KOH ( $c = 3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na 7,8. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu extrakčního roztoku.

#### 3.2.3.2. *Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0*

V asi 800 ml vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a 0,438 g Na<sub>2</sub>EDTA. Po rozpuštění bylo uvedeno pH pomocí KOH ( $c = 3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na 8,0. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 1000 ml a vodou doplněn po rysku.

Roztok je stálý a uchovává se při laboratorní teplotě. Používá se pro přípravu pracovního a aktivačních roztoků.

#### 3.2.3.3. *Příprava aktivačních roztoků*

V odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,228 5 g MgCl<sub>2</sub> v HEPES-KOH, pH 8,0.

v odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,300 3 g KHCO<sub>3</sub> v HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě. Z těchto roztoků se pipetuje po 50  $\mu\text{l}$  do optické kyvety, což odpovídá konečné koncentraci 20 mM MgCl<sub>2</sub> a 25 mM KHCO<sub>3</sub> v aktivačním roztoku.



#### **3.2.3.4. Příprava extrakčního roztoku**

V odměrné baňce na 200 ml bylo rozpuštěno 0,156 g DTT, 0,096 g MgCl<sub>2</sub> a 0,4 g BSA v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 7,8.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C. Takto připravený roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,2 % BSA.

#### **3.2.3.5. Příprava roztoku glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy**

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6 mg enzymu. Roztok se uchovává při teplotě –18 °C.

#### **3.2.3.6. Příprava roztoku kreatinfosfokinasy**

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 byly rozpuštěny 2 mg enzymu. Roztok se uchovává při teplotě –18 °C.

#### **3.2.3.7. Příprava roztoku R5P**

V 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6,2 mg R5P. Roztok se uchovává při teplotě –18 °C.

#### **3.2.3.8. Příprava roztoku 3-fosfoglycerátkinasy**

Ke stanovení byl použit komerčně dodávaný roztok. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

#### **3.2.3.9. Příprava pracovního roztoku**

V odměrné baňce na 10 ml bylo rozpuštěno v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 8,0:

0,002 g NADH

0,008 g DTT

0,013 g fosfokreatinu

0,019 g ATP

19 µl 3-fosfoglycerátkinasy

100 µl roztoku kreatinfosfokinasy

100 µl roztoku glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

Takto připravený pracovní roztok obsahuje 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,25 mM NADH, 5 mM DTT, 5 mM fosfokreatinu, 3,5 mM ATP, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat kreatinfosfokinasy a 80 nkat glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Pracovní roztok je stálý maximálně 6 hodin a uchovává se při laboratorní teplotě.

### **3.2.4. Extrakce enzymu**

Vzorek listu, přibližně 60–120 mg, byl rozdrcen v třecí misce spolu s mořským pískem. Následně bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku a směs byla asi 30 sekund homogenizována. Výsledná suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 30 sekund odstředována. Získaný extrakt byl použit ke stanovení počáteční a celkové aktivity. Tento extrakt rychle stárne, a proto bylo nutné ho zpracovávat co nejdříve.

### 3.2.5. Měření aktivity

#### 3.2.5.1. *Počáteční aktivita*

Pro měření počáteční aktivity bylo do optické kyvety napipetováno 50  $\mu\text{l}$  aktivačního roztoku  $\text{MgCl}_2$  a 50  $\mu\text{l}$  aktivačního roztoku  $\text{KHCO}_3$ . Dále bylo připraveno 20  $\mu\text{l}$  extraktu, 850  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku a 30  $\mu\text{l}$  roztoku R5P. Po promíchání byl ihned měřen pokles absorbance v 30s intervalech při vlnové délce 340 nm.

#### 3.2.5.2. *Celková aktivita*

Pro měření počáteční aktivity bylo do optické kyvety napipetováno 50  $\mu\text{l}$  aktivačního roztoku  $\text{MgCl}_2$  a 50  $\mu\text{l}$  aktivačního roztoku  $\text{KHCO}_3$  a 20  $\mu\text{l}$  extraktu. Roztok byl promíchán a 15 minut inkubován při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo do kyvety přidáno 850  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku a 30  $\mu\text{l}$  roztoku R5P. Po promíchání byl měřen pokles absorbance v 30 s intervalech při vlnové délce 340 nm.

### 3.2.6. Výpočet aktivity enzymu Rubisco

Měření absorbance bylo provedeno u jedenácti vzorků, odebíraných v atmosféře s běžným a zvýšeným obsahem  $\text{CO}_2$  v různých časech. Pokles absorbance byl měřen v 30 s intervalech celkem 6 minut, takže bylo získáno celkem 12 hodnot absorbancí pro každý ze vzorků. Z těchto hodnot byl vypočten úbytek absorbance za 30 sekund  $\Delta A$ . Po vyřazení odlehlých hodnot byla ze změn absorbance vypočtena aktivita enzymu Rubisco z Lambertova - Beerova zákona:

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

kde  $\Delta A$  je změna absorbance,  $t$  je čas [s],  $l$  je délka optické dráhy [cm],  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ ],  $c$  je koncentrace [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ].

Tabulka 1: Měření počáteční aktivity ve vzorku AN<sup>+</sup> V 180 při standardní koncentraci CO<sub>2</sub>, ΔA je změna absorbance za 30 s.

AN <sup>+</sup> V 180	plocha (m <sup>2</sup> )	čerstvá hmot. (g)	ΔA
1	0,001216	0,116	-0,002*
2	0,001216	0,116	0,003
3	0,001216	0,116	0,001
4	0,001216	0,116	0,001
5	0,001216	0,116	0,002
6	0,001216	0,116	0,001
7	0,001216	0,116	0,001
8	0,001216	0,116	0,001
9	0,001216	0,116	0,001
10	0,001216	0,116	0,001
11	0,001216	0,116	0,002
12	0,001216	0,116	
		průměr ΔA	0,0010
Aktivita (μmol CO <sub>2</sub> ·s <sup>-1</sup> ·m <sup>-2</sup> )		0,540	

\* značí statisticky odlehlou hodnotu, která nebyla zahrnuta do výpočtů

Aktivita enzymu byla vypočtena z rychlosti úbytku látkového množství substrátu (CO<sub>2</sub>):

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

kde ΔA je průměrný úbytek absorbance [min<sup>-1</sup>], V je objem vzorku [μl], ε je molární absorpční koeficient [cm<sup>2</sup>·mmol<sup>-1</sup>], a l je délka optické dráhy [cm]. Hodnota ε je pro NADH 6300 cm<sup>2</sup>·mmol<sup>-1</sup> a délka optické kyvety je 1 cm.

Aktivita v kyvetě tj. 20 μl extraktu:

$$\Delta n = \frac{\Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l} = \frac{0,0020 \cdot 1000}{2 \cdot 6300 \cdot 60} = 2,65 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Aktivita v 5 ml extraktu:

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 2,65 \cdot 10^{-6}}{0,02} = 6,61 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Aktivita enzymu vztažená na jednotkovou plochu listu:

$$\Delta n = \frac{6,61 \cdot 10^{-4}}{0,001216} = 0,54 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$$

### 3.3. Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco

Stanovení obsahu enzymu Rubisco vycházelo z metod Dameroyalové [67] a Rogerse et al. [68], postup byl upraven Floriánem [53] a Hlaváčkem [69].

#### 3.3.1. Přístroje

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

Centrifuga MLW T52,1

Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga (Lotyšsko)

Třepačka - LT2 Kavalier a.s.

Vortex - Start SA8

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

#### 3.3.2. Chemikálie

2-Merkaptoethanol; Sigma ALDRICH

Akrylamid; SERVA

Brilantní modř G 250 – Coomassi; SERVA

Bromfenolová modř Na sůl; SERVA

Butanol; Lachema

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

DTT - dithiothreitol; Sigma ALDRICH

Ethanol; Lachema

Glycerol; Sigma ALDRICH

Glycin; SERVA

Kyselina chlorovodíková; PENTA

Methanol; PENTA

N,N'-Methylenbisakrylamid; SERVA

Peroxodisíran amonný; SERVA

Octová kyselina; Lachema

SDS - dodecylsulfát sodný; Sigma ALDRICH

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

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma ALDRICH

#### 3.3.3. Příprava roztoků

##### 3.3.3.1. *Roztoky na přípravu gelů*

*Roztok A*

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

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok B*

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

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

*Roztok C*

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

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

#### *Roztok D*

10 g SDS bylo rozpuštěno ve 100 ml vody.

Roztok se uchovává v temnu při laboratorní teplotě.

#### *Roztok E*

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

Roztok je nutno připravit pro každé stanovení čerstvý.

#### *Roztok F*

10 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 1 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

#### *TEMED*

Komerčně dodávaný roztok.

### **3.3.3.2. Pomocné roztoky**

#### *Elektrodový pufr*

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

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

#### *TRIS pufr*

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

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

#### *Vzorkový pufr*

4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptoethanolu.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

### **3.3.3.3. Roztoky pro vizualizaci bílkovin**

#### *Stabilizační roztok*

100 ml methanolu bylo smícháno se 400 ml vody.

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

#### *Barvicí roztok*

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

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

#### *Odbarvovací roztok*

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

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

### **3.3.4. Příprava gelů**

Elektroforetická skla byla omyta, odmaštěna, opláchnuta destilovanou vodou a vyleštěna buničinou namočenou v ethanolu. Skla byla upevněna do stojanu menším sklem dopředu, spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem shora byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byl použit 10 % separační a 5 % zaostřovací gel. Při přípravě gelů bylo nutné pracovat v rukavicích z důvodu vysoké toxicity akrylamidu.

### 3.3.4.1. *Separáční gel*

Pomocí automatické pipet byly do kádinky napipetovány roztoky podle tabulky 1.

Tabulka 2: Objemy roztoků k ppravě 8% separáčnho gelu (10 ml)

<b>Roztok</b>	<b>Objem</b>
Destilovaná voda	4,0
A	3,3
B	2,5
C	-
D	0,1
E	0,1
TEMED	0,004

Roztok E a roztok TEMED byly do roztoku přidny těsně před nalitm roztoku mezi elektroforetick skla. Potě byl roztok dobře promíchán a nalit mezi skla asi 2 cm od horního okraje. Zbyl roztok byl ponechán v kádince jako kontrola tuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl převrstven butanolem pro vyrovnání hladiny a jako ochrana proti vyparovn vody. Po ztuhnutí byl butanol slit a gel byl několikrát promyt destilovanou vodou.

### 3.3.4.2. *Zaostrov gel*

Pomocí automatické pipety byly do kádinky napipetovány roztoky podle tabulky 2.

Tabulka 3: Objemy k ppravě 5% zaostrovho gelu (3 ml)

<b>Roztok</b>	<b>Objem</b>
Destilovaná voda	2,10
A	1,00
B	-
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po přidn roztoku E a roztoku TEMED byl zaostrov gel dobře promíchán a nalit na vrstvu separáčnho gelu těmě po okraj. Do prostoru mezi skla byl vložen elektroforetick hřebnek, kter byl odstraněn aš před nanšenm vzorků. Zbyl roztok byl ponechán v kádince jako kontrola ztuhnutí gelu. Hotov gel bylo mozn uchovávat v lednici, nejděle však do druhého dne.

### **3.3.5. Příprava standardu**

Ve zkumavce Eppendorf bylo rozpuštěno 1 mg D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy v 1 ml vzorkového pufru. Směs byla pečlivě promíchána na Vortexu a poté vařena 5 minut v termobloku při teplotě 100 °C.

### **3.3.6. Příprava vzorků**

Vzorek listu (60–120 mg) byl rozetřen ve třecí misce s mořským pískem. Byly přidány 2 ml TRIS pufru a vzorek byl asi 30 vteřin homogenizován. Vzniklá suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 1 minutu odstředována při 3000 ot./min. Do mikrozkušavky Eppendorf bylo napipetováno 0,5 ml extraktu a 0,5 ml vzorkového pufru. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut vřena v termobloku. Vzorky byly uchovávány v mrazničce při teplotě –18 °C.

### **3.3.7. Elektroforéza**

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

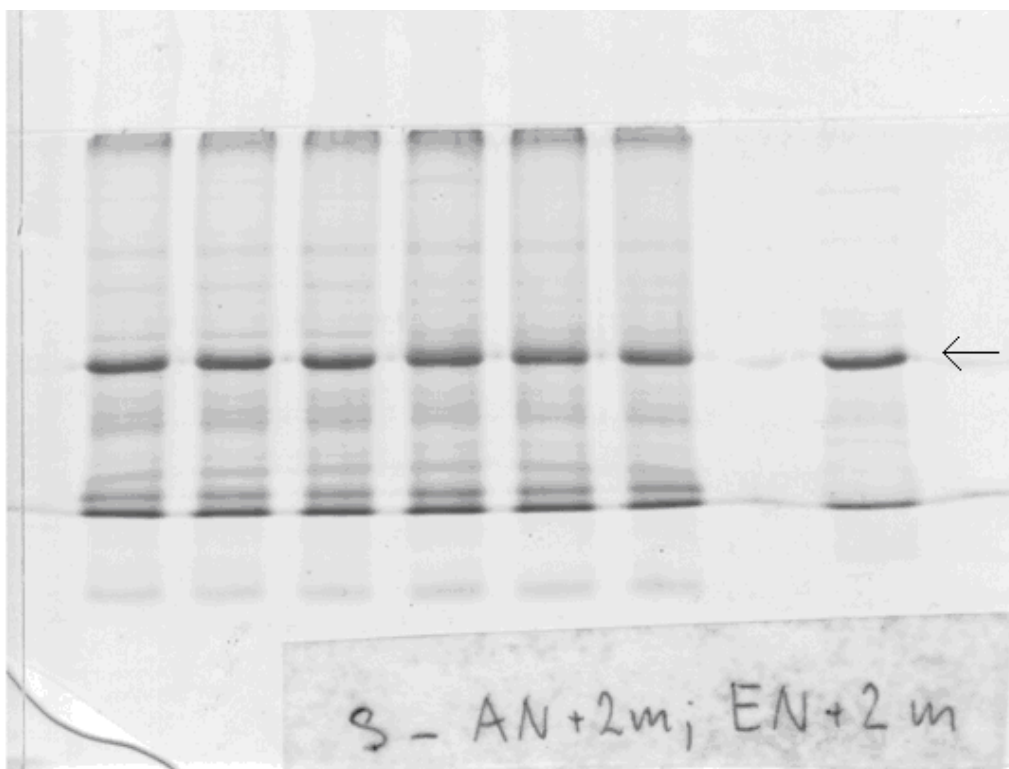
### **3.3.8. Zviditelnění bílkovin**

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

### **3.3.9. Vyhodnocení gelu**

Hotové gely byly naskenovány do počítače. Kvantifikace velké a malé podjednotky enzymu Rubisco byla provedena pomocí HP Scanner programem Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.X. Tím byly zóny velkých a malých podjednotek enzymu Rubisco převedeny na píky (intenzita zbarvení proti vzdálenosti od okraje gelu) a integrací byla vypočítána jejich plocha. Velikost plochy byla přímo úměrná koncentraci bílkovin, proto byla koncentrace

Rubisco ve vzorku vypočítána porovnáním plochy a koncentrace standardu. Protože poměr velikosti plochy a koncentrace standardu byl ovlivněn mnoha faktory, bylo nutné nanést standard Rubisco na každý gel.



Obr. 3.2 Separační polyakrylamidový gel s viditelnými zónami. Poslední sloupec je standard Rubisco, 1-6 sloupec jsou extrakty vzorků. Šipka značí zóny velké podjednotky

Vzorový příklad výpočtu obsahu Rubisco:

Tabulka 4: Stanovení obsahu Rubisco v uvedených vzorcích

označení vzorku	standard	vzorek	hmot. list. disku [mg]	obsah [g·m <sup>-2</sup> ]	obsah [mg(rub)·g-fw <sup>-1</sup> ]
EN-3m	93182,4	43804	83	2,24	22,65
EN-1m	93182,4	62929	107	2,65	25,25
AN+1m	83563,5	137319	105	7,79	62,60
AN-3m	83563,5	41363	75	2,34	26,40
AN-4m	115854,6	46661	61	2,23	26,41
AN+4m	115854,6	125622	77	4,47	56,33

Pro stanovení byl použit standard o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>

Výpočet koncentrace z ploch píků standardu a vzorku (pro vzorek EN-3m)

93182,4 ..... 1 mg/ml

43804,0 ..... x mg/ml

x = 0,47 mg/ml



Koncentrace neředěného vzorku:

$$2 \cdot 0,47 = \underline{\underline{0,94 \text{ mg/ml}}}$$

Celkový objem  $V = 2 \text{ ml}$

$$2 \cdot 0,94 = 1,88 \text{ mg enzymu Rubisco}$$

Přepočítání na jednotkovou plochu listu:

$$\frac{1,88}{0,00084} = 2238 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} = \underline{\underline{2,24 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}}}$$

Přepočítání na jednotkovou hmotnost listu:

$$\frac{1,88}{0,083} = \underline{\underline{22,65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}}}$$

Vzorec pro výpočet obsahu Rubisco v jednotce listové plochy: ( $8,4 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ )

$$x = \frac{P_{\text{vz}} \cdot c_{\text{st}} \cdot 4}{P_{\text{st}} \cdot P_{\text{listu(m}^2)}} \cdot 10^3 = \frac{43804 \cdot 1 \cdot 4}{93182,4 \cdot 8,4 \cdot 10^{-4} \cdot 10^3} = \underline{\underline{2,24 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}}}$$

Vzorec pro výpočet obsahu Rubisco vztážený na jednotku hmotnosti listu:

$$x = \frac{P_{\text{vz}} \cdot 4 \cdot 1000}{P_{\text{st}} \cdot m_{\text{list.disku}}} = \frac{43804 \cdot 4 \cdot 1000}{93162,4 \cdot 83} = \underline{\underline{22,65 \text{ mg (rub)} \cdot \text{g (fw)}^{-1}}}$$

### 3.4. Stanovení nestrukturních sacharidů antronovou metodou

Nestrukturní sacharidy byly stanoveny antronovou metodou dle [54], [55], [70]. Tato metoda je založena na extrakci nestrukturních sacharidů ve spojení s následným spektrofotometrickým stanovením pomocí antronu. Podstatou je tvorba barevného komplexu furfural-antron v prostředí koncentrované kyseliny sírové. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky.

#### 3.4.1. Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® VZ Hradec Králové. Parametry:  
nejmenší  
dílek 0,0001 g, kapacita 120 g, atest ČML  
Centrifuga MLW T52,1  
Spektrofotometr HELIOS  $\gamma$   
Vařič

#### 3.4.2. Chemikálie

Anthron; Sigma ALDRICH  
Chloralhydrát; Sigma ALDRICH  
D-Glukosa; Lachema  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$ - 98% kyselina sírová

### 3.4.3. Příprava roztoků

#### *Roztok antronu*

V 50 ml 85% kyseliny sírové bylo rozpuštěno 0,2 g antronu. Roztok byl převeden do 100 ml odměrné baňky. Roztok antronu se uchovává při laboratorní teplotě a je stálý maximálně 24 hodin.

#### *Roztok 1M chloralhydrátu - rozpouštědlo*

Ve 100 ml vody bylo rozpuštěno 16,54 g chloralhydrátu. Roztok je stálý a uchovává se při teplotě 4°C.

#### *Kalibrační roztoky glukosy*

Ve 100 ml vody bylo rozpuštěno 0,1 g glukosy. Roztok byl převeden do 200 ml odměrné baňky. Z připraveného kalibračního roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml byly připraveny postupným ředěním kalibrační roztoky o koncentracích 0–0,4 mg/ml. Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě.

#### *Extrakce rozpustných sacharidů*

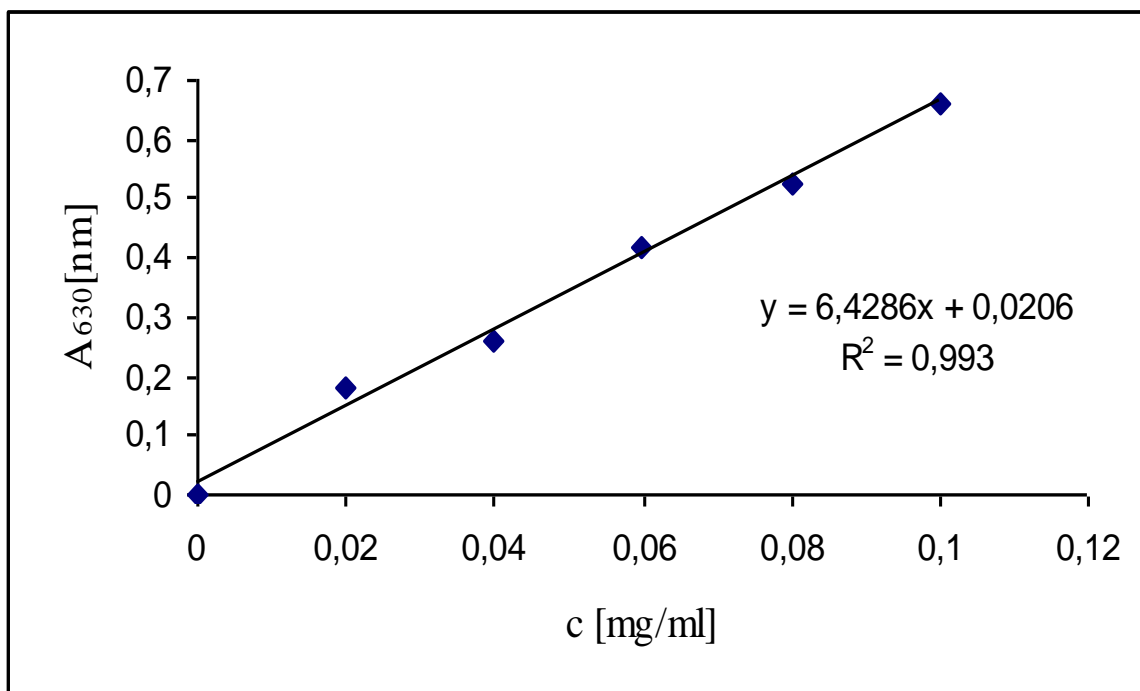
60–120 mg vzorku bylo spolu s mořským pískem rozetřeno v třecí misce na prášek. Tento prášek byl kvantitativně převeden do zkumavky 5 ml směsi MCW (metanol : chloroform : voda v poměru 12:5:3). Po protřepání na vortexu byla zkumavka vložena na 10 s do ultrazvukové lázně a potom byla zkumavka ponechána 10 minut při pokojové teplotě, aby se buňky rozrušily. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 10 min. (2500 ot./min). Vzniklý supernatant byl slit do kádinky a celá extrakce ještě 2× opakovala (celkový objem supernatantu byl 15 ml). Supernatant byl použit na stanovení rozpustných sacharidů, usazenina ve zkumavce na stanovení škrobu.

Ze vzniklého supernatantu bylo odebráno 5 ml a byly přidány 3 ml H<sub>2</sub>O a směs byla centrifugována po dobu 10 minut při (2500 ot./min). Z vrchní fáze byl odpipetován 1 ml a bylo přidáno 5 ml roztoku antronu - tato směs musela být intenzivně chlazená. Po promíchání a vychlazení se vzorek promíchal a byl zahříván po dobu 10 min. na vodní lázni. Po vyjmutí z lázně byla zkumavka se vzorkem opět chlazená.

Do čisté zkumavky bylo napipetováno 4,5 ml roztoku koncentrované kys. sírové, ke kterému bylo přidáno 0,5 ml vzorku (10× ředění). Poté byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě asi 10 min. Následně byla změřena absorbance při 630 nm proti destilované vodě.

#### *Výpočet obsahu rozpustných sacharidů*

Celkem byly u každého odběru měřeny 3 vzorky ( $n = 3$ ). Obsah nestrukturních sacharidů byl vypočten z kalibrační křivky.



Obr. 3.3 Kalibrační křivka glukosy ( $R^2=0,993$ )

Rovnice lineární regrese:

$$y = 6,4286x + 0,0206$$

$$x = \frac{y - 0,0206}{6,4286}$$

kde  $x$  představuje koncentraci nestrukturních sacharidů [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ] a  $y$  značí absorbcii jednotlivých vzorků při  $\lambda = 630 \text{ nm}$

Tabulka 5: Měření množství nestrukturních sacharidů ve vzorku EN<sup>-</sup> S 120

měření č.	A	m [g]
1	0,290	0,123
2	0,302	0,123
3	0,308	0,123
průměr	0,300	

Výpočet koncentrace nestrukturních sacharidů v 10x zředěném roztoku:

$$c_{zř.} = \frac{A - 0,0206}{6,4286} = \frac{0,3 - 0,0206}{6,4286} = 0,0435 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Výpočet koncentrace v neředěném vzorku:

$$c = c_{zř.} \cdot 10 = 0,435 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Výpočet hmotnosti nestrukturních sacharidů v 15 ml extraktu:

$$m_{NS} = 0,435 \times 15 = \underline{\underline{6,525 \text{ mg}}}$$

Výpočet koncentrace nestrukturních sacharidů vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti:

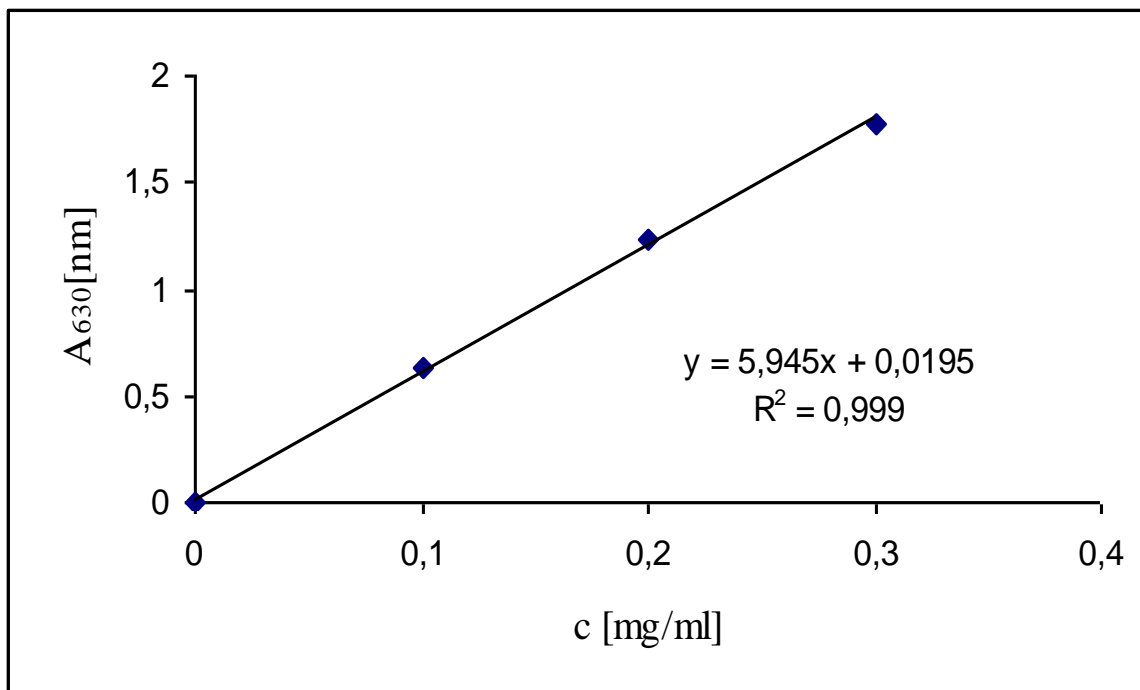
$$c = \frac{m_{\text{NS}}}{m} = \frac{6,525}{0,123} = \underline{\underline{53,049 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}}}$$

#### Extrakce škrobu

K sedimentu po stanovení sacharidů byl napipetován 1 ml 1M chloralhydrátu. Roztok byl promíchán na vortexu a směs byla zahřívána 15 minut na vroucí vodní lázni. Poté byly vzorky 5 min. centrifugovány při (2500 ot./min). Vzorek byl 10× zředěn ze směsi byl odebrán 1 ml a za stálého chlazení ledem byl přidán k 5 ml roztoku antronu. Směs byla promíchána a zahřívána na vroucí vodní lázni dalších 10 minut.

#### Měření obsahu škrobu

Po vyndání z vodní lázně byly vzorky ponechány 10 minut při pokojové teplotě a následně byla změřena absorbance při 630 nm. Při měření se postupovalo stejně jako při měření sacharidů. Někdy bylo potřeba dodatečné ředění (1:1) roztokem kys. sírové.



Obr. 3.4 Kalibrační křivka škrobu ( $R^2=0,999$ )

Rovnice lineární regrese:

$$y = 5,945x + 0,0195$$

$$x = \frac{y - 0,0195}{5,945}$$

kde  $x$  představuje koncentraci škrobu [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ] a  $y$  značí absorbanci jednotlivých vzorků při  $\lambda = 630 \text{ nm}$

Tabulka 6 : Měření množství nestruturních sacharidů ve vzorku EN +V 60

měření č.	A	m [g]
1	1,665	0,117
2	1,668	0,117
3	1,675	0,117
průměr	1,669	

Výpočet koncentrace škrobu v 10× zředěném roztoku:

$$c_{zř.} = \frac{A - 0,0195}{5,945} = \frac{1,669 - 0,0195}{5,945} = 0,2775 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Výpočet koncentrace v neředěném vzorku:

$$c = c_{zř.} \cdot 10 = 2,775 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Výpočet koncentrace škrobu vztažená na 1 g čerstvé hmotnosti:

$$c = \frac{m_{NS}}{m} = \frac{2,775}{0,117} = \underline{\underline{23,715 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}}}$$

### 3.5. Stanovení nestruturních sacharidů pomocí HPLC

Stanovení sacharidů pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) bylo prováděno dle Cabálkové et al. [57].

Vzorek listu byl v misce rozdrcen spolu s kapalným dusíkem a špetkou mořského písku. Rozdrcený prášek byl kvantitativně převeden do mikrozkuhavky Eppendorf (2 ml) spolu se směsí 1 ml methanol:chloroform:voda (12:5:3), poté byla směs zahřívána na 45 °C po dobu 10 minut. Směs byla vortexována a vložena do ultrazvukové lázně (1 min.) a následně centrifugována (6000 ot./min) po dobu 10 minut. K odebranému 1 ml supernatantu bylo přidáno 0,5 ml deionizované vody a směs byla opět sonifikována a centrifugována, poté byl roztok přefiltrován přes stříkačkový filtr (PVDF, 0,22 µm). Směs byla zahuštěna na vakuové odparce (30 °C, odpaření methanolu a chloroformu) na dobu 2–3 hod. a lyofilizována přes noc. Lyofilizát byl před analýzou rozpuštěn v 0,5 ml směsi acetonitril/voda (1:1) a získaný roztok byl po centrifugaci přenesen do vialky.

#### 3.5.1. Přístroje

HPLC HEWLETT PACKARD série 1 100 s refraktometrickým (RI) detektorem, kolona prevail Carbohydrate ES 5v 250 × 4,6 mm (max. tlak 153 bar, min. 0 bar)

#### 3.5.2. Chemikálie

voda pro HPLC

acetonitril pro HPLC

standarty:

sacharosa, SIGMA  
fruktosa, SIGMA  
glukosa, SIGMA  
arabinoza D(-), 99% SIGMA  
ribosa D (-), SIGMA  
galaktosa D (+), 99% SIGMA, obsahuje < 0,01% glukosy  
manosa D (+), mix. Anomer, SIGMA

### 3.5.3. Příprava roztoků

#### *Mobilní fáze*

75 % acetonitril byl připraven z 750 ml acetonitrilu a 250 ml demi vody, po ohřátí při laboratorní teplotě byl roztok vložen na 20 min. do ultrazvuku - odplynění

#### *Standardy*

Koncentrace standardů fruktosy, glukosy a sacharosy byla 5 mg/ml. Od každého standardu bylo naváženo 5 mg a rozpuštěno v 1 ml HPLC vody

#### *Podmínky metody*

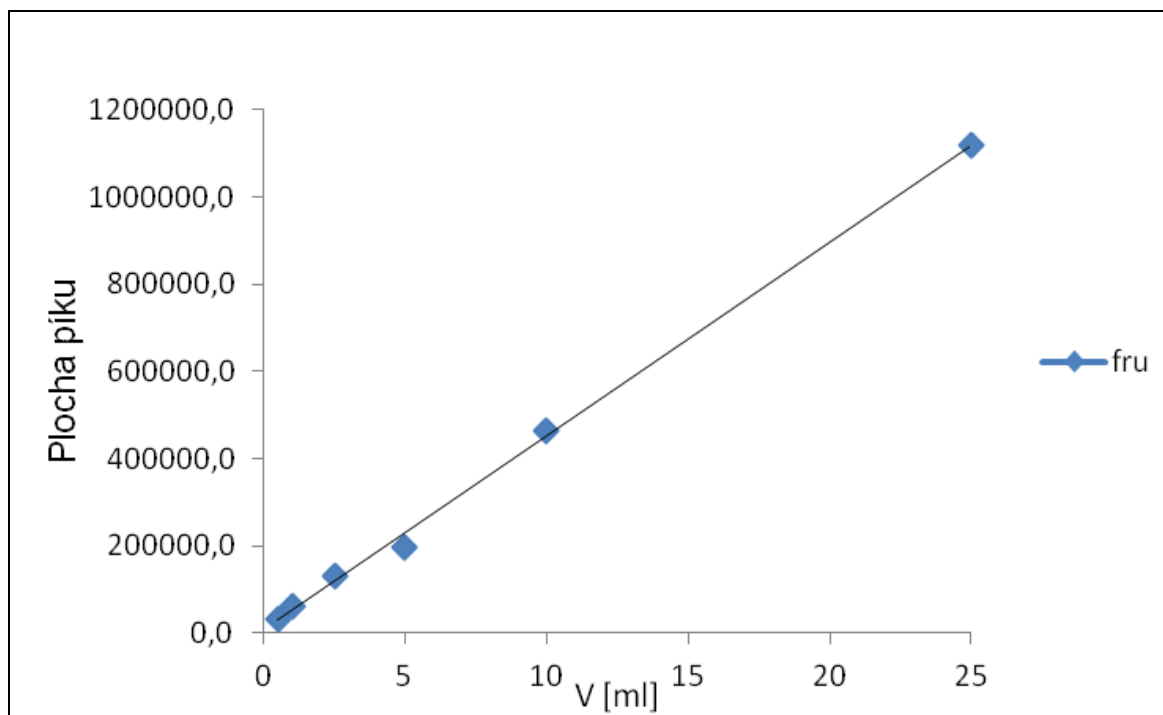
poměr acetonitril/voda 3:2, průtok 1ml/min.

#### *Nástříky standardů*

fruktosa - 0,5; 0,1; 2,5; 5,0; 10; 25  $\mu$ l

glukosa - 0,5; 0,1; 2,5; 5,0; 10; 25  $\mu$ l

sacharosa - 2,5; 5,0; 10; 25; 50;100  $\mu$ l



Obr. 3.5 Kalibrační křivka fruktosy

Rovnice lineární regrese:

$$y = 8972,5 x$$

Výpočet množství fruktosy v 10× zředěném vzorku:

plocha píku pro fruktosu: 150 460

$$y = \frac{y}{8972,5} = \frac{150460}{8972,5} = 16,77 \mu\text{g}$$

Výpočet množství fruktosy v neředěném vzorku:

$$m = 16,77 \times 10 = 167,7 \mu\text{g} = \underline{\underline{0,1677 \text{ mg}}}$$

Výpočet hmotnosti fruktosy vztažený na 1 g čerstvé hmotnosti:

$$\frac{0,1677}{0,069} = \underline{\underline{2,43 \text{ mg Fru/g FW}}}$$

Totožné jsou výpočty pro glukosu a sacharosu z následujících lineárních regresí:

Rovnice lineární regrese pro glukosu:

$$y = 7836,6 x$$

Rovnice lineární regrese pro sacharosu:

$$y = 9384,4 x$$

### **3.6. Statistické zpracování výsledků**

V experimentu bylo pracováno vždy se třemi vzorky listů od každé varianty ( $n = 3$ ). Výsledky byly zpracovávány v programu Microsoft Excel, kde byly vyhodnoceny aritmetické průměry, směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco

Tabulka 7: Průměrné hodnoty počátečních aktivit pro vzorky kultivované v běžné koncentraci CO<sub>2</sub>, jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), n = 3.

A počáteční						
VZORKY	aktivita ( $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ )	SD	IS	aktivita ( $\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}$ )	SD	IS
AN -V 0	1,086	0,000	0,000	0,013	0,011	0,010
AN+V 0	0,917	0,741	0,726	0,004	0,003	0,003
AN-S 30	0,789	0,078	0,076	0,008	0,001	0,001
AN+S 30	0,687	0,148	0,145	0,007	0,001	0,001
AN-S 60	0,709	0,711	0,805	0,002	0,000	0,000
AN+S 60	0,706	0,354	0,401	0,007	0,003	0,003
AN-V 60	0,824	0,208	0,203	0,006	0,002	0,002
AN+V 60	1,577	1,767	1,732	0,008	0,002	0,002
AN-S 120	0,825	0,205	0,201	0,009	0,002	0,002
AN+S 120	0,908	0,688	0,674	0,006	0,001	0,001
AN-V 120	1,149	0,217	0,213	0,011	0,002	0,002
AN+V 120	0,630	0,227	0,223	0,007	0,003	0,003
AN-S 180	0,760	0,282	0,276	0,007	0,003	0,003
AN+S 180	0,693	0,192	0,217	0,007	0,002	0,002
AN-V 180	0,645	0,183	0,180	0,006	0,002	0,002
AN+V 180	0,537	0,188	0,184	0,006	0,002	0,002



Tabulka 8: Průměrné hodnoty celkových aktivit pro vzorky kultivované v běžné koncentraci CO<sub>2</sub>, jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), n = 3.

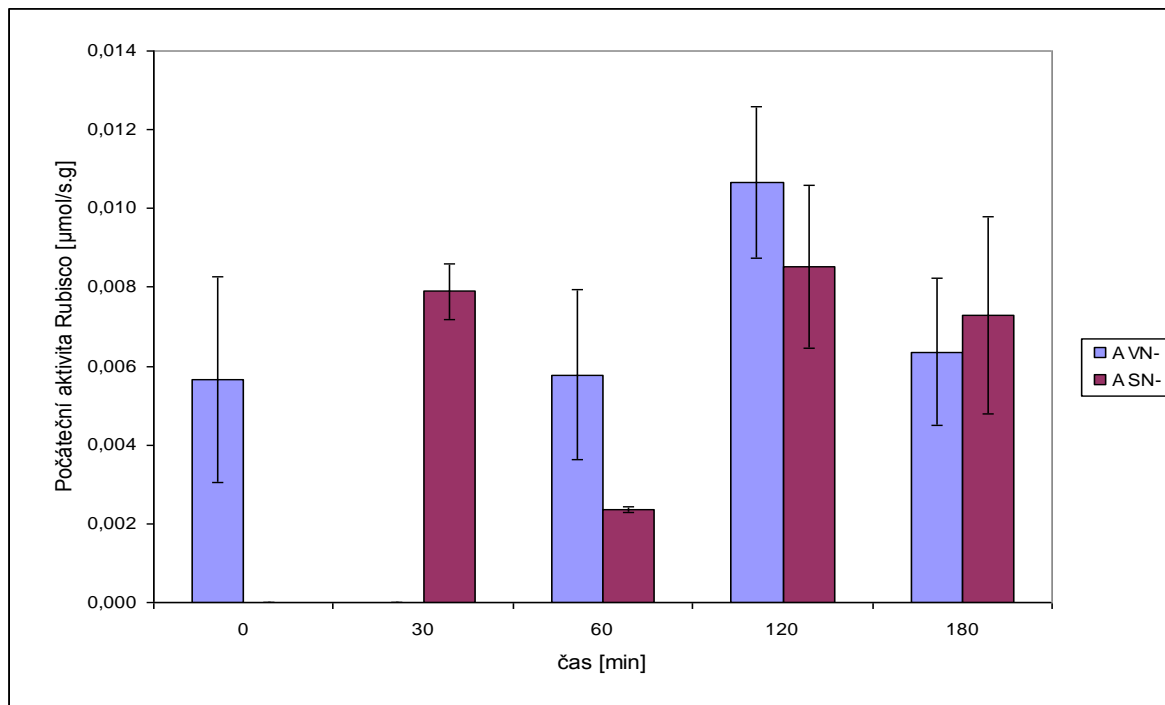
<b>A celková</b>						
<b>VZORKY</b>	<b>aktivita (<math>\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2</math>)</b>	<b>SD</b>	<b>IS</b>	<b>aktivita (<math>\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}</math>)</b>	<b>SD</b>	<b>IS</b>
AN -V 0	1,248	1,062	1,041	0,012	0,010	0,010
AN+V 0	0,751	0,410	0,402	0,004	0,003	0,003
AN-S 30	0,476	0,104	0,102	0,005	0,001	0,001
AN+S 30	0,775	0,029	0,028	0,007	0,001	0,001
AN-S 60	0,800	0,505	0,572	0,007	0,003	0,004
AN+S 60	0,722	0,497	0,563	0,007	0,003	0,004
AN-V 60	0,600	0,139	0,136	0,006	0,001	0,001
AN+V 60	0,733	0,202	0,198	0,008	0,002	0,002
AN-S 120	0,846	0,155	0,152	0,008	0,002	0,001
AN+S 120	0,928	0,639	0,626	0,011	0,008	0,008
AN-V 120	1,033	0,493	0,483	0,009	0,004	0,004
AN+V 120	0,809	0,646	0,633	0,009	0,008	0,007
AN-S 180	0,711	0,359	0,352	0,006	0,003	0,003
AN+S 180	0,753	0,358	0,405	0,040	0,048	0,054
AN-V 180	0,883	0,252	0,247	0,008	0,002	0,002
AN+V 180	0,810	0,356	0,349	0,009	0,005	0,005

Tabulka 9: Průměrné hodnoty počátečních aktivit pro vzorky kultivované v atmosféře se zvýšenou CO<sub>2</sub>, jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), n = 3.

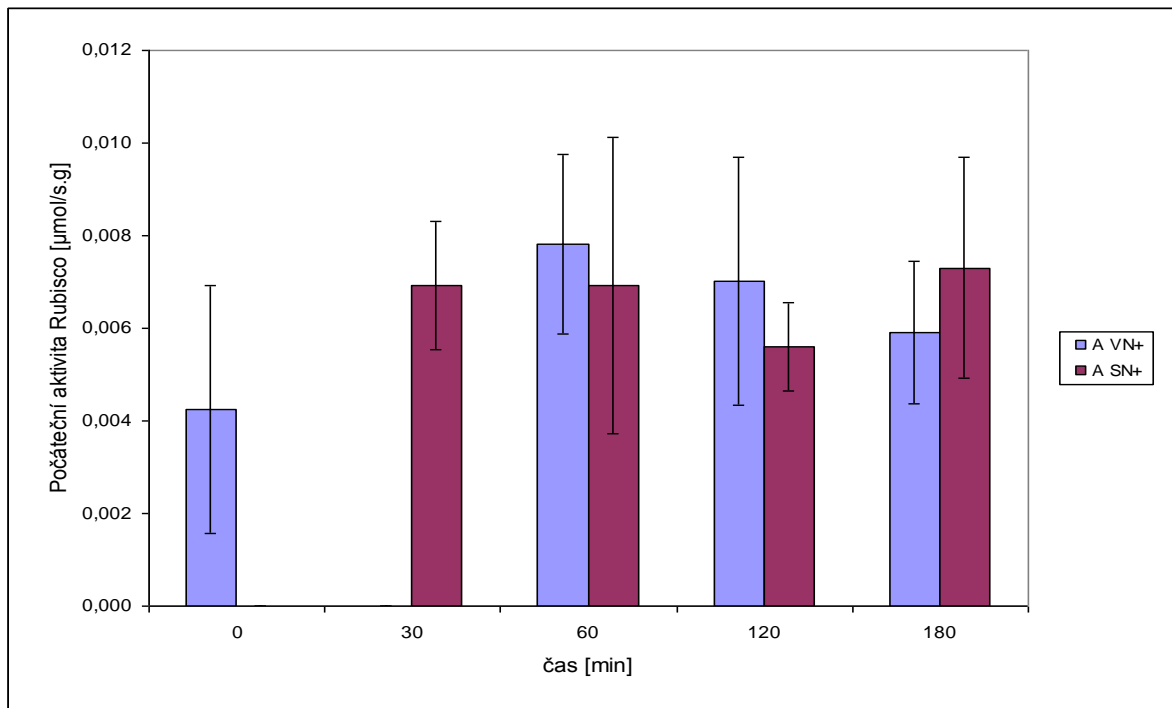
<b>E počáteční</b>						
<b>VZORKY</b>	<b>aktivita (<math>\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2</math>)</b>	<b>SD</b>	<b>IS</b>	<b>aktivita (<math>\mu\text{mol/s}\cdot\text{g}</math>)</b>	<b>SD</b>	<b>IS</b>
EN -V 0	0,793	0,238	0,233	0,007	0,003	0,003
EN+V 0	0,670	0,310	0,303	0,007	0,004	0,004
EN-S 30	1,990	2,221	2,176	0,007	0,003	0,003
EN+S 30	0,416	0,125	0,123	0,004	0,001	0,001
EN-S 60	0,779	0,475	0,466	0,012	0,005	0,005
EN+S 60	0,766	0,222	0,217	0,008	0,003	0,002
EN-V 60	0,748	0,363	0,356	0,012	0,009	0,008
EN+V 60	0,613	0,412	0,404	0,005	0,004	0,004
EN-S 120	0,716	0,340	0,333	0,008	0,001	0,001
EN+S 120	0,671	0,250	0,245	0,007	0,003	0,003
EN-V 120	1,330	1,064	1,043	0,007	0,003	0,003
EN+V 120	1,324	1,339	1,312	0,257	0,436	0,427
EN-S 180	0,792	0,129	0,127	0,008	0,001	0,001
EN+S 180	0,811	0,313	0,306	0,007	0,003	0,003
EN-V 180	2,069	2,329	2,283	0,007	0,003	0,003
EN+V 180	0,782	0,487	0,477	0,257	0,436	0,427

Tabulka 10: Průměrné hodnoty celkových aktivit pro vzorky kultivované v atmosféře se zvýšenou CO<sub>2</sub>, jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), n = 3.

E celková						
VZORKY	aktivita (μmol/s·m <sup>2</sup> )	SD	IS	aktivita (μmol/s·g)	SD	IS
EN -V 0	0,703	0,263	0,258	0,006	0,002	0,002
EN+V 0	0,701	0,343	0,337	0,007	0,004	0,003
EN-S 30	3,676	4,724	4,629	0,039	0,051	0,050
EN+S 30	0,894	0,325	0,319	0,009	0,002	0,002
EN-S 60	0,765	0,578	0,566	0,010	0,005	0,005
EN+S 60	0,912	0,422	0,413	0,009	0,005	0,004
EN-V 60	0,974	0,435	0,426	0,010	0,005	0,005
EN+V 60	0,802	0,504	0,494	0,006	0,005	0,005
EN-S 120	1,079	0,327	0,320	0,011	0,004	0,004
EN+S 120	0,740	0,228	0,223	0,006	0,002	0,002
EN-V 120	0,863	0,271	0,265	0,009	0,003	0,003
EN+V 120	0,764	0,567	0,555	0,008	0,003	0,003
EN-S 180	0,844	0,154	0,151	0,009	0,002	0,002
EN+S 180	0,917	0,316	0,310	0,008	0,003	0,003
EN-V 180	1,061	0,174	0,171	0,010	0,001	0,001
EN+V 180	0,988	0,620	0,608	0,009	0,006	0,006

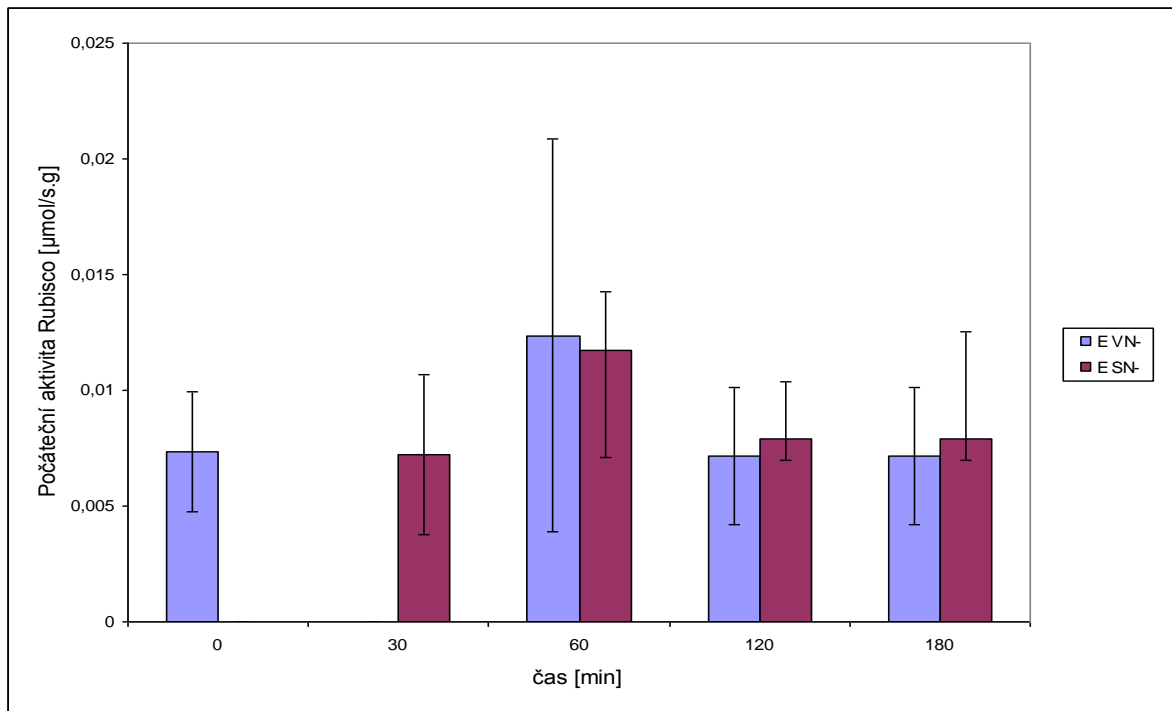


Obr. 4.1 Počáteční aktivita Rubisco ve vzorcích nehnojených dusíkem (N) kultivovaných ve vodě (V) a sacharose (S) v běžné koncentraci CO<sub>2</sub> (A), n = 3. Chybové úsečky znázorňují interval spolehlivosti.

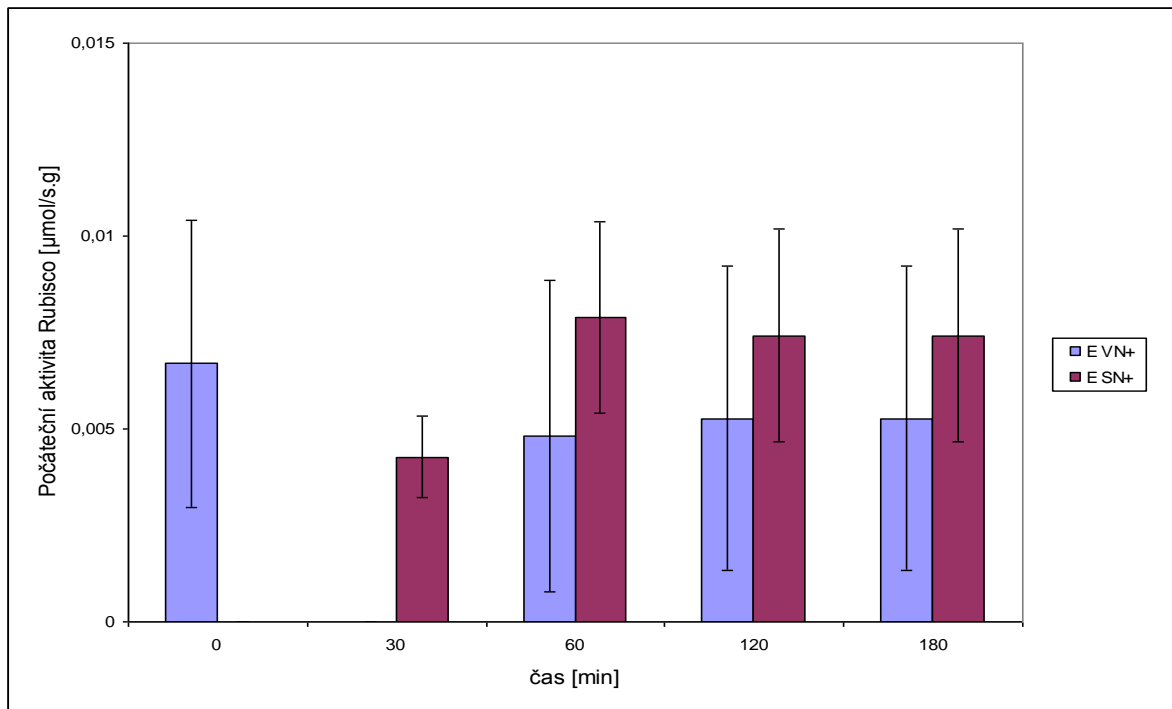


Obr. 4.2 Počáteční aktivita Rubisco ve vzorcích hnojených dusíkem ( $N^+$ ) kultivovaných ve vodě (V) a sacharose (S) v běžné koncentraci  $CO_2$  (A),  $n = 3$ . Chybové úsečky znázorňují interval spolehlivosti.

Z obr. 4.1 a 4.2 je zřejmé, že nebyl statisticky významný rozdíl v počátečních aktivitách Rubisco mezi vzorky kultivovanými ve vodě (V) a v sacharose (S) v běžné koncentraci  $CO_2$  (A). Statistický rozdíl byl zjištěn pouze v nehnojené variantě ( $N^-$ ) v 60. minutě. Taktéž nebyl pozorován průkazný rozdíl v počátečních aktivitách mezi variantami  $N^+$  a  $N^-$ .



*Obr. 4.3 Počáteční aktivita Rubisco ve vzorcích nehnojených dusíkem (N) kultivovaných ve vodě (V) a sacharose (S) ve zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (E), n = 3. Chybové úsečky znázorňují interval spolehlivosti.*



Obr. 4.4 Počáteční aktivita Rubisco ve vzorcích hnojených dusíkem ( $N^+$ ) kultivovaných ve vodě (V) a sacharose (S) ve zvýšené koncentraci  $CO_2$  (E),  $n = 3$ . Chybové úsečky znázorňují interval spolehlivosti.

V podmínkách zvýšené koncentrace  $CO_2$  nebyl pozorován průkazný rozdíl v aktivitě Rubisco mezi variantami  $N^+$  a  $N^-$  ani mezi variantami S a V. Aktivita Rubisco je však více stimulována u varianty hnojené dusíkem (obr. 4.3 a 4.4). Rovněž nebyl prokázán významný rozdíl v aktivitě Rubisco mezi listy kultivovanými v běžné a zvýšené koncentraci  $CO_2$ .

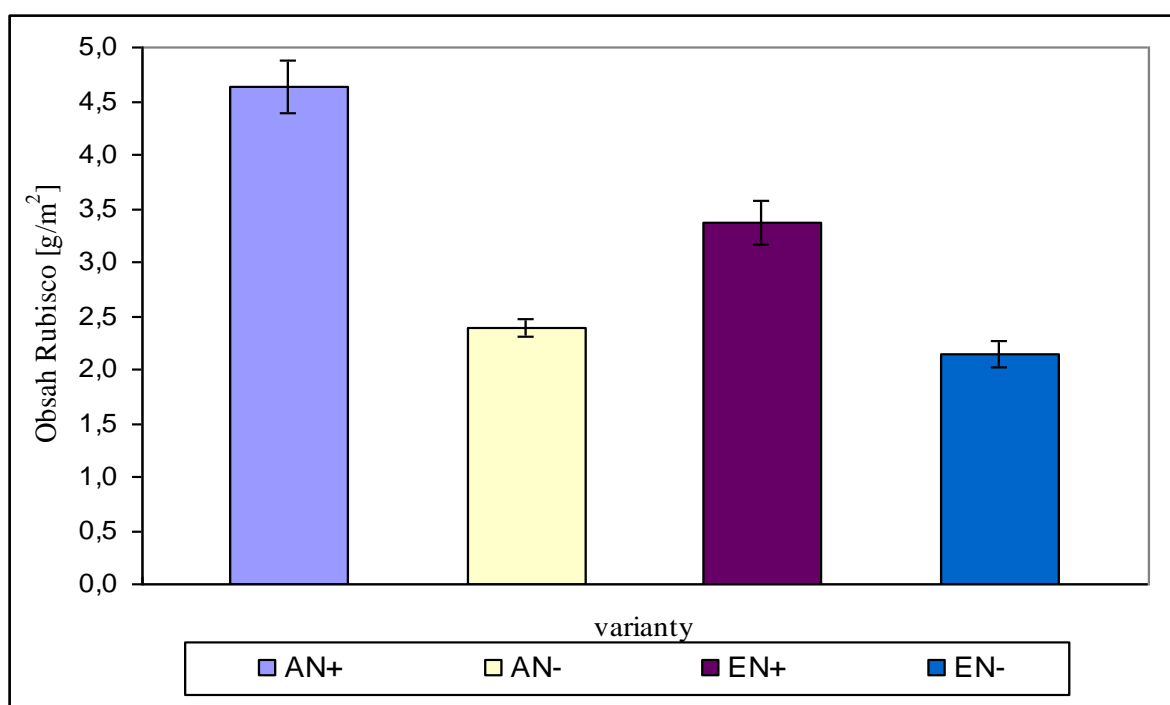
#### 4.2. Stanovení obsahu enzymu Rubisco

Tabulka 11: Průměrné hodnoty obsahu enzymu Rubisco pro vzorky kultivované v běžné koncentraci  $CO_2$  (A), jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS).  $N^-$  – vzorky nehnojené dusíkem,  $N^+$  – vzorky hnojené dusíkem,  $n = 3$ .

vzorek A	obsah Rubisco (g/m <sup>2</sup> ) pro $N^-$	SD	IS	obsah Rubisco (g/m <sup>2</sup> ) pro $N^+$	SD	IS
1	2,97	0,03	0,04	7,79	0,17	0,19
2	2,02	0,07	0,08	3,24	0,21	0,24
3	2,34	0,11	0,12	3,03	0,20	0,23
4	2,23	0,10	0,12	4,47	0,28	0,32
průměr	2,39	0,08	0,09	4,63	0,22	0,24

Tabulka 12: Průměrné hodnoty obsahu enzymu Rubisco pro vzorky kultivované ve zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (E), jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS). N<sup>-</sup> – vzorky nehnojené dusíkem, N<sup>+</sup> – vzorky hnojené dusíkem, n = 3.

vzorek E	obsah Rubisco (g/m <sup>2</sup> ) pro N <sup>-</sup>	SD	IS	obsah Rubisco (g/m <sup>2</sup> ) pro N <sup>+</sup>	SD	IS
1	2,59	0,15	0,17	3,60	0,31	0,35
2	1,48	0,02	0,02	2,99	0,08	0,09
3	2,24	0,13	0,18	3,99	0,14	0,15
4	2,28	0,13	0,15	2,88	0,19	0,21
průměr	2,15	0,11	0,13	3,37	0,18	0,20



Obr. 4.5 Obsah Rubisco ve vzorcích hnojených dusíkem (N<sup>+</sup>) a nehnojených dusíkem (N<sup>-</sup>) kultivovaných v běžné (A) a ve zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (E), n = 3. Chybové úsečky znázorňují interval spolehlivosti.

Z obr. 4.5 je vidět, že obsah Rubisco je významně nižší při kultivaci vzorků ve zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (E) než v běžné koncentraci CO<sub>2</sub> (A), taktéž je nižší obsah Rubisco při nehnojení dusíkem (N<sup>-</sup>) než při hnojení dusíkem (N<sup>+</sup>).

### 4.3. Stanovení nestrukturních sacharidů antronovou metodou

Tabulka 13: Průměrné hodnoty obsahu nestrukturních sacharidů ve vzorcích kultivovaných v běžné atmosféře (A), jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), (n = 3).

VZOREK	cukr [mg/g]	SD	IS	cukr [mg/cm <sup>2</sup> ]	SD	IS
AN-V 0	58,41	15,88	17,97	0,63	0,18	0,20
AN+V 0	53,46	7,56	8,56	0,56	0,06	0,06
AN-V 60	63,26	30,22	34,19	0,62	0,29	0,33
AN+V 60	49,26	12,35	13,97	0,47	0,13	0,14
AN-S 60	85,52	19,92	22,54	0,85	0,20	0,23
AN+S 60	75,68	23,44	26,52	0,79	0,23	0,26
AN-V 120	69,10	13,98	15,82	0,73	0,15	0,17
AN+V 120	53,73	4,85	5,49	0,56	0,05	0,06
AN-S 120	87,76	21,98	24,87	0,92	0,28	0,31
AN+S 120	92,63	22,70	25,69	0,84	0,29	0,33
AN-V 180	57,91	16,14	18,26	0,57	0,14	0,16
AN+V 180	53,29	11,97	13,54	0,49	0,06	0,07
AN-S 180	97,87	19,42	21,97	1,01	0,19	0,22
AN+S 180	106,33	25,66	29,03	1,04	0,35	0,40

Tabulka 13: pokračování

VZOREK	škrob [mg/g]	SD	IS	škrob [mg/cm <sup>2</sup> ]	SD	IS
AN-V 0	18,81	5,99	6,78	0,20	0,07	0,07
AN+V 0	9,51	1,70	1,92	0,10	0,02	0,02
AN-V 60	36,13	11,04	12,49	0,36	0,10	0,12
AN+V 60	15,24	4,02	4,55	0,15	0,05	0,06
AN-S 60	27,41	10,93	12,37	0,27	0,10	0,11
AN+S 60	8,37	2,35	2,66	0,09	0,03	0,03
AN-V 120	29,08	7,49	8,48	0,31	0,08	0,09
AN+V 120	10,92	2,04	2,31	0,11	0,02	0,03
AN-S 120	31,39	10,33	11,69	0,33	0,12	0,13
AN+S 120	10,43	1,96	2,22	0,09	0,01	0,01
AN-V 180	34,62	11,89	13,46	0,34	0,11	0,13
AN+V 180	12,16	1,82	2,06	0,11	0,01	0,02
AN-S 180	23,17	5,77	6,53	0,24	0,05	0,06
AN+S 180	9,62	3,45	3,90	0,09	0,03	0,03

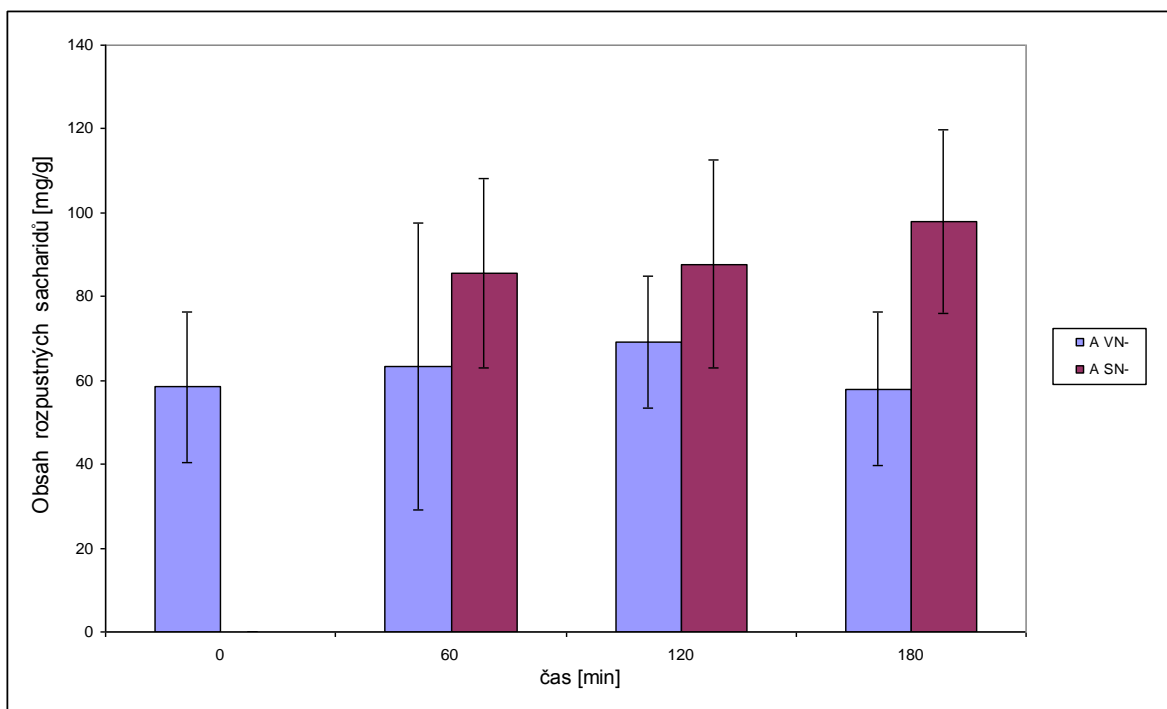
Tabulka 14: Průměrné hodnoty obsahu nestruturních sacharidů ve vzorcích kultivovaných ve zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (E), jejich směrodatné odchylky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), (n = 3).

VZOREK	cukr [mg/g]	SD	IS	cukr [mg/cm <sup>2</sup> ]	SD	IS
EN-V 0	60,95	21,18	23,97	0,62	0,21	0,24
EN+V 0	48,36	15,13	17,12	0,51	0,20	0,23
EN-V 60	71,76	27,83	31,49	0,74	0,26	0,29
EN+V 60	64,13	14,92	16,89	0,72	0,17	0,20
EN-S 60	82,43	15,31	17,33	0,80	0,12	0,14
EN+S 60	74,63	20,88	23,63	0,76	0,22	0,25
EN-V 120	63,35	17,36	19,64	0,62	0,12	0,13
EN+V 120	60,93	11,24	12,72	0,66	0,10	0,12
EN-S 120	90,43	26,68	30,19	0,90	0,22	0,25
EN+S 120	102,74	34,89	39,48	1,15	0,38	0,44
EN-V 180	73,10	18,69	21,15	0,61	0,16	0,18
EN+V 180	67,51	7,81	8,83	0,76	0,07	0,08
EN-S 180	95,84	18,70	21,16	0,98	0,14	0,16
EN+S 180	95,40	27,28	30,87	1,05	0,26	0,29

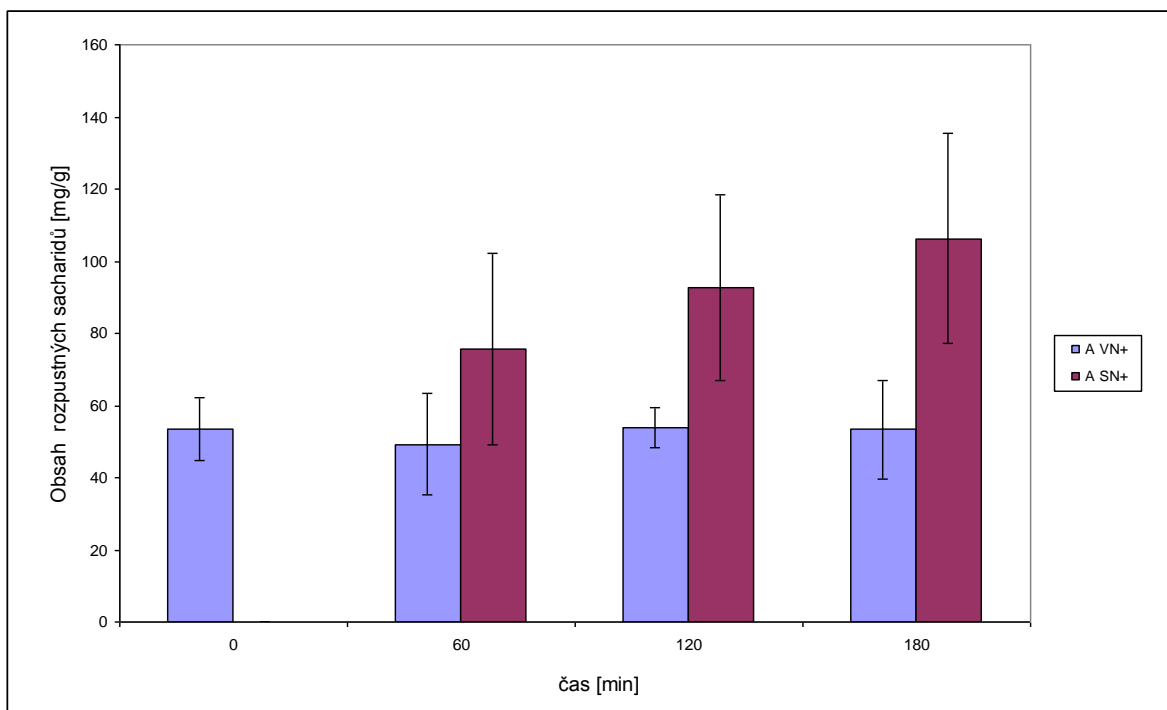
Tabulka 14: pokračování

VZOREK	škrob [mg/g]	SD	IS	škrob [mg/cm <sup>2</sup> ]	SD	IS
EN-V 0	43,38	4,98	5,64	0,44	0,03	0,04
EN+V 0	13,47	4,29	4,85	0,13	0,03	0,03
EN-V 60	37,87	4,34	4,91	0,39	0,04	0,05
EN+V 60	15,26	6,02	6,81	0,17	0,07	0,07
EN-S 60	42,71	14,17	16,03	0,41	0,11	0,13
EN+S 60	12,41	3,68	4,16	0,12	0,03	0,04
EN-V 120	37,12	5,07	5,74	0,38	0,08	0,09
EN+V 120	16,19	4,07	4,60	0,18	0,04	0,05
EN-S 120	48,80	12,37	14,00	0,49	0,10	0,11
EN+S 120	14,55	7,95	9,00	0,16	0,09	0,10
EN-V 180	48,23	9,58	10,84	0,48	0,07	0,08
EN+V 180	15,40	2,20	2,49	0,18	0,04	0,05
EN-S 180	37,22	8,84	10,00	0,38	0,09	0,10
EN+S 180	15,61	3,70	4,19	0,18	0,05	0,06



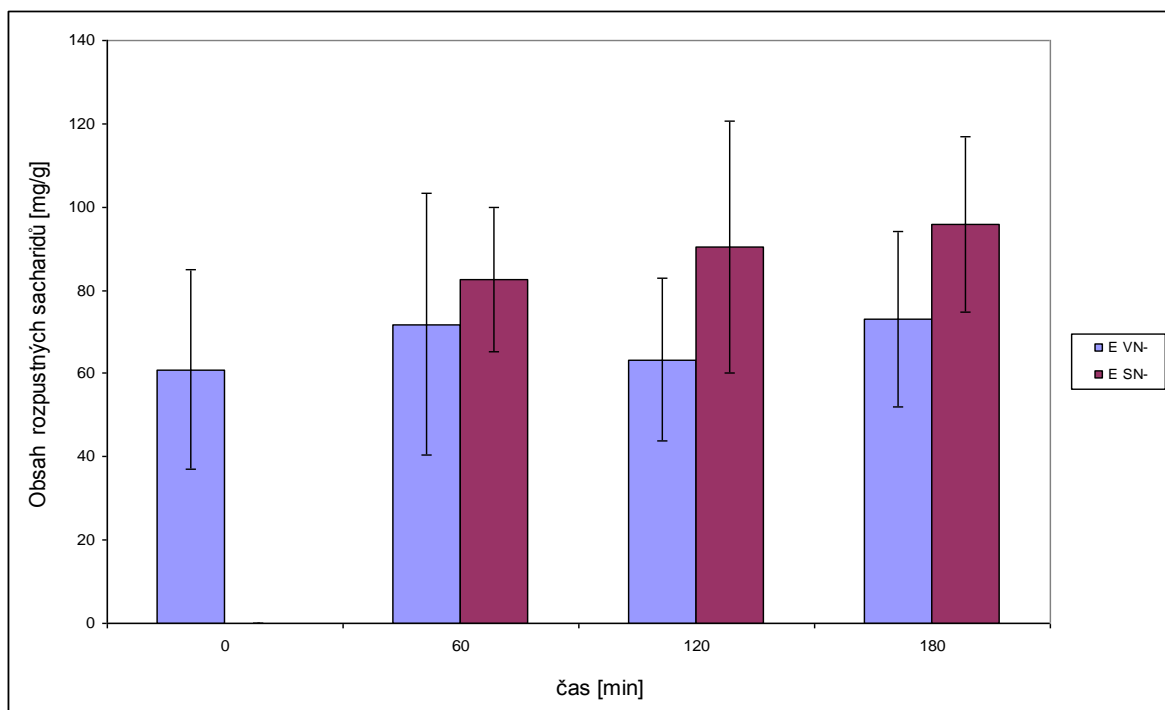


Obr. 4.6 Akumulace rozpustných sacharidů v listech v intervalu 0–180 minut po začátku fotosyntézy u vzorků kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) bez přídavku dusíku (N<sup>-</sup>) při běžné koncentraci CO<sub>2</sub> (A). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti, n = 3.

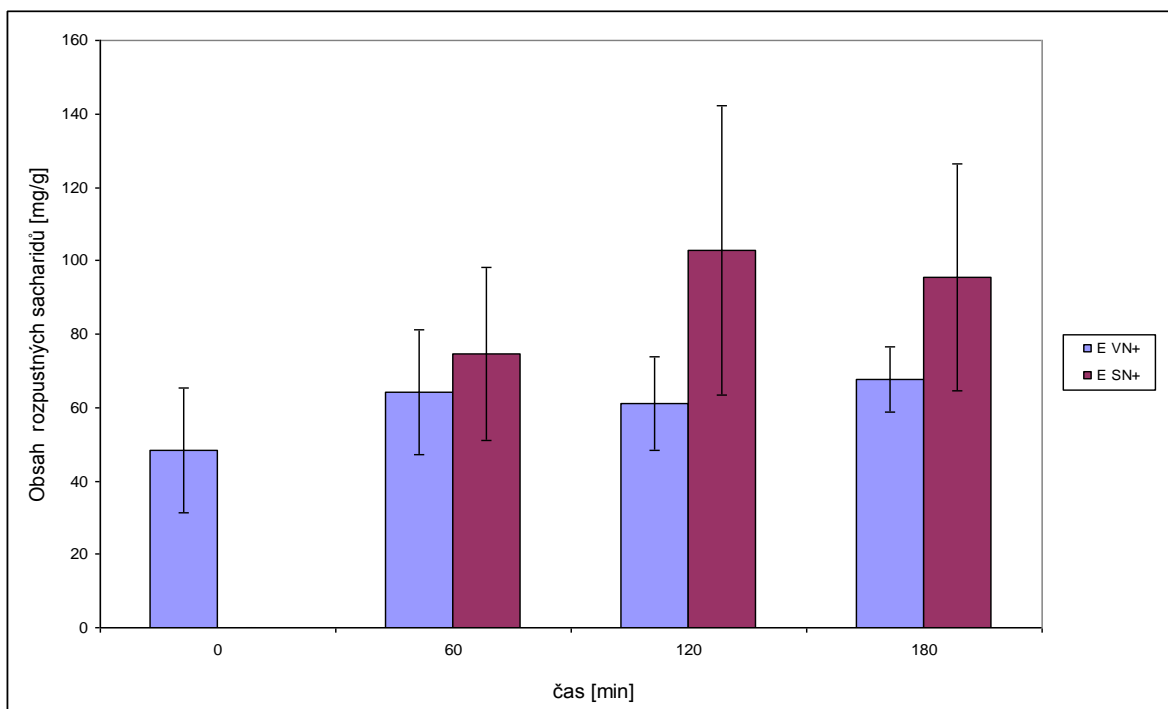


Obr. 4.7 Akumulace rozpustných sacharidů v listech v intervalu 0–180 minut po začátku fotosyntézy u vzorků kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) s přídavkem dusíku (N<sup>+</sup>) při běžné koncentraci CO<sub>2</sub> (A). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti, n = 3.

Z obr. 4.6 a 4.7 můžeme vidět, že nárůst obsahu rozpustných sacharidů s časem nastal u varianty A pouze u vzorků kultivovaných v sacharose, kdežto u vzorků kultivovaných ve vodě zůstal obsah rozpustných sacharidů od 60. do 180. minuty téměř stejný, jak u varianty s hnojením dusíkem ( $N^+$ ), tak i u varianty  $N^-$ . Statisticky významné rozdíly v obsahu rozpustných sacharidů lze mezi S a V pozorovat pouze u varianty hnojené dusíkem ( $N^+$ ) v časech 120 a 180 minut. Mezi variantami  $N^+$  a  $N^-$  nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu rozpustných sacharidů.

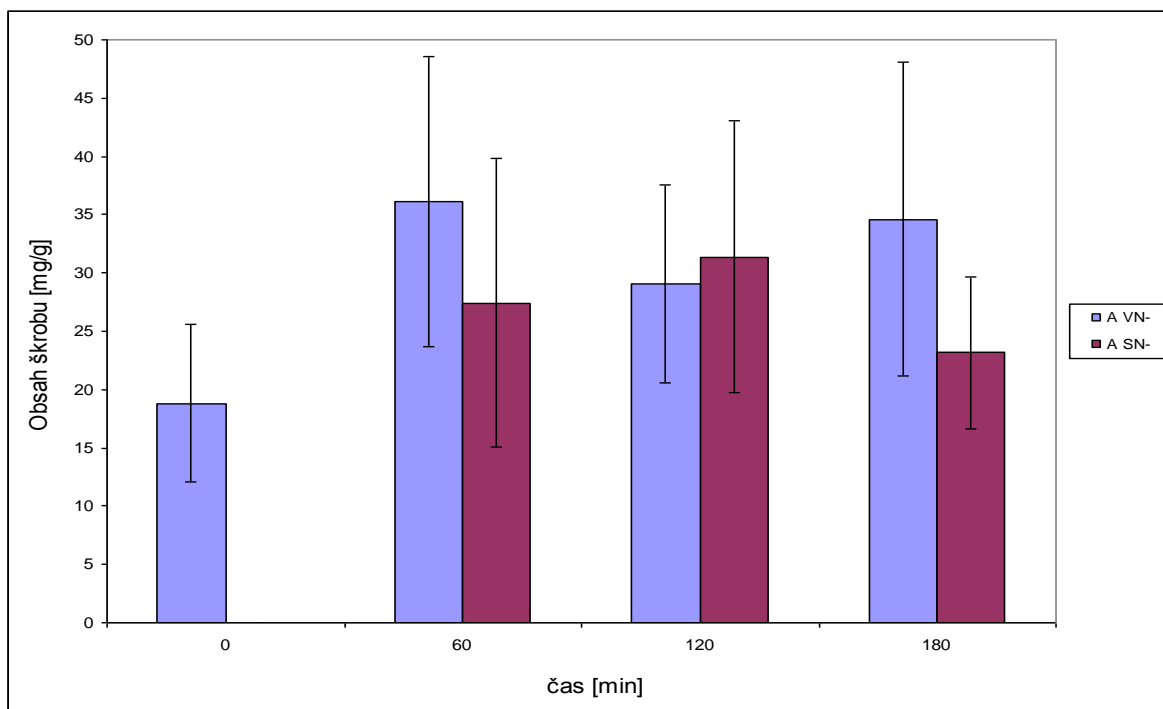


Obr. 4.8 Akumulace rozpustných sacharidů v listech v intervalu 0–180 minut po začátku fotosyntézy u vzorků kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) bez přídavku dusíku (N) při zvýšené koncentraci  $CO_2$  (E). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

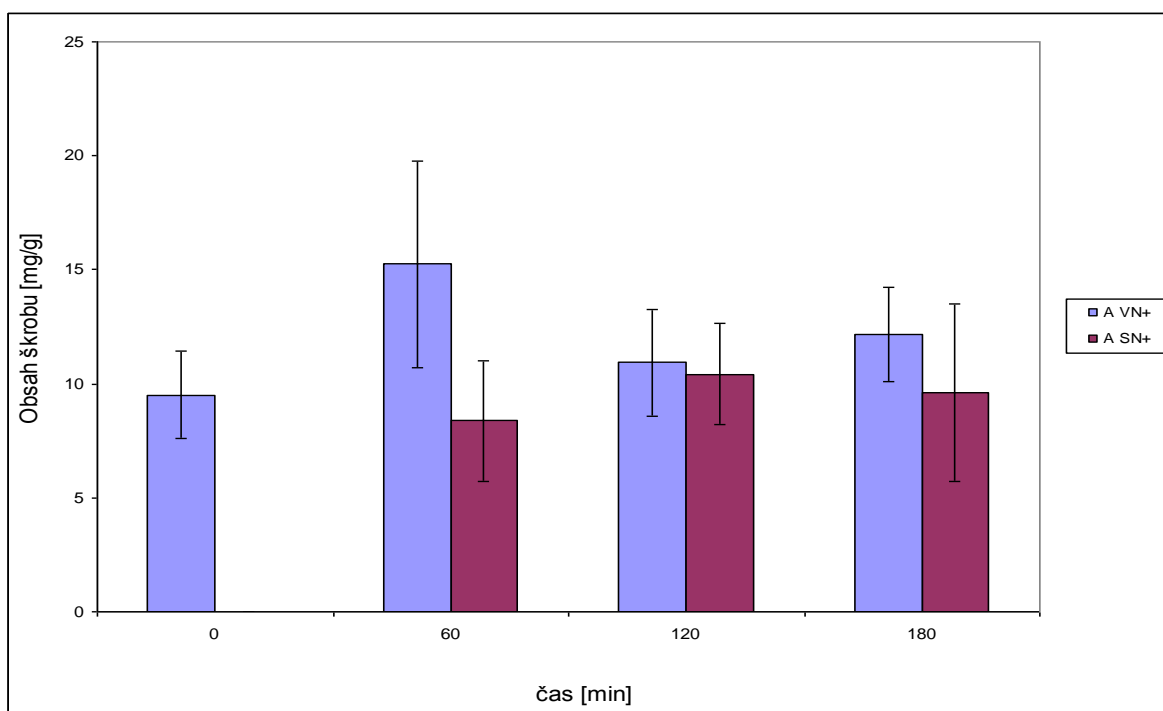


Obr. 4.9 Akumulace rozpustných sacharidů v listech v intervalu 0–180 minut po začátku fotosyntézy u vzorků kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) s přidavkem dusíku ( $N^+$ ) při zvýšené koncentraci  $CO_2$  (E). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

Z obr. 4.8 a 4.9 vyplývá, že v podmínkách zvýšené koncentrace  $CO_2$  je obsah rozpustných sacharidů v listech nevýznamně vyšší u vzorků kultivovaných v sacharose ve srovnání se vzorky kultivovanými ve vodě. Hnojení dusíkem nemá na akumulaci rozpustných sacharidů vliv. Rovněž nebyly zjištěny významné rozdíly v obsahu rozpustných sacharidů mezi listy kultivovanými v normální a zvýšené koncentraci  $CO_2$ .

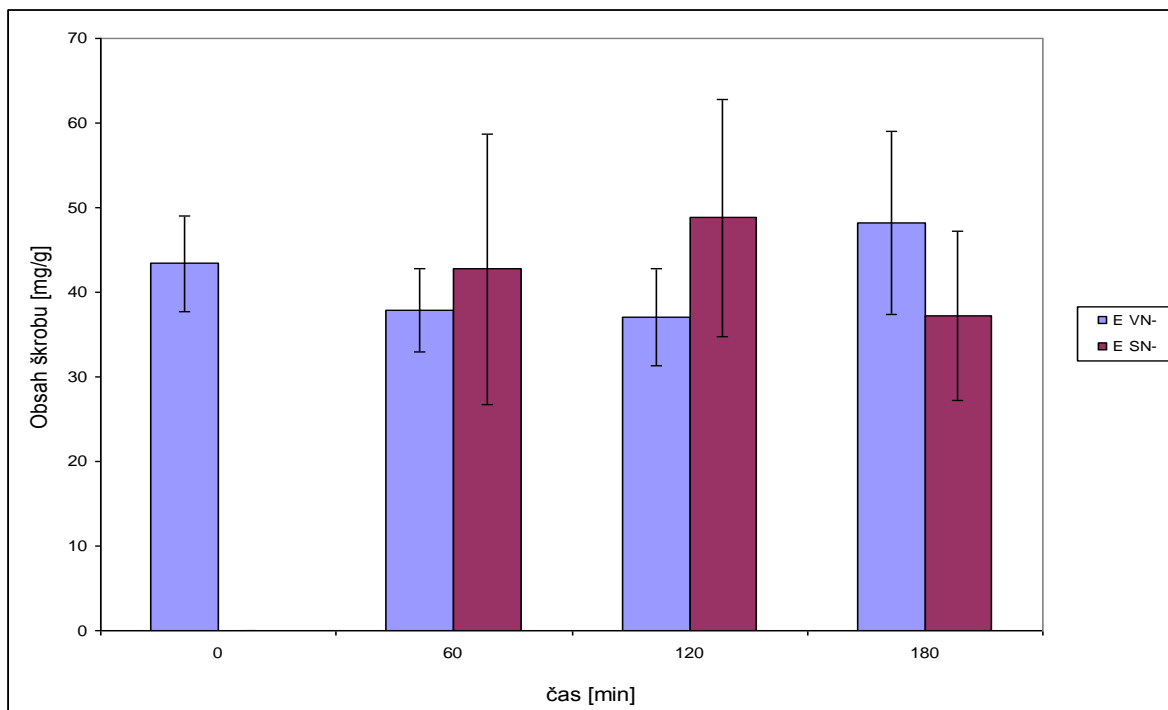


Obr. 4.10 Akumulace škrobu v listech 0–180 minut po začátku fotosyntézy ve vzorcích kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) bez přídavku dusíku (N) při běžné koncentraci  $CO_2$  (A). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

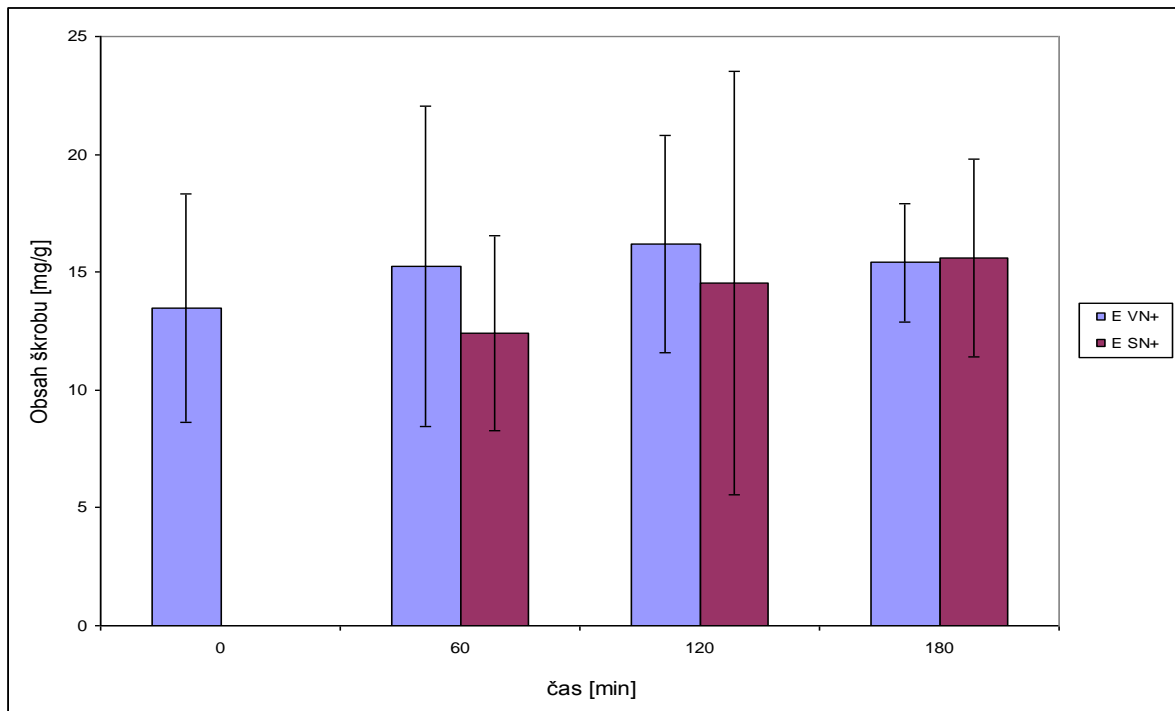


Obr. 4.11 Akumulace škrobu v listech 0–180 minut po začátku fotosyntézy ve vzorcích kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) s přídavkem dusíku (N) při běžné koncentraci  $CO_2$  (A). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

U listů kultivovaných při normální koncentraci CO<sub>2</sub> nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu škrobu mezi variantami V a S. Naproti tomu významný vliv na obsah škrobu mělo hnojení dusíkem, u varianty N<sup>+</sup> byl obsah škrobu v listech přibližně dvakrát nižší, než u listů nehnojených dusíkem (obr. 4.10 a 4.11).



Obr. 4.12 Akumulace škrobu v listech 0–180 minut po začátku fotosyntézy ve vzorcích kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) bez přídavku dusíku (N) při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (E). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .



Obr. 4.13 Akumulace škrobu v listech 0–180 minut po začátku fotosyntézy ve vzorcích kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) s přidavkem dusíku (N) při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  (E). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

U vzorků kultivovaných při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  nebyl zjištěn významný rozdíl v akumulaci škrobu mezi variantami V a S. Obsah škrobu však byl u varianty  $\text{N}^-$  přibližně dvakrát až třikrát vyšší než u varianty  $\text{N}^+$  (obr. 4.12 a 4.13). U varianty kultivované při zvýšené koncentraci  $\text{CO}_2$  byl obsah škrobu v listech nevýznamně vyšší než u varianty v běžné koncentraci  $\text{CO}_2$ .

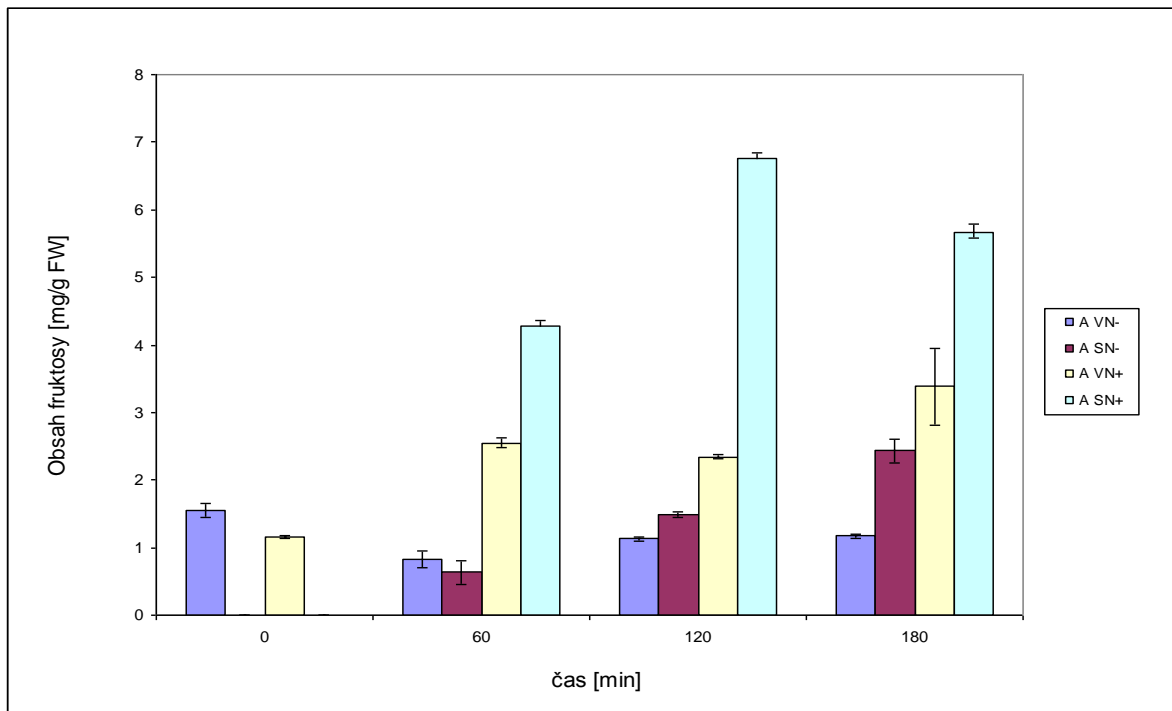
#### 4.4. Stanovení nestrukturních sacharidů pomocí HPLC

Tabulka 15: Akumulace fruktosy, glukosy a sacharosy v listech 0–180 minut od začátku fotosyntézy zjištěná metodou HPLC. A – běžná koncentrace CO<sub>2</sub>, N<sup>-</sup> - nehnojeno dusíkem, N<sup>+</sup> - hnojeno dusíkem, V- listy kultivované ve vodě, S – listy kultivované v sacharose, jejich směrodatné odchytky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), (n = 3).

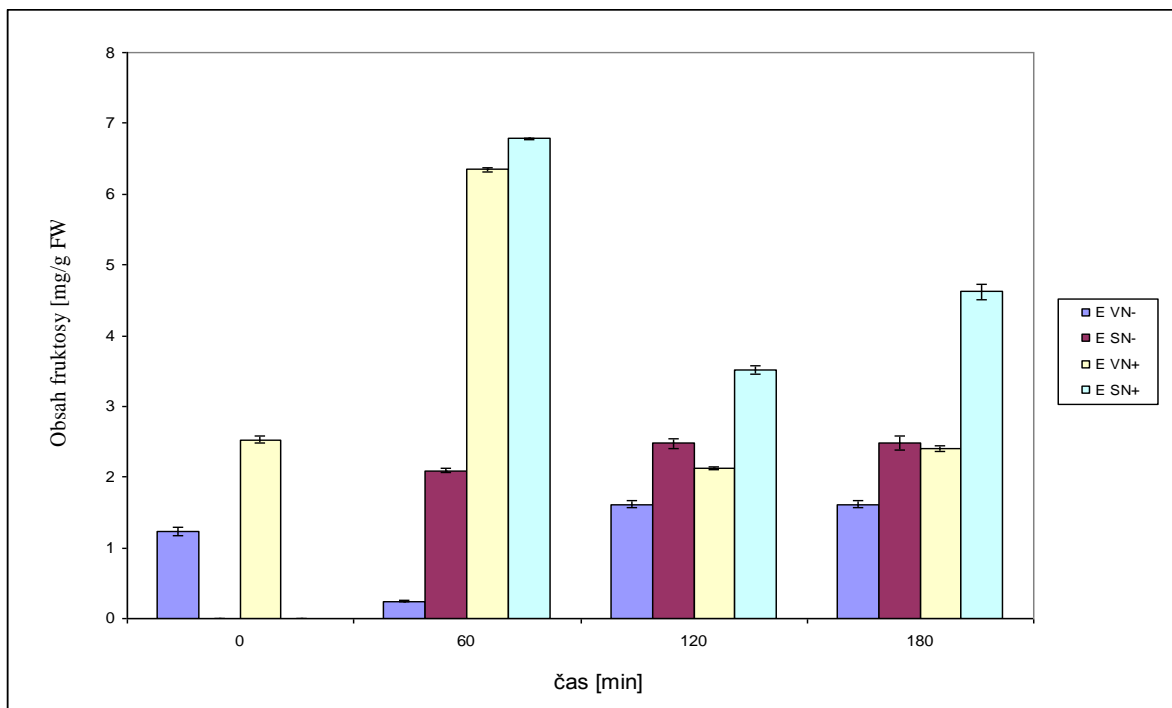
VZOREK	fruktosa [mg/g FW]	SD	IS	glukosa [mg/g FW]	SD	IS	sacharosa [mg/g FW]	SD	IS
AN+V 0	1,16	0,02	0,03	1,14	0,01	0,02	7,45	0,03	0,04
AN-V 0	1,55	0,09	0,10	1,92	0,04	0,04	9,96	0,02	0,02
AN+S 60	4,28	0,07	0,08	3,70	0,07	0,08	20,25	0,04	0,05
AN-S 60	0,64	0,16	0,18	0,64	0,15	0,16	15,48	1,65	2,29
AN+V 60	2,55	0,06	0,07	2,45	0,03	0,04	5,17	0,01	0,01
AN-V 60	0,82	0,09	0,13	0,75	0,15	0,17	8,43	0,12	0,13
AN+S 120	6,75	0,09	0,10	5,75	0,06	0,07	24,59	0,21	0,23
AN-S 120	1,48	0,04	0,04	1,23	0,03	0,04	24,27	0,04	0,05
AN+V 120	2,34	0,03	0,03	2,16	0,12	0,14	7,15	0,16	0,18
AN-V 120	1,13	0,03	0,04	1,21	0,02	0,02	11,40	0,05	0,05
AN+S 180	5,67	0,11	0,12	4,36	0,09	0,10	35,39	0,17	0,20
AN-S 180	2,43	0,15	0,17	2,51	0,24	0,27	33,64	0,40	0,45
AN+V 180	3,38	0,05	0,06	3,22	0,03	0,03	6,49	0,24	0,28
AN-V 180	1,17	0,03	0,03	1,37	0,06	0,06	8,51	0,06	0,07

Tabulka 16: Akumulace fruktosy, glukosy a sacharosy v listech 0–180 minut od začátku fotosyntézy zjištěná metodou HPLC. E – zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub>, N<sup>-</sup> - nehnojeno dusíkem, N<sup>+</sup> - hnojeno dusíkem, V- listy kultivované ve vodě, S – listy kultivované v sacharose, jejich směrodatné odchytky (SD) a intervaly spolehlivosti (IS), (n = 3).

VZOREK	fruktosa [mg/g FW]	SD	IS	glukosa [mg/g FW]	SD	IS	sacharosa [mg/g FW]	SD	IS
EN+V 0	2,53	0,05	0,06	2,48	0,06	0,07	7,91	0,13	0,15
EN-V 0	1,23	0,05	0,06	1,64	0,03	0,03	10,71	0,07	0,08
EN+S 60	6,78	0,01	0,01	5,92	0,03	0,03	14,62	0,12	0,13
EN-S 60	2,09	0,02	0,03	2,03	0,15	0,17	15,38	0,20	0,22
EN+V 60	25,27	0,02	0,03	5,24	0,04	0,05	21,18	0,13	0,15
EN-V 60	0,24	0,01	0,01	0,25	0,01	0,01	1,50	0,01	0,01
EN+S 120	3,51	0,05	0,06	3,44	0,07	0,08	4,07	0,01	0,01
EN-S 120	2,48	0,06	0,07	2,29	0,04	0,05	16,50	0,06	0,07
EN+V 120	2,13	0,02	0,02	2,13	0,05	0,06	10,09	0,06	0,06
EN-V 120	1,61	0,04	0,05	2,19	0,09	0,10	9,44	0,14	0,15
EN+S 180	4,62	0,09	0,10	3,89	0,01	0,01	37,09	0,13	0,15
EN-S 180	2,48	0,09	0,10	2,44	0,10	0,12	13,71	0,19	0,21
EN+V 180	2,40	0,03	0,03	2,29	0,01	0,01	12,54	0,02	0,02
EN-V 180	1,46	0,05	0,06	2,10	0,06	0,07	10,00	0,09	0,10



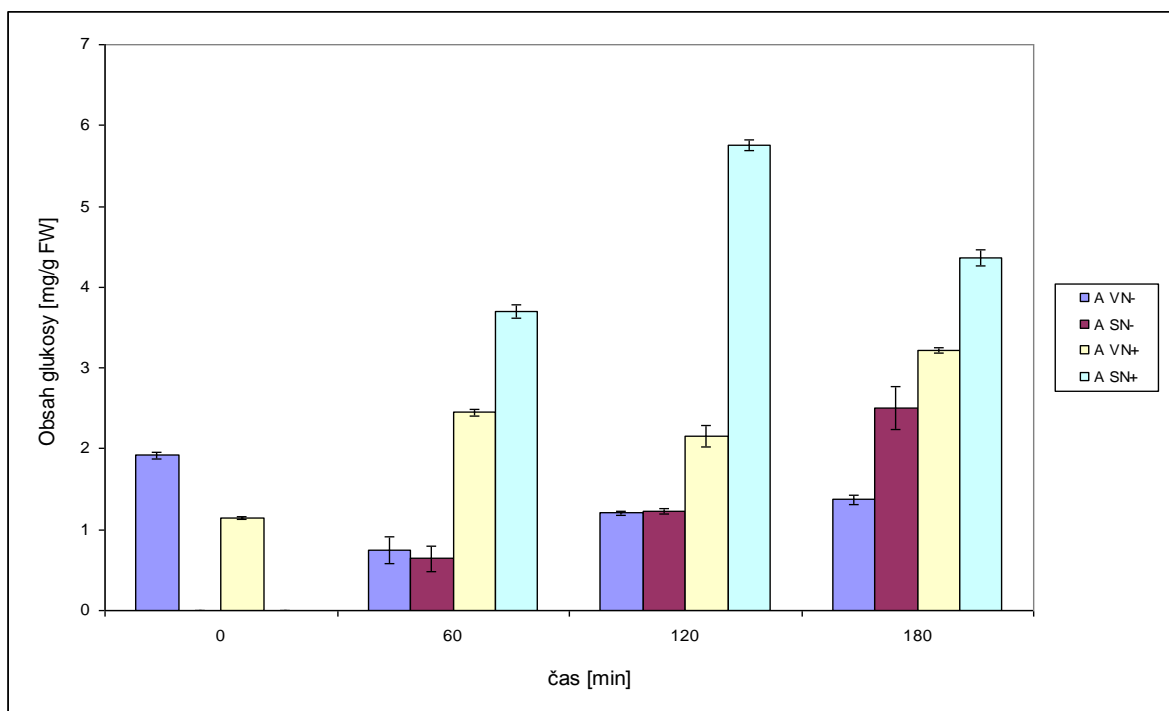
Obr. 4.14 Akumulace fruktosy 0–180 minut od začátku fotosyntézy v listech kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) hnojených dusíkem ( $N^+$ ) a bez hnojení dusíkem ( $N^-$ ), pro běžnou koncentraci  $CO_2$  (A). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .



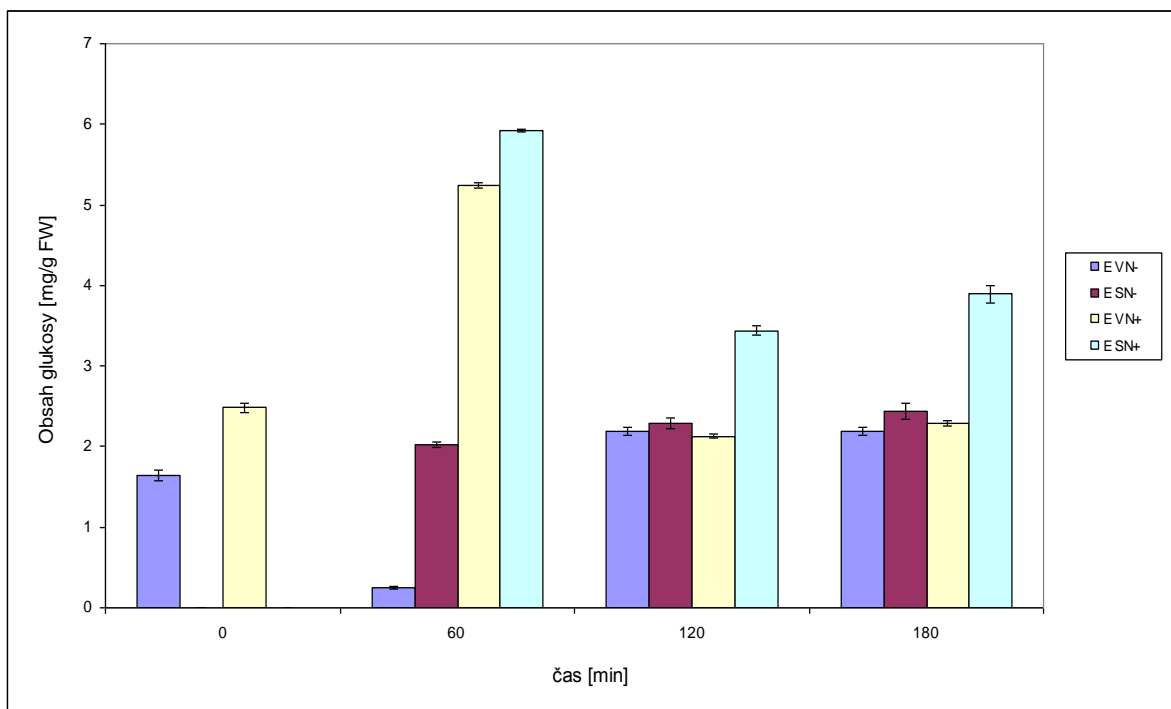
Obr. 4.15 Akumulace fruktosy 0–180 minut od začátku fotosyntézy v listech kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) hnojených dusíkem ( $N^+$ ) a bez hnojení dusíkem ( $N^-$ ), pro zvýšenou koncentraci  $CO_2$  (E). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .



Metodou HPLC byl zjištěn významný nárůst obsahu fruktosy u varianty A mezi 0.–180. minutou trvání fotosyntézy u všech variant, s výjimkou vzorků kultivovaných ve vodě, nehnojených dusíkem. (obr. 4.14). U varianty E došlo k výraznému nárůstu obsahu fruktosy mezi 0. – 60. minutou fotosyntézy u všech variant s výjimkou vzorků kultivovaných ve vodě, nehnojených dusíkem. Mezi 60. – 180. minutou nastal významný pokles v obsahu fruktosy u varianty E hnojené dusíkem (obr. 4.15).

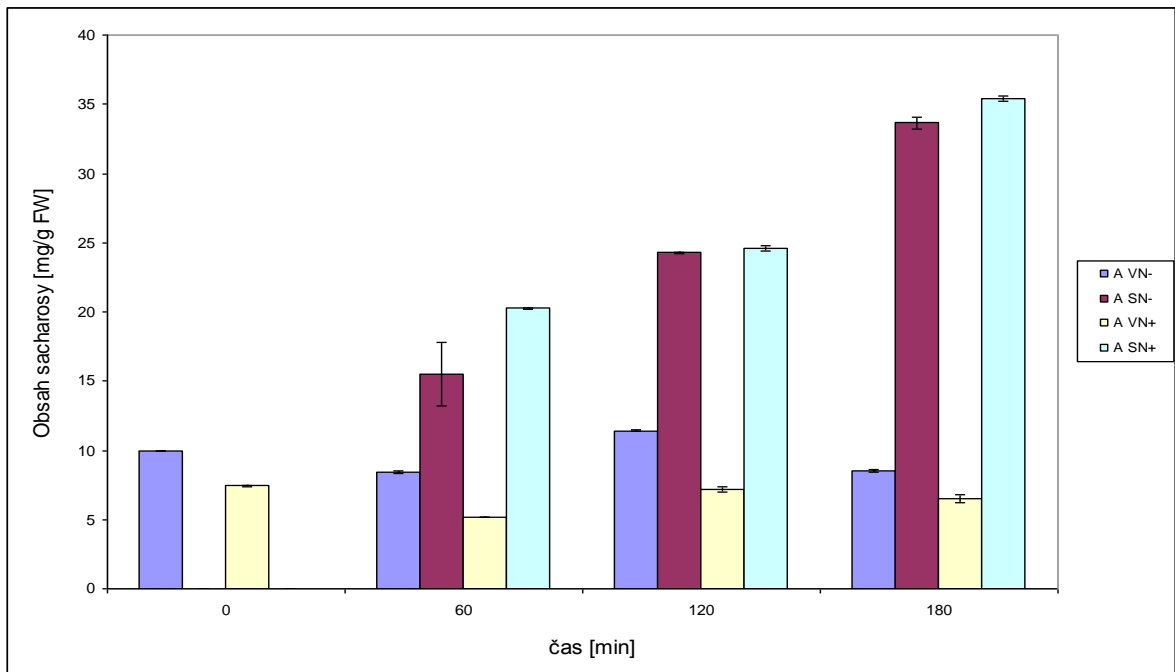


Obr. 4.16 Akumulace glukosy 0–180 minut od začátku fotosyntézy v listech kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) hnojených dusíkem ( $N^+$ ) a bez hnojení dusíkem ( $N^-$ ), pro běžnou koncentraci  $CO_2$  (A). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

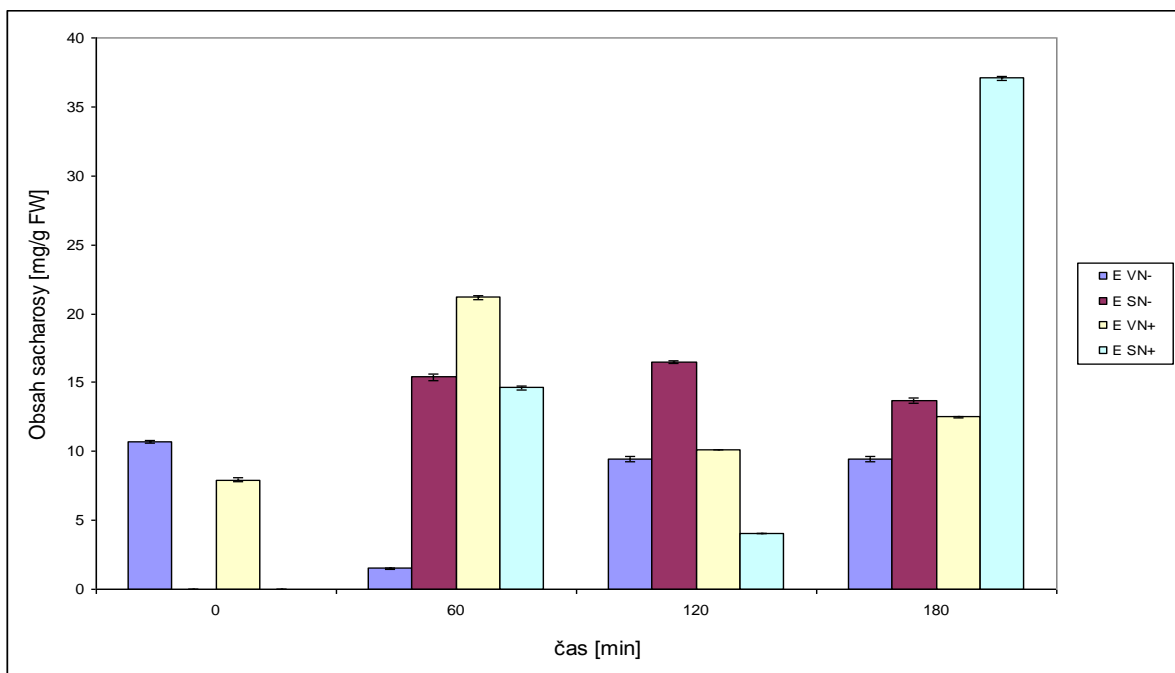


Obr. 4. 17 Akumulace glukosy 0–180 minut od začátku fotosyntézy v listech kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) hnojených dusíkem ( $N^+$ ) a bez hnojení dusíkem ( $N^-$ ), pro zvýšenou koncentraci  $CO_2$  (E). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

Z obr. 4.16 a 4.17 je zřejmé, že největší obsah glukosy vykazuje varianta s feedingem sacharosou, hnojená dusíkem. Největší nárůst obsahu glukosy nastal u variant hnojených dusíkem mezi 0.–60. minutou.



Obr. 4.18 Akumulace sacharosu 0–180 minut od začátku fotosyntézy v listech kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) hnojených dusíkem ( $N^+$ ) a bez hnojení dusíkem (N), pro běžnou koncentraci  $CO_2$  (A). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .



Obr. 4.19 Akumulace sacharosu 0–180 minut od začátku fotosyntézy v listech kultivovaných ve vodě (V) a v sacharose (S) hnojených dusíkem ( $N^+$ ) a bez hnojení dusíkem (N), pro zvýšenou koncentraci  $CO_2$  (E). Chybové úsečky znázorňují intervaly spolehlivosti,  $n = 3$ .

U listů kultivovaných v běžné koncentraci CO<sub>2</sub> v roztoku sacharosy byl zjištěn plynulý nárůst obsahu sacharosy v intervalu 0–180 minut. U listů kultivovaných při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> byl pozorován nárůst obsahu sacharosy mezi 0.–60. minutou (s výjimkou varianty EVN).

## 5. DISKUSE

V předložené diplomové práci byl studován vliv manipulace sinku, dusíkaté výživy a koncentrace CO<sub>2</sub> na akumulaci nestrukturních sacharidů a na obsah a aktivitu enzymu Rubisco u buku lesního. Manipulace sinku spočívala v kultivaci listů v roztoku sacharosy, srovnávací vzorky byly kultivovány ve vodě. Rostliny byly kultivovány jednak v běžné koncentraci CO<sub>2</sub> (A = 385 μmol·mol<sup>-1</sup>), jednak ve zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> (E = 700 μmol·mol<sup>-1</sup>), polovina rostlin v každé variantě byla hnojena dusíkem, druhá polovina nikoliv.

V našem experimentu nebyl zjištěn průkazný vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> "feedingu" sacharosou ani hnojení dusíkem na aktivitu enzymu Rubisco. Toto zjištění je v rozporu se závěry jiných autorů [71], [72], [73], kteří uvádějí, že aktivita Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace klesá. Zachová [74], Matulková [10], Hrstka et al. [75] uvádějí naopak stimulaci aktivity Rubisco při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>. Všichni autoři, např. [71],[72],[75] jsou zajedno v pozitivní korelaci mezi hnojením dusíkem a aktivitou Rubisco. Při dostatečném přísunu dusíku může rostlina syntetizovat více enzymu Rubisco a od obsahu Rubisco v listech se odvíjí potenciální aktivita. Je zajímavé, že v našem experimentu aktivita Rubisco značně kolísala, ačkoliv bylo zajištěno konstantní osvětlení. Lze to snad vysvětlit heterogenitou vzorků (z jednoho listu bylo uděláno jedno stanovení) a malým počtem opakování (n = 3).

Hlavním projevem aklimace rostlin na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> je snížený obsah enzymu Rubisco [39], [50], [71], [72], [76], [77]. V naší práci jsme zaznamenali snížení obsahu Rubisco při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> o 27 % u hnojené varianty a o 10 % u nehnojené varianty. Markantní vliv na obsah Rubisco mělo hnojení dusíkem. U varianty AN<sup>+</sup> byl obsah Rubisco o 48 % vyšší než u varianty AN<sup>-</sup>, u varianty EN<sup>+</sup> byl obsah Rubisco o 36 % vyšší než u varianty EN<sup>-</sup>. Snížení obsahu Rubisco v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> se vysvětluje: (1) represí fotosyntetických genů způsobenou akumulací hexos v listech [78], [61], (2) poklesem obsahu rozpustných proteinů a celkového dusíku v listech [79], [80], (3) pokles síly sinku [81]. Obsah rozpustných sacharidů v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> byl nevýznamně vyšší u varianty S, než u varianty V. Bylo zjištěno, že hnojení dusíkem nemá na akumulaci rozpustných sacharidů vliv. Rozdíly mezi A a E nebyly též statisticky významné.

Je zřejmé, že obsah škrobu v listech nezávisí na feedingu sacharosou, ale byl významně vyšší u varianty nehnojené dusíkem (N<sup>-</sup>) než u varianty N<sup>+</sup> a nevýznamně vyšší u varianty E ve srovnání s A.

To je v rozporu s jinými autory, kteří uvádějí, že v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> se v listech zvyšuje obsah nestrukturních sacharidů, což způsobuje represí exprese genů pro malou a velkou podjednotky Rubisco [50], [82]. Na skutečnost, že limitace dusíkem zvyšuje akumulaci sacharidů v listech, upozorňuje řada prací [83], [84], [85]. Při limitaci dusíkem je malá velikost sinku, protože růst rostliny je omezen. Za těchto podmínek jenom malá část sacharidů je translokována z listů do ostatních částí rostliny a sacharidy se akumulují v listech. Nedostatek dusíku zvyšuje akumulaci sacharidů v listech a vysoký obsah sacharidů snižuje obsah fotosyntetických proteinů včetně enzymu Rubisco a vede tak k dalšímu snížení obsahu listového dusíku a intenzity fotosyntézy [51].

Analýza HPLC ukázala, že v listech byl přibližně stejný obsah fruktosy a glukosy (0,3–7mg/g), přičemž změny v obsahu glukosy v intervalu 0–180 minut téměř přesně

kopírovaly změny v obsahu fruktosy. Obsah sacharosy v listech byl podstatně vyšší a činil 2–35 mg/g.

## 6. ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo stanovit dynamiku akumulace nestrukturních sacharidů a aktivity enzymu Rubisco při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub>.

Měření bylo prováděno na listech buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) odebraných na Experimentálním ekologickém pracovišti Centra pro výzkum globální změny AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech. Základní hnojení varianty N<sup>+</sup> bylo provedeno zálivkou okamžitě po výsadbě s využitím hnojiv dusičnanu amonného s vápencem, superfosfátu a síranu draselného na výsledný obsah živin v substrátu: 200 mg N·l<sup>-1</sup>, 100 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·l<sup>-1</sup> a 100 mg K<sub>2</sub>O·l<sup>-1</sup>. Na konci května 2010 a začátkem dubna 2011 bylo provedeno druhé a třetí hnojení N opět v dávce 200 mg N·l<sup>-1</sup>. U kontrolní varianty N<sup>-</sup> bylo použito pouze fosforu a draslíku ve stejné dávce P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a K<sub>2</sub>O jako v případě N<sup>+</sup> varianty.

Vzorky byly pěstovány v minisférách s běžnou koncentrací CO<sub>2</sub> (A = 385 μmol·mol<sup>-1</sup>) nebo v atmosféře se zvýšeným obsahem CO<sub>2</sub> (E = 700 μmol·mol<sup>-1</sup>). Samotný „feeding“ experiment byl prováděn na přelomu července a srpna 2011 při každém odběru byly odebrány 3 vzorky (n = 3) z každé výživy dusíkem. Pro experiment byly vybrány stejně sluněné listy s přibližně stejnou velikostí a podobným umístěním na větvičce. Listy použité ve vlastním experimentu byly adaptovány na tmu po dobu 12 hodin. Následně byly vloženy do 0,7 M roztoku sacharosy resp. vody. Listy byly vystaveny záření PPFD 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> po dobu 0, 30, 60, 120, 180 min.

U vzorků byla měřena počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky dle Lilleyho a Wolkeru [64] s extrakcí dle Besforda [65], metoda byla modifikována pro stanovení počáteční aktivity dle Heringové [66]. Obsah Rubisco byl stanoven metodou SDS-PAGE dle Dameroyalové [67] a Rogerse et. al. [68], postup byl upraven Floriánem [53] a Hlaváčkem [69]. Byl stanoven obsah nestrukturních sacharidů antronovou metodou dle [54], [55], [70] a stanovení nestrukturních sacharidů bylo provedeno ještě pomocí HPLC dle Cabáلكové et. al. [57].

V našem experimentu bylo zaznamenáno snížení obsahu Rubisco při zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> o 27 % u hnojené varianty a o 10 % u nehnojené varianty. Markantní vliv na obsah Rubisco mělo hnojení dusíkem. U varianty AN<sup>+</sup> byl obsah Rubisco o 48 % vyšší než u varianty AN<sup>-</sup>, u varianty EN<sup>+</sup> byl obsah Rubisco o 36 % vyšší než u varianty EN<sup>-</sup>.

Obsah rozpustných sacharidů v podmínkách zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> byl nevýznamně vyšší u varianty S, než u varianty V. Bylo zjištěno, že hnojení dusíkem nemá na akumulaci rozpustných sacharidů vliv. Rozdíly mezi A a E nebyly též statisticky významné.

Podle našich výsledků obsah škrobu v listech nezávisí na feedingu sacharosou. Obsah škrobu byl významně vyšší u varianty nehnojené dusíkem (N<sup>-</sup>) než u varianty N<sup>+</sup> a nevýznamně vyšší u varianty E ve srovnání s A.

Z HPLC metody jsme určili obsah fruktosy a glukosy, který se pohyboval od 0,3 do 7 mg/g, přičemž změny v obsahu glukosy v intervalu 0–180 minut téměř přesně kopírovaly změny v obsahu fruktosy. Obsah sacharosy v listech byl podstatně vyšší a činil mezi 2–35 mg/g.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VODRÁŽKA, Z.; *Biochemie*. 2. opravené vyd. (dotisk). Praha: Academia, 1999. 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] VOET, D., VOETOVÁ, J. G.; *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. 1362 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [3] HRSTKA, M.; *Obecná biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2005. ISBN 80-214-3057-5.
- [4] VIČÍKOVÁ, M.; *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných listech buku lesního*. Brno, 2009. 48 s. Bakalářská práce VUT. Struktura aktivního místa. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>
- [5] ALBERTIS, *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem 2000. ISBN 80-902906-0-4]
- [6] Struktura chlorofylu *a* a *b*. Dostupné z: <http://alliedhealthblog.com/2010/11/>
- [7] Schéma oxygení fotosyntézy. Dostupné z: <http://kbfr.agrobiologie.cz/kbfr/hnilicka/prednasky/fyziologie-rostlin/fyziologie/fotosynteza.pdf>
- [8] LEBLOVÁ, S.; *Biochemie fotosyntézy: Mechanismy fixace atmosferického oxidu uhličitého a jeho regulace*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n. p., 1988, 123 s. ISBN 17-192-88.
- [9] MATULKOVÁ, Z.; *Vliv stárnutí listů na obsah enzymu Rubisco*. Brno, 2008. 42 s. Bakalářská práce. VUT. Vedoucí práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [10] MATULKOVÁ, Z.; *Denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého*. Brno, 2010. 70 s. Diplomová práce. VUT v Brně. Vedoucí práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [11] BOUSSINGAULT, J. B.; *Agronomie, chemic agricole et physiologie*, 2nd edn. Paris. *Mallet Bachelier*. 1868, č. 2, s. 236-312.
- [12] TIT, M., QUICK, W. P.; Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. *Physiologia Plantarum*. 1989, č. 77, s. 633-641.
- [13] QUICK, M. P., MILLS, J. D.; The kinetics of adenine-nucleotide binding to chloroplast ATPase CFO-CF1 during the illumination and post-illumination



- period in isolated pea thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1988, č. 936, s. 222-227.
- [14] PIETERS, A., PAUL, M. J., LAWLOR, D. W.; Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. *Journal of Experimental Botany*. 2001, č. 52, s. 1083-1091.
- [15] LABATE, C. A., LEEGOOD, R. C.; Limitation of photosynthesis by changes in temperature. Factors affecting the response of carbon dioxide assimilation to temperature in barley leaves. *Planta*. 1988, č. 173, s. 519-527.
- [16] PAUL, M. J., DRISCOLL, S. P.; Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant, Cell and Environment*. 1997, č. 20, s. 110-116
- [17] MARTIN, T., OSWALD, O., GRAHAM, I. A.; *Arabidopsis* seedling growth, storage mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiology*. 2002, č. 128, s. 472-481.
- [18] STITT, M., KRAPP, A., KLEIN, D., ROPER-SCHWARZ, U., PAUL, M.; Do carbohydrates regulate photosynthesis and allocation by altering gene expression? *American Society of Plant Physiologists*. 1995, č. 22, s. 583-621.
- [19] GEIGER, M., HAAKE, V., LUDEWIG, F., SONNEWALD, U., STITT, M.; Influence of nitrate and ammonium nitrate supply on the response of photosynthesis, carbon and nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment*. č. 22, s. 1117-1199.
- [20] SHEEN, J.; Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell*. 1990, č. 2, 1027-1038.
- [21] JANG, J. C., SHEEN, J.; Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Physiol*. 1997, č. 9, s. 5-19.
- [22] ARAYA, T., NOGUCHI, K., TERASHIMA, I.; Effects of carbohydrate accumulation on photosynthesis differ between sink and source leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant, Cell Physiol*. 2006, č. 47, s. 644-652.
- [23] HABASH, D. Z., PAUL, M. J., PARRY, M., KEYS, A. J., LAWLOR, D. W.; Increased capacity for photosynthesis in wheat grown at elevated carbon dioxide: the relationship between electron transport and carbon metabolism. *Planta*. 1995, č. 197, s. 482-489.
- [24] PELLNY, T. K., GODDIJN, O., PAUL, M. J.; Unravelling the role of trehalose-6-phosphate in metabolic signalling. *Experimental Biology*. 2002.

- [25] WILDMAN, S., BONNER J.; The proteins of green leaves. Isolation, enzymatic properties, and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. *Arch. Biochem.* 1947, č. 14, s. 381-413.
- [26] HRSTKA, M.; *Dlouhodobý účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy u smrku ztepilého.* Brno, 2004. 77 s. Dizertační práce. VUT.
- [27] KAWASHIMA, N.; Non-synchronous incorporation of  $C_{14}O_2$  into amino acids of the two subunits of fraction I protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970, 38, Issue 1, s. 119-131
- [28] NEČESANÁ, P.; *Dlouhodobý účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu enzymu Rubisco u smrku ztepilého.* 55 s. Brno, 2002 Diplomová práce VUT. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [29] TROWN, P. W.; An important method for the isolation of carboxydismutase. *Biochemistry.* 1965, 4, s. 908-918.
- [30] Struktura Rubisco - vlevo forma II ( $L_2$ ), vpravo forma I ( $L_8S_8$ ). Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>
- [31] Struktura enzymu Rubisco. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>
- [32] LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S.; *Photosynthesis: Physiology and Metabolism.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 113 s. ISBN 0-7923-6143-1.
- [33] HARTMAN, F. C; HARPEL, M. R.; Structure, function, regulation, and assembly of D- ribulose- 1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63, s. 197-234.
- [34] LORIMER, G. H.; Ribulosebisphosphate carboxylase-aminoacid sequence of a peptide bearing the activator carbon dioxide. *Biochemistry.* 1981, č. 20, s. 1236-1240.
- [35] LORIMER, G. H., BADGER, M. R., ANDREWS, T. J.; The activation of ribulose-1,5-bisphosphate karboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry.* č. 15, 529 - 536.
- [36] LORIMER, G. H., ANDREWS, T. J., TOLBERT, N. E.; Ribulose bisphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction product and mechanism of action. *Biochemistry,* 1973, 12, s 18-23.

- [37] GUTTERIDGE, S., GATENBY, A. A.; Rubisco Synthesis, Assembly, Mechanism, and Regulation. *The Plant Cell*, 1995, 7, s. 809–819
- [38] NÁTR, L.; *Koncentrace CO<sub>2</sub> a rostliny*. 1. vydání. Praha: ISV, 2000. 257 s. ISBN 80-85866-62-5.
- [39] DRAKE, B. G., GONZALES-MELER, M. A., LONG, S. P.; More efficient plants : A consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub>?. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997, 48, s. 609-639.
- [40] IDSO, S. B, KIMBALL, B. A., AKIN, D. E., KRIDLER, J.; A general relationship between CO<sub>2</sub> - induced reduction in stomatal conductance and concomitant increases in foliage temperature. *Environ. exp. Bot.* 33: 1993, 443-446
- [41] ACOCK, B. ACOCK, M. C. PASTERNAK, D.; Interactions of CO<sub>2</sub> enrichment and temperature on carbohydrate production and accumulation in muskmelon leaves. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 1990, 115, s. 525-529.
- [42] SAXE, H., ELLSWORTH, D. S., HEATH, J.; Tree and forest functioning in an enriched CO<sub>2</sub> atmosphere. *New Phytol.* 1998, 139, s. 395-436.
- [43] CEULEMANS, R., MOUSSEAU, M.; Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on woody plants. *New Phytol.* 1994, 127, s. 425-446.
- [44] EAMUS, D.; Ecophysiological traits of deciduous and evergreen woody species in the seasonally dry tropics. *Tree*. 1999, 14, s. 11-16.
- [45] STITT, M., KRAPP, A.; The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 1999, č. 22, 583-621.
- [46] DEL POZO, A., PEREZ, P., GUTIERREZ, D., ALONSO, A., MORCUENDE, R., MARTINEZ-CARRASCO, R.; Gas exchange acclimation to elevated CO<sub>2</sub> in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to nitrogen acquisition and partitioning in wheat grown in field chambers. *Environ. Exp. Bot.* 2007, č. 59, 371–380.
- [47] CONROY, J. P.; Influence of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations on plant nutrition. *Aust. J. Bot.* 1992, č. 40, 445–456.
- [48] BOWES, G.; Growth at elevated CO<sub>2</sub> - photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant Cell Environ.* 1991, č. 14, 795–806.

- [49] CHENG, S. H., MOORE, B. D., SEEMANN, J. R.; Effects of short- and long-term elevated CO<sub>2</sub> on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Heynh. Plant Physiol.* 1998, č. 116, 715–723.
- [50] MOORE, B. D., CHENG, S. H., SIMS, D., SEEMANN, J. R.; The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Cell and Environment.* 1999, č. 22, 567 - 582.
- [51] WINGLER, A., PURDY, S., MACLEAN, A.; The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Exp. Bot.* 2006, č. 57, 391–399.
- [52] ONO, K., NISHI, Y., WATANABE, A., TERASHIMA, I.; Possible mechanisms of adaptive leaf senescence. *Plant Biol.* 2001, č. 3, 234–243.
- [53] FLORIÁN, J.; *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy.* Brno, 2006. 47 s. Diplomová práce. VUT.
- [54] DREYWOOD, R.; Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. in Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1946, 18, s. 499.
- [55] YEMM, E. W., WILLIS, A. J.; The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochemical Journal*, 1954, 57, s. 508–514.
- [56] KLOUDA, P.; *Moderní analytické metody.* 2. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [57] CABÁLKOVÁ, J., WAHLUND, K. G., CHMELÍK, J.; Complex analytical approach to characterization of the influence of carbon dioxide concentration on carbohydrate composition in Norway spruce needles. *Journal of chromatography A*, 2007, 1148, s. 189–199.
- [58] HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J.; *Základy imunologie.* 3. vydání Praha: Triton, 2005. ISBN 80-7254-686-4.
- [59] KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O.; *Laboratorní cvičení z biochemie.* 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000. 203 s. ISBN 80-7182-104-7
- [60] Aparatura pro elektroforézu. Převzato z:  
[http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse Information/4581/techniques/gel elect/page protein.html](http://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse%20Information/4581/techniques/gel%20elect/page%20protein.html)

- [61] WARREN, C. R.; The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO<sub>2</sub> movement is increased by nutrient supply. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55, s. 2313–2321.
- [62] MCCORMICK, A. J., CRAMER, M. D., WATT, D. A.; Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. *Journal of Plant Physiology*. 2008, č. 165, s. 1817-1829.
- [63] Lamelové kultivační sféry – EEP Bílý Kříž simulují účinek zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na úrovni porostu. Dostupné z:  
<http://www.usbe.cas.cz/czechcarbo/vyzkum.htm>
- [64] LILLEY, R. M., WALKER, D. A.; An improved spectrophotometric assay for ribulose carboxylase. *Biochem Biophys. Acta*. 1997, 358, s. 226-229.
- [65] BESFORD, R. T.; Some properties of Ribulose bisphosphate carboxylase extracted from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*. 1984, 35, 153, s. 495-504.
- [66] HERINGOVÁ, P.; *Aktivita enzymu Rubisco u smrku ztepilého v průběhu dne*. Brno, 2004. Diplomová práce. VUT. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [67] DAMERVAL, C., VIENNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT H.; Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52-54.
- [68] 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 CO<sub>2</sub>. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52: 1555-1561.
- [69] HLAVÁČEK, V.; *Stanovení obsahu enzymu Rubisco v listech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 36 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
- [70] GROSPIETSCH, M.; Determination of plant starch modified by anthron methods, using chloralhydrate as a solvent. *Methods in Plant Sciences*, 1997, 11, s. 39–40.
- [71] GRIFFIN, K. L., TISSUE, D. T., TURNBULL, M. H., WHITEHEAD, D.; The onset of photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub> partial pressure in field-grown *Pinus radiata* D. Don after 4 years. *Plant, Cell and Environment*. 2000, č. 23, s. 1089-1098.
- [72] RIIKONEN, J., HOLOPAINEN, T., OKSANEN, E., VAPAAVUORI, E.; Leaf photosynthetic characteristics of silver birch during three years of exposure to elevated concentrations of CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> in the field. *Tree Physiology*. 2005, č. 25, s. 621-632.

- [73] LEAKEY, A. D. B., AINSWORTH, E. A., BERNACCHI, C. J., ROGERS, A., LONG, S.P., ORT, D.R.; Elevated CO<sub>2</sub> effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *J. Exp. Bot.* 2009, č. 60, 2859–2876.
- [74] ZACHOVÁ, L.; *Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na množství a aktivitu Rubisco*. Brno, 2008. 56 s. Diplomová práce. Vysoké Učení Technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce PhDr. Miroslav hrstka Ph.D.
- [75] HRSTKA, M., URBAN, O., BABÁK, L.; Seasonal changes of Rubisco content and activity in *Fagus sylvatica* and *Picea abies* affected by elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Chemical Papers*. 2012, v tisku.
- [76] AINSWORTH, E. A., ROGERS, A.; The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO<sub>2</sub>]: mechanism and environmental interaction. *Plant, Cell and Environment*. 2007, č. 30, s. 258-270.
- [77] ZHANG, D. Y., CHEN, G. Y., CHEN, J., YONG, Z. H., ZHU, J. G., XU, D. Q.; Photosynthetic acclimation to CO<sub>2</sub> enrichment related to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylation limitation in wheat. *Photosynthetica*. 2009, č. 47, 152–154.
- [78] VAN OOSTEN, J. J., WILKINS, D., BESFORD, R. T.; Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO<sub>2</sub> is mimicked by regulation by carbohydrates - a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*. 1994, č. 17, s. 913-923.
- [79] SICHER, R. C., BUNCE, J. A.; Relationship of photosynthetic acclimation to changes of Rubisco activity in field-grown winter wheat and barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynthesis Research*. 1997, č. 52, s. 27-38.
- [80] NAKANO, H., MAKINO, A., MAE, T.; The effect of elevated partial pressure of CO<sub>2</sub> on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology*. 1997, č. 115, s. 191-198.
- [81] PERÉZ, P., MORCUENDE, R., DEL MOLINO, I.M., MARTÍNEZ-CARRASCO, R.; Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO<sub>2</sub>, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany*. 2005, č. 53, s. 13-27.
- [82] SENEWEERA, S., MAKINO, A., HIROTSU, N. M., NORTON, R., SUZUKI, Y.; New insight into photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub>: The role of leaf nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content in rice leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 2011, č. 71, 128–136.

- [83] MILLER, A., TSAI, C.H., HEMPHILL, D., ENDRES, M., RODERMEL S., SPALDING, M.; Elevated CO<sub>2</sub> effects during leaf ontogeny a new perspective on acclimation. *Plant Physiol.* 1997, č. 115, 1195–1200.
- [84] YOSHIDA, S.; Molecular regulation of leaf senescence. *Plant Biol.* 2003, č. 6, s. 79-84.
- [85] PARROTT, D., YANG, L., SHAMA, L., FISCHER, A. M.; Senescence is accelerated, and several proteases are induced by karbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta.* 2005, č. 222, s. 989-1000.

## 8. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

3-KABP	3-keto-D-arabinitol-1,5-bisfosfát
3-PGA	3-fosfoglycerinaldehyd
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
C	uhlík
CA1P	2-karboxyarabinitol-1-fosfát
CABP	2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
ČR	Česká republika
DNA	deoxribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Ery-4-P	erytroza-4-fosfát
Fru-6-P	fruktosa-6-fosfát
Glc-1-P	glukosa-1-P
H <sub>2</sub>	vodík
H <sub>2</sub> S	sulfan
HCl	kyselina chlorovodíková
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethanosulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kalinová chromatografie
IRGA	infračervený analyzátor plynu
KHCO <sub>3</sub>	hydroxyuhličitan draselný
KOH	hydroxid draselný
Mg <sup>2+</sup>	ion hořečnatý
MgCl <sub>2</sub>	chlorid manganatý
minisféra A	atmosféra se standardní koncentrací CO <sub>2</sub>
minisféra E	atmosféra se zvýšenou koncentrací CO <sub>2</sub>
Mn <sup>2+</sup>	ion manganatý
N <sup>-</sup>	nehnojení dusíkem
N	dusík
N <sup>+</sup>	hnojení dusíkem
Na <sub>2</sub> EDTA	ethylendiamintetraoctan disodný
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PAGE	elektroforéza na polyarylamidovém gelu



Pi	anorganický fosfát
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density
PVDF	polyvinylidenfluorid
R-5-P	ribosa-5-fosfát
RNA	ribonukleová kyselina
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	sodium dodecilsulfát
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	xylulosa-1,5-bisfosfát
Xyl-5-P	xylulosa-5-fosfát
$\varepsilon$	molární absorpční koeficient
$\lambda$	vlnová délka