

Fyziologie rostlin

Učební text k přednášce Bi4060 na přírodovědecké fakultě MU v Brně.
Určeno pouze ke studijním účelům pro studenty MU. Autor textu prof. Jan Gloser.

Stručný obsah (v závorce je číslo stránky)

1. Transportní procesy

Transport vody (3)

Transport iontů solí a organických látek (15)

Transport plynů (32)

2. Metabolické procesy

Primární procesy fotosyntézy (40)

Sekundární procesy fotosyntézy (52)

Ekofyziologické studium fotosyntézy (61)

Respirační procesy (66)

Asimilace minerálních živin (75)

3. Růstové a vývojové procesy

Růst buněk a diferenciací orgánů (83)

Vnitřní chemické regulátory růstu (90)

Regulace růstu vnějšími faktory (107)

Pohyby částí rostlin a vnitřní rytmy (118)

4. Stresová fyziologie

Obecné reakce rostlin za stresu (128)

Záření a teplota jako stresové faktory (133)

Vliv nedostatku vody a minerálních živin (142)

Vliv zasolení, acidity a hypoxie půdy (151)

Působení toxických polutantů (155)

Interakce rostlin s jinými organismy (158)

1. ČÁST - TRANSPORTNÍ PROCESY

Předkové dnešních rostlin žijící v pravěkých mořích postupně získali velmi dobrou funkční výbavu k fotosyntetické asimilaci anorganických zdrojů uhlíku, ovšem k pobytu mimo vodní prostředí to zdaleka nepostačovalo. Jejich další vývoj, vrcholící úspěšnou kolonizací všech kontinentů, byl záležitostí neobyčejně složitou a dlouhodobou. V první řadě bylo potřeba získat dostatečnou schopnost vzdorovat stále hrozícímu nedostatku vody: buď tolerovat její velkou ztrátu v buňkách a obnovovat veškeré funkce i po téměř úplném vyschnutí, nebo umět lépe s nedostatkovou vodou hospodařit. To znamenalo především osvojit si způsob jejího získávání v hlubších vrstvách půdy specializovanými orgány, rychle ji přivádět do nadzemních částí, a účinně omezit její ztráty.

Nemenší problémy měly první terestrické rostliny i se získáváním a transportem iontů minerálních živin. Difuze jakožto převládající transportní mechanismus u vodních rostlin nebyl zdaleka schopen zabezpečit potřeby nových obyvatel souše. Postupné strukturální změny umožňující dálkový transport vody a rozpuštěných látek cévními svazky byly spojeny se syntézou nových materiálů (zejména ligninu), zvyšujících mechanickou pevnost a odolnost stále rozměrnějších těl. K tomu nově přistoupila i velmi dokonalá regulace výměny plynů pomocí kutikuly a průduchů na povrchu listů. To všechno mělo obrovský dopad na zrychlení a dlouhodobou aktivitu fotosyntetických procesů a s tím spojenou vyšší rychlost růstu.

Transportní procesy u cévnatých rostlin jsou překvapivě komplikovanější než u živočichů. Množství transportovaných látek (zejména vody a CO_2) je u rostlin neobyčejně velké. Navíc látkové výměny mezi rostlinou a jejím okolím bývají současně prováděny ve dvou zcela odlišných typech prostředí (půda – atmosféra). Také transport látek uvnitř rostliny je komplikovaný, neboť rostliny nemají k dispozici žádnou mechanickou „pumpu“, která by uváděla transportované látky do pohybu. Navíc u rostlin je na rychlém vnitřním přesunu roztoků závislé i šíření regulačních signálů, neboť ty jsou převážně chemické, nikoli elektrické povahy.

Co se transportuje ?

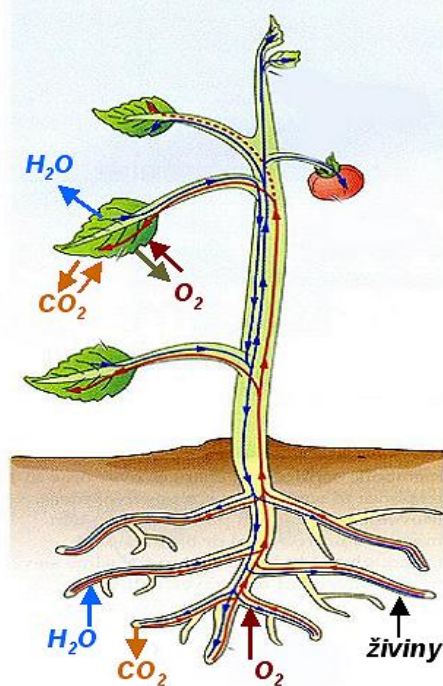
- voda
- plyny (zejména oxid uhličitý a kyslík)
- minerální živiny
- organické látky (vlastní metabolity)

Jakými cestami ?

- buněčnými stěnami
- intercelulárami
- transportními proteiny v membránách
- plasmodesmaty
- lýkem
- xylémem

Jakými mechanismy ?

- difusí (hlavně všechny plyny)
- aktivním transportem (uvnitř buněk a přes membrány)
- hromadným tokem (dálkový transport v lýku a xylému)



1.1 Transport vody

Voda je základní složkou všech živých rostlin, nutnou pro udržení jejich struktur i funkcí. Naprostá většina transportních procesů v rostlinách se odehrává ve vodných roztocích, stejně tak všechny biochemické reakce. Voda v těle rostlin není dlouhodobě zadržována, ale neustále odchází ve formě vodní páry do atmosféry. Za průměrného letního dne dosahuje množství přijaté a opět vydané vody několikanásobku celkového obsahu vody ve všech orgánech. Suchozemské rostliny jsou totiž obvykle vystaveny silně "výparným" podmínkám, tedy vzduchu se značným deficitem vodní páry. Přitom nemohou mít povrch svých orgánů neprodyšně uzavřený, neboť potřebují přijímat ze vzduchu životně důležitý oxid uhličitý. Schopnost tolerovat větší ztráty vody má jen poměrně malá skupina *poikilohydrických* rostlin (např. lišejníky a některé mechy). Naprostá většina ostatních (které se označují jako *homoiohydrické*) musí stále udržovat obsah vody v pletivech na vysokých hodnotách. Již při ztrátě asi poloviny z celkového obsahu vody (při plném nasycení) jsou tyto rostliny nevratně poškozeny a hynou. Proto také zabezpečení rychlého příjmu a transportu vody i regulace jejího výdeje patří mezi prioritní fyziologické funkce rostlin.

Chemický potenciál vody - základní vztahy

Správné pochopení podstaty a průběhu transportních procesů v rostlinách je možné pouze tehdy, máme-li alespoň základní znalosti o energetice fyzikálně-chemických soustav a o obecných vlastnostech roztoků. Tato problematika je podrobně popsána v celé řadě běžně dostupných učebnic fyzikální chemie, kde v případě hlubšího zájmu lze najít příslušné informace. Připomeňme si jen několik těch skutečně nejdůležitějších pojmů a vztahů.

Tok vody mezi dvěma místy v rostlině může nastat pouze tehdy, jestliže voda na těchto místech má rozdílný chemický potenciál. **Voda vždy proudí z místa, ve kterém má vyšší chemický potenciál do místa s potenciálem nižším** (pochopitelně za předpokladu, že mezi těmito místy existuje spojení umožňující průtok). Toto základní pravidlo by nám však v praxi příliš nepomohlo, pokud bychom nebyli schopni posoudit, jaké okolnosti mohou měnit hodnotu chemického potenciálu vody v jednotlivých částech rostliny.

Voda v rostlinách se obvykle nevyskytuje v čistém stavu, ale jako součást roztoků. Hodnota chemického potenciálu vody v roztoku závisí především na množství látek v ní rozpuštěných a dále na tlaku, kterému je v buňkách vystavena.

Čím vyšší je vnitrobuněčný, hydrostatický tlak v buňkách (označovaný též jako *turgorový tlak* či *turgor*), tím vyšší hodnotu má i chemický potenciál vnitrobuněčné vody. S koncentrací rozpuštěných látek (*solutu*) naopak chemický potenciál vody klesá, neboť aktivita molekul vody je omezována interakcemi s molekulami solutu.

Chemický potenciál je mírou volné energie jednoho molu chemické látky

Volná energie = ta část energie určité chemické látky, kterou lze v daném systému nějak využít, přesněji **přeměnit v práci**, tedy způsobit změny spojené se *spotřebou energie* (např. mechanické změny - deformace, přesuny částic a těles, ale i překonávání vlivu gravitačního či elektromagnetického pole. Také zahrnuje procesy spojené s *předáním energie* jinému systému či s *přeměnou do jiné formy energie*.

Gibbsova volná energie, užívaná u chemických soustav je definována pro **izotermické podmínky** (vliv změn teploty tedy není brán v úvahu). Ne vždy však s ní můžeme operovat ve fyziologii rostlin!

Aktuální hodnota chemického potenciálu látky n (μ_n , J mol⁻¹)

je závislá na působení celé řady okolností, v jakých se látka nachází, a které označujeme jako **složky chemického potenciálu**, např.:

tlak, koncentrace látky, elektrický náboj částic látky, poloha v gravitačním poli, poloha v elektromagnetickém poli, působení přítomných jiných látek ...

Aktuální hodnotu chemického potenciálu je výhodné stanovovat a vyjadřovat jako **odchylku od chemického potenciálu těže látky za standardních podmínek (μ_n^0)**

Snížení chemického potenciálu vody vlivem rozpuštěných látek lze nejjednodušší odvodit ze snížení tlaku vodních par nad roztokem. Pokud se mezi vodou v kapalném a v plynném stavu ustaví rovnováha, pak i chemické potenciály obou fází musí být shodné. Pokles chemického potenciálu je snáze měřitelný u vody v plynném stavu, a sice ze *snížení tlaku vodních par* v nasyceném stavu (či z dalších charakteristik, které jsou na tomto tlaku přímo závislé, jako je např. hustota vodních par nebo relativní vlhkost vzduchu).

Kromě přímého měření můžeme snížení tlaku vodních par také vypočítat z koncentrace roztoku vyjádřené molárním zlomkem vody. Podle *Raoultova zákona* musí být tlak nasycených vodních par nad roztokem (p_v^r) roven součinu tlaku nasycených vodních par nad čistou vodou (p_v^0) a molárního zlomku vody (X_v): $p_v^r = p_v^0 \cdot X_v$

Hodnotu chemického potenciálu vody v roztoku (μ_v^r , za všech ostatních podmínek ve standardním stavu) pak můžeme vypočítat ze vztahu:

$$\mu_v^r = \mu_v^0 + RT \ln X_v$$

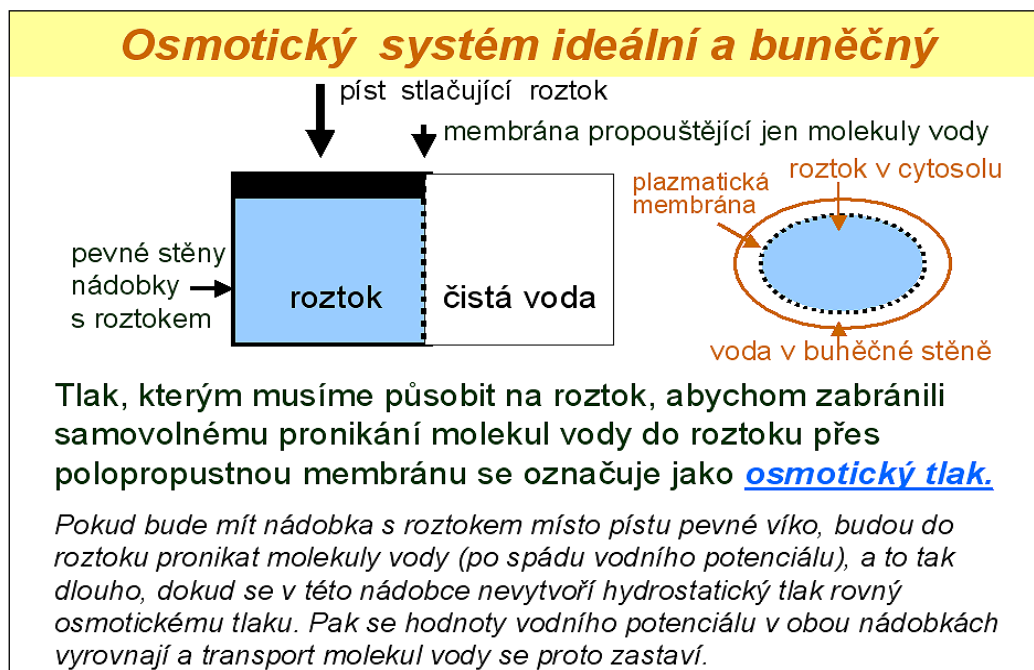
μ_v^0 = chemický potenciál čisté vody ($J \text{ mol}^{-1}$),

R = plynová konstanta ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$),

T = absolutní teplota (K).

Chemický potenciál vody je hodnotou *relativní* (což ostatně platí o potenciálech obecně), udává tedy vždy jen rozdíl mezi energetickým stavem vody za aktuálních podmínek a za podmínek standardních. Hodnota μ_v^0 a příslušné standardní podmínky za kterých platí, jsou věcí dohody.

Snížení chemického potenciálu vody vlivem rozpuštěných látek lze odvodit také jiným způsobem, a sice z měření (či výpočtu) *osmotického tlaku*.



U roztoků, které nemáme uzavřené v takovéto měrné soustavě, vyjadřují hodnoty osmotického tlaku pouze jejich *potenciální schopnost tento tlak za vhodných podmínek způsobit*. Proto se také někdy používá termín *osmotický potenciál*. Závislost osmotického tlaku (či osmotického potenciálu) na koncentraci roztoku, který je v kontaktu s čistou vodou, popsal *van't Hoff*:

$$\pi = RT C i$$

π = osmotický tlak (Pa)

C = koncentrace vyjádřená molalitou roztoku (počet molů rozpuštěné látky na 1 kg vody),

i = parametr zohledňující disociaci (ionizaci) molekul rozpuštěné látky a jiné odchylky od ideálního roztoku.

Vodní potenciál a jeho dvě hlavní složky

Chemický potenciál vyjadřujeme obvykle v jednotkách *energie* na jednotku množství látky, zatímco v biologických systémech jsou z řady důvodů praktičtější jednotky *tlaku*. Nejde jen o zmíněný a snadno měřitelný osmotický tlak. Aktivitu vody v rostlinách velice ovlivňuje i hydrostatický tlak a adhezni síly, také lépe měřitelné v tlakových jednotkách.

Proto se v biologii častěji používají (jako měřítko volné energie vody) transformované hodnoty chemického potenciálu, označované *vodní potenciál* (Ψ): **Vodní potenciál je chemický potenciál vody v systému vyjádřený v jednotkách tlaku a srovnávaný s chemickým potenciálem čisté vody za atmosférického tlaku a téže teploty.**

$$\Psi = \frac{\mu_v^r - \mu_v^0}{V_v}$$

Ψ = vodní potenciál (Pa)

μ_v^r = chemický potenciál vody v roztoku (obecně v systému),

μ_v^0 = chemický potenciál čisté vody,

V_v = molární objem vody ($18.016 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$).

Převedení na jednotky tlaku je umožněno vztažením rozdílu chemických potenciálů na objemovou jednotku (V_v). Mezi vodním potenciálem a chemickým potenciálem vody existuje prakticky lineární závislost, neboť molární objem vody je veličinou téměř konstantní. Je proto možné popisovat stejné děje v rostlinách jak hodnotami vodního potenciálu, tak i původního chemického potenciálu.

Referenční *hodnota chemického potenciálu čisté vody* (μ_v^0), je pro výpočet vodního potenciálu konvenčně brána jako *nulová za atmosférického tlaku a téže teploty, jako má voda v systému*, což zjednodušuje výpočty. Současně to znamená, že hodnoty vodního potenciálu roztoků v rostlinách jsou téměř vždy záporné (= nižší než chemický potenciál čisté vody).

Pro vodní potenciál v rostlinách platí totéž, co již bylo řečeno na začátku této kapitoly ve spojitosti s chemickým potenciálem vody: *je zvyšován působením hydrostatického tlaku (obvykle jde o turgorový tlak v buňkách), a naopak snižován vzrůstající koncentrací rozpuštěných látek*. Vliv koncentrace lze na společné tlakové jednotky převést nejsnadněji pomocí osmotického tlaku (π), jak již bylo vysvětleno. Potom platí (zjednodušeně):

$$\Psi = p - \pi$$

Je důležité si uvědomit, že *hydrostatický tlak* (p) *v tomto vztahu považujeme za nulový, pokud má stejnou hodnotu jako tlak vzduchu v okolní atmosféře* (i když v absolutním měřítku nemá tlak vzduchu v atmosféře nulovou hodnotu, ale přibližně $+0,1 \text{ MPa}$!). Pokud tedy tlak v buňkách poklesne na hodnotu tlaku vzduchu v okolí rostliny (např. při ztrátě turgoru za nedostatku vody, který se projeví vadnutím rostliny), pak vodní potenciál buněk bude číselně roven osmotickému tlaku jejich vnitřních roztoků (ovšem se záporným znaménkem).

Pokud by však došlo v buněčných strukturách k poklesu tlaku pod hodnotu tlaku vzduchu v okolní atmosféře (což označujeme jako podtlak nebo též napětí), hodnota p pak bude záporná, a to způsobí pokles vodního potenciálu pod hodnotu danou osmotickým tlakem. K tomu běžně dochází při transportu vody ve vodivých elementech xylému, kde se výparem z listů vytváří podtlak snižující vodní potenciál transportovaných roztoků.

Hodnoty koncentrační (osmotické) i tlakové složky vodního potenciálu se mohou v různých částech rostliny poměrně rychle měnit, a tudíž i jejich *relativní významnost* pro výsledný vodní potenciál může být různá. Dosti užitečné je vycházet ze zjednodušené představy *buňky jako osmotického systému*, odděleného od apoplastového okolí polo-propustnou plazmatickou membránou (viz obrázek na předcházející straně). V takovém případě musí dojít v ustáleném stavu k vyrovnání chemického potenciálu vody uvnitř buňky s chemickým potenciálem vody ve vnějším prostředí. Pokud tedy mají buňky ve svém okolí dostatek vody s minimálním obsahem solí, jaká obvykle bývá v apoplastu, pak i při velkém obsahu osmoticky aktivních látek ve vakuole či v cytosolu může vodní potenciál těchto buněk dosáhnout téměř maximální (nulové) hodnoty.

Osmotickým příjmem vody se může uvnitř buněk zvýšit hydrostatický tlak natolik, že zcela

kompenzuje negativní působení rozpuštěných látek (= osmotické složky) na snížení vodního potenciálu ($p - \pi = 0$). Při dostatečně pevných, téměř neroztažných buněčných stěnách (které jsou charakteristické právě jen pro rostlinné buňky), stačí k tomuto zvýšení hydrostatického tlaku příjem velmi malého množství vody. Také ale při velmi malé ztrátě vody rychle poklesá vodní potenciál.

Vliv okolního prostředí na vodní potenciál a turgor v buňce – základní pravidla

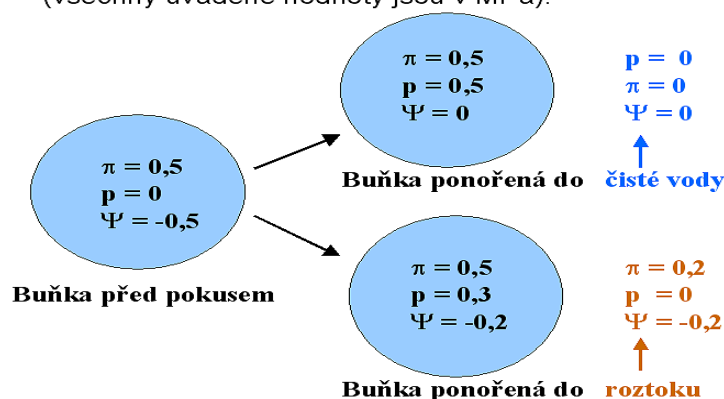
- po jisté době se hodnoty vodního potenciálu buňky vyrovnají s hodnotami vodního potenciálu okolního prostředí,
- maximální turgorový tlak v buňce obklopené čistou vodou je roven osmotickému tlaku buňky,
- maximální turgorový tlak v buňce obklopené roztokem odpovídá rozdílu osmotických tlaků buňky a roztoku v okolí.

Vnitřní řízení osmotických dějů v rostlinných buňkách a jeho význam

- Rostlinné buňky mohou **rychle měnit svůj osmotický tlak**, a to především transportem iontů draslíku přes plasmatickou membránu v obou směrech,
- Díky pevné buněčné stěně mohou rostlinné buňky zvýšit turgorový tlak (a tím i vodní potenciál) již při osmotickém příjmu velmi malého množství vody,
- Osmoticky dosažené zvýšení hodnot vodního potenciálu zvyšuje rychlost biochemických procesů,
- Osmoticky dosažené zvýšení turgoru je nutné pro zajištění mechanické pevnosti orgánů rostliny a je také nutnou podmínkou pro prodlužovací růst buněk.

Příklad výpočtu změn tlaku v buňkách v závislosti na změnách vnějšího prostředí

Vycházíme ze základního vztahu: $\Psi = p - \pi$ ($\Rightarrow p = \Psi + \pi$)
(všechny uváděné hodnoty jsou v MPa).



Další, méně významné složky vodního potenciálu

Na rozdíl od běžného stanovování chemického potenciálu látek v *chemickém* výzkumu, při práci s rostlinami se jedná o systémy komplexnější a rozměrnější. Při transportu vody do větších výšek (tedy především u stromů), je potřeba dodat jisté množství energie na překonání **gravitace**. Potom tedy platí, že *voda (čistá či v roztoku) ve větší výšce, než je referenční vzorek (téhož složení a za téhož tlaku) má vodní potenciál zvýšený o gravitační složku*. Při transportu vody do výšky 10 metrů nad místem jejího příjmu je hodnota vodního potenciálu této vody zvýšena přibližně o 0,1 MPa, při transportu do 100 m pak o 1 MPa.

Kromě tlakové, osmotické a gravitační složky vodního potenciálu se někdy uvádí ještě další, označovaná jako **složka matriční**, která způsobuje *snížení vodního potenciálu při interakci molekul vody s povrchy pevných látek*. V běžném vodním režimu rostliny má vcelku zanedbatelný význam. K matriční složce vodního potenciálu se například počítá snížení vodního potenciálu vazbou molekul vody na koloidní částice v půdě, na struktury uvnitř buňky (např. proteiny, membrány), a v buněčných stěnách (fibrily celulózy). Molekuly vody mohou vytvářet velmi tenké hydratační obaly kolem pevných částic, ve kterých jsou poutány silami o velikosti i několika desítek MPa. Pokud je ovšem přítomna také voda hydratačně nevázaná (což je vždy kromě případů extrémního vyschnutí), pak *její* vodní potenciál určuje celkový vodní potenciál v příslušné struktuře.

Vazba vody v buněčných stěnách, zahrnovaná též někdy do matričního potenciálu, může být i poněkud jiného charakteru. Jde o vodu poutanou *kapilárními silami* (o kterých se ještě zmíním později) v jemných pórech těchto stěn. Vlivem adheze molekul vody k pevným stěnám pórů (tedy v podstatě kapilár), dochází ke snížení hydrostatického tlaku ve vodním sloupečku pod úrovní menisku. Proto lze její vliv na snížení vodního potenciálu v buněčné stěně zahrnout spíše do tlakové složky (**p**). *Tlakový rozdíl* způsobený kapilárními silami ve vysychajících (či zvlhčovaných po předchozím vyschnutí) buněčných stěnách. I u mrtvých buněk, např. dřeva, může dosáhnout řádově desítky MPa. Prakticky se projevuje např. při botnání dřeva a suchých semen (*imbiční síly*). Jak uvidíme později, kapilární síly mají zásadní význam i pro dálkový transport vody v xylému.

Pomocí hodnot vodního potenciálu (Ψ) můžeme poměrně jednoduchým způsobem kvantifikovat termodynamický stav vody nejen v rostlině, ale i v jejím okolí. To má zvlášť velký význam pro ekologickou fyziologii, která studuje interakce rostlin s prostředím. Při studiu vodního režimu rostlin se obvykle snažíme o *kvantifikaci celého toku vody z půdy přes rostlinu do atmosféry*. Voda protéká tímto směrem jen v tom případě, pokud existuje stálý rozdíl mezi hodnotami Ψ půdní vody v okolí kořenů (kde musí být nejvyšší) a hodnotami Ψ vody v orgánech rostliny (postupně klesající od kořenů k listům). Nejnižší hodnotu Ψ pak musí mít voda (ve formě vodní páry) ve vzduchu v okolí listů. Hodnoty Ψ půdy jsou za příznivých vlhkostních podmínek velmi vysoké (tedy blízké hodnotám Ψ čisté vody), neboť koncentrace solí v půdním roztoku bývá obvykle velmi malá a tlaková složka se zde prakticky neuplatňuje. Vzduch v půdních pórech má stejný tlak, jaký je v okolní atmosféře. Naopak vodní potenciál vzduchu v okolí nadzemních částí rostlin bývá v denních hodinách velice nízký. Jeho hodnotu lze vypočítat z *naměřené relativní vlhkosti vzduchu* (w , vyjádřené desetinným zlomkem v logaritmickém tvaru) a teploty (**T**, uvedené v Kelvinech), protože poměr mezi plynovou konstantou (**R**) a molárním objemem vody (V_v) je téměř stálý:

$$\Psi \text{ (MPa)} = \frac{RT}{V_v} \ln w = 0,4618 \cdot T \cdot \ln w$$

Je-li tedy např. relativní vlhkost vzduchu 0,5 (tedy 50%, což je běžné) a teplota vzduchu 20 °C (= 293,15 K), pak $\Psi = -93,8$ MPa. *V nočních hodinách* však často bývá vzduch nasycen vodní parou (100% relativní vlhkost) - v tom případě Ψ vzduchu se radikálně zvýší na hodnotu blízkou nule a tok vody se zastaví. Příklady obvyklých hodnot vodního potenciálu (vše v MPa):

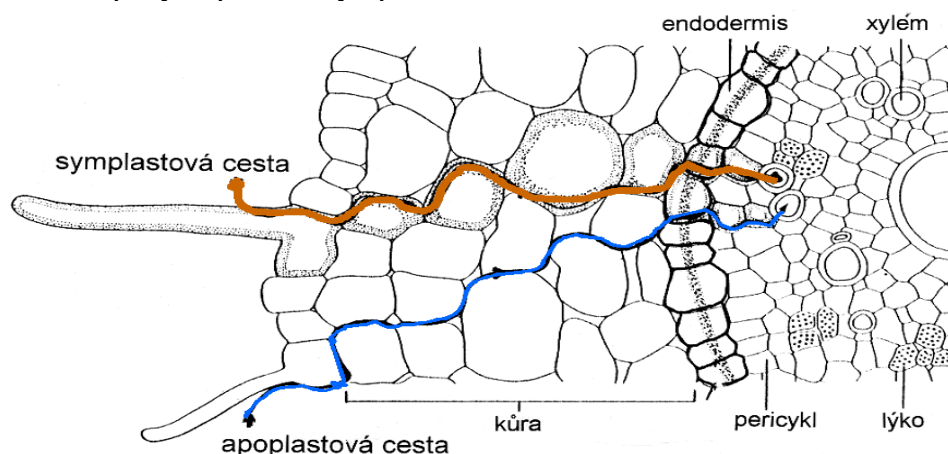
vlhká půda	-0,01 až -0,05
půda vyschlá k bodu trvalého vadnutí	-1,5
kořeny	-0,1 až -1,5
listy (v průběhu dne, bez plné turgescence)	-0,2 až -2,0

Příjem vody kořeny a radiální transport

Kořeny jsou hlavním místem vstupu vody z vnějšího prostředí do rostliny. Neaktivnější zóna příjmu vody u mladých kořenů leží asi 10 až 50 mm od kořenové špičky, tedy tam, kde obvykle dochází k největší tvorbě kořenových vlásků. V této části kořene bývají již dokonale vyvinuty vodivé elementy xylému. U starších částí kořene sorpční aktivita klesá, hlavně v důsledku suberinizace (zkorkovatění) jejich povrchových pletiv. Avšak i u těchto kořenů bývá obvykle příjem vody měřitelný a vzhledem k jejich ploše i dosti významný.

Kořenové vlásky jsou modifikované epidermální buňky, ale jejich schopnost přijímat vodu pro vodu (vztaženo na jednotku povrchu) není o nic větší než u ostatních epidermálních buněk. Výrazně se však podílejí na zvětšení *celkového* sorpčního povrchu kořenů i na zvětšení objemu půdy, který může celá kořenová soustava využívat. Vzhledem ke svým rozměrům pronikají i do velmi malých pórů v půdních strukturách, ve kterých se v suché půdě nejdéle udržují zbytky vody.

Příjem vody z půdy do kořenů je možný pouze tehdy, je-li vodní potenciál půdního roztoku vyšší než vodní potenciál vody v kořenech (v opačném případě by mohlo docházet i k toku vody z rostliny do suché půdy!). Rychlost příjmu vody závisí jednak na velikosti rozdílů (gradientu, spádu) vodních potenciálů, jednak na hydraulické vodivosti kořenových pletiv v příčném (radiálním) směru, tedy od epidermis ke xylému. Obvykle se rozlišují dvě hlavní možnosti pohybu vody v radiálním směru: *apoplastová cesta*, při které voda do cytoplazmy nevstupuje, ale pohybuje se pouze buněčnými stěnami a volnými mezibuněčnými prostory, a *symplastová cesta*, kdy voda vstupuje do cytoplazmy a pokračuje v dalším pohybu pouze v symplastu:



Schema symplastové a apoplastové cesty transportu vody a rozpuštěných látek v kořenových pletivech.

Obvykle se současně využívají obě cesty. Vstup vody do symplastu (tedy z buněčných stěn do protoplastů kořenových buněk přes jejich plazmatické membrány) je možný podél celého apoplastového toku. Přesto odpor, který musí voda překonávat při poměrně krátkém radiálním transportu, může být někdy vyšší než při toku vodivými elementy xylému.

Souvislý tok vody apoplastovou cestou buněčnými stěnami z epidermis až do xylému (který je také apoplastovou strukturou!), tedy bez jediného přestupu přes cytoplazmatickou membránu, není možný. V cestě tomuto toku stojí totiž suberinem impregnované (a tudíž pro vodu nepropustné) radiální části buněčných stěn v *endodermis* (*Caspariho proužky*). Navíc, jak bylo nyní dokázáno, u kořenů většiny rostlin (88% druhů z dosud zkoumaných 52 čeledí) je vyvinuta kromě endodermis ještě *exodermis*, což je podpokožková vrstva buněk s obdobnou stavbou jakou má endodermis. Buňky těchto vrstev nejsou samozřejmě zcela nepropustné pro vodu, která ovšem musí nejprve vstoupit přes plazmatickou membránu do jejich vnitřního roztoku (cytosolu), tedy do symplastu. Mezibuněčný transport vody a rozpuštěných látek velmi usnadňují hojná *plazmodesmata*, což jsou volně propustné kanálky v buněčné stěně nepokryté plazmatickou membránou. Vstup vody do vodivých elementů xylému je ale opět spojen s přestupem přes plazmatickou membránu přiléhajících buněk. Na vytvoření nezbytného gradientu (snížením vodního potenciálu v blízkosti xylému) má hlavní podíl podtlak v xylému (zejména v denních hodinách při výparu vody z listů).

Transmembránový transport vody

Příjem vody do rostliny i vnitrobuněčné přesuny vody mezi cytosolem a organelami jsou neodmyslitelně spojeny s transportem přes biologické *membrány*. Jedině díky membránám mohou rostlinné buňky (ale i jejich součásti, zejména vakuoly) fungovat jako osmoticky aktivní systémy. Biologické membrány ovšem nejsou propustné pouze pro vodu, ale též, i když mnohem méně, pro rozpuštěné látky. Nemohou být propustné jen pro vodu už z toho důvodu, že rostlina musí přijímat

a transportovat ionty solí i menší organické molekuly. Odchytky od vlastností ideálně polopropustné membrány způsobují, že buňky nemohou dosáhnout takového turgorového (hydrostatického) tlaku, který by odpovídal teoretické hodnotě osmotického tlaku, i kdyby byla v jejich okolí čistá voda.

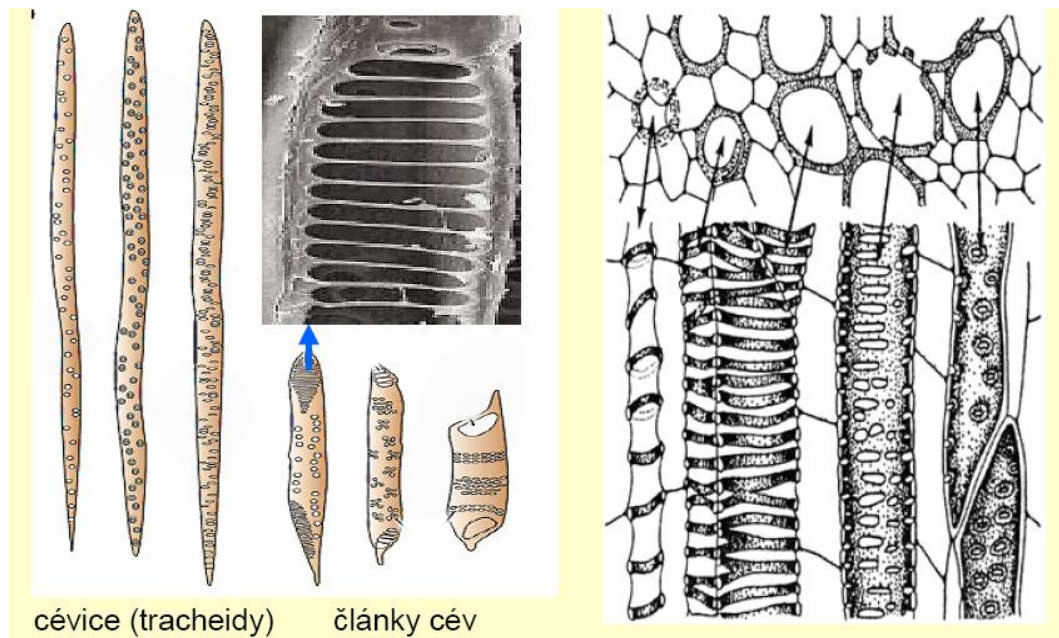
Většina molekul vody proniká přes biologické membrány póry, které vytvářejí speciální *transmembránové proteiny (akvaporíny)*. Mají vysokou transportní kapacitou a selektivitu. Propouštějí jen molekuly vody. Jejich struktura a funkce je blíže popsána na str. 21 a 22. Rostliny mohou jejich počet (plošnou hustotu) v membránách poměrně rychle měnit (syntézou či rozkladem) podle aktuální potřeby, tedy zda je za daných okolností žádoucí zrychlit či zpomalit transport. Akvaporínů je celá řada typů (= proteinů kódovaných odlišnými geny) i u téže buňky. Akvaporíny v rostlinných buňkách (na rozdíl od živočišných) nejsou pouhé trvale otevřené kanálky (tedy právě poríny), jak se dříve soudilo, ale mají schopnost se v případě potřeby zavírat (např. za nedostatku vody v půdě či při zaplavení půdy). V otevřeném stavu je však jejich transportní kapacita neobyčejně vysoká, řádově asi jedna miliarda (10^9) molekul vody za sekundu. V každém případě se jedná o transport pasivní, který není spojen se spotřebou metabolické energie.

Hybnou silou transportu vody přes membrány je *rozdíl vodních potenciálů* roztoků na obou stranách membrány ($\Delta\Psi$), který je ovšem daný rozdílem tlaků (Δp) a koncentrací roztoků (vyjádřené rozdílem jejich osmotických tlaků, $\Delta\pi$). K tomu ještě přistupují specifické vlastnosti membrány (např. plošná hustota a stupeň otevřenosti akvaporínů) vyjádřené v hodnotách její *hydraulické vodivosti, L_p* . *Rychlost toku vody přes membránu* (J , $m \cdot s^{-1}$) je pak:

$$J = L_p \cdot \Delta\Psi = L_p \cdot (\Delta p - \Delta\pi)$$

Transport vody v xylému

Dálkový (meziorgánový) transport vody v rostlinách probíhá v daleko největší míře ve specializovaných transportních pletivech. Vodivé elementy dřeva (xylému) bývají tvořeny *cévami (tracheje)* a *cévicemi (tracheidy)*. U evolučně starších rostlin (především nahosemenných) nalézáme jen tracheidy.



Ukázka nejčastějších tvarů a vnitřní stavby vodivých elementů xylému.

Tok vody xylémem je v podstatě fyzikální proces, a proto jeho mechanismus je dnes již docela dobře znám. Podle nyní všeobecně uznávané *kohezní teorie* je hybnou silou transportu vody podtlak (tlak menší než atmosférický) ve vodivých elementech xylému, způsobený vypařováním vody v nadzemních částech, tedy na samém konci vodivých drah. Tato teorie byla navržena již na počátku 20. století (Münch 1930), když se s konečnou platností nepotvrdily původní hypotézy o aktivním (metabolicky hnaném) transportu.

Při ověřování platnosti kohezní teorie bylo potřeba ověřovat, zda platí základní předpoklady, na kterých je postavena:

- může vůbec vzniknout v zakončení xylému (v okolí cév v listech) dostatečně velký podtlak ?
- má vodní sloupec v cévách natolik velkou soudržnost, aby při velkém snížení tlaku nedošlo k jeho přetržení?
- jakým mechanismem je zabezpečen celý systém proti náhodným poruchám (zejména proti ucpání cév a cévic bublinkami plynů)?

Hlavní síly, které táhnou dlouhé sloupce vody v cévách směrem vzhůru, je nutno hledat v *buněčných stěnách listového mezofylu*. Voda v úzkých pórech mezi mikrofibrilami celulózy má velmi *ostrý úhel smáčení*, daný vysokou přilnavostí (adhezí) molekul vody k celulózovým povrchům. Vezmeme-li ještě v úvahu *vysoké povrchové napětí vody*, pak negativní tlak, který se v těchto pórech (mikrokapilárách) může pod sloupečky vody vytvořit, je značný (viz rámeček níže).

Zvláštní význam má *malý průměr kapilárních pórů*, neboť velikost negativního tlaku je na něm úzce závislá. Voda může v kapilárních trubiciích xylému zajisté také *vzlínat* do jisté výšky, a to i bez napojení na listová pletiva. V *cévách* o průměru např. 100 μm se kapilaritou sníží tlak asi o 0,003 MPa pod hodnotu tlaku atmosférického, což postačuje k vyzdvižení sloupečku vody do výšky pouze 0,3 m. To by ovšem bylo pro transport vody u většiny vyšších rostlin nedostatečné. *Kapilární póry v buněčných stěnách* jsou však mnohem tenčí, mají průměr jen asi 10 nm. V tom případě lze dosáhnout snížení tlaku až o 30 MPa, což by čistě teoreticky mělo postačovat na transport vody až do výšky 3000 m. V dynamickém systému se stálým tokem (při výparu z listů) však takovýchto hodnot nelze dosáhnout, neboť je potřeba vynaložit jistou sílu i na překonání tření transportované vody o stěny vodivých elementů. Nicméně, pro transport i do korun těch nejvyšších stromů (což je asi 100 metrů) by měl být vytvořený podtlak naprosto dostatečný.

Systém tenkých kapilár v buněčných stěnách, ve kterém lze dosáhnout velkého snížení tlaku, je ale samostatně (bez napojení na širší kapiláry v xylému) nepoužitelný pro transport vody na delší vzdálenosti, neboť *klade toku vody velký odpor* (třením molekul vody o stěny). Ten totiž vzrůstá nejen se zmenšováním průměru kapiláry, ale i s délkou transportní dráhy.

SÍLY PŮSOBÍCÍ V KAPILÁŘE :

σ - povrchové napětí vody
 α - kontaktní úhel adheze
 r - poloměr kapiláry
 h - výška sloupečku
 ρ - hustota vody
 g - gravitační zrychlení

$\sigma \cdot \cos \alpha \cdot 2\pi \cdot r$

$\pi \cdot r^2 \cdot h \cdot \rho \cdot g$

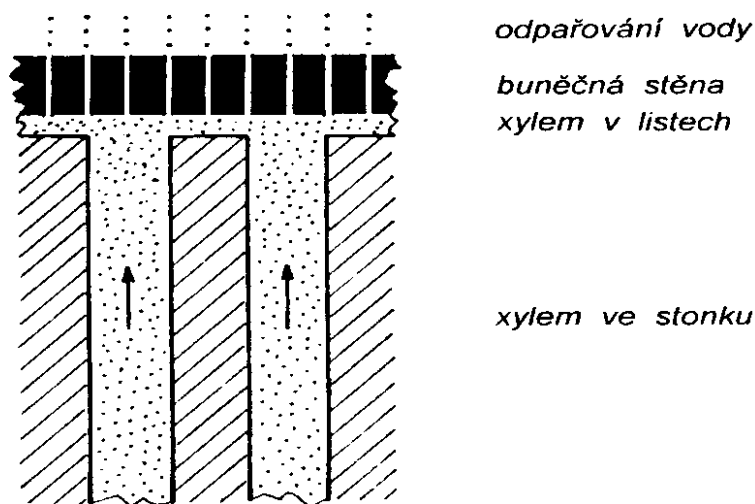
Přibližný výpočet tlaku (p) pod meniskem vody v kapiláře s velkou smáčivostí stěn (cévy, póry v buněčné stěně):

$$p \text{ (MPa)} = - 0,3 / 2r$$

Příklady :

Pro cévu v xylému ($r = 25 \mu\text{m}$): $p = - 0,006 \text{ MPa}$ ($\approx h = 0,6 \text{ m}$)
 Pro póry v buněčné stěně ($r = 0.005 \mu\text{m}$): $p = -30 \text{ MPa}$ ($\approx h = 3000 \text{ m}$)

Obecné schéma rozložení sil určujících velikost "samovolného" vzestupu sloupečku vody v kapilárách.



Velmi zjednodušené znázornění principu funkce xylémové soustavy v rostlinách, složené ze dvou typů kapilár. Na velmi úzké a krátké kapiláry (tvořené póry v buněčných stěnách listového parenchymu) jsou napojeny široké a dlouhé kapiláry xylému.

A nyní se podívejme, jaká je *soudržnost vodního sloupce* v cévách. Molekuly vody jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky. K jejich narušení by mělo teoreticky dojít až při hodnotách podtlaku přibližně 30 MPa. V praxi ale takové hodnoty soudržnosti nelze dosáhnout z řady důvodů. Jedním z nich je vliv rozpuštěných látek (včetně plynů), které mohou soudržné síly molekul vody značně snižovat. Z výsledků mnoha pokusů a pozorování vyplývá, že soudržnost vodních sloupečků v cévách je také značně závislá na jejich šířce (průměru). V cévách velmi širokých (400 až 500 μm) může dojít k přetržení sloupce již při podtlaku asi 2 MPa, ale ve velmi úzkých cévách a cévicích (o průměru 10 až 50 μm) dochází k přetržení až při snížení tlaku o 10 až 20 MPa. Vidíme tedy, že **úzké vodivé elementy jsou provozně bezpečnější, ovšem na druhé straně kladou toku vody velký odpor (= mají malou vodivost pro vodu)**. Ta vzrůstá se čtvrtou mocninou poloměru kapiláry.

Je proto zřejmé, že nejčastější vnitřní šířka vodivých elementů u rostlin (50-100 μm) je výsledkem kompromisního "řešení" dvou protichůdných požadavků (či lépe řečeno optimalizačního procesu v průběhu evoluce), kdy je zaručena jednak dostatečná vodivost, ale současně i dostatečná bezpečnost provozu. Často je kompromisu dosaženo také zastoupením cév či cévic různé šířky v tomtéž cévním svazku.

Přesto se však může stát (a je to dosti častý případ), že ve vodivých elementech xylému dojde k přetržení některých sloupečků vody a vytvoří se v nich dutiny vyplněné plyny (*kavitace, plynová embolie*). K tomu může dojít jednak při extrémním suchu, kdy hodnoty podtlaku v xylému vzrostou až za kritickou mez soudržnosti molekul vody. Častěji však způsobují kavitaci některé plyny, které byly rozpuštěny ve vodě přijímané kořeny a v xylému za velmi sníženého tlaku se z ní uvolňují. K vyloučení plynů může dojít i při zvýšení teploty nadzemních částí (ve srovnání s kořeny), neboť rozpustnost plynů s teplotou klesá. Další velmi častou příčinou kavitace je zamrznutí vody v xylému (spojené se zmenšením jejího objemu) u vytrvalých rostlin v průběhu zimního období. Samozřejmě jakékoli poranění vodivých pletiv (v extrémním případě úplné přerušení, např. u řezaných květin) vede okamžitě ke kavitačnímu ucpání cév a cévic.

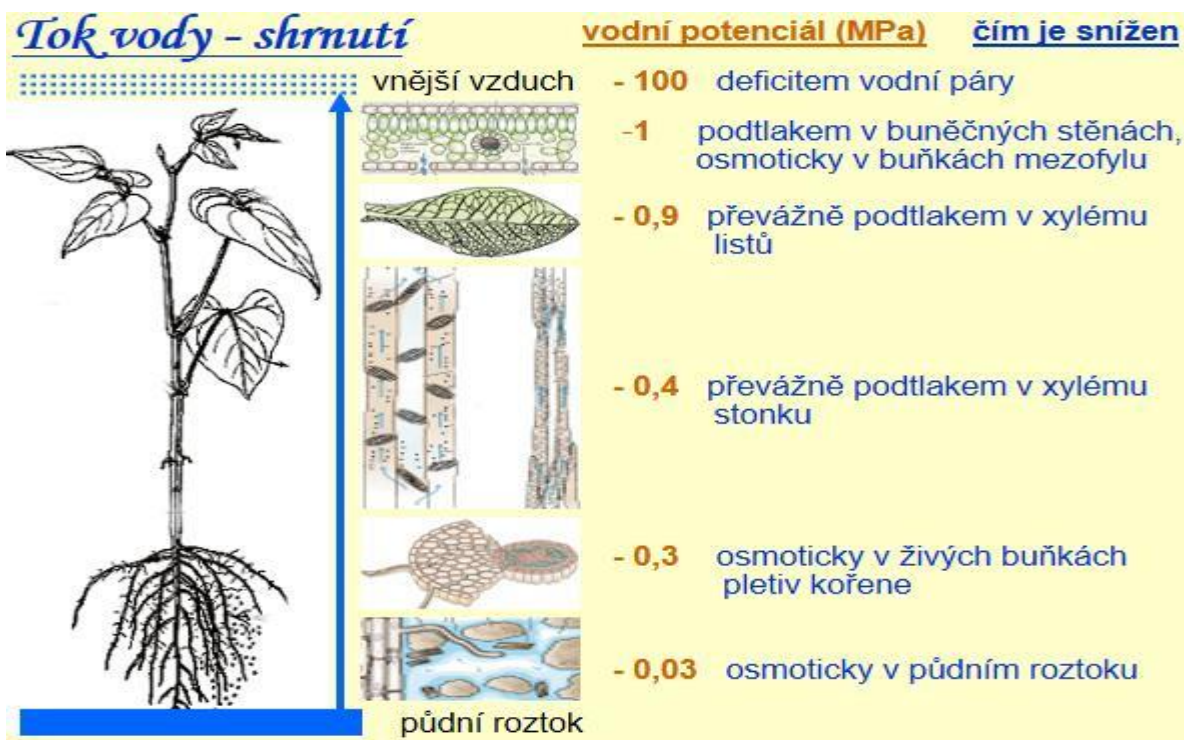
Nápravné mechanismy, které umožňují zajistit transport vody i v případě vzniklé kavitace, jsou několikerého druhu. Většina je ale založena na strukturních adaptacích (zvláštnostech stavby) xylému. Perforované *přepážky* na koncích jednotlivých článků cév či cévic jsou účinnou ochranou proti šíření bublinek na větší vzdálenosti (při velkém podtlaku mají původně malé bublinky tendenci rychle expandovat). Jednotlivé cévy či cévice jsou zřídka uloženy paralelně vedle sebe na delším úseku kmene, spíše se složitě proplétají. Proto voda, která vchází do kmene z jedné části kořene, může být současně rozváděna do mnoha větví koruny. Také *kapacita vodivých cest* je obvykle natolik velká, že vyřazení značného procenta cév z provozu ještě neohrozí život rostliny.

Některé druhy řeší poškození velkého množství cév v důsledku mrazové kavitace rychlou *tvorbou nových vodivých pletiv* na jaře (jarní přírůstek dřeva).

Kromě strukturních předpokladů ještě existují i *funkční mechanismy* nápravy kavitačního poškození cest pro vedení vody. Jsou založeny v první řadě na vytvoření pozitivního tlaku v cévách (*přetlaku* ve srovnání s okolní atmosférou). K tomu může dojít několika způsoby. Především v nočních hodinách, kdy vzhledem k vysoké vzdušné vlhkosti je zastaven výpar z rostlin (transpirace), je zastaven i xylémový tok. Přesto však dochází k membránovému transportu iontů (hlavně minerálních živin) do zakončení xylému v kořenech, neboť jejich transport je řízen zcela jinými mechanismy než transport vody, jak bude ještě blíže popsáno v další části tohoto textu. Osmoticky aktivní látky se v xylému hromadí, neboť jejich pohyb pouze difúzí (bez toku celého roztoku) je velice pomalý. Následuje osmoticky podmíněný přesun vody z okolního parenchymu do cév a tím i zvyšování tlaku v cévách, někdy až na hodnotu 0,02 MPa. Tento jev je běžný zejména u většiny bylin. Vytvořený přetlak ve vodivých elementech xylému, označovaný také jako **kořenový vztlak**, vede k opětovnému spojení většiny přerušovaných sloupečků.

U některých druhů rostlin, zejména u dřevin, nebývá kořenový vztlak v nočních hodinách měřitelný. Přesto i u nich existuje možnost dočasného vytvoření přetlaku v xylému. Principem je opět aktivní (metabolickou energií podmíněný) transport osmoticky aktivních látek do poškozených cév a cévic ze sousedících parenchymových buněk, spojený s pasivním (osmotickým, tedy difúzním) příjmem vody. K tomuto přestupu nedochází v kořenech, ale přímo v nadzemních částech v blízkosti poškozeného místa. Na rozdíl od kořenového vztlaku, ke kterému za příznivých podmínek (dostatek vody a živin v půdě) dochází bez ohledu na potřebu odstranění kavitace, osmotické zvyšování tlaku přímo ve stoncích bývá kavitačním poškozením části xylému vyvoláno. Celý mechanismus této indukce není dosud dostatečně znám.

Ještě zbývá uvést několik údajů o *maximální rychlosti transportu tekutin v xylému*. Za předpokladu, že tok vody není omezen na vstupu a výstupu, je jeho rychlost závislá na rozdílu hydrostatického tlaku mezi začátkem a koncem vodivých cest a dále na hydraulické vodivosti cév a cévic, která, jak víme, je dána především jejich vnitřní šířkou (světlostí). Maximální rychlosti toku vody, naměřené u listnatých stromů se širokými cévami (100 až 500 μm , jaké mají např. dub, jasan, jilm) dosahují až 45 metrů za hodinu. Ještě vyšší rychlost byla naměřena u některých lián. U druhů s úzkými cévami (nejčastěji 40 až 80 μm , např. ovocné stromy) a u jehličnatých stromů (tracheidy jsou zvláště úzké, jen asi 10 až 25 μm) bývají maximální rychlosti toku vody jen 1 až 6 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$.



Metody stanovení hlavních charakteristik stavu vody v rostlinách

Vodní potenciál je velmi obtížné stanovit nedestruktivně, tedy u neporušených rostlin či jejich částí. Obvykle proto pracujeme s odříznutými vzorky různé velikosti. K vlastnímu stanovení se nejčastěji používají dva principiálně odlišné přístupy.

Metoda hygrometrická vychází ze vztahu mezi relativní vlhkostí vzduchu a jeho vodním potenciálem, který byl již uveden. Uzavřeme-li vzorek rostliny (nebo půdy, roztoku či jiného materiálu) do vhodné nádoby, pak se v ní po jisté době ustaví relativní vlhkost odpovídající vodnímu potenciálu ve vzorku. K přesnému měření vlhkosti vzduchu v nádobce (nejméně na 0,1%, a to ještě v oblasti blízké úplnému nasycení) se používají různé speciální postupy. K nejčastějším patří komůrky vybavené miniaturními teplotními čidly (termočlánky), jimiž se nejprve změří *psychrometrický rozdíl* (= rozdíl mezi teplotou suchého a ovlhčeného čidla) a z tohoto rozdílu se pak vypočítá či odečte v psychrometrických tabulkách hodnota relativní vlhkosti.

Jiné (modernější) typy aparatur jsou vybaveny miniaturními čidly pro měření teploty rosného bodu, ze které lze snadno vypočítat relativní vlhkost vzduchu. V tom případě je teplotní čidlo součástí miniaturního kovového zrcátka, umístěného v komůrce nad měřeným vzorkem. Zrcátko je pomalu elektricky zchlazováno a při počátku orosení se odečte jeho teplota (= teplota rosného bodu vzduchu nad vzorkem).

Při praktickém použití uvedených přístrojů se hodnoty vodního potenciálu měřených vzorků obvykle nezjišťují výpočtem z naměřených hodnot vlhkosti vzduchu, ale odečítají se z kalibrační křivky daného měřicího zařízení, získané měřením série vzorků o známém vodním potenciálu (obvykle roztoků solí o různé koncentraci). Podmínkou přesného měření jsou přísně izotermické podmínky (čidlo, vzorek a vzduch v nádobce).

Metoda tlaková je založena na měření tlaku, který je nutno vynaložit, aby se kompenzovalo snížení vodního potenciálu v pletivech rostliny. Část rostliny se uzavře do silnostěnné kovové nádoby, ovšem tak, aby řezná plocha (obvykle řapíku listu či stonku) procházela víkem na vnější stranu. V nádobce pak pomalu zvyšujeme tlak (z připojené nádoby se stlačeným vzduchem), a současně pozorujeme řeznou plochu. Jakmile se na ní objeví první kapičky vytlačené šťávy, odečteme hodnotu tlaku v nádobě se vzorkem. Tato hodnota numericky odpovídá vodnímu potenciálu vzorku. Při přesné práci je nutno ještě od ní odečíst hodnotu osmotického tlaku vytlačené šťávy. Ta ovšem bývá obvykle blízká nule, neboť šťáva je z buněk vytlačována v podstatě procesem *reverzní osmózy*, a mělo by tudíž jít o téměř čistou vodu. Tlaková metoda je v současné době využívána i pro stanovení řady dalších charakteristik stavu vody v rostlině (osmotické a tlakové složky vodního potenciálu, obsahu vody při nulovém tlakovém potenciálu, specifické vodivosti xylému pro transport vody), a také k získávání vzorků xylémové tekutiny pro chemické analýzy).

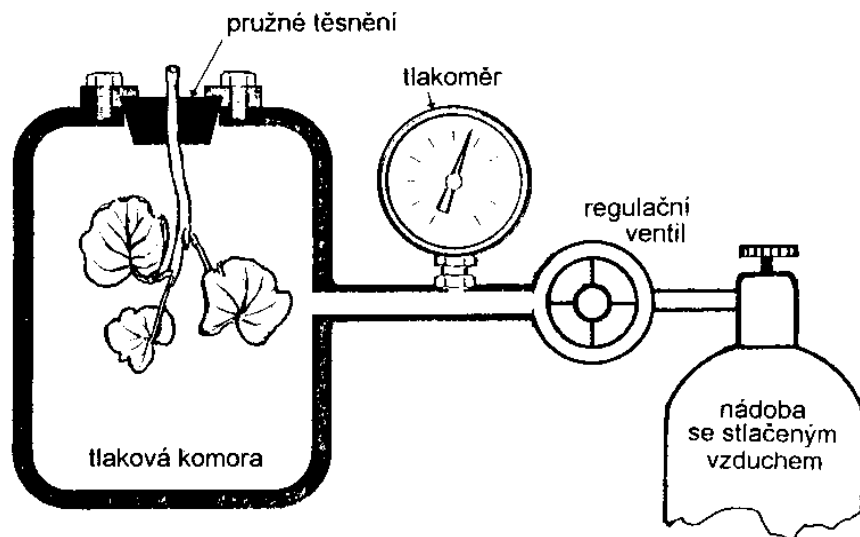


Schéma aparatury pro měření vodního potenciálu tlakovou metodou.

Existuje i řada starších metod, které se dnes používají jen zřídka. Patří k nim např. testování, jaká koncentrace vhodného osmotika (o známém osmotickém tlaku, a tudíž i známém vodním potenciálu) způsobí počínající plazmolýzu. Při hledání izotonického roztoku můžeme také postupovat tak, že ponecháme série shodných vzorků ponořené do vhodně odstupňovaných koncentracích osmotika, a po jisté době měříme změnu jejich délky či hmotnosti, nebo též změnu koncentrace roztoků pod vlivem expozice vzorků.

Osmotický tlak (π) se dnes už neměří pomocí klasických membránových osmometrů (zejména pro potíže s vhodnou membránou a časovou náročnost). Nejčastěji používáme *metodu kryoskopickou*. Při kryoskopii měříme *snížení bodu tuhnutí roztoku* (b , $\Delta^\circ\text{C}$), tedy v našem případě buněčných šťáv vylisovaných z rostliny. Bod tuhnutí je koligativní (= na množství částic v roztoku závislá) vlastnost roztoků, stejně tak jako osmotický tlak (π), a vztah mezi nimi je prakticky lineární:

$$\pi \text{ (MPa)} = 1,22 b$$

K měření osmotické složky vodního potenciálu lze využít i *hygrometrickou metodu*, zmíněnou v souvislosti s měřením celkového vodního potenciálu. Vzorek rostliny však nejprve usmrtíme (např. krátkým zmrazením). Poškozením membrán poklesne turgor na nulu a je tudíž vyloučena spoluúčast tlakové složky vodního potenciálu.

Turgorový tlak (= tlakovou složku vodního potenciálu, p) můžeme nepřímo stanovit z rozdílu mezi celkovým vodním potenciálem a osmotickým tlakem. V současné době však nabývá na stále větším významu technicky velmi obtížné *přímé měření hydrostatického tlaku* v buňkách (turgoru) pomocí tlakových sond. Při tomto postupu opatrně zavedeme tenkou skleněnou kapiláru naplněnou silikonovým olejem do nitra buňky. Kapilára je napojena na přesný elektrický tlakoměr. Při zavádění kapiláry a v průběhu vlastního měření se nesmí změnit původní objem buňky, neboť by to vážným způsobem ovlivnilo hodnoty měřeného tlaku.

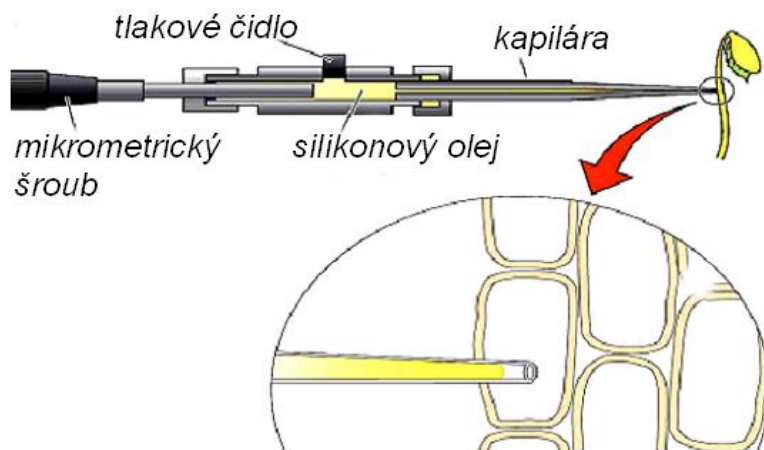


Schéma aparatury pro měření turgorového tlaku v buňkách

Rychlosti toku vody rostlinou lze principiálně zjišťovat měřením jejího *příjmu* (např. z úbytku objemu živného roztoku, ve kterém pokusnou rostlinu pěstujeme), nebo z *výdeje* vody z rostliny ve formě vodní páry (např. gazometricky ze zvýšení vlhkosti vzduchu v okolí rostliny). To je ovšem vhodné spíše pro laboratorní pokusy s poměrně malými rostlinami.

Pro terénní měření jsou metody stanovování rychlosti xylémového toku založené na principu *přenosu tepla*. Jestliže bodově ohřejeme jistou část stonku, šíření tepla ve směru toku vody bude rychlejší než v opačném směru, neboť přenos tepla bude urychlován proudící vodou (konvekci). Proto také teplota stonku (měřená velmi jemnými termočládky) v jisté vzdálenosti nad místem ohřevu bude vyšší než ve stejné vzdálenosti od místa ohřevu směrem dolů. Známe-li množství dodávaného tepla, pak ze zjištěného teplotního rozdílu můžeme vypočítat množství protékající vody, a z rychlosti reakce po tepelném impulzu také rychlost proudění. Stonek musí být v místě měření velmi dobře izolován proti ztrátám tepla do okolního vzduchu.

1.2 Transport iontů solí a organických látek

Rostliny svými kořeny přijímají nejen vodu, ale i celou řadu jiných chemických látek, ze kterých daleko nejhojnější jsou ionty jednoduchých anorganických solí. Ty nejdůležitější z nich, *nezbytné* pro metabolismus rostliny, označujeme jako *minerální živiny*. Představa, že rostlina nasává kořeny půdní roztok, tedy že přijímá rozpuštěné látky do svých buněk ve stejné koncentraci, v jaké jsou v půdním roztoku, by byla krajně nesprávná. Není to možné už z toho důvodu, že poměrný podíl jednotlivých látek v půdním roztoku naprosto neodpovídá jejich zastoupení v rostlinné biomase. Neregulovaný příjem by velmi rychle vedl ke vzniku toxicky vysokých koncentrací jedněch prvků a k vážnému nedostatku jiných prvků v těle rostliny.

Mechanismus příjmu a transportu iontů solí se tedy nutně musí odlišovat od procesů spojených s příjmem a transportem vody. Je zapotřebí, aby splňoval tyto základní předpoklady:

a) Vzhledem k velmi nízké koncentraci většiny iontů minerálních živin v půdním roztoku (často o několik řádů nižší, než nacházíme v buňkách kořenů), je nutné zajistit transport těchto iontů **proti koncentračnímu spádu** (z nižší koncentrace do vyšší).

b) Vzhledem k velkým rozdílům mezi koncentracemi jednotlivých iontů živin v půdním roztoku a potřebami rostliny, musí být kořeny schopny **řídít příjem každého iontu odděleně od ostatních**.

Podívejme se nyní, jakým způsobem je u rostlin zajištěno, že uvedené požadavky budou skutečně uspokojeny.

Buněčné membrány jako předpoklad řízeného příjmu iontů solí

Příjem iontů solí kořeny začíná jejich vstupem ve vodním roztoku do buněčných stěn epidermis, odkud mohou buď přecházet přes plazmatickou membránu (*plazmalemu*) do cytoplazmy, nebo pokračovat v putování apoplastem až k endodermis, a přitom postupně vstupovat do cytoplazmy korových buněk. Část iontů může být do buněk kůry vnášena i hyfami symbiotických hub. Dříve nebo později však musí dojít k přestupu iontů přes plazmalemu, a často i přes další membrány uvnitř buněk (např. *tonoplast* obalující vakuoly).

Jsou to právě *membrány buněk*, které mají hlavní podíl na řízení příjmu a transportu iontů solí a na zmíněných odlišnostech od příjmu vody. Poznání stavby a funkce buněčných membrán má proto klíčový význam pro pochopení celého mechanismu. Obecnými vlastnostmi membrán se zabývají detailně jiné vědní obory, zejména buněčná biologie a biofyzika. Připomeňme si alespoň několik nejdůležitějších údajů, které jsou pro náš další výklad skutečně nezbytné.

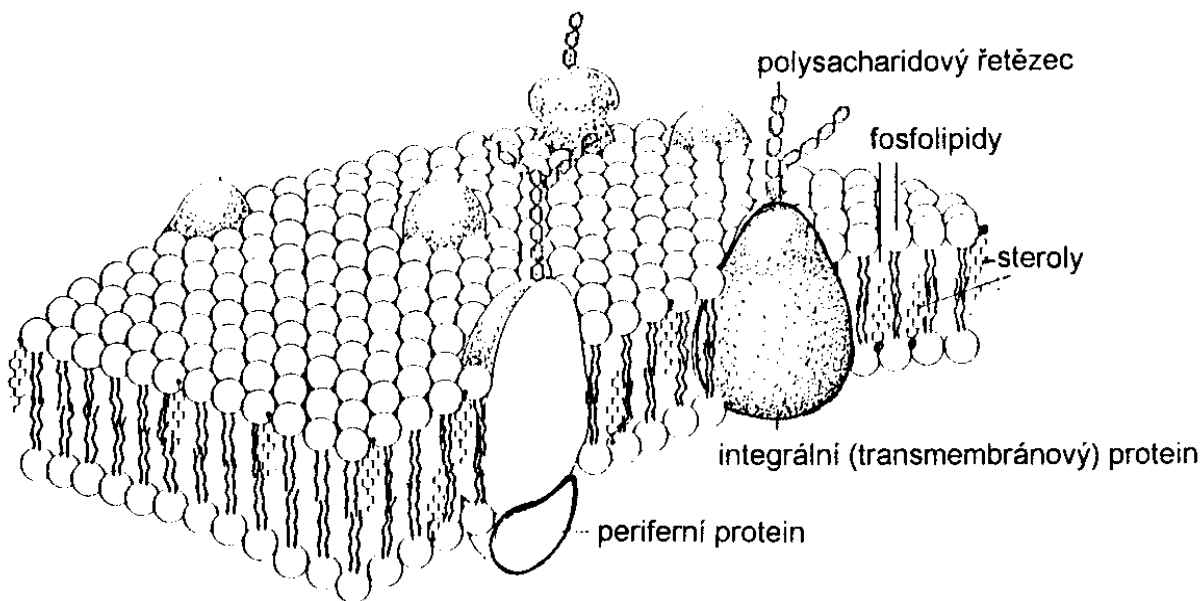
Základní stavba u všech biologických membrán je podobná, i když v detailech lze nalézt rozdíly, a to jak uvnitř téže buňky, tak i mezi orgány a druhy. Z hlediska hrubého látkového složení jde o směs proteinů a lipidů přibližně ve stejném poměru. Na některé z nich (2 až 10%) bývají navázány sacharidy. Kvalitativně významná je také vazba iontů vápníku (Ca^{2+}), bez kterých je funkce většiny membrán vážně poškozena.

Lipidovou složku membrán rostlinných buněk tvoří zejména:

- *fosfolipidy* (fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol a fosfatidylglycerol),
- *glykolipidy* (monogalaktosyldiglycerid a digalaktosyldiglycerid)
- *steroly* (hlavně sitosterol, stigmasterol, campesterol a jen poměrně vzácně cholesterol).

Základní hmota membrány je tvořena *dvěma* vrstvami molekul *lipidů*, které k sobě přisedají hydrofobními řetězci mastných kyselin, a zbylá hydrofilní část je orientována k vnějšímu povrchu. Na délce řetězců a počtu dvojných vazeb mastných kyselin jsou značně závislé fyzikální vlastnosti celé membrány. Lipidová dvojvrstva je pro ionty a větší polární molekuly prakticky nepropustná, takže velmi dobře odděluje buňku od vnějšího prostředí (funkce bariéry). Přitom je ale natolik pružná („polotekutá“), aby v ní mohlo docházet ke snadným výměnám, přemísťování

a konformačním změnám membránových bílkovin. Strukturální vlastnosti lipidové dvojvrstvy zásadním způsobem ovlivňuje přítomnost *sterolů*. Udržují uhlíkové řetězce fosfolipidů v uspořádaném stavu a tím snižují tekutost a propustnost membrány. Podíl molekul sterolů velice kolísá jak u membrán různých rostlinných druhů, tak i u různých orgánů téhož druhu. Mění se také působením rozdílných faktorů vnějšího prostředí.



Klasická představa buněčné membrány jako fluidní mozaiky.

Membránové proteiny můžeme rozdělit z funkčního hlediska do několika skupin:

- transportní proteiny. Ty umožňují transport iontů i větších molekul organických látek přes membránu. Patří k nim *poríny*, *selektivní kanály* a *přenašeče* (včetně protonových pump),
- receptory signálů a rozlišovače cizích molekul. Přenášejí signály z vnějšího prostředí k přenosovému řetězci v buňce. Dále rozlišují, které molekuly proteinů a polysacharidů budou odmítnuty nebo naopak přijaty pro další zpracování (obvykle jde o transport). K této rozlišovací funkci slouží především glykoproteiny.
- strukturální proteiny, které zpevňují a stabilizují strukturu membrán.

Z hlediska lokalizace v membráně rozdělujeme proteiny na *transmembránové (integrální)*, prostupující celou lipidovou dvojvrstvou, a *periferní*, které poměrně volně přisedají na povrch jedné strany membrány.

Vnitřní dvojité vrstvy lipidů dává biologickým membránám vlastnost elektricky izolujícího materiálu (dielektrika). Již velmi malá odchylka od elektroneutality v buněčném prostředí vytváří významný rozdíl v elektrickém potenciálu roztoků na obou stranách membrány. Tento rozdíl může dosahovat až několika set milivoltů, přičemž *cytosolová strana má negativní hodnoty* elektrického potenciálu, zatímco *elektrický potenciál vnějšího prostředí bývá považován konvenčně za nulový* (standardní).

Význam elektrochemického gradientu pro transport iontů

Obdobně jako tomu bylo u transportu vody, také ionty rozpuštěných látek se mohou pohybovat jak *difuzí*, tak i *hromadným (konvekčním) tokem*, v tom druhém případě ovšem jen ve společném proudu s molekulami vody. Hromadný tok je mnohem rychlejší než difuze a tudíž neobyčejně důležitý při dálkovém transportu nejen vody, ale i v ní rozpuštěných látek. Ovšem hromadný tok se v rostlinách uplatňuje převážně jen ve vodivých elementech cévních svazků. Buněčné membrány

představují nepřekonatelnou překážku pro hromadný tok zejména elektricky nabitých částic (iontů), a proto trans-membránový transport se děje buď (a) *difuzí* (hlavně přes iontové kanály), nebo (b) *energeticky dotovanými mechanismy* přes zvláštní typy transportních proteinů. Podíváme se nejprve ten jednodušší (difusní) proces.

Pro "*samovolný*" *transport iontů solí difuzí* přes buněčné membrány je zásadně důležitý rozdíl v chemickém potenciálu těchto iontů mezi místy oddělenými membránou. To ostatně platí obecně, nejen pro ionty, jak již víme z výkladu o transportu vody. **O chemickém potenciálu iontů solí rozhoduje nejen koncentrace, ale velký význam má i složka elektrická.**

Chemický potenciál, ve kterém hraje významnou úlohu elektrická složka, označujeme obvykle jako elektrochemický potenciál.

Elektrochemický potenciál iontu n v roztoku (μ_n) můžeme tedy zjednodušeně vyjádřit:

$$\mu_n = \mu_n^0 + RT \ln C_n + z_n F E$$

μ_n^0 = chemický potenciál iontu n za standardních podmínek,

RT = součin plynové konstanty a absolutní teploty,

C_n = koncentrace iontu n v roztoku (přesněji jeho aktivita),

z_n = valence iontu n ,

F = Faradayova konstanta ($9,65 \cdot 10^4 \text{ J V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$),

E = celkový elektrický potenciál roztoku (V).

Vliv rozdílné koncentrace na transport iontů (ale i jiných rozpuštěných látek)

Chemický potenciál (a tím i volná energie) rozpuštěných látek vzrůstá s jejich koncentrací. Změna volné energie (ΔG) spojená s přesunem 1 molu látky z místa a (o koncentraci C^a) do místa b (o koncentraci C^b) je:

$$\Delta G = RT \ln (C^a/C^b)$$

Pokud je C^b vyšší než C^a (když je potřeba transportovat látku z místa kde má nižší koncentraci do místa s vyšší koncentrací), je nutno dodat energii (= vynaložit práci), v opačném případě se energie uvolňuje - systém tedy může konat práci, transport může tudíž probíhat i bez dodatečné energie (obvykle difusí). (Např. při rozdílu koncentrací 10 : 1 je $\Delta G = 5,7 \text{ kJ}$).

Vliv rozdílného elektrického potenciálu (jen pro elektrolyty!)

Změna volné energie (ΔG) spojená s přesunem 1 molu iontů o valenci z z místa a (o elektrickém potenciálu E^a) do místa b (o el. potenciálu E^b):

$$\Delta G = z F (E^b - E^a) \quad [F = \text{Faradayova konstanta}]$$

$$\Delta G = z F \Delta E$$

Při přesunu kationtů do kladně nabitého prostředí je nutno dodat energii (= vynaložit práci), analogicky to platí i pro přesun aniontů do negativně nabitého prostředí. Přesun kationtů do negativně nabitého prostředí a aniontů do kladně nabitého prostředí může probíhat samovolně.

Uvažme nyní, za jakých podmínek může docházet k difuzi **iontu n** z roztoku na vnější straně membrány, kterou si označíme jako strana **a**, do roztoku na vnitřní straně membrány (strana **b**). Je užitečné vyjít z podmínek rovnovážného stavu, kdy k difuzi nedochází.

Pokud je membrána pro daný iont prostupná, pak ve stavu rovnováhy musí být elektrochemický potenciál iontu **n** na obou stranách membrány shodný:

$$\mu_n^a = \mu_n^b$$

$$\mu_n^0 + RT \ln C_n^a + z_n F E^a = \mu_n^0 + RT \ln C_n^b + z_n F E^b$$

což lze upravit na tvar *Nernstovy rovnice*:

$$E^b - E^a = \frac{RT}{z_n F} \ln \frac{C_n^a}{C_n^b}$$

Rozdíl elektrických potenciálů na obou stranách membrány ($E^b - E^a$) lze zjednodušeně psát jako ΔE .

Pokud je dosažen na obou stranách membrány shodný *elektrochemický potenciál* příslušného iontu, vůbec to neznamena, že by také musela být na obou stranách membrány jeho stejná *koncentrace*. O tom se můžeme snadno přesvědčit po dosazení numerických hodnot konstant do Nernstovy rovnice. Pro jednomocný kationt ($z_i = 1$) a teplotu 25 °C (= 298,15 K) platí:

$$\Delta E [\text{V}] = 0,0257 \ln \frac{C^a}{C^b}$$

a po úpravě na dekadický logaritmus a pro napětí v milivoltech:

$$\Delta E [\text{mV}] = 59,2 \log \frac{C^a}{C^b}$$

Je tedy zřejmé, že **desetinásobný rozdíl v koncentraci jednomocného iontu mezi oběma stranami membrány ($\log 10/1 = 1$) je úměrný rozdílu elektrických potenciálů o velikosti 59,2 mV mezi oběma stranami membrány**. Pokud například by byla v cytosolu buňky desetkrát vyšší koncentrace iontů draslíku než ve vnějším prostředí, pak snížením elektrického potenciálu na vnitřní straně membrány na -59,2 mV by bylo možné zcela kompenzovat vliv koncentračního rozdílu na hodnotu celkového transmembránového elektrochemického potenciálu (ta pak bude nulová a nebude tedy probíhat difusní tok). **Při dalším snižování elektrického potenciálu v cytosolu pod uvedenou hodnotu může dojít k difuzi K^+ z vnějšího prostředí do buňky, tedy do prostředí i s desetinásobně vyšší koncentrací K^+ !** Je zcela zřejmé, že velké transmembránové elektrické potenciály (u rostlinných buněk běžně přes 120 mV), mohou velmi podstatně napomáhat samovolnému toku (difuzi) iontů i proti koncentračnímu gradientu, tedy z míst o malé koncentraci do míst s koncentrací třeba až stokrát vyšší. **Při všech úvahách o ovlivňování transportu iontů (či jiných elektricky aktivních částic) určitou hodnotou elektrického potenciálu je potřeba mít stále na zřeteli jaká je polarita těchto částic, zda mají kladný či záporný náboj** (viz spodní rámeček na předešlé straně).

Rozdíl v elektrických potenciálech roztoků oddělených biologickou membránou vzniká nejčastěji činností protonových pump (viz další kapitola). *Může k němu ale docházet i v důsledku rozdílů ve schopnostech difuzního pohybu různých druhů iontů v dané membráně*. Ne všechny ionty totiž procházejí membránami stejně snadno. Za běžných podmínek dochází navíc v buňkách k difuzi více různých druhů iontů současně.

Představme si tedy případ, kdy na jedné straně membrány budeme mít roztoky disociovaných solí o jiné koncentraci než na straně druhé, ale počet opačně elektricky nabitých částic (kationtů a aniontů) bude v obou roztocích vyrovnán. Difuze bude zpočátku probíhat pouze pod vlivem koncentrační složky chemického potenciálu, neboť elektrická složka nebude ještě významná. I za situace, kdy gradient koncentrací jednotlivých druhů iontů bude stejný, nemusí být ale stejná rychlost jejich difuze. Tuto rychlost totiž ovlivňuje také velikost iontů a jejich specifické interakce se složkami membrány. Všechny faktory, které ovlivňují mobilitu iontů v membráně (kromě rozdílů v chemickém potenciálu!), shrneme do hodnoty jejich *koeficientů permeability*. Ty jsou specifické pro jednotlivé druhy iontů a pro daný typ membrány.

Koeficienty permeability malých jednomocných iontů pro difuzi plazmatickou membránou mají hodnotu řádově 10^{-9} m s^{-1} . Ionty s větší molekulovou hmotností a ionty divalentní jsou ještě mnohem méně pohyblivé.

Dosud jsme se zabývali pouze otázkou difuzního toku iontů přes biologické membrány. Rychlost difuze v rostlinných buňkách však ovlivňují i jiné struktury, než jsou membrány. Jisté komplikace mohou způsobovat některé pevné látky (zejména v buněčné stěně), které snadno vytvářejí elektricky nabitě povrchy. Patří k nim například pektin a jiné makromolekuly, z jejichž karboxylových skupin disociují ionty vodíku. Struktury v buněčné stěně se tím stávají elektronegativní a mohou k sobě elektrostaticky vázat kationty solí. Elektricky nabitě povrchy v buňkách bývají označovány jako *Donnanova fáze* a elektrický potenciál mezi touto fází a okolním roztokem jako *Donnanův potenciál*. Donnanova fáze se vytváří i v cytoplazmě na povrchu velkých molekul proteinů a nukleových kyselin. Může ovlivňovat dynamiku difuzních výměn jednotlivých iontů, ovšem *pro celkovou rychlost toku za delší časový interval nemá rozhodující význam*.

Funkce transportních proteinů

A nyní se podíváme trochu podrobněji na *přenosové cesty* pro ionty a jiné rozpuštěné látky v buněčných membránách. Navíc k dosud uvedeným hybným silám transportu látek (elektrochemický potenciál u prosté difuze, tlakový rozdíl u hromadného toku) si přidáme ještě další, vycházející z vlastní metabolické energie buněk.

Jak již víme, základní fosfolipidová vrstva (*matrix*) membrán je prakticky nepropustná pro ionty a větší polární molekuly, stejně tak i pro molekuly organických látek. Jejich přestup přes membránu je možný pouze díky specializovaným transportním bílkovinám, které si můžeme rozdělit do několika skupin.

A. Selektivní kanály jsou integrální (transmembránové) proteiny s možností měnit svoje prostorové uspořádání. Změna konformace není součástí transportního mechanismu, pouze ovlivňuje prostupnost kanálu, tedy *rychlost* transportu. Schematicky si to lze představit jako přivírání a otvírání regulační klapky, ovšem pravděpodobnější je představa proměnlivé šířky celého póru (kanálku), či rychlého střídání dvou konformačních stavů s otevřenou a zavřenou difuzní cestou, přičemž na frekvenci výskytu a souhrnné době stavu "otevřeno" závisí prostupnost kanálu.

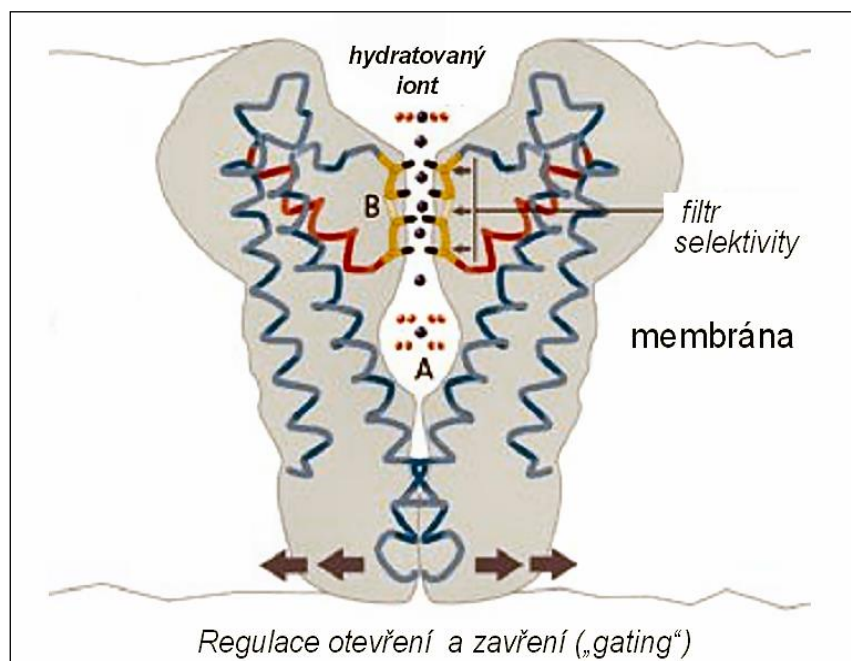
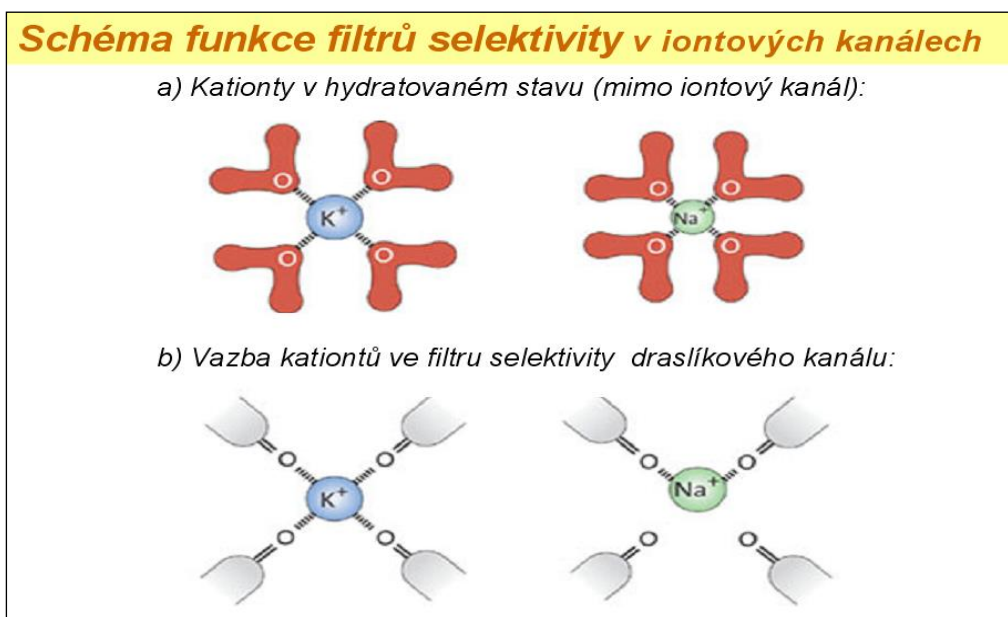
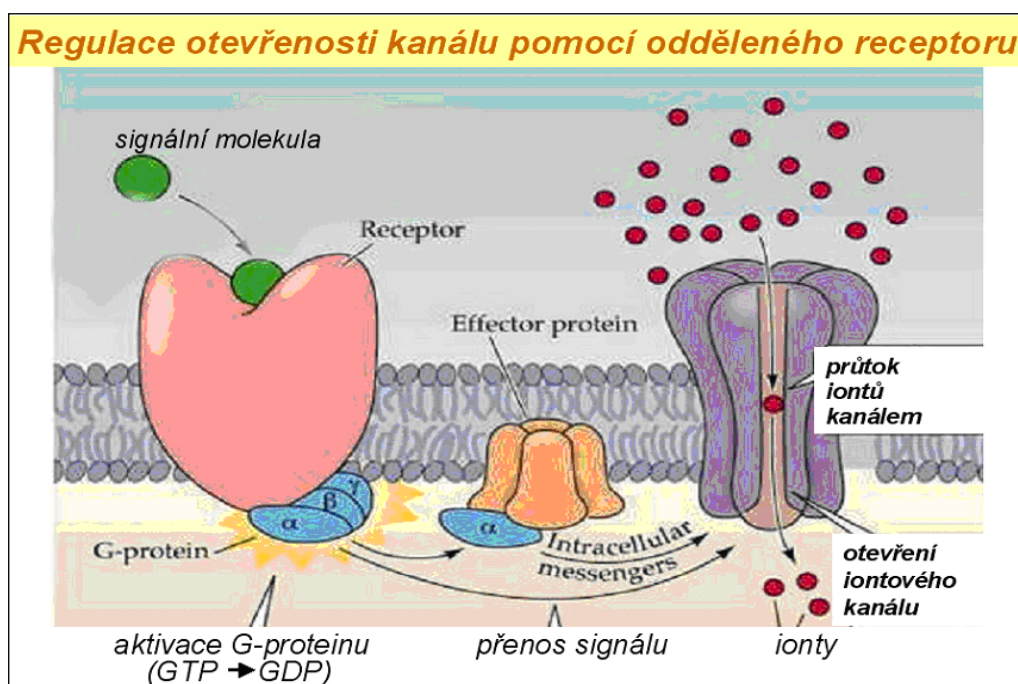


Schéma hlavních součástí a funkce typického iontového kanálu

Jak je patrné z obrázku, ionty vstupují do kanálu v hydratovaném stavu, ovšem v úseku transportní cesty, označovaném jako „*filtr selektivity*“, molekuly vody se odpojují. Místo hydratace nastupuje dočasná elektrostatická vazba iontu k aminokyselinovým zbytkům transportního proteinu. Iont je propuštěn kanálem jen v tom případě, že dojde k *dokonalé shodě vazebných sil mezi ním a aktivními body ve filtru selektivity*, jejichž prostorové uspořádání je specifické pro každý typ iontového kanálu. Proto také *například* neprojdou ionty sodíku draslíkovým kanálem, i když mají menší rozměry než ionty draslíku:



Vlastní výkonný protein selektivního kanálu je řízen řadou jiných, odděleně umístěných membránových proteinů, které fungují jako selektivní příjemci signálů. Přijaté signály jsou od nich přenášeny řetězcem druhotných mediátorů. Jedna z mnoha možností je naznačena:



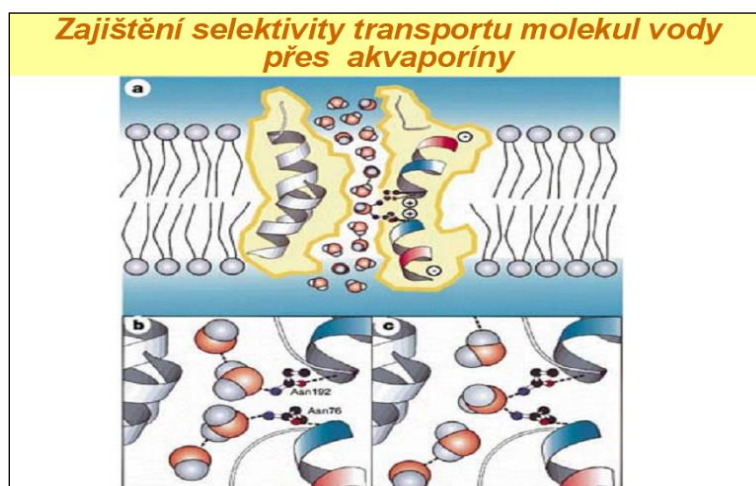
K významným signálům pro otevírání a zavírání kanálů patří zejména:

- gradient elektrického napětí mezi oběma stranami membrány,
- vnější fyzikální podněty (záření, teplota, tlak na membránu aj.),
- chemické látky regulační povahy.

Hustota selektivních (hlavně iontových) kanálů v buněčných membránách je sice velmi malá (řádově asi 100 na ploše 1 mm²), ovšem *jejich přenosová kapacita je neobyčejně vysoká* (asi 10⁶ až 10⁸ iontů za sekundu!).

Zcela zvláštními typy selektivních kanálů (z hlediska jejich struktury i funkce) jsou **akvaporíny**, o kterých již byla zmínka v předcházející kapitole věnované transportu vody. Výzkumu akvaporínů je stále věnována mimořádná pozornost jak v rostlinné, tak i v živočišné fyziologii. V každém organismu jich existuje celá řada typů, mezi kterými jsou značné odlišnosti nejen ve struktuře, ale i v regulaci jejich tvorby a funkce. Genů kódujících tyto transportní proteiny je známo několik desítek. V membránách se obvykle vyskytují v *tetramerních shlucích*, ovšem každá ze čtyř částí je samostatnou funkční (transportní) jednotkou. V jednom shluku se ale nemusí vždy vyskytovat totožné proteiny:

Způsob zajištění selektivity při transportu molekul vody akvaporíny byl dlouho nejasný, neboť zde nebylo možné uplatnit dosavadní znalosti o transportu elektricky nabitých částic (iontů). Mechanismus zajišťující selektivitu akvaporínů musí být tudíž zcela odlišný od filtrů v iontových kanálech. Akvaporíny propustí pouze ty molekuly, které jsou schopny se dočasně spojit ve stísněném hydrofobním úseku póru s aminokyselinovými zbytky pomocí *vodíkových můstků*, a které navíc mohou být donorem i akceptorem této vazby. Celý mechanismus je již znám velmi podrobně, a je pochopitelně značně složitější, než jak je schematicky znázorněno na následujícím obrázku:



Je také zajímavé, že zatímco v *živočišných buňkách* fungují akvaporíny jako pravé *poríny* (tedy s trvale otevřeným transportním kanálkem), u *rostlin* mají schopnost se za jistých okolností uzavírat. Dokonce jsou známy dva možné mechanismy vedoucí k jejich zavření:

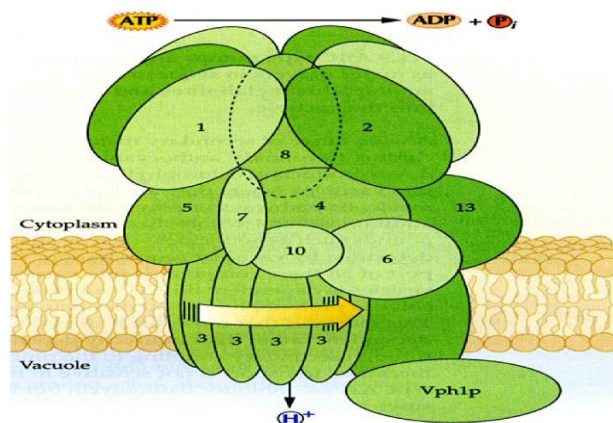
- (1) *pod vlivem nedostatku vody v buňce či za vysoké teploty* dochází k defosforylaci určitého serinového zbytku (a v důsledku toho pak k zavření kanálku),
- (2) *při anaerobním stresu* (např. při zaplavení půdy v okolí kořenů) zprostředkovává zavírací reakci protonace jednoho histidinového zbytku.

B. Transmembránové přenašeče (transportéry) jsou značně různorodou skupinou transportních bílkovin, které při své činnosti obvykle prodělávají vratné strukturální změny. Způsob vazby transportovaných částic k přenašečům a charakter vratných změn v jejich konformaci je dosud znám jen částečně. Obvykle se však nejedná o navazování transportované látky do nějakého komplexu a přesun tohoto komplexu na druhou stranu membrány, ale spíše přenášená látka migruje vytvořeným pórem s několika mezivazbami na stálých vazebných místech transportního proteinu. Proto také transportní kapacita přenašečů je vždy podstatně (o několik řádů) menší, než u iontových kanálů – nejčastěji jen 10² až 10³ iontů za sekundu.

Víme také, že u některých přenašečů je transport spojen se *spotřebou metabolické energie* (obvykle získané hydrolýzou ATP, vzácněji i z jiných, např. oxidačních reakcí). V tom případě se jedná o *aktivní transport* a příslušný přenašeč lze řadit mezi enzymy. *Aktivní transport tak může probíhat zcela nezávisle na gradientu elektrochemického potenciálu přenášené látky.*

Nejčastějším případem aktivního transportu je činnost přenašečů využívajících energii uvolněnou z hydrolýzy ATP. Tyto transmembránové proteiny označujeme jako *adenosintrifosfatázy*, zkráceně *ATPázy*. Jsou hojnou součástí všech biologických membrán. Pro aktivní transport iontů jsou mimořádně důležité ATPázy nacházející se v cytoplazmatické membráně a v tonoplastu. O zvláštích ATPáz v membránách chloroplastů a mitochondrií si povíme v kapitolách věnovaných metabolismu.

V plazmatické membráně i v tonoplastu jsou asi vůbec nejhodnější ATPázy označované jako *protonové pumpy*, které transportují (s využitím energie uvolněné rozkladem ATP na ADP) vodíkové ionty z jedné strany membrány na druhou, a to i z místa kde mají koncentraci (přesněji: elektrochemický potenciál) malý do míst s potenciálem vyšším. Tyto "pumpy" (jako ostatně i jiné ATPázy) tvoří jediná molekula bílkoviny, ale celý komplex se zřetelně asymetrickou stavbou: na užší "krček" pevně uložený v membráně, přiléhá kulovitá "hlavička", která již zcela vystupuje z roviny membrány.



Stavba protonové pumpy vakuolárního typu

Asymetrickou stavbou je dána i jednosměrnost transportu. Naprostá většina protonových pump transportuje vodíkové ionty z cytosolu do buněčné stěny (přes plazmalemu), a z cytosolu do vakuoly (přes tonoplast). Celý proces začíná zachycením molekuly ATP vystupující částí ATPázy a po její hydrolýze se vytváří volná cesta pro vstup protonu. Při rozštěpení jedné molekuly ATP je přes plazmalemu přenesen vždy jen *jeden proton*. Avšak ATPázy v tonoplastu jsou nejen rozměrnější, ale i energeticky efektivnější - na jednu molekulu ATP transportují *dva protony*. Jejich činnost také není závislá na přítomnosti draslíkových iontů, jako je tomu u ATPáz v plazmalemě, vyžadují však k aktivaci hořčík.

V membráně vakuol rostlinných buněk se nachází ještě další typ protonové pumpy, která k přenosu vodíkových iontů nevyužívá energii uvolněnou z ATP, ale z hydrolýzy anorganického difosfátu (= pyrofosfátu) na fosfátové ionty (H^+ -difosfatáza, dříve označovaná též jako H^+ -pyrofosfatáza či zkráceně H^+ -PPáza), která může po jistou dobu udržovat gradienty na membránách i za kritického nedostatku ATP v rostlinné buňce.

Činnosti protonových pump dochází k těmto zásadním změnám:

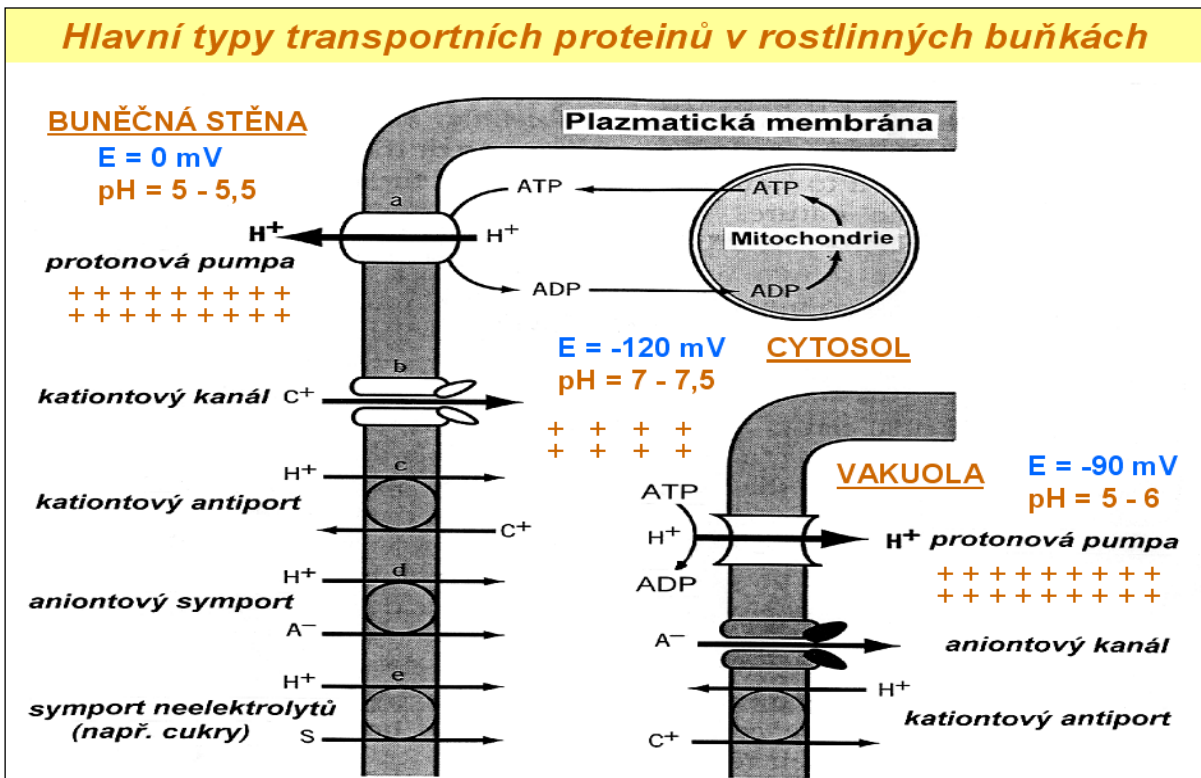
a) Vytváří se velký rozdíl v koncentraci vodíkových iontů mezi buněčnou stěnou, cytosolem a vakuolou. Hodnota pH buněčné stěny i vakuolárního roztoku obvykle klesá na 5,5 až 5, zatímco v cytosolu se zachovává přibližně neutrální reakce (pH 7,0 až 7,5), neboť jsou tam přítomny látky se značnou ústojnou (pufrovací) schopností. Větší koncentrace vodíkových iontů v buněčné stěně a ve vakuole současně znamená i jejich vyšší chemický potenciál v těchto kompartmentech než v cytosolu.

b) Dochází ke zvýšení membránového elektrického potenciálu, neboť v cytosolu je méně kationtů a je tedy negativnější než buněčná stěna a roztok ve vakuole. Proto se tento typ ATPáz označuje jako *elektrogenní*.

Spřažený transport a kinetika výměn pomocí přenašečů

Vlivem rozdílů v pohyblivosti kationtů a aniontů při difuzi přes biologické membrány, ale zejména v důsledku činnosti protonových pump je cytosol vždy negativněji nabitý než jeho okolí (tedy roztoky v buněčné stěně a ve vakuole). Vzhledem k takto orientovanému rozdílu elektrického potenciálu jsou vytvořeny velmi příznivé podmínky pro *pasivní (difusní) transport kationtů z okolí do cytosolu pomocí selektivních (iontových) kanálů difuzí.*

Transport *aniontů* stejným směrem (z okolí do cytosolu) či kationtů opačným směrem (z cytosolu do okolí) však pasivním způsobem (difusí) není možný. Transport v tomto případě lze uskutečnit pouze pomocí aktivních přenašečů, tedy za dodání jistého množství chemické energie. Při transportu aniontů do buňky (či z cytosolu do vakuoly) není možné dodávat chemickou energii přímo hydrolýzou ATP v příslušném aniontovém přenašeči, ale nejčastěji se využívá energie pomocného, současně transportovaného iontu, jehož chemický potenciál byl zvýšen dříve uskutečněnou metabolickou reakcí. V tom případě hovoříme o **sekundárním aktivním transportu**. Jako pomocné ionty v těchto společných (spřažených) transportech figurují nejčastěji protony. Je přitom využít jejich vyšší chemický potenciál na vnější straně plazmalemy a ve vakuole, vytvořený transportní ("zahušťovací") činností vodíkových pump. Vodíkové ionty za vyšší koncentrace a v „kladněji“ nabitěm prostředí (= s vysokým elektrickým potenciálem) mají vyšší chemický potenciál než ve zředěném stavu a v prostředí se sníženým elektrickým potenciálem. Zvýšení jejich chemického potenciálu je tedy dáno jak koncentrační, tak i elektrickou složkou. Při transportu aniontů z vnějšího prostředí přes plazmalemu do cytosolu jsou protony transportovány stejným směrem (přičemž přenašečem prochází současně vždy jeden aniont a jeden či několik protonů), což se označuje jako **symport**. Je však možné využít přebytek energie vodíkových iontů k energetické dotaci transportu jiného iontu současně pronikajícího tímto přenašečem opačným směrem (**antiport**). *Spřažený transport je v rostlinných buňkách neobyčejně hojně využíván* pro výměny nejen iontů minerálních živin, ale i nízkomolekulárních organických látek (elektrolytů i neelektrolytů, např. organických kyselin, cukrů, adenylátů, aj.) mezi cytosolem a okolím buňky či mezi cytosolem a buněčnými organelami.



Transport organických látek

Uvnitř buňky i mezi buňkami panuje čilá výměna nejen vody a iontů solí, ale i větších organických molekul, včetně proteinů. Tomu musí odpovídat i dokonale fungující transportní systémy, které ale mohou být velmi odlišné nejen u různých vnitrobuněčných struktur, ale také u různých typů buněk.

Transport proteinů je zvláště významný u organel. Velké množství proteinů, které buněčné organely obsahují ve svých vnitřních strukturách, a které ještě navíc potřebují neustále obměňovat, není totiž syntetizováno jejich vlastním aparátem. Především do chloroplastů a mitochondrií musí být velké množství (často více než 50%) proteinů transportováno přes dvojitou membránu z cytosolu. Také přes tonoplast a cytoplazmatickou membránu je transportována řada složitých organických molekul.

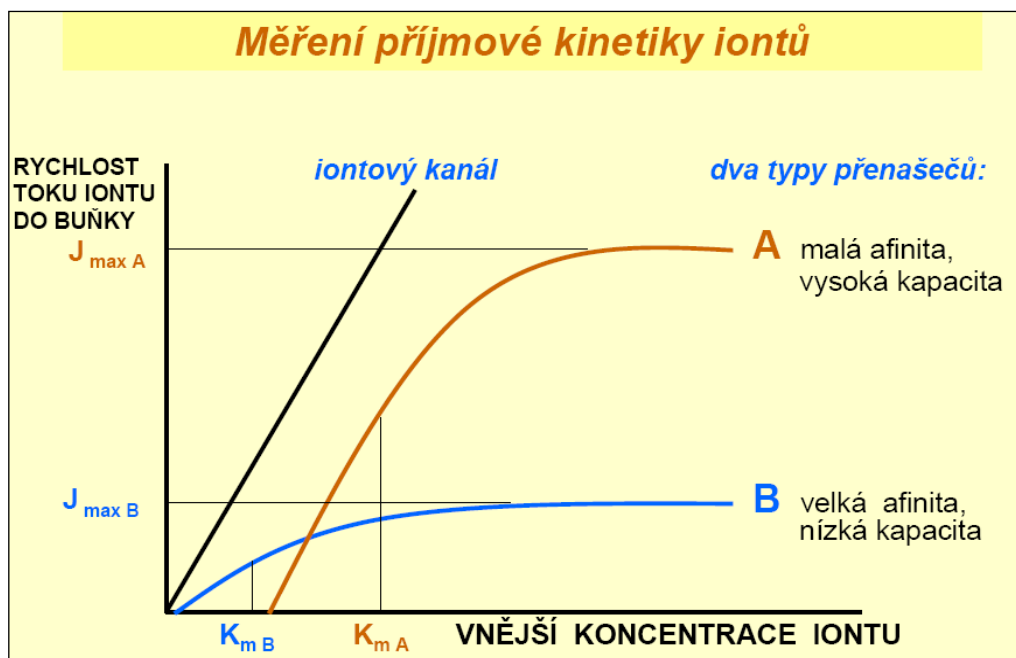
Transport proteinů přes specifické aktivní přenašeče v membránách je možný pouze v nesloženém (lineárním) tvaru. K udržení nesložené struktury před vlastním transportem a naopak k vytvoření složené funkční konformace molekuly proteinu po transmembránovém transportu je nutná spoluúčast specifických pomocných proteinů označovaných jako *chaperony*, které se dočasně navazují na transportovaný protein. Udivující je specifita vazby (je nutné rozlišovat mezi stovkami různých proteinů) a přitom u transportních proteinů v membránách chloroplastů a mitochondrií nebyly zjištěny žádné glykoproteiny, jejichž polysacharidové řetězce tuto rozlišovací schopnost u jiných membrán zajišťují. Transport proteinů (i jiných látek) mezi organelami uvnitř buňky je neobyčejně zrychlován prouděním cytoplazmy a váčkovým přesunem na vláknech cytoskeletu.

Transport cukrů (zejména sacharózy) a dalších nízkomolekulárních organických látek (aminokyselin, amidů, bezdusíkatých organických kyselin, atd.) přes biologické membrány se děje nejčastěji spřaženým transportem s vodíkovými ionty ve specifických přenašečích. Tento sekundárně aktivní transport může být za vysokých koncentrací příslušné látky provázen i pasivním transportem. Zdaleka ne pro všechny metabolity ale musí být v buněčných membránách vhodné transportní proteiny - někdy je nutný rozklad složitějších na jednodušší, transportovatelné složky a jejich resyntéza na opačné straně membrány. V některých případech jsou sice v membránách transportní proteiny pro daný metabolit, ale transport je možný pouze v jednom směru, což obvykle má svoje opodstatnění.

Transport sekundárních metabolitů, jako např. flavonoidů, anthokyanů, rozkladných produktů asimilačních barviv, alkaloidů a mnoha dalších sloučenin, využívá zvláštní transportní proteiny označované jako *ABC přenašeče* (= *ATP Binding Cassette transporters*). Jedná se o primárně aktivní transport, přímo využívající ATP jako zdroje energie (nikoli tedy zprostředkovaně přes tvorbu protonového gradientu). Výzkum mechanismu přenosového procesu u transportních proteinů tohoto typu u rostlin je však teprve v začátcích

Metody používané při studiu funkce transportních proteinů

Studiem *kinetiky příjmu* jednotlivých iontů, např. měřením rychlosti příjmu za různé koncentrace ve vnějším prostředí, můžeme podle tvaru zjištěných závislostí rozlišit transport pomocí přenašečů (saturační typ křivky, rychlost transportu může dosáhnout jen jisté hodnoty, kterou nelze překročit) od prosté difuze (vzestupné křivky bez zřetelného nasycení). Tato měření se provádějí s buňkami či celými kořeny rostlin s předem navozeným nedostatkem zkoumaného iontu ve zkoumaném vzorku. Rozlišit pasivní transport od aktivního lze na základě srovnání teoretické hodnoty rychlosti a směru difusního toku (vypočítané z gradientu chemického potenciálu příslušného iontu) a porovnáním této hodnoty s experimentálně zjištěnými rychlostmi toku či s koncentracemi v ustáleném stavu.



Studium transportních procesů na buněčné úrovni je nesmírně obtížné. Nejen proto, že studovaný iont může být současně transportován oběma směry a navíc různým mechanismem (aktivně i pasivně), ale může být také kontinuálně odváděn do různých buněčných struktur, či přímo v cytosolu vázán do chemických sloučenin. Velké potíže vyplývají z proměnlivosti biologických membrán a z možnosti regulace jejich struktury a funkce, kterou buňka má. Životnost transportních proteinů je velmi krátká (obvykle jen několik dní), jsou tedy ve stálé obměně. Jejich počet se může rychle měnit podle okolností (naléhavost potřeby určitého iontu pro buňku, vnější koncentrace iontů, aj.).

Velký pokrok ve výzkumu transportu iontů přes buněčné membrány byl umožněn zavedením metody označované anglickým termínem "*patch clamp*". Při této metodě se ústí velmi tenké kapiláry přisaje na studovanou membránu a za různých experimentálně navozovaných podmínek se pak studují její vlastnosti. Je dokonce možné opatrnou manipulací s kapilárou vytrhnout kousek přisáté membrány a v umělém prostředí zkoumat funkce jednotlivých transportních proteinů.

Ještě významnější jsou v současné době některé aplikace metod *molekulární biologie*, vycházející ze znalosti genů kódujících jednotlivé transportní proteiny a v přenosu genetické informace do buněk jiných organismů, v nichž se tyto proteiny nevyskytují. Tedy např. cRNA zkoumaného transportního proteinu je pomocí vhodného vektoru vpravena do vajíčka žáby *Xenopus laevis*, a funkce vytvořeného transportního proteinu jsou zkoumány pomocí elektrofyziologických a izotopových metod.

Nicméně ani uvedené moderní biochemické či molekulárně biologické metody nepostačují k detailnímu objasnění vlastního transportního mechanismu a selektivity jednotlivých transportních proteinů. Není možné zkoumat tyto proteiny po jejich separaci z membrán, neboť jejich správná konformace a tím i funkčnost je možná jen při jejich přirozeném uložení v membráně. Zde je tedy potřeba aplikovat nedestruktivní *biofyzikální* metody, např. rentgenovou krystalografii.

Radiální a xylémový transport iontů solí

Jako radiální transport iontů v kořenech označujeme jejich tok od epidermis až po xylém. Tento tok probíhá stejně tak jako u vody souběžně symplastem i apoplastem, s výjimkou prostupu přes endodermis a exodermis, kde se oba proudy dočasně spojují. Za nízkých

koncentrací iontů obvykle převažuje symplastový tok. Jeho rychlost je asi 10 až 60 mm za hodinu, což je podstatně více než rychlost prosté difuze za takového koncentračního spádu, který může v buňkách vzniknout. K rychlejšímu radiálnímu transportu přispívá proudění cytoplazmy. Zrychlený tok vody v apoplastu či symplastu za silně výparných podmínek může také výrazně napomáhat transportu iontů solí.

V celém úseku transportu napříč kořenem jsou zřejmě **dvě klíčová místa**: jednak při *vstupu iontů do symplastu* (nejčastěji přes plazmatickou membránu buněk pokožky), a dále *při vstupu iontů do vodivých elementů xylému* z parenchymových buněk středního válce sousedících s xylémem. Tedy, jinými slovy, jde o vstup a výstup iontů přes membrány symplastu.

Ty ionty, které již v buňkách epidermis vstoupily přes plazmalemu do cytosolu, mohou procházet buňkami kůry a středního válce pomocí plazmodesmat, tedy bez přestupu cytoplazmatické membrány dalších buněk. Tento symplastový transport však nutně končí u vodivých elementů xylému, které, jakožto mrtvé struktury, nemají spojení se sousedními buňkami pomocí plazmodesmat. Ionty zde tedy musí podruhé být transportovány přes plazmatickou membránu. V xylému bývá koncentrace solí velmi nízká, a proto při tomto transportu jsou podmínky téměř opačné, než tomu bylo při příjmu z půdního roztoku. Vlastnosti plazmalemy parenchymových buněk hraničících s xylémem musí být tudíž podstatně odlišné od vlastností plazmalemy buněk epidermis a kůry. Existují také důkazy, že regulační signály ovlivňující činnost iontových kanálů a přenašečů v membráně epidermis neovlivňují činnost transportních proteinů v membránách přiléhajících ke xylému. Ty mají zřejmě svůj vlastní regulační mechanismus.

Podélný (xylémový) transport iontů solí v cévách a cévicích je již vcelku méně zajímavý. Ionty, stejně tak i některé organické látky transportované z kořenů do nadzemních částí jsou unášeny proudem vody, a tudíž rychlost jejich transportu je zcela *závislá na rychlosti toku vody*. Stěny cév mají sice mírně negativní náboj a tudíž zde může docházet k elektrostatické vazbě části kationtů, avšak tato vazba je poměrně slabá a rychle saturovatelná.

Transport látek v lýku (floému)

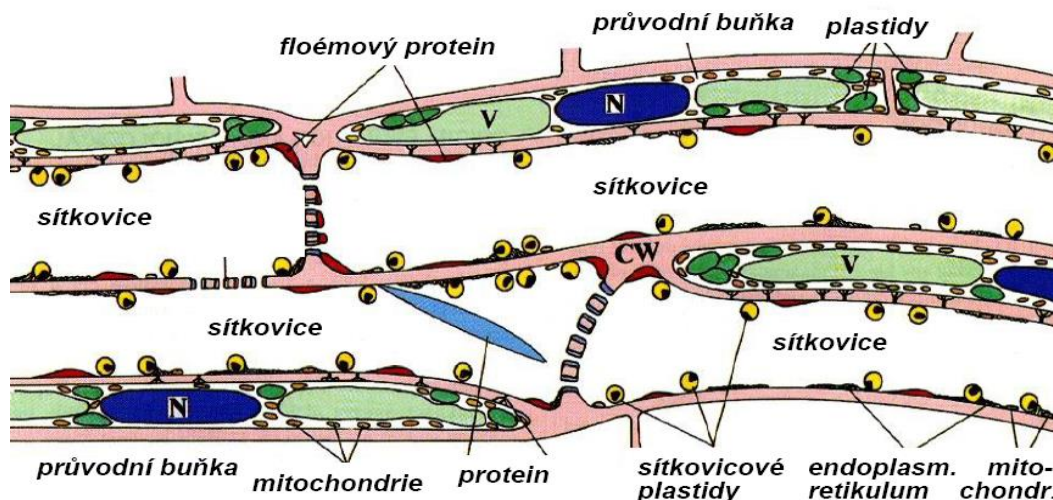
Kromě rychlého dálkového rozvodu roztoků v xylému má rostlina ještě další výkonný a na xylému nezávislý transportní systém - **lýko (floém)**. Stavba i funkce floémové soustavy je zcela odlišná od xylému a proto představa, že hlavní rozdíl mezi těmito dvěma soustavami je jen ve směru proudění (xylémem vzhůru a lýkem dolů), je krajně nesprávná. Jak již víme, xylémový tok probíhá v mrtvých strukturách na základě působení fyzikálních sil a má prakticky vždy vzestupný směr.

Floémová transportní soustava je tvořena živými buňkami, obousměrně propojuje všechny orgány rostliny a je proto mnohem univerzálnější než xylémový transport. Tok v lýku má rostlina pod velmi dokonalou kontrolou, neboť je vázán na metabolické procesy.

Lýko je tvořeno dlouhými řetězci bezjaderných buněk, **sítkovic**. Jsou navzájem spojeny hustě proděravělými buněčnými stěnami, označovanými jako sítko. Délka sítkovic je přibližně čtvrt až půl milimetru, pouze u nahosemenných bývají delší (1,5 mm). Při vzniku dospělé sítkovice nejen degeneruje jádro, ale mizí i vakuoly a plazmatická membrána v oblasti sítek.

K sítkovicím přiléhá jednak lýkový parenchym, ale hlavně zvláštní **buňky průvodní, které jsou se sítkovicemi propojeny hustou sítí plazmodesmat a tvoří s nimi vlastně jeden funkční celek**. Na rozdíl od sítkovic mají průvodní buňky vysokou metabolickou aktivitu (často vyšší než buňky v meristémeh!). U některých skupin druhů, zvláště z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) a bobovitých (*Fabaceae*), mají průvodní buňky zvlněný (tedy i zvětšený) povrch plazmatické membrány, což lze považovat za důkaz jejich velkého významu pro komunikační spojení lýka s okolními pletivy (laterální transport).

Uvnitř sítkovic, kromě nástěnné cytoplazmy, bývají nápadná vlákénka bílkoviny, označované jako *P-protein*, která se obvykle shlukují v oblasti sítěk. Funkce této bílkoviny je stále velmi záhadná. Vzhledem k tomu, že má snadnou schopnost koagulace, může rychle utěsnit otvory v sítku v případě poranění a zabránit tak výtoku cenné floémové tekutiny. Do jaké míry může sloužit také jako regulátor průtoku, eventuálně jako součást obranného mechanismu proti patogenům, není dosud jednoznačně dokázáno.



Stavba sítkovic a jejich těsná vazba na průvodní buňky v lýku.

Složení roztoků transportovaných ve floému je nejen druhově specifické, ale mění se i v závislosti na rychlosti růstových a metabolických procesů. Vždy však převažují neredukující cukry, z nichž bývá nejhojnější *sacharóza*. Její koncentrace může dosahovat až 150 g l^{-1} . Dále bývají hojně zastoupeny aminokyseliny (až 15 g l^{-1} , zejména kyselina glutamová, asparagová a serin) i jiné organické kyseliny, ale také např. ATP a fytohormony. Ve floémové šťávě lze často zjistit i ionty anorganických solí (např. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Sítkovice se udržují ve funkčním stavu zřídka déle než jednu vegetační sezónu, pokud ovšem je zachována kambiální aktivita. Ve starých nefunkčních sítkovicích se hromadí polysacharid *kalóza*, který slouží k jejich dokonalému utěsnění. Kalóza může být produkována i v mladých funkčních sítkovicích, a to jednak při jejich poranění, ale i v důsledku působení některých stresových faktorů (např. za vysoké teploty).

Popis vlastního **mechanismu floémového toku** lze rozdělit na tři hlavní otázky:

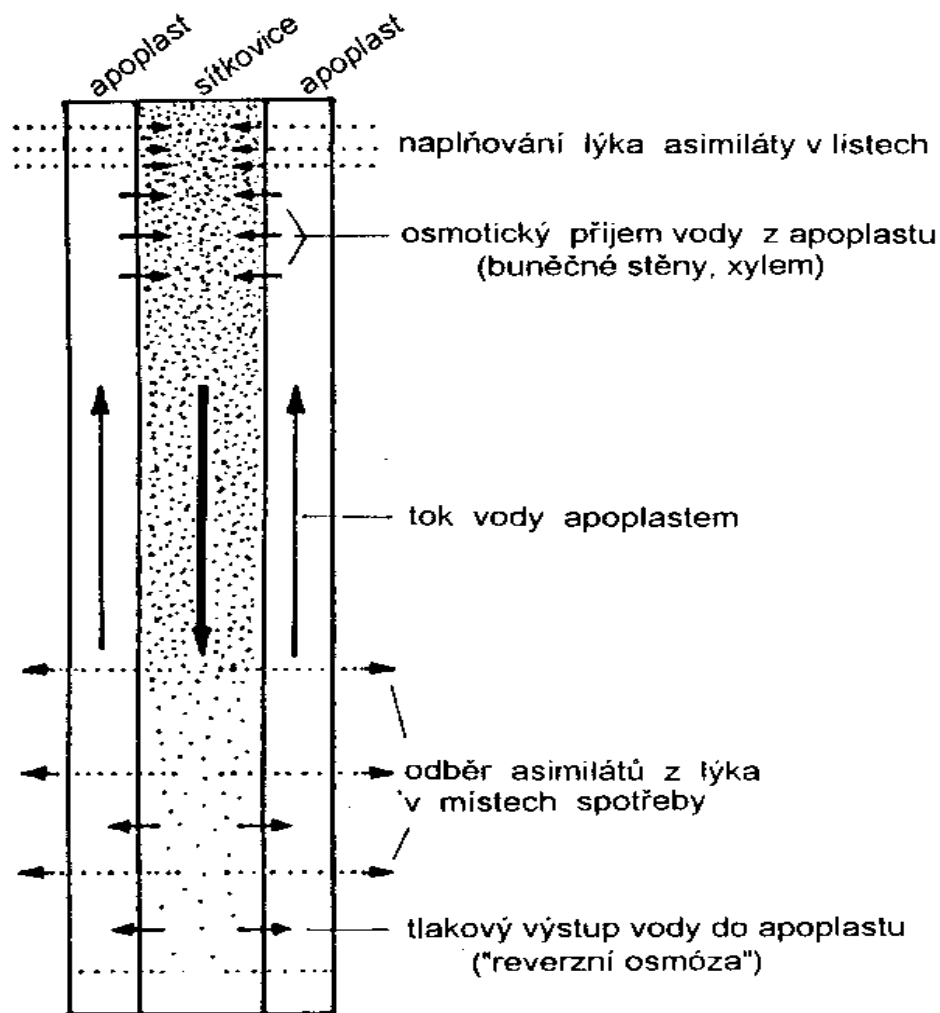
- (1) co je *hybnou silou* celého toku,
- (2) jakým způsobem je řízen *vstup* látek do sítkovic (tzv. naplňování zdrojové části lýka),
- (3) jakým způsobem je řízen *výstup* („odběr“) látek ze sítkovic na místě jejich potřeby.

Z vysokých rychlostí floémového toku (přibližně 1 m h^{-1}) je zřejmé, že nemůže jít o prostou difuzi ani o přenos zrychlený prouděním cytoplazmy, který je běžný v jiných symplastových strukturách, neboť jeho rychlost bývá nanejvýš několik centimetrů za hodinu. Skutečnost, že lýko je tvořeno živými buňkami, vedla k intenzivnímu zkoumání dalších možností *aktivního transportu* v lýku, energeticky zásobeného především z průvodních buněk po celé délce floémové soustavy. Vycházelo se přitom z domněnky, že transport přes otvory v sítkách (po jejich vyplnění *P-proteinem*) může probíhat pouze za dodávání metabolické energie. Tato domněnka se nepotvrdila. Bylo naopak prokázáno, že u funkčních sítkovic jsou u většiny druhů rostlin sítká natolik volná, že *umožňují hromadný tok*.

V současné době se pro vysvětlení mechanismu transportu roztoků v lýku uznává jako nejpravděpodobnější **teorie tlakového toku**, která byla vypracována již ve dvacátých letech tohoto století, a od té doby bylo nasbíráno hodně důkazů na její podporu. Podle této teorie

není nutné uvažovat o *aktivním* podílu všech sítkovic v jednotlivých sloupečcích na transportu. Hromadný tok je dán tlakovým rozdílem mezi začátkem a koncem celé transportní cesty. Rozdílného tlaku je dosaženo *propojením odlišných osmotických systémů*. Ten první je umístěn u zdroje transportovaných látek (nejčastěji cukerných asimilátů v listech) a druhý na místech jejich spotřeby (v kořenech, ale a v jiných energeticky nesamostatných orgánech či v úložištích asimilátů). Asimiláty se hromadí ve zdrojovém zakončení floému, což je provázáno osmotickým vtokem vody do sítkovic ze sousedních buněčných stěn, které jsou napájeny xylémovým proudem. Vzniklý tlak v těchto místech (až 2,5 MPa) vede k toku tekutin na opačnou stranu floémových drah, kde je tlak nižší. V tomto druhém osmotickém systému dochází k výstupu rozpuštěných látek i vody. Výstup vody je dán vyšším vodním potenciálem vody v sítkovicích ve srovnání s vodou v apoplastu, a je nutnou podmínkou udržení stálého toku. V místech největšího odběru cukrů z floému se udržuje jejich poměrně vysoká koncentrace v apoplastu buněk v okolí lýka, což vede nejen k tlakově, ale i k osmoticky podmíněnému výstupu vody ze sítkovic. Část asimilátů je odebírána z lýka i v průběhu toku. V lýku se tedy udržuje stálý spád koncentrace osmoticky aktivních látek i spád hydrostatického tlaku od zdrojové části do místa spotřeby.

Rychlost floémového toku závisí v prvé řadě na fungování osmotického systému v listech (= u zdroje asimilátů). Výkon tohoto systému je dán rozdílem vodního potenciálu mezi symplastem (koncentrovaný roztok na začátku floému) a apoplastem (zředěný xylémový roztok v buněčných stěnách).



Znázornění hlavních rysů teorie tlakového toku tekutin v lýku v důsledku součinnosti dvou osmotických systémů (blíže viz text).

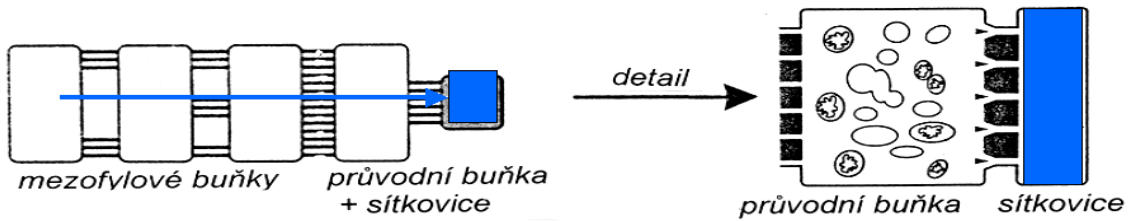
Popsaná teorie tlakem řízeného toku má i svoje slabá místa, která čekají na vysvětlení. V prvé řadě není jasné, proč jsou vodivé elementy lýka živé buňky s komplikovanou stavbou sítěk, když pro čistě tlakový mechanismus transportu by lépe vyhovovaly mrtvé buňky, jak je tomu u xylému. Nejsme si také zatím jisti, zda tlakovou teorií lze vysvětlit floémový tok u naho-semenných (*Gymnospermae*). U této skupiny rostlin bývají sítka v sítkovicích pravidelně potažena membránami typu hladkého endoplazmatického retikula a není tedy vůbec jasné, zda a do jaké míry je vůbec možný hromadný tok.

Naplňování lýka (angl. *phloem loading*) je proces při kterém dochází k hromadění cukrů a dalších látek ve floému v blízkosti asimilujících buněk mezofylu do koncentrace, která je *podstatně vyšší (až 40x) než v okolních buňkách zdrojového mezofylu*. Tento proces zůstal po dlouhou dobu nevysvětlen. Na první pohled bylo zřejmé, že se sotva může jednat o transport čistě symplastovou cestou (přes plazmodesmata až do sítkovic), neboť v tom případě by nebylo možné zachovat tok rozpuštěných látek z nižší koncentrace do vyšší. To lze zajistit jen při energeticky dotovaném aktivním transportu přes membrány. Membránový transport cukrů se děje symportem s H^+ ionty, které jsou zpětně přenášeny protonovými pumpami. Uvažovalo se tedy, že symplast lýka (sítkovice s průvodními buňkami) není propojen s okolním mezofylem plně funkčními plazmodesmaty, a že *ze symplastu mezofylu přestupují cukry (převážně sacharóza) přes plazmalemu do apoplastu (do buněčné stěny a do mezibuněčných prostor) a odtud, opět přes membránu, do průvodních buněk a sítkovic (tzv. apoplastová cesta naplňování lýka)*.



Existence apoplastové cesty naplňování lýka byla skutečně dokázána u většiny dosud zkoumaných druhů rostlin, ale existují i výjimky. U rostlin z některých taxonomických skupin (zejména evolučně starších, včetně řady druhů stromů a keřů) nebyl prokázán přestup cukrů do apoplastu, ale pouze *přímý tok plazmodesmaty z mezofylových buněk až do lýka*, který, jak jsme již naznačili, by teoreticky neměl být možný. Tato čistě **symplastová cesta** je ovšem podmíněna jedním zásadním požadavkem: transportovaná sacharóza se musí v průvodních buňkách lýka přetvořit na složitější cukry s větší molekulou (např. na rafinózu či stachyózu), jejichž transport plazmodesmaty zpět do mezofylových buněk není možný. Jedná se tedy o jakousi „polymerační past“, která umožňuje hromadění cukrů v lýku i bez účasti aktivního transmembránového transportu. Významnou úlohu zde ovšem také hrají strukturní a funkční vlastnosti plazmodesmat, které musí být schopny účinně zabránit zpětnému transportu molekul rafinózy.

Symplastová cesta naplňování lýka



Hlavní znaky symplastové cesty:

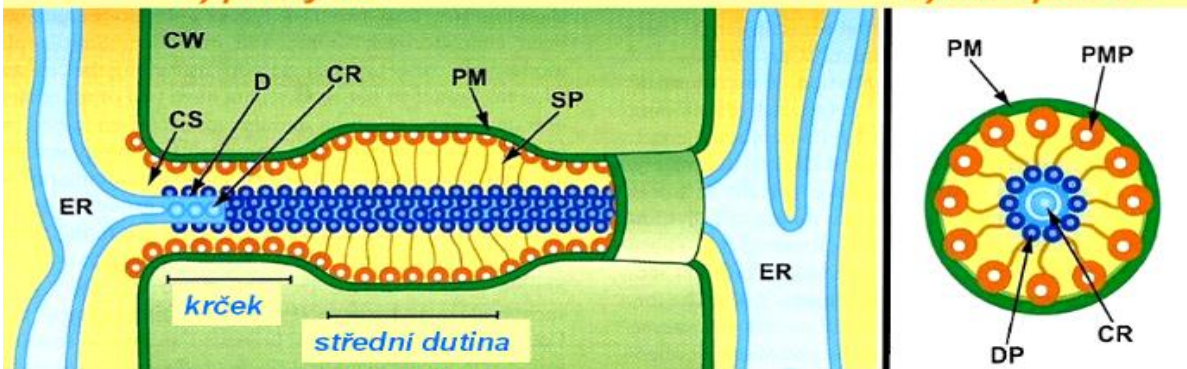
- hojná plasmodesmata na rozhraní mezofyl - lýko, která jsou propustná jen pro malé molekuly,
- udržování nízké koncentrace sacharózy v lýku (a tím i koncentračního spádu pro transport z mezofylu) rychlou konverzí do složitějších cukrů (rafinóza, stachyóza, manitol),
- vytvořené složitější cukry nemohou projít přes plasmodesmata zpět do mezofylu, proto zůstávají v lýku („polymerační past“),
- má poměrně malou transportní kapacitu, je citlivá na chlad,
- vyskytuje se hlavně u evolučně starších druhů rostlin (řada druhů stromů, keřů a teplomilných bylin).

Stavba a funkce plazmodesmat: Dnes již víme, že regulační schopnosti má především oblast krčku – depolymerací aktiniových vláken se může zvýšit průměr transportovaných částic z běžných 1,5 - 2 nm až na 10 nm (tedy pak projdou molekuly až do velikosti 20 kDa!), ovšem na druhé straně je možné silné přivření až zavření kanálu v oblasti krčku. Navíc právě tam byla dokázána přítomnost zvláštních proteinů, které mohou hrát roli selekčních filtrů vylučujících z transportu některé látky.

Schéma vnitřní stavby plazmodesmat

a) příčný řez

b) čelní pohled



ER – endoplazmické retikulum, D – desmotubulus, PM – plazmatická membrána, CW – buněčná stěna, CS – cytoplazmatický rukáv, DP – proteiny desmotubulu, CR – střední váleček, PMP – proteiny vázané na PM, SP – příčné výběžky.

Směrování transportu a výstup látek z lýka jsou v současné době intenzivně studované procesy, a to zejména pro jejich možné praktické využití. Pokud bychom například dokázali vhodnými zásahy (chemickými regulátory, genovou manipulací) lépe usměrňovat toky asimilátů do zásobních orgánů či do semen zemědělsky významných plodin, mělo by to velký význam pro zvýšení jejich výnosů. Bohužel tak daleko ještě nejsme, protože naše poznatky o regulačních mechanismech floémového transportu jsou stále nedostatečné.

Již dosti dlouho bylo známo, že z téhož místa (např. z určitého listu) mohou být jednotlivé typy sloučenin, současně vstupující do lýka, transportovány do odlišných orgánů. Tedy např. sacharóza převážně do kořenů, aminokyseliny do mladých listů, atd. Pozdější přesná měření ale dokázala, že tento zdánlivě směřovaný transport není dán existencí specifických transportních drah (tedy rozdílně směřovaných izolovaných sítkovic, které spojují jen některá místa). Elementy lýka jsou obvykle dosti složitě pospojovány (nejen podélně, ale i příčně), a na mnoha místech dochází k přestupu transportovaných látek do apoplastu a jejich resorpci zpět do lýka. To vše umožňuje směrově velmi plastický pohyb (svým způsobem cirkulaci) transportovaných látek po celé rostlině. Preferenční zásobení určitého orgánu určitou sloučeninou je obvykle dáno *větší schopností* „odběru“ dané látky z floémové tekutiny v daném místě.

Mechanismy řídicí výstup rozpuštěných látek z lýka.

Principiálně jsou opět možné dvě rozdílné cesty, *apoplastová* a *symplastová*, tedy obdobně jak u naplňování lýka. Přesnější údaje o regulaci rychlosti „odběru“ látek z lýka v určitém orgánu máme jen pro některé typy sloučenin, především pro sacharózu. Bylo zjištěno, že zcela zásadní úlohu má v tomto případě aktivita enzymu *invertázy* v těsné blízkosti lýka, která štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu.

Tyto redukující monosacharidy již nemohou být dále transportovány lýkem, ani do něho nemohou vstupovat, neboť v membránách sítkovic a průvodních buněk nejsou pro ně transportní proteiny. Naopak, nerozložená sacharóza vstupuje zpět do lýka velmi snadno, protože sacharózových přenašečů je v membránách dostatek. Orgán, který má v jisté fázi vývoje nároky na zásobení cukry, začne pro zvýšení odběru sacharózy z lýka vytvářet více invertázy. Výzkumu podnětů a procesů spojených s regulací tvorby a aktivity různých typů invertáz (existuje jich celá početná skupina!) je nyní věnována zvláště velká pozornost.

Metody pro stanovení látek vedených lýkem.

Rychlost a směr transportu látek rozváděných po rostlině lýkem se nejčastěji stanovuje pomocí stabilních či radioaktivních izotopů. Lze například exponovat po krátkou dobu vybraný list v komůrce, do které přivádíme vzduch s obsahem izotopově značeného oxidu uhličitého, a pak po jisté době sledovat jeho přítomnost v jiných orgánech.

Při studiu floémového transportu nás ale také zajímá *chemické složení a koncentrace transportovaných látek*. K tomu však potřebujeme získat vzorky floémové tekutiny. Po naříznutí sítkovic se floémový tok velmi rychle zastavuje (indukovaným ucpáním sítěk v poraněné sítkovici), takže tímto způsobem nelze odběry provádět.

Naštěstí máme nyní k dispozici jinou, velmi zajímavou metodu odběru, využívající svého hmyzu. Původně byla používána v entomologii k analýze potravy mšic, avšak dnes je z ní rutinní metoda rostlinné fyziologie. Sající mšice, která svým sosákem proniká do sítkovice, nejprve zmrazíme (popraškem pevného CO₂ či tekutým dusíkem) a pak její tělo oddělíme tak, aby sosák zůstal v rostlině. Díky stálému přetlaku ve floému (2 až 3 MPa) nám ze zbytku sosáku po dlouhou dobu vytéká tekutina k analýze (asi 1 μl za hodinu).

Další neméně vtipná metoda byla vymyšlena pro práci s bobovitými rostlinami. V mladém lusku vyřízneme okénko, abychom měli přístup k tvořícímu se semeni. U něho pak nařízneme vnější obal a vyjmeme embryo. Místo po embryu se vyplní rozehřátým agarem. Asimiláty z floému se do rostoucího embrya dostávají apoplastovou cestou přes endothel (protože floém není s embryem propojen), a tudíž velmi snadno difundují i do agaru. Agar pak ve vhodné dobu vyjmeme a analyzujeme.

1.3 Transport plynů

Kromě transportu vody, iontů solí a organických látek jsou s životem rostliny spojeny i důležité výměny plynů. Veškerý uhlík, který je základem pro stavbu organických látek, přijímá rostlina ze vzduchu ve formě *oxidu uhličitého*. Nezbytný je i příjem *kyslíku* pro uvolňování chemické energie v respiračních procesech. Podle toho, zda převažují asimilační nebo disimilační procesy, může se směr transportu obou těchto plynů měnit. Třetí významnou plynnou složkou, jednosměrně vystupující z rostliny je *vodní pára*. Denní úhrn transportované vodní páry je obvykle více než stokrát větší než množství kyslíku a oxidu uhličitého. Některé další plyny transportované v rostlinách, např. endogenní etylen a amoniak jsou z kvantitativního hlediska již mnohem méně významné.

Hlavní cesty a mechanismus transportu plynů

Plyny se mohou pohybovat v rostlině systémem vzájemně propojených mezibuněčných dutin naplněných vzduchem (*interceluláry*), které se obvykle vyskytují ve všech orgánech. V pletivech bez vzdušných intercelulár a uvnitř buněk je transport plynných látek možný pouze po jejich rozpuštění ve vodě. Tok plynů je udržován buď samovolným pohybem molekul po koncentračním spádu (difuze), nebo nuceným prouděním po spádu tlaku (hromadný tok).

Difuze má pro transport plynů v intercelulárách rostlin zcela zásadní význam. Jednak proto, že v intercelulárách, vzhledem k jejich napojení na okolní atmosféru, lze stěží vytvořit větší rozdíly tlaku, vedoucí k hromadnému toku, ale hlavně proto, že difuze v plynném prostředí je dostatečně rychlá (zhruba desettisíckrát rychlejší než ve vodě).

Podle *prvního Fickova zákona* platí, že rychlost difuzního toku (\mathbf{J}_n , počet molů látky n , které projdou jednotkovou plochou za jednotku času) je úměrná koncentračnímu gradientu ($\delta C_n / \delta x$):

$$\mathbf{J}_n = -\mathbf{D}_n \cdot \delta C_n / \delta x$$

kde \mathbf{D}_n je difuzní koeficient pro látku n je závislý na teplotě a některých dalších faktorech prostředí. Difuze probíhá od vyšší koncentrace k nižší, proto je výraz (podle zavedené konvence) záporný. Po úpravě uvedeného vztahu pro měřitelný rozdíl koncentrací (ΔC_n) na místech od sebe vzdálených o Δx dostáváme:

$$\mathbf{J}_n = \mathbf{D}_n \frac{\Delta C_n}{\Delta x} = \frac{\mathbf{D}_n}{\Delta x} \Delta C_n$$

Podíl $\mathbf{D}_n / \Delta x$ nazýváme difuzní vodivost pro látku n a označujeme ji zjednodušeně jako \mathbf{g}_n . Její převrácená hodnota ($1/\mathbf{g}_n$) se označuje jako difuzní odpor pro látku n (\mathbf{r}_n):

$$\mathbf{g}_n = \frac{\mathbf{D}_n}{\Delta x} = \frac{\mathbf{J}_n}{\Delta C_n} = \frac{1}{\mathbf{r}_n}$$

Používané jednotky: \mathbf{J} [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$], \mathbf{C} [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$], \mathbf{x} [m], \mathbf{D} [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$], \mathbf{g} [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$], \mathbf{r} [$\text{s} \cdot \text{m}^{-1}$]. Hodnoty difuzní vodivosti mohou být také vyjadřovány v molárních jednotkách [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$].

Hodnoty difuzního koeficientu jsou specifické pro jednotlivé plyny, např:

$$\begin{array}{ll} \text{CO}_2 & D = 1,51 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \text{kyslík} & D = 1,95 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ \text{vodní pára} & D = 2,42 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \end{array}$$

Z uvedených příkladů (pro difuzi ve vzduchu) je zřejmá závislost \mathbf{D} na molekulové hmotnosti plynů - vyšší hodnota \mathbf{D} u menších molekul znamená jejich rychlejší tok (za stejného rozdílu koncentrací).

Nejmenší problémy bývají s transportem *kyslíku*. Jeho obsah ve vzduchu (přibližně 21 objemových %) je natolik velký, že i při omezených difuzních cestách (zavřené průduchy v listech, nebo u orgánů s epidermis bez průduchů) netrpí rostliny jeho nedostatkem. Kyslík poměrně snadno proniká kutikulou, buněčnými stěnami i membránami, mnohem pomaleji

však proniká roztoky v pletivech. Hlavním místem spotřeby jsou mitochondrie a peroxisomy. U listů s aktivní fotosyntézou obvykle *kyslík vznikající při fotolýze vody* nejen že stačí pokrýt potřeby respiračních procesů, ale nadbytek bývá odváděn do atmosféry.

Jisté potíže s transportem kyslíku mohou vzniknout pouze u rostlin, jejichž kořeny rostou v *anaerobním prostředí* (mokřady, zaplavené či zhutnělé půdy). U těchto rostlin mívají kořeny a navazující stonky zvláště bohatě vyvinut systém intercelulár (až 70% plochy na příčném průřezu), zajišťující dostatečně rychlou difuzi kyslíku z nadzemních nezaplavených orgánů do orgánů v bezkyslíkatém prostředí. U některých vodních rostlin (např. z čeledi stulíkovitých) byl objeven mechanismus vyvolávající i rychlejší *hromadný tok* vzduchu do submerzních částí (cirkulace řapíky různě starých listů v závislosti na změnách jejich teploty). Existují důkazy, že k hromadnému toku kyslíku do kořenů zaplavených rostlin (např. rýže) může docházet také v souvislosti s rozpouštěním oxidu uhličitého ve vodě. Pokud totiž není příslušný objem kyslíku, který se spotřebovává při dýchání, nahrazen stejným objemem CO₂ (což není v případě úniku CO₂ do vody v okolí kořenů), pak v intercelulárách kořenů vzniká podtlak vedoucí k hromadnému toku vzduchu z nadzemních částí spojených s atmosférou.

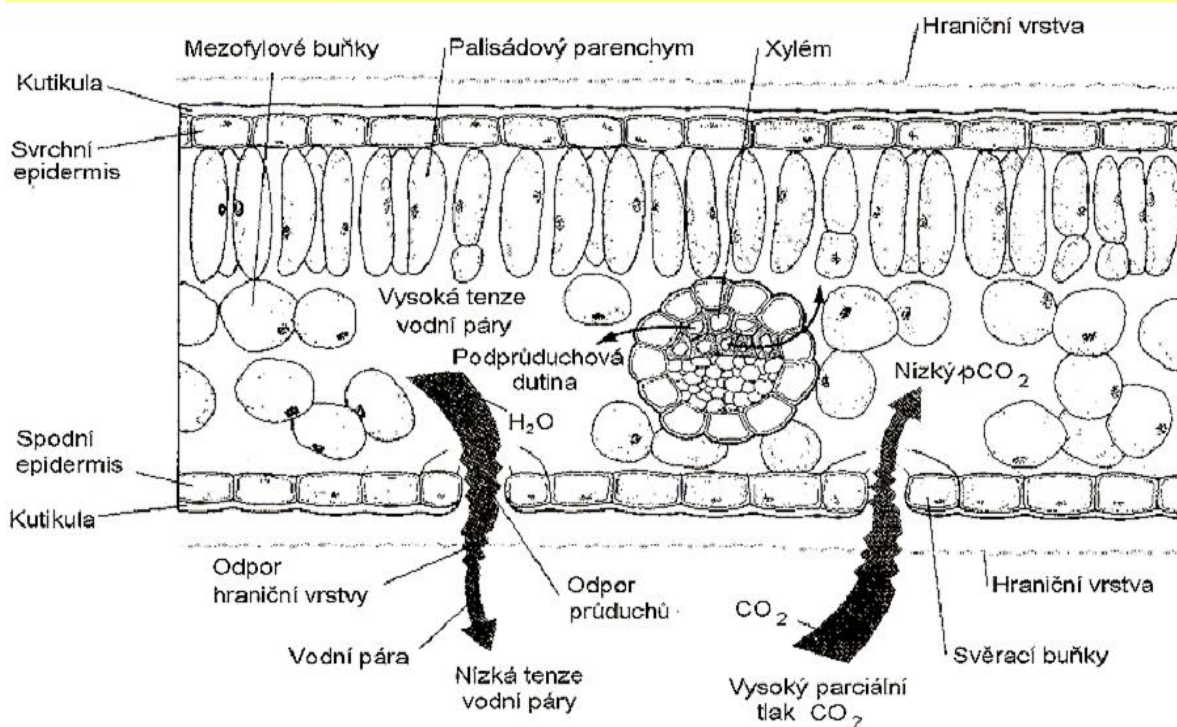
Transport oxidu uhličitého, který je produkován ve všech živých částech rostliny při aerobních respiračních procesech, je možné rozdělit na *dvě fáze*. Tou první je transport v buněčných roztocích (cytosol a hydratované buněčné stěny), a druhou pak difuze ve vzduchem naplněném prostoru intercelulár. Ve vodním prostředí je CO₂ nejen rozpuštěn, ale část molekul reaguje s vodou za vzniku kyseliny uhličité, která při pH nad 4,5 rychle disociuje na hydrogenuhličitanové ionty. I malé zvýšení pH v buňce značně snižuje poměr mezi obsahem volně rozpuštěného CO₂ a vázaného ve formě HCO₃⁻ iontů. Pokud v buňkách probíhá pouze respirace, pak transport CO₂ ve vzduchu naplňujícím interceluláry a přestup přes epidermis s kutikulou do vnějšího prostředí je obvykle velmi rychlý, neboť koncentrace CO₂ vytvořená v intercelulárách respirací je poměrně vysoká (řádově několik objemových procent), zatímco ve vzduchu v okolí rostliny je velice nízká (0,036 objemových %), a tím je i koncentrační spád, na kterém závisí rychlost difuze, příznivě vysoký.

U listů s probíhající fotosyntézou ale výdej oxidu uhličitého ze současně probíhající respirace zdaleka nestačí pokrývat jeho spotřebu v asimilačních procesech. Je tedy nutný *transport CO₂ do listu*, což je spojeno s řadou vážných problémů. Vzhledem ke zmíněné nízké koncentraci CO₂ ve vzduchu je rychlost difuze do listu obvykle nedostatečná k plnému uspokojení potřeby syntetických procesů.

Rychlost difuze CO₂ do listu je vážným limitujícím faktorem celkové rychlosti fotosyntézy a je jí proto při fyziologických výzkumech věnována velká pozornost. Čím je vlastně omezována rychlost toku CO₂ do listu? Pokud je kapacita biochemického zpracování CO₂ v buňce vysoká a koncentrace CO₂ ve vzduchu okolo listu konstantní, pak rozhodující slovo má *vodivost difuzních cest*, neboť koncentrační spád zůstává stejný. Naprostá většina CO₂ vstupuje do listů **průduchy**, které jsou nejužším místem difuzní cesty, a proto také nejvíce rozhodují o rychlosti difuze. Šířku průduchových štěrbin (a tím tedy i vodivost pro difuzi CO₂) může rostlina ve značném rozmezí aktivně řídit. Funkci průduchů si v dalším textu podrobněji popíšeme, stejně tak jako metody, při kterých stanovení rychlosti toku CO₂ využíváme k odhadu rychlosti fotosyntézy a respirace.

Transport vodní páry je prakticky vždy jednosměrný, z rostliny do atmosféry, neboť vzduch v intercelulárách považujeme za téměř nasycený vodní parou. Teoreticky ovšem transport vodní páry ze vzduchu do rostliny možný je - např. u silně vyschlých či podchlazených orgánů ve vlhkém prostředí. To jsou však opravdu vzácné případy. Dráha difuze molekul vodní páry z rostliny bývá velmi krátká a gradient koncentrací obvykle neobyčejně velký - z toho vyplývá i *velká rychlost difuzního toku*.

Příjem CO_2 do listu je nutně spojen s výdejem vodní páry !



Gradient koncentrace či parciálního tlaku vodní páry mezi vzduchem a listem je nejen vyšší, ale i podstatně *proměnlivější* než tomu je u CO_2 . Na tomto kolísání se podílejí změny parciálního tlaku vodní páry jak ve vzduchu, tak i v listu, a to především pro jeho silnou *závislost na teplotě*. Teplota vzduchu i listů se mění v průběhu dne často nestejným způsobem, avšak každé zvýšení teploty (jak vzduchu, tak i listů) vede obvykle k prudkému zvýšení gradientu koncentrace vodní páry.

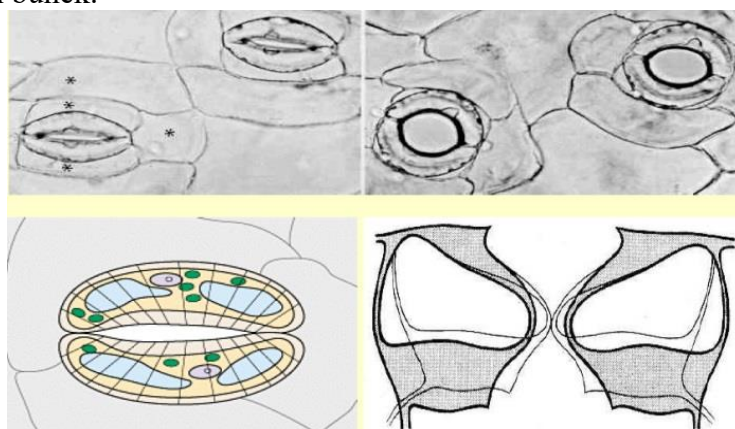
Transport vodní páry z rostliny je možný všemi jejími částmi, ovšem daleko nejvýznamnější, tak jako v případě CO_2 , je opět u listů. Ty orgány, ve kterých neprobíhá fotosyntéza, mohou mít povrch pokrytý souvislou kutikulární vrstvou s voskovými impregnacemi, která velmi zpomaluje rychlost difuze vodní páry. Asimilující orgány se však takto trvale uzavírat nemohou. Pro zajištění dostatečného přísunu CO_2 ke chloroplastům je žádoucí, aby list kladl co nejmenší odpor difuznímu toku. Rostlina je tedy postavena před *dilema, jak získat co nejvíce CO_2 a přitom ztratit co nejméně vody*. Stavba a funkce průduchového aparátu jsou příkladem velmi dokonalého optimalizačního řešení tohoto problému.

Průduchová regulace výměny plynů

Všechny orgány vyšších rostlin, ve kterých probíhá fotosyntetická asimilace CO_2 , mají v epidermis pravidelně rozmístěny zvláštní párové buňky, označované jako *buňky svěrací*. Ty části buněčné stěny, kterými se obě svěrací buňky spolu stýkají, nejsou srostlé, ale vytvářejí *průduchovou štěrbinu*, která v otevřeném stavu zásadním způsobem usnadňuje výměnu plynů mezi vzduchem v intercelulárách a okolní atmosférou. Kdybychom sečetli plochu otevřených průduchových štěrbin, zjistili bychom, že tvoří sotva jedno procento z celkové plochy listu. Rychlost difuzního toku plynů otevřenými průduchovými štěrbinami však může být mnohem větší, než bychom očekávali. Zhruba asi taková, jako kdyby polovina plochy listu nebyla vůbec pokryta epidermis. Navíc *velikost průduchové štěrbinu může rostlina aktivně a zcela spojitě měnit od stavu úplného uzavření až po plné otevření*, průduchy jí tedy dávají možnost velmi dokonale řídit rychlost výměny plynů s okolím.

Svěrací buňky průduchů při růstu listů sice vznikají ze stejného meristematického základu jako ostatní epidermální buňky, avšak při diferenciaci získávají zcela *jiné strukturální znaky*. Nejde jen o nápadné tvarové rozdíly a zvláštní zesílené části buněčné stěny. Na rozdíl od běžných buněk pokožky mají *vždy dobře vyvinuté chloroplasty*, které však téměř *neobsahují karboxylační enzym Rubisco*. Zato v cytosolu je hojně přítomen jiný karboxylační enzym, *PEP karboxyláza*. Mají velký počet *mitochondrií* s vysokou aktivitou citrátového cyklu. Svěrací buňky *nejsou propojeny se sousedními buňkami pomocí plazmodesmat*, zato mají s nimi velmi dokonalé spojení pomocí transportních proteinů v plasmatické membráně. Všechny tyto zvláštní znaky stavby svěracích buněk podmiňují jejich správnou funkci, jak bude ještě blíže vysvětleno.

Mechanika pohybů průduchů je známa velmi dobře. K otevírání průduchové štěrbinu *přesunem vody z buněk listového mezofylu do svěracích buněk*, což vede ke zvětšení jejich objemu. Tím, že ve stěnách svěracích buněk převažuje příčná (radiální) orientace celulósových vláček (micel), nemají tyto buňky po příjmu vody tendenci zakulacovat svůj tvar (a tím tedy uzavírat štěrbinu), ale spíše protahovat se do délky. Vzhledem k pevnému ukotvení konců svěracích buněk do buněčných stěn sousedních buněk je výsledkem protahování jisté prohnutí ("vyboulení") svěracích buněk bočním směrem. Tím se štěrbinu rozevírá. Toto základní schéma může být poněkud modifikováno u rostlin s atypickou morfologií svěracích buněk, např. u trav dochází ke zvětšení objemu pouze v rozšířených koncích svěracích buněk.



Přivřený a plně otevřený průduch (nahore). Vlevo dole je znázorněno příčné uložení vláken celulózy (micel) v buněčných stěnách svěracích buněk, vpravo příčný řez svěracími buňkami v otevřeném a v zavřeném stavu.

Vysvětlením mechaniky pohybů jsme však teprve na úplném začátku řetězce příčin a následků. Čím je způsoben náhlý přesun vody do svěracích buněk při otevírací reakci? Bylo dokázáno, že jde o *tok vyvolaný zvýšením osmotického tlaku ve svěracích buňkách*, a to v důsledku *předcházejícího přesunu iontů draslíku*. Náhlý vtok draslíkových iontů do svěracích buněk je ovšem závislý na otevření iontových kanálů pro draslík v plasmatické membráně, a současně na *stimulaci protonových pump*, jejichž aktivitou dochází k přesunu vodíkových iontů na vnější stranu plasmatické membrány. Chybějící vodíkové ionty v cytosolu svěracích buněk jsou doplňovány *disociací organických kyselin*, především kyseliny jablečné a citrónové, jejichž tvorba z rezervních sacharidů je rovněž stimulována (= biochemický pH-stat umožňující zachovat optimální pH pro enzymatické procesy v cytosolu). Vytvořený vysoký elektrochemický potenciál nahromaděním protonů v buněčné stěně je podmínkou rychlého difusního toku iontů K^+ do cytosolu svěracích buněk. Přesun iontů draslíku bývá někdy provázen i přesunem jistého množství chloridových iontů.

Při *zavírací reakci* průduchů je aktivita protonových pump inhibována, ale současně dochází k aktivaci membránových proteinů pro export malátových aniontů ze svěracích

buněk. Tím dojde k depolarizaci plazmatické membrány a k samovolnému transportu iontů draslíku z cytosolu svěracích buněk do buněčné stěny a do buněk vedlejších. Stejným směrem začne osmoticky difundovat i voda, turgorový tlak se sníží a průduch se zavře. Existence malátového přenašeče v membránách svěracích buněk a jeho klíčová významnost pro zavírací reakci průduchů byla objevena teprve v roce 2008.

Jaký **signál** však spouští celý otevírací a zavírací mechanismus do pohybu? Výsledkem mnohaletého usilovného hledání způsobu řízení pohybů průduchů je zjištění, že *neexistuje jediný signál či řídicí okruh, ale u každé rostliny je jich vždy několik* a na zcela odlišných principech, ale působících často současně v koordinované souhře.

Světlo (= viditelné záření) je zcela evidentně jedním z významných signálů. Za tmy jsou průduchy u většiny rostlin uzavřeny (výjimku tvoří jen některé sukulentní rostliny metabolickou cestou CAM, ke kterým se ještě vrátíme v kapitole o fotosyntéze). Po osvětlení však dochází k rychlému otevírání. Vysvětlit přenos tohoto signálu však není jednoduché. Podle dřívějších představ měl být vliv světla zprostředkován jeho absorpcí v chlorofylu a posléze sníženou koncentrací CO₂ v intercelulárách v důsledku aktivované fotosyntézy. Dnes však víme, že kromě tohoto nepřímého mechanismu může světlo působit na pohyby průduchů také přímo, nezávisle na fotosyntéze. *Největší účinek má světlo modré (o vlnové délce 430 až 460 nm), které aktivuje činnost protonových pump v plazmatické membráně svěracích buněk.* Tato aktivace je zprostředkována flavoproteinovým pigmentem označovaným jako *kryptochrom*, který je vázán v plazmatické membráně svěracích buněk.

Koncentrace CO₂ ve vzduchu v intercelulárách má neobyčejně významný vliv na pohyby průduchů (za nízké koncentrace se otevírají, vysoká naopak vede k zavírání). Koncentrace CO₂ bývá velmi často hlavním řídicím signálem, a to především za nízkých a kolísavých hodnot záření, kdy *otevírání průduchů se může v podstatě zpětnově řídit rychlostí spotřeby CO₂ ve fotosyntéze.* Příjem signálu (stav vnější koncentrace CO₂) je uskutečňován pomocí senzorových proteinů v plazmatické membráně svěracích buněk. Jeho účinek je silnější než působení záření. Proto snížení koncentrace CO₂ v intercelulárách (např. jeho fixací do organických kyselin pomocí již zmíněné PEP karboxylázy u sukulentních rostlin s metabolismem typu CAM) může vyvolat otevírání průduchů i za tmy.

Nedostatek vody v listu (vodní deficit), provázený poklesem vodního potenciálu a turgoru, způsobuje i za jinak příznivých okolností (dostatek světla, potřeba dodávat CO₂ pro fotosyntézu vnímaná snížením jeho koncentrace v intercelulárách) zavírání průduchů, neboť *ochrana listu před nadměrnou ztrátou vody má prioritu před maximalizací toku CO₂ pro fotosyntézu.* Jak již víme, průduchy se udržují v otevřeném stavu díky vysokému turgoru svěracích buněk a tak není obtížné si představit jejich pasivní zavření v důsledku většího snížení obsahu vody, a tím i ztráty turgoru, ve všech buňkách listu.

Existuje však ještě jiný, citlivější způsob reakce na nedostatek vody, který umožňuje rostlinám zavírat průduchy mnohem dříve, než dojde k větší ztrátě vody. Jde o reakci zprostředkovanou *kyselinou abscisovou*, což je terpenoidní sloučenina ze skupiny fytohormonů, kterými se budeme podrobněji zabývat při popisu regulace růstových procesů. Kyselina abscisová se uvolňuje z mezofylových buněk již při velmi mírném poklesu jejich turgoru a je vedena ke svěracím buňkám. Působením kyseliny abscisové dochází k inhibici činnosti protonových pump, ovšem zprostředkovaně, pomocí vnitrobuněčných druhotných mediátorů, ke kterým patří v první řadě ionty vápníku. Koncentrace iontů vápníku ovlivňuje v buňce rychlost enzymově řízených reakcí (např. fosforylace), na nichž je závislá činnost protonových pump v membránách, a tudíž i rychlost transportu K⁺ do svěracích buněk.

Je zajímavé, že ke zvýšení koncentrace kyseliny abscisové v listech (a tím i k zavírání průduchů) může dojít i jejím *transportem z jiných orgánů*, zejména z kořenů. Začínající nedostatek vody v půdě (ale i některé jiné stresové podněty, např. zasolení či nedostatek kyslíku) indukují v kořenech syntézu kyseliny abscisové, která je xylémovým tokem rychle

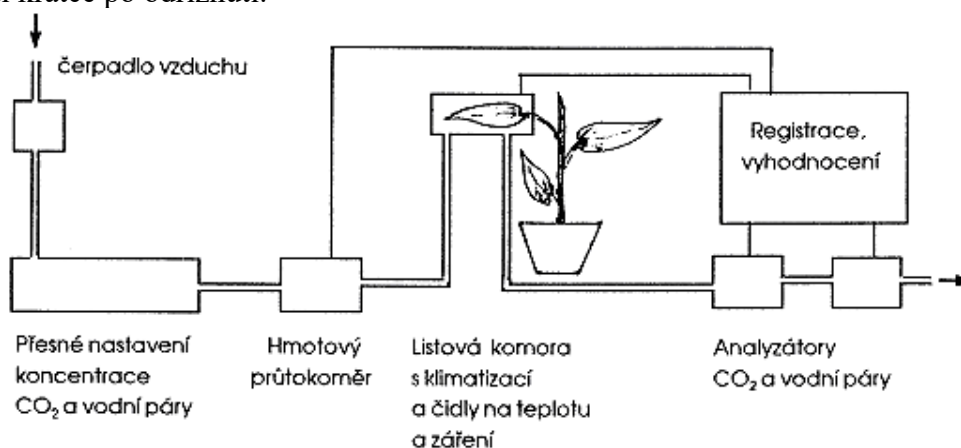
transportována do listů. K zavírání průduchů tímto mechanismem může tedy dojít i za stavu, kdy listy mají ještě vody dostatek (např. jsou zásobeny z té části kořenů, která dosud může přijímat vodu), tedy v předstihu před hrozícím celkovým nedostatkem.

Vysoká citlivost průduchů na **vlhkost vzduchu** u některých druhů byla objevena poměrně nedávno. Velmi nízký parciální tlak vodní páry ve vzduchu okolo listu vede k zavírání průduchů zcela nezávisle na stavu vody v listu (i při plném nasycení listových pletiv!). Jde tedy o další velmi citlivý regulační mechanismus k včasnému zabránění ztrát vody, kromě popsané regulace pomocí kyseliny abscisové. Pokles vlhkosti vzduchu při otevřených průduších znamená vždy velké zvýšení výparu vody z listů a díky rychlé reakci průduchů lze těmto ztrátám zabránit hned v samém počátku. To je zvláště důležité pro ty rostliny, které mohou jen velmi obtížně a zřídka doplňovat ztracenou vodu (např. epifyty).

Závěrem tedy můžeme shrnout, že **kromě přímého vlivu světla na otvírání průduchů existují ještě nejméně dva další, významnější regulační systémy se zpětnou vazbou. První je řízen koncentrací CO_2 v intercelulárách a zajišťuje tok CO_2 přiměřený potřebám fotosyntézy. Druhý systém je řízený stavem vody v pletivech (s přenosem signálů pomocí kyseliny abscisové), přizpůsobuje tedy tok vodní páry z listu možností příjmu vody rostlinou, a tím ji chrání před poškozením dehydratací.**

Měření rychlosti výměny plynů a vodivosti průduchů

Měření rychlosti výměny plynů (O_2 , CO_2 , vodní pára) je nejčastěji založeno na stanovení změn jejich koncentrace ve vzduchu v těsné blízkosti rostliny. Technicky nejschůdnější řešení spočívá v uzavření rostliny (častěji však jen její části, např. listu) do průhledné komůrky. Změny koncentrace plynů měříme buď v protékajícím vzduchu (= otevřený systém, průběžně registrujeme *rozdíly* v jejich koncentraci před vstupem do komůrky a po výstupu), nebo v cirkulující smyčce (uzavřený systém, vyhodnocujeme *rychlost* poklesu či vzestupu koncentrace). Komůrka musí být konstruována tak, aby bylo možno řídit podmínky prostředí uzavřeného orgánu (teplotu, ozáření, ventilaci). Pro **analýzu plynů** je k dispozici řada přesných analyzátorů a čidel (*kyslík*: paramagnetické analyzátory, čidla Clarkova typu. *CO_2* : analyzátory infračerveného záření. *Vodní pára*: psychrometry, kapacitní čidla, měřiče rosného bodu, aj.). Rychlost výdeje vodní páry z rostlin můžeme také určovat z úbytku jejich hmotnosti krátce po odříznutí.



Zjednodušené schéma aparatury pro měření rychlosti výměny plynů u rostlin.

Pro **měření difuzní vodivosti průduchů** se používají přístroje označované jako difusní porometry. Základním principem je přesné stanovení rychlosti výdeje vodní páry z uzavřené části rostliny (z kontinuálního měření změn vlhkosti vzduchu v komůrce) a dále z měření teploty vzduchu a objektu (obvykle listu) v komůrce. Pak lze vypočítat za pomoci fyzikálních vztahů či tabulek i rozdíl mezi koncentrací vodní páry *uvnitř listu* (e_s , je považována za

nasycenou při dané teplotě listu) a v okolí listu (e_a). Rychlost toku vodní páry z listu lze vypočítat z měřené rychlosti vzestupu vlhkosti vzduchu v komůrce. Jak již bylo uvedeno na začátku této kapitoly, obecně pro rychlost difuzního toku platí, že je přímo závislá na rozdílu koncentrací a na difuzní vodivosti (g). Rychlost toku vodní páry z listu (J_{VP}) je tedy dána vztahem, ve kterém jedinou neznámou zůstává difuzní vodivost: $J_{VP} = (e_s - e_a) g_{VP}$

Difuzní vodivost epidermis pro vodní páru (g_{VP}) lze tudíž vypočítat: $g_{VP} = J_{VP} / (e_s - e_a)$.

Při této metodě není stanovena pouze vodivost průduchů, ale celé epidermis, tedy i kutikuly. Ta je ovšem ve srovnání s vodivostí otevřených průduchů zanedbatelně malá (více než stokrát menší).

Difuzní vodivost epidermis listů pro CO_2 (g_{CO_2}) můžeme odvodit z vodivosti pro vodní páru (g_{VP}), stanovené popsáním způsobem. Není s ní ovšem nikdy totožná. Molekuly CO_2 mají totiž větší hmotnost než molekuly vodní páry, a proto i menší hodnotu difuzního koeficientu (difuze je pomalejší). Je proto nutné hodnoty g_{VP} snížit úměrně ke vzájemnému poměru difuzních koeficientů:

$$g_{CO_2} = g_{VP} \frac{D_{CO_2}}{D_{VP}} = 0,62 g_{VP}$$

Kontrolní otázky k 1. části učebního textu Fyziologie rostlin

1. Jak je definován vodní potenciál a jaké dílčí složky určují jeho celkovou hodnotu?
2. Rostlinné buňky se sice chovají jako osmotický systém, ale ne zcela dokonalý. V jakých funkčních znacích se odchylují od ideálního osmotického systému?
3. Pokud bychom buňku s osmotickým tlakem cytosolu $\pi = 1,2$ MPa ponořili do roztoku s hodnotou osmotického tlaku $\pi = 0,4$ MPa, jaký hydrostatický (turgorový) tlak by se v ní vytvořil? (za předpokladu, že by se chovala jako ideální osmotický systém).
4. Jakým způsobem mohou rostlinné buňky velmi rychle měnit osmotický tlak cytosolu?
5. Z jakých důvodů je pro rostliny důležité udržovat vysoký turgorový tlak v buňkách?
6. Jaké vnější i vnitřní faktory ovlivňují rychlost toku vody v cévách xylému?
7. Jaké jsou příčiny vzniku bublinek ve vodivých elementech xylému (kavitace, plynová embolie) a jaké mechanismy umožňují rostlinám zajistit i v tomto případě tok vody?
8. Na jakých okolnostech závisí rychlost toku vody do buňky přes její plazmatickou membránu (vztaženo je jednotku plochy membrány).
9. Za jakých okolností může dojít k samovolnému vytékání vody z pahýlu po odříznutí stonku (kořenový vztlak) a co je jeho příčinou?
10. Jaké maximální rychlosti může dosahovat transport vody u našich listnatých stromů s širokými cévami ve srovnání s jehličnatými stromy?
11. Jaké jsou hlavní znaky membránových přenašečů typu iontových kanálů ve srovnání s přenašeči (carriers) v membránách rostlinných buněk?
12. Jakými podněty (signály) může být aktivováno otvírání selektivních kanálů v membránách rostlinných buněk?
13. Zdůvodni, zda může nebo nikdy nemůže dojít k transportu iontů živin (např. K^+) z půdy do kořenů prostou difuzí (přes selektivní kanály), je-li jejich koncentrace v kořenových

buňkách desetkrát vyšší než v půdním roztoku okolo kořene!

14. Jaký je rozdíl mezi symportním a antiportním typem přenosu látek přes buněčné membrány?
15. Co je hybnou silou transportu roztoků v lýku a proč může i ve stejné sítkovici dojít v průběhu dne k obrácení směru proudění?
16. Popiš hlavní principy apoplastové a symplastové cesty naplňování lýka!
17. Jakým způsobem je řízen odběr sacharózy z floémové tekutiny v místech největší potřeby?
18. Jaké jsou hlavní rozdíly z hlediska své stavby a funkce mezi floémovými buňkami sítkovic a buňkami vedlejšími v jejich okolí?
19. Jakým způsobem se xylémová soustava rostliny může vyrovnávat s poškozením funkčnosti některých svých cév vniknutím bublinky vzduchu?
20. Jaké sloučeniny bývají v největším množství transportovány v lýku?
21. Jaké anatomické a biochemické zvláštnosti mají svěrací buňky průduchů ve srovnání s ostatními epidermálními buňkami a jaký je funkční význam těchto zvláštností?
22. Jakým způsobem jsou pohyby průduchů vázány na mezibuněčný transport draslíkových iontů a čím je směr tohoto transportu podmíněn?
23. Jakým mechanismem je zajištěno otvírání a zavírání průduchů v závislosti na aktivitě fotosyntetických procesů v mezofylových buňkách?
24. Jakým mechanismem je spouštěna zavírací reakce průduchů na začínající nedostatek vody v půdě, i když listy jsou ještě vodou zcela nasyceny?
25. Jakým způsobem bychom mohli vypočítat difuzní vodivost epidermis listů pro vodní páru a oxid uhličitý?

2. ČÁST – METABOLICKÉ PROCESY

Poznávání neuvěřitelně velkého množství chemických sloučenin a reakcí při přeměnách látek v živých buňkách je hlavní náplní vědního oboru biochemie. Pro rostlinného fyziologa jsou detailní znalosti o metabolických pochodech ovšem také velice cenné, především jako podklad k vysvětlení procesů na vyšších organizačních úrovních (orgány, celé rostliny). Fyziologie rostlin však nejen využívá biochemické poznatky, ale má vypracované i vlastní metody, které umožňují studovat metabolické projevy rostlin *nedestruktivně (in vivo)*, a to i u rostlin rostoucích v přírodních podmínkách. K pochopení vztahů mezi metabolismem a ostatními funkcemi rostliny bude směřovat následující část učebního textu. Nemůžeme ale zcela vypustit přehled základních poznatků o metabolických procesech na buněčné úrovni.

2.1 Primární procesy fotosyntézy

Naprostá většina rostlin získává veškerou energii pro své metabolické procesy z primárního energetického zdroje, což je slunečního záření, a veškerý uhlík z jednoduché anorganické sloučeniny, oxidu uhličitého. Jsou to tedy *fotoautotrofní* organismy. Díky těmto schopnostem mají klíčové postavení v celé biosféře, neboť ostatní (heterotrofní) biotické složky ekosystémů, včetně člověka, pouze využívají energii bohaté organické látky vytvořené rostlinami.

Procesy vedoucí k vazbě oxidu uhličitého do organických sloučenin s využitím radiační energie označujeme jako *fotosyntetickou asimilaci* CO_2 , zkráceně (i když ne zcela přesně) hovoříme o fotosyntéze. Obecněji lze definovat fotosyntézu jako ***souhrn procesů spojených s přeměnou energie fotonů (kvant záření) do volné chemické energie, která je dále využita při biologických syntézách.*** Chemická energie získaná ze záření může být totiž využita přímo v chloroplastu nejen k redukci anorganických sloučenin uhlíku, ale i k jiným biochemickým reakcím, např. k redukci anorganických sloučenin dusíku a síry.

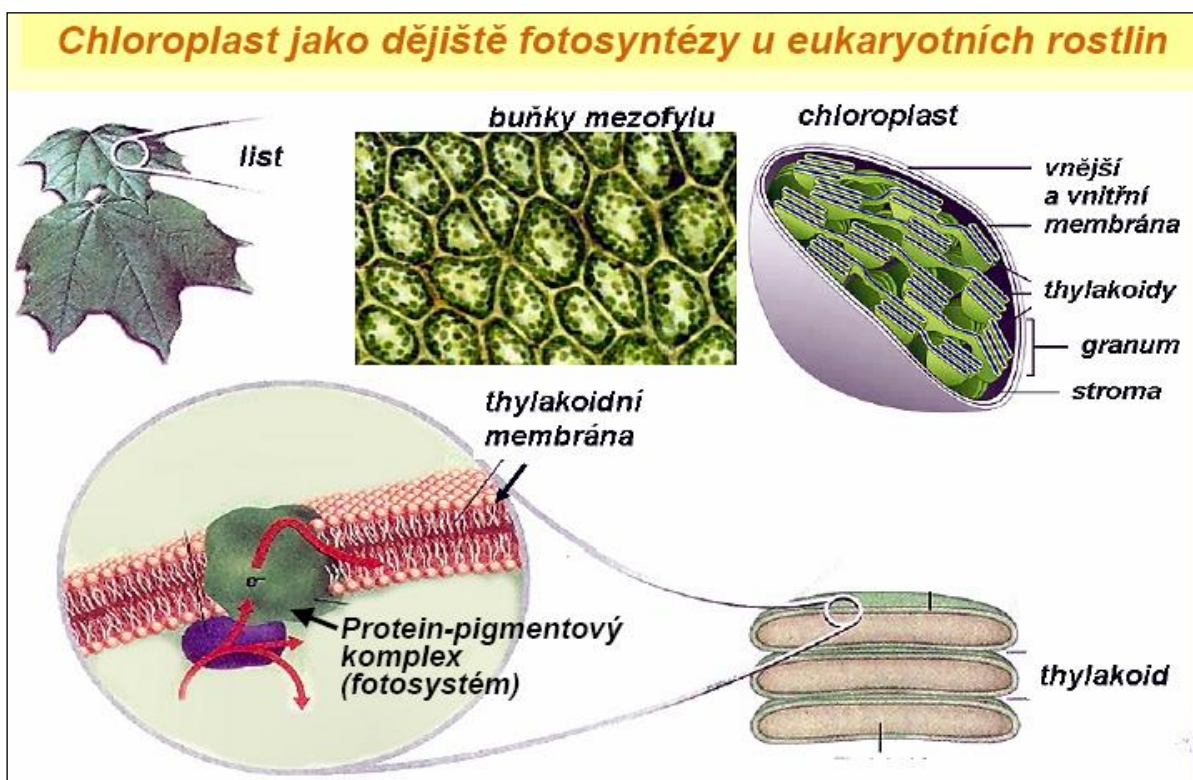
Fotosyntetická *asimilace oxidu uhličitého*, která je ústředním metabolickým procesem rostlin, zahrnuje velké množství dílčích reakcí, které lze rozdělit do tří skupin:

- ***fyzikální procesy*** související s absorpcí zářivé energie v molekulách asimilačních pigmentů a s rezonančním přenosem zachycené energie k reakčním centrům,
- ***primární fotochemické a redoxní procesy*** spojené s přenosem elektronů redoxními systémy k redukci **NADP** (*nikotinamid adenin dinukleotidfosfát*) a k energetické podpoře vzniku **ATP** (*adenosintrifosfátu*) z **ADP** (*adenosindifosfátu*),
- ***sekundární biochemické reakce***, ve kterých dochází k vazbě CO_2 do organických sloučenin s využitím energie produktů primárních procesů.

Je potřeba poznamenat, že fotosyntetické procesy jsou z evolučního hlediska velmi staré. Vyvinuly se již u primitivních prokaryotních organismů před několika miliardami let, i když zpočátku jejich účinnost byla malá. V té své původní podobě zůstaly zachovány např. u sírných bakterií. Ale již u sinic (což jsou ovšem také velmi staré prokaryotní organismy) evoluce fotosyntézy značně pokročila a složitější struktura protein-pigmentových součástí fotosyntetického aparátu vedla ke zvýšení celkové efektivity. Navíc nově nabytá schopnost uvolňovat elektrony štěpením molekul vody a využívat je k tvorbě redukovaných sloučenin otevřela těmto organismům cestu ke kolonizaci širokého spektra stanovišť. Do nejdokonalejší podoby se ovšem fotosyntetické procesy rozvinuly až u eukaryotních rostlin, kde probíhají ve specializovaných organelách, v ***chloroplastech***.

Stavba hlavních funkčních celků v thylakoidech chloroplastů

Chloroplasty jsou orgány s dvojitou povrchovou membránou a s dalším, vysoce specifickým vnitřním membránovým systémem, označovaným jako **thylakoidy**. Thylakoidní membrány sice vznikají z vnitřní obvodové membrány chloroplastu, avšak vytvářejí zcela oddělenou soustavu uzavřených plochých váčků. Skupiny těsně na sebe přiléhajících thylakoidů nazýváme **grana**. Ty části membrán, které k sobě v granech přiléhají, označujeme jako granální (přitisknuté, stěsnané) thylakoidní membrány. Mají poněkud odlišnou skladbu a funkci než ty, které volně komunikují s okolím. Prostor uvnitř thylakoidů (**lumen**) je vyplněn vodou s rozpuštěnými solemi. Thylakoidy jsou vysoce specializované struktury sloužící k efektivnímu zajištění krajně obtížných *fotochemických* procesů, tedy vlastní přeměny radiční formy energie v chemickou. Gelový roztok mezi thylakoidy (**stroma**) je dějištěm mnoha desítek *biochemických* procesů – probíhá zde např. tvorba bílkovin kódovaných v plastidovém genomu, syntéza asimilačních barviv, mastných kyselin, ale zcela převažují procesy vedoucí k asimilaci anorganických forem uhlíku, dusíku a síry.



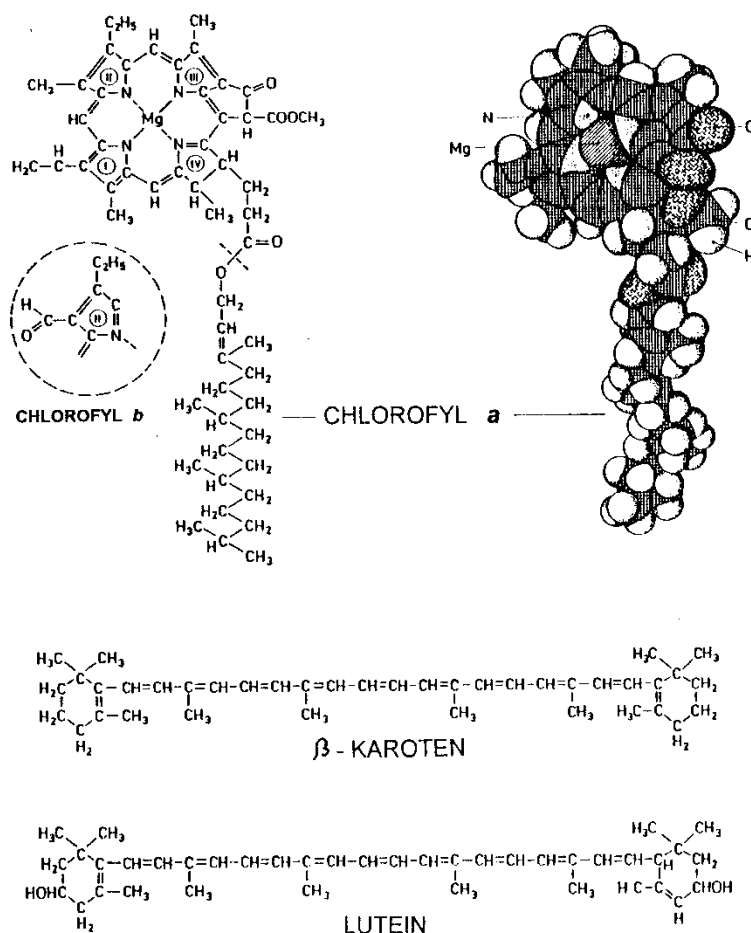
Specifické znaky chloroplastů

- semiautonomní orgány s vlastním genomem, proteosyntézou a množením (dělením),
- obsahují asi 300 druhů proteinů, syntetizují však z nich jen asi 90 (ostatní se importují z cytosolu),
- vytvářejí se z proplastidů, do funkčního stavu se vyvíjejí jen na světle,
- mají dvojitou membránu na obvodu a uvnitř další membránový systém plochých váčků (thylakoidů),
- thylakoidy mají zvláštní typ membrán s vysokým obsahem galaktolipidů (místo fosfolipidů).

V membránách thylakoidů je pozoruhodně vysoký obsah integrálních bílkovin, obvykle asi 60 až 65 % jejich hmotnosti. Na většinu z nich se váže velké množství molekul asimilačních barviv (chlorofylů a karotenoidů) za vzniku **protein-pigmentových komplexů**.

Proteiny v thylakoidních membránách, ať už s navázanými pigmenty či bez nich, nejsou rozmístěny náhodně, ale sdružují se do velmi *dokonale organizovaných shluků* (funkčních celků), které mohou sice pracovat do značné míry samostatně, ale obvykle spolu navzájem spolupracují. Rozdělujeme je do čtyř hlavních skupin: **fotosystém I**, **fotosystém II**, **cytochromový komplex** a **ATP-syntáza**.

Oba typy fotosystémů (I a II) se skládají z centrální části (**reakční centrum, jádro fotosystému**), která je obklopena světlosběrným protein-pigmentovým komplexem, označovaným zkratkou **LHC** (= *Light Harvesting Complex*), nebo též jako **anténa**. Funkcí antény je pouze *zachycovat a induktivní rezonancí předávat excitační energii (ne elektrony!) do reakčního centra, kde začíná vlastní přenos elektronů*. Na transmembránových proteinech jádra bývají připojeny nejen molekuly asimilačních barviv, ale i molekuly látek s redoxními vlastnostmi, které slouží jako přenašeče elektronů.



Chemická struktura nejčastějších asimilačních pigmentů

Z asimilačních barviv, kterých bývá v každém z obou fotosystémů několik stovek molekul, má zcela výjimečné postavení **chlorofyl a**. Nejen proto, že je ho daleko největší množství (asi tři čtvrtiny všech barviv v chloroplastech), ale také pro schopnost přejít do ionizovaného stavu ztrátou elektronu při jeho excitaci zářivou energií. Tuto schopnost mají ovšem *jen některé molekuly chlorofylu a umístěné v jádru fotosystémů*. Chlorofyl a nacházíme ve všech částech fotosystémů, na rozdíl od chlorofylu b, který bývá zastoupen pouze v anténách.

Chlorofyl *b* má jen přídavnou (akcesorickou) funkci, pro fungování fotosyntetického aparátu není nezbytný. Chlorofyly jsou zelené, protože zelenou část viditelného spektra nejméně absorbují, a tudíž většinu jí odrážejí. Největší absorpci mají v oblasti modré (vlnové délky zhruba 400-500 nm) a červené (600-700 nm).

Karotenoidy mají nejčastěji žlutou, oranžovou a červenou barvu. Absorbují hlavně krátkovlnnou část viditelného záření (mezi 400 až 500 nm). Nacházíme je jak v anténách, tak i v jádře fotosystémů. K nejhojnějším patří **beta-karoten** a ze skupiny xantofylů pak **lutein**. Mají jednak funkci světlosběrnou (jako doplňkové pigmenty), ale navíc velmi významnou funkci ochrannou. Pokud totiž molekuly chlorofylu absorbují více zářivé energie, než může být využito pro přenos elektronů, pak může dojít k energetickému ovlivnění molekul kyslíku. Vzniklý "singletový" kyslík, i některé další „reaktivní“ formy aktivovaného kyslíku, mají destrukční účinky na stavební součásti thylakoidů. Pokud je ale nadbytečná energie převedena ke karotenoidům, může být zneškodněna přeměnou na teplo. Podrobněji jsou tyto procesy popsány ve čtvrté části těchto učebních textů, která je věnovaná stresové fyziologii. Karotenoidy jsou právě pro svoji ochrannou funkci pro život rostlin naprosto nezbytné. Bezkarotenoidní mutanti působením světla velmi rychle hynou.

Dva zmíněné typy fotosystémů mají kromě uvedených společných znaků i řadu odlišností ve své stavbě a funkci. Existují i jisté mezidruhové rozdíly a navíc *tentýž druh může složení fotosystémů (hlavně početnost LHC) poněkud měnit v závislosti na podmínkách prostředí*. Níže uvedené charakteristiky mají proto značně pravděpodobnostní charakter.

Fotosystém I (PS I) se nachází výlučně ve „volných“ částech thylakoidních membrán, které komunikují přímo se stromatem. Nevyskytuje se tedy v těch částech thylakoidů, které k sobě těsně přiléhají. *Jádro fotosystému I* (reakční centrum) obsahuje především dva velké polypeptidy (Ia, Ib), které na sebe vážou ionizovatelnou molekulu chlorofylu *a* (označovanou jako **P700**, neboť absorbuje nejvíce záření o vlnové délce 700 nm). Obvykle se však jedná o *dimer*, tedy o dvě stejné, spojené molekuly. Celkem je k proteinům reakčního centra připojeno ještě asi 50 až 130 dalších molekul chlorofylu *a*, společně s několika molekulami karotenoidů. K proteinům reakčního centra je též připojeno několik redoxních sloučenin sloužících k přenosu elektronů (blíže viz str. 46). *Světlosběrný komplex, LHC I*, („anténa“) obsahuje asi 100 molekul chlorofylu *a* i *b* (v přibližném poměru 3:1), které jsou vázány na několik integrálních proteinů v těsné blízkosti reakčního centra.

Fotosystém II (PSII) je lokalizován v granálních (přitisknutých, stěsnaných) membránách thylakoidů. Jeho hlavní část (bez vnější antény) je tvořena obvykle šesti integrálními a třemi periferními proteiny. Jádro (reakční centrum) fotosystému II tvoří dva integrální proteiny označované jako D1 a D2, na které bývá navázáno asi 50 molekul chlorofylu *a*, včetně jedné zvláštní ionizovatelné molekuly **P680** (označení opět vyjadřuje vlnovou délku světla s maximem absorpce). Dále je na proteiny jádra fotosystému trvale připojeno několik molekul přenašečů elektronů (feofytin, a dva plastochinony typu Q_A a Q_B). K fotosystému II patří i komplex ve kterém dochází k **fotolýze vody**. Bývá též označován jako **OEC** (*Oxygen Evolving Center*). Je tvořen několika malými periferními proteiny, připojenými z vnitřní strany (z lumen) thylakoidní membrány. Na nich jsou navázány 4 ionty manganu, dále ionty chloru a vápníku (Ca²⁺). K přenosu elektronů mezi komplexem oxidace vody a P680 slouží redoxní změny v molekule aminokyseliny *thyrosinu*.

Na proteiny v těsné blízkosti reakčního centra fotosystému II bývá obvykle připojeno asi 100 molekul chlorofylů *a* + *b*, a také několik molekul beta-karotenu. Dohromady tak vytvářejí celek označovaný jako **vnitřní anténa**. Kromě toho je k fotosystému II volně připojena ještě další, **vnější anténa** (= vnější LHC II). Ta obsahuje celkem asi 100 až 200 molekul chlorofylů *a* + *b*, a také jisté množství karotenoidů (hlavně xanthofylů, např. violaxanthin a lutein). Pigmenty ve vnější anténě jsou také vázány na vhodné nosiče,

bílkovinné molekuly (na každé vždy asi 10 molekul chlorofylu, a 1 až 3 molekuly karotenoidů). Vnější antény nejsou pevně spojeny s vnitřními částmi fotosystému. Za nadměrně vysokých hodnot záření se mohou od fotosystému II odpojit, a tím zabránit jeho poškození nadbytečnou excitační energií.

Cytochromový komplex (cyt b_6 - cyt f) je složen ze čtyř proteinů. Tento komplex bývá zastoupen ve všech částech membrán thylakoidů. Jeho hlavní funkcí je zprostředkování transportu elektronů z fotosystému II na fotosystém I ve spolupráci s mobilními přenašeči (plastochinony a plastocyanin, viz dále).

ATP-syntáza (dříve nazývaná "Coupling Factor", CF) je rozmístěna vždy v blízkosti fotosystému I. Tedy jen v těch částech thylakoidních membrán, které volně komunikují se stromatem. Tvoří ji komplex devíti polypeptidů, který je velmi podobný tomu, jaký nalzáme i v mitochondriích. Funkci má jednoznačnou - zprostředkovat tvorbu ATP z ADP energeticky dotovanou tokem vodíkových iontů protonů z thylakoidního vaku (lumen) do stromatu.

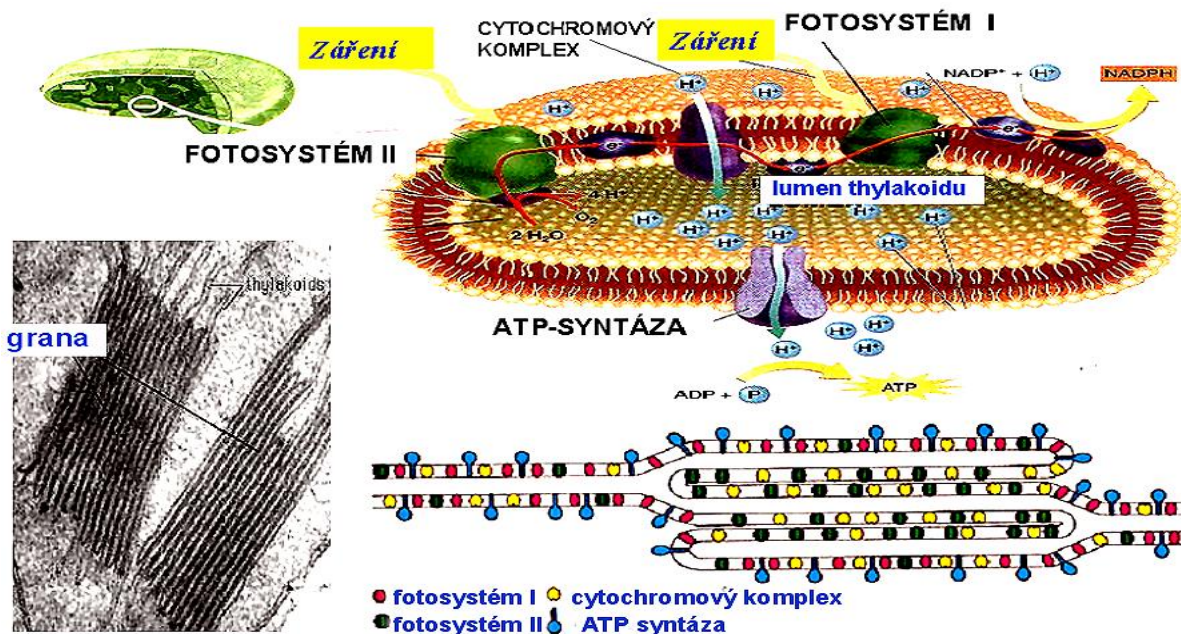
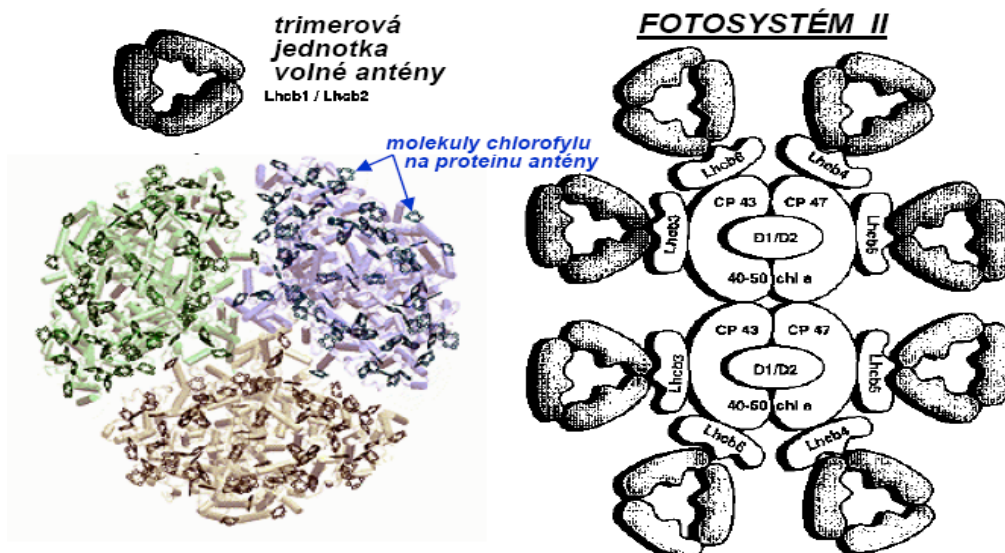


Schéma uložení hlavních proteinových komplexů v thylakoidní membráně. Je také naznačena jejich součinnost při přenosu elektronů a protonů, popisovaná v textu.

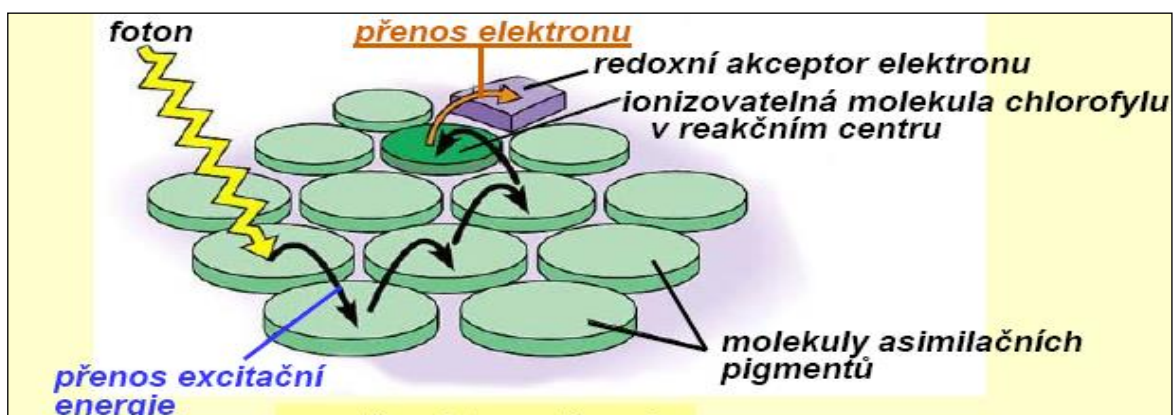


Organizace světlosběrných systémů (antén) u fotosystému II

Průběh primárních procesů fotosyntézy

Při dopadu kvant záření (fotonů) vhodné vlnové délky (přibližně od 400 do 700 nm) na asimilační barviva v anténách, dojde v jejich molekulách k **excitaci elektronů**. Jeden foton přitom excituje (= převádí do energeticky bohatšího, ale nestabilního stavu) pouze jeden elektron v jedné molekule. Přbytek energie při návratu elektronu z excitovaného do základního stavu může být jednak přeměněn na teplo či vyzářen ve formě fluorescenčního záření, ale nejčastěji bývá využit k excitaci elektronu v jiné, blízké molekule chlorofylu či karotenoidu. Touto bezztrátovou výměnou, označovanou jako **induktivní rezonance** může být **excitační energie** jednotlivých elektronů („*exciton*“) přenesena postupnými kroky až do reakčního centra k ionizovatelné molekule chlorofylu *a*.

Jednosměrnost přenosu excitační energie z antén směrem k reakčnímu centru fotosystémů je zajištěna díky rozdílům ve vlastnostech barviv, které jsou velmi závislé na způsobu své vazby k molekulám bílkovin. Čím blíže k reakčnímu centru se barviva nacházejí, tím menší energii potřebují k excitaci. Tím stoupá pravděpodobnost, že právě na ně bude excitační energie přenesena. Karotenoidy a chlorofyl *b* potřebují obecně vyšší excitační energii než molekuly chlorofylu *a*. V centrální molekule chlorofylu *a*, reakčního centra obou typů fotosystémů, pak dojde po příjmu excitonu k oddělení elektronu.



Schématické naznačení excitace elektronu v molekule pigmentů a přenosu excitační energie

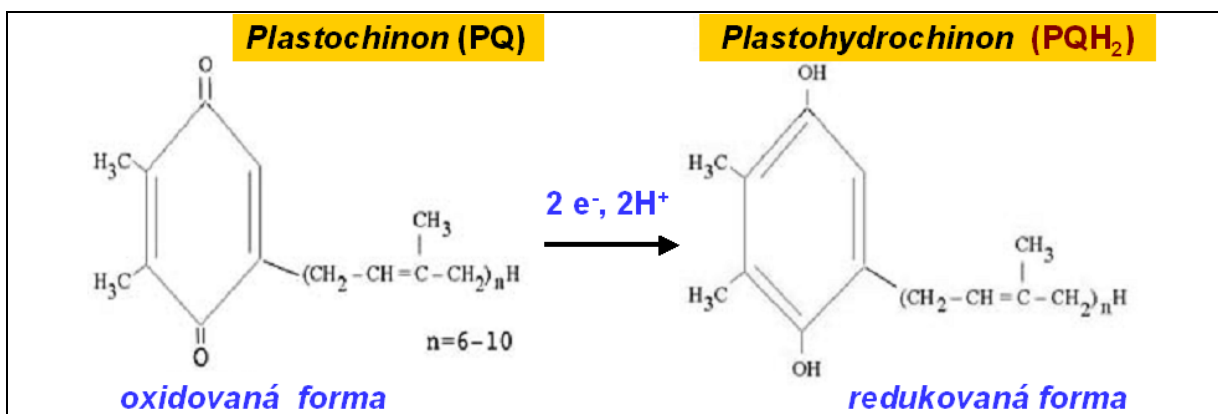
Podívejme se ale blíže na reakce, které následují po uvolnění elektronu, neboť ty jsou v obou typech fotosystémů již odlišné.

V **reakčním centru fotosystému II** je elektron odštěpený z ionizovatelné molekuly chlorofylu P680 zachycen prvním akceptorem, kterým je **feofytin** (= modifikovaná molekula chlorofylu *a* bez centrálního atomu hořčíku). Z něho je předáván na další redoxní přenašeče typu **chinonů**. Dva z nich (označované jako **Q_A** a **Q_B**), jsou vázané k proteinům reakčního centra. Navazujícími přenašeči jsou volně pohyblivé **plastochinony (PQ)**, které se nacházejí v okolí fotosystému.

Vraťme se však ještě k centrální molekule chlorofylu P680, která předala svůj elektron. Zpět do původního redukováného stavu se dostává tím, že přijímá elektron pocházející z rozložené molekuly vody. **Oxidační rozklad vody** je však velmi obtížný proces, který musí být zprostředkován multiproteinovým komplexem OEC (*Oxygen Evolving Complex*), navázaným na fotosystém II. Rozpadem jedné molekuly vody se uvolňují dva elektrony. Měřením bylo zjištěno, že se dokonce současně oxidují dvě molekuly vody, ze kterých se tedy uvolňují *čtyři elektrony*. Je zřejmé, že přímá oxidace vody aktivovanou molekulou chlorofylu (schopnou akceptovat jen jeden uvolněný elektron) není možná. Proto je v centru oxidace vody důležitá přítomnost iontů manganu se schopností čtyři elektrony naráz přijmout a pak je postupně předávat na chlorofyl P680 prostřednictvím přenašeče označovaného jako Y_Z, což je zřejmě radikál tvořený tyrosinovým zbytkem na proteinu D1.

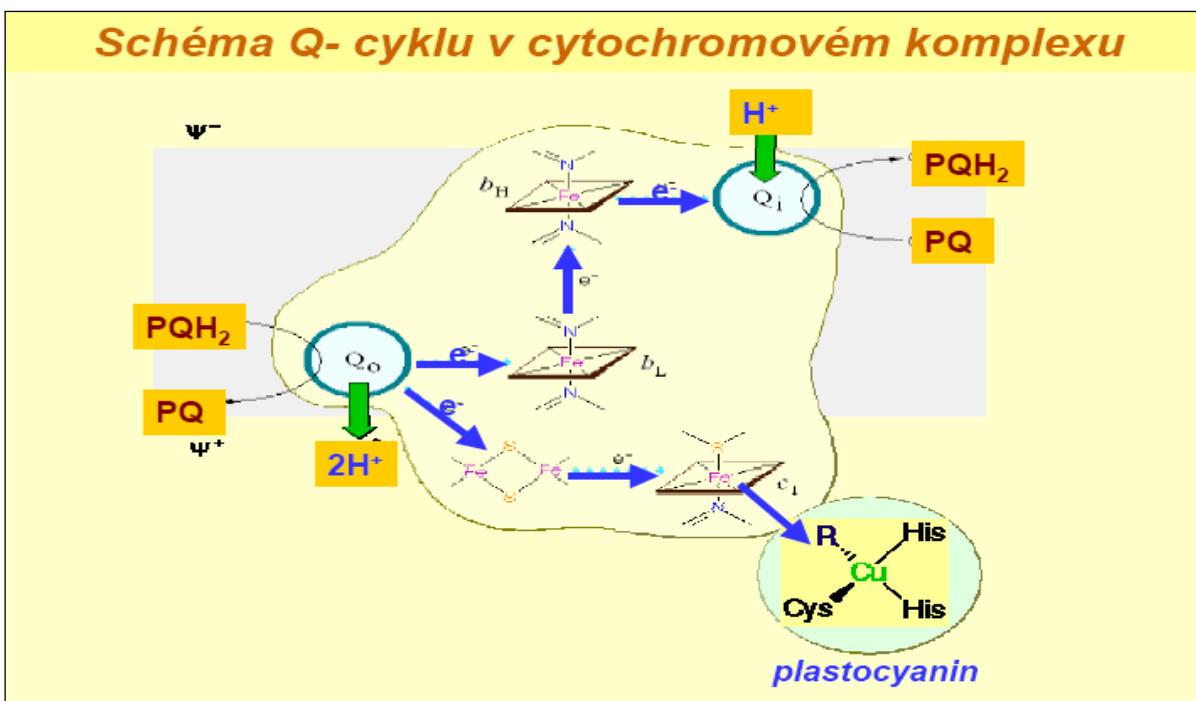
Sledujme však nyní opět cestu elektronů po vazbě na plastochinony. Je důležité si uvědomit, že k redukcí plastochinonu na plastohydrochinon jsou potřebné nejen dva elektrony, ale také **dva vodíkové ionty**, které však nepocházejí z fotolýzy vody. Jsou přebírány z *vnější strany membrány, ze stromatu*, a při dalších redoxních změnách (oxidaci plastohydrochinonu) se v membráně *uvolňují na její opačné straně*, tedy do lumen. Vidíme tedy, že *oxidací jedné molekuly vody a následným přenosem elektronů ve fotosystému II se lumen thylakoidu obohatil o čtyři vodíkové ionty*. To je velmi důležité z hlediska celkového energetického výtěžku, jak bude zřejmé z dalšího výkladu.

Přenos elektronů z fotosystému II k cytochromovému komplexu pomocí volně pohyblivých *plastohydrochinonů* (v chloroplastech jich bývá několik druhů) je nejpomalejší proces v celé transportní cestě. Průměrná doba přenosu je asi 5 milisekund, ostatní výměny jsou obvykle o několik řádů rychlejší.



Obecné schéma redukce plastochinonů.

Cytochromový komplex je tvořen čtyřmi proteiny, na které jsou navázány čtyři redoxní systémy. U těch ale výměna elektronů není spojena s vazbou vodíkových iontů. Proto při oxidaci volně pohyblivých plastohydrochinonů na tomto komplexu se odpojené protony mohou hromadit ve vnitřní části thylakoidních váčků (lumen), spolu s protony produkovanými rozkladem vody ve fotosystému II. Oxidací jedné molekuly hydrochinonu se uvolní dva elektrony, ovšem každý z nich se může ubírat rozdílnými cestami. Jeden je obvykle zachycen redoxním systémem typu Fe-S (na tzv. *Rieskeho proteinu*), pak je přenesen na cytochrom typu *f*, a nakonec na mobilní přenašeč **plastocyanin**. Druhý z elektronů bývá zachycen hemovou redoxní skupinou cytochromu typu *b*, a po přestupu na další cytochrom stejného typu (na témže proteinu) je uvolněn k redukcí některé z volně pohyblivých molekul plastochinonů, a ta je pak opět oxidována na cytochromovém komplexu. Smyslem tohoto cyklického přenosu elektronu, označovaného jako **Q-cyklus** (= chinonový cyklus), je přispět k dalšímu přečerpávání vodíkových iontů z vnější, stromatální strany (odkud se odebírají při redukcí plastochinonů) do lumen thylakoidu (kam odcházejí při oxidaci plastohydrochinonu).



Již zmíněný *plastocyanin* (PC), na který dříve nebo později přecházejí všechny elektrony transportované z fotosystému II přes cytochromový komplex, je malý protein (10,5 kDa) ve vodě dobře rozpustný, s redoxní skupinou obsahující měď. Nachází se na vnitřní straně thylakoidní membrány (směrem k lumen) a přenáší elektrony z cytochromového komplexu do *reakčního centra ve fotosystému I*. Jakmile je v tomto centru (za přispění absorbované radiační energie) oxidována centrální molekula chlorofylu *a*, (označovaná jako *P700*), chybějící elektron je doplněn právě z plastocyaninu, neboť ve fotosystému I neprobíhá fotolýza vody (jako možný zdroj elektronů). První akceptor elektronu z P700 je opět molekula chlorofylu *a* (označovaná též jako *A₀*), dalším pak fylochinon (*A₁*), a pak následuje řetěz tří redoxních systémů typu Fe-S (označované jako *F_x*, *F_A*, *F_B*), pevně vázaných na integrálních proteinech reakčního centra. Teprve pak dochází k přenosu elektronu na *ferredoxin* (*Fd*), který se nachází na stromatální straně thylakoidní membrány. Ferredoxin je malý, snadno pohyblivý protein s obsahem iontů železa. Přenáší elektrony ke konečnému akceptoru v celém řetězci, k *NADP⁺*, který je redukován na *NADPH*. Reakce je zprostředkována enzymem *ferredoxin-NADP reduktázou* (zkráceně *Fp*), a spotřebovávají se při ní dva elektrony.

Feredoxin

na jeho redukované formě jsou závislé tyto reakce v plastidech:

- redukce **NADP na NADPH** (+ *ferredoxin-NADP oxidoreduktáza*)
- redukce dusitanů na **amoniak** (+ *nitritreduktáza*)
- tvorba **glutamátu** z glutaminu a α -ketoglutarátu, (+ *glutamátsyntáza*)
- tvorba redukovaného **thioredoxinu** (+ *thioredoxin reduktáza*)

V případě nasycení uvedených reakcí může ferredoxin předávat elektrony na:

- **plastochinony** (= cyklický transport elektronů \Rightarrow tvorba ATP),
- **kyslík** (= *Mehlerova reakce*, je spojena s tvorbou superoxidu, který je rychle rozkládán *superoxiddismutázou*, a vznikající peroxid vodíku je dále rozložen systémem *askorbát - askorbátperoxidáza*).

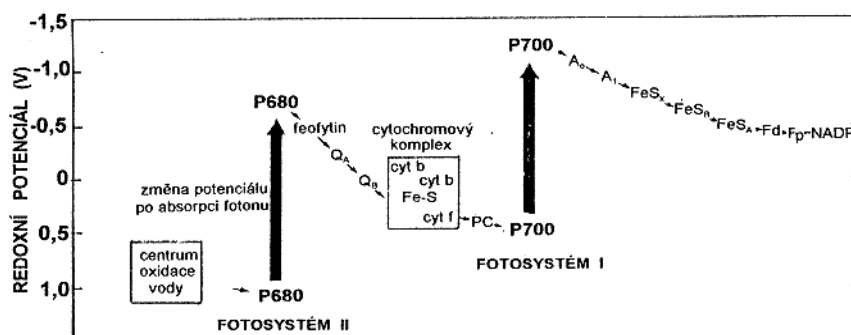
Celý popsaný přenos elektronů z rozštěpené molekuly vody až na NADP^+ nazýváme *necyklický (lineární) elektronový transport*. Kromě toho ještě může probíhat *cyklický elektronový transport*. Při něm jsou elektrony uvolněné z excitované molekuly chlorofylu P700 v reakčním centru fotosystému I z přenášeny přes dříve popsaný řetěz pevně vázaných redoxních systémů a mobilní ferredoxin nikoliv k NADP^+ , ale jsou použity na redukci mobilních plastochinonů v thylakoidní membráně. Po příjmu dvou elektronů se navážou na jednu molekulu plastochinonu i dva protony pocházející z vnější strany thylakoidu. Vzniklý plastohydrochinon je oxidován v cytochromovém komplexu, uvolněné elektrony jsou přenášeny přes jeho redoxní systémy na plastocyanin a pak zpět k P700. Pak mohou opět vstupovat do dalšího cyklu, ovšem protony uvolněné při oxidaci plastohydrochinonu na cytochromovém komplexu již zůstávají v lumen. **Popsaný cyklický transport elektronů slouží tedy k "pumpování" vodíkových iontů ze stromatu do lumen.** Využívá světelnou energii zachycenou jen ve fotosystému I, a je tudíž zcela nezávislý na fotosystému II a na fotolýze vody. *Nemůže však zcela nahradit necyklický transport s účastí obou fotosystémů, protože jedině tímto transportem se může vytvářet kromě ATP i nezbytně potřebná, energeticky velmi bohatá, redukující sloučenina NADPH.*

Jak vyplynulo z předcházejícího popisu, fotolýzou vody a navazujícími redoxními výměnami dochází k rychlému hromadění vodíkových iontů v lumen thylakoidu. Jejich zvýšená volná energie (díky gradientu elektrochemického potenciálu) je průběžně využívána k tvorbě ATP, a sice při průchodu protonů z lumen do stromatu *ATP-syntázou*. Tento polypeptidový komplex se vyskytuje v hojném počtu jen na volných (nepřilehlých) částech thylakoidní membrány, vzhledem k potřebě rychlého přísunu ADP a fosfátových iontů ze stromatu a odvodu ATP tamtéž. K tvorbě jedné molekuly ATP z ADP je nutný průchod tří protonů. Tvorbu ATP na úkor chemického potenciálu vodíkových iontů nahromaděných v lumen při necyklickém (lineárním) elektronovém transportu nazýváme *necyklickou fosforylací* na rozdíl od *cyklické fosforylace*, která využívá energie vodíkových iontů přenesených do lumen ze stromatu při cyklickém elektronovém transportu.

Optimalizace fotochemické části fotosyntézy

Proč je pro oxygenní fotosyntézu nutná spolupráce fotosystémů I i II ?

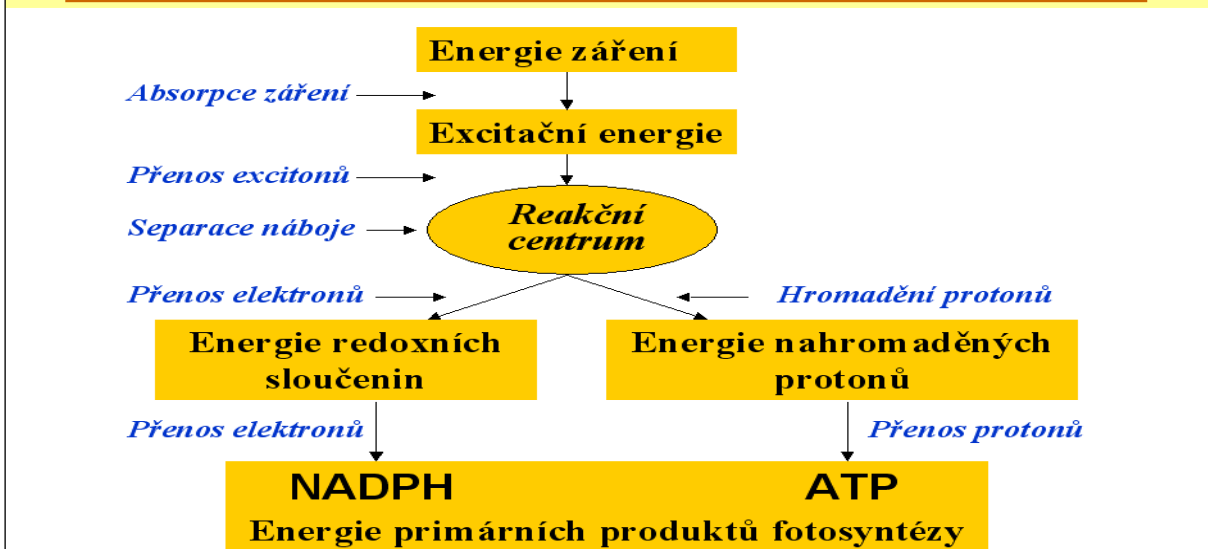
- Excitovaná molekula chlorofylu P 680 v reakčním centru fotosystému II je relativně slabé redukční činidlo (nepostačuje k redukci NADP).
- Molekula chlorofylu P700 v reakčním centru fotosystému I je po odtržení elektronu relativně slabé oxidační činidlo (nepostačuje k oxidaci vody).



Proč je nutné prostorové oddálení obou fotosystémů?

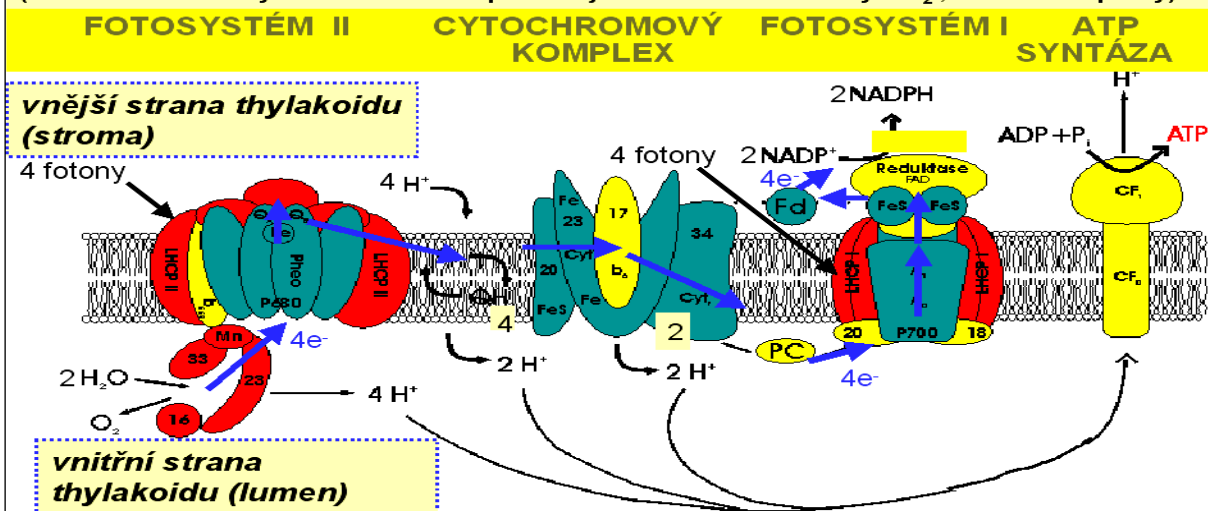
Přenos excitační energie ve fotosystému I (PS-I) je rychlejší než v PS-II a molekula P700 má menší nároky na excitaci než P680, většina excitonů by tudíž směřovala k P700.

Přehled typů procesů ve fotochemické části fotosyntézy



Souhrnné hodnocení průběhu primárních procesů:

Rozkladem 2 molekul vody se uvolní 4 elektrony, které na konci transportního řetězce redukují 2 molekuly NADP. Při rozkladu vody a následném transportu 4 elektronů (za spotřeby energie 8 fotonů) dojde k obohacení lumen thylakoidu o 10 protonů, což postačuje k tvorbě 3 molekul ATP pomocí ATP-syntázy. (Získané 2 molekuly NADPH a 3 ATP postačují k redukcí 1 molekuly CO_2 , viz další kapitoly).



Metodické přístupy ke studiu primárních procesů fotosyntézy

Studium struktury proteinových komplexů v thylakoidních membránách a funkce jejich jednotlivých součástí je mimořádně obtížné, a naše dosavadní poznatky jsou stále ještě neuspokojivé. Potíže vyplývají nejen ze složitosti a funkční propojenosti těchto struktur, ale hlavně z toho, že jsou to struktury, jejichž nenarušená vazba v membránách je podmínkou správné funkce. Běžné biochemické metody jsou proto použitelné jen ve velmi omezené míře. Mnohem větší význam mají moderní biofyzikální metody umožňující provádět analýzy nedestruktivním způsobem na živých, plně funkčních částech rostlin. Detaily „architektury“ fotosystémů, zejména tedy prostorové struktury reakčních center a anténních protein-pigmentových shluků, jsou nejčastěji studovány pomocí *rentgenové krystalografie*. K výzkumu funkční významnosti jednotlivých proteinů v komplexech také velmi pomáhají vhodné aplikace metod *molekulární biologie*, např. cílenou tvorbou geneticky modifikovaných rostlin s různě defektní stavbou fotosystémů.

Ke stanovení celkové funkčnosti fotochemického aparátu rostlin i k analýze dílčích procesů zapojených do konverze energie záření do chemické formy energie jsou v současné době nejvíce používány *metody založené na detekci a následné analýze signálu indukované fluorescence chlorofylu*. Jsou to metody velmi rychlé, aplikovatelné jak na buněčné, tak i na orgánové úrovni, a navíc snadno použitelné i v terénních podmínkách. Proto bychom měli znát jejich obecný princip a některé oblasti jejich využití.

Jak již bylo v předcházejícím výkladu naznačeno, jeden elektron v molekule chlorofylu po absorpci dávky záření (fotonu) je uveden do energeticky bohatšího stavu, ze kterého se rychle vrací zpět do stavu základního. Přebytek jeho energie při tomto návratu je většinou využit *k fotochemickým procesům* (transport elektronů z reakčního centra a tvorba NADPH), ale může také posloužit *ke vzniku nového záření (fluorescenční záření, má poněkud větší vlnovou délku než to, které bylo absorbováno)*. Je ale také možná třetí cesta, a sice přeměna excitační energie elektronu *na tepelnou energii*. Tyto *tři deexcitační cesty jsou ve vzájemném kompetičním vztahu*, tudíž snížení aktivity jedné z nich vede k relativnímu zvýšení úhrnného podílu zbývajících dvou cest. Tedy naměříme-li u studovaného listu za konstantní ozáření *snížení* hodnot fluorescenčního záření chlorofylu, lze z toho usuzovat jednak na zvýšenou aktivitu fotochemických procesů, ale také může jít o zvýšení tepelného rozptylu (disipace) excitační energie, která pak již nemůže být využita ve fotochemických procesech fotosyntézy). V odborné fluorometrické terminologii se tyto dva kompetiční procesy ovlivňující fluorescenci označují jako *fotochemické zhášení (angl. quenching) fluorescence*, a *nefotochemické zhášení fluorescence*.

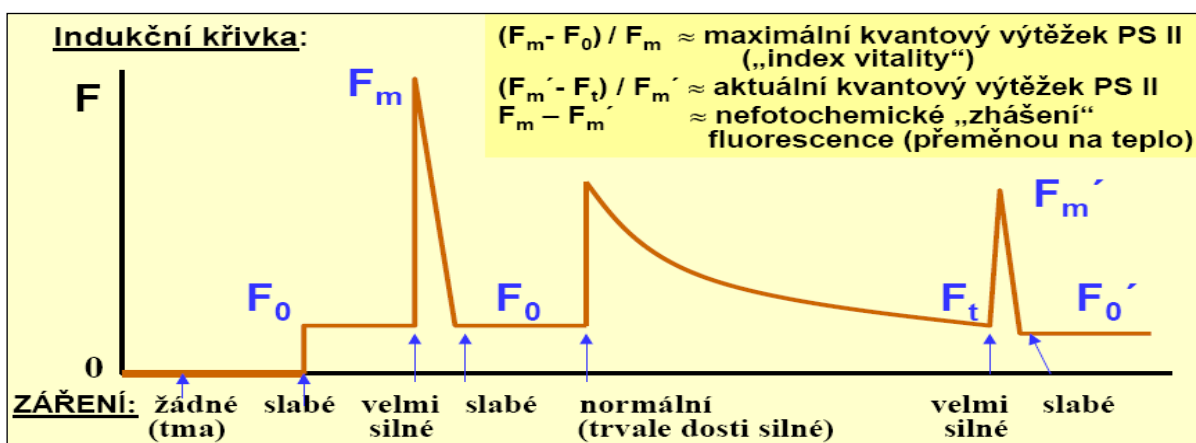
K přesnému měření fluorescence chlorofylu existuje dnes celá řada velice citlivých, snadno přenosných přístrojů, které obvykle mají vlastní zdroj záření pro regulovanou indukci (vybuzení) fluorescence. Nejvážnějším problémem při fluorometrických měřeních však není přesné stanovení hustoty toku fluorescenčního záření vyzařovaného z měřeného objektu (ten lze zaznamenávat automaticky i po velmi dlouhý časový interval!), ale analýza získaných dat, neboť z nich je nutno *odděleně vypočítat podíl fotochemické a nefotochemické složky na celkovém zhášení fluorescence*. Jen pak mohou fluorometrická měření posloužit k hodnocení aktivity primárních (fotochemických) procesů v rostlinách, na kterých nám nejvíc záleží.

Pro oddělené stanovení podílu obou zmíněných složek je nutno zvolit takový měřicí postup, při kterém jedna složka zůstává konstantní, či ještě lépe po jistou dobu zcela potlačena. Podíl fotochemického zhášení fluorescence lze eliminovat *zablokováním přenosu elektronů v thylakoidní membráně*, což lze provést nejen aplikací chemických inhibitorů redoxních systémů, ale i (což je v praxi nejčastější) *krátkým působením záření o vysoké (nadsaturační) rychlosti toku*. V tom případě dojde k úplné redukci redoxních přenašečů ve fotosystémech, a ty po jistou dobu nejsou schopny přijímat žádné další elektrony. Jeden z nejjednodušších postupů při získávání základních údajů o aktuálním i potenciálním stavu asimilačního aparátu je schematicky znázorněn na obrázku a blíže popsán v dalším textu.

Měření obvykle začínáme se vzorkem (rostlinou, listem či částí listu) který byl po dobu několika desítek minut před měřením zatemněn. Tím je navozen plně oxidovaný stav redoxních systémů v thylakoidních membránách, které jsou tudíž schopné po ozáření vzorku rychle přenášet elektrony z reakčního centra. Pokud záření je jen velmi nízké, je relativní hodnota emitované fluorescence také velmi nízká (označuje se jako F_0 , tedy bazální či „nulová“ fluorescence). Poté je aplikován krátký puls velmi vysokého záření, při kterém je velkým množstvím uvolněných elektronů v reakčním centru dočasně zablokován jejich transport, neboť není dostatek volných akceptorů (tedy redoxních přenašečů v oxidovaném stavu, vše je náhle plně redukováno), ale přitom mechanismy nefotochemického zhášení fluorescence (tepelné disipace) nejsou ještě za tak krátkou dobu aktivovány. Část energie, která by se u rostliny s nezablokovanými přenašeči mohla fotochemicky využít, je přeměněna na mimořádně vysokou („maximální“) fluorescenci (F_m). Normalizovaný rozdíl fluorescence

od F_0 až po F_m je tak mírou *maximální (potenciální) rychlosti transportu elektronů* ve fotosystémech a může sloužit i k odhadu *kvantového výtěžku fotosystému II*.

Po zjištění uvedených základních parametrů můžeme měřený list vystavit středním hodnotám záření (které jsou běžné v přírodě) a opakovaně aplikovat krátké pulzy velmi vysokého záření ke zjištění parametru F'_m , což je hodnota maximální fluorescence při dlouhodobém vystavení listu záření. (na našem obrázku je znázorněn pouze jeden takový puls). V časovém intervalu několika desítek minut se postupně aktivují nefotochemické mechanismy zhášení (způsobující tepelnou disipaci jisté části excitační energie) a rozdíl mezi F_m a F'_m lze považovat za míru jejich aktivity.



Měření a následná analýza signálu fluorescence chlorofylu může být používána v základním výzkumu fotosyntetických procesů, např. k hlubší analýze rychlosti jednotlivých kroků a tím i k hledání nejvíce limitujících míst v transportním řetězci (zejména pomocí přístrojů umožňujících měřit extrémně rychlé změny v emitovaném fluorescenčním záření). Daleko nejčastěji jsou však měření indukované fluorescence používána v ekologické fyziologii rostlin k velmi rychlé a snadné detekci významnosti vlivu různých stresových faktorů na rostliny. Nemusí to být pouze faktory ovlivňující přímo funkčnost fotosyntetického aparátu (např. nízká či vysoká teplota, nadměrné záření, plynné polutanty). ***I nepřímé vlivy vedoucí ke zpomalení růstu (např. nedostatek vody či živin vedoucí ke zpomalení růstu) se dříve nebo později projeví v malém „odbytu“ vytvářených asimilátů. Jejich postupné hromadění v chloroplastech vede v první řadě k inhibici biochemických procesů fixace CO₂. Pak obvykle následuje i malá „poptávka“ po produktech fotochemických procesů (ATP, NADPH), a tedy i ke zpomalení rychlosti fotochemických procesů, a to je už fluorimetricky měřitelné.***

Relativní dostupnost kompaktních aparatur pro měření indukované fluorescence chlorofylu *in vivo* a jejich téměř masové nasazení v různých oblastech základního i aplikovaného fyziologického výzkumu lze jen uvítat, avšak současně svádí k mnoha *chybným aplikacím*. Především je nutno mít stále na paměti, že se jedná vesměs o *relativní* měření změn ve funkčnosti primárních procesů v měřeném vzorku, stěží použitelné ke srovnávacím účelům, tedy k nalezení spolehlivých rozdílů mezi různými listy či druhy. Vyvozovat z fluorimetrických měření závěry týkající se rychlosti sekundárních fotosyntetických procesů (fixace CO₂) je také velmi nespolehlivé – korelace zjišťované v laboratorních podmínkách nemusí vůbec platit pro rostliny v přírodě. V tomto směru jsou metody založené na měření výměny plynů (především příjmu a výdeje CO₂) stále nenahraditelné. Avšak i při jednoduchých detekcích opakovaně prováděných na těchže listech velmi záleží na správném (předem navrženém a vyzkoušeném) experimentálním postupu, protože ***špatně naměřená data nelze uspokojivě vyhodnotit a jakékoli snahy o jejich interpretaci jsou velmi zavádějící.***

2.2 Sekundární procesy fotosyntézy

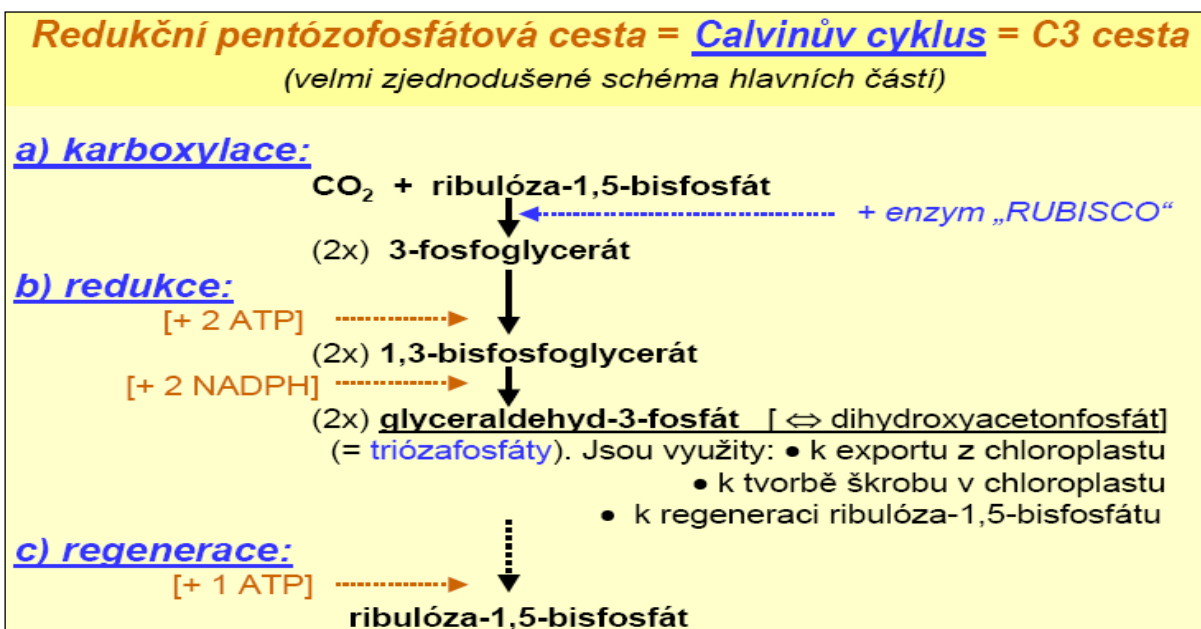
Na popsané primární procesy v thylakoidních membránách chloroplastů navazuje celá řada syntetických procesů, z nichž nejdůležitější je *asimilace CO₂ do organických sloučenin*. K tomu slouží komplex biochemických reakcí probíhajících tentokrát *ve stromatu* chloroplastu. Reakce jsou spojeny do uzavřeného koloběhu, který souhrnně označujeme jako **fotosyntetický cyklus redukce uhlíku**, nebo též **Calvinův cyklus**. Nebudeme jej zde podrobně popisovat, neboť to je již problematika čistě biochemická. Zopakujme si tedy jen opravdu to nejdůležitější. Calvinův cyklus lze rozdělit na tři etapy:

Karboxylace: CO₂ je vázán na pětiuhlíkatý fosforylovaný cukr ribulóza-1,5-bisfosfát pomocí enzymu ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza. Prvním stálým produktem této reakce (bez dodání energie), jsou **dvě molekuly kyseliny 1,3-fosfoglycerové** (1,3-PGA).

Redukce: Nejprve se na 3-PGA napojuje další fosfátová skupina uvolněná hydrolyzou molekuly ATP. Vzniká tak kyselina 1,3-bisfosfoglycerová a pak dochází k vlastní redukci pomocí NADPH za vzniku *glyceraldehyd-3-fosfátu*. Protože při fixaci jedné molekuly CO₂ vznikly dvě molekuly 3-PGA, bude celkový náklad na jejich redukci 2 ATP a 2 NADPH.

Regenerace: Jde o nejsložitější fázi celého cyklu, ve které z části nově vytvořeného glyceraldehyd-3-fosfátu, řetězem několika reakcí fosforylovaných cukrů, dojde k syntéze ribulóza-5-fosfátu. Ten je nutno převést další, již třetí molekulou ATP na ribulóza-1,5-bisfosfát, který pak slouží opět jako akceptor pro další molekulu CO₂.

K čistému zisku *jedné tříuhlíkaté* molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu je zapotřebí fixovat *tři molekuly CO₂*, tedy celý cyklus musí proběhnout třikrát. Vytvořený glyceraldehyd-3-fosfát je jednak zpracováván v dalších syntézách přímo v chloroplastu (např. na škrob), jednak je transportován z chloroplastu do cytosolu. Na transportu se může podílet také blízký příbuzný dihydroxyacetonfosfát, který vzniká snadnou izomerací z glyceraldehyd-3-fosfátu.



Calvinův cyklus je evolučně velmi starý proces, společný všem fotosyntetizujícím organismům. *Žádný jiný cyklus se srovnatelnou funkcí není znám*, avšak je známa celá řada přidavných reakcí, které fungování Calvinova cyklu mohou zefektivnit anebo přizpůsobit zvláštním podmínkám.

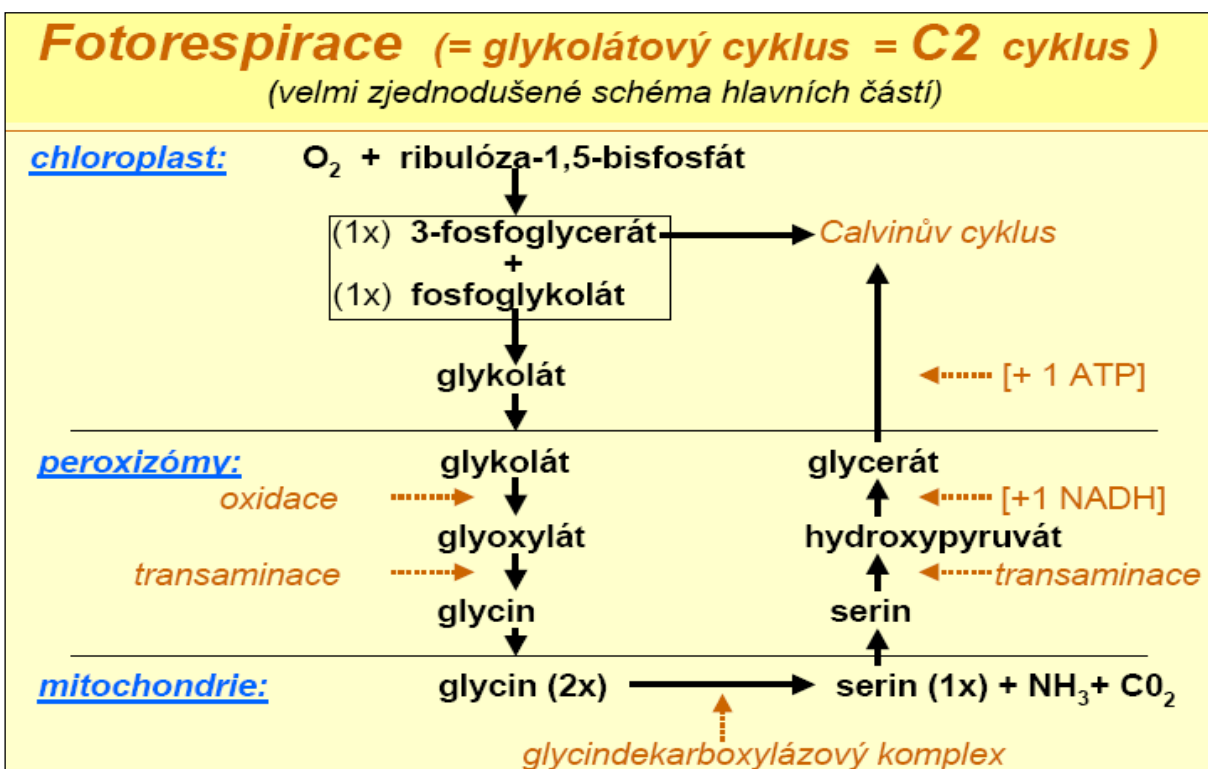
Hlavním enzymem Calvinova cyklu je *ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza*, běžně označovaná akronymem "**Rubisco**". Může fungovat, jak už jeho název napovídá, nejen jako karboxyláza, ale i jako oxygenáza, tedy na stejný substrát vnášet buď CO₂, nebo O₂.

V listech rostlin má největší zastoupení ze všech proteinů (30 až 50 %). Katalytické schopnosti *Rubisco* jsou aktivovány pouze na světle za přítomnosti Mg^{2+} a CO_2 , které s ním vytvářejí pevný komplex. Tento proces (*karbamylace Rubisco*) je stimulován specifickým enzymem *Rubisco aktivázou*. U některých druhů se vyskytuje ještě další specifická sloučenina, která řídí (tentokrát inhibuje) aktivitu *Rubisco*: *2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát*. Dokonalá regulace aktivity *Rubisco* a některých dalších enzymů v Calvinově cyklu je zřejmě nutná ke sladění návaznosti reakcí a k omezení oscilací v cyklu na počátku světelné periody.

Afinita *Rubisco* k CO_2 je sice podstatně větší než ke kyslíku, jenže v chloroplastech bývá mnohem vyšší koncentrace kyslíku než CO_2 . Za takových podmínek se oxygenázová aktivita skutečně významným způsobem projeví. Spouští celý řetěz reakcí, které souhrnně označujeme jako *fotorepirační cyklus oxidace uhlíku*, zkráceně *fotorespirace*.

Fotorespirace tedy začíná přenosem kyslíku pomocí *Rubisco* na stejný substrát, jako při karboxylaci (ribulóza-1,5-bisfosfát). Stálým produktem této reakce je *jedna molekula 3-PGA a jedna molekula fosfoglykolátu*. Z ní se záhy odštěpuje fosfátová skupina a vzniklý glykolát je transportován z chloroplastu do blízkých peroxisomů. Tam je oxidován na glyoxylát a ten dále transaminován na glycin. Na tyto reakce v peroxizómu navazují další, tentokrát v mitochondriích: *tvorba jedné molekuly serinu* ze dvou molekul glycinu. Uvolňuje se při tom po jedné molekule CO_2 a NH_3 . Serin může být jednak využíván v dusíkovém metabolismu buňky (syntéza dalších aminokyselin, bílkovin a jiných složitějších látek), ale může být také transportován zpět do peroxisomů, kde po transaminaci a redukcí (za spotřeby jedné molekuly NADH) vzniká *glycerát*. Ten se v chloroplastech fosforyluje za účasti jedné molekuly ATP na 3-fosfoglycerát, který může být využit k regeneraci původního substrátu, ribulóza-1,5-bisfosfátu. Tím se celý cyklus uzavírá.

Je dobré si povšimnout, že z každých dvou dvouuhlíkatých molekul glykolátu (tedy celkem 4 C), které vystupují z chloroplastu do řetězu fotorepiračních reakcí, se vrací zpět jen jedna tříuhlíkatá molekula glycerátu, tedy jen 75% C. Zbylá čtvrtina uhlíku se ztrácí ve formě CO_2 . Při přepočtu na výchozí substrát (ribulóza-1,5-bisfosfát) činí ztráta uhlíku 10%, ovšem přistupují ztráty energetické, a to 2 ATP a 2,5 NAD(P)H na každou přenesenou molekulu O_2 .



Schopnost enzymu *Rubisco* přenášet na tentýž substrát nejen CO₂, ale i O₂, má obvykle za následek značné snížení účinnosti fotosyntetické fixace CO₂. Poměr mezi karboxylační a oxygenační aktivitou tohoto enzymu závisí především na poměru mezi koncentrací CO₂ a kyslíku v chloroplastu. Tento poměr je zase velmi závislý na koncentraci obou plynů v atmosféře. Za normálního složení vzduchu v okolí listu (21 objemových procent O₂ a 0,036 procent CO₂), a při teplotě listu 25 °C, je teoretický poměr mezi rychlostí oxygenace a karboxylace (vypočítaný z afinitních konstant obou enzymů) asi 2,5. To by naznačovalo, že asi jedna čtvrtina primárního substrátu využitelného v Calvinově cyklu podléhá fotorespiračním procesům a tedy i ztrátám (uhlíku, energie), jak již bylo uvedeno.

Výsledky měření rychlosti fotorespirace za reálných podmínek v listu, získané pomocí moderních metod s využitím značeného kyslíku (¹⁸O₂), umožňujících přesně stanovit množství kyslíku přenášeného enzymem *Rubisco*, nás nutí značně přehodnotit naše původní představy o významnosti fotorespirace, postavené jen na zjednodušených, teoretických předpokladech. Bylo totiž zjištěno, že *poměr mezi karboxylační a oxygenační aktivitou Rubisco v listech běžných rostlin (s fixační cestou C₃) bývá velmi často vyrovnaný (1:1)*, a to i za normální koncentrace plynů v atmosféře. Hlavním důvodem jsou zřejmě značně rozdílné koncentrace plynů v *chloroplastu* ve srovnání s okolním vzduchem. Kyslík je totiž produkován ve velkém množství přímo v chloroplastech štěpením vody, zatímco CO₂ tam musí pronikat složitější cestou. To tedy znamená, že **fotorepirační ztráty mohou dosahovat až 50%!** Při zvyšování teploty listu poměr mezi koncentrací CO₂ a O₂ v chloroplastech dále klesá, neboť CO₂ má za vyšších teplot menší rozpustnost ve vodě než kyslík. *Podíl oxygenace, a tudíž i fotorespiračních ztrát, tedy nutně vzrůstá i s teplotou.*

Negativní vliv fotorespirace na celkovou efektivitu fixace CO₂ je sice nepochybný, ale pro celkové fungování rostliny není zcela jistě jen pouhým ztrátovým procesem, se kterým si evoluce "nevěděla rady". *Všechny možné "benefity" fotorespirace dosud neznáme*, neboť jsou často jen kvalitativního charakteru, a tudíž sotva ocenitelné měřítky zisku energie či uhlíku. Právě fotorepirační cestou se *vytváří nejvíce aminokyselin glycinu a serinu*. Také je již známo, že rostliny s uměle potlačenou fotorespirací mají silně inhibované procesy asimilace anorganického dusíku i tvorbu některých organických kyselin. Fotorespirace může také být velmi prospěšná cesta k odvádění přebytků ATP a redukčního potenciálu za silného záření či za nedostatku CO₂ (např. při přivření průduchů za nedostatku vody). V takových případech může být v chloroplastech zachován dostatečně rychlý průběh primárních procesů fotosyntézy, a tudíž i zpracování radiační energie absorbované v asimilačních pigmentech. Její nadbytek by mohl vést k poškození fotosyntetického aparátu. Ve srovnání s jinými fotoprotektivními mechanismy může fotorespirace zajistit ochranu mnohem rychleji.

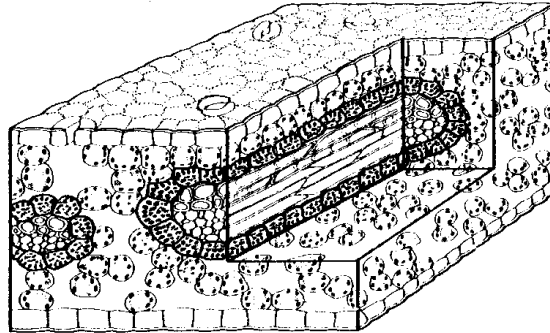
Fixační cesta C₄

I když v průběhu evoluce rostlin nevznikl kromě Calvinova cyklu žádný jiný fixační cyklus s tak dokonalou obnovou všech reagujících složek, a také ani nedošlo k výraznému zlepšení vlastností klíčového enzymu *Rubisco*, přesto jisté změny v metabolických cestách u řady druhů skutečně nastaly. Je již dobře známo několik pozoruhodných metabolických adaptací, které v první řadě umožňují zvýšit parciální tlak CO₂ v místech jeho fixace Calvinovým cyklem a tím potlačit oxygenázovou aktivitu *Rubisco*. Společným principem těchto adaptací u suchozemských rostlin je *opakovaná karboxylace*, u vodních (ponořených) rostlin pak ještě navíc *aktivní transport iontů HCO₃⁻ z vodního prostředí do listů*.

Nejprve se podívejme, jak funguje nejvíce rozšířená metabolická adaptace označovaná jako **fixační cesta C₄**. U rostlin s tímto typem metabolismu (zkráceně **C₄-rostliny**) jsou chloroplasty se schopností fixace běžným Calvinovým cyklem soustředěny jen do skupin *zvláštních buněk*, které mají ztlustlé stěny a malé vakuoly. Zato chloroplastů a mitochondrií

mají mimořádně velký počet. Tyto zvláštní buňky vytvářejí jednu až dvě koncentrické vrstvy kolem cévních svazků. Jsou velmi nápadné a říká se jim též věnce či **pochvy cévních svazků**.

Ostatní mezofylové buňky mají chloroplasty menší, méně početné, bez škrobových zrn, zato s velkým počtem granálních tylakoidů. Hlavně však mají zcela jinou funkci při sekundárních procesech fotosyntézy. Nejvíce chloroplastů bývá v těch mezofylových buňkách, které leží v těsné blízkosti zvláštních buněk pochev cévních svazků, *neboť mezi oběma typy buněk je nutná velmi těsná spolupráce*.



Průřez částí listu rostliny s fixační cestou C₄. Buňky pochvy cévních svazků, kde probíhá konečná fixace CO₂ do sacharidů, jsou zvýrazněny.

K prvotní karboxylaci dochází vždy v cytosolu běžných mezofylových buněk. Jsou při ní využívány hydrogenuhličitanové ionty (HCO₃⁻), které se v cytosolu vyskytují hojněji než rozpuštěný CO₂. Navazují se na tříuhlíkatý fosfoenolpyruvát za vzniku oxalacetátu (kyseliny oxaloctové). *Primární produkt reakce je tedy čtyřuhlíkatá sloučenina - proto označujeme tuto fixační cestu jako C₄* (na rozdíl od přímé fixace Calvinovým cyklem, označované jako C₃-fixační cesta, neboť prvním stálým produktem je tříuhlíkatá kyselina fosfoglycerová).

Enzymem katalyzujícím popsanou reakci je **fosfoenolpyruvátkarboxyláza** (zkráceně **PEP karboxyláza**), která má k CO₂ větší afinitu než *Rubisco*. Tím je také možný rychlejší příjem CO₂ do listu i při stejné vodivosti difuzních cest.

Další reakce, které následují po prvotní karboxylaci, mohou vést několika směry (viz obrázek na následující straně). U jedné skupiny C₄-rostlin, ke které patří např. kukuřice, vzniklý oxalacetát vstupuje do chloroplastů mezofylových buněk, kde se velmi rychle redukuje na malát. Ten je pak transportován do zvláštních buněk v pochvách cévních svazků, kde dochází k dekarboxylaci na pyruvát. Uvolněný CO₂ je zpracováván Calvinovým cyklem. Zbylý pyruvát je odváděn zpět do mezofylových buněk k využití v dalším fixačním cyklu.

U jiné skupiny C₄-rostlin (některé tropické trávy, např. rodu proso, *Panicum*) je oxalacetát v cytosolu transaminován na **aspartát** (donorem aminoskupiny je glutamát), který je pak transportován do zvláštních buněk v pochvách cévních svazků. Tam je nejprve opět přeměněn na oxalacetát, který je buď přímo dekarboxylován, nebo je nejprve redukován na malát a pak teprve dekarboxylován. Ve všech případech je uvolněný CO₂ ve zvláštních buňkách pochev cévních svazků dále zpracováván Calvinovým cyklem. Zbylé produkty (pyruvát či alanin) jsou transportovány zpět do mezofylových buněk a regenerací primárního akceptoru se cyklus uzavírá.

Fixační cesta C₄ je z hlediska využití CO₂ neobyčejně účinná. Nejen proto, že v mezofylu je CO₂ (resp. HCO₃⁻) velmi rychle a účinně vázán PEP karboxylázou na fosfoenolpyruvát, ale hlavně proto, že v buňkách pochev cévních svazků vzniká dekarboxylací organických kyselin velmi vysoká koncentrace CO₂ (asi 1500 cm³.m⁻³, což je téměř desetkrát více, než bývá v mezofylových buňkách C₃-rostlin!) *Zvýšenou koncentrací CO₂ je téměř úplně potlačena oxygenázová aktivita Rubisco*, a tím tedy i fotorespirace. Chloroplasty v buňkách pochev cévních svazků mají velmi málo gran, tudíž i malé zastoupení tylakoidních membrán s fotosystémem II. Proto i produkce kyslíku rozkladem vody je poměrně malá.

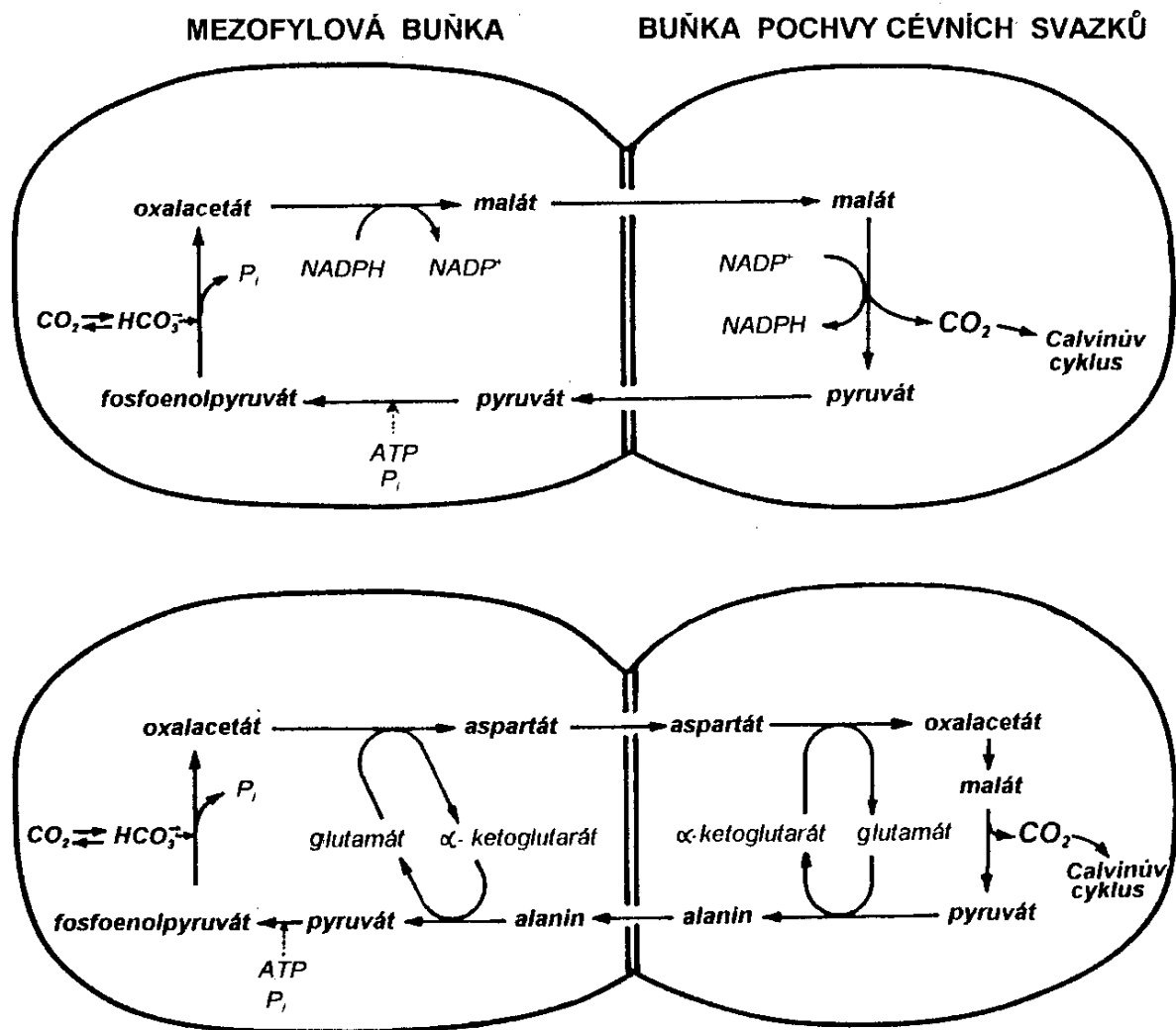


Schéma dvou variant fixační cesty C₄: varianta s transportem malátu (nahore) a s transportem aspartátu (dolní část obrázku). Existují i další modifikace C₄-metabolismu.

Na druhé straně však celý mechanismus umožňující zvyšovat koncentraci CO₂ v oddělené skupině buněk schopných jeho vazby Calvinovým cyklem vyžaduje jisté *dodatečné provozní náklady*. Na každou fixovanou molekulu CO₂ je nutno vynaložit energii nejen tří molekul ATP v Calvinově cyklu, ale ještě navíc 1 až 2 ATP na regeneraci fosfoenolpyruvátu. Z toho můžeme usoudit, že rostliny s fixační cestou C₄ mohou být zvláště úspěšné za podmínek, kdy příkon zářivé energie (pro tvorbu ATP v primárních procesech) není limitující, a kdy omezujícím faktorem je spíše nedostatečný přísun CO₂ do listu. Také za vyšší teploty, která zvyšuje u C₃-rostlin fotorespirační ztráty, je výhodnější cesta C₄.

Je proto pochopitelné, že nejvíce druhů rostlin s fixační cestou C₄ nacházíme v tropických a subtropických zemích. Celkem se jedná asi o tisíc druhů z 16 čeledí, u kterých byl tento typ metabolismu dosud dokázán. Nejpočetnější skupinu tvoří tropické trávy (včetně hospodářsky významných druhů, jako je proso, cukrová třtina a kukuřice), ale také asi 300 druhů dvouděložných bylin. C₄-cesta se nevyskytuje u řas, mechů a nahosemenných, ani u většiny listnatých stromů a keřů. V naší flóře (pokud nepočítáme zmíněnou introdukovanou kukuřici, proso a některé zavlečené plevelné trávy) se vyskytují rostliny C₄ jen zcela výjimečně. Jde především o nepočetnou skupinu druhů teplomilných trav (např. rodů *Digitaria*, *Bothriochloa*, *Setaria* a *Cynodon*).

Taxonomické skupiny rostlin s největším zastoupením druhů s fixační cestou C4:

Čeleď	počet rodů s C4	počet druhů s C4
<u>Jednoděložné:</u>		
Lipnicovité (<i>Poaceae</i>)	372	4600
Šáchorovité (<i>Cyperaceae</i>)	28	1330
<u>Dvouděložné:</u>		
Merlíkovité (<i>Chenopodiaceae</i>)	45	550
Laskavcovité (<i>Amaranthaceae</i>)	13	250
Hvězdicovité (<i>Asteraceae</i>)	8	150
Přýšcovité (<i>Euphorbiaceae</i>)	1	150
Rdesnovité (<i>Polygonaceae</i>)	1	80
Šruchovité (<i>Portulacaceae</i>)	2	70
Kacibovité (<i>Zygophyllaceae</i>)	3	50
Hvozdíkovité (<i>Caryophyllaceae</i>)	1	50
<u>Rarity:</u> <i>Haloxylon aphyllum</i> (merlíkovité) – dřevina <i>Borszczovia aralocaspica</i> , <i>Bienertia cycloptera</i> – jen 1 typ buněk		

Fixační cesta CAM

Ve velmi rozsáhlé a taxonomicky rozmanité skupině **sukulentních rostlin** nacházíme další zajímavou metabolickou variantu fotosyntetické asimilace CO₂, označovanou jako fixační cesta **CAM** (z angl. *Crassulacean Acid Metabolism*, neboť byla poprvé zjištěna u rostlin čeledi tlusticovitých, *Crassulaceae*). Také zde, obdobně jako u rostlin C₄, dochází nejprve k vazbě HCO₃⁻ na fosfoenolpyruvát, a ve druhé fázi ke karboxylaci v Calvinově cyklu. Celá řada dalších znaků je však zcela specifická.

První zvláštnost spočívá v tom, že **oba karboxylační procesy probíhají v těžce buňce**. Nejsou odděleny prostorově, ale zato časově - neprobíhají tedy současně.

Dalším svérázným znakem je prvotní karboxylace v cytosolu zprostředkovaná PEP-karboxylázou. Probíhá totiž **pouze v noci**. Na rozdíl od C₄-rostlin neprobíhá současně dekarboxylace, a tak substrát pro karboxylaci (fosfoenolpyruvát) nemůže být doplňován z uzavřeného cyklu. Musí být tudíž obstaráván glykolýzou a přídavnými reakcemi ze škrobu.

Třetím rysem je **hromadění kyseliny jablečné** (která vzniká z primárního produktu karboxylace, oxalacetátu) v průběhu noci ve velkých vakuolách. Její koncentrace může dosahovat až 0,3 M, a pH vakuolární šťávy klesá až k hodnotě 4. Pro správnou funkci cesty CAM je proto velmi důležitá jednak dostatečná velikost vakuoly, ale i schopnost tonoplastu udržet obrovský koncentrační rozdíl ve vodíkových iontech mezi vakuolou a cytosolem.

Konečně čtvrtou specifitou je **regulace druhé fixace** CO₂. Za světla je kyselina jablečná transportována z vakuoly do cytosolu, kde je dekarboxylována. Uvolněný CO₂ je v chloroplastech zpracováván Calvinovým cyklem.

Správná funkce fixační cesty CAM a časová posloupnost jednotlivých reakcí je podmíněna **dokonalou regulací aktivity enzymů**. Zdaleka ne všem regulačním mechanismům rozumíme. Víme však, že **PEP-karboxyláza se v rostlinách s fixační cestou CAM vyskytuje ve dvou reverzibilních formách. Za tmy je to forma aktivní** (dokonale funkční, a navíc necitlivá ke koncentraci malátu). **Působením záření však přechází do formy inaktivní** (s velmi malou afinitou k CO₂ a ta je ještě navíc silně inhibována přítomností malátu). Tyto změny jsou provázány fosforylací (za tmy) a defosforylací (za světla) serinové složky v její molekule. Je pozoruhodné, že aktivita PEP-karboxylázy v rostlinách typu C₄ je regulována právě opačně, v aktivní formě se vyskytuje pouze za světla.

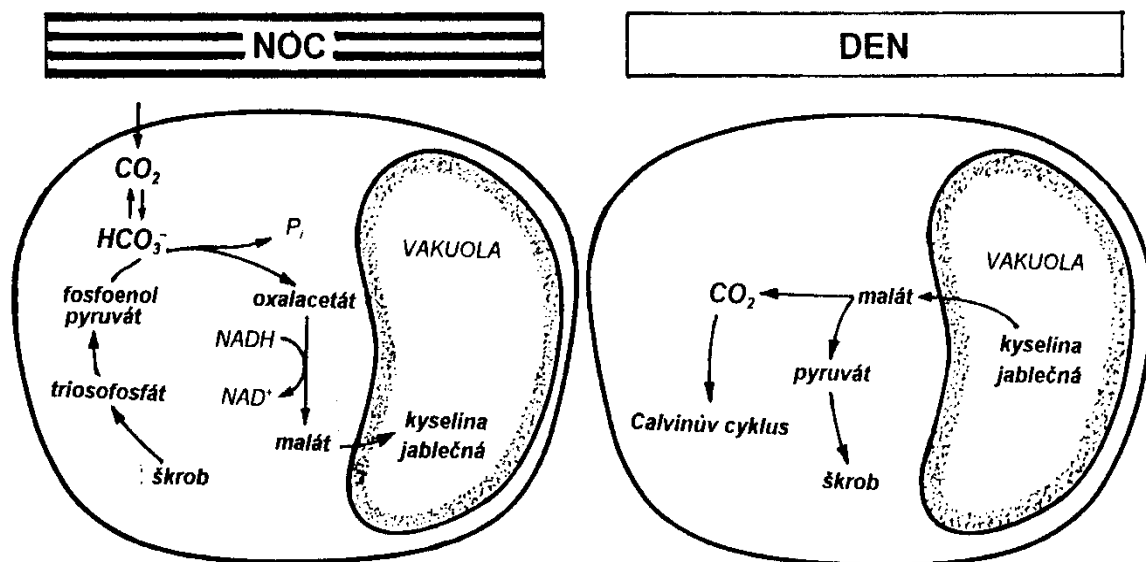


Schéma fixační cesty typu CAM.

Světlem je ovšem aktivována celá řada jiných enzymů (z toho pět jen v Calvinově cyklu!) a mechanismus aktivace je v současné době intenzivně zkoumán. U některých enzymů jde jen o redukci disulfidických skupin na sulfhydrylové na světle, někdy je to mnohem komplexnější problém, jako např. v případě enzymu *Rubisco*.

U fixační cesty CAM, obdobně jako u C₄, se prakticky neuplatňuje fotorespirace. Je to opět dáno tím, že k fixaci CO₂ Calvinovým cyklem dochází za podmínek velmi vysoké koncentrace CO₂ (po uvolnění z malátu, až 5000 cm³.m⁻³!). Tato koncentrace zcela potlačuje oxygenázovou aktivitu *Rubisco*.

I přesto jsou však energetické náklady na fixaci jedné molekuly vyšší než u cesty C₄. Kromě spotřeby 1 až 2 ATP na zpracování malátu (jako u C₄-cesty), ještě navíc přistupuje potřeba 1 ATP na aktivní transport jedné molekuly malátu do vakuoly (zpětný transport je pasivní) a 0,5 ATP na jednu molekulu CO₂ při syntéze rezervních sacharidů (ty jsou nutné jako zdroj energie při tvorbě PEP v noci).

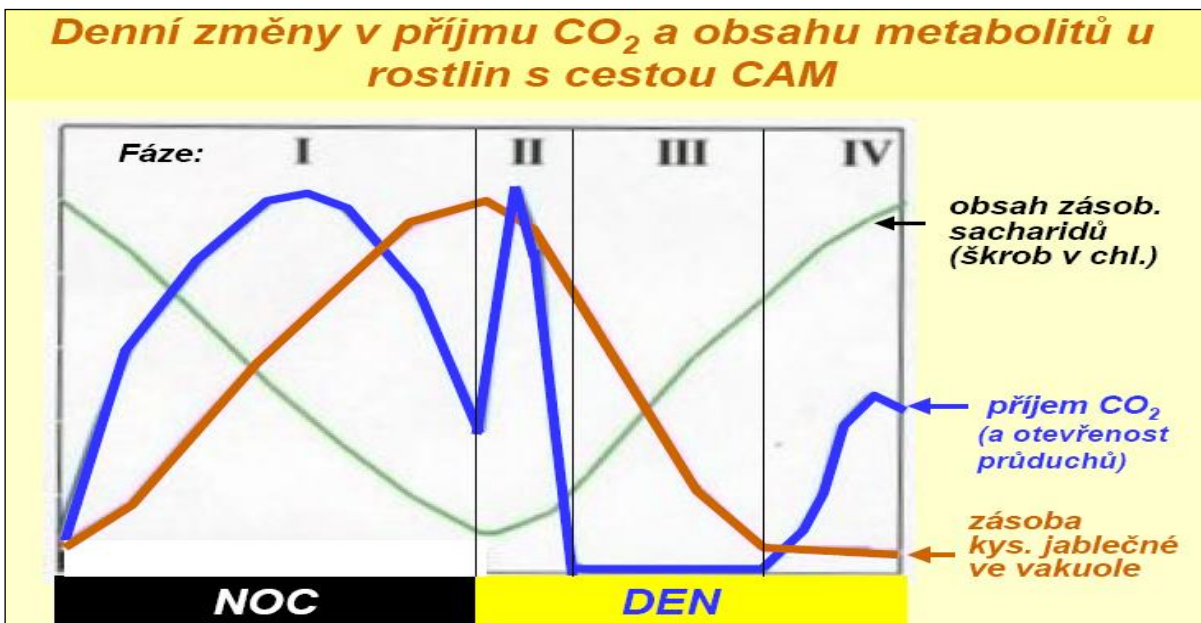
Fixační cesta CAM se vyskytuje přibližně u 15 tisíc druhů z více než 40 čeledí. Některé čeledi mají prakticky všechny druhy typu CAM (např. *Crassulaceae*, *Cactaceae*, *Mesembryanthemaceae*), avšak v mnoha jiných čeledích je sukulence a výskyt fixační cesty CAM vyhrazen jen některým zástupcům. **Vazba sukulence a metabolismu CAM je pochopitelná, neboť velké vakuoly jsou potřebné ke zvýšení úložné kapacity pro malát.** Tedy naprostá většina rostlin s fixační cestou CAM je více či méně sukulentní. Obráceně to však neplatí - zdaleka ne všechny rostliny se zdužnatělými orgány mají fixační cestu CAM.

Tím, že u rostlin s fixační cestou CAM jsou přítomny oba karboxylační enzymy ve stejných buňkách (není zde prostorové oddělení a dvojí druh chloroplastů jako u C₄-rostlin), jsou také možné různé **odchytky od popsaného typického průběhu** opakované karboxylace CO₂. U řady druhů není využíván k denní fixaci Calvinovým cyklem pouze CO₂ získaný dekarboxylací malátu, ale i CO₂ přímo přijímaný ze vzduchu (zejména po vyčerpání zásob malátu). Známe však i takové druhy, které mají sice veškerou „výbavu“ pro CAM metabolismus, ale po velkou část svého života tuto cestu vůbec nevyužívají - asimilují k nerozeznání stejně jako běžné C₃ rostliny. Možnost přechodu z fixační cesty C₃ na CAM jim však umožňuje využívat fixační cestu CAM za takových podmínek, kdy je to výhodnější. Mají tedy možnost přizpůsobovat svůj metabolismus velmi široké amplitudě kolísání faktorů vnějšího prostředí. Je poučné sledovat, za jakých podmínek aktivují tyto druhy fixační cestu CAM, neboť z toho můžeme dedukovat, jaké vnější tlaky vlastně vedly k jejímu vzniku.

Přechod na fixační cestu CAM (= *indukce CAM* u těch rostlin, které jsou toho schopny) probíhá zejména:

- za **nedostatku vody v půdě** (nejčastější případ),
- za **vysoké teploty** (např. i u našich sukulentních rostlin rodů *Sedum* a *Sempervivum*).
- **při zasolení půdy**.

Je zřejmé, že hlavní výhody fixační cesty CAM se uplatňují za nedostatku vody, kdy je nutné či výhodné omezit ztráty vody transpirací. Jedinečná schopnost CAM rostlin přijímat CO₂ v noci (kdy relativní vlhkost vzduchu je vysoká a tudíž ztráty vody z listů jsou minimální), umožňuje těmto rostlinám na jednotku vydané vody vytvořit asi desetkrát větší množství biomasy. **Druhy s fixační cestou CAM také mohou za krajně nepříznivých podmínek mít průduchy dlouhodobě uzavřeny a provádět vnitřní recyklaci CO₂ uvolněného z respiračních procesů.** To jiné rostliny nemohou. Hlavní lokality s výskytem rostlin s fixační cestou CAM leží v suchých (aridních) oblastech tropů a subtropů. V chladnějších oblastech (byť třeba taky suchých) jich nacházíme již mnohem méně. Je to dáno tím, že jen málo z nich je mrazuvzdorných, právě pro velký obsah vody ve svých buňkách.



Taxonomické skupiny rostlin s největším zastoupením druhů s fixační cestou CAM

Čeleď : přibližný počet druhů:

<i>Orchidaceae</i>	7000
<i>Bromeliaceae</i>	2000
<i>Cactaceae</i>	2000
<i>Aizoaceae</i>	2000
<i>Crassulaceae</i>	1200
<i>Liliaceae</i>	700
<i>Asclepiadaceae</i>	600
<i>Euphorbiaceae</i>	500
<i>Agavaceae</i>	400

Rod: přibližný počet druhů:

<i>Tillandsia</i>	1500
<i>Euphorbia</i>	500
<i>Aloe</i>	400
<i>Sedum</i>	300
<i>Agave</i>	300

Souhrnné posouzení účinnosti fixace CO₂ na úrovni chloroplastů

Celkovou termodynamickou účinnost fotosyntetických procesů určujeme jako *poměr mezi množstvím energie vázané v nově vytvořených asimilátech, a energií fotonů, která byla při tvorbě těchto asimilátů spotřebována*. Hodnoty účinnosti fotosyntézy jsou nepochybně důležitým měřítkem rozdílů v potenciálních schopnostech rostlin vytvářet novou biomasu, avšak jejich stanovení není vůbec jednoduché. Důvodů je hned několik. Především hodnoty účinnosti jsou silně závislé na rychle proměnlivých faktorech, jako je např. množství záření, koncentrace substrátů či aktivita enzymů, a lze je tudíž určovat jen pro jisté zjednodušené podmínky. Dále je nutné se rozhodnout, co vlastně budeme považovat za vstupní energetické hodnoty: zda energii všech fotonů, které dopadají na list a chloroplasty, nebo pouze energii fotonů absorbovaných asimilačními pigmenty.

Při teoretickém hodnocení účinnosti fotosyntetické fixace CO₂ je užitečné posuzovat odděleně energetické přeměny v primárních a sekundárních procesech. Kolik je vlastně potřeba chemické energie na fixaci jednoho molu CO₂? Víme, že k zabudování jedné molekuly CO₂ do asimilátů v Calvinově cyklu jsou nutné dvě molekuly NADPH a tři molekuly ATP. Energetický požadavek na tvorbu jednoho molu NADPH je přibližně 220 kJ, a na tvorbu molu ATP nanejvýš 50 kJ (přesné hodnoty jsou závislé na podmínkách, za kterých reakce probíhají). Fixace jednoho molu CO₂ je tudíž spojena s náklady asi 590 kJ.

Na Calvinův cyklus jsou ale obvykle napojeny ještě další reakce, které jsou v podstatě neoddělitelně spojeny s fixací CO₂ a které celkové náklady na fixaci zvyšují. U C₃-rostlin je to fotorespirace, u rostlin s fixační cestou C₄ a CAM opakovaná karboxylace. Z údajů uvedených v tabulce je zřejmé, že fotorespirační ztráty u C₃-rostlin zvyšují celkové náklady na fixaci CO₂ více, než koncentrační mechanismy u rostlin typu C₄ a CAM. Uvedená účinnost biochemických procesů fotosyntézy byla vypočítána jako poměr mezi energetickým *ziskem* (= obsahem volné energie v 1 molu vytvořené fruktózy, měřeno jejím spalným teplem, 2804 kJ mol⁻¹) a *náklady* (= celková spotřeba energie na tvorbu 1 molu fruktózy příslušnou fixační cestou).

	C3	C4	CAM
Spotřeba na fixaci 1 molekuly CO₂ - ATP:	3	4 - 5	6
NADPH:	2	2	2
Energetické náklady na fixaci 1 molu CO₂ (kJ)			
- bez zahrnutí fotorespirace u C3:	590	665	740
- se zahrnutím fotorespirace u C3:	867	665	740
Energ. náklady na tvorbu fruktózy (kJ mol⁻¹):	5202	3990	4440
Energetická účinnost tvorby fruktózy:	0,54	0,70	0,64

Srovnání energetických nákladů a účinnosti v sekundárních (biochemických) procesech fotosyntetické asimilace CO₂ u tří hlavních typů fixačních cest .

Pro výpočet *celkové účinnosti fotosyntézy* (včetně primárních procesů) nás v první řadě zajímá, jaké jsou *maximální hodnoty* této účinnosti. Obvykle vycházíme z odhadu minimálního počtu fotonů, jejichž energie je nutná pro tvorbu potřebného množství NADPH a ATP pro sekundární procesy. Z dřívějšího výkladu již víme, že k redukci jedné molekuly CO₂ jsou nutné dvě molekuly NADPH a tři molekuly ATP. K redukci dvou molekul NADP⁺ na NADPH jsou potřeba čtyři elektrony, které se uvolní ze dvou molekul vody za spotřeby

energie z osmi fotonů, neboť dva fotony (v každém fotosystému jeden) jsou nutné na transport jednoho elektronu necyklickou cestou. Tedy osm fotonů je absolutní minimum pro zabezpečení nejen 2 NADPH, ale i 3 ATP potřebných na fixaci jedné molekuly CO_2 (viz obrázky na str. 50). Vzhledem k uvedeným hodnotám účinnosti (tedy i ztrátovosti) biochemických procesů je ***k zabezpečení asimilace jedné molekuly CO_2 zapotřebí obvykle minimálně 12 fotonů***, jak bylo dokázáno i experimentálně. Pro tvorbu jednoho molu fruktózy potřebujeme tedy $6 \times 12 = 72$ molů fotonů. Jeden mol fotonů červeného světla (680 nm) předává při absorpci v asimilačních pigmentech energii 175 kJ, tudíž na získání jednoho molu fruktózy (2804 kJ) jsou náklady $72 \times 175 = 12600$ kJ. Maximální účinnost (zisk/náklady) celé fotosyntetické asimilace CO_2 , zahrnující primární i sekundární procesy, je tedy přibližně $2804/12600 = 0,22$ (= 22%).

Uvedené výpočty vycházejí ze záření *absorbovaného v asimilačních pigmentech* a plně zužitkovaného pro transport elektronů. Jak uvidíme ještě v další kapitole, využití záření *dopadajícího na list* je mnohem menší, neboť přibližně 15 % fotosynteticky aktivního záření není listem vůbec absorbováno (část se odrazí, část je propuštěna), a jistý podíl absorbují i jiné součásti listu než asimilační pigmenty. Se vzrůstající hustotou toku fotonů roste také množství záření, které sice bylo absorbováno asimilačními pigmenty, ale nemohlo být využito ve fotosyntéze pro omezenou kapacitu přenosu elektronů v primárních procesech fotosyntézy.

2.3. Ekofyziologické studium fotosyntézy

Pro své výjimečné postavení v životě rostliny je fotosyntetická asimilace CO_2 intenzivně studována nejen metodami biochemické a biofyzikální analýzy buněčných struktur, ale i na úrovni listů, celých rostlin či dokonce porostů. Hlavní pozornost při tomto studiu není obvykle zaměřena na detailní poznání *podstaty* asimilačních procesů, ale spíše na *hledání vnitřních a vnějších faktorů omezujících rychlost fotosyntézy* u asimilujících orgánů intaktních rostlin. Cílem takového výzkumu fotosyntézy je jednak poznání mechanismu, který řídí rychlost fotosyntézy u struktur s vyšší úrovní integrace, ale i konkrétní aplikace získaných poznatků, např. v zemědělské výrobě či při ekologickém studiu přirozené vegetace. V každém případě tento přístup vyžaduje používat vhodné nedestruktivní metody. Daleko nejčastěji je fotosyntéza sledována pomocí měření *rychlosti příjmu CO_2* do listů, méně často (např. u vodních rostlin) je používáno měření *rychlosti výdeje kyslíku*. Odhad rychlosti fotosyntézy z měření rychlosti výměny plynů (*gazometrické metody*) je komplikován respiračními procesy v mitochondriích, které probíhají i na světle a jsou též spojeny s výměnou plynů. Pomocí gazometrie tedy nemůžeme měřit skutečnou rychlost fixace CO_2 v chloroplastech (která bývá označována jako *hrubá fotosyntéza*), ale pouze rychlost *čisté fotosyntézy*, což je rychlost hrubé fotosyntézy zmenšená o rychlost současně probíhajících respiračních procesů spojených s výdejem CO_2 , který se po uvolnění z mitochondrií znovu fixuje (recykluje) v chloroplastu.

Záření a teplota jako hlavní vnější faktory řídící rychlost fotosyntézy

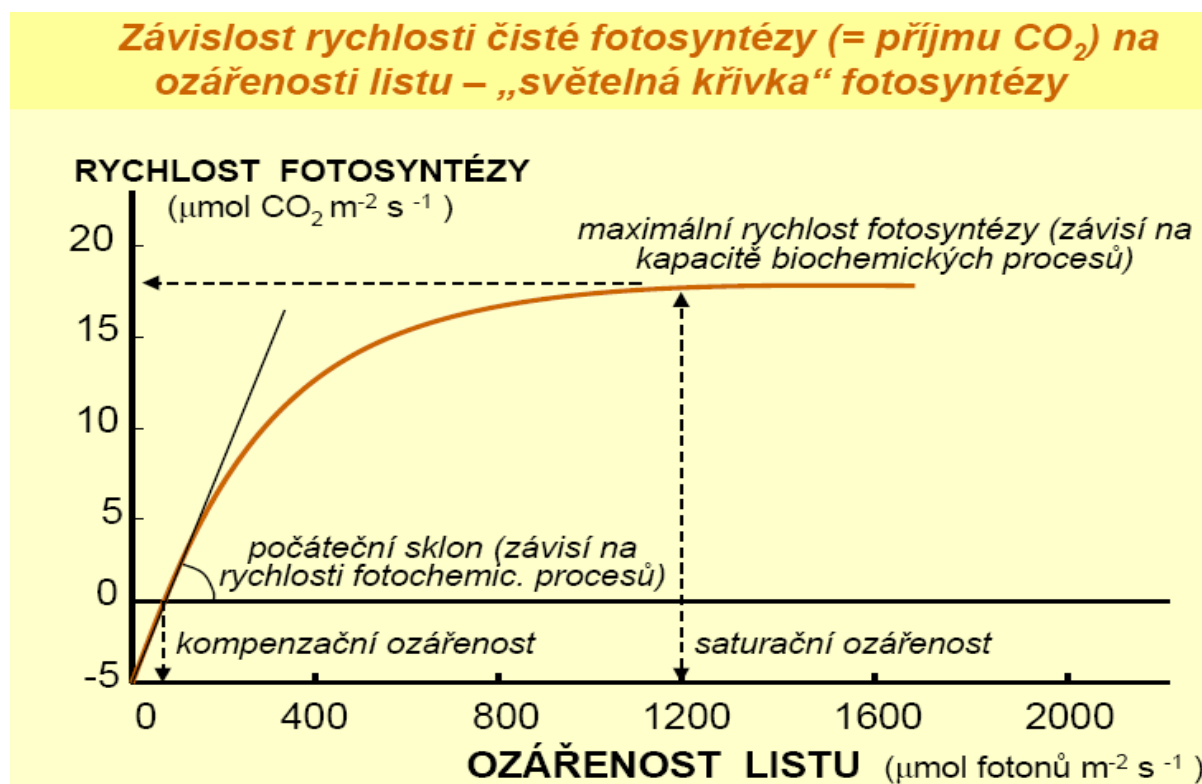
Pokud provádíme v přírodních podmínkách dlouhodobá měření rychlosti fotosyntézy a současně registrujeme i nejrůznější vnější abiotické faktory, můžeme pak stanovit jejich významnost pomocí statistických metod. Nejtěsnější korelace bývá téměř vždy zjišťována mezi fotosyntézou a zářením, na druhém místě je obvykle teplota.

Množství záření kolísá v denních i ročních cyklech a navíc v porostech se mění v závislosti na prostorovém umístění listů. Při studiu fotosyntézy nás zajímá pouze ta část spektra, která je absorbována asimilačními pigmenty, tedy přibližně v rozmezí vlnových délek 400 až 700 nm (= *fotosynteticky aktivní radiace, FAR*). Množství záření dopadající na

jednotku listové plochy za jednotku času (**ozáření**) měříme v jednotkách toku energie (W m^{-2}), nebo jako **hustotu toku fotosynteticky aktivních fotonů** (zkráceně PPF, z angl. *Photosynthetic Photon Flux*, $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$). Maximální hodnoty za jasného letního dne činí asi 500 W.m^{-2} , což přibližně odpovídá $2200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ FAR.

Rychlost „čisté“ fotosyntézy nejčastěji měříme počtem molů CO_2 přijatých z okolního vzduchu na jednotku listové plochy za sekundu. Vztah mezi rychlostí čisté fotosyntézy a ozáření listu není lineární, nýbrž má tvar limitní křivky charakteristického tvaru. Tradičně bývá označována jako **světelná křivka fotosyntézy**. Její počátek na abscise leží u takové hodnoty ozáření, při které je rychlost fixace CO_2 právě dostatečná na spotřebu CO_2 vydávaného z respiračních procesů. Výměna CO_2 s okolním vzduchem je tedy nulová. Označujeme ji jako **kompensační ozáření** (dříve též světelný kompenzační bod). Hodnota kompenzačního ozáření je závislá především na rychlosti respirace (a tudíž i na teplotě), a také na strukturních charakteristikách listů. Obojí však může být opět závislé na druhu rostliny a podmínkách, za kterých roste. Nejčastěji se pohybuje v rozmezí 1 až 5 W m^{-2} (= přibližně 5 až $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ FAR).

Rychlost fotosyntézy při vzestupu ozáření nad kompenzační úroveň zpočátku stoupá téměř lineárně, později se však zpomaluje a dále již nevzrůstá - bylo dosaženo nasycení fotosyntézy zářením. Hodnotu ozáření, při které k nasycení došlo, nazýváme **saturační ozáření**. Také v hodnotách saturačního ozáření jsou obrovské rozdíly dané strukturními vlastnostmi listů (tenké listy ji mají vždy nižší), i kapacitou biochemických procesů. Obecně platí, že listy s nízkou hodnotou saturačního ozáření mají i nízkou hodnotu dosažitelné rychlosti fotosyntézy při nasycení zářením.



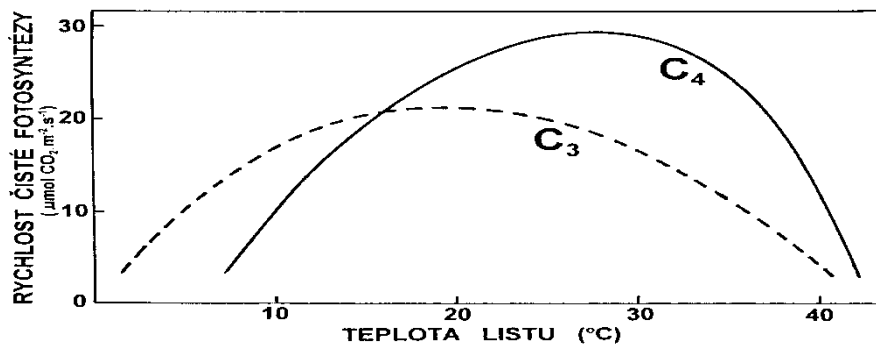
Již pouhým pohledem na světelnou křivku zjistíme, že největší přírůstek rychlosti fotosyntézy na jednotku přírůstku záření je na jejím počátku, tedy v oblasti nízkých hodnot ozáření. Uvedený poměr se nazývá **kvantový výtěžek fixace CO_2** :

$$Q = \frac{\text{počet molů fixovaného } \text{CO}_2}{\text{počet molů fotonů pohlcených listem}}$$

Při přesném výpočtu kvantového výtěžku vycházíme ze záření listem *pohlčeného* - je tedy nutné běžně měřené množství *dopadajícího* záření korigovat hodnotami odrazivosti a propustnosti příslušného listu. Převrácenou hodnotu kvantového výtěžku označujeme jako kvantový požadavek. *Za nízké úrovně záření* je rychlost biochemických procesů fotosyntézy omezena především dodávkou energie (ve formě ATP a NADPH) z primárních (fotochemických) procesů. Proto hodnoty kvantového výtěžku, zjištěné ze sklonu počátečního, (lineárního) úseku světelných křivek, jsou vždy nejvyšší. Se stoupající ozářeností, kdy je rychlost fotosyntézy více omezována biochemickými procesy, pak klesají

Rychlost fotosyntézy listů *za vysokých hodnot ozářenosti* (oblast plató světelných křivek, nasycení fotosyntézy zářením) není obvykle určována jediným faktorem. Kromě nedostatečné kapacity sekundárních (biochemických) procesů může mít velký vliv i malá difuzní vodivost průduchů a také hromadění produktů fotosyntézy. Způsob, jakým určujeme významnost jednotlivých omezujících činitelů, bude popsán v následujícím oddílu..

Teplota je vedle záření druhým nejvýznamnějším vnějším faktorem, který ovlivňuje rychlost fotosyntézy. Teplota kolísá v pravidelných denních i ročních cyklech. Teplotní *optimum* pro čistou fotosyntézu leží u většiny rostlin s fixační cestou C₃ nejčastěji v rozmezí 15 až 25 °C zatímco u C₄-rostlin bývá obvykle vyšší (25 až 35 °C).



Závislost rychlosti čisté fotosyntézy listů kukuřice (C₄-rostlina) a pšenice (C₃) na teplotě.

Čím je vlastně určována teplotní závislost fotosyntézy? Primární (fotochemické) procesy se v běžném rozsahu teplot mění jen velmi málo. Citlivěji reagují sekundární (biochemické) procesy fotosyntézy. Jejich rychlost se s teplotou zvyšuje až po hodnotu zhruba 40°C, kdy začíná denaturace enzymů. Křivka teplotní závislosti čisté fotosyntézy, měřená z výměny plynů, nemá ovšem tvar čisté teplotní závislosti enzymatické aktivity, neboť nutně dochází k interferenci s teplotní závislostí současně probíhající mitochondriální respirace. U C₃-rostlin navíc s teplotou vzrůstá oxygenázová aktivita *Rubisco* a tudíž i fotorespirace.

Minimální teploty při kterých je ještě měřitelná čistá fotosyntéza, jsou u většiny druhů rostlin mírného pásma v rozmezí 0 až -3 °C, zatímco *růst* těchto druhů se často zastavuje již při poklesu teploty (v meristematické zóně) na +5 °C. *Fotosyntéza za nízkých teplot (blízkých nule) vede tedy k hromadění nevyužitých asimilátů*. U mrazuvzdorných druhů (např. naše jehličnaté stromy, řada druhů trav včetně ozimých odrůd obilí) bývá čistá fotosyntéza měřitelná ještě při nižších teplotách (-5 až -7 °C). Také teplotní optimum fotosyntézy bývá u těchto druhů v zimních měsících posunuto směrem k nižším teplotám.

Stanovení významnosti faktorů omezujících rychlost fotosyntézy

Rychlost fotosyntézy listu či celé rostliny se mění ve velmi širokém rozmezí jak v průběhu dne, tak i během vegetačního období. Není to však pouze v důsledku kolísání faktorů vnějšího prostředí, ale i v důsledku *vnitřního stavu asimilačního aparátu*, zejména funkčních předpokladů dílčích biochemických reakcí. Na změnách rychlosti fotosyntézy, studované na orgánové úrovni, se podílejí i *morfologické a anatomické charakteristiky*.

Ty určují například maximální vodivost difuzních drah pro CO₂ v listech, či počet a uspořádání chloroplastů v mezofylových buňkách. Proto při podrobnějším zkoumání příčin rozdílů v rychlosti fotosyntézy nevystačíme se systematickým měřením této rychlosti u rostlin v přírodních podmínkách a s následným statistickým vyhodnocením. Je zapotřebí provádět i pokusy v řízeném prostředí s promyšleně navozovanými změnami jednotlivých zkoumaných faktorů. Neméně důležitá je i schopnost správně interpretovat zjištěné reakce, posoudit jejich postavení v dlouhém a složitém řetězci příčin a následků.

Při kauzální analýze rozdílů v rychlosti fotosyntézy je velmi užitečné rozdělit si možné řídicí proměnné do jisté hierarchické posloupnosti. Vyjděme z ústředního postavení Calvinova cyklu u běžných rostlin s C₃-fixační cestou. Omezení rychlosti fixace může bezprostředně (primárně) způsobovat:

1) **Karboxylační aktivita enzymu Rubisco** (která závisí hlavně na jeho množství) a dále na koncentraci CO₂ a O₂ v chloroplastu. Za normálních okolností je koncentrace O₂ vcelku stálá a omezující vliv má pouze koncentrace CO₂. Její hodnoty (i při stálém složení vnějšího vzduchu) jsou závislé na vodivosti difuzních cest v listu, především na vodivosti průduchů.

2) **Rychlost primárních (fotochemických) procesů**, která je závislá na množství záření, asimilačních pigmentů, přenašečů elektronů, atd.

3) **Hromadění produktů fixace CO₂**. Malá rychlost přeměny fosforylovaných intermediátů na konečné produkty (škrob, sacharóza) vede k blokování fosfátových iontů v cytosolu a k jejich nedostatku v chloroplastech.

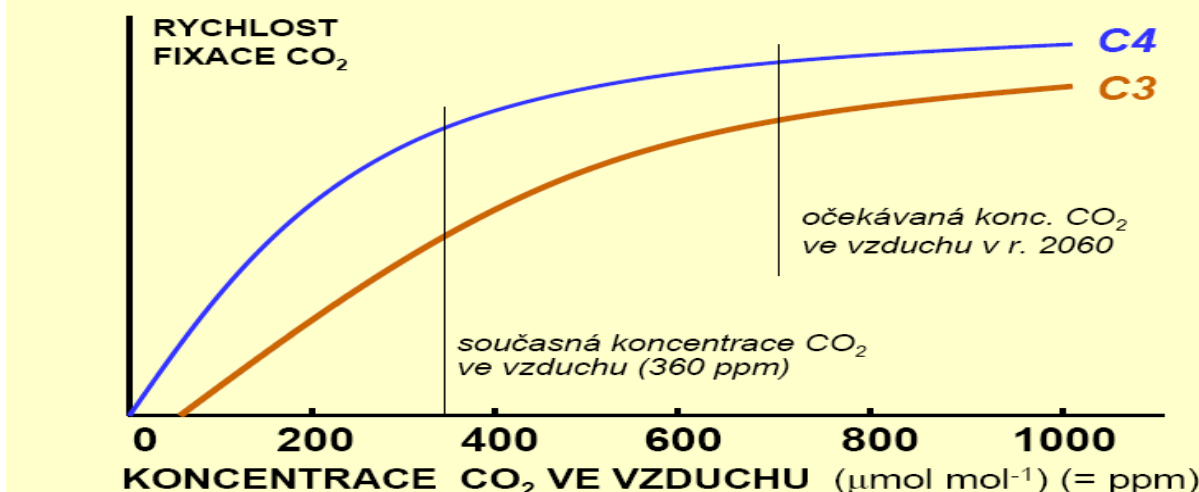
Pomocí gazometrických metod můžeme i u celých nepoškozených rostlin určit, který z uvedených tří procesů má v daném okamžiku největší omezující vliv. Základní postup takovéto analýzy spočívá ve stanovení závislosti rychlosti čisté fotosyntézy na záření ("světelných křivek") a na koncentraci CO₂ (CO₂ - křivka).

Interpretace světelných křivek je poměrně jednoduchá: počáteční, přibližně lineární část křivky, vymezuje interval hodnot ozáření, ve kterém asimilaci CO₂ omezuje nedostatečná rychlost primárních (fotochemických) procesů. Za saturační ozáření může být rychlost fotosyntézy určována jak nedostatečnou karboxylační aktivitou, tak i hromaděním produktů fixace. Rozlišení těchto dvou omezujících vlivů je možné po náhlém zvýšení koncentrace CO₂ (či snížení O₂) ve vzduchu. Pokud se rychlost fotosyntézy nezmění, pak se jedná o limitaci asimiláty.

Poněkud náročnější je celková **analýza závislosti čisté fotosyntézy na koncentraci CO₂**. Je známo, že tato závislost je u většiny rostlin (zejména s fixační cestou C₃) téměř lineární až do hodnot, které jsou v čistém vzduchu běžné (okolo 350 cm³.m⁻³). **Kompenzační koncentrace CO₂** (= průsečík CO₂-křivky s abscisou) je u **C₄rostlin** obvykle nulová či velice blízká nule. **U všech C₃rostlin** je vyšší než nula, nejčastěji v rozmezí 35 až 50 cm³.m⁻³. Hlavní příčinou těchto rozdílů je fotorespirační výdej CO₂ u C₃ rostlin. Potlačíme-li fotorespiraci (snížením koncentrace kyslíku ve vzduchu pod 2%), pak rozdíly mezi oběma skupinami rostlin zmizí.

Za dostatku záření je normální koncentrace CO₂ ve vzduchu nedostatečná pro zajištění takové rychlosti jeho toku do chloroplastů, která by odpovídala kapacitě fotochemických a biochemických procesů u C₃-rostlin. Zvýšení koncentrace CO₂ ve vzduchu až do hodnot asi 1000 cm³.m⁻³ obvykle zvyšuje rychlost čisté fotosyntézy. Limitujícím faktorem fotosyntézy není pouze vnější koncentrace CO₂ ale i vodivost difuzních cest pro CO₂. Uvnitř listu (v intercelulárách a v chloroplastech) bývá při aktivní fotosyntéze koncentrace CO₂ snížena přibližně o 20 až 50% ve srovnání s okolním vzduchem, což je právě dáno omezenou difuzní vodivostí listu. Navíc je tato vnitřní koncentrace silně závislá na změnách v otevřenosti průduchů, které lze často obtížně předvídat.

Závislost rychlosti čisté fixace CO₂ na koncentraci CO₂



Dosavadní studium limitujících faktorů rychlosti fotosyntézy u rostlin v přirozených podmínkách ukazuje, že jen zřídka lze označit pouze jeden faktor (či řídicí komplex) za limitující. Na řízení rychlosti fotosyntézy se obvykle podílí více mechanismů, současně a střídá se pouze jejich relativní významnost. *Regulační mechanismy směřují k optimálnímu využití všech součástí asimilačního aparátu.* Směřují tedy k takovému stavu, kdy v daném prostředí není žádná z těchto součástí ve výrazném přebytku či nedostatku.

Zvláště názorně můžeme tuto optimalizaci struktur a funkcí pozorovat u rostlin rostoucích za dlouhodobě nepříznivých podmínek. Při trvalém nedostatku záření (v zastínění) je v listech velmi malý obsah *Rubisco* i jiných enzymů, zato je udržováno velké množství asimilačních pigmentů ve světloběrných komplexech. Počáteční sklon CO₂- křivek a plató světelných křivek má proto jen nízké hodnoty, ovšem to jsou oblasti, ve kterých tyto listy běžně neoperují. Obdobný charakter fotosyntetických závislostí mají i rostliny rostoucí za nedostatku dusíku v půdě a todíž i v listech.

Při studiu fotosyntézy na úrovni celých rostlin je v současné době věnována velká pozornost dvěma problémům, které spolu částečně souvisejí. Je to jednak **vliv trvale zvýšené koncentrace CO₂** ve vzduchu na rychlost čisté fotosyntézy, a dále ovlivňování fotosyntézy rychlostí **odběru asimilátů** z listů.

Koncentrace CO₂ ve vzduchu je sice z krátkodobého hlediska poměrně stálá (denní a roční výkyvy jsou zřídka větší než $\pm 10\%$), ovšem z každoročního přírůstku průměrné koncentrace lze usoudit, že *ke zvýšení na dvojnásobek současného stavu by mohlo dojít už během tohoto století.* Při této změně (z 360 na 720 $\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$) navozené **v krátkodobých** laboratorních pokusech se rychlost fotosyntézy většiny běžných druhů C₃-rostlin zvyšuje přibližně o 40 až 50%. Zvýšená koncentrace CO₂ stimuluje rychlost čisté fotosyntézy nejen proto, že *Rubisco* má k CO₂ poměrně malou afinitu a při normální koncentraci CO₂ zdaleka nemůže být v nasyceném stavu, ale i díky potlačené fotorespiraci (u C₃-rostlin).

Pokusy s **dlouhodobou** expozicí rostlin v uměle vytvořené atmosféře se zvýšenou koncentrací CO₂ (700 $\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ trvající několik měsíců až roků) ukazují, že za tuto dobu obvykle dochází u mnoha druhů k postupnému poklesu rychlosti fotosyntézy ve srovnání s hodnotami na počátku expozice. Tento pokles (*aklimační reakce*) je provázen snížením aktivity enzymů (především *Rubisco*) a hromaděním asimilátů v listech.

Snížení rychlosti fotosyntézy v důsledku **hromadění asimilátů** (způsobené jejich nedostatečným využíváním) není pouze problémem u rostlin pěstovaných za zvýšené koncentrace CO₂, které mají velmi zrychlenou fotosyntézu. Je velmi závažný i za normální koncentrace CO₂ ve vzduchu, a sice za takových podmínek, kdy rostliny mají malou kapacitu

pro ukládání asimilátů ve formě zásobních látek a současně je nemožno ani využívat ke zrychlení růstu, ať už z důvodů morfogenetických, či v důsledku inhibice růstu vnějšími faktory (vodní stres, nízká teplota, atd.).

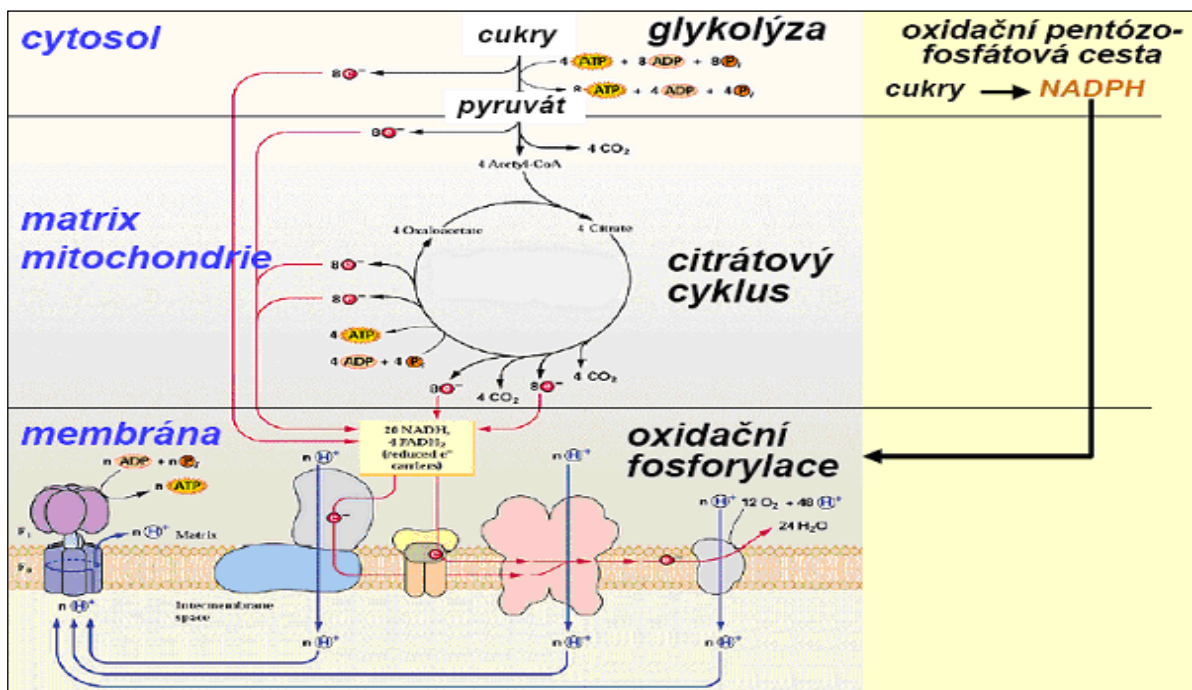
Současný výzkum vztahů mezi využíváním asimilátů a fotosyntézou se zaměřuje na řešení celé řady dílčích problémů. Především jde o vysvětlení *mechanismu inhibice fotosyntézy*, což předpokládá porozumět biochemické regulaci složitěho metabolismu cukerných metabolitů buňkách (mimo chloroplasty), a najít příčiny, které vedou ke *zpomalení tvorby sacharózy* (jako hlavního cukru transportovaného do jiných orgánů), či k hromadění fosforylovaných cukrů, a tím i k nedostatku fosfátových iontů v chloroplastech. U řady druhů však nelze negativní vztah mezi rychlostí fotosyntézy a koncentrací jakékoliv cukerné sloučeniny vůbec dokázat, i když při zvýšeném odběru asimilátů jinými orgány dochází i u těchto rostlin k výraznému zrychlení fotosyntézy.

Velké úsilí je v současné době také soustředěno na poznání mechanismu, který řídí *zvětšování úložné kapacity* pro asimiláty (růst zásobních orgánů, nových odnoží či tvorba semen a plodů) v závislosti na zrychlení fotosyntézy. To jsou však již problémy, které mohou být řešeny pouze ve spolupráci se specialisty na růstovou fyziologii (fytohormonální regulace) a s molekulární biologii rostlin.

2.4. Respirační procesy

Téměř polovina všech sacharidů vytvořených fotosyntetickou asimilací oxidu uhličitého je v průběhu dne opět rozložena v souběžně probíhajících biochemických reakcích, které se souhrnně označují jako *respirace*. Tento rozklad bývá spojen s příjmem kyslíku a jeho konečným produktem je oxid uhličitý a voda. Zdaleka ne všechny molekuly rozkládaného substrátu jsou však oxidovány až na CO_2 . Smyslem respirace není totiž pouze zpřístupnění energie získané rozkladem složitějších organických sloučenin pro jiné procesy, ale i získání jednodušších organických molekul, které jsou pak využity jako základní stavební moduly v navazujících syntetických procesech. Obdobně jako u fotosyntézy, celý komplex respiračních procesů můžeme rozdělit do několika na sebe navazujících částí:

- rozklad primárního substrátu v cytosolu
- citrátový cyklus v matrix mitochondrií,
- elektronový transport a oxidační fosforylace na membránách mitochondrií.



Rozklad primárního substrátu v cytosolu

V každé rostlinné buňce je pohotovostní zásoba rychle využitelného substrátu, tvořeného především sacharózou a fosforylovanými hexózy (*glukóza-1-fosfát*, *glukóza-6-fosfát*, *fruktóza-6-fosfát*). Tato zásoba se neustále doplňuje, a to jednak z nových asimilátů (transportem triózafosfátů, především glycerinaldehyd-3-fosfátu z chloroplastů), jednak rozkladem složitějších sacharidů, zejména sacharózy, škrobu a fruktanů, méně často i lipidů a proteinů.

Klasické schéma **glykolýzy** začíná od molekuly hexózy, ze které po devíti krocích a za účasti deseti různých enzymů vznikají dvě molekuly pyruvátu. Molekula hexózy se nejprve dvakrát fosforyluje a pak rozpadá na dvě fosforylované triózy. Klíčové postavení pro další reakce má *glycerinaldehyd-3-fosfát*, který slouží jako donor elektronů (a protonu) pro redukci pyridinového nukleotidu (NAD^+ na NADH). Při dalších přeměnách se tvoří **pyruvát** jako konečný produkt glykolýzy, a uvolněná fosfátová skupina přechází na ADP za vzniku ATP. U rostlin, na rozdíl od živočišných buněk, může být produktem glykolýzy kromě pyruvátu také **malát**. Ten vzniká také z fosfoenolpyruvátu podobně jako pyruvát, ovšem vedlejší metabolickou cestou přes oxalacetát. Tvorbu oxalacetátu katalyzuje PEP-karboxyláza.

Energetický zisk glykolýzy je velmi malý - z jedné molekuly hexózy lze získat nanejvýš 2 ATP a 2 NADH, což představuje jen zlomek z celkové využitelné energie vstupního substrátu. Hlavní funkcí glykolýzy je tedy příprava jednodušších sloučenin (především pyruvátu a malátu, ale i jiných meziproductů) pro další rozkladné i syntetické procesy.

Pokud mají buňky dostatek kyslíku, většina produktů glykolýzy je dále oxidována v mitochondriích. **Za nedostatku kyslíku** glykolýza sice probíhá, avšak hromadící se produkty musí být zpracovány jinými cestami, souhrnně označovanými jako **fermentace** (kvašení). Akceptorem elektronů jsou v tom případě různé organické látky a konečným produktem nejčastěji kyselina mléčná nebo etanol. Při těchto reakcích dochází současně k regeneraci NAD^+ , takže je zajištěn nerušený průběh glykolýzy. Při náhlém nedostatku kyslíku dochází obvykle nejprve ke tvorbě laktátu, ale později převažuje tvorba etanolu, který je relativně méně toxický (nepůsobí silné okyselení cytosolu).

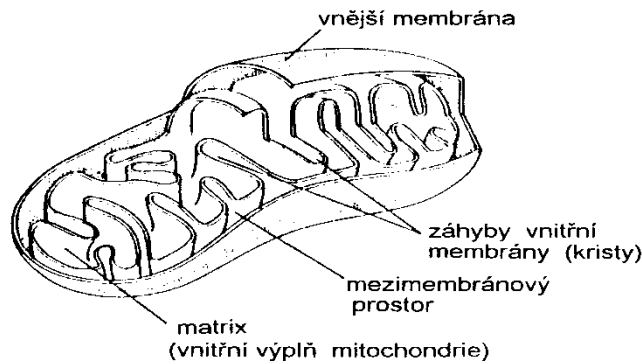
Reakce probíhající při glykolýze jsou **reverzibilní** a skutečně také můžeme někdy v rostlinách pozorovat syntézu sacharidů z pyruvátu, malátu či z jiných jednoduchých organických sloučenin vzniklých rozpadem větších necukerných molekul. Tento proces označovaný jako **glukoneogeneze** je hojně využíván při mobilizaci rezerv uložených ve formě tuků (např. při klíčení olejnatých semen).

Paralelně s glykolýzou obvykle probíhá u rostlin ještě jedna varianta rozkladu primárního substrátu označovaná jako **oxidační pentózová cesta**. Na rozdíl od glykolýzy umožňuje úplnou oxidaci hexóz až na CO_2 , aniž by musely být využívány mitochondriální procesy. V první fázi této cesty dochází k oxidaci jednoho uhlíku v hexóze až na CO_2 za vzniku pentózy a dvou NADPH. Postupně se hromadící pentózové molekuly mohou být využity k tvorbě hexóz (regenerační fáze), nebo pro jiné syntézy.

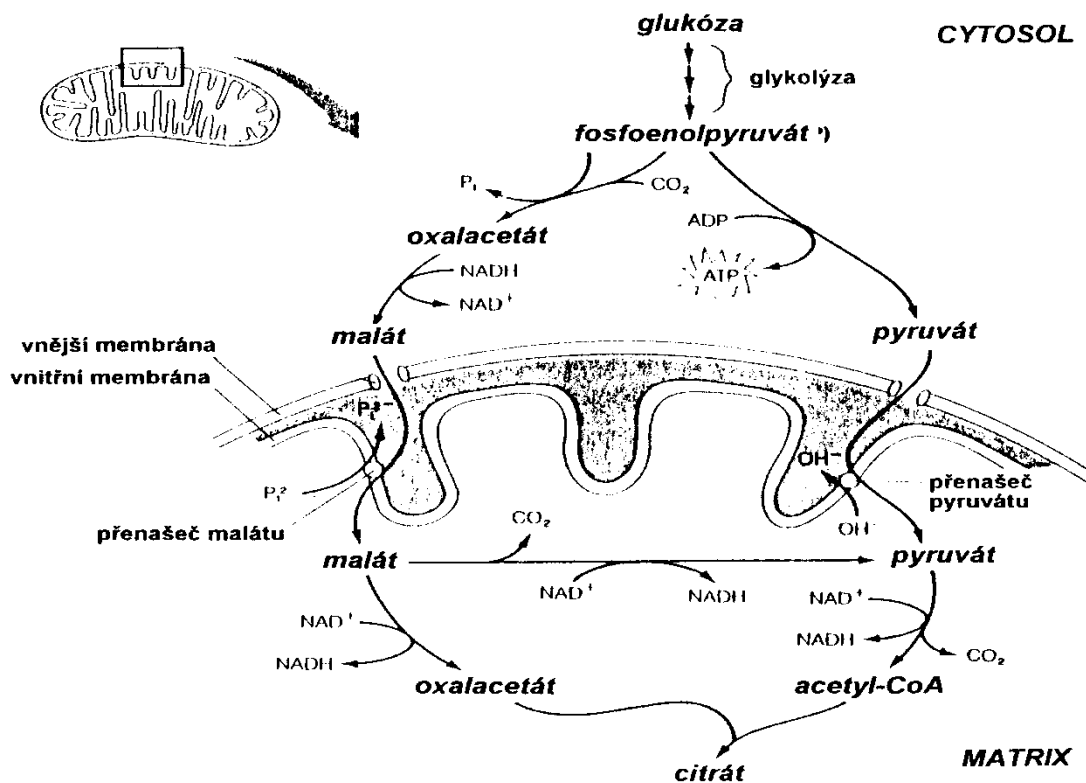
Pentózová cesta je hlavním zdrojem NADPH v cytosolu. Velký význam mají i některé meziproducty, např. ribóza-5-fosfát jako prekurzor pro tvorbu nukleotidů, erythróza-4-fosfát pro tvorbu fenolických sloučenin včetně ligninu. Asi 20 až 30 % sacharidů se rozkládá právě touto cestou. Je tedy pro rostliny nepostradatelná a její aktivita se snižuje pouze za anaerobních podmínek. **Pentózová cesta ovšem nemůže být nikdy hlavní respirační cestou, nenahraditelným zdrojem energie** Pentózová cesta probíhá nejen v cytosolu, ale také v chloroplastech, ovšem tam pouze za tmy. Inhibice světlem je nutná, aby se vyloučil její nepříznivý vliv na průběh Calvinova cyklu.

Oxidační procesy v mitochondriích

Oxidace pyruvátu, malátu a NADH, vytvořených v glykolýze, probíhá v mitochondriích. Tam je teprve dosaženo největšího energetického výtěžku. Mitochondrie jsou obdobně jako chloroplasty semiautonomní orgány s dvojitou membránou, s vlastními ribozómy, DNA a RNA. Vnější membrána je poměrně dobře propustná i pro velké molekuly (přibližně do 10 kDa), tedy pro většinu buněčných metabolitů a iontů. Vnitřní membrána vytváří výrazné záhyby, označované jako *kristy*. V této membráně jsou hojné jednak **transportní bílkoviny**, (zvláště pak přenašeče pro pyruvát, malát, HPO_4^{2-} , ATP a ADP), ale i **proteinové komplexy** na kterých probíhá oxidace NADH, a tvorba ATP. Střední uzavřený prostor vyplňuje **základní hmota** (*matrix*) mitochondrie, ve které probíhá velké množství biochemických reakcí. Proto je mimořádně bohatá na enzymy a zpracovávané metabolity.



Obvyklá stavba rostlinné mitochondrie

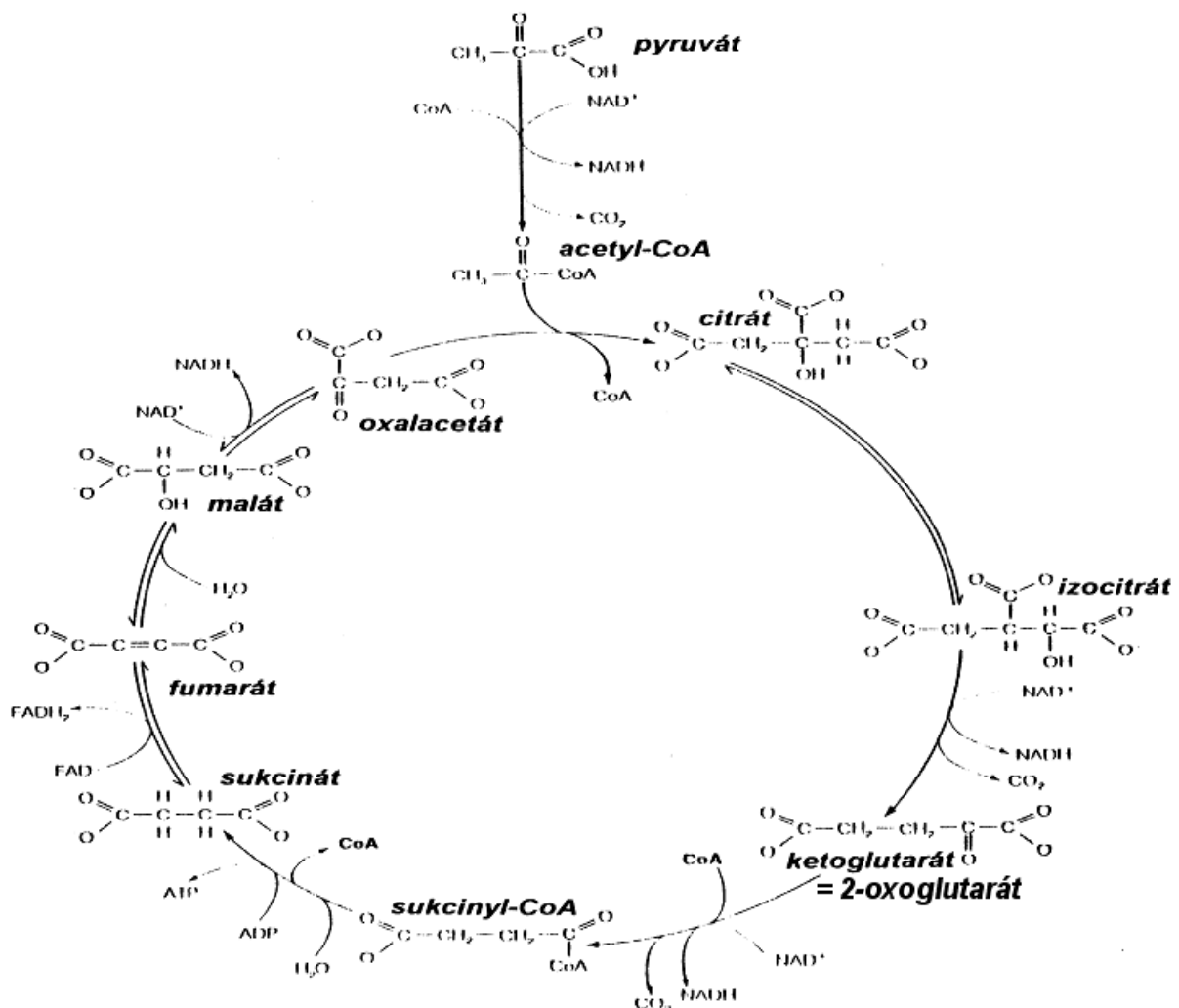


Do rostlinné mitochondrie může vstupovat (přes specifické přenašeče) nejen pyruvát, ale i malát. Obrázek zachycuje obě tyto možnosti, které však nemusejí být využívány současně či stejně často.

Pyruvát transportovaný z cytosolu je v matrix mitochondrie nejprve dekarboxylován. Uvolňuje se jedna molekula CO_2 a acetátový zbytek je vnášen pomocí koenzymu A do vlastního **citrátového cyklu** (někdy bývá též nazýván jako **cyklus trikarboxylových kyselin** či **Krebsův cyklus** (podle svého objevitele H.A.Krebse). V něm se navazuje na oxalacetát za vzniku šestiuhlíkaté kyseliny citronové, která v dalších sedmi krocích postupně ztrácí dva uhlíky (ve formě dvou molekul CO_2).

Postupnou oxidací jedné molekuly pyruvátu v citrátovém cyklu vznikne kromě tří molekul CO_2 i jedna molekula ATP , ale hlavně 3 NADH a 1 FADH_2 , ve kterých je uchováno ještě velké množství volné chemické energie. Ta se využívá na tvorbu ATP v navazujících membránových procesech. Ne vždy musí být veškerý malát nebo pyruvát oxidován v celé soustavě reakcí. Citrátový cyklus je pro buňku významným centrem jak katabolických, tak i anabolických reakcí, *zdrojem řady meziproductů* pro různé syntézy, zejména aminokyselin.

Citrátový cyklus v rostlinných mitochondriích má některé zvláštnosti, které nenalzáme u mitochondrií živočišných. Je to např. přítomnost jablečného enzymu, který umožňuje rozklad malátu na pyruvát, a tak zachovat funkčnost cyklu i při velkém odběru 2-oxoglutarátu na asimilaci amonných iontů. A je to také tvorba ATP místo u živočichů obvyklého GTP .



Zjednodušené schéma citrátového cyklu. Nejsou uvedeny enzymy nutné pro dílčí reakce.

Konečný přenos elektronů z redukovaných sloučenin, vzniklých v citrátovém cyklu a při glykolýze, probíhá pomocí složité soustavy oxidoreduktáz, označované jako **respirační řetězec**. Redoxní systémy, které tvoří tento řetězec, jsou umístěny na několika funkčně propojených **multiproteinových komplexech** ve vnitřní membráně mitochondrie.

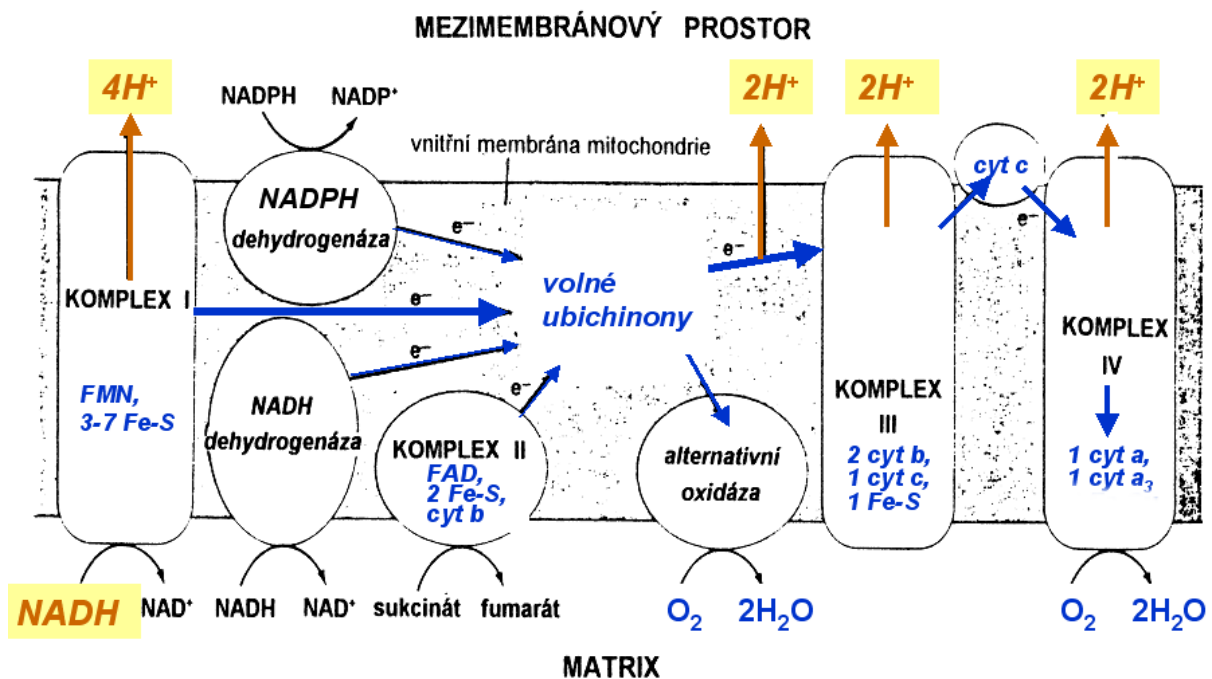
Komplex I (*NADH dehydrogenáza*) slouží k redukci NADH (produkovaných citrátovým cyklem) a přenos uvolněných elektronů pomocí několika pevně vázaných redoxních systémů (*flavinmononukleotid* - FMN, a další tři (někdy i více) redoxní centra typu Fe-S proteinů). Elektrony jsou pak přenášeny na **ubichinon**, který je chemicky i funkčně podobný plastochinonům v chloroplastech. Molekuly ubichinonu (a jeho redukované formy ubichinolu či hydrochinonu) jsou volně pohyblivé v mitochondriální membráně a proto jsou důležitým prostředníkem pro několik navazujících reakcí.

Komplex II (*sukcinátdehydrogenáza*) zajišťuje přenos elektronů ze sukcinátu (ten je součástí citrátového cyklu!) na ubichinon pomocí redoxního systému FAD - FADH₂ (*flavinadeninukleotid*). Součástí komplexu II jsou též asi dva FeS-proteiny a cytochrom typu *b*. V tomto komplexu nedochází k membránovému přenosu protonů.

Komplex III (*cytochrom BC₁ komplex*), obsahuje dva cytochromy *b*, cytochrom *c₁* a FeS-protein. Tyto redoxní systémy zprostředkovávají přenos elektronů z ubichinolu na další mobilní přenašeč, cytochrom *c*.

Komplex IV (*cytochromoxidáza*), obsahuje dva cytochromy typu *a*, které jsou schopny díky specificky vázaným iontům mědi (kromě železa v hemové skupině), přenosu elektronů na konečný akceptor - **kyslík**.

Kromě uvedených základních komplexů byly zjištěny v *rostlinných mitochondriích* ještě některé další pomocné systémy, umožňující v jistých úsecích hlavního řetězce souběžný transport elektronů. Především jde o **dva komplexy dehydrogenáz**, které mají obdobnou funkci jako komplex I. Jeden z nich je umístěn na vnější straně membrány, kde usnadňuje oxidaci NADPH (a také NADH) přicházejících z cytosolu. Další komplex NADH-dehydrogenázy je připojen k vnitřní straně membrány a funguje zcela obdobně jako komplex I (liší se však citlivostí k některým inhibitorům).



Hlavní proteinové komplexy ve vnitřní membráně mitochondrie u rostlin a jejich funkce.

Redoxní výměny při oxidaci NADH na komplexu I a přenos elektronů nejběžnější cestou (přes ubichinony, a komplexy III a IV až na kyslík) jsou spojeny s přenosem vodíkových iontů z matrix do mezimembránového prostoru, jak je znázorněno na obrázku. Při jejich transportu do matrix, hnaném vytvořeným elektrochemickým gradientem přes hojně ATP-syntázy (stejněho typu a stejně účinné jako v chloroplastech) **dochází k tvorbě ATP** (*oxidační fosforylace*).

Molekuly ATP, které se hromadí v matrix, je nutno neustále transportovat do cytosolu, a naopak do mitochondrií přivádět ADP a fosfátové ionty. Pro tento transport slouží hojně antiportové přenašeče ve vnitřní membráně.

Pozoruhodnou zvláštností dýchacího řetězce mitochondrií *jen u rostlin* je existence **alternativní cesty**, která umožňuje přenos elektronů z ubichinolu na kyslík i bez účasti cytochromových komplexů. Funguje tedy i po jejich zablokování kyanidem. Proto bývá též označována jako *kyanid-rezistentní cesta*. Transport elektronů z ubichinolu na kyslík přes komplex "alternativní oxidázy" na vnitřní straně mitochondriální membrány *není spojen s přenosem vodíkových iontů*, a proto ani jej nelze energeticky využít pro tvorbu ATP (dochází pouze ke ztrátové přeměně na tepelnou energii).

Význam alternativní cesty pro rostliny je stále ještě předmětem výzkumu. Byla dokázána u všech dosud zkoumaných druhů a také víme, že probíhá souběžně s cytochromovou cestou, i když s velmi proměnlivou rychlostí. Její podíl na celkovém toku elektronů vždy nápadně stoupá při velkém nadbytku respiračního substrátu (např. za vysoké rychlosti fotosyntézy v listech). Je proto možné, že jde o způsob, jak zajistit rychlý rozklad substrátu (rychlejším odvodem elektronů) a přitom si zachovat pod kontrolou optimální množství vytvářeného ATP. Větší význam však alternativní cesta asi má jako regulační mechanismus pro udržování optimálního poměru mezi množstvím ATP, NADH a některými intermediárními produkty citrátového cyklu (např. 2-oxoglutarátu, spotřebovávaného při asimilaci amonných iontů).

Vnitřní a vnější faktory řídící rychlost respirace

Regulace rychlosti respiračních procesů je neobyčejně složitý problém. Je to dáno především tím, že jde o komplex velmi různorodých biochemických reakcí, které mohou být nezávisle na sobě stimulovány či inhibovány specifickými metabolity. Ne vždy musí regulace směřovat k zajištění maximálně efektivních energetických přeměn. Přesto již známe některé mechanismy a uzlové body v celém komplexu reakcí, kterými rostlina může zvláště účinně řídit rychlost respirace.

Nepochybně nejdůležitější vnitřní regulace směřují k přizpůsobení rychlosti respirace energetickým potřebám rostliny. Nejjednodušší a vcelku samovolně působící regulační mechanismus je ovládán **koncentrací adenylátů**, především množstvím volného ADP, které pochopitelně vzrůstá při větší spotřebě energie (rychlejším štěpením ATP). Koncentrací adenylátů je řízena rychlost glykolýzy (změnou aktivity enzymů fosfofruktokinázy a pyruvátkinázy), a také rychlost oxidační fosforylace v mitochondriích.

Rychlost respirace je dále závislá na **množství primárního substrátu** v buňkách. Zvýšené množství hexos (a také fosfátových iontů) v cytosolu zrychluje glykolýzu i ostatní respirační procesy. Rychlost hydrolyzy zásobních sacharidů je zcela nezávislá na aktivitě respiračních enzymů. Je řízena samostatně, stejně tak jako rychlost transportu nově vytvářených asimilátů. Kromě *vnitřních* regulací, které mohou měnit rychlost respirace rostliny i ve zcela neměnném vnějším prostředí, působení *vnějších abiotických činitelů* má často nadřazenou regulační úlohu.

Teplota má na celkovou rychlost respirace zvláště výrazný vliv, neboť ovlivňuje rychlost všech dílčích enzymatických procesů. Při zvýšení teploty o 10 °C se rychlost respirace obvykle zdvojnásobí (faktor $Q_{10} = 2$). To platí v teplotním rozmezí přibližně od 0 °C do 30 °C, pak se již rychlost respirace zpomaluje. Při teplotách okolo 40 °C začne velmi rychle klesat. Zpomalení při vyšší teplotě může souviset s nedostatečně rychlou difuzí kyslíku (difuze se také zrychluje s teplotou, ale mnohem méně, $Q_{10} = 1,1$). Hlavní příčinou zpomalení a posléze poklesu respirace je však obvykle *denaturace některých enzymů*. Nepříznivý vliv vyšší teploty se zejména projevuje při jejím delším působení. Charakter teplotní závislosti respirace může být značně odlišný u různých druhů rostliny a bývá ovlivněn i podmínkami, ve kterých rostou. Rozdíly jsou zejména v hodnotách *minimální teploty*, kdy je vůbec

respirace ještě měřitelná (u některých arktických druhů i při -20 °C !), a v hodnotách maxima, ale také *rychlost vzestupu* respirace za běžných teplot nemusí být zcela stejná. Rozdíly v Q₁₀ mohou být v rozmezí od 1,8 do 2,4.

Záření nemá na rychlost respirace přímý vliv, ale ovlivňuje ji nepřímo přes fotosyntézu. V cytosolu fotosyntézy schopných buněk osvětlených listů se fotofosforylací zvyšuje koncentrace ATP a současně se snižuje množství ADP, což může mít inhibiční vliv na rychlost respirace. Současně se však zvyšuje množství volných cukrů, a tak na začátku temné periody je rychlost respirace zvýšena.

Koncentrace kyslíku je obvykle v mitochondriích dostatečná, neboť jeho transport do buněk je velmi rychlý. V případě nedostatečného zásobení kyslíkem (*hypoxie*, například u kořenů rostlin rostoucích v zaplavených či v udusaných půdách) dochází v buňkách k celé řadě metabolických změn. Především je velmi omezena tvorba ATP v mitochondriích, neboť je zpomalen transport elektronů (pro nedostatek jejich konečného akceptoru O₂). Dále je v cytosolu *stimulována fermentace* a její produkty (především kyselina mléčná a etanol) jsou ve větší koncentraci toxické. Velmi často bývá za nedostatku kyslíku pozorováno zvýšení rychlosti glykolýzy, které ovšem vede k neefektivnímu vyčerpání zásobních látek.

Význam respirace pro další fyziologické procesy v rostlinách

Respirační procesy se sice tradičně v učebnicích fyziologie rostlin probírají jako součást uhlíkového metabolismu, ovšem je nutné si stále uvědomovat jejich *podvojný charakter*: slouží jednak k transformaci uhlíkatých sloučenin (tvorba „stavebního materiálu“ k syntéze nových organických sloučenin), tak i k tvorbě velkého množství chemicky vázané energie, využitelné při nových syntézách. Respirace probíhá, na rozdíl od fotosyntézy, ve všech živých buňkách rostliny a je proto spojena téměř se všemi ostatními fyziologickými procesy. I přes tuto složitost lze rozdělit návaznosti respirace na jiné procesy do tří hlavních skupin:

- *podpora růstových procesů* (energie a materiál pro tvorby nových struktur),
- *podpora procesů údržby* již vytvořených struktur, zejména obměna proteinů, udržování potenciálového gradientu na membránách,
- *podpora procesů spojených s příjmem živin a s transportem látek* v rostlině.

Zabezpečení růstu (růst je zde míněn jako syntéza a hromadění nové biomasy), a to energií i jednoduchými organickými sloučeninami, je prvořadou úlohou respirace v rostlinách. Je proto pochopitelné, že existuje přímá závislost mezi rychlostí růstu a rychlostí respirace. Vyšší rostliny však nerostou rovnoměrně ve všech svých částech a vztah mezi rychlostí růstu a respirace je vázán vždy jen na příslušnou část rostliny.

Biochemické procesy spojené s tvorbou stavebních složek nově vytvářené biomasy jsou vcelku dobře prozkoumané. Pokud známe chemické složení nově vytvářené biomasy, můžeme vypočítat materiálové a energetické náklady na její tvorbu. Velmi užitečný je též **koeficient energetické účinnosti syntetických procesů (Y)**:

$$Y = \frac{\text{energie v nově vytvořené sloučenině}}{\text{energie ve spotřebovaných substrátech}}$$

Množství jednotlivých složek biomasy rostlin, které se vytvoří heterotrofními procesy z jednoho gramu glukózy a koeficient účinnosti jejich syntézy (Y):

Složka	Vytvořené množství (g)	Y
oligo + polysacharidy	0,85	0,93
proteiny	0,67	0,78
lipidy	0,36	0,88
lignin	0,48	0,80

Jestliže známe chemické složení nově vznikající biomasy, můžeme z uvedených dílčích nákladů a účinnosti vypočítat **celkovou účinnost** syntetických procesů. Například v sušině nových listů bývá průměrně 70% sacharidů, 15% proteinů, 5% lipidů, 5% ligninu. Celková účinnost syntetických procesů by pak měla být asi 0,85. *To je ovšem hodnota teoretického maxima účinnosti, které prakticky nelze dosáhnout.* Biochemické syntézy z řady důvodů neprobíhají jen po energeticky nejvýhodnějších cestách, a kromě toho vyžadují některé další nepřímé náklady (např. na transport výchozích substrátů a konečných produktů). *Skutečná účinnost se proto pohybuje nejčastěji v rozmezí od 0,50 do 0,75.*

V každé buňce, a to i u nerostoucích orgánů, probíhají energeticky náročné **udržovací procesy**, jejichž rychlost musíme vzít také v úvahu. Respirace spojená s údržbou buněčných struktur a funkcí bývá někdy vyčleňována do zvláštní kategorie ("**udržovací respirace**"). Nejde samozřejmě o jiný typ biochemických procesů, ale pouze o jistou část z celkové respirační aktivity, která souvisí s údržbou. Stanovit velikost této složky respirace je metodicky velmi obtížné, přesto se však intenzívně hledají vhodné postupy (např. stanovením respirace u nerostoucích orgánů či měřením respirace testovaných rostlin za různé rychlosti růstu s následnou extrapolací zjištěné závislosti pro nulovou rychlost růstu). Zdá se totiž, že právě ve velikosti udržovací složky respirace mohou být značné rozdíly mezi druhy a odrůdami, což může významně určovat jejich potenciální produkční schopnosti. Možnost využít rozdílu v "**udržovací respiraci**" jako kritéria při šlechtění se proto jeví jako velmi perspektivní. Průměrné denní ztráty biomasy způsobené udržovací složkou respirace bývají nejčastěji okolo dvou procent z celkové hmotnosti rostliny.

Velmi obtížný je též odhad nákladů na údržbu jednotlivých struktur a funkcí v rostlině. K nejvíce energeticky náročným procesům patří **obměna proteinů**. Průměrná životnost molekul proteinů zapojených do metabolických procesů se odhaduje přibližně na 10 dní. Náklady na jejich obměnu se odhadují zhruba na 10 mg glukózy na gram suché hmotnosti rostliny za den. Obdobné množství substrátu se zřejmě spotřebuje při udržování potenciálových gradientů na membránách.

Stejně tak těžko se stanovuje množství respirací uvolněné energie nutné na **příjem nezbytných iontů solí** (minerálních živin) kořeny. Tyto potíže vyplývají z rozmanitosti mechanismů příjmu solí, neboť tentýž iont může být někdy přijímán pasivně a jindy aktivně. Hojně přijímaný nitrátový iont může být někdy téměř současně s příjmem v kořenech redukován, jindy probíhá redukce až v listech, kde může být využita energie z primárních procesů fotosyntézy. Nové výsledky ukazují, že náklady na příjem a prvotní asimilaci minerálních živin budou vyšší, než se dosud odhadovalo. U rychle rostoucích druhů mohou vyžadovat asi 10 % veškeré energie uvolněné respiračními procesy v celé rostlině, u pomalu rostoucích druhů (zvláště pak za nedostatku živin v půdě) to může být i více než 20 %.

Účinnost a metody měření respiračních procesů

K rozkladným respiračním procesům mohou být využívány různé druhy substrátů a také ne vždy je rozklad úplný, tedy až na CO₂ a H₂O. Přesto je však užitečné vědět, jaké **maximální množství energie** se může při respiraci uvolnit.

Při úplné oxidaci jedné molekuly glukózy může vzniknout celkem až 32 molekul ATP (2 v glykolýze a zbývajících 30 pak z mitochondriálních procesů):

GLYKOLÝZA	CITRÁTOVÝ CYKLUS	MEMBRÁNOVÉ PROCESY	CĚLKEM
2 ATP			2
2 NADH		5 ATP	5
	2 ATP		2
	8 NADH	20 ATP	20
	2 FADH ₂	3 ATP	3

Maximální účinnost (efektivitu) respirace zjistíme z podílu mezi získanou energií (standardní volná energie 32 molekul ATP je přibližně 1,6 MJ) a volnou energií rozkládaného substrátu (jedné molekuly glukózy, asi 2,8 MJ), což je tedy **zhruba 0,57**. Zbývajících 43% chemické energie obsažené v glukóze se z rostliny ztrácí přeměnou na teplo.

V reálných podmínkách však tak vysoké účinnosti energetické přeměny glukózy sotva lze dosáhnout. Zejména proto, že v rostlinné buňce probíhají současně i méně energeticky účinné respirační cesty, které výslednou účinnost nutně snižují. Jednak je to malátová varianta glykolýzy, která je u rostlin mnohem častější než pyruvátová. Dále přistupuje velmi málo účinná alternativní cesta přenosu elektronů v mitochondriích.

V cytosolu mohou ještě navíc probíhat v jisté míře další oxidační procesy, o jejichž existenci se můžeme poměrně snadno přesvědčit. Po zablokování cytochromové cesty (kyanidem) i alternativní cesty (kyselinou salicylhydroxamovou, SHAM) je stále ještě jistá respirační aktivita měřitelná. Původně byla souhrnně označována jako **reziduální respirace**, o jejíž biochemické podstatě a lokalizaci se dosud mnoho nevědělo. Bylo však známo, že probíhá pouze mimo mitochondrie a není spojena s tvorbou ATP. Nyní již víme, že se jedná převážně o takzvané **peroxidázové dýchání**. Nejde však o nějakou samostatnou respirační cestu, ale pouze o oxidaci NADH ($1 \text{ O}_2 / 2 \text{ NADH}$) katalyzovanou peroxidázami. Může mít však značný podíl (až 20 %) na celkových oxidačních procesech v buňkách.

Energetickou účinnost respiračních procesů v živé rostlině můžeme v současné době studovat pomocí moderních fyzikálních metod. Převratnou událostí bylo zejména zavedení spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), která ve spojení s aplikací značeného fosforu (^{31}P) umožňuje měřit *rychlost tvorby či rozkladu ATP in vivo*. Pokud současně měříme spotřebu kyslíku, můžeme vypočítat, kolik molekul ATP vzniklo na jednu přijatou molekulu kyslíku. Při neefektivnější cytochromové cestě ve spojení s glykolýzou je tento poměr 6 ATP/ O_2 (častěji se vyjadřuje jako ATP/O = 3). U alternativní cesty je ATP/O = 1, a u peroxidázového dýchání ATP/O = 0.

Měření rychlosti respirace se nejčastěji provádí klasickými metodami, a sice buď *stanovením spotřeby kyslíku, nebo výdeje CO_2* . Již vzácněji se používá měření *výdeje tepla* pomocí speciálních kalorimetrů. Výdej CO_2 stanovujeme gazometrickými metodami, a to buď průtokovými (ze změny koncentrace CO_2 ve vzduchu po průchodu okolo uzavřené rostliny či orgánu, tedy stejně jako při měření fotosyntézy), nebo metodami neprůtokovými. Při nich vyloučený CO_2 jímáme do vhodného roztoku hydroxidu a poté jej kvantitativně stanovíme titračně. Existuje ovšem řada dokonalejších metod, při kterých měříme změnu objemu či tlaku vzduchu způsobenou respiračním příjmem O_2 a absorbcí vyloučeného CO_2 v uzavřeném systému (*volumetrické a manometrické metody*, např. klasický Warburgův přístroj). Velmi rozšířené je stanovení rychlosti respirace ze spotřeby kyslíku *polarografickou metodou (Clarkovo čidlo)*, a to obvykle při ponoření měřeného orgánu do vhodného roztoku. Práce v roztocích umožňuje snadnou aplikaci specifických inhibitorů jednotlivých respiračních cest, stanovení podílu těchto cest na celkové rychlosti respirace, a tedy i odhad celkové energetické účinnosti oxidačních procesů.

Uvedené metody můžeme s výhodou kombinovat. Zejména je užitečné měřit současně výdej CO_2 a spotřebu kyslíku, a z toho pak vypočítat **respirační kvocient (RQ)**:

$$\text{RQ} = \frac{\text{vyloučený } \text{CO}_2 \text{ (mol kg}^{-1}\text{)}}{\text{přijatý } \text{O}_2 \text{ (mol kg}^{-1}\text{)}}$$

Pokud prodýchávaný substrát pochází ze sacharidů (což je nejčastější případ), pak RQ = 1. Při oxidaci vysoce redukovaných sloučenin je hodnota RQ nižší (pro většinu lipidů je RQ přibližně 0,7, u proteinů 0,8). Naopak, pro více oxidované sloučeniny může být i vyšší než jedna (např. pro kyselinu citronovou jako substrát je RQ = 1,33).

2.5 Asimilace minerálních živin

Asimilace dusíku

Z prvků, které označujeme jako *minerální živiny*, stojí na prvním místě významnosti pro všechny rostliny dusík. Je nepostradatelnou součástí bílkovin a řady dalších stavebních součástí rostlin, avšak jeho příjem a metabolické přeměny jsou dosti komplikovanou záležitostí. Hlavním zdrojem dusíku jsou jeho sloučeniny v půdním roztoku, převážně ve značně oxidované formě a před inkorporací do organických molekul spotřebuje rostlina hodně energie na jejich redukci. Živočichové nejsou schopni zpracovávat minerální formy dusíku, a proto i z tohoto hlediska jsou zcela odkázáni na procesy v rostlinách. Kromě rozpustných dusíkatých sloučenin v půdě jsou některé druhy rostlin schopné využívat i plynný elementární dusík.

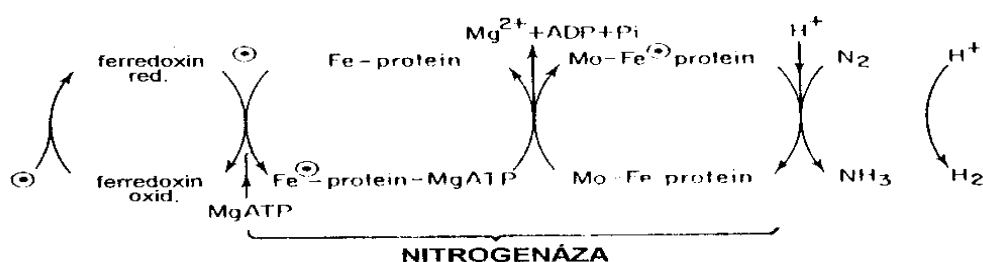
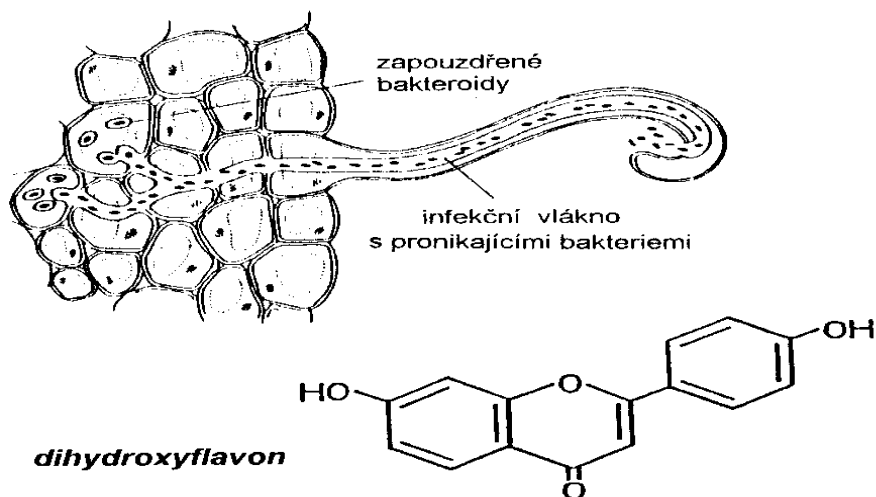
Fixace molekulového (plynného) dusíku

Molekulový dusík rostliny nedovedou využívat k asimilaci (fixaci) do organických sloučenin samostatně, ale pouze ve spolupráci s některými prokaryotními organismy. Nejvýznamnější jsou bakterie, které fixují dusík při pevném symbiotickém spojení s kořeny některých druhů vyšších rostlin. Jde především o bakterie dříve zahrnované do rodu *Rhizobium* (je nyní rozčleněn do řady samostatných rodů). Symbiotické fixace dusíku jsou schopny i některé aktinomycety (*Frankia* spp.) a sinice (*Anabaena*, *Nostoc*). K hostitelským rostlinám patří většina druhů čeledi *Fabaceae*, dále pak některé stromy a keře z celkem přibližně 23 rodů (např. *Alnus*, *Myrica* a *Hippophae*).

Podívejme se trochu blíže na průběh nejčastější a také nejdůležitější symbiotické fixace dusíku bakteriemi z okruhu bývalého rodu *Rhizobium*. Těchto bakterií známe celou řadu druhů a často se vyznačují specifickou afinitou jen k určitým druhům hostitelských rostlin. Vyskytují se běžně v půdě jako saprofytní organismy bez fixační aktivity. Při kontaktu s kořenem vhodné hostitelské rostliny pronikají po enzymatickém narušení buněčné stěny do buněk epidermis (obvykle do kořenového vlásku), a pak dále až do vnitřních vrstev kůry. Tam stimulují expresi řady specifických genů v buňkách korového parenchymu kořene (viz rámeček na následující straně), což vede k množení buněk v infikované části kořene. Výsledkem obnovené dělivé aktivity je vznik kořenových hlízek o velikosti asi 2 až 4 mm.

Bakterie se usazují v cytoplazmě vnitřních (obvykle tetraploidních) buněk hlízek. Usazené (nedělivé) a poněkud zvětšené bakterie nazýváme *bakteroidy*. Jednotlivé bakteroidy, někdy ale i skupiny několika bakteroidů jsou obaleny *peribakteroidní membránou*, která vzniká invaginací plazmatické membrány hostitelské buňky a vytváří útvar označovaný jako *symbiosom*. V cytosolu buněk s bakteroidy se vytváří zvláštní protein (*leghemoglobin*) červené barvy, který reguluje hospodaření s kyslíkem. Ten je sice potřeba dodávat ve velkém množství k respiračním centrům v obvodové membráně fixujících bakteroidů, ovšem velmi selektivně, neboť ve vnitřním prostoru, kde probíhá vlastní fixace dusíku, musí být udržována koncentrace kyslíku na velmi nízké úrovni. Klíčový enzym fixace, *nitrogenáza*, je totiž vyšší koncentrací kyslíku nevratně ničen. Na druhé straně terminální oxidáza v bakteriálním dýchacím řetězci má ke kyslíku mimořádně vysokou afinitu.

Je nutné zdůraznit, že proces vzniku symbiotického vztahu (migrace bakterií v půdě ke vhodným kořenům, tvorba hlízek a usazení bakterií v buňkách), probíhá za složité interakce hostitelské rostliny s bakteriemi, podložené specifickými *komplexy desítek genů u obou partnerských organismů*. Proto je omezen jen na rostliny z poměrně malého okruhu u taxonomických skupin. Detailní popis celého procesu symbiotické fixace dusíku je však již mimo rámec tohoto učebního textu.

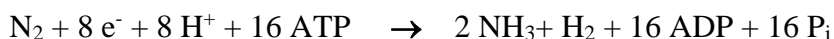


Pronikání bakterií rodu *Rhizobium* do kořenů hostitelské rostliny, struktura jedné ze sloučenin vylučovaných z kořenů vojtěšky (vábících bakterie), a schéma redukce dusíku.

PRŮBĚH VZNIKU SYMBIOTICKÉ VAZBY:

1. vylučování druhově specifických **flavonoidních látek** z kořenů hostitelské rostliny,
2. **specifické reakce vyvolané flavonoidy u vhodného druhu bakterií:**
 - chemotaxe (chemicky vyvolaný pohyb směrem ke kořenům),
 - indukce exprese skupiny **nod-genů**, což vede ke tvorbě specifických oligosacharidů typu lipochitinů, označovaných jako **nod-faktory**
3. **specifické reakce pod vlivem nod-faktorů v hostitelské rostlině:**
 - tvorba **lectinů** (= proteiny s vazebnými místy pro sacharidy) na povrchu kořenových vlásků - usnadňují vazbu a průnik bakterií do kořene,
 - tvorba specifických proteinů **nodulinů** v kořenech (jsou nutné pro tvorbu hlízek a zabezpečení fixačního procesu),
4. průnik bakterií do buněk kůry infekčním vláknem, růst hlízek,
5. tvorba **bakteroidů** (= zapouzdřených bakterií) a **leghemoglobinu** v hostitelských buňkách,
6. vlastní fixace N₂

Redukce molekulového dusíku probíhá v bakterioidech, které jsou hostitelskou rostlinou zásobovány sacharidy. Redukce dusíku na amoniak je energeticky mnohem náročnější, než např. redukce CO₂. Na každou molekulu N₂ je zapotřebí dodat minimálně 8 elektronů (z toho 6 na tvorbu NH₃ a 2 na současně probíhající tvorbu H₂), a dále energii z 16 molekul ATP. Souhrnně lze celou reakci vyjádřit:



Celý proces je katalyzován **nitrogenázou**, což je enzymový komplex složený ze dvou částí označovaných jako Fe-protein a Mo-Fe-protein. Ty se ještě dělí na několik podjednotek

s redoxními skupinami typu Fe-S. Nitrogenáza je přiváděna do aktivního, redukováného stavu pomocí elektronů přenášených k ní z jiných metabolických procesů. Posledním donorem elektronů bývá obvykle ferredoxin nebo flavodoxin. Při přenosu elektronů v nitrogenáze je nutný i hořčík navázaný na ATP.

Amonné ionty transportované z bakteroidů jsou přímo v cytoplasmě hostitelských buněk zabudovány do organických sloučenin (nejčastěji glutamin, glutamát a asparagin) a ty jsou pak vedeny xylémem do nadzemních částí rostliny. V listech jsou převážně použity k syntéze dalších aminokyselin. Část z těchto produktů je transportována zpět do kořenů.

Mezi fixační aktivitou jednotlivých druhů a kmenů symbiotických bakterií mohou být značné rozdíly. Proto se věnuje v současné době mimořádně velká pozornost nalezení těch nejefektivnějších mikroorganismů (selekcí, genovými manipulacemi). Nemenší úsilí se také věnuje nalezení nejvhodnějších hostitelských rostlin. Existují totiž velké genotypové rozdíly v počtu vytvářených hlízek na jednotku kořenů a rostlina také do značné míry může řídit rychlost fixace N₂ v hlízkách. Tato rychlost se podstatně mění v průběhu ontogeneze. Nejvyšší je vždy v období tvorby semen.

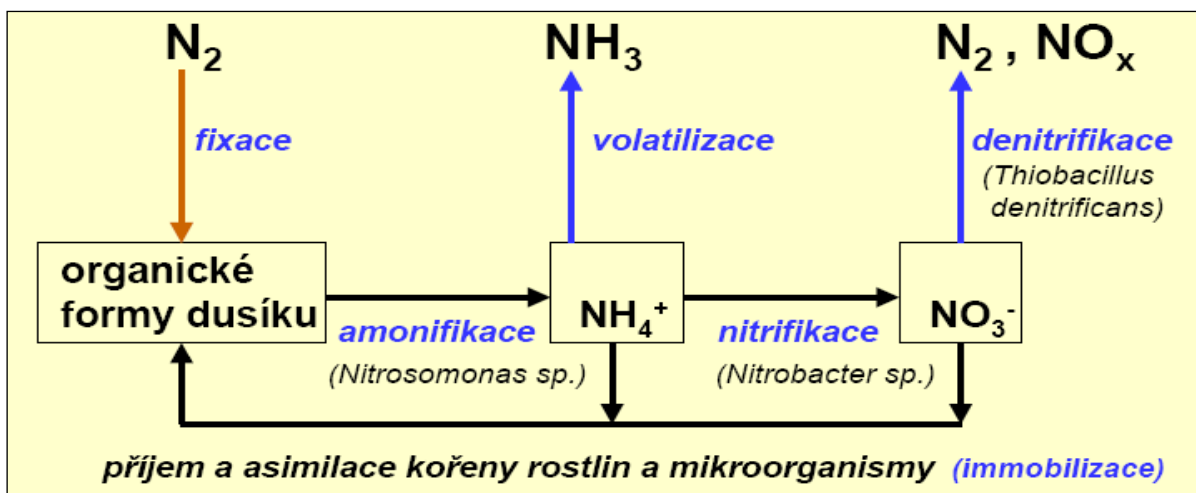
Množství symbioticky fixovaného dusíku se snižuje při vyšším obsahu anorganických forem dusíku v půdě. Je to vcelku pochopitelné, neboť příjem nitrátových či amonných iontů z půdy je pro rostliny méně energeticky náročný než fixace N₂. Naopak, zvýšený obsah fosforu v půdě působí na rozvoj symbiotické fixace stimulačně. Roční úhrnné množství fixovaného dusíku za optimálních podmínek může dosahovat až 400 kg čistého N na hektar, což se zcela vyrovná dávkám dusíku dodávaných do půdy formou umělých hnojiv při pěstování těch plodin, které symbiotickou fixaci nemají. Jinými slovy, symbiotická fixace je schopna plně saturovat dusíkem hostitelské rostliny, což je v *přírodních ekosystémech* výhodné při kolonizaci území s extrémně malým obsahem dusíku v půdě.

Měření rychlosti fixace dusíku se obvykle provádí ze stanovení aktivity *nitrogenázy*, kdy využíváme její schopnosti redukovat i jiné sloučeniny, než je dusík (stanovení malých změn koncentrace dusíku ve vzduchu je totiž velmi obtížné). Nejčastěji používáme acetylen, přidávaný ke vzorkům kořenů či půdy v uzavřené nádobce. Vznikající etylen lze vysoce citlivě měřit pomocí plynové chromatografie.

Asimilace nitrátů a amonných iontů

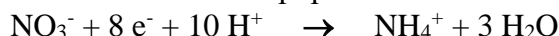
Schopnost symbiotické fixace dusíku je vyhrazena poměrně malé skupině rostlin. Všechny ostatní jsou odkázány na příjem dusíkatých sloučenin z půdy. Nejčastěji se jedná o nitráty, nitrity a amonné ionty, které v půdě vznikají z půdní organické hmoty činností mikroorganismů (= *mineralizace dusíku*). Při rozkladu organických látek vznikají nejprve amonné ionty (***amonifikace***). Ty se dále mohou oxidovat na nitrity (bakteriemi rodu *Nitrosomonas*) a dále na nitráty (*Nitrobacter*) v procesech souhrnně označovaných jako ***nitrifikace***. Při nedostatku kyslíku v půdě může docházet k mikrobiálnímu rozkladu dusičnanů na molekulový dusík či na plynné oxidy dusíku (***denitrifikace***) a tím i ke ztrátám dusíku z půdy.

Je to tedy především dynamika půdní mikroflóry, která rozhoduje o množství a typu sloučenin dusíku v půdě. Činnost mikrobů je ovšem řízena podmínkami prostředí. Tak například za nízké teploty a nízkého pH půdy je značně zpomalena nitrifikace (tvorba nitrátů) a hromadí se pouze amonné ionty, neboť amonifikační mikroflóra je mnohem odolnější k nepříznivým vlivům. Většinou však mají rostliny k dispozici současně různé přijatelné formy anorganických sloučenin dusíku.



Přehled hlavních typů procesů spojených s koloběhem dusíkatých sloučenin v přírodě

Nitrátové ionty přijaté z půdy nemůže rostlina zabudovat do organických látek svého těla přímo, ale až po redukcí na ionty amonné. K této redukcí může docházet u některých druhů přímo v kořenech, u jiných až v listech. Kde redukcí probíhá lze zjistit jednak analýzou xylémové šťávy, jednak stanovením aktivity enzymu *nitrátoreduktázy* v příslušných orgánech. Avšak také u druhů, které obvykle redukcí veškeré nitráty v kořenech, může někdy docházet k jejich transportu do listů, a to v těch případech, kdy aktivita nitrátoreduktázy v kořenech je buď snížena (např. nízkou teplotou), nebo je nedostatečná vzhledem ke zvýšenému příjmu nitrátů. Redukci nitrátů lze popsat souhrnnou rovnicí:



Již z prvního pohledu na tuto rovnici je zřejmé, že jde o velmi náročnou redukcí (oxidační číslo dusíku se mění z +5 na -3 !). Také je užitečné si všimnout, že se spotřebovává více vodíkových iontů než elektronů. Úbytek vodíkových iontů v cytosolu vede k jeho alkalizaci. Pro zachování optimálního pH v buňkách jsou tedy nezbytné jisté kompenzační mechanismy. U kořenů obvykle dochází ke sníženému výdeji H^+ do půdního roztoku a naopak ke zvýšenému vylučování OH^- a aniontů organických kyselin (pH půdy v okolí kořenů se tedy zvyšuje!). Redukce nitrátů v listech je provázána také zvýšenou tvorbou organických kyselin (zvláště kyseliny jablečné ze sacharidů přes fosfoenolpyruvát a kyselinu oxaloctovou). K těmto reakcím dochází vcelku samovolně, neboť aktivitu PEP-karboxylázy stimuluje zvýšené pH. Celý reakční systém bývá označován jako *biochemický pH-stat*.

Při bližším pohledu na redukcí nitrátů v rostlinách zjistíme, že jde vlastně o dvě navazující reakce. Tou první je redukcí nitrátu na nitrit, v dalším pak jeho redukcí na amonný iont:

1. krok - redukcí nitrátu na nitrit (dusitan) (v cytosolu):



- donor elektronů : NADH

- enzym: *nitrátoreduktáza* (redox. skupiny: FAD, hem, Mo- komplex)

2. krok - redukcí dusitanu na amonný iont (v plastidech):



- donor elektronů : feredoxin

- enzym: *nitritoreduktáza* (redox. skupiny: Fe-S, hem)

Nitrátreduktáza je klíčovým enzymem při asimilaci nitrátů v rostlinách, neboť nejvíce rozhoduje o její celkové rychlosti. V každé buňce se vyskytuje v několika formách (s odlišně kódovanými proteiny), ovšem s velmi podobnou základní strukturou i funkcí. Jedná se o komplex složený ze dvou totožných podjednotek (*homodimer*). Každá z nich obsahuje tři funkční skupiny: *FAD*, *hem* a *molybdenový komplex*.

Množství nitrátreduktázy v rostlinách silně kolísá v závislosti na genotypu i na celé řadě faktorů prostředí. Především existují velké rozdíly v *potenciálních* (maximálně dosažitelných) hodnotách aktivity nitrátreduktázy. Některé ruderalní druhy (např. kopřiva, *Urtica dioica*) mohou dosahovat hodnot až stonásobně vyšších než některé vřesovištní rostliny (např. borůvka, *Vaccinium myrtillus*), které jsou adaptovány k růstu na substrátech velmi chudých na nitrátovou formu minerálního dusíku. Tyto druhy pak nejsou schopny výrazněji zrychlit a využívat nitráty ani při jejich dodání do substrátu ve větším množství.

Ale i u těže rostliny či listu se *aktuální hodnoty* aktivity nitrátreduktázy mohou rychle měnit i v průběhu dne. Vzhledem k velmi krátké životnosti tohoto enzymu (poločas rozpadu je jen několik hodin), v buňkách současně probíhá jak syntéza, tak i rozklad (proteolytickými enzymy). Rychlost syntézy a tudíž i dosažitelná aktivita nitrátreduktázy je v přímé závislosti na množství nitrátů v buňce. Jedná se tedy o typický případ **indukce enzymatické aktivity substrátem**, která je jinak u vyšších rostlin velmi vzácná (na rozdíl od bakterií, kde je běžná). Aktivita tohoto enzymu je také stimulována světlem - jednak díky vyšší produkci reduktantů (může být využíván jak NADH, tak i NADPH, v závislosti na dané formě enzymu), ale pravděpodobně i jinými, na světle závislými mechanismy (na základě informací zprostředkovaných fytochromovým systémem, jak bude blíže vysvětleno ve třetí části tohoto textu). Stimulace světlem je ale podmíněna přítomností nitrátů v buňce, pouze tedy umocňuje účinek substrátové indukce. Nicméně v nočních hodinách je asimilace nitrátů v nadzemních částech rostlin vždy velmi zpomalena, a tudíž dochází k jejich hromadění.

Amonné ionty, ať už vytvořené popsanou redukcí nitrátů či přímo přijaté kořeny z půdy, působí nepříznivě na buněčný metabolismus (zejména inhibují membránové procesy včetně tvorby ATP) a proto jejich rychlá vazba do dalších sloučenin (u příjmu z půdy přímo v kořenech) je životně důležitá. V buňkách listů se navíc uvolňuje velké množství amonných iontů v průběhu glykolátového (fotorespiračního) cyklu, které je také nutno opět vázat do organických dusíkatých látek.

První reakcí asimilace amonných iontů je obvykle tvorba **glutaminu** (amidovou vazbou na glutamát) za účasti enzymu *glutaminsyntetázy* (označované zkratkou GS). Tato reakce probíhá v cytosolu za spotřeby jedné molekuly ATP. Za dostatku amonných iontů v buňkách glutamin reaguje s 2-oxoglutarátem (který je produkován v mitochondriálním citrátovém cyklu) za vzniku glutamátu (viz schéma v rámečku). Tato reakce katalyzovaná *glutamátsyntázou* (GOGAT) probíhá v plastidech a vyžaduje dodání redukčního činidla, kterým v chloroplastech listových buněk bývá redukován feredoxin (produkován především v primárních procesech fotosyntézy), v buňkách kořenů pak NADH. Část takto produkovaného glutamátu je využita opět jako akceptor amonných iontů pro další cyklus jejich asimilace.

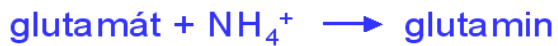
Značné množství glutamátu je ovšem využíváno pro tvorbu *jiných dusíkatých látek*, v první řadě různých aminokyselin (aminoskupina glutamátu může být snadno přenášena transaminací na různé organické kyseliny) a z nich pak se syntetizují hlavně bílkoviny. Bohaté na dusík jsou nukleové kyseliny i mnoha sekundárních metabolitů a zásobních látek. Velmi významnou dusíkatou látkou je také *glutathion*, jehož stálá zásoba v chloroplastech slouží jednak jako antioxidant, ale i jako substrát pro syntézu řady jiných dusíkatých sloučenin. Cesty syntéz těchto dusíkatých sloučenin v rostlinách jsou již problematikou čistě biochemickou.

Asimilace amonných iontů

Nejčastější cesta:



Za velmi nízkých koncentrací NH_4^+ :



Za velmi vysokých koncentrací NH_4^+ :



Velmi zjednodušené schéma tří různých cest asimilace amonných iontů.

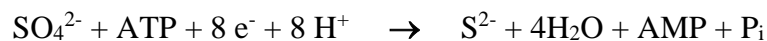
Z fyziologického hlediska je velmi zajímavé sledovat změny v obsahu dusíkatých látek v různých orgánech během růstu. Mladé klíčící rostliny získávají veškerý dusík ze zásobních bílkovin uložených v semeni (*proteinová tělíska*). Velmi rychle po začátku klíčení jsou zásobní proteiny hydrolyzovány na aminokyseliny a amidy, ze kterých jsou opět syntetizovány nové druhy proteinů a dalších látek.

Celý další růst a vývoj rostliny je provázen maximální úsporností v hospodaření s organicky vázaným dusíkem. Zvláště dramatické změny nastávají při stárnutí orgánů a při tvorbě semen či plodů. Funkce rostliny za těchto situací směřují k *translokaci dusíku* do místa největší potřeby z ostatních svých částí. Protože nejvíce dusíku je vázáno v bílkovinách, dochází v prvé řadě k jejich rozkladu. Ze stárnoucího listu, dříve než uschne, může být odváděno do mladých či zásobních orgánů až 85 % veškerého dusíku.

Při tvorbě semen a plodů u rostlin nedostatečně zásobených dusíkem je měřitelný pokles rychlosti fotosyntézy listů. Tento na první pohled paradoxní jev se dá vysvětlit právě přednostním zásobením reprodukčních orgánů dusíkatými látkami na úkor listů (tedy i z části karboxylačních enzymů po jejich rozkladu), a to i za cenu snížené rychlosti tvorby asimilátů.

Asimilace síranů a fosforečnanů

Síra je nejčastěji přijímána z půdy v podobě síranů a jejich asimilace v rostlině má některé podobnosti s asimilací nitrátů. Je to také energeticky velmi náročný proces, který souhrnně můžeme vyjádřit takto:



K redukci síranů obvykle dochází v *chloroplastech listů*, v omezené míře může probíhat i v kořenech (v proplastidech). Síranový iont se nejprve váže na ATP za vzniku adenosin-5-fosfosulfátu (APS) a jedné molekuly pyrofosfátu. Ta se však záhy rozpadá na dva fosfátové ionty. Teprve pak dochází k vlastní redukci přenosem elektronů - u listů je donorem feredoxin. Je zapotřebí celkem osmi elektronů, neboť oxidační číslo síry se mění z +6 na -2. *Produktem redukce je siričkový iont, který je ale hned vestavěn do aminokyseliny cysteinu.*

Rostliny jsou schopny využívat anorganické zdroje síry i ve formě plyných sloučenin (především oxidu siřičitého, pokud nedosahuje toxicky zvýšené koncentrace). Molekuly SO_2 po vstupu průduchy do listu reagují s vodou za vzniku siřičitanových iontů, které jsou v chloroplastech redukovány obdobným způsobem, jak bylo uvedeno u síranů.

Naprostá většina asimilované síry je použita ke tvorbě aminokyselin *cysteinu* a *methioninu*, které jsou pravidelnou součástí bílkovin i některých oligopeptidů. Síra je součástí řady redoxních sloučenin i mnoha sekundárních metabolitů, zejména silic.

Asimilace fosforu rostlinami je poměrně jednoduchá, protože fosfor, na rozdíl od dusíku a síry, zůstává téměř stále v plně oxidovaném stavu. Z půdy je přijímán jako dihydrogenfosfátový iont (H_2PO_4^-), pouze ve výjimečných případech (za vysokého pH) jako HPO_4^{2-} . Koncentrace těchto iontů v půdním roztoku jsou vždy extrémně nízké (0,5 až 2 μM), a proto příjem obvykle vyžaduje metabolickou energii.

Po vstupu do cytoplazmy kořenových buněk jsou fosfátové ionty rychle esterifikovány do ATP. Část z nich je pak ještě v kořenech využita na syntézu fosfolipidů, DNA a RNA, část se ukládá jako zásoba do vakuol. V cytosolu se stabilně udržuje jen velmi nízká koncentrace.

Z kořenů může být fosfor transportován do nadzemních orgánů, a to jak ve formě volných fosfátových iontů, tak i vázaný v ATP. U většiny rostlin jsou však na delší vzdálenosti transportovány přednostně anorganické formy fosforu, zatímco uvnitř buněk (např. mezi organelami) převládá výměna ATP a ADP. Při stárnutí listů je asi 60 % z jejich celkového obsahu fosforu odvedeno lýkem do jiných orgánů.

Vzhledem k nízké koncentraci fosforu v cytoplazmě je doba jeho obratu v metabolických procesech velmi krátká (jen asi 5 minut). Daleko nejvíce fosfátových iontů cykluje při fotosyntéze a při všech dalších syntézách složitějších sacharidů, zbytek pak při syntéze a obměnách fosfolipidů, RNA a DNA.

Kontrolní otázky ke 2. části učebního textu Fyziologie rostlin

1. Jaké jsou hlavní typy proteinových komplexů v thylakoidních membránách chloroplastů ?
2. Z jakých hlavních částí je složen fotosystém II v thylakoidech?
3. Jaké jsou hlavní *funkční* rozdíly mezi chlorofyly a karotenoidy?
4. Jakým mechanismem je zajištěna jednosměrnost přenosu excitační energie z antén do reakčního centra fotosystémů?
5. Jaké dílčí fotochemické reakce vedou k hromadění vodíkových iontů v lumen thylakoidu?
6. Jakým způsobem může cytochromový komplex přispívat k vyšší energetické účinnosti primárních (fotochemických) procesů fotosyntézy?
7. Jaké odlišné typy redukčních procesů mohou probíhat v chloroplastech s využitím redukované formy ferredoxinu?
8. Popiš průběh cyklického transportu elektronů v thylakoidních membránách. K tvorbě jakých primárních metabolitů vede?
9. Co rozumíme pod pojmem "nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu" a čím je způsobeno?
10. Jaké jsou tři hlavní fáze fotosyntetického cyklu redukce uhlíku (Calvinův cyklus)?
12. Jaké faktory podmiňují aktivaci katalytické funkce enzymu Rubisco?
13. Popiš návaznost reakcí v glykolátovém cyklu (fotorespiraci).
14. Popiš návaznost reakcí ve fixační cestě C4. Jaké výhody tato cesta rostlinám přináší?
15. Popiš návaznost reakcí ve fixační cestě CAM.
16. Jaké biochemické zvláštnosti rostlin s fixační cestou CAM podmiňují jejich schopnost otvírat průduchy v nočních hodinách?

18. V jakých jednotkách nejčastěji vyjadřujeme množství fotosynteticky aktivního záření dopadajícího na rostliny?
19. Která část "světelné křivky" rychlosti fixace CO₂ je nejvíce ovlivněna účinností fotochemických procesů?
20. Jaké energeticky bohaté substráty jsou transportovány do mitochondrií rostlinných buněk a v nich pak využívány pro tvorbu ATP?
21. Jaké hlavní multiproteinové komplexy se nacházejí ve vnitřní membráně mitochondrií rostlinných buněk a jakou mají funkci?
22. Jaký význam může mít transport elektronů v mitochondriích alternativní (kvanid-resistentní) cestou pro rostlinné buňky?
23. Jaké maximální množství molekul ATP může vzniknout (fosforylací z ADP) v rostlinné buňce při úplném rozkladu jedné molekuly glukózy na CO₂ a vodu?
24. K jakým hlavním skupinám fyziologických procesů v rostlinách jsou využívány energeticky bohaté sloučeniny (hlavně ATP) produkované v mitochondriích?
25. Jaké hlavní vnitřní a vnější faktory mohou zvyšovat celkovou rychlost respiračních procesů?
26. Jaké typy chemických sloučenin se uplatňují při navazování symbiotických vztahů mezi hostitelskou rostlinou a vhodným typem hlízkových bakterií fixujících plynný dusík?
26. Jaké specifické proteiny či jiné metabolity jsou nutné pro zabezpečení fixační aktivity bakteroidů uvnitř kořenových hlízek?
27. Jaké pedochemické faktory (zejména koncentrace některých minerálních živin) mohou snižovat či zvyšovat symbiotickou fixaci dusíku?
28. Jaké hlavní skupiny půdních mikrobiálních procesů ovlivňují přeměny dusíkatých látek?
29. Ve kterých částech *buňky* (ne celé rostliny!) dochází k redukci nitrátů na amonné ionty?
30. Jaké faktory přispívají k aktivaci enzymu nitrátoreduktázy?
31. Na jakou chemickou látku se nejčastěji navazují amonné ionty při svém prvotním vstupu do organických vazeb?
32. Ve kterých částech buňky dochází k redukci síranů a k zabudování síry do organických vazeb a jaký je první stálý produkt toho procesu?

3. ČÁST – RŮSTOVÉ A VÝVOJOVÉ PROCESY

I velmi dokonalé znalosti fyzikálních a biochemických principů fyziologických procesů (transportních procesů, metabolismu) nejsou ještě dostatečné k tomu, abychom vysvětlili vznik dospělé rostliny z oplozeného vajíčka. Je sice pravda, že tvorba nových buněk je závislá na dostatku „stavebního materiálu“ z biochemických procesů, ale pro život rostliny zdaleka nepostačuje jen hromadění nových buněk. Je nutná i jejich tvarová a funkční specializace, což vyžaduje dokonalé vnitřní řízení a koordinaci. Jen tak mohou vznikat odlišná pletiva i celé orgány, které rostlina potřebuje ke svému životu. Základní informace jak budovat tělo rostliny jsou zapsány v genomu každé buňky, ovšem jejich realizace může být velmi modifikovaná celou řadou vnitřních i vnějších faktorů.

Růst rostlin je velmi široce používaný termín, obvykle označující postupné zvětšování hmotnosti, délky, objemu či počtu buněk, orgánů i celých rostlin. Kvalitativní změny, které provázejí růst zejména při specializaci buněk a pletiv na rozdílné funkce, nazýváme **diferenciace**. Společným působením obou těchto procesů dochází k postupným tvarovým změnám (**morfogenezi**), které provázejí rostlinu po celý její život, tedy v průběhu jejího ontogenetického vývoje. Zastřešujícím termínem **vývoj** pak označujeme celou posloupnost převážně kvalitativních změn, které ovšem jsou těsně spojeny se změnami kvantitativními.

Průběh růstových procesů u většiny rostlin není pevně určen, jak tomu bývá u živočichů. Přesto lze pozorovat i u rostlin jisté **obecné znaky růstu**. K nim patří např. zřetelná orientace nově tvořených struktur podle jisté osy (**axiální charakter růstu**) a opakování některých strukturních jednotek (**modulární charakter růstu**). Zvláště významnou úlohu hraje u rostlin **polarita** buněk i celých orgánů, projevující se nestejnými vlastnostmi protilehlých, zdánlivě stejných struktur. Na buněčné úrovni se jedná zejména o rozdílné funkční vlastnosti protilehlých částí plazmatické membrány, a cytoskeletu.

Růstové procesy můžeme studovat na různé úrovni, od buněčné až po úroveň populační. V následujících kapitolkách této části učebního textu se zaměříme hlavně na procesy spojené s **regulací růstu a vývoje** rostlin v průběhu ontogeneze, počínaje oplozením a tvorbou embrya, přes vegetativní fázi až k přechodu do fertilmního stádia a stárnutí. Seznámíme se s mechanismem působení hlavních **vnitřních** (hormonálních) regulátorů růstu a vývoje, i s modifikujícím vlivem faktorů **vnějšího prostředí**.

3.1 Růst buněk a diferenciace orgánů

Růst závisí v první řadě na zmnožení počtu buněk a na zvětšení jejich rozměrů do konečného stavu. Na rozdíl od živočichů probíhají tyto procesy jen v úzce vymezených zónách zvaných **meristémy**. Již v embryonálním stavu se vyčleňují dva typy primárních meristémů, jeden pro růst kořenů a druhý pro růst nadzemních částí (výhonku, prýtu). Tyto meristémy se udržují aktivní v apikálních částech kořene a výhonku prakticky po celý život rostliny. Kromě toho se u většiny rostlin dodatečně zakládají sekundární meristémy mimo apikální zóny (interkalárně, např. kambium). Meristematické buňky jsou poměrně malé, s velkým jádrem, s tenkou buněčnou stěnou a bez velké centrální vakuoly.

Dělení buněk (**cytokineze**) je prvním růstovým projevem. V dělicích se buňkách dochází k několika nápadným a pravidelně se opakujícím změnám, které označujeme jako fáze buněčného cyklu:

a) **interfáze**, u které lze rozlišit tři časové etapy

G₁ - **presyntetická** (narůstá jádro i cytoplazma),

S - **syntetická** (dochází k replikaci DNA),

G₂ - **postsyntetická** (příprava na mitózu).

b) **mitóza**, která se tradičně člení se na čtyři úseky: **profáze, metafáze, anafáze, telofáze**.

Na rozdělení jádra rychle navazuje tvorba střední lamely, a k ní přiléhající buněčné stěny. Materiál pro stavbu těchto součástí je transportován především ve váčcích z Golgiho komplexu. Orientace střední lamely určuje, zda k rozdělení buněk dojde ve směru kolmém k povrchu orgánu (*antiklinálně*) či ve směru rovnoběžném s nejbližším vnějším povrchem (*periklinálně*), což má pro výsledný tvar rostoucího orgánu zásadní význam. Neméně významné je i řízení růstu primární stěny (směr ukládání mikrofibril celulózy). Na něm závisí větší či menší roztažitelnost jednotlivých úseků buněčné stěny, a tedy i směr, ve kterém se buňka nejvíce prodlužuje. V obou případech jsou hlavními řídicími prvky uvedených syntéz mikrotubuly. Jakým systémem přenosu informací jsou však řízeny vlastní mikrotubuly, není dosud uspokojivě vysvětleno.

Po ukončeném dělení jedna ze dvou dceřiných buněk vstupuje do dalšího cyklu (celý cyklus trvá obvykle 8 až 24 hodin), zatímco druhá obvykle přechází do prodlužovací fáze a více už se nedělí. Někdy však dochází i u těchto buněk k další syntéze a k replikaci DNA, která však není provázána dělením. Tak vznikne místo běžné diploidní buňky buňka tetraploidní. Obvykle mívá i větší rozměry.

Prodlužovací fáze buněčného růstu následuje hned po dělení v blízkosti meristému. U nově vytvořených buněk dochází nejen k podstatnému zvětšení jejich objemu, ale také ke změnám vnitřní stavby (zmnožení organel, vznik centrální vakuoly).

Zvětšování objemu buňky je složitý biofyzikální proces, který je v poslední době intenzivně zkoumán. Ukazuje se totiž, že právě tato růstová fáze je mimořádně citlivá na různé vnější i vnitřní regulace. Dřívější teorie prodlužovacího růstu buněk vycházely z primární úlohy tvorby a včleňování nového stavebního materiálu do buněčné stěny. Příjem vody byl chápán jen jako průvodní jev, zaplňování nových prostor. Podle našich současných znalostí právě příjem vody a vzniklý turgorový tlak má naprosto nezastupitelnou aktivní úlohu při růstu buněk. Bez dostatečně velkého vnitrobuněčného tlaku není zvětšování buňky možné.

Fyzikální mechanismy prodlužovacího růstu buněk mají dva řídicí komplexy:

- řízení velikosti turgorového tlaku,
- řízení roztažnosti buněčné stěny.

Velikost turgorového tlaku závisí v první řadě na hodnotách osmotické složky vodního potenciálu vnitrobuněčného roztoku, a tudíž i na funkci transportních proteinů v plazmatické membráně, které řídí vstup osmoticky aktivních látek do buňky. Je dobré si uvědomit, že při poklesu turgorového tlaku (v důsledku růstu buněčné stěny) dojde i k poklesu vodního potenciálu v buňce. To má za následek zrychlený příjem vody do buňky, spojený se zvýšením turgoru. K udržování turgoru na původní výši je však nutné udržovat i původní hodnotu osmotického tlaku dalším příjmem osmoticky aktivních látek (hlavně iontů solí).

Experimentálně bylo dokázáno, že k *růstu buňky* (zvětšování jejího objemu) dochází až po dosažení jisté prahové hodnoty turgorového tlaku (p_0). Při dalším zvyšování turgoru (p) se úměrně zvyšuje i rychlost růstu buňky (r), která ovšem záleží i na roztažnosti (extenzibilitě) buněčné stěny, což je vyjádřeno koeficientem x :

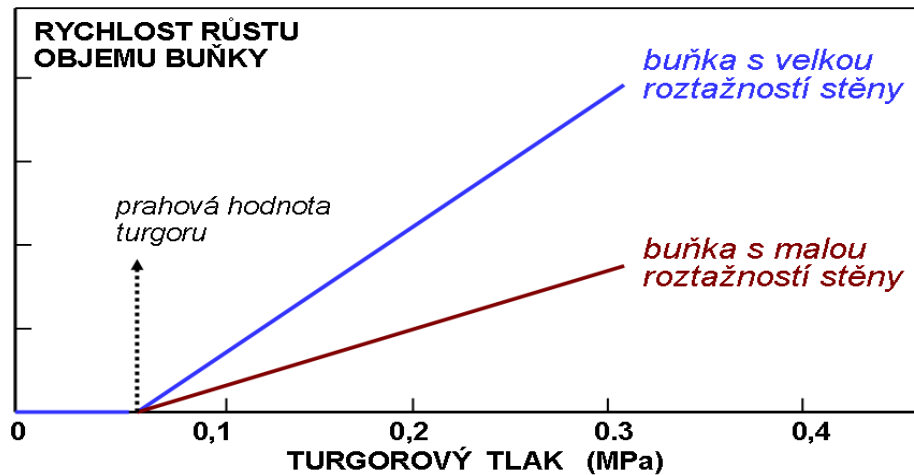
$$r = x (p - p_0)$$

Roztažnost buněčné stěny závisí nejen na orientaci a zřasení mikrofibril celulózy a na četnosti vodíkových můstků mezi nimi, ale i na zastoupení dalších výplňových složek (pektiny, xyloglukany, extensin atd.). Je také známo, že hodnotu roztažitelnosti může rostlina v jistých mezích rychle měnit účinkem specifických látek, *fytohormonů* (především typu auxinů a gibberelinů), jak bude blíže uvedeno v dalších kapitolách.

Dosud nejsou známy všechny mechanismy řídicí dlouhivý růst buněk. Ovšem již z toho, co víme, lze odvodit, že tento *růst se nutně musí zpomalit až zastavit za těchto okolností*:

- při poklesu turgoru pod prahovou úroveň, což může být způsobeno jak nedostatečným zásobením rostliny vodou (špatnou dostupností vody v půdě či velkým výparem), tak i malým obsahem osmoticky aktivních látek v buňkách (neboť ty vznik turgorového tlaku osmotickým příjmem vody podmiňují).
- při snížené roztažnosti buněčné stěny, např. vratným působením zpevňujících bílkovin typu extensinů, či kondenzací fenolických látek typu ligninu (což už je proces nevratný).

Je velmi pravděpodobné, že rostliny mohou také regulovat hodnotu prahové úrovně turgoru (nejspíš pomocí látek hormonálního charakteru), což může ve svých důsledcích vést k rozdílu v citlivosti k nedostatku vody. Tedy při jak velké ztrátě vody (a tudíž i s tím spojeném snížení turgorového tlaku) se již zastaví růst.



Grafické znázornění závislosti rychlosti prodlužovacího růstu buňky na hodnotě turgorového tlaku a na roztažnosti buněčné stěny.

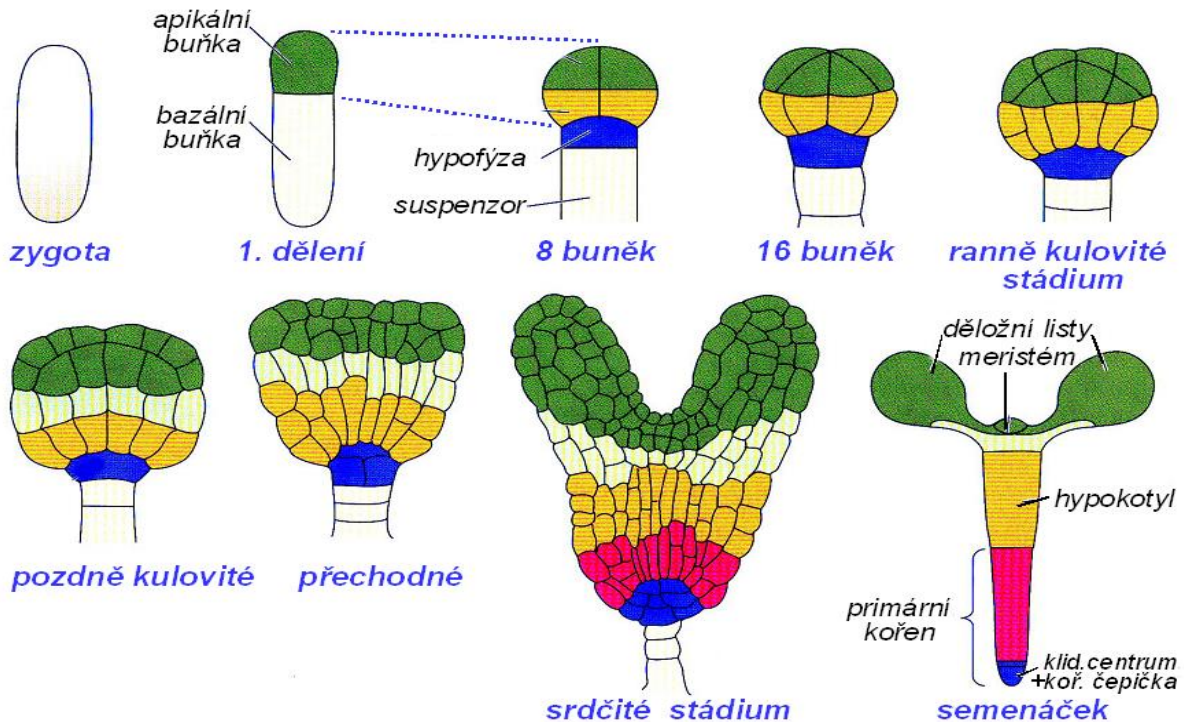
Růst a diferenciacce embrya

Vznik nového jedince pohlavní cestou u rostlin, stejně jako u živočichů, začíná splynutím haploidních jader samičí (vaječné) a samčí (spermatické) pohlavní buňky, ale jisté specifické odlišnosti přece jen existují. Vaječná buňka je uložena u krytosemenných rostlin ve zvláštní struktuře označované jako zárodečný vak, ve které jsou uzavřeny ještě dvě další haploidní jádra. Oplození se účastní současně dvě samčí buňky. Splynutí jádra jedné z nich s jádrem vaječné buňky dává vznik *diploidní zygotě* a z ní pak následně embryu. Splynutím jádra druhé samčí buňky se dvěma jádry zárodečného vaku vede k tvorbě triploidního zásobního pletiva – *endospermu*. Endosperm sice roste v další fázi mnohem rychleji než embryu, ovšem růst embryu je nejen podstatně důležitější, ale i složitější.

Strukturální (anatomické) změny při růstu embryu, znázorněné na následujícím obrázku, jsou již známy dosti dlouho. První příčné dělení protáhlé zygoty je asymetrické, přičemž menší dceřinná buňka (označovaná jako apikální) vzniká z metabolicky aktivnější části zygoty vyplněné hustou cytoplazmou, zatímco větší (bazální) dceřinná buňka vzniká z protilehlé části, ve které se nalézá velká vakuola.

Apikální buňka z prvního dělení zygoty během asi 30 hodin po oplodnění dává vznik kulovitému útvaru složenému z osmi buněk (*oktant*). Ten je však už zřetelně rozlišen na dvě vrstvy po čtyřech buňkách, jejichž osudy jsou v dalším vývoji zcela odlišné. Z horní vrstvy buněk se postupně diferencuje apikální meristém a základy děložních lístků, zatímco ze spodní vrstvy hypokotyl a větší část primárního kořene včetně meristému nad klidovým centrem. Z příčného dělení bazální buňky se vytváří sloupeček suspensoru, napojující embryu k zárodečnému vaku, ovšem nejvrchnější buňka této struktury (*hypofýza*) se vyvíjí zcela odlišně a v plně diferencovaném embryu jsou z ní vytvořeny základy meristému kořenové čepičky a přiléhajícího klidového centra. Ve finální fázi vývoje embryu dochází

k dalšímu prodloužení základu děložních lístků (stádium označované jako *torpédo*), následuje řízená ztráta vnitrobuněčné vody a společně s dehydratovaným endospermem vstup do dormantního stavu ve zralém semenu.



Vývojová stádia při růstu embrya modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Barevně je odlišena lokalizace skupin buněk shodného původu při postupné diferenciaci embrya a mladé rostliny.

Růst a diferenciacie embrya je i v současné době předmětem intenzivního výzkumu, ovšem již nikoli observačně anatomického. Hlavní pozornost je nyní orientovaná k poznání *regulačních mechanismů*, které řídí diferenciaci jednotlivých skupin buněk v rostoucím embryu. Intenzivní výzkum se provádí na modelových rostlinách (hlavně *Arabidopsis thaliana*) pomocí nejmodernějších molekulárních metod, neboť detailní znalost mechanismů řídicích růst a vývoj embrya může mít klíčový význam pro pochopení regulačních procesů, které se obdobným způsobem mohou odehrávat v průběhu dalších, postembryonálních vývojových stádií rostliny v orgánech s růstovou aktivitou. Není nutno zdůrazňovat, že poznatky v tomto směru by mohly mít značné praktické využití při záměrném řízení růstu užitkových rostlin. Dosud získané výsledky nejsou ještě zdaleka uspokojivé, ale přesto již mohou sloužit jako názorný příklad dokumentující složitost celé problematiky.

Z obecných znaků (předpokladů), které se uplatňují při regulaci růstu a diferenciaci nově vznikajících buněčných populací, můžeme uvést alespoň ty hlavní:

- **polarita buněk**, která je vytvořena již u zygoty před začátkem prvního dělení. I pouhým pozorováním lze zjistit, že protilehlé části zygoty mají odlišnou strukturu buněčného obsahu (hustota cytoplazmy, rozmístění organel), ale rozdíly jsou nepochybně i funkční. Polarita je přenášena při dalších děleních i do všech nových buněk.
- **poloha buněk** v prostorových souřadnicích. Buňky mají schopnost vnímat informace o svém prostorovém umístění v rámci vznikajícího mnohobuněčného útvaru a na základě této informace upravovat svoje další chování. Celý mechanismus podmiňující tento typ reakcí je ale dosud znám velmi nedostatečně.
- **účast fytohormonů**, zejména typu auxinů a cytokininů. Ty jsou složitě řízeným způsobem transportovány rostoucím konglomerátem buněk a podílí se na mezibuněčné koordinaci časově a prostorově oddělené aktivace genů.

- **zpětnovazební mechanismy** jsou neobyčejně časté a silné. Je již známo velké množství genů, které se střídavě aktivují či inhibují v závislosti na osudech svých vlastních „produktů“, často přes kaskádu složitých interakcí. Zvláště komplikované vazby bývají mezi skupinami transkripčních faktorů, kdy aktivace jedné z nich může vyvolat represi jiné.

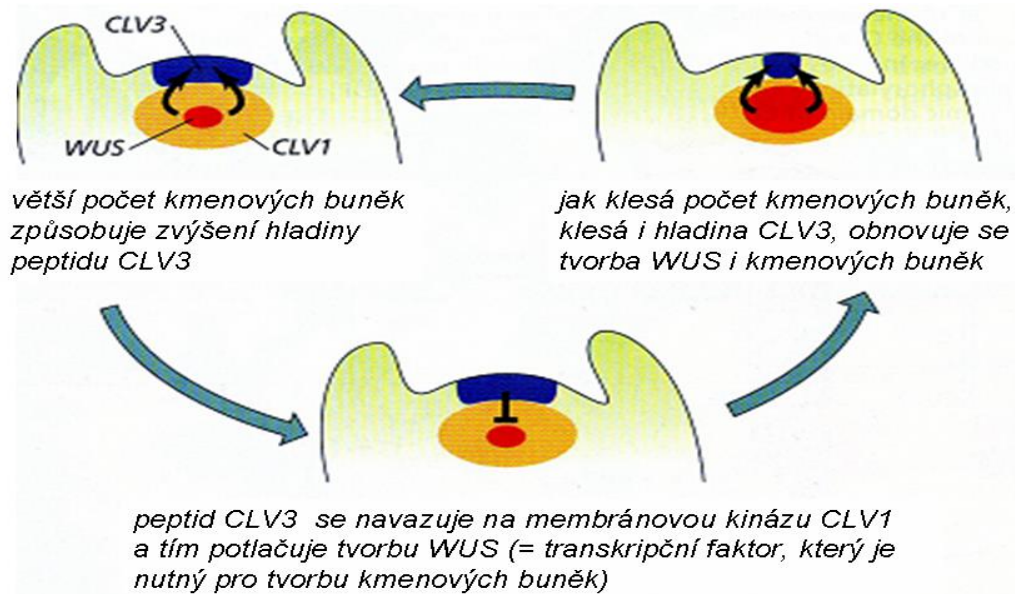


Schéma jednoho z autoregulačních mechanismů při růstu embrya, který v tomto případě slouží k udržování optimálního počtu kmenových buněk v apikálním meristému prýtu. Uvedenými zkratkami bývají pro zjednodušení označovány geny i proteiny které jsou jimi kódovány.

Klíčový význam pro správný vývoj embrya a následný růst mladé rostliny má formování dvou meristematických center, což je proces řízený početnou skupinou genů aktivovaných v jisté časové posloupnosti, která koreluje se změnami koncentrace fytohormonu auxinu. Nově vznikající buňky, odvozené od centrální skupinky buněk kmenových, se velmi brzo oddělují do funkčně rozdílných zón, které jsou pak základem pro tvorbu odlišných pletiv. Zvláště nápadné jsou rozdíly mezi periferní zónou převážně antiklinálně se množících buněk (*protoderm*), jakožto základu pro tvorbu epidermis, a střední zónou, ze které se později diferencuje bazální meristéum produkující buňky pro stavbu kůry a cévních svazků vnitřní části stonku či kořene. Mezi jednotlivými zónami, i přes jejich rozdílnost (strukturní, funkční i co do předurčenosti další diferenciaci) existují velmi těsné regulační vazby zajišťující optimální proporcionalitu jejich dalšího rozvoje.

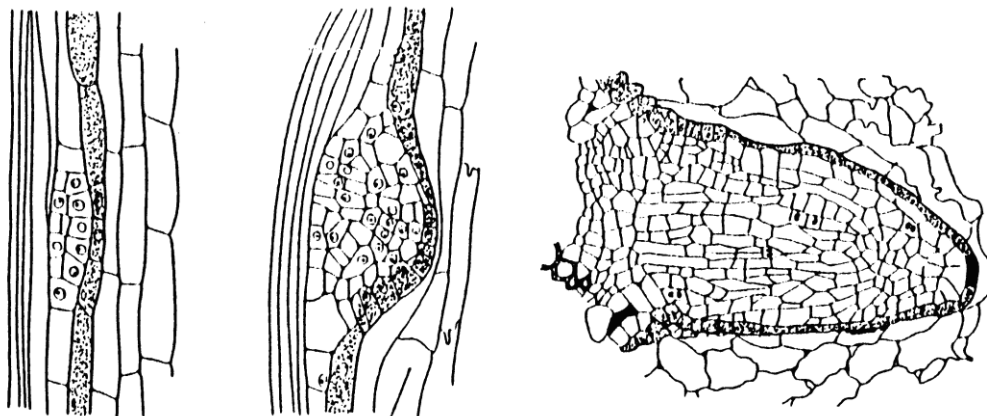
Růst a diferenciaci jednotlivých orgánů

Embryo uzavřené v zaschlém stavu v semeni může obnovit svůj další růstu až po ovlhčení a dostatečné rehydrataci buněk. Avšak ani pak ještě nemusí dojít ke klíčení, pokud zůstal zachován velký obsah inhibičních látek, zajišťujících vstup embrya do dormance (zejména kyselina abscisová). U některých druhů je navíc klíčení podmíněno přítomností látek stimulující povahy typu fytohormonů a fytochromů, (budou probírány v dalších kapitolách). Při klíčení semen jsou jako jedny z prvních obnoveny respirační procesy a funkčnost proteosyntetického aparátu, následuje spuštění tvorby hydrolytických enzymů pro rozklad rezervních látek v endospermu, a plně se aktivuje činnost obou apikálních meristémů (pro primární kořen a stonek). Navazující diferenciaci procesy vedou k rychlé tvorbě všech pletiv a orgánů juvenilní rostliny.

Kořeny jsou orgánem s poměrně jednoduchou a jednotnou stavbou. Obvykle při jejich růstu rozlišujeme čtyři strukturně i funkčně rozdílné zóny, jejichž hranice však nemusejí být zcela ostré:

- *Kořenová čepička* chrání apikální meristém před poškozením, usnadňuje průnik kořene půdou vylučováním slizovitých látek (mukopolysacharidů), a podílí se i na řízení růstových procesů v jiných částech kořene (např. gravitropické reakce). Buňky kořenové čepičky se tvoří z vlastního meristému, postupně se dostávají až na okraj, kde se odlupují.
- *Meristematická zóna* je uložena nad kořenovou čepičkou. Produkuje řetězce buněk, z nichž se v další fázi vytváří pouze válcový primární kořen, bez jakýchkoli postranních struktur. Na rozhraní mezi touto meristematickou zónou a meristémem kořenové čepičky bývá skupinka několika kmenových buněk s velmi malou dělivou aktivitou (*klidové centrum*).
- *Prodlužovací zóna* má již velmi omezenou dělivou aktivitu, zato v ní dochází k velmi podstatnému zvětšení objemu všech buněk produkovaných meristémem. Dochází zde již také k částečné diferenciaci pletiv, především vodivých elementů.
- *Zóna dokončování diferenciaci*, ve které dostávají jednotlivá pletiva svoji konečnou podobu. Velmi dramatická je zejména diferenciaci plně funkčních vodivých pletiv, která je spojena s částečnou degradací vnitřního obsahu buněk předurčených k přeměně na vodivé elementy lýka (články sítkovic), či dokonce k jejich úplnému odumření („programovanou smrtí“, tedy sebezničením) v případě elementů xylému (cév a cévic). Vytváří se také vrstva buněk endodermis, která je pro správnou funkci kořene nepostradatelná.

Základy bočních kořenů se vytvářejí až ve zcela diferencovaných částech kořene a nejsou tudíž nijak závislé na činnosti apikálního meristému. Jejich tvorba začíná obnovením dělivé aktivity skupinky buněk v pericyklu, iniciované stimulačním působením lokálně zvýšené koncentrace fytohormonů (především auxinů a cytokininů). Spouštěcí signály vedoucí k tvorbě bočních kořenů nemusejí vycházet jen z vnitřního programu či „potřeb“ rostliny, ale mohou vznikat pod vlivem faktorů vnějšího prostředí, např. za jisté koncentrace živin v okolí kořene. Růst bočního kořene je provázen velmi rychlým vznikem apikálního meristému a kořenové čepičky, jejichž funkce jsou zcela stejné jak u kořene primárního. Jediným rozdílem bývá obvykle menší gravitropická reakce či její úplná ztráta. Tloušťnutí kořenů je zajištěno u nahosemenných a u většiny dvouděložných činností sekundárního meristému (kambia), který se zakládá mezi lýkem a dřevem. U jednoděložných se obvykle kambialní kruh nezakládá a k tloušťnutí dochází pouze zvětšováním buněk a tvorbou nových cévních svazků.

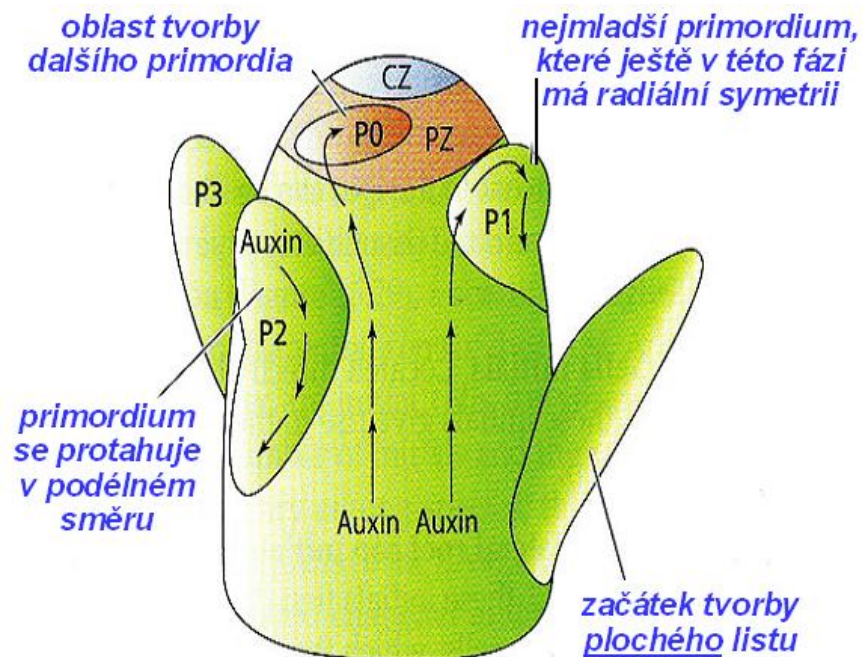


Počáteční fáze zakládání bočního kořene v pericyklu

Prýt (= souhrnné označení pro všechny mimokořenové, tedy obvykle nadzemní části rostliny, odpovídá anglickému termínu *shoot*) má také své základy již vytvořené v embryu, ve formě jednoduchého apikálního meristému, ovšem velmi brzy se musí u mladého semenáčku vytvářet útvar podstatně složitější. Apikální meristém totiž musí být schopen zajišťovat nejen růst a větvení stonku, ale i zakládání dalších meristémů pro růst listů a květů. Uspořádání vrstev dělivých buněk v apikální části prýtu je nejen značně odlišné od kořenové špičky, ale také specifické pro různé druhy či celé vyšší taxonomické okruhy rostlin.

V typickém případě lze rozlišit na apikálním meristému vnější jedno- až třířadovou vrstvu buněk, dělících se antiklinálně (buňky pláště čili *tuniky*), a vnitřní buňky (*korpus*) dělící se periklinálně až neuspořádaně. Dělivé buňky lze nalézt mnohem dále od špičky vzrostného vrcholu, než jak tomu bývá u kořenů. K tvorbě základů listů (*listových primordií*) však přesto dochází v těsné blízkosti vegetačního vrcholu. Jedná se proces mimořádně složitý z hlediska řízení, a současně mimořádně důležitý z hlediska budoucí stavby celé nadzemní části rostliny. Již v této velmi časně fázi se obvykle rozhoduje nejen o celkovém počtu listů, ale i o časových intervalech mezi jejich tvorbou, o typu fylotaxe a také o způsobu a frekvenci větvení stonku.

Listy se rozvíjejí z listových základů (*primordií*) pomocí několika dalších specifických meristémů. V prvních fázích růstu má největší dělivou aktivitu vrstva buněk na vnějším konci primordia, později i na okrajích (*marginální meristém* zajišťující růst do šířky), a někdy i v bazální části (*interkalární meristém*, zvláště aktivní u listů trav). Složité tvary listových čepelí u některých druhů rostlin jsou vytvářeny nestejnou aktivitou jednotlivých úseků marginálního meristému. Složitost tvorby listů ale vyplývá také z toho, že je nutno regulovat průběh růstových procesů ve třech na sebe kolmých osách, určujících délku, šířku a tloušťku listu.



Zakládání a růst listových primordií s vyznačenými toky fytohormonu auxinu

Meristémy listů jsou udržovány v aktivním stavu někdy velmi dlouho (např. u trav je schopen i zcela dospělý list obnovit růst za jistých podmínek). U listů *dvouděložných rostlin* však dělivý růst trvá poměrně krátce a nelze jej znovu aktivovat. U těchto listů je dělení buněk ukončeno již při dosažení jedné pětiny až poloviny konečné plochy listu, pak již dochází jen ke zvětšování objemu buněk. V této dlouhivé fázi růstu jsou však jisté rozdíly: buňky mezofylu zastavují růst dříve než epidermální, a proto při dalším zvětšování plochy (již jen růstem epidermis) dochází ke vzniku rozsáhlých *intercelulár* v mezofylu.

Vytrvalé rostliny se sezónní periodicitou růstu (např. naše stromy) zakládají listová primordia pro jarní období růstu již při tvorbě pupenů v předcházejícím roce. Také v semenech některých druhů rostlin lze nalézt ještě před vyklíčením na embryu kromě základů listů děložních i primordia několika dalších (pravých) listů.

3.2 Vnitřní chemické regulátory růstu

Základní informace pro řízení růstu, diferenciaci a hrubý „stavební plán“ morfogeneze jsou sice kódovány v DNA každé rostlinné buňky, ovšem tyto informace samy o sobě nestačí pro zajištění optimálního průběhu uvedených procesů. Buňky musí neustále monitorovat stav vnějšího prostředí a také komunikovat navzájem. Podněty z těchto zdrojů významným způsobem ovlivňují expresi genetické informace.

Koordinace růstových procesů v rostlinách není také možná jen na úrovni jednoho orgánu. Je nutná souhra činnosti souborů buněk (pletiv) i velmi vzdálených, zejména mezi kořeny a nadzemními částmi. Přenos morfogenetických signálů se děje převážně pomocí chemických sloučenin transportovaných lýkem i xylémem, na kratší vzdálenosti pak různými mezibuněčnými cestami (*plazmodesmatickými kanály*), nebo buněčnou stěnou a membránovými transportními proteiny). Jedná se většinou o sloučeniny poměrně jednoduché chemické struktury, ovšem jejich konečný dopad na morfogenezi rostlinného organismu je zcela srovnatelný s působením hormonů u živočichů. Proto se také označují jako rostlinné hormony (*fytohormony*).

Fytohormon je definován jako *organická sloučenina, která po syntéze v jedné části rostliny je transportována do jiné její části, kde ve velmi malé koncentraci způsobuje fyziologickou reakci*. K fytohormonům tedy nepočítáme anorganické ionty přijímané z vnějšího prostředí, ani organické metabolity produkované rostlinou ve velkých kvantech (sacharidy, aminokyseliny), i když mohou významně růst ovlivňovat. Nezahrnujeme k nim ani uměle vyrobené sloučeniny s regulačním účinkem na růst.

V současné době máme nejvíce poznatků o fytohormonech označovaných jako *auxiny, gibbereliny, cytokininy, brassinosteroidy a strigolaktony*. Každá z těchto skupin zahrnuje často velmi početné typy sloučenin s podobnou chemickou strukturou i s podobnou regulační funkcí. K významným a rozšířeným fytohormonům patří i samostatně stojící sloučeniny: *etylén, kyselina abscisová a kyselina jasmonová*, z nichž každá má odlišné, zcela specifické působení. Uvedené *základní fytohormony* hrají nezastupitelnou regulační úlohu u naprosté většiny rostlin. Kromě nich je známa ještě řada dalších sloučenin, které vyhovují definici fytohormonu (např. *polyaminy* a celá řada *fenolických látek*). O jejich funkci máme dosud méně poznatků, avšak přesto jejich významnost je zcela nepochybná. Výskyt těchto látek však bývá omezen jen na některé taxonomické skupiny rostlin.

Na rozdíl od živočišných hormonů neprobíhá tvorba fytohormonů u rostlin v úzce vymezených částech jejich těla, které by plnily podobnou funkci jako žlázy s vnitřní sekrecí u živočichů. Potenciální schopnost tvořit fytohormony má velmi často většina buněk celé rostliny, i když v nestejně míře, a ne vždy musí být tato schopnost aktivována. Také účinky (oblasti působení) fytohormonů jsou mnohem méně specifické ve srovnání s živočišnými hormony. Každý fytohormon může působit na buňky v různých orgánech a výsledek tohoto působení vůbec nemusí být podobný. Je totiž často závislý na vývojovém stavu příslušného orgánu i na interakcích jak s dalšími fytohormony, tak i s mnoha dalšími vnitřními i vnějšími faktory, zejména se světelným a teplotním režimem.

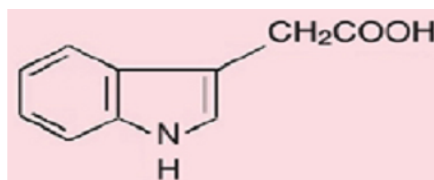
Velmi různorodý je i *mechanismus působení*. I pro tentýž typ fytohormonu může existovat více typů specifických receptorů (membránových i volně pohyblivých v cytosolu), více možných cest přenosu signálu od receptorů, a konečně i více regulovaných vnitrobuněčných struktur. Mohou jimi být metabolicky významné či transportní proteiny, ale nejčastěji se jedná o *ovlivňování exprese genů v jádře*, jak bude v dalším textu pro každou skupinu fytohormonů blíže popsáno. Zejména jde o působení na úrovni přepisu (transkripce) a úpravy (*processing*) mRNA. Tyto články aktivace genetické informace jsou totiž ovlivňovány převážně proteiny (transkripčními faktory, enzymy), a není proto obtížné si představit možné působení fytohormonu na příslušný regulační protein.

Auxiny

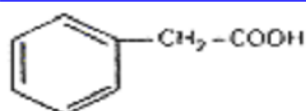
Ze všech rostlinných hormonů byly nejdříve (v první polovině 20. století) objeveny auxiny. Po dlouhá léta byla známa jen jedna látka tohoto typu, **kyselina indolyl-3-octová** (angl. *Indole-3-Acetic Acid*, zkráceně **IAA**). Dnes víme, že se v rostlinách vyskytují ještě nejméně tři další organické kyseliny s podobným účinkem:

- kyselina 4-chlor-indolyl-3-octová,
- kyselina -indolyl-3-máselná,
- kyselina fenyl-octová.

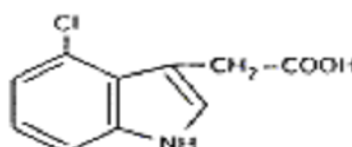
kyselina indolyl-3-octová: (IAA)



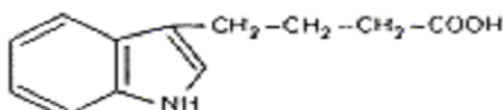
další, méně časté auxiny:



kyselina fenyl-octová



kyselina 4-chlor-indolyl-3-octová



kyselina indolyl-3-máselná

Kromě toho můžeme v rostlinách najít další tři velmi podobné sloučeniny, které však považujeme pouze za prekurzory auxinů (*indolylacetaldehyd, indolylacetonitril a indolyl-etanol*). Velmi snadno se oxidují na IAA. Známe však i několik uměle připravených látek s účinkem charakteristickým pro auxiny. Jedná se o aromatické sloučeniny s karboxylovou skupinou, což jsou zřejmě dva nezbytné předpoklady pro ovlivnění příslušných receptorů v rostlině (např. *kyselina α -naftyl-octová*, NAA). Ze všech jmenovaných auxinů a jejich prekurzorů máme daleko nejvíc poznatků o účincích, tvorbě, transportu a degradaci **kyseliny indolyl-3-octové (IAA)**. Její obsah a tím i význam v rostlinách zcela převažuje nad ostatními látkami typu auxinů.

Syntéza IAA je možná několika cestami, většina z nich však vychází z aminokyseliny *tryptofanu*. Enzymy, které se na této syntéze podílejí, jsou nejvíce aktivní v mladých rostoucích částech rostlin. *Apikální meristémy v nadzemních částech a mladé listy jsou tedy hlavními místy syntézy IAA*. Odbourávání (degradace) IAA začíná obvykle ztrátou karboxylové skupiny. Kromě řízení rychlosti syntézy a degradace IAA může rostlina kontrolovat její koncentraci pomocí dočasné inaktivace kovalentní vazbou na některé organické látky, zejména na cukry a aminokyseliny. Z těchto *konjugátů* se pak IAA snadno uvolňuje pomocí hydrolytických enzymů. Vázaná IAA má velký význam jako zásobní forma. Může být ukládána i v semenech a rychle aktivována při klíčení.

Transport IAA v rostlině má několik zvláštností. Na rozdíl od většiny ostatních metabolitů, jen zřídka bývá nalézána v lýku či v xylému. Nejčastěji je vedena parenchymatickými buňkami v blízkosti cévních svazků. Tento transport je poměrně pomalý (jen asi 10 mm za hodinu) a vyžaduje metabolickou energii. Plazmatické membrány překonává pomocí selektivních transportních proteinů několika typů. Pro vstup do buňky (*influx*), slouží hlavně symport (+2H⁺) selektivními přenašeči označovanými zkratkou **AUXI**. Za nízké hodnoty pH v buněčné stěně (pod 5,5) je možný i pasivní transport nedisociovaných (a tudíž elektricky neutrálních) molekul IAA z apoplastu do cytosolu. Za vyššího pH, které

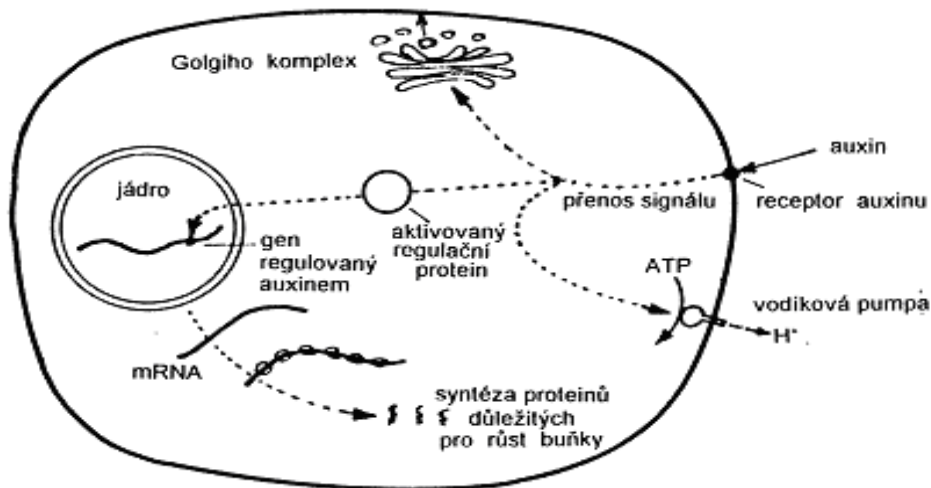
pravidelně bývá uvnitř buněk (v cytosolu, zhruba 7 až 7,5) jsou molekuly IAA disociované a jejich zpětný transport (výstup, *efflux*) už bývá pravidelně pasivní. Je zprostředkován celou rodinou aniontových přenašečů typu PIN, protože pro pasivní transport anionů ven z buňky je obvykle příznivý spád elektrochemického potenciálu. Avšak i *efflux* může být někdy prováděn paralelně pomocí primárně aktivních (ATP-využívajících) přenašečů typu PGP.

Další zvláštností je výrazně *polární charakter transportu IAA*. V nadzemních částech *probíhá vždy od růstového vrcholu a z mladých listů směrem dolů, ke kořenům (bazipetálně)*. Není přitom ale závislý na působení gravitace (probíhá stejným způsobem i u stonku umístěného do vodorovné polohy). Bazipetální směr transportu je určován nestejným umístěním zmíněných transportních proteinů v plazmatické membráně. Přenašeče pro vstup (AUX) nacházíme jen v „horní“ části buňky (tedy směrem k vegetačnímu vrcholu), zatímco v její „spodní“ části jsou přenašeče pro výstup (PIN).

Působení auxinů na procesy v rostlinách je mnohostranné. Na některé z účinků auxinu jsme již narazili v předcházející kapitole věnované embryogenezi a *regulaci procesů v meristémech* (včetně zakládání primordií listů, postranních pupenů, atd.). Lze jen dodat, že i *diferenciace vodivých pletiv* (cévních svazků) probíhá správným způsobem jen za působení jisté koncentrace auxinů. Nejznámější oblastí působení auxinů je ovšem *stimulace dlouhivého růstu buněk*, částečně i rychlosti dělení, a to často již v koncentraci 10^{-8} M. Stejně tak dobře prozkoumaný je kladný vliv zvýšené koncentrace auxinů na *růst kořenů*, zvláště na četnost větvení a na tvorbu adventivních kořenů. Tato vlastnost má široké praktické využití při *zakořeňování řízků* rostlin (nejúčinnější bývá kyselina indolyl-3-máselná). Vliv auxinů na buněčné aktivity se v přírodních podmínkách uplatňuje i při poranění, kdy stimulují tvorbu ochranné vrstvy z korkovatelých buněk zacelujících ránu, a v případě potřeby i obnovu poškozeného xylému. Účinek auxinů na obnovení dělivé aktivity se ale projevuje pouze za přítomnosti dalších fytohormonů ze skupiny cytokininů. Auxiny mohou také ovlivňovat tvorbu některých dalších fytohormonů, např. tvorbu etylénu, který má převážně inhibiční účinky, ale naopak i tvorbu gibberelinů, které mají stimulační účinky na růst.

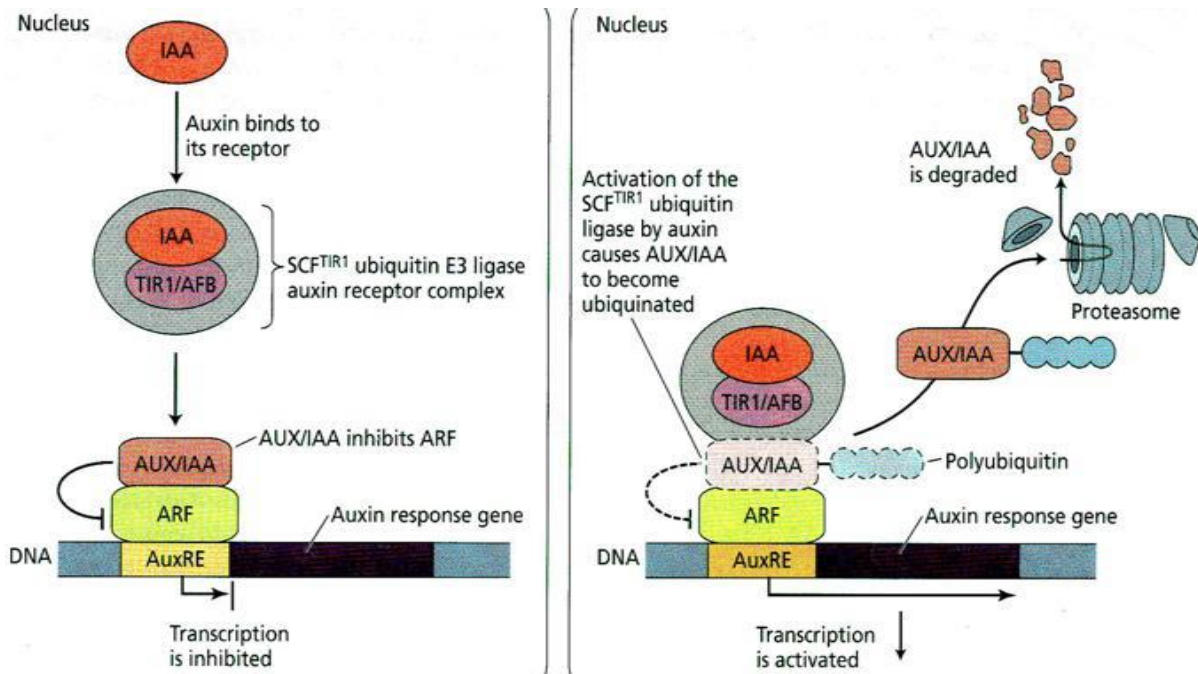
Auxiny jsou nezbytné pro řízení pochodů, kterými rostlina reaguje na jednostranné působení prostředí (*gravitropismus, fototropismus*). Ty budou podrobněji probrány v dalších kapitolách. Auxiny mají také významný podíl na řízení *apikální dominance* růstu (= inhibiční vliv vegetačního vrcholu na níže položené pupeny), která je u rostlin běžným jevem. Podle původní představy byla "nadvláda" vrcholového meristému vysvětlována vysokou koncentrací auxinů transportovaných z vegetačního vrcholu. Jak je známo, *příliš vysoká koncentrace auxinů* (zhruba nad 10^{-4} M) může mít již výrazně inhibiční účinky na růst, a tudíž by teoreticky mohla brzdit rozvoj níže položených pupenů. Přesná měření auxinových gradientů však tento jednoduchý regulační mechanismus nepotvrdila, neboť mezi stupněm inhibice pupenů a rychlostí přítoku nativních auxinů nebyla zjištěna kladná závislost. Na druhé straně však víme, že jistý vliv auxinů na apikální dominanci je zcela nepochybný (při zastavení jejich přísunu je zrušena i dominance!). Současné výzkumy dokazují významnou úlohu terpenoidních látek vznikajících štěpením karotenoidů při inhibici níže položených pupenů, ovšem současně bylo zjištěno, že jejich účinnost je vázána na interakci s auxiny.

Studium **mechanismu působení** auxinů v buňkách se zpočátku zaměřovalo hlavně na vysvětlení *stimulace dlouhivého růstu*. Vzhledem k tomu, že jde o reakci velmi rychlou (již za 15 minut dochází k měřitelným růstovým změnám!), nelze ji vysvětlit vstupem auxinů do jádra a ovlivňováním genové aktivity, ale spíše přenosem signálu z vhodného receptoru v plazmatické membráně k mimojaderným efektorům. Skutečně se podařilo objevit selektivní membránový receptor (označovaný jako *auxin binding protein, ABPI*), který po aktivaci molekulou auxinu (a za asistence druhotných vnitrobuněčných mediátorů) je schopen stimulovat činnost protonových pump v plazmalemě. Následné snížení pH v buněčné stěně vede k zvýšení její roztlačnosti (*extenzibility*), což vede ke zrychlení dlouhivého růstu.



Starší představa mechanismu působení auxinů na růst buněk receptorovou cestou.

Novější výzkumy ale ukázaly, že naprostá většina ostatních vnitrobuněčných procesů řízených auxiny probíhá *nezávisle na membránových receptorech* (i po jejich vyřazení z funkce). Častěji tedy asi bude navazování na receptor a ovlivňování aktivity genů až po *vstupu auxinů do jádra buňky*, jak je naznačeno na následujícím obrázku:



Regulace genové aktivity auxiny (základní mechanismus na molekulární úrovni)

- ◆ anionty auxinu *vstupují* do buňky pomocí přenašečů (*AUX1*), *vystupují* z buňky jinými přenašeči typu *PIN (1-8)*. Na aktivitě těchto transportních proteinů závisí *aktuální koncentrace* auxinu v buňce, a na jejich lokalizaci i *směr mezibuněčného transportu*.
- ◆ molekuly auxinu se v buněčném jádře vážou na receptor *TIR1*,
- ◆ receptor *TIR1* po navázání auxinu je schopen *inaktivovat* proteiny typu *AUX-IAA* (29 u *Arabidopsis*), které inhibují aktivitu transkripčních faktorů skupiny *ARF* (23 u *Arabidopsis*),
- ◆ transkripční faktory skupiny *ARF* (*auxin response factor*) po uvolnění z inhibice spouštějí expresi příslušných genů.

Gibereliny

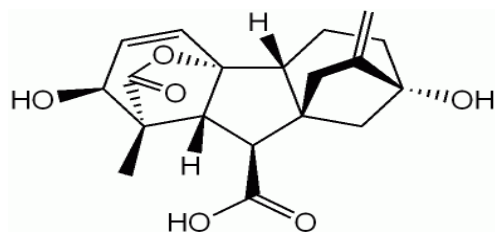
Objev této skupiny fytohormonů je přibližně stejně starý jako v případě auxinů. Vycházel z pozorování účinků látek vylučovaných patogenní houbou *Gibberella fujikuroi* na zrychlení růstu stébel rýže. Byl učiněn v Japonsku a na dlouhou dobu zapomenut. Teprve od padesátých let 20. století se začaly gibereliny skutečně intenzivně zkoumat.

Všechny gibereliny patří mezi *terpeny* s 19 až 20 uhlíky ve čtyřech kruhových systémech a nejméně s jednou karboxylovou skupinou. Jsou proto kyselé povahy. Označují se zkratkou **GA** (*Gibberellic Acid*) s číselným indexem vyjadřujícím pořadové číslo od jejich objevu. V současné době známe asi 140 různých přirozeně se vyskytujících giberelinů, ovšem jejich významnost je velmi rozdílná. Byly nalezeny u všech dosud zkoumaných druhů cévnatých rostlin i u značného počtu druhů rostlin primitivnějších. U každého druhu rostlin je přítomno jen několik typů giberelinů. Některé jsou společné řadě druhů (např. GA₁ a GA₃), jiné lze najít mnohem vzácněji, či jejich funkce mohou být více specializované.

Syntéza giberelinů in vivo vychází z acetátových skupin, ze kterých se tvoří kyselina mevalonová a isopentenylpyrofosfát, jako základní stavební prvek všech terpenů. Degradace giberelinů v rostlinách je velmi pomalá, ale často dochází k inaktivaci vazbou s jinými sloučeninami. Konjugáty s glukózou (glukosidy) jsou nejčastější a velmi důležitou zásobní formou giberelinů.

Pravděpodobně každá rostlinná buňka má schopnost tvořit gibereliny, ovšem v některých orgánech je tato tvorba zvláště intenzivní. K nim patří především *mladé listy*, které svou produkcí giberelinů mohou působit na velké zrychlení růstu stonku. Neobyčejně vysoká koncentrace giberelinů bývá pravidelně zjišťována v mladých, vyvíjejících se *semenech*, kde se ukládají ve formě konjugátů.

Transport giberelinů, na rozdíl od auxinů, není jen bazipetální, ale může probíhat *všemi směry*. Snadno jsou transportovány i *lýkem nebo xylémem*. Syntéza giberelinů probíhá nejen v nadzemních částech, ale i v kořenech, ovšem vlastní růst kořenů je jimi jen velmi málo ovlivňován. Spíše bývá zjišťováno, že většina produkce giberelinů je transportována xylémem z kořenů do nadzemních částí.



Giberelin GA₃ patří k nejběžnějším giberelinům v rostlinách.

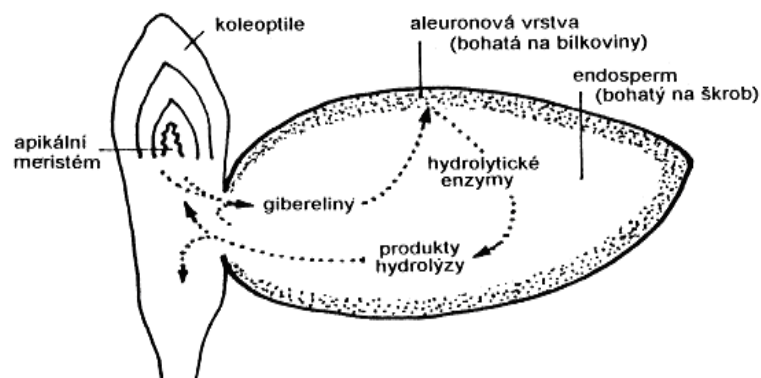
Z fyziologických účinků giberelinů je nutno na prvním místě jmenovat celkové zrychlení růstu zejména pak *stimulaci dlouhivého růstu stonku*. Geneticky pozměněné rostliny s poruchou syntézy giberelinu mají zakrslý vzrůst a jejich reakce na uměle dodaný giberelin je překvapivě velká. Ale i normální (geneticky nepozměněné) rostliny mohou výrazně zrychlit růst stonku po aplikaci giberelinu, což je zvláště nápadné u trav, nebo také u některých rostlin z čeledi brukvovitých, které ve vegetativní fázi tvoří přízemní růžice se zkráceným stonkem.

Gibereliny mají významnou funkci při *klíčení semen*. Na počátku klíčení se uvolňují hydrolyzou z konjugovaných zásobních forem, později jsou produkovány embryem. Kromě stimulace růstových procesů v prorůstajícím embryu (spolu s auxiny) stimulují také tvorbu a vylučování *hydrolytických enzymů*. Ty jsou potřebné pro rozklad zásobních polysacharidů v semeni na jednoduché cukry, které podporují růst klíčící rostlinky. Na stanovení rychlosti

tvorby α -amylázy v aleuronové vrstvě obilky je založen jeden z biotestů používaných na stanovení koncentrace a účinnosti giberelinů v extraktech.

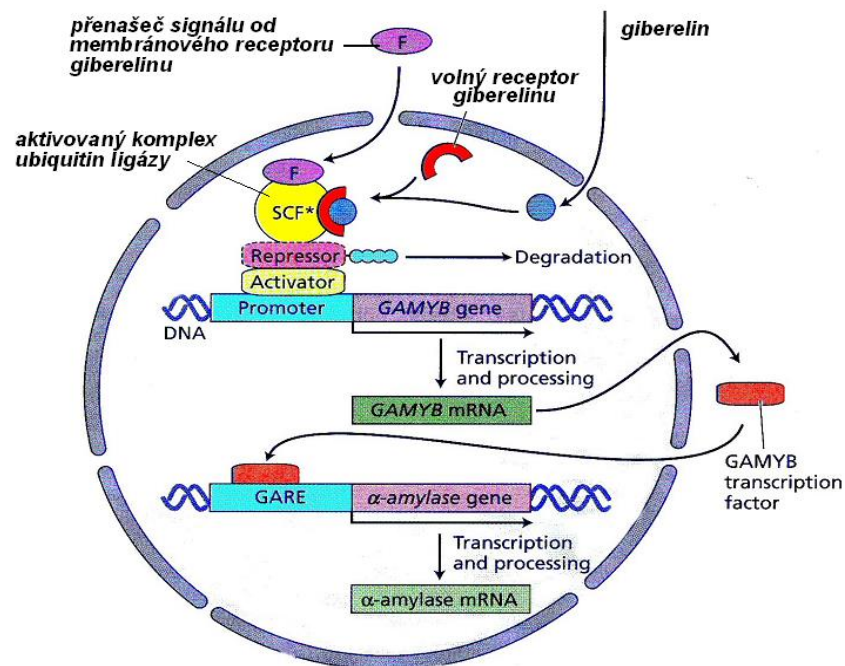
Z dalších účinků giberelinů lze uvést jejich stimulační účinky na tvorbu pylu a na nasazování plodů u některých ovocných stromů i v těch případech, kdy nedošlo k opylení (parthenokarpie, bezsemenné plody). Je také dokázán jejich vliv na urychlení přechodu z juvenilní fáze do dospělosti, spojené např. se schopností tvorby šišek u jehličnatých stromů. Gibereliny se mohou také podílet na indukci tvorby květů u fotoperiodicky závislých druhů rostlin, jak ještě bude blíže popsáno v kapitole věnované fotoperiodicitě. Experimentálně bylo zjištěno, že aplikací giberelinů lze někdy přerušit dormanci semen i pupenů a nahradit tak vlastně aktivační působení nízkých teplot, dlouhé fotoperiody či červeného světla.

Mechanismus působení giberelinů je v současné době velmi intenzivně studován. Vzhledem k rozmanitým oblastem jejich účinků nelze očekávat nějaký obecně platný mechanismus. Dobře prozkoumaným je mechanismus stimulace tvorby hydroláz v klíčících obilkách:



Funkce giberelinů při tvorbě hydrolytických enzymů v klíčící obilce: směry výměn metabolitů.

Je však jisté, že část regulačních aktivit je spojena se zachycením molekuly giberelinu v selektivním receptoru v plazmatické membráně a s přenosem signálu řetězcem druhotných přenašečů do jádra či na jiná místa v buňce, ovšem současně je možný i vstup giberelinů do buňky a jejich interakce s proteiny regulujícími expresi genů v jádře, obvykle na úrovni transkripce.



Průběh aktivace genu pro α -amylázu v jádře aleuronové buňky klíčící obilky

Tvorba transkripčního faktoru genu pro tvorbu α -amylázy v buňkách aleuronové vrstvy je bez přítomnosti giberelinu blokována represorem aktivátoru transkripce. K jeho odstranění (degradaci po navázání ubiquitinu za asistence ubiquitin ligázy) může dojít na základě signálu přenášeného z giberelinového receptoru v plazmatické membráně (přes G-protein a aktivovaný F-box protein). Je ale možná i alternativní cesta vedoucí k odstranění represoru transkripce, a sice přes navázání molekuly giberelinu na specifický volně pohyblivý receptorový protein až přímo v jádře. Bylo ale zjištěno, že při tomto druhém způsobu aktivace transkripce sice dochází k tvorbě α -amylázy, ale ta se hromadí v buňce. Její transport ven z buňky je spouštěn jen po přenosu signálu z giberelinového receptoru zakotveného v plazmatické membráně.

Mechanismus působení giberelinů na růstové procesy je značně složitější a jeho výzkum stále pokračuje. Je však známo, že stimuluje jednak dělení buněk (zkrácením G_1 a S-fáze), hlavně však jejich dlouhivý růst v subapikálních růstových zónách. Ke zrychlení dlouhivého růstu buněk dochází především zvýšením roztažnosti buněčné stěny, nejspíše ovlivňováním inkorporace proteinů ze skupiny extensinů. Na rozdíl od působení auxinů není změna roztažnosti buněčné stěny spojena se změnou její acidity. Na rychlost růstu působí příznivě i velké množství hexos, uvolňovaných při stimulované hydrolýze polysacharidů, neboť ty jsou zdrojem energie a stavebního materiálu pro rostoucí buňky. Navíc přispívají ke zvýšení osmotického tlaku, a tedy i k následnému zvýšení turgoru. Ten, jak již víme, je nutným předpokladem růstu.

Praktické využití giberelinů je dosti omezené. Gibereliny nelze vyrábět ve větším měřítku synteticky a také jejich biotechnologická produkce kulturami hub je drahá. Přesto se občas používají, a to zejména na *zvětšení rozměrů rostlin* či jejich orgánů (např. postříkem některých odrůd révy vinné lze vypěstovat značně větší hrozny). Zvětšení rozměrů po ošetření gibereliny však nemusí být vždy spojeno se vzrůstem hmotnosti sušiny.

Více než vlastní gibereliny došly praktického využití sloučeniny, které jejich syntézu v rostlinách blokují a způsobují tudíž zpomalení růstu (*růstové retardanty*). K takovým látkám patří např. chlorcholinchlorid, známý pod zkratkou CCC ("*Retacel*"), ale i jiné sloučeniny známé pod obchodními názvy *Phosphon* a *Paclo-butrazol*. Často se těmito přípravky ošetřovaly obiloviny, neboť kratší stébla jsou méně náchylná k polehání. Jejich používání však už v současné době není dovoleno, neboť zdravotně nebezpečné metabolity těchto látek se dostávaly do potravního řetězce.

Chemické struktury jednotlivých sloučenin z celé skupiny giberelinů (a řadu dalších podrobných informací o ostatních fytohormonech) lze najít na webové stránce: www.plant-hormones.info/gibberellin_nomenclature.htm

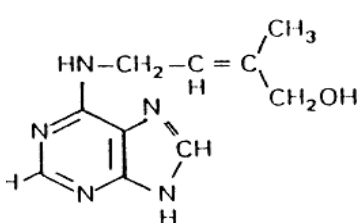
Cytokininy

Na počátku padesátých let 20. století byly na několika výzkumných pracovištích usilovně hledány a testovány látky, které by mohly regulovat rychlost buněčného dělení (*cytokineze*). Toto úsilí bylo motivováno nejen možnými aplikačními aspekty, ale vycházelo i z potřeby lépe vysvětlit růstově-regulační procesy. Rozkladem DNA byla získána sloučenina nazvaná *kinetin*, která byla sice velmi účinná, ale v rostlinách se ji nepodařilo nalézt. Teprve v šedesátých letech se skutečně podařilo z rostlin extrahovat přirozeně se vyskytující (nativní) látky s velmi podobnou strukturou a účinky jako měl kinetin. První izolace se podařila z endospermu nedozrálých obilek kukuřice (*Zea mays*) - proto dostala nově objevená sloučenina název *zeatin*. Je asi vůbec nejhojnější ze všech cytokininů, kterých dnes již známe několik desítek. Část z nich nacházíme v rostlinách ve volné formě, část jich bývá vázána na některé jiné sloučeniny (např. jako atypické báze v tRNA, nikoli však v DNA!). Spolu se synteticky připravenými analogy představuje celá skupina cytokininů více než 200 sloučenin.

Z chemického hlediska jsou si všechny cytokininy dosti podobné, ovšem tvorba různých derivátů je zde častější než u jiných fytohormonů. Základní kostru tvoří *adenin*, na který je připojen boční řetězec (např. isopentenyl u jednoho z velmi běžných cytokininů, *isopentenyladeninu*). Kromě toho se na každý z cytokininů může napojovat ribóza za vzniku nukleosidu (ribosidu) a po připojení fosfátové skupiny vznikají *nukleotidy*. Ty jsou obvykle nejčastější transportní formou cytokininů. Největší regulační účinky však mívají jen základní formy, označované též jako *volné báze*.

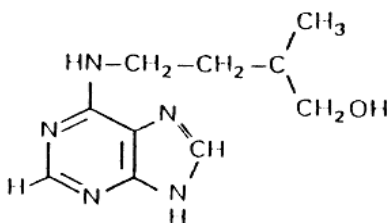
Syntéza cytokininů v rostlinách se odvozuje od *adenosinmonofosfátu (AMP)*, ze kterého se pak odštěpuje fosfátová skupina a ribóza. Obdobně jako u auxinů a giberelinů je i zde možná tvorba konjugátů (zejména glykosidů), které mohou být využity k ukládání do rezervních orgánů či pro transport. Také u cytokininů máme potíže s přesným určením místa jejich syntézy, neboť toto nemusí být totožné s místem jejich nejvyšší koncentrace. Existují ale dostatečné důkazy o zvláště intenzivní syntéze cytokininů v *apikálním meristému kořenů*, odkud jsou rozváděny xylémem do ostatních orgánů. Kořeny však nejsou jediným místem syntézy. K tvorbě cytokininů může docházet i v různých pletivech nadzemních částech, ale obvykle jen v omezeném množství a v určité vývojové fázi. Mladé listy a jiné nadzemní orgány s meristémy, v nichž pravidelně zjišťujeme vysokou koncentraci cytokininů, jsou jimi v převážné míře zásobovány z kořenů.

Izoprenoidní cytokininy:

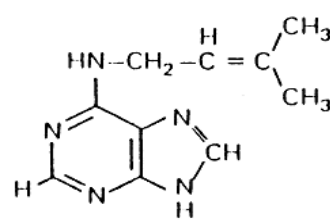


zeatin

(hydroxy-3-metylbut-2-enylamino purin)

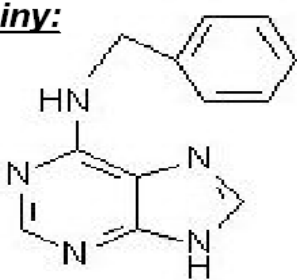


dihydrozeatin



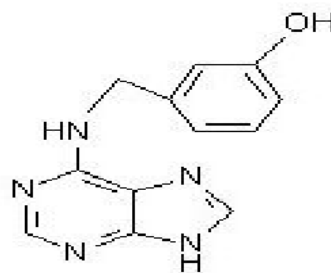
izopentenyladenin

Aromatické cytokininy:



benzyladenin

(= benzylaminopurin)



meta-topolin

(= (m-OH) benzylaminopurin)

Chemická struktura některých běžných cytokininů.

Fyziologické účinky cytokininů jsou značně různorodé. Jejich prvořadou funkcí je nepochybně *schopnost regulace dělení buněk* v meristémech, která je ale vázána jen na jejich optimální koncentraci. Nedostatek i nadbytek cytokininů rychlost dělení buněk snižuje. Pod vlivem cytokininů může být obnovena dělivá aktivita i v diferencovaných pletivech, např. při tvorbě závalu (kalusu) na poraněných místech. Obvykle je ale nutná i zvýšená koncentrace auxinů.

Cytokininy podporují *tvorbu bočních pupenů* u dvouděložných rostlin a ruší jejich dormanci (způsobenou např. apikální dominancí), ovšem další růst iniciovaných pupenů je možný pouze za spoluúčasti auxinů a giberelinů.

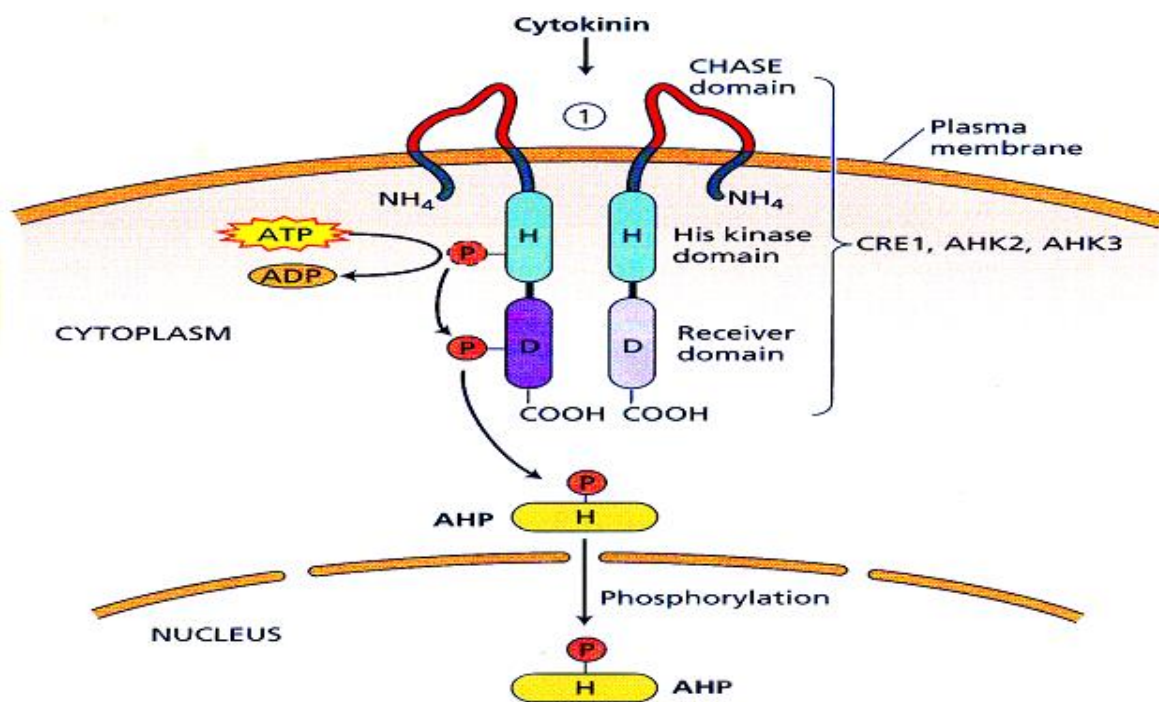
Velmi zajímavou a dosud málo probádanou oblastí působení cytokininů je jejich *interakce s minerálními výživou rostlin*. Hladina cytokininů se v rostlinách zvyšuje úměrně se stoupajícím množstvím dostupných živin v půdě, což má nezanedbatelný dopad i na jejich efektivnější využívání (např. zrychlení a účelné směřování jejich transportu, zabudovávání v rostoucích a zásobních orgánech)

Významný je také účinek cytokininů na *zpomalení stárnutí* některých orgánů rostlin. Mnoho pokusů bylo prováděno zejména s listy, které si podstatně déle zachovávají funkční chloroplasty a vysoký obsah chlorofylu, jestliže je v nich obsah cytokininů zvýšen (umělou aplikací či přirozenou cestou po zakořenění řapíku). Ukazuje se, že cytokinininy především chrání membrány před degradací (antioxidační ochrana nenasycených mastných kyselin).

Neméně významný je i poznatek, že orgány se zvýšeným obsahem cytokininů jsou *přednostně zásobovány metabolity* rozváděnými v lýku, což má význam nejen pro zpomalení stárnutí některých orgánů, ale zejména pro preferenční zásobení těch nejrychleji rostoucích částí rostliny. Také rychlost toku asimilátů do zásobních orgánů může být řízena cytokinininy.

Z dalších zjištěných účinků cytokininů můžeme ještě jmenovat *stimulační vliv na klíčení* semen. Při odstraňování dormance semen do jisté míry nahrazují obvyklé účinky nízkých teplot. Významný stimulační vliv cytokininů byl pozorován při *tvorbě funkčních chloroplastů* z proplastidů (včetně zvýšení rychlosti tvorby gran a chlorofylu), což lze vysvětlit zrychlenou tvorbou specifických proteinů. Obtížněji vysvětlitelná je však celá řada dalších účinků, např. na tvorbu plodů, rychlost dozrávání, atd.

Mechanismus působení cytokininů je znám jen pro některé jejich hlavní účinky. Především se zkoumala cesta přenosu signálu při iniciaci exprese velkého množství genů řízených cytokinininy. Tato cesta začíná od nově objevených receptorů cytokininů v plazmatické membráně, které jsou blízkce příbuzné dvoukomponentní sensorové histidinové kináze, jejíž funkce byla již dříve popsána u bakterií. Po aktivaci receptoru molekulou cytokininu dojde u tohoto receptoru k autofosforylaci a v dalším kroku k přenosu fosfátové skupiny na mobilní přenašeč signálu, kterým je protein označovaný zkratkou AHP. Ten pak vstupuje do jádra a po opakovaném přenosu fosfátové skupiny až na aktivační elementy (je jich celá řada typů) dojde k indukci transkripce.



Cytokininový receptor v plazmatické membráně a přenos signálu do jádra

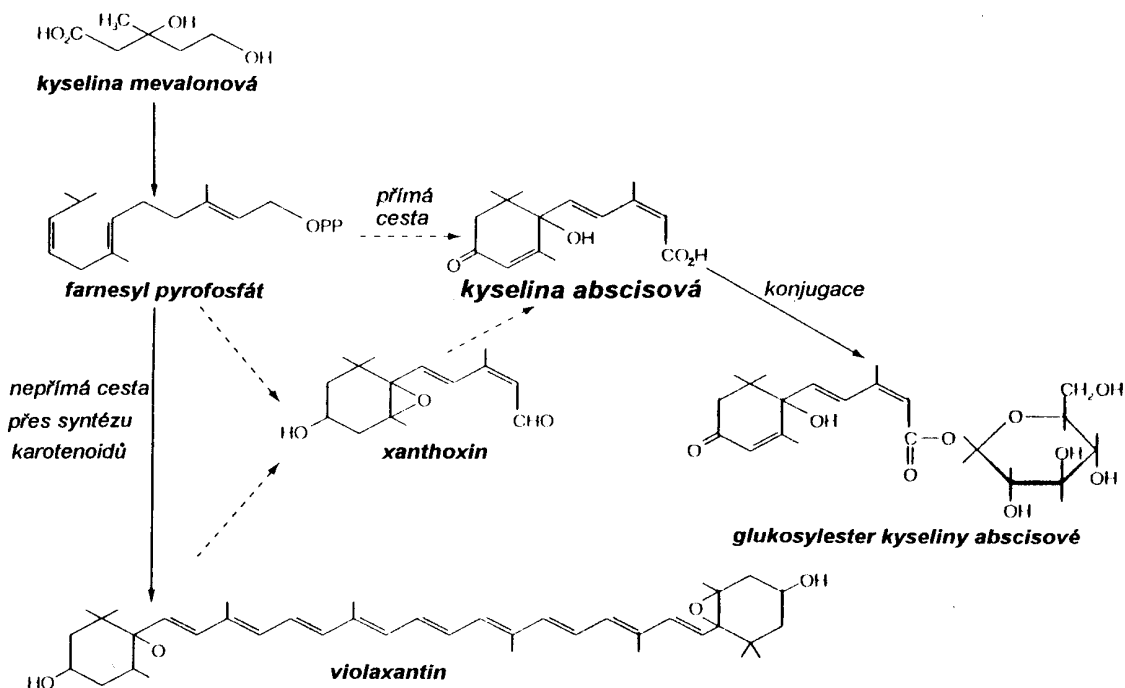
Hlavní účinek cytokininů na iniciaci a zrychlení celého cyklu při dělení buněk je pravděpodobně dosahován různými cestami. Jednou z nich je zvýšení aktivity některých proteinkináz, zapojených do řízení chodu buněčného cyklu. Významný je také vliv cytokininů na urychlení přepisu DNA a tím i na zkrácení syntetické fáze cyklu. Účinek cytokininů na dělení buněk je také podmíněn přítomností auxinů, které ovlivňují především iniciaci replikace DNA.

Kromě detailní analýzy jednotlivých složek celého mechanismu působení cytokininů máme mnoho údajů o růstových a vývojových změnách celých orgánů či rostlin po experimentálním navození určité hladiny cytokininů. Velká část jich byla získána při kultivacích meristémů či transgenních rostlin *in vitro*. Z nich je zcela zřejmá koordinace působení cytokininů s auxiny nejen při již zmíněném dělení buněk, ale především při jejich diferenciaci a tvorbě základů orgánů. Jen za určitého poměru koncentrací těchto dvou fytohormonů regenerují z kalusové kultury dokonale vyvinuté rostliny. Při převaze auxinů je preferována tvorba kořenů, nadbytek cytokininů vede pouze k tvorbě stonků a listů.

Kyselina abscisová

I když k objevu tohoto fytohormonu došlo mnohem později než u všech dosud probíraných skupin (až v roce 1963), vůbec to neznamená, že by snad byl méně významný. Stále zřetelněji se ukazuje, že kyselina abscisová (angl. *Abscisic Acid*, zkráceně **ABA**) je nejen velmi mocným regulátorem růstových procesů u všech vyšších rostlin, ale plní i další funkce související se zvýšením odolnosti vůči nepříznivým vnějším vlivům. Po chemické stránce se jedná o relativně jednoduchou sloučeninu - seskviterpenoid s 15 uhlíky v molekule.

Tvorba ABA v rostlině může probíhat jednak přímo z kyseliny mevalonové a farnesylpyrofosfátu, anebo (častěji) nepřímo štěpením některých *karotenoidů*, především *xanthoxinu*. U listů k tomu dochází v chloroplastech, u nezelených orgánů pak v jiných typech plastidů. Xanthoxin je pak postupně oxidován na ABA-aldehyd a vlastní ABA. Tyto procesy už nejsou vázány na plastidy, ovšem přesto u listů nacházíme největší množství ABA uloženo právě v chloroplastech. Je nutno poznamenat, že také sám xanthoxin má fyziologické účinky zcela podobné ABA, ovšem je velmi málo pohyblivý.



Možné cesty syntézy kyseliny abscisové v rostlinách

Z **fyzilogických účinků** ABA je potřeba na prvním místě uvést *zpomalení růstových procesů*. V těch částech rostliny, které vstupují do dormance (zejména pupeny na konci léta, ale i semena), pravidelně nacházíme velmi zvýšený obsah ABA, který se udržuje po dlouhou dobu. Ukončení dormance ale nemusí vždy korelovat s poklesem obsahu ABA, protože velmi záleží i na přítomnosti protichůdně působících stimulačních látek (zejména giberelinů) jejichž obsah se může v průběhu dormance zvyšovat a utlumit působení ABA.

Při *dozrávání semen* však ABA hraje prakticky vždy mimořádně významnou úlohu. V závěrečné fázi růstu embrya se obsah ABA ve všech strukturách semene výrazně zvyšuje a její účinky jsou jak inhibiční, tak i stimulační. Stimuluje *ukládání rezervních látek* v endospermu a také *tvorbu početné rodiny proteinů*, které jsou označovány jako LEA proteiny (*Late Embryogenesis Abundant proteins*). Ty jsou nutné pro uchování životaschopnosti embrya a buněk endospermu při jejich silné dehydrataci (vyschnutí) ve finální fázi tvorby semene. Inhibiční účinky ABA se projevují hlavně v *utlumení růstu embrya*, které již dosáhlo optimálních rozměrů. Další pokračování v růstu by totiž znemožnilo jeho správné uložení v semeni. Působením ABA je také zastavena tvorba giberelinů, které by bránily vstupu embrya do dormance.

Dříve uváděná důležitá úloha ABA při tvorbě odlučovací vrstvičky způsobující opad listů, květů a plodů není v současné době již považována za obecně významnou – uplatňuje se totiž jen u malého počtu druhů. Podstatně větší vliv na tento proces má tvorba etylénu. Nicméně podíl ABA na *zrychlené stárnutí* rostlinných orgánů (zejména listů) je zcela nepochybný, i když často se spoluúčastí etylénu. Stárnutí je provázeno postupným rozpadem proteinů, chlorofylu, nukleových kyselin a dalších snadno rozložitelných buněčných součástí provázené zvýšenou aktivitou hydrolytických enzymů.

Kromě regulace růstu má ABA mimořádně významnou úlohu v řízení mnoha dalších fyziologických procesů při působení stresových faktorů na rostlinu. Při nedostatku vody v listech (indikované mírným poklesem turgoru a vodního potenciálu buněk) koncentrace ABA velmi rychle vzrůstá (až 50x). Toto zvýšení vede k *zavírání průduchů*, a to často mnohem dříve, než by k němu došlo jiným způsobem. Zavírací reakce průduchů bývá dokonce pozorována již při počátku vysychání horních vrstev půdy, ačkoliv vodní potenciál listů je ještě dostatečně vysoký, pokud rostlina je schopna čerpat vodu z hlubších vrstev. Přenos informace z té části kořenové soustavy, která je vystavena začínajícímu suchu, do listů se děje nejčastěji *xylémovým transportem* ABA, a přispívá k němu i změna pH xylémové tekutiny. Ke zvýšení koncentrace ABA dochází také pod vlivem nízkých teplot a zasolení půdy. ABA je tedy významným *článkem obecné stresové reakce*, která vede (mimo jiné) i k *tvorbě „antistresových“ proteinů* zvyšujících celkovou odolnost. Tvorba ABA za zmíněných stresových situací bývá nejčastěji iniciována poklesem turgoru buněk.

Mechanismus působení ABA je značně různorodý, neboť je využívána k řízení procesů jak velmi rychlých (např. zavírání průduchů), tak i procesů relativně dlouhodobých (dokončování vývoje semen). Zvláště podrobně byl studován mechanismus působení ABA na pohyby průduchů, o kterém se původně předpokládalo, že patří k těm relativně jednodušším. Tyto předpoklady se však nesplnily, protože se ukázalo, že i při tomto regulačním působení může být v téže svěrací buňce využíváno více cest příjmu a přenosu signálu. Ty začínají u membránových receptorů (několika typů), od kterých je po zachycení molekuly ABA signál přenášen přes G-protein na fosfolipázy typu C či D. Jako navazující přenašeči signálu mohou působit (paralelně v různých cestách!) např. štěpný produkt membránových lipidů (IP₃), oxid dusnatý, či některé reaktivní formy kyslíku (H₂O₂), a ty pak iniciují otevření vápníkových kanálů. Vtok regulační dávky Ca²⁺ do cytosolu pak vede k inhibici protonové pumpy, depolarizaci plazmalemy, a k výtoku značné části osmotik a vody ze svěrací buňky. Už tak dost složitou situaci dále komplikuje existence přenosové cesty z membránového receptoru

bez aktivační účasti vápníkových iontů (fosforylačním mechanismem), a také existence mobilních vnitrobuněčných receptorů ABA.

Ke spuštění exprese genů (zejména pro „antistresové“ proteiny) pod vlivem ABA dochází nejčastěji cestou aktivace transkripčních faktorů (za účasti aktivovaných kináz a mikroRNA), přičemž prvotní signál může být přenášen jak od membránových, tak i vnitrobuněčných receptorů ABA. Může ovšem docházet i k inhibici aktivity některých genů (např. pro tvorbu hydroláz), taktéž na úrovni transkripce.

Praktické využití ABA není příliš časté. Někdy bývá používána formou postřiku či máčení k prodloužení dormantního stavu (bez prorůstání) bramborových hlíz při jejich uskladnění. Postřikem rostlin (polních plodin) lze také zvyšovat jejich odolnost ke stresům, tedy např. před očekávaným nástupem delších období sucha či nízkých teplot.

Etylén

Zařazení tohoto nejjednoduššího uhlovodíku s dvojnou vazbou (a navíc *plynu*) mezi fytohormony je poněkud překvapující, ale etylén svými fyziologickými účinky mezi ně rozhodně patří. Působení etylénu na růst rostlin bylo pozorováno již na začátku 20. století, zejména ve sklenicích vytápěných plynovými hořáky. Ale teprve až po úspěšném vývoji vysoce citlivých plynových chromatografů v šedesátých letech bylo možné dokázat, že hořením se uvolňuje také etylén, a mohl se provádět experimentální výzkum jeho působení.

Etylén produkují vyšší rostliny ve všech svých částech, dále řada hub (včetně hub žijících v půdě), a některé mikroorganismy. Zvláště velký výdej etylénu bývá zjišťován u dozrávajících plodů, u velmi mladých i u stárnoucích listů, a při působení různých stresových faktorů. Také poraněné rostlinné orgány zvyšují mnohonásobně produkci etylénu již v průběhu několika desítek minut.

Syntéza etylénu v rostlinách se odvozuje z cyklických přeměn aminokyseliny *methioninu* až na zvláštní kyselinu *1-amino-cyklopropan-1-karboxylovou* (ACC) za spotřeby energie jedné molekuly ATP. Ke konečné tvorbě etylénu z ACC je nutný i kyslík. Transport etylénu v rostlině probíhá nejčastěji prostou difuzí v intercelulárách. Cévními svazky po celé rostlině je rozváděna pouze ACC, která se také může hromadit ve vakuolách. Rychlost tvorby ACC (katalyzovaná enzymem ACC-syntázou) je hlavní reakcí, na které závisí konečné množství uvolňovaného etylénu. Velmi často bývá pozorován autokatalytický efekt, což znamená, že vyšší koncentrace etylénu dále zvyšuje rychlost jeho tvorby.

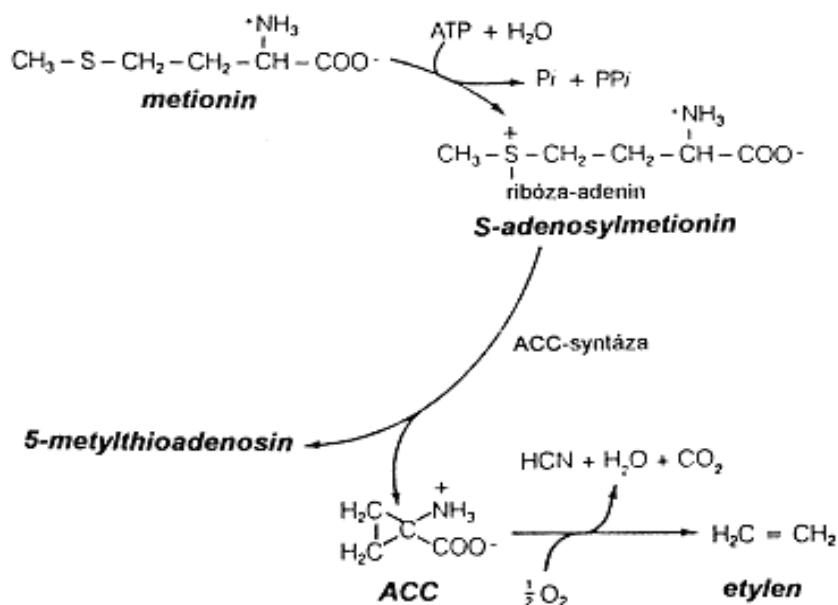


Schéma syntézy etylénu (5-metylthioadenosin je regenerován zpět na metionin).

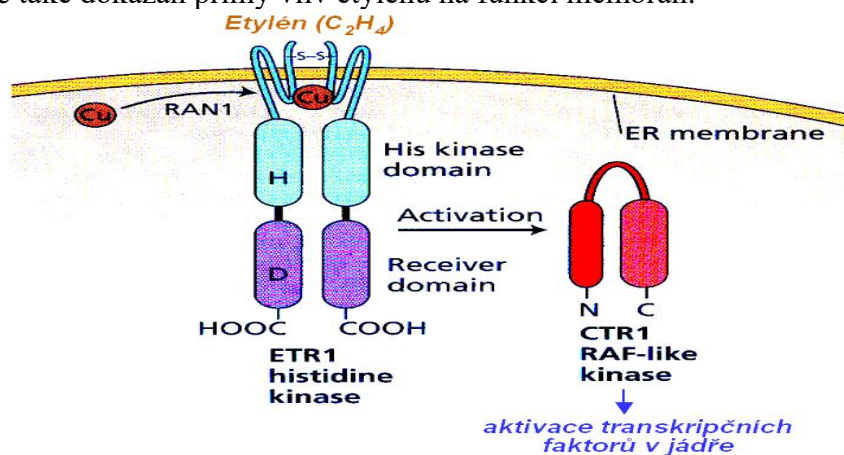
Jak již bylo uvedeno, k syntéze etylénu je nutný kyslík, a proto u orgánů v hypoxických podmínkách (např. u kořenů v zaplavených či udusaných půdách) by se měla tvorba etylénu snižovat. Přesto právě za těchto podmínek ale může dojít paradoxně k nahromadění etylénu v intercelulárách, neboť je velmi omezena možnost jeho difuze do vnějšího prostředí.

Fyziologické účinky etylénu jsou velmi rozmanité a někdy i poněkud protichůdné. Nejčastěji bývá pod jeho vlivem pozorováno *zpomalení dlouhivého růstu* stonků i kořenů a současně jejich tloušťnutí. Průvodním znakem těchto změn je jiná orientace mikrofibril celulózy v buněčných stěnách. Reakce buněk v některých částech orgánů však může být nestejná. To pak vede k obloukovitému zakřivení rostoucího orgánu, např. řapíku listů (*epinastie*). Někdy také dochází působením etylénu ke ztrátě gravitropismu. Známé jsou však i některé kladné účinky etylénu na růstové procesy: zrychluje dlouhivý růst některých vodních rostlin, vyvolává tvorbu adventivních kořenů a kořenových vlásků, *tvorbu odlučovací vrstvičky buněk v řapících listů*, a také může stimulovat klíčení semen.

Četné jsou i účinky etylénu na jiné oblasti chování rostlin, než je zmiňovaná rychlost růstu a morfogeneze. K nejvýznamnějším patří stimulace procesů souvisejících se *zrychlením zrání plodů*. Nejčastěji k tomu dochází díky významnému zvýšení aktivity enzymů hydrolyzujících polysacharidy (celulóza, pektinázy). Často velmi zrychlená tvorba těchto enzymů pod vlivem etylénu bývá pozorována nejen v plodech, ale i v jiných orgánech, a vede k velmi závažným změnám (např. lýtické zvětšování intercelulár v kořenech, opad listů, plodů a květů atd.). Podobně jako kyselina abscisová etylén *zrychluje stárnutí* všech orgánů, což vede k brzkému vadnutí květů či k rozkladu chlorofylu a rozpustných proteinů v listech. Na druhé straně může ale spouštět některé *obrané reakce* při působení stresových faktorů, např. tvorby specifických lýtických enzymů k zabránění průniku hyf patogenních hub.

Etylén může působit již ve velmi nepatrné koncentraci (asi $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$) a jeho tvorba může být někdy až překvapivě velká (např. v dozrávajícím jablku dosahuje koncentrace etylénu často více než $2000 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$!). Vzhledem k tomu, že se jedná o plyn, vzájemné ovlivňování rostlin pomocí etylénu je také docela dobře možné. Zvláště výrazné může být toto působení v prostředí s omezenou výměnou vzduchu, např. v půdě. Tam může docházet nejen k vzájemnému ovlivňování kořenů sousedních rostlin, ale také etylén produkovaný půdními mikroorganismy a houbami může ovlivňovat (převážně inhibovat) růst kořenů.

Mechanismus působení etylénu je dnes již znám poměrně dobře. Buněčným receptorem etylénu je obdobně jako u recepce cytokininů transmembránový protein typu dvousložkové *histidinové kinázy*, ovšem s několika zvláštními znaky. Jednak bývá umístěn v membráně endoplazmatického retikula, ale hlavně se jedná o dimer s centrálně navázaným kofaktorem *obsahujícím měď*. Další přenos signálu pokračuje přes několik postupně fosforylovaných proteinů až k aktivaci celé řady transkripčních faktorů v jádře a k jimi modulované genové expresi. Byl ale také dokázán přímý vliv etylénu na funkci membrán.



Receptor etylénu v membráně endoplazmatického retikula a začátek přenosu signálu.

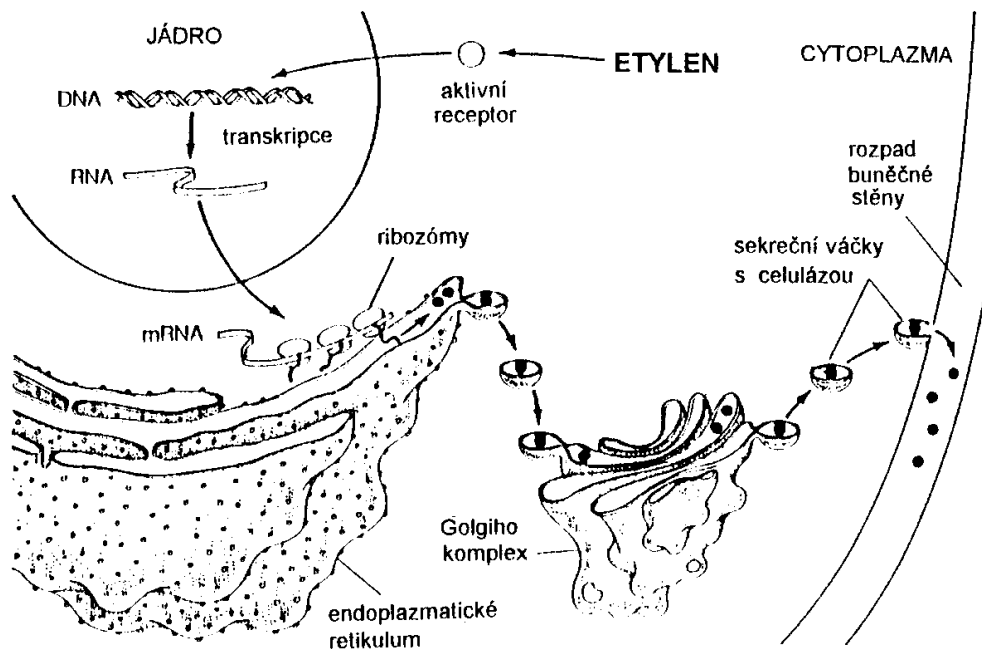


Schéma možného působení etylénu na rozpad buněčné stěny při dozrávání plodů.
Receptor etylénu bývá obvykle umístěn v membráně endoplazmatického retikula.

Praktické využití etylénu pro ovlivňování procesů v rostlinách souvisí v první řadě s regulací rychlosti *dozrávání plodů*. Pro urychlení zrání ovoce koncentraci etylénu ve skladových komorách zvyšujeme (zejména bývá využíváno u banánů, které se musejí sklízet a transportovat ve zcela nezralém stavu). Naopak, máme-li zájem na zpomalení zrání (při skladování jablek), pak etylén vytvářený ovocem musíme ze vzduchu odstraňovat (např. větráním či pohlcováním v roztoku manganistanu draselného). Tvorbu etylénu lze také zastavit v bezkyslíkatém prostředí (uložení ovoce v dusíkové atmosféře). Je nutno ale poznamenat, že *dozrávání plodů některých rostlin (např. ze skupiny citrusů) není provázáno zvýšenou tvorbou etylénu*, a tudíž se ani nedá uměle (uvedenými postupy) průběh jejich dozrávání ovlivnit.

Některé účinky etylénu nedovedeme zatím vysvětlit, i když jsou prakticky využívány. Jedná se zejména o indukci kvetení u broméliovitých (ačkoli u jiných rostlin etylén obvykle kvetení inhibuje!), a o výrazné zvyšování podílu samičích květů u tykvovitých (ve společném působení s IAA).

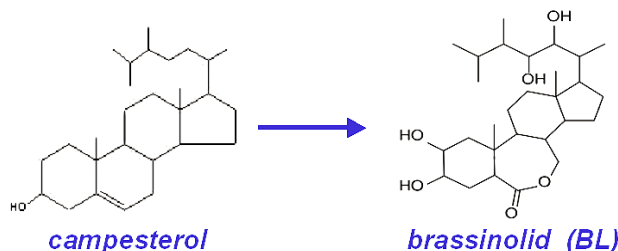
Brassinosteroidy

Existence steroidních hormonů u rostlin byla dlouho zpochybňována a jejich přesná identifikace a zařazení do „elitní skupiny“ základních fytohormonů byla provedena teprve nedávno. Látky se steroidní strukturou se sice vyskytují v rostlinách zcela běžně (např. jako součást membrán), ovšem dokázat jejich významné a mnohostranné zapojení do přirozené (nikoli tedy uměle navozené) regulace růstových procesů nebylo vůbec snadné.

První sloučenina tohoto typu, extrahovaná z pylu řepky (*Brassica napus*) v dostatečném množství pro stanovení chemické struktury, byla nazvána *brassinolid* (podle zdroje použitého pylu). O pylových extraktech bylo totiž již dříve známo, že stimulují růstové procesy. Další steroidní fytohormon (*castasteron*) byl izolován z hmyzích hálek na kaštanovníku (*Castanea crenata*), u kterých také byla hledána neznámá látka podporující jejich rychlý růst. Dnes je již známo více než 60 steroidních fytohormonů (souborně nazývaných jako *brassinosteroidy*).

Byl dokázán jejich výskyt v různých orgánech všech druhů rostlin z více než 30 čeledí které byly dosud analyzovány, a to včetně evolučně starých skupin nahosemenných rostlin a kaprad'orostů. Relativně největší koncentrace bývají nalézány v mladých orgánech, v pylu a v semenech, ovšem i tam se jedná o koncentrace extrémně nízké (řádově 10^{-12} až 10^{-9} M).

Syntéza brassinosteroidů je možná celou řadou biosyntetických drah, ovšem nejčastěji vychází z *campesterolu* či *sitosterolu*, což jsou nejhojnější steroly v membránách rostlinných buněk. Vždy se jedná o celý řetěz reakcí (redukce, hydroxylace, epimerace, oxidace) za účasti mnoha enzymů.



Struktura nejúčinnější brassinosteroidní sloučeniny brassinolidu a jejího prekursoru campesterolu

Fyziologické účinky brassinosteroidů jsou neobyčejně mnohostranné. Především se jedná o regulaci *růstových procesů*, obvykle v těsné synergické interakci s auxiny. Mají silný stimulační vliv na rychlost dělení i prodlužovacího růstu buněk, přičemž toto působení je spojeno jak s aktivací genové aktivity, tak i s přímou stimulací činnosti protonových pump, vedoucím ke zvýšení acidifikace (a tedy i roztažnosti) buněčné stěny. Obdobně jako auxiny jsou schopny působit na růst kořenů: v malé koncentraci stimulačně, ve větší inhibičně. Brassinosteroidy jsou zcela nezbytné pro *růst pylových láček*. Významná je i jejich úloha při *diferenciaci vodivých pletiv*, zejména stimulují tvorbu xylému (při nedostatku brassinosteroidů se více zmenšuje zastoupení xylému než floému). Další oblasti působení se týkají často pozorované *stimulace klíčení semen* a *zvýšení odolnosti vůči stresům* (mráz, nedostatek vody, zasolení, infekce) ovšem metodicky a interpretačně přesných prací v tomto směru je dosud velmi malý počet.

Mechanismus působení brassinosteroidů (BR) je v současné době intenzivně zkoumán. Víme již, že k příjmu signálu dochází zachycením molekuly příslušného BR specifickým receptorem umístěným v plazmatické membráně. Jedná se o homodimer zvláštního typu serin/threoninové kinázy (*BR1*) s velmi dlouhým extracelulárním řetězcem aminokyselin, na kterém jsou vazebná místa pro BR. Po navázání molekuly BR dojde na vnitrobuněčných úsecích téže kinázy k několikanásobné fosforylaci a následně pak ke komplikovanému přenosu signálu do jádra, tam pak k aktivaci transkripčních faktorů a tím i genové exprese. Brassinosteroidy jsou schopny aktivovat stovky genů v rostlinné buňce, z nichž část může být aktivována i auxiny, ovšem jejich koncentrace musí být podstatně vyšší (až 1000x).

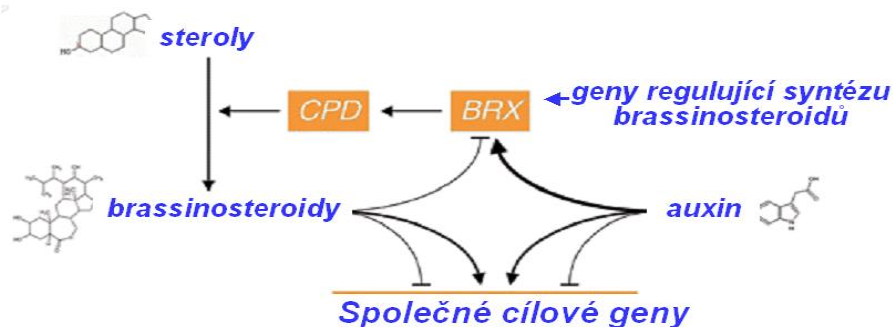


Schéma jednoho z možných mechanismů spolupůsobení brassinosteroidů a auxinů (v tomto případě zesilování účinku auxinů indukovanou tvorbou brassinosteroidů).

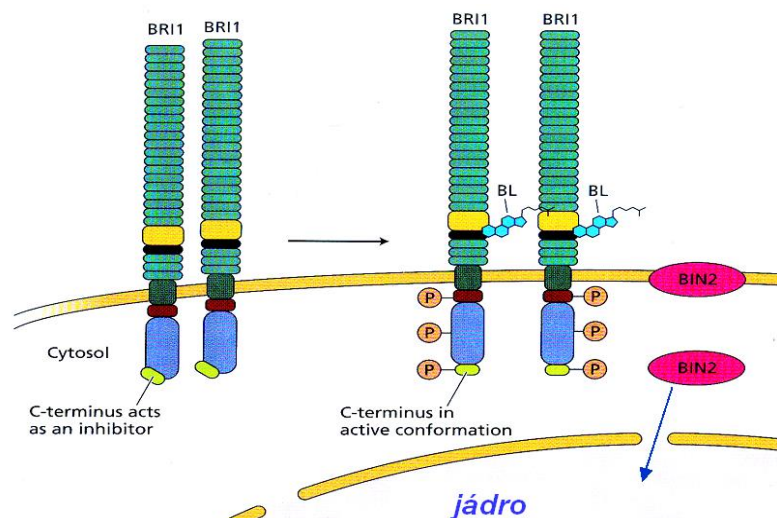
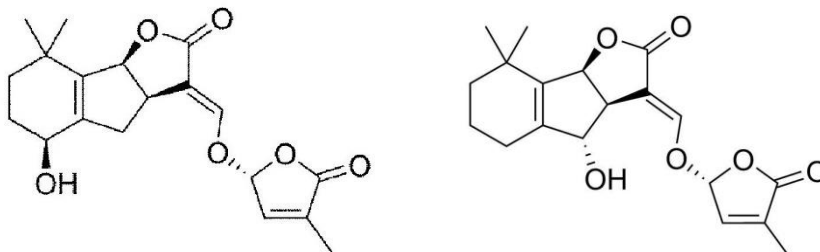


Schéma funkce brassinosteroidového receptoru v plazmatické membráně. Po zachycení dvou molekul brassinolidu (BL) dojde k fosforylaci na několika místech vnitrobuněčného úseku receptoru a následně k aktivaci dalších článků přenosového řetězce.

Praktické využití brassinosteroidů (vyráběných synteticky) není zatím příliš rozšířené, ale v dosud provedených polních pokusech bylo dosaženo značně nadějných výsledků. Po postřiku porostů některých polních plodin vhodnou koncentrací BR došlo ke zvýšení jak celkové tvorby biomasy, tak i některých kvalitativních ukazatelů. Zvláště významné bylo zvýšení odolnosti ošetřených rostlin k nepříznivým klimatickým podmínkám (mráz, sucho), i zvýšení odolnosti k napadení rostlin patogenními organismy.

Strigolaktony

Názorným příkladem možností nových, netušených objevů v růstové fyziologii je skupina terpenoidních sloučenin typu laktonů, která mezi základní fytohormony byla zařazena až v roce 2008. Ovšem již mnohem dříve bylo známo, že tyto metabolity jsou vylučovány do půdy z kořenů celé řady druhů rostlin. Ale také že jsou nezbytné pro klíčení semen některých jiných druhů (např. z rodů *Striga* či *Orobancha* - záraza), které parazitují na kořenech svých sousedů. Tento zdánlivě nesmyslný jev, kdy rostliny aktivně podporují růst svých parazitů, byl později uveden na přijatelnou míru experimentálně podloženým zjištěním, že hlavním účelem vylučovaných látek je stimulace růstu a větvení hyf mykorrhizních hub, a tedy i urychlení kolonizace kořenů těmito houbami. Bylo také dokázáno, že vylučování strigolaktonů se velmi zvyšuje za nedostatku živin v půdě (především fosforu), kdy mykorhiza je zvláště potřebná. Parazitické rostliny tedy pouze druhotně využily v průběhu koevolučního procesu vylučované specifické metabolity jako signál oznamující přítomnost vhodné hostitelské rostliny.



Nejběžnější strigolaktony: **strigol**

orobanchol

Další výzkum strigolaktonů, který už vedl k jejich zařazení mezi základní fytohormony, byl motivován zjištěním, že tyto sloučeniny se tvoří i v těch rostlinách, které nikdy mykorrhizní vztahy nevytvářejí (např. většina druhů z čeledi brukvovitých, včetně modelové

rostliny *Arabidopsis thaliana*). Také byl prokázán jejich transport z kořenů do nadzemních částí. Pak už tedy jen zbývalo dokázat, že mají i *jiné funkce, než jen regulaci procesů v okolí kořenů*. Rychlý pokrok v tomto směru byl umožněn zejména experimenty s celou škálou transgenních rostlin s poruchami tvorby či transportu strigolaktonů, dále stanovením biochemických cest jejich syntézy v rostlinách a určením genů spojených s procesy syntézy a transportu. Naše znalosti o funkci strigolaktonů však přesto stále ještě nejsou dostatečné.

Zvýšený obsah strigolaktonů v kořenech, indukovaný hlavně nedostatkem živin, *stimuluje tvorbu bočních kořenů a kořenových vlásků*. Současně ale dochází ke *zpomalení* růstu primárního kořene. Kořenový systém se proto rozrůstá více do šířky a vzrůstá hustota prokořenění půdy v okolí rostliny. **V nadzemních částech** strigolaktomy *inhibují zakládání či prorůstání bočních pupenů*. Rostliny jsou pak méně větvené či mají menší počet odnoží. Vytvářejí tak menší množství nadzemní biomasy a relativně více kořenů (ve srovnání s rostlinami se sníženým obsahem strigolaktonů, tedy např. těch, které rostou za dostatku živin). Z toho zřetelně vyplývá **základní úloha strigolaktonů: optimalizovat poměr mezi velikostí nadzemní a podzemní části rostliny v závislosti na vnějších podmínkách**, zejména za měnící se dostupnosti živin. Stimulace mykorhizní kolonizace kořenů strigolaktomy vylučovanými do půdy zajisté dále posiluje adaptační schopnosti rostlin k nedostatku živin.

Mechanismus působení strigolaktonů je dosud značně nejasný. Nejvíce toho zatím víme jen o jejich těsné návaznosti na regulační funkce auxinů a cytokininů. Strigolaktomy jsou schopny měnit rychlost jejich transportu, a tudíž i jejich koncentraci v různých orgánech či pletivech. Modifikují tak jejich aktivitu jako „*regulátor regulátorů*“. Existují však již spolehlivé důkazy i o jejich samostatném ovlivňování některých růstových procesů, bez spoluúčasti jiných fytohormonů, např. indukování meristematické aktivity v kambiu či stimulace růstu kořenových vlásků.

Syntéza strigolaktonů v rostlinách začíná štěpením karotenoidů. Nejčastějším místem syntézy jsou kořeny, odkud jsou rozváděny do nadzemních částí xylémem. V omezeném množství je však jejich tvorba možná i v nadzemních částech. Dosud bylo identifikováno přibližně 20 strigolaktonů, přičemž i v téže rostlině lze najít několik odlišných typů (např. u *Arabidopsis thaliana* je to orobanchol, orobanchyl acetát a 5-deoxystrigol). Jejich výskyt není omezen pouze na evolučně mladší taxonomické okruhy rostlin, lze je najít i u mechů.

Metodické přístupy ke studiu fytohormonů

Pokrok ve výzkumu fytohormonů byl a stále je velmi těsně závislý jak na vhodně zvoleném koncepčním přístupu, tak i na aplikaci vhodných metod, a to především metod biofyzikálních, biochemických a molekulárně biologických. Tradiční, převážně observační přístup se dnes již téměř nepoužívá. Spočíval ve stanovení vztahu mezi reakcí rostliny a obsahem fytohormonů v příslušných orgánech, či reakce rostliny po záměrné aplikaci fytohormonu na její jistou část. Výzkumné práce prováděné v současné době využívají převážně rostliny geneticky pozměněné (mutanti, transgenní rostliny) se zvýšenou či sníženou tvorbou určitého fytohormonu, nebo se zvýšenou tvorbou enzymů daný fytohormon rozkládajících či naopak uvolňujících z inaktivních forem.

V naprosté většině pokusů se vychází z předpokladu, že limitující je jen koncentrace fytohormonu, nikoli recepce a přenos signálu. Tento předpoklad ale nemusí být vždy správný. Další nepříjemnou komplikací pokusů bývá vzájemné ovlivňování několika současně přítomných fytohormonů, které lze stěží vyloučit. Některé fytohormony též mohou velmi rychle a vratně přecházet do méně aktivních či zcela inaktivních konjugovaných forem.

Aktivní koncentrace fytohormonů v rostlinách bývají velmi nízké (nejčastěji v rozmezí od 10^{-12} až po 10^{-6} M), a proto metody pro jejich stanovení musí být velmi citlivé, a navíc dostatečně selektivní. Vlastní stanovení obvykle začíná extrakcí z čerstvého vzorku a převedením do bezvodých organických rozpouštědel. Pak následuje pracná separace a čištění

(především chromatograficky). Ke konečné kvantitativní detekci vyčištěných vzorků se nabízí celá řada metod s velmi rozdílnou přesností. **Fyzikálně-chemické metody** zcela převládají, zejména vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) s různými typy detektorů, dále plynová chromatografie (GC), a to často ve spojení s hmotovou spektrometrií (GS-MS).

Imunologické metody mají extrémní citlivost, nedostižnou jinými postupy. Jejich širšímu využití však brání obtížná příprava a tím i vysoká cena specifických protilátek (*imunoglobuliny*, které jsou produkovány pouze živočišnými buňkami). Také nároky na čistotu extraktů jsou vysoké. Existuje řada modifikací imunologických metod s využitím radioizotopů či enzymů.

Biotesty jsou z hlediska selektivity a kvantitativního stanovení fytohormonů naopak nejméně přesné, ale přesto se i dnes občas používají, a to zejména pro posouzení *biologické účinnosti* fytohormonů. Jedná se hlavně o fytohormony vytvářející početné skupiny chemicky příbuzných sloučenin (např. gibereliny či cytokininy), které se mohou velmi podstatně lišit i za stejné koncentrace v mohutnosti svých účinků. Pro každou skupinu fytohormonů byly vypracovány standardní postupy na vhodných testovacích objektech (např. pro gibereliny rychlost růstu hypokotylu salátu). K biotestům se samozřejmě již nepoužívají hrubé extrakty z rostlinných orgánů, jak tomu bylo dříve, ale již separované a přesně definované sloučeniny.

3.3. Vnější faktory regulující růst

Růst každé rostliny v přírodě je ovlivňován desítkami nejrůznějších *vnějších* fyzikálně-chemických faktorů, které jsou navíc ve vzájemných interakcích. Zkoumat celý tento komplex je prakticky nemožné. Naštěstí významnost jednotlivých vnějších faktorů není stejná, a lze tedy přednostně studovat působení těch nejdůležitějších, ke kterým nepochybně patří *záření a teplota*.

Regulační funkce fytochromů

Záření je pro rostliny v první řadě zdrojem energie. V kapitolách věnovaných fotosyntéze bylo popsáno, jakým způsobem je fotosynteticky účinná část spektra rostlinou zachycena a využita. Vazba radiační energie do asimilátů je jistě základním předpokladem růstu, ale není to jediný způsob, jak záření může působit na růst. Záření je totiž pro rostliny nejen zdrojem energie, **záření je i zdrojem důležitých informací o vlastnostech prostředí**, ve kterém se nacházejí. Na základě těchto informací pak mohou usměrňovat růst, vývoj i pohyby jednotlivých svých částí takovým způsobem, aby bylo zajištěno přežití a reprodukce v daném typu prostředí. Informační význam nemá jen *množství* záření a *směr* ze kterého dopadá na rostlinu, ale i *spektrální složení* a *periodicita* (střídání světla a tmy v průběhu dne).

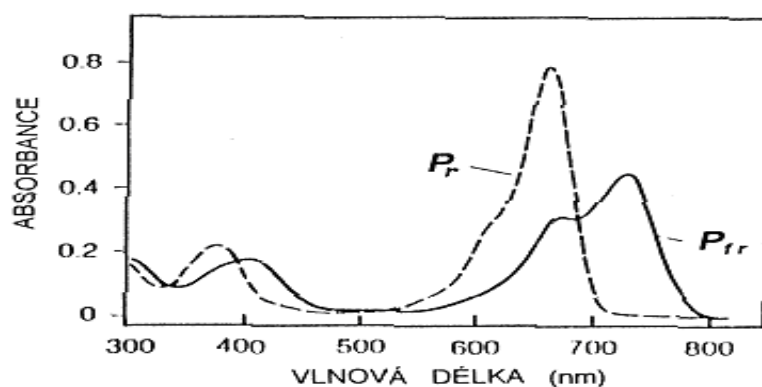
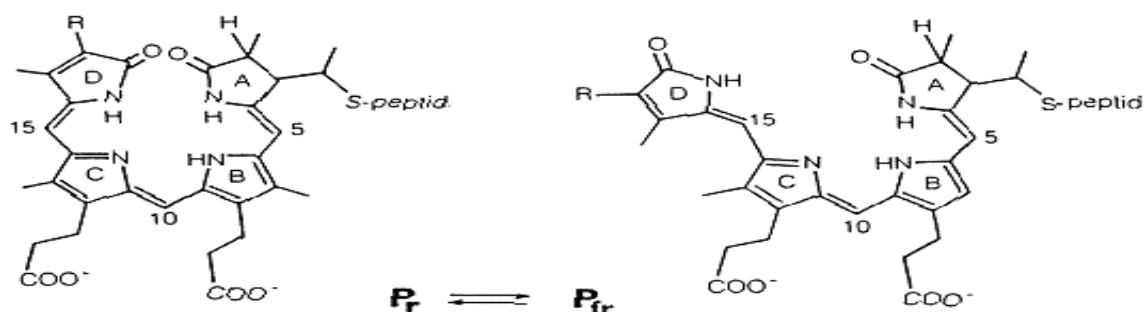
Aby rostlina vůbec mohla využít informace přenášené zářením, je nutná jeho absorpce, dále pak převod a zesílení přijatého signálu. Jako **fotoceptory** slouží specializované barevné sloučeniny (*pigmenty*). Některé z nich pohlcují převážně dlouhovlnné červené záření, jiné zase mají maximum absorpce v krátkovlnné oblasti (modrá a fialová část spektra).

Fytochromy jsou nejdůležitější, a také nejlépe prozkoumanou skupinou fotoceptorů. Jsou to *proteiny* (obvykle homodimery) volně pohyblivé v cytosolu, které mají kovalentně (přes sírný můstek) připojen *tetrapyrrolový lineární řetězec* (*fytochromobilin*). V důsledku přítomnosti této chromofórové skupiny mají charakter barviva (pigmentu) s velmi účinnou absorpcí některých složek světla. V každé rostlině se obvykle může vytvářet (v závislosti na podmínkách prostředí a ontogenetickém stádiu) několik různých fytochromů které mají **rozdílné proteinové nosiče (apoproteiny), zatímco chromofór je u všech stejný**. U dosud zkoumaných dvouděložných druhů bývá fytochromů nejčastěji pět (označovaných písmeny A, B, C, D, E), u jednoděložných byly dosud zjištěny jen tři (A, B, C).

Apoprotein u fytochromu A (který je v hojné míře syntetizován u rostlin za nedostatku záření či v úplné tmě) je značně specifický. Bývá též označován jako **typ I**. Strukturálně-funkční vlastnosti apoproteinů ostatních fytochromů, syntetizovaných u rostlin až po jisté době osvětlení (označované souhrnně jako *proteiny typu II*), jsou si značně podobné, i když v rostlinách plní i některé specifické funkce.

Chromofórový řetězec (fytochromobilin) je syntetizován v plastidech (dostí podobnou biochemickou cestou, jaká je využívána pro syntézu chlorofylu), pak je exportován do cytosolu, kde dojde k jeho autokatalytickému napojení na příslušný apoprotein.

Každý z uvedených fytochromů může vytvářet **dvě snadno vratné formy**. Základní forma všech typů fytochromů má světle modrou barvu a maximum absorpce ve spektrální oblasti **jasně červeného záření (660 nm)**. Označuje se zkratkou **P_r** (**Phytochrome - red**). V této formě jsou fytochromy rostlinami syntetizovány. Po ozáření světlem obsahujícím jasné červenou složku dojde v chromofóru k izomerační změně a barva fytochromu se změní na olivově zelenou s maximem absorpce v **tmavě červené oblasti (730 nm)**. Tuto druhou formu, označovanou jako **P_{fr}** (**Phytochrome - far red**) lze převést zpět na základní formu ozáření tmavě červeným světlem.



Chromofor molekuly fytochromu a absorpční spektra obou reverzibilních forem, **P_r** a **P_{fr}**.

Mezi oběma formami fytochromů jsou zcela zásadní rozdíly ve fyziologických účincích. **Procesy v rostlinách jsou aktivovány jen formou P_{fr}**. Rozdíly v účinnosti obou forem jsou dány změnami ve struktuře základního proteinu (ne v chromoforu), který funguje jako autokatalyzující proteinkináza (blíže bude popsáno v dalším textu).

K transformaci jisté části **P_r** na **P_{fr}** u vysoce citlivého fytochromu **A** postačuje velmi nepatrné množství záření s obsahem červené složky (asi 200 J m⁻², což je méně než 1 % přijaté energie z plného slunečního záření za dobu jedné minuty). Tato transformace však není úplná ani při delším ozáření jen jasné červeným světlem, což ostatně vyplývá z překryvu absorpčních křivek obou forem fytochromů. V rostlinách vystavených světlu se proto vyskytují obě formy fytochromů, ovšem jejich poměr se může měnit v závislosti na aktuálním spektrálním složení dopadajícího záření. **Forma P_{fr} je však velmi málo stabilní,**

proto i bez ozáření tmavě červeným světlem se u zatemněných rostlin samovolně vrací na P_r a částečně se také rozkládá.

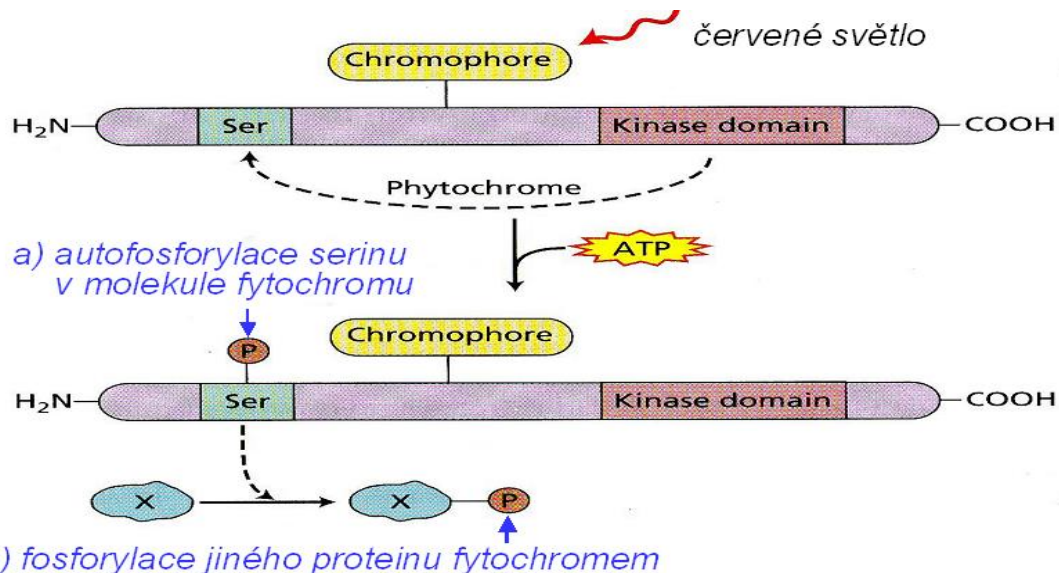
Je důležité si uvědomit, že fytochromy mohou rostlinám zprostředkovat *informace o několika odlišných vlastnostech vnějšího prostředí*, a sice:

(a) **zda se rostlina nachází ve tmě či na světle:** v tomto případě může postačovat jako spouštěcí signál pouze přítomnost i *velmi malého množství aktivní formy* fytochromů, které se vytvoří i při velmi slabém osvětlení (přesněji malou *dávkou* záření) bez ohledu na jeho spektrální složení. Mezi nejcitlivější reakce na přítomnost záření patří inhibice růstu stonku (u semenáčků hypokotylu či mezokotylu), tedy zabránění etiolace (nadměrného „vytahování“ zatemněných rostlin, pokud se např. při klíčení v půdě dostane výhonek nad její povrch). Reakci vyvolá již přeměna 0,02% z celkové zásoby fytochromů na aktivní formu.

(b) **jaké je spektrální složení světla v daném prostředí,** zejména jaký je poměr mezi zastoupení jasně červené a tmavě červené složky (R/FR). Tento poměr indikuje zejména stupeň zastínění daného místa jinými rostlinami (či hustotu porostu). Vlivem selektivní absorpce kratších vlnových délek (400-700 nm) asimilačními barvivy v listech má záření pod hustšími porosty výrazný nadbytek tmavě červené složky ($R/FR \cong 0,2$), zatímco na nezastíněných místech bývá $R/FR \cong 1$. Změny spektrálního složení světla ovlivňují **poměr** mezi množstvím aktivní a neaktivní formy fytochromů v rostlinách, a právě tento poměr může mít zásadní význam pro řízení celé řady fyziologických procesů zahrnujících klíčení semen, aktivaci mnoha metabolicky významných enzymů, a také morfogenetické procesy (zakládání nových odnoží a listů, řízení tvaru a velikosti listů a stonků, aj.). Rostliny tolerující zastínění (*sciofyta*) nemají tak citlivé reakce na pokles poměru R/FR, jak rostliny světlomilné.

(c) **jaká je délka dne či noci** (tedy délka světlé a tmavé periody v rámci denního cyklu), což je důležité pro řízení fotoperiodicky závislých procesů v rostlinách. Tato funkce fytochromů je propojena s vnitřní časomírou a bude podrobněji popsána v další kapitole.

Mechanismus působení fytochromů na fyziologické procesy je již vcelku uspokojivě prozkoumán. Přeměna neaktivní formy (P_r) do aktivní formy (P_{fr}) fytochromu je provázána autokatalytickou fosforylací (přenosem fosfátového iontu z ATP na jiné místo téhož proteinu) ze které pak může být přenášen na jiné proteiny a tím aktivovat jejich funkce). Fytochromy jsou tedy zářením regulované *proteinkinázy* (*serin/threoninového typu*), u kterých při fosforylaci dojde současně i k jistým koformačním změnám, usnadňujícím jejich transport do jádra a následnou aktivaci transkripčních faktorů a tím i genové exprese. Je ale známo, že fytochromovou signální cestou mohou být aktivovány i represory některých genů.



Znázornění funkce fytochromu jako autofosforylující proteinkinázy řízené světlem

I když většina aktivované formy fytochromů přechází do jádra, přesto jistá část zůstává v cytosolu (v těsné blízkosti membrán), kde může působit jako aktivátor některých rychlých procesů nezávislých na expresi genů. Zejména se jedná o aktivace metabolicky významných enzymů a transportních proteinů v membránách, včetně protonových pump. Tím může dojít ke zprostředkování např. světlem řízených změn v dlouhivém růstu, které jsou měřitelné již v průběhu několika minut.

Jak již bylo zmíněno na začátku této kapitoly, v každé rostlině je syntetizováno několik druhů fytochromů (s odlišným apoproteinem), a jejich zastoupení je různé v jednotlivých orgánech, a také se mění v průběhu ontogeneze. Každý z nich má v rostlinách poněkud odlišnou funkci (danou odlišností v biochemické reaktivitě), a proto popis mechanismu regulace určitého konkrétního procesu v rostlinách platí jen pro příslušný typ fytochromu, který je do něho zapojen. Detailní popis jednotlivých regulačních cest a regulovaných procesů je již mimo rozsah tohoto učebního textu – vždyť jen u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* je již známo několik tisíc genů, jejichž exprese je regulovaná zářením se zapojením fytochromové signální cesty. Náš výklad proto bude omezen jen na několik nejdůležitějších funkčních rozdílů.

Fytochrom A zprostředkovává hlavně reakce za velmi nízkých dávek záření (reakce VLFR (*very low fluence response*, viz rámeček), zatímco **fytochrom B** je hlavním mediátorem reakcí typu LFR a HIR. *Ostatní fytochromy (C, D, E) mají většinou jen přídatnou, orgánově specifickou funkci* (např. prodlužování řapíků listů, stonkových internodií), ale jsou také potřebné i pro fotoperiodické řízení tvorby květů. Naše znalosti o jejich funkcích však ještě zdaleka nejsou uspokojivé, protože se s jejich výzkumem začalo relativně nedávno.

Tři hlavní typy reakcí řízené fytochromy

VLFR (*very low fluence response*)

reakce, které jsou spouštěny již **přítomností nepatrného množství formy P_{fr}** (0.02% z $P_r + P_{fr}$), vytvořené již za extrémně malé dávky záření - od 0,1 nmol fotonů m^{-2} (např. inhibice růstu hypokotylu, reakce nejsou vratné!).

LFR (*low fluence response*)

reakce, které vyžadují **dostatečně vysoký poměr P_{fr}/P_r** , stačí však **malá dávka záření** (od 1 μ mol m^{-2} fotonů), jsou snadno vratné (např. stimulace klíčení).

HIR (*high irradiance response*)

reakce vyžadující **velkou dávku záření** (plné denní světlo **po dobu několika hodin**), např. deetiolace, syntéza chlorofylu. Nejsou citlivé na změny poměru P_{fr}/P_r , nejsou vratné, a na jejich řízení se podílí i receptory modrého záření.

Po dlouhou dobu bylo záhadou, proč reakce typu VLFR probíhají i při působení tmavě červeného světla (730 nm). K vysvětlení tohoto paradoxního jevu je nutné si uvědomit, že *konverze forem fytochromů není v žádné spektrální oblasti úplná*. Při ozáření tmavě červeným světlem se sice přemění 97% z celkového obsahu fytochromů do fyziologicky neaktivní formy, ale zbývající 3% zůstávají v aktivní formě (P_{fr}). Přitom *pro aktivaci reakcí VLFR stačí již velmi nepatrné množství formy P_{fr} (0,02%) z celkového množství fytochromů!*

Regulační funkce receptorů modrého záření

Kromě fytochromů je ve všech rostlinách přítomna ještě jiná skupina fotoreceptorů aktivovaná pouze krátkovlnným zářením. Jak bylo dokázáno přesným měřením akčních spekter, tento typ fotoreceptorů je citlivý nejen na modré a fialové světlo, ale i na část ultrafialového záření (UV-A), v celkovém rozmezí vlnových délek asi od **320** do **500 nm**. Izolace a identifikace těchto pigmentů byla (a stále je) obtížná, i když k nejvážnější kandidátům již delší dobu patřily flavoproteiny a karotenoidy. V současné době známe tři odlišné typy receptorů modrého záření: kryptochromy, fototropiny a zeaxanthin.

Kryptochromy jsou proteinové pigmenty blízké příbuzné *fotolyázám*, což jsou enzymy opravující poškození DNA po působení UV záření. Na bílkovinný nosič je navázána jednak molekula **FAD** (flavin adenin dinukleotid), ale také *pterin*. Kryptochromy v rostlinách nejčastěji zprostředkují *inhibici růstu stonku a hypokotylu po ozáření světlem s obsahem modré barvy*.

Fototropiny jsou zapojeny, jak již název napovídá, především do *regulace fototropických reakcí* (zakřivování částí rostlin vyvolané jednostranným ozářením, bude podrobněji popsáno v další kapitole). Podílí se ovšem i na některých dalších reakcích, zejména na celkové inhibici růstu stonku (ve spolupůsobení s kryptochromy) a na světlem aktivovaných vnitrobuněčných přesunech chloroplastů při náhlých změnách ozářenosti listů (slouží k omezení možné destrukce fotosyntetického aparátu nadbytečnou absorpcí záření). Fototropiny mají charakter autofosforylujících proteinkináz typu serin/threonin, ve kterých na nosný protein jsou navázány dva komplexy **FAM** (flavin adenin mononukleotid).

Zeaxanthin je karotenoid, který *hraje hlavní roli při světlem řízené otvírací reakci průduchů*. Zeaxanthin vzniká snadnou přeměnou z violaxanthinu v thylakoidních membránách chloroplastů. V mezofylových buňkách dochází k jeho tvorbě až při vysoké ozářenosti listů a jeho funkcí je chránit fotosyntetický aparát před destrukcí nadbytkem excitační energie. Ve svěřacích buňkách ale dochází k jeho tvorbě již při velmi malé ozářenosti (ráno za svítání), a jeho množství v průběhu dne stoupá či klesá paralelně se změnami záření. *Na aktuální koncentraci zeaxanthinu v chloroplastech svěřacích buněk závisí intenzita signálu, který je přenášen z chloroplastu k plazmatické membráně*, kde jsou jím aktivovány protonové pumpy (H^+ -ATPázy). Následná změna transmembránového potenciálu vede ke vstupu draslíkových iontů a vody do svěřacích buněk a k jejich rozevření zvýšeným turgorem.

Ekologické aspekty vlivu záření na klíčení, růst a morfogenezi

Světlo jako zdroj informace o vnějším prostředí ovlivňuje růst rostlin už od klíčení semen. Z přibližně jednoho tisíce dosud zkoumaných druhů bylo zhruba u dvou třetin zjištěno, že jejich semena jsou lépe klíčivá na světle než ve tmě. U semen zbývající třetiny buď nebyla zjištěna žádná závislost nebo byla naopak klíčivost světlem inhibována. Pokusme se nyní vysvětlit, jaké mohou být příčiny těchto jevů.

Jestliže zdravé ovlhčené semeno neklíčí, ačkoli vnější podmínky jsou pro klíčení příznivé, nachází se ve stavu **dormance** (někdy ovšem termín dormance bývá používán pro jakýkoliv klidový stav, tedy i pro případ suchých semen). Živá semena, která ani za dostatku vody, příznivé teploty a kyslíku, ale *bez přístupu světla neklíčí*, označujeme jako **fotodormantní**.

Již v klasických pokusech s fotodormantními semeny salátu, které vedly k objevu fytochromů, byl zjištěn rozhodující vliv červeného světla na jejich klíčení. Jak již dnes víme, přítomnost jistého množství aktivní formy fytochromů (**P_{fr}**), vytvořené z inaktivní formy (**P_r**) působením světla s významným podílem jasně červené složky, významně podporuje klíčení. V suchých semenech může být jisté množství aktivní formy fytochromů uloženo, někdy (zejména u drobných semen) ale nikoliv.

Tyto rozdíly jsou závislé hlavně na podmínkách, za kterých semena dozrávají. Pokud při dozrávání převažuje tmavě červená složka světla nad červenou (což je vždy, když světlo proniká k dozrávajícím semenům strukturami obsahujícími chlorofyl), pak po dozrání tato semena obsahují převážně jen neaktivní P_r a v důsledku toho jsou fotodormantní. Pokud jsou však při dozrávání příznivé podmínky pro tvorbu P_{fr} , pak bývá i větší množství této aktivní formy fytochromů v semenech uchováno. Taková semena pak mohou být po ovlhčení klíčivá i ve tmě (nejsou fotodormantní). Avšak i u těchto semen může někdy dojít k inhibici klíčení ze zcela jiných důvodů.

Spektrální složení světla bývá na různých stanovištích v přírodě velmi odlišné. Jak bylo již zmíněno, pod korunami lesních stromů, stejně tak i pod hustým listovým zápojem jiných porostů (louky, polní plodiny) je však až pětikrát více tmavě červeného světla (o vlnové délce 700 až 750 nm) než světla jasně červené barvy. Tím je snížen obsah aktivní formy fytochromů a tudíž to může vést k inhibici klíčení i těch semen, která leží na povrchu půdy. Je však nutno poznamenat, že citlivost k tomuto inhibičnímu působení je u různých druhů odlišná - u světlomilných rostlin je podstatně větší než u druhů snášejících stín.

Při hlubším studiu *fotodormance semen* nás nemůže uspokojit pouhé zjištění, že přítomnost aktivní formy fytochromů (P_{fr}) je pro klíčení nutná, ale ptáme se, proč je vlastně nutná, tedy jakým mechanismem ovlivňuje procesy spojené s klíčením semen. Pro kauzální analýzu je důležitý poznatek, že největší účinek má záření zachycené embryem (v oblasti hypokotylu a radikuly), nikoliv dělohami. Naše současná představa je taková, že klíčovou funkci má aktivní forma fytochromů obsažená v buňkách, které vstupují do fáze prodlužování. Působí stimulačně především na transportní proteiny v membránách. Po jejich otevření dojde k toku draslíkových iontů do buněk a tím i ke vzestupu jejich osmotického tlaku, což je předpokladem i pro zvýšení turgoru, na kterém prodlužování buněk závisí. Pokud je turgorový tlak nízký, semeno neklíčí. Stejně tak dobře může být důležitá i aktivace některých enzymů v cytosolu, a to fytochromy řízenou fosforylací.

Nelze zatím spolehlivě odpovědět na otázku, jak fytochromy při rušení fotodormance ovlivňují koncentraci a účinek fytohormonů. Jako velmi pravděpodobné se ukazuje ovlivnění tvorby giberelinů a cytokininů, o nichž je známo, že při aplikaci na dormantní semena mohou nahradit účinek P_{fr} . Také je možné uvažovat o vlivu aktivní formy fytochromů na odbourávání inhibitorů klíčení, především kyseliny abscisové.

Účinky světla na procesy spojené s *tvorbou jednotlivých orgánů a jejich růstu (morfogenezi)* jsou výrazné u mladých rostlin hned po vyklíčení. U trav je světlem zastavován růst mezokotylu i koleoptile, a současně je stimulováno rozvinutí stočených listů. Tyto procesy jsou řízeny fytochromovým systémem. Lze je navodit již velmi slabým červeným světlem. V tomto případě je zřejmě fytochromy stimulována tvorba giberelinů, či alespoň zvýšena citlivost některých buněk na jejich působení. Aplikací giberelinů totiž dosáhneme stejného efektu jako působením červeného světla.

U klíčících rostlinek dvouděložných druhů je jednou z prvních nápadných reakcí na světlo *narovnání ohybu hypokotylu* (i epikotylu). Tento ohyb je pravděpodobně vyvoláván působením etylénu, jehož syntéza je na světle zastavena. Působením světla se také zrychluje růst plochy listů i délka řapíku. Velmi rychle, často během několika hodin, dochází k tvorbě chlorofylu a plně funkčních chloroplastů z proplastidů, tedy včetně řádně fungujících thylakoidních membrán a enzymů nutných pro zabezpečení asimilačních procesů.

Nejen u semenáčků, ale i u dospělých rostoucích rostlin je světlem *zpomalována rychlost růstu stonku* a jiných nadzemních částí (např. listů trav). Na této inhibici se významně podílí oba systémy fotoreceptorů (fytochrom i kryptochrom). Modré světlo mívá často rychlejší a výraznější účinek.

Fotoperiodicky řízené procesy růstu a vývoje

V těch oblastech naší planety, kde v průběhu roku dochází k velkým a pravidelně se opakujícím změnám klimatických faktorů (což je kromě tropických oblastí téměř všude), je pro rostliny velice důležité, aby průběh jejich fyziologických funkcí byl synchronizován s ročními klimatickými cykly. Nestačí pouhé přizpůsobování se okamžitému stavu vnějších faktorů. Mnohé procesy v rostlinách potřebují ke zdárnému dokončení dosti dlouhou dobu (např. tvorba květů a dozrání semen), u některých je dokonce naprosto nezbytné, aby započaly ještě *před* vlastním působením kritického faktoru (např. zvýšení odolnosti vůči mrazu). Proto je pro rostliny tolik potřebná informace, *v jakém ročním období se nacházejí*. I v tomto případě hraje hlavní úlohu záření a jeho příjem fytochromovým systémem.

Nejspolehlivějším ukazatelem fáze ročního cyklu je pro rostliny rostoucí v téže zeměpisné šířce *délka světelné části dne (fotoperiody)* a její postupné změny (zkracování, prodlužování). Všechny reakce rostlin, které jsou závislé na jisté délce fotoperiody, nazýváme *reakce fotoperiodické*. Daleko nejpodrobněji byly tyto reakce zkoumány v souvislosti s tvorbou květů, ale velký význam má délka fotoperiody i na klíčení, rychlost růstu, tvorbu odnoží, translokaci asimilátů a mnohé další procesy.

Popis fotoperiodických závislostí v obecné rovině je mimořádně obtížný, neboť v nich panuje obrovská *mezidruhová variabilita*. Není divu, vždyť jednotlivé rostlinné druhy, a to i ty, které dnes rostou v přírodě pohromadě, často mají svůj původ v oblastech s odlišným radiačním režimem (daným zeměpisnou šířkou). Navíc, vzhledem k rozdílné rychlosti růstových a vývojových procesů, může mít pro ně informace o délce dne nestejnou důležitost. Co je však zvláště závažné, to je *rozdílná spojitost mezi délkou dne a klimatickou příznivostí* pro růst rostlin v různých oblastech naší planety. Tak např. zkracování délky dne je pro rostliny v našem klimatickém pásmu významnou informací o nástupu teplotně *nepříznivého období* (zimy), ale pro rostliny rostoucí v oblastech s mediteránním typem klimatu je to naopak informace o nástupu *období příznivého* pro růst, neboť po letním suchu bude konečně dostatek srážek.

Podívejme se nejprve na některé ***fotoperiodické závislosti kvetení***. Jen málo druhů zakládá květy zcela bez jakékoliv vazby na délku fotoperiody (*fotoperiodicky neutrální rostliny*, z běžně pěstovaných druhů např. rajče, okurka či fazol). Častěji se setkáváme s nároky na jistou délku dne (fotoperiody), a podle toho rozdělujeme rostliny na dlouhodobní a krátkodobní.

U rostlin ***absolutně (čili obligátně) dlouhodobních*** (např. ředkvička či špenát) dochází k tvorbě květů výhradně až po překročení určité minimální délky dne. Tato kritická délka dne je specifická pro různé druhy, ale obvykle bývá delší než 12 hodin. U ***fakultativně dlouhodobních rostlin*** se s prodlužováním délky dne pouze zvyšuje pravděpodobnost tvorby květů, avšak jisté procento jedinců vykvétá i za krátkého dne.

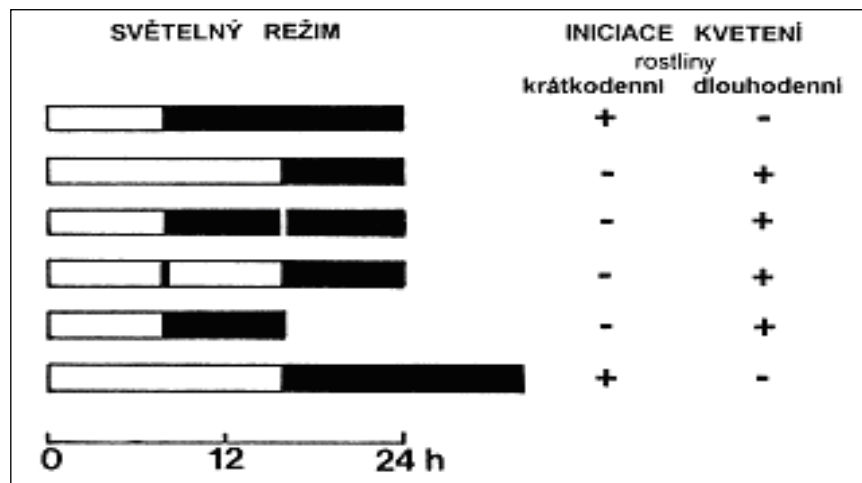
Dlouhá fotoperioda naopak inhibuje tvorbu květů u ***krátkodobních*** rostlin (např. některé druhy chryzantém, merlík bílý). Také zde se setkáváme s rostlinami absolutně a fakultativně krátkodobními. Nověji byly vyčleněny ještě další kategorie, jako např. rostliny ***dlouho-krátkodobní***, které vytvářejí květy sice za krátkého dne, ale pouze tehdy, jestliže předcházelo období s dlouhými dny (tedy jen na podzim a nikoli na jaře), i když aktuální délka dne může být v obou ročních dobách shodná. K takovým rostlinám patří např. *Bryophyllum crenatum*. Je potřeba ještě upozornit, že i různé *odrůdy* téhož druhu se mohou značně lišit ve svých nárocích na délku dne, některé mohou být krátkodobní a jiné dlouhodobní. Také teplota v průběhu kultivace může značně měnit fotoperiodickou závislost!

I v rámci téže kategorie fotoperiodické závislosti jsou velké mezidruhové rozdíly v počtu dní, který je nutný k navození reakce. V extrémním případě může být kvetení iniciováno *jediným* denním cyklem (např. u několika druhů trav, merlíků, okřehků aj.), většinou je však zapotřebí cyklů několik.

Při fenomenologickém výzkumu fotoperiodismu bylo provedeno obrovské množství pokusů, ve kterých se zejména využívalo rostlin s kvetením absolutně závislým na fotoperiodě a navíc s jednodenní indukční dobou, jako např. merlík červený (*Chenopodium rubrum*), nebo řepeň durkoman, (*Xanthium strumarium*). Bylo dokázáno, že pro krátkodenní rostliny, ke kterým patří právě merlík a řepeň, není důležitá délka světelné části dne, ale musí být přesně dodržena **dostatečná délka noci**. Ta navíc nesmí být přerušena ani krátkým osvětlením světlem které obsahuje červenou část spektra (tedy např. běžným denním či umělým světlem bez selektivních filtrů). Pokud by ovšem následoval osvit tmavě červeným světlem, indukce kvetení by proběhla normálně. **Účast fytochromů** v řízení fotoperiodických reakcí byla dokázána i v jiných typech pokusů.

Jak se dalo očekávat, přerušení "dne" krátkým zatemněním bylo téměř vždy bez účinku (krátké zatemnění nemá vliv na změnu forem fytochromů). Zato krátký osvit v průběhu noci působil i na dlouhodenní rostliny - ovšem opačně než na krátkodenní - vedl k indukci kvetení.

Pro vysvětlení mechanismu fotoperiodické stimulace či inhibice zakládání květů bychom v první řadě potřebovali znát jakým způsobem vlastně rostlina "měří" délku dne či noci. Jednou z možností se zdála být postupná autoreverze P_{fr} na P_r , ke které dochází ve tmě. K indukci fotoperiodické reakce by pak mohlo být důležité dosažení jistého poměru mezi P_{fr} a P_r či úplná absence formy P_{fr} . Jak již víme, narušení tmavé periody světlem, při kterém se rychle mění poměr mezi P_{fr} a P_r , má pro fotoperiodickou reakci vždy vážné následky.



Iniciace kvetení (+) u krátkodenních a dlouhodenních rostlin za různého světelného režimu.

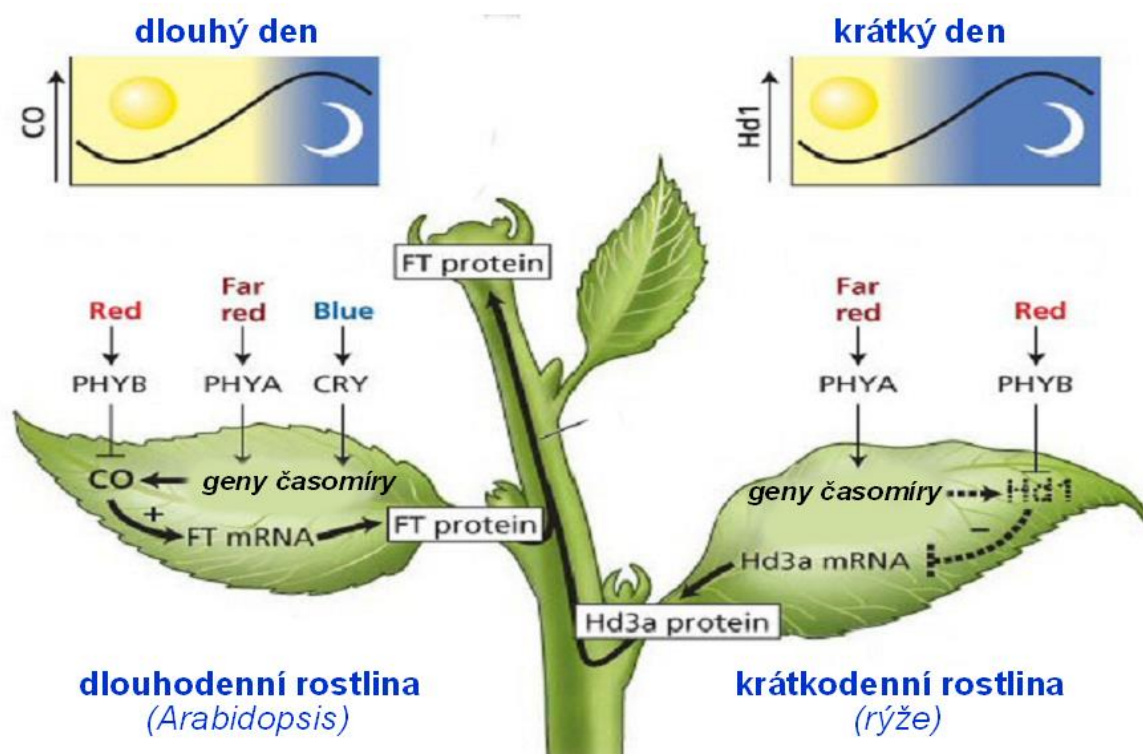
Podrobnější analýza výrazných vnitřních výkyvů v citlivosti k fotoperiodické indukci (např. při uměle prodlužované temné periodě či při narušování temné periody krátkým osvětlením v různou dobu od začátku zatemnění) ukázala, uvedený řídicí systém typu "přesýpacích hodin", navíc spoléhající pouze na poměrně jednoduchou reakci, nemůže uspokojivě vysvětlit řízení všech fotoperiodicky závislých dějů. Účast fytochromového systému je zajisté nezpochybnitelná, ovšem jeho k jeho řídicí funkci bude ve většině případů fotoperiodicity nutná spolupráce s vnitřní časomírou oscilátorového typu ("*biologické hodiny*", blíže v další kapitole).

Rouškou tajemství byl dlouho také zahalen způsob **tvorby a přenosu signálu pro kvetení** uvnitř rostliny. Bylo bezpečně prokázáno, že fotoperiodická indukce tvorby květních základů neprobíhá přímo v apikálním meristému. *Délku dne (respektive noci) detekují listy a informace musí být do meristému nějakým způsobem přenesena*. Skutečnost, že jde o látkový přenos, bylo možné dokázat např. roubováním neindukovaného vrcholu na indukovanou rostlinu, či stanovením doby nutné k přenosu indukčního signálu (řádově hodiny). Spekulovalo se o existenci zvláštní látky (pracovně označované jako "*florigen*"), avšak úsilí o jeho izolaci dlouho nebylo korunováno úspěchem.

To pak vedlo k názoru, že na indukci květů se asi podílí současně více látek (fytohormonů i jiných metabolitů) ve vzájemné interakci. Soustředěným úsilím několika vědeckých kolektivů a s použitím moderních metod molekulární biologie se konečně podařilo mnohé z uvedených záhad vyřešit. Bylo dokázáno, že skutečně specifická sloučenina indukující tvorbu květů ("florigen") existuje, má bílkovinnou povahu, a navíc je u dlouhodobých rostlin jiná než u krátkodobých.

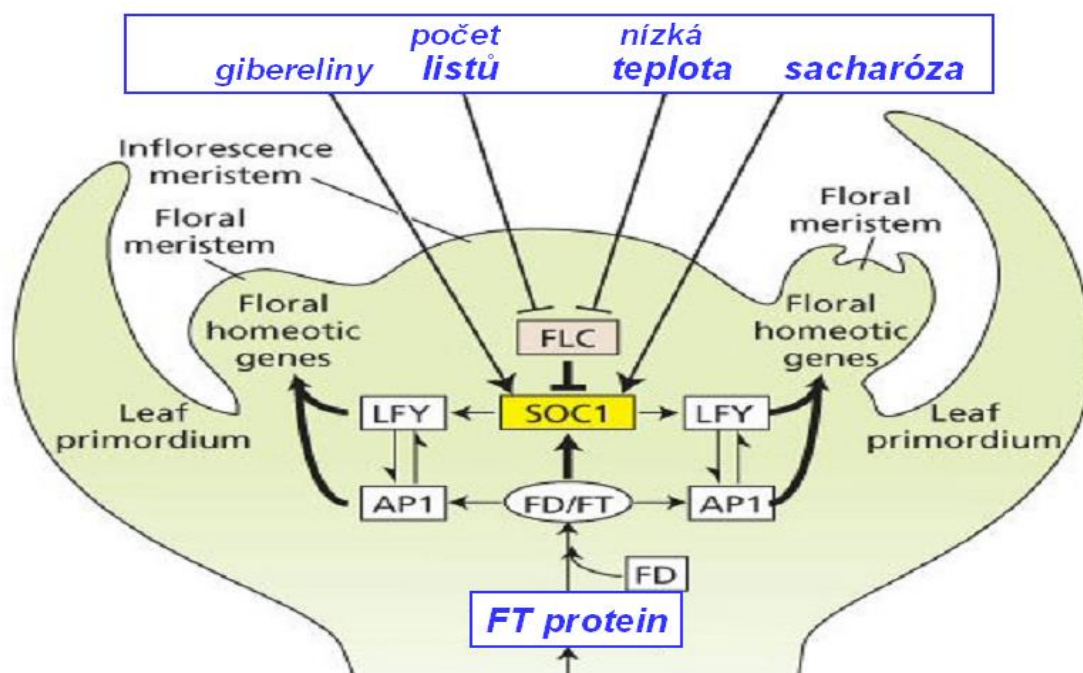
Proces fotoperiodické indukce kvetení skutečně vždy začíná v listech, a sice rytmickými změnami obsahu specifických proteinů, jejichž tvorba je převážně řízena vnitřní časovírou. U **dlouhodobých rostlin** (např. *Arabidopsis thaliana*) se jedná o protein označovaný zkratkou svého kódujícího genu **CO** (**CONSTANS**). Jeho tvorba se začíná zvyšovat až ve druhé polovině diurnálního (24h) cyklu, a v průběhu noci dochází k jeho rozkladu (což je řízeno fytochromy). Pokud k nástupu „noci“ dochází později (za dlouhé fotoperiody), pak dochází k mnohem většímu nahromadění proteinu CO než za krátkého dne. Protein CO stimuluje aktivitu genu **FT** (**FLOWERING LOCUS T**), a tím i tvorbu dalšího typu proteinu (**FT protein**). Ten je z listů transportován lým do apikálního meristému prýtu, a tam je schopen (je-li v dostatečném množství, tedy za dlouhého dne), indukovat procesy vedoucí k tvorbě základů květů. Plní tedy úlohu dlouho hledaného mobilního přenašeče signálu („florigenu“) mezi listy a apexem. Ovšem má to ještě jeden háček – k indukci růstu květů dojde až po spojení proteinu FT s dalším proteinem (označovaným jako FD), který se tvoří přímo v apikálním meristému.

U krátkodobých rostlin (modelovou rostlinou bývá rýže) je situace poněkud odlišná. V listech se na světle také vytváří specifický protein (označovaný zkratkou **Hd1**), jehož nahromadění je opět větší za delší fotoperiody, jenže (na rozdíl od analogického proteinu CO u dlouhodobých rostlin), je tento protein *inhibitorem* exprese funkčně navazujícího genu (**Hd3a**). Čím kratší je tedy fotoperioda, tím méně se vytváří inhibitoru **Hd1**, a tím více je syntetizováno proteinu **HD3a**, který u krátkodobých rostlin plní úlohu mobilního přenašeče signálu pro tvorbu květů z listů do apikálního meristému.



Schématické znázornění tvorby a přenosu fotoperiodického signálu z listů do apikálního meristému prýtu. Bližší popis je uveden v textu.

Iniciace tvorby základů květů v apikálním meristému není ovšem proces jednoduše závislý jen na dostatečném přísunu mobilních proteinů (FT či Hd3a) z listů. Jak je patrné z následujícího obrázku, tyto proteiny nejsou jedinými možnými iniciátory květotvorného procesu. Dnes už víme, že signál přenášený z listů může ovlivňovat květotvorbu nejen po spojení s proteinem FD, ale často podléhá vlivu (stimulačnímu či inhibičnímu) několika dalších regulačních proteinů tvořených přímo v apikálním meristému.



FT protein po transportu z listů se v apikálním meristému spojuje s proteinem FD a vytváří tak regulační komplex FD/FT, který je schopen aktivovat květotvorný gen LFY, ovšem nepřímou, a to buď cestou přes aktivaci genu API, či přes aktivaci genu SOC1. Druhá cesta je využívána i při působení jiných faktorů, schopných za jistých okolností indukovat tvorbu květů, zejména vnější vernalizační signál (při působení nízkých teplot) a vnitřní (autonomní) signál, vznikající při dostatečném počtu listů. Oba tyto signály působí inhibičně na expresi genu FLC, jehož produkt je inhibítorem genu SOC1. Gibbereliny a vyšší obsah sacharózy jsou schopny indukovat kvetení přímou aktivací genu SOC1.

Délka fotoperiody ovlivňuje kromě kvetení i celou řadu dalších procesů, zejména rychlost růstu. Mnoho druhů bylin i dřevin z mírné (temperátní) zóny má **zpomalený růst za krátkých dní** (a to i když úhrnné množství záření a jeho spektrální složení udržujeme v pokusech na stejné výši jako za dlouhých dní!). Obvykle je toto zpomalení růstu v těsné souvislosti se zvýšením odolnosti vůči mrazu. Také u jiných druhů rostoucích ve středoevropských a v severněji položených oblastech můžeme pod vlivem krátkých dní pozorovat změny v aktivitě fytohormonů vedoucí k indukci celého komplexu fyziologických reakcí, označovaného jako "**podzimní syndrom**" (např. zastavení tvorby chlorofylu, rychlé stárnutí a opadávání listů, dormance pupenů, atd.). Zvláště časté je spolupůsobení nízké teploty, na které se nyní podíváme trochu podrobněji.

Vliv teploty na růst a vývoj

Růst naprosté většiny rostlin probíhá jen v poměrně úzkém teplotním rozmezí zhruba od 5 do 40 °C. Negativní účinek nízkých teplot (mrazu a chladu) a příliš vysokých teplot souvisí především s teplotní závislostí biochemických reakcí, s poruchami funkce membrán a s inaktivací enzymů. Jde tedy o *stresové účinky, které budou souhrnně popsány ve 4. části tohoto učebního textu.*

Působení nízkých teplot však může mít také **příznivý vliv na průběh růstu a vývoje**. U mnoha druhů rostlin z oblastí s výrazným ročním kolísáním teplot jsou nízké teploty v určité vývojové fázi přímo existenčně nutné, neboť na nich závisí tvorba květů, zrušení dormance semen a pupenů, vývoj hlíz, cibulí a některé morfogenetické procesy. Ve všech případech jde o takové působení, jehož účinek není pozorovatelný ihned, ale až s jistým zpožděním.

Vernalizace patří k nejlépe známým pozitivním účinkům nízkých teplot. Označujeme tak proces, kdy pupeny některých druhů rostlin jen pod vlivem zchlazení jsou schopny přejít do fertilmního stádia, tedy vytvořit květní orgány. Vernalizace se vztahuje dokonce i na semena řady druhů, která pouze při uložení za nízkých teplot (ve zvlhčeném stavu) jsou schopny po vyklíčení dát vznik fertilmním rostlinám. Požadavky různých druhů na nízké teploty se však značně liší. Velmi vyhraněné nároky mají nejen jednoleté druhy, a také rostliny dvouleté. **Pro přechod do reprodukční fáze dvouletek jsou nízké zimní teploty absolutně nutné**, zatímco závislost jednoletek je obvykle jen kvantitativní (fakultativní). Nízké teploty u nich zvyšují pravděpodobnost kvetení, a také urychlují jeho začátek. U mnoha vytrvalých rostlin je iniciace kvetení vázána nejen na nízkou teplotu, ale současně i na krátkou fotoperiodu.

Velké množství pokusů bylo zaměřeno na zjištění optimální teploty pro vernalizační procesy a nezbytnou dobu trvání těchto teplot. Byla zjištěna obrovská variabilita mezi druhy, avšak nejčastější hodnoty **účinné teploty** leží v rozmezí 0 až 10°C. Minimální doba působení těchto teplot kolísá od 4 do 8 týdnů, saturační doba pak od 4 týdnů do 3 měsíců. Účinkem vysokých teplot (20 až 30 °C, někdy i více) bezprostředně po působení nízkých teplot je možné indukci kvetení zrušit (**devernalizace**), ovšem jinak vernalizační signál v indukovaných semenech či pupenech se uchovává po celé mnohaměsíční období vynuceného vegetačního klidu.

Bylo dokázáno, že působení nízkých teplot není zprostředkováno jinými částmi rostliny, ale **k recepci dochází přímo v apikálním meristému** (v pupenu či u semen v apikálním meristému embrya), který převádí do stavu "kompetence" pro následné květovorné procesy. **Mechanismus vernalizačního procesu** zdaleka není ještě uspokojivě znám, ale je téměř jisté, že se bude jednat o celou řadu druhově odlišných mechanismů. Kromě možné spoluúčasti giberelinů, jejichž koncentrace v meristémech se v průběhu vystavení nízkým teplotám zvyšuje, se nejčastěji uvažuje o epigenetické regulaci „květovorných“ genů (stabilní změny ve způsobu exprese těchto genů po působení nízkých teplot), jak již bylo dokázáno u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Tím lze vysvětlit i dlouhodobé přetrvávání "květuschopnosti" v indukovaných meristémech.

Dormance semen (klidový stav se zcela zablokovanou růstovou aktivitou) je dalším významným životním projevem rostlin, při jehož indukci kterém hraje **kromě fotoperiody i nízká teplota** významnou úlohu. Nejde ale jen o **navození vstupu** do dormantního stavu nízkou teplotou, ale také o **jeho překonání** (tedy pokračování v růstu), a to opět pod vlivem jisté doby působení nízkých teplot. V průběhu působení chladu byla v semenech pozorována celá řada biochemických změn, např. rozklad zásobních tuků a proteinů, hromadění škrobu i osmoticky aktivních cukrů. Je však obtížné v těchto změnách najít příčinnou posloupnost. Pozoruhodný je vzestup koncentrace giberelinů a je dokázáno, že dochází i k **odbourávání některých inhibitorů**, zejména kyseliny abscisové .

Dormance pupenů může být také indukována nízkou teplotou, avšak je známo, že k ní často dochází už v letních měsících (např. u stromů) pod vlivem zkracování délky dne. Pro zrušení dormance bývá u některých druhů významná fotoperioda (dlouhý den), u jiných jen nízká teplota ale velmi často musí být splněny oba požadavky (dlouhý den po období s nízkou tepotou).

Navození i zrušení dormantního stavu je vyvoláno přímým působením teploty či záření na příslušný pupen a není převoditelné z jednoho pupenu na jiný (neošetřený). Také délka fotoperiody aktivuje přímo pupen (např. u dřevin v bezlistém stavu), ačkoli ve vegetačním

období jsou listy pro příjem informace o fotoperiodě naprosto nutné. Nejúčinnější teploty pro zrušení dormance bývají v rozmezí 0 až 10 °C a minimální doba působení několik týdnů. Existují ovšem velké rozdíly jak mezi druhy, tak mezi ekotypy téhož druhu.

Rychlého zrušení dormance lze mnohdy úspěšně dosáhnout aplikací giberelinů, působením par některých těkavých látek, a také ponořením příslušné části rostliny do teplé vody (40 až 50 °C) po dobu asi 15 sekund.

Pro urychlení vývoje některých *okrasných cibulovin* (např. tulipánů) byly vypracovány přesné postupy založené pouze na změnách teplotního režimu během podzimních měsíců, které umožňují "načasovat" dobu rozkvetu na žádaný termín.

Vliv denního kolísání teplot (*termoperiodismus*) na rostliny je poměrně malý. Jen velmi zřídka jsou větší teplotní výkyvy nutnou podmínkou pro iniciaci kvetení. Spíše jen zrychlují růst, zvyšují počet květů (např. u rajčat), u brambor zvyšují počet tvořených hlíz.

3.4. Pohyby částí rostlin a vnitřní rytmy

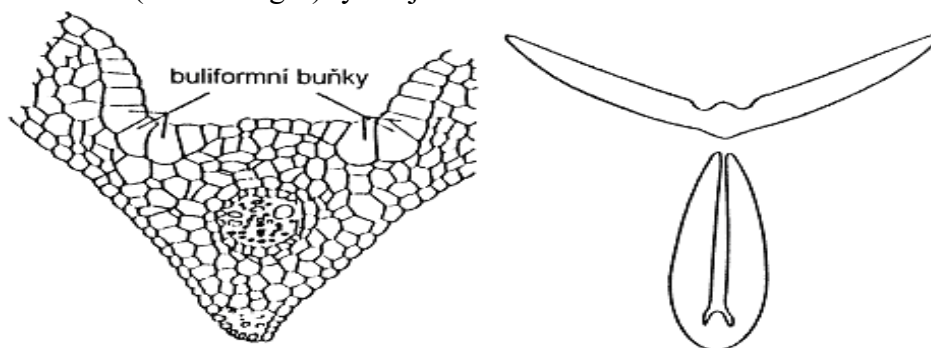
Rostliny jsou sice většinou trvale přisedlé organismy, avšak jejich orgány mají obvykle schopnost jistého pohybu (ve smyslu trvalé či vratné změny jejich prostorové orientace, tedy různé ohyby, náklony, otáčení, ale i ovíjení). Tato schopnost je nejen velmi významná pro úspěšné přežití v měnícím se prostředí, ale navíc neobyčejně nápadná. Snad právě proto byly pohyby rostlin zkoumány už v samém počátku rostlinné fyziologie a jejich výzkum pokračuje i v dnešní době. Přesto zůstává stále mnoho nedořešeno.

V našem přehledu si podrobněji probereme pouze dvě hlavní skupiny pohybů: nastie a tropismy. Pomineme tedy pohyby vnitrobuněčné (proudění cytoplazmy, pohyby organel), lokomoční pohyby některých nižších rostlin a specializovaných buněk (taxe), a také veškeré pohyby neživých částí rostlin, způsobované čistě fyzikálními procesy.

Nastie

Jako nastie označujeme takové pohyby, jejichž směr není určen směrem působení podnětu. Většina nastických pohybů má reverzibilní charakter, neboť je způsobována změnou tvaru buněk v motorických zónách, nikoliv nevratným růstem.

K nejjednodušším pohybům patří *hygronastie* u listů mnoha druhů trav, a to zejména těch, které rostou na suchých stanovištích. Podélné složení či svinutí jejich listů za nedostatku vody je způsobováno změnou turgoru skupin buněk na adaxiální straně. Tyto buňky (označované jako buňky *buliformní*) jsou většího rozměru a mají velmi slabou kutikulu. Ztrácejí tudíž vodu (a tím i turgor) rychleji než ostatní.

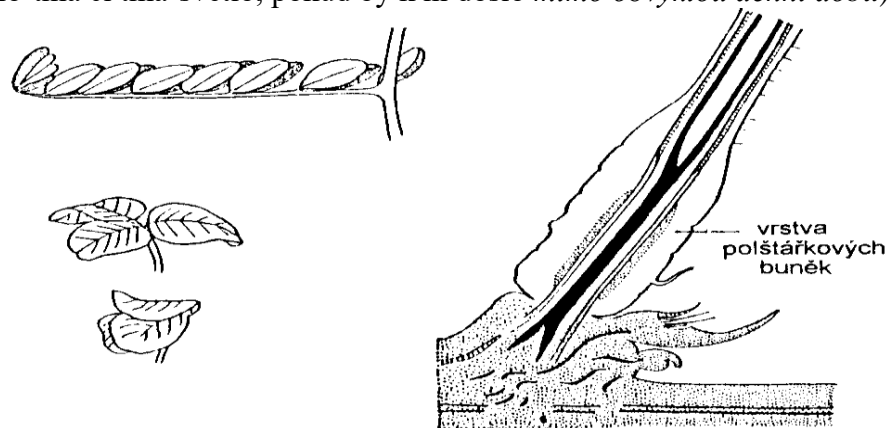


Hygronastické pohyby (skládání listů) u xerofytních druhů trav.

Složitější, i když velmi dobře prozkoumané, jsou *nyktinastie* ("spánkové" pohyby) u řady druhů se složenými listy (např. z čeledi *Fabaceae* a *Mimosaceae*). Poloha listů (přesněji řečeno prostorová orientace roviny, ve které je umístěna listová čepel) se u těchto rostlin pravidelně každý den dvakrát mění: ve dne bývá přibližně horizontální, v noci téměř

vertikální. Na bázi řapíků celého listu i jednotlivých lístků, tedy v místech, kde dochází k aktivně řízeným ohybům, lze pozorovat zvláštní vrstvy buněk ("polštářky").

Pohyb listu je způsoben *vzrůstem turgoru v polštářkových buňkách na jedné straně řapíku a současně poklesem turgoru v buňkách na opačné straně*. Změny turgoru jsou způsobeny přesunem vody, kterému předchází přesun osmoticky aktivních látek (zejména K^+ , tedy obdobně, jako při pohybech prūdchů. A také zde je transport draslíkových iontů podmíněn zrychleným transportem H^+ , po *aktivaci protonových pump* v plazmatické membráně. Aktivaci způsobuje záření absorbované jak fytochromy, tak i kryptochromy v buňkách polštářků, a navíc v součinnosti s vnitřními rytmickými procesy (listy obvykle *nereagují* na změnu světlo-tma či tma-světlo, pokud by k ní došlo *mimo obvyklou denní dobu*).



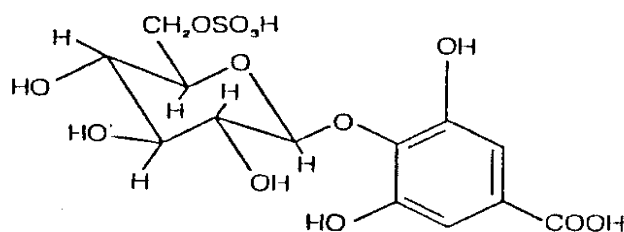
Příklady nyktinastického skládání listů u bobovitých rostlin

Na rozdíl od pohybů prūdchů je však zde ještě jedna komplikace. Tentýž podnět (světlo či tma) způsobuje zcela opačné ovlivnění transportních procesů v buňkách horní strany polštářku než v buňkách spodní strany.

K ještě složitěji řízeným pohybům patří nepochybně *thigmonastie*, při níž reagují především listy na dotek a ořes. Stejnou reakci však může u nich vyvolat i náhlá změna teploty či podráždění elektrickým proudem. Mechanická stránka těchto pohybů je zcela stejná jako u nyktinastií (změna turgoru u buněk polštářků), ovšem navíc zde přistupuje *šíření signálu* z podrážděné části rostliny do částí nepodrážděných.

Šíření vzruchů, tak běžné u živočichů vybavených nervovými vlákny, je u rostlin proces mnohem vzácnější a záhadnější. I u rostlin byl sice prokázán vznik akčních potenciálů po podráždění, ovšem bylo současně dokázáno, že samotný elektrický signál je málo účinný, pokud není doplněn látkovým (chemickým) mechanismem přenosu.

K uvedeným poznatkům se došlo již na začátku dvacátého století, ale teprve až v polovině osmdesátých let se podařilo izolovat a identifikovat ony záhadné chemické sloučeniny, kterými se šíří vzruchy do motorických buněk polštářků. Nejčastěji se jedná o deriváty kyseliny gallové, (např. β -D-glukosid-6-sulfát kyseliny gallové, označovaný jako **PLMF 1**, z angl. *Periodic Leaf Movement Factor*). Celá skupina těchto látek se označuje jako *turgoriny*, a lze je považovat za specifický typ fytohormonů.



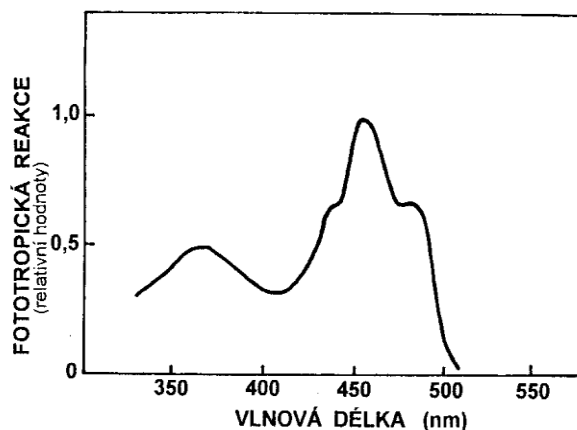
Struktura nejúčinnějšího turgorinu PLMF1.

Fototropismus

U všech tropismů, na rozdíl od nastií, je *směr pohybové reakce závislý na směru působení podnětu*. Mechanická stránka těchto pohybů je obvykle spojena s usměrněným *růstem buněk* (nikoli tedy jen se změnami turgoru, jak tomu bylo u nastií). Tomu nutně musí odpovídat i složitější způsob řízení.

U *fototropismu* je orientovaný pohyb částí rostliny vyvolán působením viditelného záření (tedy *světla*). Typickým příkladem je *zakřivování stonku směrem ke zdroji záření, či pohyby listů a květů v závislosti na poloze slunce na obloze v průběhu dne*.

Klasickým objektem pro analýzu fototropických pohybů byly klíční rostliny trav, zejména první list (*koleoptile*) klíčích obilok ovsa. Velmi brzy se zjistilo, že na *příjem signálu* je daleko nejcitlivější špička listu. Při velmi nízké intenzitě světla (měřené v jednotkách hustoty toku záření jednotkovou plochou čili *ozářenosti* daného objektu), list se ohýbá vždy směrem ke zdroji záření (= pozitivní zakřivení), a velikost ohybové reakce je úměrná celkové *dávce záření* (= součinu ozářenosti a doby působení). Při relativně vyšší hodnotě ozářenosti (zhruba nad $0,3 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, což u bílého světla odpovídá přibližně toku fotonů $1,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; to je méně než jedna tisícina hustoty toku slunečního záření za jasného dne!), je závislost zakřivení na dávce záření (zvyšované délkou expozice) podstatně složitější. Zpočátku má charakter shodný s reakcí za nízké ozářenosti, avšak při stoupajících dávkách záření se koleoptile vrací do vzpřímené polohy (= zdánlivá ztráta fototropismu). Při velmi vysokých dávkách záření dochází k obnovení pozitivní fototropické reakce, tedy k ohybu směrem ke zdroji záření,



Fototropický ohyb klíčnicích rostlin ke zdroji záření a typické akční spektrum fototropického ohybu

Velikost první pozitivní fototropické reakce (za malých dávek záření) je přímo úměrná těmto dávkám a nezávislá na hodnotě aktuální ozářenosti (tedy zda stejná dávka byla aplikována světlem o velké intenzitě po krátkou dobu, či slabým světlem po delší dobu). Rozporné reakce za vyšších dávek jsou zřejmě spojeny s vlivem záření na nějaký další regulační mechanismus. Skutečně bylo zjištěno, že po jisté době (několik desítek minut) způsobují vyšší dávky záření výrazný *pokles citlivosti špičky listů* zkoumaných rostlin na záření. Snížení citlivosti samovolně mizí asi po dvaceti minutách expozice ve tmě.

Výrazný pokrok ve výzkumu závislosti fototropických reakcí na dávce záření přineslo zkoumání vlastností a heterogenity *receptorového systému*. Již dříve bylo dokázáno, že ohybovou reakci navozuje hlavně modré a fialové světlo (o vlnové délce přibližně 400 až 500 nm). Bylo tedy zřejmé, že fototropické reakce jsou závislé na receptorech modrého záření, které byly později identifikovány jako flavoproteiny a nazvány *fototropiny*. Na rozdíl od tradičních představ bylo nově zjištěno, že tyto *receptory se nevyskytují jen v apikální části listů, ale i v níže položených místech*, kde jich je ovšem mnohem méně, a hlavně potřebují k aktivaci vyšší dávku záření.

Uvedená pozorování zdánlivého snížení citlivosti špičky koleoptile při vyšších dávkách záření aplikovaných intenzivním světelným zdrojem si nyní vysvětlujeme *nasyčením fotoreceptorů na obou stranách špičky* (ohybová reakce předpokládá aktivaci receptorů jen na osvětlené straně!), neboť čím větší je ozáření listu, tím více záření prochází listem i na jeho stranu odvrácenou od světelného zdroje. Za velmi vysokých dávek záření se aktivují i málo citlivé receptory na osvětlené straně spodnější strany koleoptile (pod špičkou), což vede k obnově pozitivní fototropické reakce (k opětovnému ohybu směrem ke zdroji záření).

Dosud jsme se věnovali pouze způsobu *vnímání (percepce) signálu*, tedy příjmu informace o záření. To je však jen začátek celé fototropické reakce: signál totiž musí být převeden k příslušným výkonným článkům regulované soustavy, tedy k buňkám, které jsou schopny na tento signál reagovat zrychlením růstu. V případě koleoptile je tedy nutný převod informace o zachyceném záření od špičky k níže položeným pletivům, jejichž buňky pod jeho vlivem zpomalují růst na osvětlené straně, a naopak zrychlují růst na straně odvrácené od zdroje záření.

Po dlouhá léta se nestejná rychlost růstu vysvětlovala rozdílnou koncentrací auxinů. Záření mělo způsobovat jejich transport do méně osvětlených pletiv (*teorie Cholodného a Went*). Bylo sneseno mnoho důkazů dosvědčujících platnost této teorie (rychlost šíření signálu se shoduje s rychlostí transportu *auxinů*, ohyb lze vyvolat jednostrannou aplikací auxinů po seříznutí špičky, rozdíly v rychlosti růstu obou stran koleoptile jsou komplementární, pomocí biotestů lze zjistit rozdíly v koncentraci auxinů, atd.). Teprve v nedávné době byla její obecná platnost zpochybněna. Byla totiž v některých případech dokázáno nerovnoměrné rozložení i některých jiných sloučenin regulujících rychlost růstu (např. karotenoid *xanthoxin*). To ovšem neznamená, že bychom mohli auxin zcela vyloučit z role hlavního mediátora, neboť bez jeho přítomnosti k ohybům vůbec nedojde. Je tedy velmi pravděpodobné, že půjde o spolupůsobení několika regulačních chemických látek, z nichž některé mohou měnit *citlivost buněk k auxinům*.

Provádíme-li pokusy s mladými výhonky jiných rostlin, než jsou trávy, většinou zjistíme, že percepce světelného signálu probíhá přímo v místech, která se zakřivují (= oblast dlouhivého růstu buněk), nikoli tedy ve vegetačním vrcholu. Často také nejsou dokazatelné komplementární rozdíly v rychlosti růstu osvětlené a zastíněné části. Může docházet jen k inhibici růstu na osvětlené straně, což lze tedy vysvětlit *přímou inhibicí růstu buněk na osvětlené straně*. Je však zajímavé, že pokud dojde k nasycení procesů tvorby inhibitorů zářením (tím, že ozařujeme rostlinu po dostatečně dlouhou dobu ze všech stran), pak při následujícím jednostranném ozáření lze pozorovat komplementární rozdíly v růstu obou stran. Můžeme tedy předpokládat, že i u orgánů reagujících přímou inhibicí růstu osvětlených buněk se může za jistých okolností uplatňovat i mechanismus založený na translokaci auxinů.

Zvláště složitým případem fototropických pohybů je *diafototropismus*, naklánění listů vzhledem k poloze slunce na obloze v průběhu dne (obvykle s cílem maximalizovat příjem sluneční energie). Listy jsou přitom orientovány kolmo ke směru slunečních paprsků, nikoli tedy souběžně, jak je tomu u běžného fototropismu. Mechanismus pohybů je v tomto případě stejný jako u nyktinastií, tedy reverzibilní změny turgoru v polštářkovitých buňkách na bázi řapíku. Složitá je však percepce a převod signálu. Bylo zjištěno, že směr slunečních paprsků je detekován především buňkami podél hlavních žilek na listové čepeli. V závislosti na směru ozáření produkují tyto buňky signály pro stimulaci či inhibici transportních procesů v polštářcích řapíku. Způsob přenosu signálů není dostatečně znám, je však možná účast auxinů. Navíc při řízení těchto pohybů se podílejí i jisté "programy", odvozené od vnitřních biologických rytmů. Naklánění listů do jistých poloh (např. směrem k očekávanému východu slunce) probíhá v pravidelnou hodinu i při umístění rostliny v úplné tmě.

Gravitropismus

Fototropické pohyby, které jsme si právě popsali, mají význam pouze pro nadzemní orgány. Proto také kořeny obvykle na světlo nereagují. Jen výjimečně můžeme jistou reakci zaznamenat, a sice odklon od zdroje záření (negativní fototropismus). Zato pohyby vyvolané a orientované směrem působení gravitace (*gravitropické pohyby*) nacházíme pravidelně u všech částí rostlin. Je všeobecně známo, že hlavní stonky rostou *negativně gravitropicky* (= proti směru působení gravitační síly), zato primární kořen *pozitivně gravitropicky*. Ovšem gravitropicky orientován může být i růst některých částí rostlin (např. větví, listů), a to i ve směru kolmém či šikmém na směr působení gravitace.

Hlavním modelovým objektem pro výzkum gravitropismu byly tradičně *kořeny*. Již před více než sto léty byl zjištěn velký význam kořenových špiček pro vnímání gravitace a později se podařilo dokázat, že rozhodující úlohu mají *buňky v kořenové čepičce*, neboť po jejich poškození dochází ke ztrátě gravitropismu. Český vědec Bohumil Němec pak jako první upozornil na nápadně pravidelný výskyt *amyloplastů* v buňkách kořenové čepičky a na jejich možnou úlohu při gravitropických pohybech. Úloha amyloplastů jako *statolitů* (a to nejen v kořenech) byla skutečně potvrzena mnoha pokusy, při kterých byl škrob různými metodami odstraňován. Při těchto pokusech bylo zároveň zjištěno, že kromě amyloplastů se škrobovými zrny mohou gravitropickou reakci vyvolat i jiné částice schopné sedimentace v cytosolu, ovšem škrob, vzhledem ke své relativně vysoké specifické hmotnosti, je zvláště účinný.

Jakým způsobem však sedimentace statolitů vyvolává v buňkách kořenové čepičky podráždění, a jak potom dochází k přenosu tohoto podráždění do další části kořene, ve které dojde k růstovým změnám? Obě otázky spolu úzce souvisejí.

Jedna z dřívějších teorií předpokládala, že v kořenové čepičce je produkována kyselina abscisová, která při vodorovné poloze kořene inhibuje růst buněk na spodní straně, a tím dochází k jeho zakřivení ve směru gravitace. Nové poznatky dokazují, že *inhibice růstu je způsobována auxiny*, (např. kyselinou indolyl-3-octovou, IAA). Ta proudí parenchymovými buňkami poblíž středu kořene až do kořenové čepičky, a z ní se vrací zpět buňkami korového parenchymu. Buňky čepičky proto mohou ovlivnit *nestejnou distribuci IAA* do korových pletiv, a to především změnami v lokalizaci specifických transportních proteinů pro auxin (vynašeče typu PIN3) v plazmatické membráně. Řízení této distribuce začíná přeskupením statolitů, které má vliv i na orientaci aktinových vláken cytoskeletu a tím i na transport váčků s nově vytvářeným transportním proteinem PIN3 (= „vynašeč“ auxinu) přednostně k těm částem plazmatických membrán, které leží ve směru působení gravitace. Ve spodní (tedy původně boční) části horizontálně orientovaného kořene se vytváří *natolik vysoká koncentrace auxinů, která má již inhibiční účinek na růst buněk*. Horní strana je sice auxinem zásobena již méně, ale přesto pokračuje v růstu a kořen se zakřivuje směrem dolů.

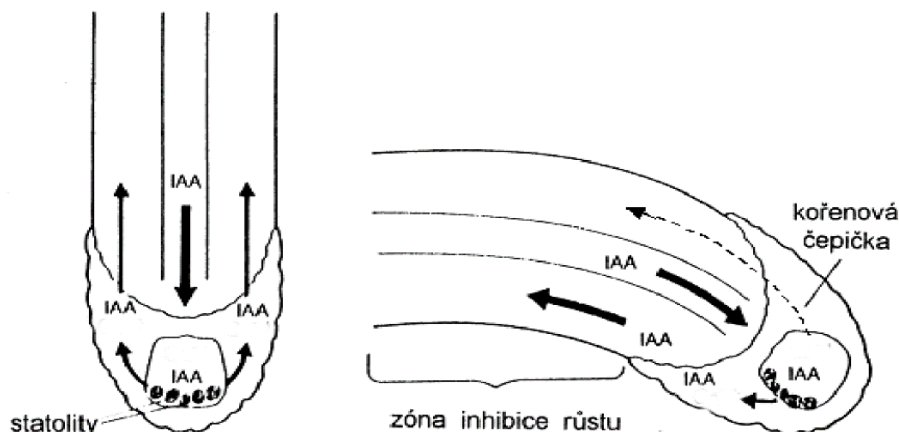


Schéma řízení pozitivně gravitropické reakce kořene položeného do vodorovné polohy.

Gravitropické reakce **u nadzemních částí** rostlin jsou odlišné od kořenů, a to už tím, že percepce signálu probíhá obvykle ve stejných místech jako ohyb (nikoli tedy jen ve vegetačním vrcholu). Funkce amyloplastů jako statolitů je shodná s kořeny. Nacházíme je nejčastěji v parenchymových buňkách vnitřní kůry, ve škrobové pochvě okolo cévních svazků a někdy též v kolenchymové vrstvě pod epidermis. Položíme-li svisle rostoucí stoněk do vodorovné polohy, sedimentace amyloplastů proběhne asi za dvě minuty a během několika dalších minut můžeme pozorovat počátek gravitropického zakřívování. Buňky ve spodní část stonku zrychlují růst, zato růst buněk v horní části je zpomalen.



Ukázka gravitropických reakcí kořenů a prýtu u klíčících rostlinek ve svisle postavené misce.

Obdobně jako u buněk se statolity v kořenové čepičce, i u buněk v zóně dlouhivého růstu stonků dochází k přesměrování toku auxinů. V té části plazmatické membrány, která je vystavena tlaku amyloplastů, dojde ke zmnožení selektivních transportních proteinů (vynášeců auxinů typu PIN), a auxiny jsou tudíž přednostně transportovány napříč stonkem ve směru působení gravitace. **Vzhledem k menší citlivosti buněk nadzemních částí k auxinům (ve srovnání s kořeny) jejich nahromadění ve spodní části vodorovně umístěného stonku vyvolá stimulaci dlouhivého růstu buněk** v této části a následný ohyb stonku směrem vzhůru. Změnami v rozmístění auxinových transportních proteinů se dají vysvětlit i některé po dlouhou dobu záhadné jevy, jako je např. "*gravitropická paměť*". Bylo totiž pozorováno, že u gravitačně stimulovaného hypokotylu (= položeného po jistou dobu do vodorovné polohy) k zakřivení nemusí vůbec dojít, pokud má malý obsah auxinu (např. po dekapitaci či po aplikaci inhibitorů syntézy IAA). Gravitropickou reakci ale je možné dodatečně vyvolat aplikací IAA na takovýto orgán. Co je však zvláště pozoruhodné, že k vyvolání gravitropické reakce (ohybu) dojde i tehdy, jestliže aplikujeme IAA na hypokotyl vrácený již do svislé polohy! Stejně tak můžeme vyvolat opožděnou gravitropickou reakci u intaktního hypokotylu, který byl uložen do vodorovné polohy za nízké teploty (4 °C, při které byl dlouhivý růst jeho buněk zcela zastaven) a pak ve svislé poloze ohřát.

Vnitřní rytmické procesy

Vzhledem k velmi pravidelným cyklickým pohybům naší planety (oběh okolo Slunce a rotace kolem vlastní osy), můžeme pozorovat v přírodě mnoho významných změn s periodou nejen jeden rok, ale i jeden den. Pro rostliny je velmi výhodné synchronizovat průběh některých svých funkcí s pravidelně se opakujícími změnami vnějšího prostředí, zejména pak schopnost provést fyziologické změny vedoucí k optimální interakci s faktory prostředí *ještě dříve než začnou způsobit* (např. nastavit listy vhodným směrem ještě před východem Slunce, s předstihem začít s tvorbou potřebných proteinů, aktivovat enzymy, atd.). To ovšem nutně

předpokládá jistou schopnost *měření času* (označovanou obvykle jako *biologické či fyziologické "hodiny"*) nezávisle na změnách vnějšího prostředí.

Existence vnitřní rytmičnosti u rostlin se předpokládala již velmi dávno. První spolehlivé důkazy se však podařilo získat až ve dvacátých letech minulého století a intenzivní výzkum pokračuje dodnes. Experimenty v tomto směru jsou totiž neobyčejně technicky náročné. Už z toho důvodu, že zajistit zcela konstantní vnější podmínky je prakticky nemožné. V úvahu se totiž musí brát i méně běžné faktory, které mohou mít kolísavý průběh a od jejichž vlivu lze pokusné rostliny obtížně izolovat (elektromagnetické vlny velmi krátkých délek, magnetické pole, toky částic s vysokou energií, aj.).

Rytmičné procesy u rostlin se mohou lišit *délkou periody* (= trváním jednoho opakujícího se cyklu), *amplitudou* a průběhem jednotlivých *fází* (= stavů v určitých úsecích periody). Nejčastěji se setkáváme s rytmickými procesy s periodou přibližně 24 hodin (= *cirkadiánní rytmy*), které pokračují i po umístění rostlin v trvalé tmě, nebo naopak při trvalém osvětlení. Patří sem nejen různé pohyby listů, květů a jejich částí, které pro snadnost pozorování jsou velmi často využívány v pokusech, ale i méně nápadné změny mnoha biochemických procesů (např. aktivace enzymů v uhlíkovém metabolismu CAM). Procesy, jejichž změny mají délku periody jeden rok (např. klíčení semen mnoha druhů), se zkoumají velmi obtížně nejen pro časovou i technickou náročnost, ale i pro jejich možnou interferenci s procesy stárnutí.

Již v počátcích studia cirkadiánních procesů bylo zjištěno, že uměle navozeným periodickým kolísáním záření či teploty (s jinou periodou, než ve které byly rostliny předpěstovány) lze vyvolat změnu délky periodicky se opakujícího chování (= *posun fázi vnitřní rytmicity*), kterou lze pozorovat v následných pokusech ve stálých podmínkách. Ke změně může dojít někdy už při jednorázovém působení, jindy pod vlivem opakujících se cyklů. Tato možnost "nastavení" biologických hodin je pro rostliny v přírodě neobyčejně důležitá pro udržení přesné synchronizace vnitřních procesů s cykličností vnějšího prostředí, která není obvykle dlouhodobě konstantní (např. délka dne se v naší zeměpisné poloze značně mění v průběhu roku).

K zajímavým výsledkům také vedly pokusy s krátkodobým osvětlením rostlin při umístění v trvalé tmě. Pokud byly osvětleny v té části dne, kdy za normálních okolností (před umístěním do trvalé tmy) bylo světlo, nemělo to na rytmické procesy žádný vliv. Osvětlení v té části dne, kdy dříve bývala tma (tzv. "subjektivní noc") však již vliv mělo, avšak reakce byly závislé na načasování osvitů. Osvětlení v první polovině „subjektivní noci“ vedlo k prodloužení následného průběhu procesů, avšak osvětlení v její druhé polovině vedlo ke zrychlení procesů. K velmi podobným výsledkům se došlo při experimentech nejen s rostlinami, ale i s některými houbami a živočichy.

Z vnějších faktorů, které ovlivňují nastavení vnitřních rytmů stojí na prvním místě *záření*. Z dosud zjištěných akčních spekter je zřejmé, že není zapojen pouze jeden typ fotoreceptorů u všech rostlin. Velmi častá je citlivost na modré záření, ale v některých případech je zřejmá i účast fytochromů (v červené části spektra). Vliv teploty je mnohem menší ve srovnání se zářením. *Teplota* ovlivňuje především amplitudu, jen velmi zřídka i délku periody.

Z dosavadních výsledků vyplývá, že u rostlin, stejně tak jako u mnoha jiných organismů, *není řízení rytmicity lokalizováno do jediného místa (centra)*. Různé části rostliny mohou mít do značné míry autonomní projevy rytmicity. Příkladem mohou být polštářkové buňky na bázi listů řídící nyktinastické pohyby či buňky rostlin s fixační cestou CAM, řídící cirkadiánní vnitřní rytmicitu aktivity enzymů.

Ústředním problémem při studiu mechanismu biologických hodin je *nalezení "oscilátoru"* generujícího základní krok časoměry, tedy pravidelné endogenní impulzy, ze kterých by bylo možné odvodit (a tím i měřit) delší časové intervaly. Již v začátcích podrobného studia vnitřní rytmicity byla totiž opuštěna představa měření času pomocí jednoduchého principu "přesýpacích hodin", tedy postupného rozpadu (či naopak hromadění) určitého metabolitu.

Ani samovolný přechod aktivní formy fytochromů do neaktivní při zatemnění rostlin nemůže tuto funkci plnit, protože k němu dochází příliš rychle.

V současné době je stále více zřejmé, že jak u živočichů, tak i u rostlin je vnitřní rytmicita vázána na periodickou aktivaci a inaktivaci specifických genů pomocí různě složitých regulačních smyček. V jednodušším případě se na příslušném genu pro řízení rytmicity (např. gen *per* u octomilky či gen *frq* u houby *Neurospora crassa*, homologní geny byly nalezeny i u rostlin) vytváří transkripce mRNA pro specifický protein, který vstupuje do jádra a inhibuje přepis svého vlastního genu. Tím klesá množství příslušné mRNA a zpomaluje se tvorba inhibičního proteinu, což vede k opětovnému zvýšení tvorby mRNA a inhibičního proteinu. Je zřejmé, že takovéto cyklické změny se mohou opakovat libovolně dlouho a mohou tudíž sloužit jako dlouho hledaný "základní oscilátor".

Výzkumy v posledních letech naznačují, že mechanismus oscilačních procesů bude složitější než naznačený příklad. Specifických genů vnitřní časoměry může být totiž v téže buňce více a mezi produkty jejich aktivity může docházet k interakcím. Jak u hmyzu, tak i u rostlin bylo dokázáno, že také v různých orgánech téhož jedince může být vnitřní rytmicita řízena odlišnými a navzájem nezávislými mechanismy.

Kontrolní otázky ke 3. části učebního textu Fyziologie rostlin

1. Jakým způsobem ovlivňuje rychlost a orientaci prodlužovacího růstu buněk stavba jejich buněčné stěny?
2. V jaké fázi vývoje embrya lze již pozorovat polaritu jeho buněk?
3. Popiš jakým způsobem dochází v primárním kořenu k tvorbě bočních kořenů.
4. Popiš jakým způsobem dochází v apikálním meristému prýtu k tvorbě základů listů.
5. Jak je uskutečňován mezibuněčný a dálkový transport auxinů v rostlinách ?
6. Jaké oblasti (typy) fyziologických procesů jsou regulovány pomocí auxinů ?
7. Jaké jsou hlavní fyziologické účinky cytokininů a giberelinů ?
8. V kterých částech rostliny se může vytvářet kyselina abscisová a jak je transportována ?
9. Jaké odlišné regulační účinky má zvýšené množství giberelinů a kyseliny abscisové v semenech ?
10. Jakým chemickým ošetřením s využitím znalostí o fytohormonech lze prodloužit životnost řezaných květin ?
11. Jakým chemickým ošetřením s využitím znalostí o fytohormonech lze zvýšit odolnost rostlin vůči působení stresových faktorů ?
12. Jakým chemickým ošetřením s využitím znalostí o fytohormonech lze urychlit zrání sklizeného ovoce ?
13. Jaké typy informací získává rostlina vnímáním záření a jaké typy pigmentů slouží k příjmu informačních signálů ?
14. Jaké typy fyziologických procesů mohou být aktivovány pomocí modrého záření ?
15. Jakým mechanismem jsou schopny fytochromy aktivovat v rostlinách některé enzymy ?
16. V které části rostlin je zachycována informace o fotoperiodicitě spouštějící tvorbu květů ?
17. Jaké další faktory (kromě fotoperiodického účinku záření) mohou také iniciovat tvorbu květů ?
18. Jaké jiné růstové či vývojové procesy (kromě tvorby květů) mohou být iniciovány vhodnou délkou dne ?
19. Jaké vývojové procesy mohou být iniciovány působením nízkých teplot ?
20. Jaké typy pohybů orgánů rostlin jsou řízeny změnami turgorového tlaku ?
21. Popiš průběh fototropické reakce (= vnímání signálu a řízení ohybu nadzemních částí směrem ke zdroji záření).
22. Popiš průběh gravitropické reakce kořenů (= vnímání signálu a řízení ohybu ve směru působení gravitační síly).

4. ČÁST - STRESOVÁ FYZIOLOGIE

Většina základních fyziologických poznatků byla získána na omezeném počtu "modelových" druhů rostlin, a to ještě pěstovaných za stálých podmínek blízkých optima. Pro analytické poznávání jednotlivých funkcí je tento postup jistě výhodný. V přírodě však rostliny rostou často za podmínek mnohem méně příznivých. Faktory prostředí, které je obklopuje, kolísají v širokých mezích, často až na samou hranici existenčního minima. Přežití v těchto podmínkách by bylo sotva možné bez schopnosti *přizpůsobování* (*adaptability*). Čím více a déle se vnější prostředí odchyluje od optima, tím více trvalých změn struktur a funkcí nacházíme u organismů žijících v tomto prostředí.

Každý rostlinný druh prošel od svého vzniku složitým selekčním sítím nejrůznějších kombinací vnějších podmínek. Selektce neprobíhala na úrovni jednoho procesu či funkce, ale vždy na úrovni fenotypových projevů celého organismu. Úspěšné druhy nemusejí mít proto zrovna nejlepší parametry v určitém znaku, který považujeme za nejdůležitější. Rozhodující bývá často vyrovnanost ve více znacích. Limitujících faktorů totiž působí na rostlinu v průběhu krátké doby obvykle více a přizpůsobení k nim může klást protichůdné požadavky na funkční i strukturní změny. Také kolísání některých faktorů prostředí (např. záření, teploty, vlhkosti půdy) je velké a nepravidelné, takže jednoznačně optimální přizpůsobení ani není možné.

Přizpůsobením rozumíme veškeré modifikace funkcí a struktury rostliny pod vlivem určitého typu prostředí, které zvyšují pravděpodobnost přežití a reprodukce. Dědičně fixované změny označujeme jako **adaptace**, krátkodobé, nedědičné změny v rámci fenotypové plasticity jistého genotypu jsou **aklimace**.

Oba uvedené typy přizpůsobení mohou mít povahu *kvalitativní* (např. syntéza látek nové struktury) či *kvantitativní* (syntéza většího množství již dříve přítomných sloučenin). Může k nim docházet na buněčné úrovni i na úrovních organizačně vyšších (pletiva, orgány, celá rostlina). Přizpůsobení struktury (morfologie) a fyziologických funkcí je obvykle na sebe velmi úzce vázáno. Přejídné, aklimační zvýšení odolnosti může být založeno jak na změnách rychle pomíjivých (zvýšení aktivity některého enzymu, tvorba specifických metabolitů), tak i trvalejších (změny v tvorbě nových orgánů a v jejich vnitřní struktuře).

Prostředí ovlivňující funkce rostlin v přírodě je složitý komplex faktorů, který nelze charakterizovat jedním souhrnným znakem, ale je nutný rozklad na jednotlivé složky. Nejběžnější je dělení faktorů prostředí do tří kategorií: *fyzikální*, *chemické* a *biotické*.

Z prostorového hlediska je možné dělení na faktory *klimatické* (působící na nadzemní části rostlin) a *edafické* (půdní). Někdy je také výhodné rozdělit složky prostředí na *zdrojové* (tedy zdroje hmoty a energie pro rostliny: fotosynteticky aktivní záření, oxid uhličitý, voda a minerální živiny) a *modifikační* (např. teplota, toxické látky, biotické vlivy).

U těch složek prostředí, které jsou nezbytné pro funkce rostliny, můžeme stanovit jejich *prahovou hodnotu* (= úroveň, při které je již působení na rostlinu měřitelné), hodnotu *nasyčení* (saturace, zabezpečující optimální funkci) a dále hodnoty inhibiční až letální. Velmi často se mohou účinky jednotlivých faktorů sčítat či násobit (*aditivní* a *multiplikační působení*), někdy mohou být i ve složitějších typech vzájemných interakcí.

Intenzivní výzkum vztahů mezi prostředím a fyziologickými procesy je velmi často motivován potřebou přispět k řešení závažných *ekologických* problémů. V prvé řadě jde o vysvětlení příčin výskytu a prosperity různých druhů rostlin v určitých typech prostředí, o poskytnutí podkladů pro mechanismové prediktivní modely utváření a vývoje rostlinných společenstev a rychlosti produkce rostlinné biomasy. Na tuto problematiku se zaměřuje **ekologická fyziologie** (*ekofyziologie*), která se v současné době velmi rychle rozvíjí. Jejím cílem není tedy studium základních principů fyziologických procesů, ale hlavně využití detailních znalostí těchto procesů pro syntetické hodnocení významnosti

různých mechanismů adaptace a aklimace rostlin k převažujícím vnějším podmínkám. Jde o rozsáhlou hraniční disciplínu, ve které nevystačíme jen se sběrem dat o fyziologických procesech rostlin v určitém typu prostředí. Obvykle je nutno s nemenší intenzitou sledovat i variabilitu faktorů prostředí, strukturní charakteristiky rostlin (např. orientaci jednotlivých orgánů v prostoru, horizontální variabilitu rozmístění rostlin v porostech, druhové složení porostů, populační dynamiku, atd.). V ekologické fyziologii často nejde jenom o zkoumání schopností přizpůsobení k *aktuálnímu* působení prostředí, ale také o posouzení výhodnosti jistého typu chování rostlin v *delším časovém měřítku* (měsíce, roky). Fyziologické procesy jsou pak chápány jako regulační člen celkového koloběhu uhlíku, vody a minerálních živin v ekosystémech. Užitečný může být také "ekonomický" pohled na funkce rostlin, spojený s hodnocením účinnosti transformace zdrojů hmoty a energie, či s aplikací analýzy náklady-prospěch (*cost-benefit analysis*).

V rámci ekologické fyziologie se zvláště bouřlivě rozvíjí dílčí směr označovaný jako *stresová fyziologie*. Ta se speciálně zaměřuje jen na *působení nepříznivých faktorů prostředí* (= *stresové faktory, stresory*) na rostliny. Kromě rostlinných ekologů má velký zájem na tomto výzkumu zemědělská praxe, neboť vyšlechtění nových genotypů polních plodin s větší odolností k nepříznivým podmínkám je z mnoha důvodů velmi žádoucí. Racionální postup při tvorbě odolnějších genotypů by měl vycházet ze znalostí fyziologických mechanismů podmiňujících zvýšenou odolnost.

4.1. Obecné reakce rostlin na stres

Termín *stres* je obvykle (i když nejednotně) používán pro *souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů*. Nejde přitom nikdy o nějaký ustálený a snadno definovatelný stav, ale spíše o dynamický komplex mnoha reakcí. Problematika stresu je u rostlin komplikovanější než ve fyziologii živočichů. Je to dáno nejen jejich přisedlým způsobem života, který neumožňuje únik před působením stresorů, ale také tím, že u rostlin je mnohem větší mezidruhová variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (buněk, pletiv). Ta se projevuje značným kolísáním fyzikálně-chemických parametrů rostlinných buněk i v průběhu „normálního“ fungování. Potíže se stanovením reakční normy se pak nutně přenáší i do stanovení počátku „nenormálních“, tedy stresových reakcí.

Výzkum vztahů mezi vnějším prostředím a stresem v rostlinách obvykle začíná studiem přenosu podnětů vyvolávajících stres na rozhraní orgánů rostliny s vnějším prostředím, a dále pak přenosem signálů uvnitř rostliny. Stresové faktory, ať už fyzikálně-chemické či biotické, mohou pronikat do vnitřního prostředí rostlin různých druhů nesterjně snadno, a to především v důsledku různě vyvinutých ochranných struktur. Tento způsob ochrany má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. tlustá kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody a snadno rozložitelných organických látek, tlumící jejich nedostatek). Jedná se vlastně o schopnost *vyhnout se stresu* (*stress avoidance*), ke které přispívají také vhodně načasované životní cykly.

Z fyziologického hlediska jsou mnohem zajímavější mechanismy *aktivní odolnosti* (*stress tolerance*), omezující negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plazmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, který bývá označován jako *stresová reakce*. S vědomím značné dávky zjednodušení lze i u rostlin přijmout obecné schéma průběhu reakce organismu na stres, známé z živočišné fyziologie. Bezprostředně po začátku působení stresového faktoru dochází k narušení buněčných struktur a funkcí (*poplachová fáze*). Pokud intenzita působení stresoru nepřekročí letální úroveň, dochází záhy k mobilizaci kompenzačních mechanismů (*restituční fáze*), které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům (*fáze rezistence*). Ne vždy však toto zvýšení má trvalý charakter. Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru může být vystřídáno dalším poklesem (*fáze vyčerpání*).

Základní schéma průběhu stresové reakce ale nevyovídá vůbec nic o rozmanitosti vlastního působení stresorů, ani o koordinaci složitého komplexu reakcí, kterými je podložena odpověď rostliny na jejich působení. Tato neobyčejně rozsáhlá problematika je v současné době intenzivně studována na různých organizačních úrovních, od molekulových a genetických základů až po integrující projevy celé rostliny. V následujícím textu bude možné podat jen velmi stručné shrnutí základních poznatků, a to jednak o zvláštích působení jednotlivých stresorů, jednak o některých společných mechanismech stresových reakcí.

Předem je však potřeba zdůraznit, že průběh stresové reakce a její konečný výsledek závisí jak na intenzitě a délce působení stresového faktoru na danou rostlinu, tak i na geneticky vázaných předpokladech odpovědi, souhrnně označovaných jako *adaptační schopnosti*. Zvýšení odolnosti a opětovné ustavení homeostáze i za dlouhodobého působení stresorů bývá obvykle dosahováno jen za cenu jistých dodatečných energetických nákladů, hlavně na syntézu specifických metabolitů. I některé další změny v metabolismu zajišťující vysokou odolnost (např. udržování zvýšené koncentrace osmoticky aktivních látek) bývají často provázeny snížením rychlosti získávání nových zdrojů hmoty a energie, a tedy i snížením rychlosti tvorby biomasy. Změny struktur a funkcí rostliny vedoucí k nízké efektivitě získávání zdrojů mohou přetrvávat ještě hodně dlouho po návratu vnějších podmínek k optimu, někdy i po celý zbytek vegetačního období.

Působení stresorů (např. nízké teploty) však může na druhé straně *podmiňovat průběh důležitých morfogenetických procesů*, např. klíčení či tvorbu květních orgánů, a tím zvýšit reprodukční schopnosti i kompetiční úspěšnost. Nelze se tomu divit, vždyť celý dlouhý proces evoluce rostlin nepochybně probíhal pod vlivem stresových faktorů. Ty z nich, které měly dostatečně pravidelný, periodický výskyt, mohly být "využity" nejen ke spouštění stresové reakce, ale i jako signál pro řízení jiných fyziologických procesů, které se zvýšením odolnosti neměly žádnou přímou souvislost. Z toho je zřejmé, jak obtížné může být posuzování příznivosti či nepříznivosti vnějších faktorů pro rostliny a současně jak významné je časové měřítko při tomto hodnocení.

Studium stresu u rostlin rostoucích v přírodních podmínkách je dále komplikováno tím, že často více stresových faktorů působí současně (např. silné záření, vysoká teplota a nedostatek vody). Interakce mezi nimi mohou podstatně měnit charakter stresové reakce ve srovnání s působením každého faktoru odděleně. Působení stresorů bývá také často omezeno jen na jednu část rostliny (listy či kořeny) ve které dochází k lokální stresové reakci, ale ta může druhotně způsobovat stres i v ostatních orgánech.

Stresové a aklimační reakce, podobně jako některé jiné projevy fenotypové plasticity, neprobíhají nahodile. Jsou závislé na "programech" aktivace určitých genů, které mohou být za jistých okolností spuštěny, a to někdy i několika odlišnými mechanismy. Tyto programy jsou často evolučně velice staré. Proto také například náhlým zvýšením teploty (teplotním šokem) můžeme indukovat tvorbu skupiny proteinů, jejichž zastoupení je shodné nejen u všech druhů rostlin, ale i u mikrobů a živočichů. Hlavní abiotické stresové faktory, jako např. nedostatek vody, extrémní teploty či zasolení, formovaly metabolické procesy živých organismů už od samého začátku kolonizace souší. Dokonalá a *trvalá* adaptace k široké amplitudě kolísání vnějších faktorů nebyla možná, už jen z důvodů fyzikálně-chemických vlastností základních stavebních kamenů živé hmoty, makromolekul a membrán. Jediným možným řešením byla *dočasná* úprava struktur a metabolických cest podle aktuálního stavu vnějších podmínek, a také zajištění rychlé opravy poškozených součástí.

Metabolické změny v buňkách při působení i velmi odlišných stresorů mají sice řadu společných znaků, avšak představa jediné obecně platné stresové reakce je nereálná. Jedná se spíše o jisté *dílčí komplexy* společných reakcí, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči několika stresorům současně. Připomeňme si alespoň ty *nejčastější společné stresové reakce rostlin*.

a) Příjem a vnitrobuněčný přenos signálů

Stresové reakce jsou spouštěny *podněty* (signály), které mají fyzikální nebo chemickou povahu a pro které je v buňce vhodný receptor. Prakticky všechny dnes známé receptory jsou specializované proteiny umístěné především v plazmatické membráně, ale i v jiných částech buňky. Přenos signálu z receptoru směřuje ke konečným *efektorům*, což jsou obvykle proteiny, na kterých bezprostředně závisí nějaká fyziologická funkce, např. enzymy primárního i sekundárního metabolismu, transportní proteiny v membránách, cytoskelet, transkripční faktory ovlivňující expresi genů. Tento přenos není často realizován jedním lineárním řetězem mezičlánků (druhotných přenašečů, *second messengers*), ale spíše složitou sítí více paralelních cest.

Klíčovou úlohu v této síti mají velmi často ionty **vápníku**, ale i početná skupina **proteinkináz** (více než 70!). Mnoho proteinů, zvláště enzymů, bývá totiž aktivováno až po navázání Ca^{2+} (za asistence proteinu *calmodulinu*) nebo fosfátové skupiny (pomocí proteinkináz). Ovšem jen zřídka přenáší receptor signál přímo na proteinkinázy či na vápníkové kanály, častěji bývá přenos zprostředkován pomocí *G-proteinů* (či GTP-áz). Tyto proteiny se energeticky aktivují navázáním GTP (*guanosintrifosfát*), respektive jeho přeměnou z GDP (*guanosin difosfát*), ke které dojde kontaktem se stimulovanou molekulou receptoru. Aktivované G-proteiny jsou pak schopny přivádět do funkčního stavu další proteiny zapojené do šíření signálu (viz obrázek):

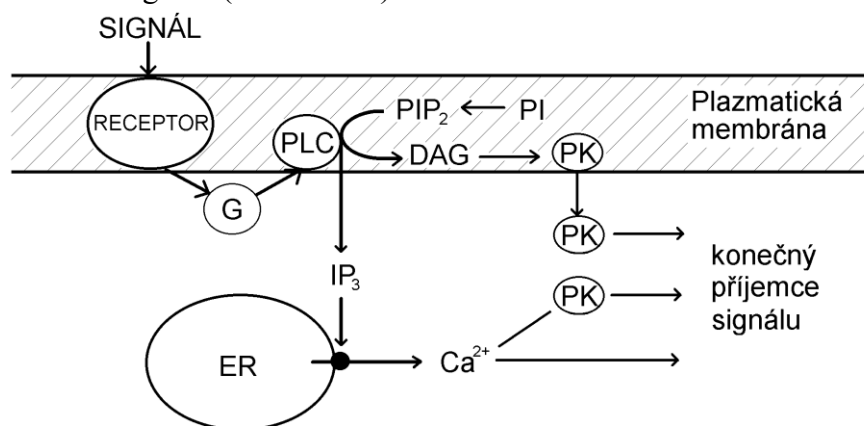


Schéma vnitrobuněčného přenosu signálu pomocí fosfoinositidového mechanismu: po zachycení signálu v receptoru dojde pomocí G-proteinu (G) k aktivaci fosfolipázy typu C (PLC). Ta štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂), vznikající z fosfatidylinositolu (PI), na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). IP₃ stimuluje otevření vápníkových kanálů v endoplazmatickém retikulu (ER) a ionty vápníku pak aktivují příslušný efektor buď přímo či zprostředkovaně pomocí proteinkináz (PK). Paralelně může být zapojen do přenosu signálu i diacylglycerol. Přenos signálu obvykle končí aktivací specifického genu, aktivací některého z metabolicky významných enzymů, anebo také aktivací určitých transportních proteinů v membránách.

K otevření vápníkových kanálů (nejen v ER, ale i v plazmatické membráně a v tonoplastu) může dojít i přímým působením G-proteinů, změnou transmembránového potenciálu, či mechanickými podněty (např. změnami turgorového tlaku v buňce). Vzhledem k tomu, že koncentrace Ca^{2+} iontů v apoplastu, ve vakuole či v ER je nejméně tisíckrát větší než v cytosolu, probíhá transport otevřeným iontovým kanálem velmi rychle (asi 10^6 iontů za sekundu!). Po odeznění signálu je vápník transportován zpět z cytosolu pomocí vápníkových pump (Ca^{2+} -ATPáz) či pomocí $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ sekundárně aktivních přenašečů. K signalizaci mohou sloužit i rychlé změny (oscilace, vlny) koncentrace Ca^{2+} v buňce. Úloha iontů vápníku je pro vnitrobuněčnou signalizaci skutečně zásadní, je známo více než 100 enzymů aktivovaných

navázáním Ca^{2+} . Aktivace neprobíhá současně v celém vnitřním prostoru buňky, nýbrž je lokalizovaná jen na místa s výskytem enzymu, který má být aktivován.

Přenos signálu pomocí proteinkináz může probíhat zcela nezávisle na iontech vápníku. Obvyklá cesta navazujících aktivací je: *receptor* → *G-protein* → *proteinkináza* → *efektor*, existují ovšem i další alternativní cesty a častá je taky funkce některých proteinkináz jako primárních receptorů signálu. U rostlin, stejně jako u živočichů, bývá někdy signál přenášen pomocí *kaskády proteinkináz*, ve které kináza aktivující efektorový protein je nejprve aktivována jinou (specifickou) kinázou, která ale opět vyžaduje aktivaci dalším typem kinázy, jedná se tedy o soustavu nejméně tří na sobě závislých kináz typu **MAPK** (*mitogen activated protein kinases*).

Popsaný způsob přenosu signálu je používán nejen za stresových situací, ale i k přenosu informací koordinujících růstové procesy, kdy primárním (vnějším) signálem může být záření či fytohormony. Za stresových situací však význam rychlé signalizace zvláště výrazně stoupá a k druhotným přenosům se využívají i některé další sloučeniny (např. peroxid vodíku, glutation, askorbát, jasmonáty a polyaminy).

b) Tvorba stresových proteinů

Pod vlivem náhlého působení stresových faktorů a za asistence příslušných receptorů s navazujícím řetězcem vnitrobuněčných přenašečů signálů dochází často již během jedné hodiny k velmi dramatickým změnám v kvantitativním i kvalitativním zastoupení proteinů v buňkách. Tvorba některých prudce stoupá, tvorba jiných se naopak zastavuje. V hojné míře se ale také syntetizují proteiny, které se za normálních okolností vůbec nedají v buňkách zjistit. Změny v syntéze proteinů obvykle kulminují několik hodin po začátku působení stresoru. Poté dochází k pomalému návratu do původního stavu. Z několika desítek proteinů, jejichž syntéza se prudce zvyšuje („*stresové*“ proteiny), jen jistá část je specificky vázána na určitý stresový faktor. K indukci mnoha dalších dochází zcela pravidelně pod vlivem stresu obecně, tedy bez ohledu na to, jakým typem stresoru je vyvolán.

Nově tvořené stresové proteiny mají velmi rozmanitou velikost i funkci. Není příliš obtížné rozdělit je pomocí vhodných detekčních metod (např. pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy, přesněji pak pomocí hmotnostní spektrometrie) do skupin podle molekulové hmotnosti, která bývá obvykle v rozmezí od 8 do 260 kDa. Mnohem obtížnější je určit jejich funkci. Nejčastěji se jim přisuzuje významná úloha v *ochraně strukturní integrity* jiných, metabolických či transportních proteinů, nukleových kyselin a membrán (např. udržováním hydratačních obalů), a podílí se také na odstraňování či reparaci poškozených buněčných struktur. Někdy se jedná o *konstitutivní proteiny*, které patří k pravidelné výbavě všech buněk, ovšem za stresu se jejich množství mnohonásobně zvyšuje. Často plní funkci *chaperonů*, které slouží nejen k řízení změn konformace proteinů při transportech přes membrány, ale jsou schopny upravit jejich konformaci i při mírném poškození. Pokud ovšem dojde k velkým, nenapravitelným změnám, pak je takový protein „označen“ malou molekulou *ubikvitinu* a rozložen pomocí *proteáz* na aminokyseliny, které jsou využity k syntéze nových proteinů.

c) Koordinace stresových reakcí pomocí fytohormonů

Pro zvýšení odolnosti vůči stresům je obvykle výhodné, aby reakce v jednotlivých buňkách probíhaly koordinovaně, a to i v okolí postiženého místa. To je zvláště důležité při mechanickém poranění rostliny či při pronikání patogenní houby. K šíření signálů mezi buňkami i na delší vzdálenosti využívají rostliny hlavně fytohormony. I když jsou to sloučeniny značně mobilní a mohou pronikat nejen k receptorům v plazmatické membráně, ale až do buněčného jádra, jejich působení na buněčné funkce (zejména na aktivaci genů) je téměř vždy zprostředkováno pomocí některého z článků vnitrobuněčné soustavy přenosu signálu, jak již bylo popsáno v kapitolách o fytohormonech ve 3. části těchto učebních textů.

Kyselina abscisová (ABA), *etylén* a *brassinosteroidy* patří k základním fytohormonům, jejichž zvýšená tvorba pravidelně provází působení většiny stresorů. Známe již desítky genů aktivovaných za stresových situací těmito fytohormony, ovšem zdaleka ještě neznáme význam všech nově syntetizovaných produktů. Vedle vyloženě kladných účinků (např. aktivace tvorby stresových proteinů a některých hydroláz) mají i výrazné *inhibiční* účinky na tvorbu některých enzymů (např. *Rubisco*, *α-amyláza*, aj.), což vede ke zpomalení růstu. Význam ABA a brassinosteroidů pro zvýšení odolnosti vůči suchu a mrazu je všeobecně uznáván, úloha etylénu je již poněkud nejednoznačná. Kromě aktivace antistresových mechanismů etylén totiž působí i rychlejší stárnutí postižených orgánů.

Jasmonáty (kyselina jasmonová, metyljasmonát), *polyaminy* (především spermin, spermidin a putrescin) a *kyselina salicylová* patří také k látkám fytohormonálního typu, jejichž koncentrace za stresu roste a jejichž ochranný účinek byl bezpečně prokázán. Jejich větší významnost je však omezena jen na některé taxonomické skupiny rostlin.

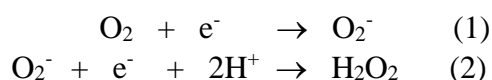
d) Tvorba a odstraňování reaktivních forem kyslíku

Stresové reakce rostlin jsou neodmyslitelně spojeny se zvýšením tvorby reaktivních forem kyslíku (singletní kyslík, superoxidový radikál, hydroxylový radikál a peroxid vodíku), ale současně i se zvýšením potenciálu pro jejich odstraňování. Mechanismus jejich vzniku i způsob odstraňování je dosti různý. Také úloha těchto látek ve stresovaných rostlinách je značně rozmanitá a do jisté míry rozporná. Jednak vznikají jako nebezpečné produkty při působení řady stresových faktorů, ale někdy *mohou mít kladnou úlohu jako signály či ochranné látky při některých typech stresů*.

Tvorba reaktivních forem kyslíku probíhá u všech rostlin, a to i při jejich růstu v optimálních podmínkách. Je nevyhnutelně spojena s transformací energie a s redoxními reakcemi v různých částech buňky včetně buněčné stěny. Stresové faktory mohou tuto tvorbu podstatně zrychlit, a to zejména:

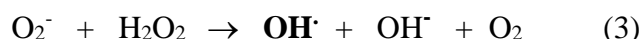
- selektivním ovlivněním metabolických reakcí spojených s redoxními výměnami,
- celkovým poškozením metabolismu a tím i poklesem účinnosti antioxidačních systémů.

První sloučeninou vznikající částečnou redukcí kyslíku je *superoxid* a jeho další redukcí dochází ke tvorbě peroxidu vodíku:



Reakce (1) vyžaduje dodání energie, zatímco reakce (2) probíhá samovolně, ovšem velmi pomalu. Katalytickým působením enzymu *superoxiddismutázy* se její průběh velmi zrychluje.

Superoxid a peroxid vodíku nejsou příliš nebezpečné sloučeniny, ale jejich společný výskyt může vést ke vzniku vysoce reaktivního hydroxylového radikálu (**OH·**):



Tvorba hydroxylového radikálu je velmi zrychlována v přítomnosti železnatých či měďnatých iontů:



Největší množství aktivních forem kyslíku se vytváří v chloroplastech, vznikají však i v mitochondriích a v jiných membránových systémech (plazmalema, tonoplast, peroxisomy, glyoxysomy). Ve většině případů jako redukční činidlo slouží *NAD(P)H* ve spojení s příslušnou *NAD(P)H oxidázou*.

Negativní působení reaktivních forem kyslíku spočívá především v *peroxidaci lipidů*. Nejvíce náchylné jsou membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Poškozeny mohou být i některé aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny, přičemž nejvíce náchylný k poškození je histidin, metionin, tryptofan a guanin.

Mechanismy ochrany před oxidativním poškozením:

Nejuniverzálnější ochranu před poškozením reaktivními formami kyslíku ve všech částech buňky poskytují některé specializované enzymy a antioxidační substráty. K hlavním enzymům patří především již zmíněná *superoxiddismutáza* (SOD), která katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. V rostlinách se vyskytují dokonce tři typy SOD (Cu/Zn SOD, Mn SOD a Fe SOD), a ve většině buněčných organel nacházíme alespoň jeden z nich. Peroxid vodíku je dále rozkládán buď *katalázou* (především v peroxisomech a glyoxisomech), nebo *askorbátperoxidázou* (AP, zejména v chloroplastech, kde chybí kataláza, někdy i v cytosolu jinými typy peroxidáz). K reakci katalyzované AP je nutný askorbát a k regeneraci vznikajícího dehydroaskorbátu také redukovaná forma glutationu, společně s enzymy dehydroaskorbátreduktázou a glutationreduktázou. Klíčovou úlohu v antioxidační ochraně hraje *askorbát* a *glutation*. Obou sloučenin bývá zejména v chloroplastech velké množství. Askorbát může reagovat se superoxidem a singletním kyslíkem i přímo, bez účasti enzymů, navíc přispívá k regeneraci *α-tokoferolu* (vitamin E), významné lipofilní sloučeniny chránící membránové lipidy před peroxidací.

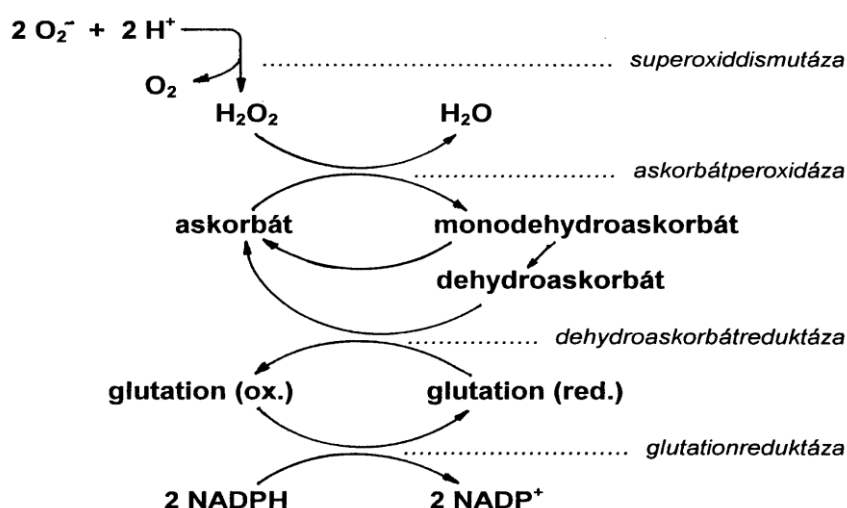


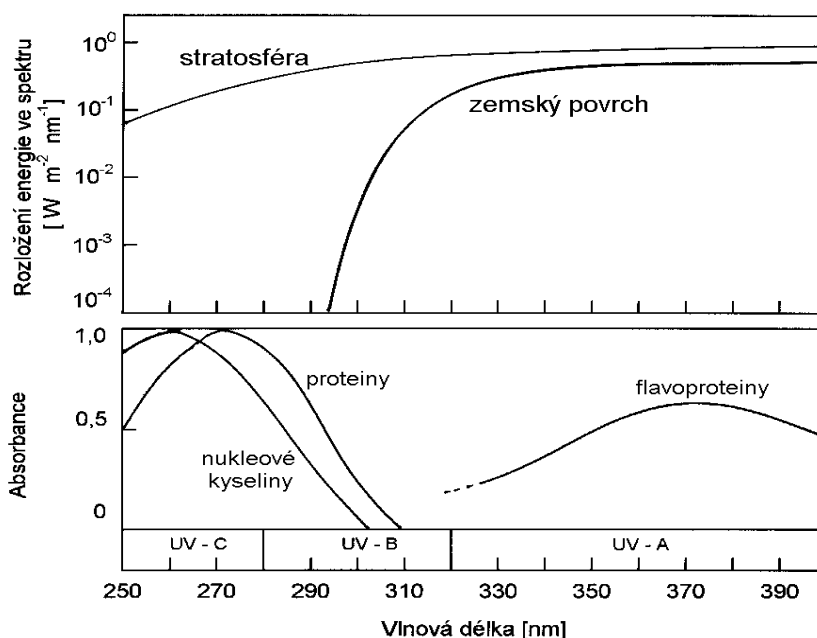
Schéma inaktivace superoxidu a peroxidu vodíku s navazujícími regeneračními cykly askorbátu a glutationu s finální redukcí pomocí NADPH.

Protistresová úloha reaktivních forem kyslíku dosud není uspokojivě prozkoumána ve všech souvislostech. Zcela zásadní roli mají nepochybně v *hypersensitivní reakci* při napadení patogeny jak bude blíže popsáno později. Peroxid vodíku je zapojen i do dalších obranných reakcí rostliny. Zrychluje tvorbu *ligninu* (a tedy zpevnění buněčné stěny), může působit na otevření vápníkových kanálů. Vtok Ca^{2+} má pak dalekosáhlé aktivační účinky. V součinnosti s kyselinou salicylovou (ta je schopna inaktivovat katalázu a tím dočasně udržet zvýšenou koncentraci peroxidu vodíku v buňce) indukuje tvorbu některých stresových proteinů. Funkce peroxidu vodíku jako *přenašeče signálu* pro expresi některých genů je významná i u živočichů a bakterií.

4.2 Záření a teplota jako stresové faktory

Ultrafialové (UV) záření v oblasti vlnových délek 200 až 400 nm představuje jen asi 7 % z celkového slunečního záření dopadajícího na naši planetu. UV záření kratších vlnových délek, označované jako UV-C (200 až 280 nm), a částečně i UV-B (280 - 320 nm) je z větší části absorbováno v atmosféře Země, zejména pak ve stratosférické ozónové vrstvě. Nejméně je atmosférou filtrována oblast UV-A (320-400 nm), která však má na živé organismy mnohem méně škodlivý účinek než pronikající zbytek záření UV-B.

UV záření s kratší vlnovou délkou (B, C) je velmi silně absorbováno celou řadou biologicky významných sloučenin, zvláště pak aromatickými aminokyselinami a nukleotidy, a tudíž i makromolekulami proteinů a nukleových kyselin. Po absorpci UV záření dochází u excitovaných molekul k fotochemickým reakcím, které poškozují jejich normální funkce. K nejčastějším změnám u proteinů patří fotooxidace thyrosinu a tryptofanu, a také rozštěpení disulfidických můstků mezi cysteinovými zbytky, které zajišťují správnou terciární strukturu proteinů. U nukleových kyselin dochází po excitaci ke vzniku nových vazeb mezi blízkými pyrimidinovými nukleotidy. Zvláště častá je tvorba dimerů thyminu uvnitř jednoho či mezi dvěma vlákny DNA. To pak má za následek poruchy v replikaci DNA i v expresi genetické informace. UV záření může způsobit u rostlin také poškození asimilačního aparátu a tím snížení rychlosti fotosyntézy. Nejvíce citlivé jsou proteiny D1 a D2 ve fotosystému II, a také proteiny centra oxidace vody. Poškozeny však mohou být i asimilační pigmenty a redoxní systémy, zejména plastochinony.



V horní části obrázku je uvedeno zastoupení UV-záření ve spektru slunečního záření jednak nad stratosférou a jednak po průchodu atmosférou s neporušenou ozónovou vrstvou na zemský povrch. V dolní části obrázku jsou uvedeny křivky relativní absorbance některých významných součástí buněk

Adaptace rostlin směřující k omezení škodlivých účinků UV záření spočívá především v zamezení jeho vstupu do vnitřních částí exponovaných orgánů, zejména tedy do asimilačního parenchymu listů. Velmi účinnou ochranu představují kutikulární vosky na vnějším povrchu a zejména pak **flavonoidní pigmenty** ve vakuolách epidermálních buněk. Při vyšších dávkách UV záření se syntéza ochranných pigmentů velmi rychle zvyšuje.

K rychlé opravě poškozených nukleových kyselin slouží především skupina specifických enzymů **photoláz**, které štěpí vazby nově vzniklých dimerů. Tento proces se nazývá **photoreaktivace**. Photolázy jsou flavoproteiny aktivované krátkovlnným zářením (370 - 450 nm). Radiační energie zachycená flavinovým chromoforem a přenesená na redoxní skupinu FADH (na tomtéž proteinu) je využita ke štěpení nežádoucího dimeru. Kromě toho může být poškozená DNA opravena, i když pomaleji, pomocí jiných enzymatických systémů (endonukleázy, DNA-polymerázy, ligázy). Poškozené proteiny je obvykle nutno rozložit a nahradit novými. Rychlost **resyntézy** proteinů rozhoduje o době nutné k návratu buněčných funkcí do původního stavu.

V běžných přírodních podmínkách dochází jen velmi zřídka k vážnějšímu poškození vyšších rostlin UV zářením. Výsledky pokusů ukazují, že i při zvýšení toku UV-B záření na

zemský povrch o 10 % (v důsledku oslabení filtrační vrstvy ozónu ve stratosféře, které se v blízké budoucnosti očekává) budou ochranné mechanismy většiny běžných druhů rostlin ještě dostatečně spolehlivě chránit před vážnějším poškozením. Nesmíme však zapomínat na skutečnost, že rostliny pěstované ve stínu či v umělých podmínkách (např. ve sklenících, sklo nepropouští UV záření!) nemají dostatečně vyvinuté strukturní ani funkční ochranné mechanismy vůči působení UV záření. Při jejich náhlém přemístění na volné prostranství může k poškození dojít.

Viditelné záření (světlo) v oblasti vlnových délek 400 až 700 nm představuje energeticky nejbohatší část spektra slunečního záření a je listy rostlin velmi účinně absorbováno. K absorpci slouží hojné asimilační pigmenty napojené na centra zpracování zachycené energie ve fotochemických procesech. Ne vždy však může být veškerá absorbovaná energie také skutečně využita. Plně osluněné listy absorbují mnohem více záření, než mohou fotochemicky zpracovat. Rostliny, jejichž růst a metabolismus je zpomalen např. nízkými teplotami či nedostatkem vody, mají možnosti využití radiační energie ještě menší, přesto však i v jejich listech probíhá absorpce záření a přenos excitonů do asimilačních center.

Zpracování velkých dávek absorbované radiační energie v chloroplastech je pro všechny rostliny velmi nebezpečná operace, neboť v relativně uzavřeném prostoru s vysokou koncentrací kyslíku se vytvářejí silná oxidační i redukční činidla, která mohou poškodit velmi jemné struktury thylakoidní membrány. K závažným změnám struktury a funkce fotosyntetického aparátu působením světla také skutečně běžně dochází. Souhrnně jsou označovány jako *fotoinhibice*. Projevují se snížením jak maximální rychlosti fotosyntézy (při saturační ozáření), tak snížením hodnot kvantového výtěžku. Toto snížení bývá obvykle plně vratné, ale až po několika hodinách či dnech.

Mechanismus vzniku fotoinhibice je v současné době velmi intenzivně studován a naše poznatky o něm nejsou tudíž zdaleka ještě úplné. Víme však, že nejvíce náchylný na poškození je *fotosystém II*, ve kterém dochází k oxidaci vody a k počátku přenosu uvolněného elektronu necyklickou cestou, jak bylo již podrobněji popsáno v kapitole o fotosyntéze. Při nedostatečné rychlosti odvodu elektronů z fotosystému II (např. v důsledku hromadění nevyužitých produktů primárních procesů fotosyntézy, ATP a NADPH) zůstávají po delší dobu v plně redukovaném stavu volné plastochinony i chinony Q_A a Q_B . Nejsou tedy schopné přijímat elektron, který je předáván z chlorofylu P680 na feofytin. Rekombinací náboje mezi oxidovaným chlorofylem P680 a redukovaným feofytinem dojde k přechodu molekuly P680 do tripletního stavu. Následnou reakcí s běžným (tripletním) kyslíkem vzniká vysoce reaktivní singletní kyslík. Ten pak může způsobit poškození součástí elektrontransportního řetězce ve fotosystému II a poškození vlastního proteinu D1. Popsaný sled událostí se označuje jako *fotoinhibice na akceptorové straně* a přítomnost kyslíku je zde nutná. Avšak i bez účasti kyslíku může dojít k fotoinhibici, a to zejména tehdy, když je omezena funkčnost centra štěpení vody a nelze tudíž zajistit dostatečně rychlou redukci molekuly chlorofylu P680. Tato molekula je po separaci náboje mimořádně silným oxidačním činidlem schopným poškodit součásti reakčního centra (*fotoinhibice na donorové straně*).

K fotoinhibici může docházet i poškozením fotosystému I, ale již méně často. Také zde může vznikat tripletní molekula chlorofylu reakčního centra P700 a tím i reaktivní singletní kyslík. Dalším toxickým produktem necyklického transportu elektronů je superoxidový radikál, který vzniká přenosem elektronů z redukovaného ferredoxinu na kyslík (*Mehlerova reakce*, viz dále), a může poškodit redoxní systémy ve fotosystému I. Singletní kyslík, superoxid a další odvozené formy aktivního kyslíku vznikající jako vedlejší, nežádoucí produkty fotochemických procesů, mohou poškozovat nejen fotosystémy, ale i jiné součásti chloroplastu, včetně chlorofylu, membránových lipidů, enzymů a nukleových kyselin.

Ochrana asimilačního aparátu před poškozením zahrnuje jednak regulační mechanismy, které směřují k *předcházení vzniku fotoinhibice*, a jednak mechanismy směřující k *nápravě škod*, tedy zejména k rychlé obměně poškozených proteinů a k rychlému odstraňování reaktivních forem kyslíku. Zmíním se stručně alespoň o těch nejdůležitějších.

a) snížení účinnosti funkce světlosběrných komplexů (antén).

Asimilační pigmenty v anténách absorbují většinu dopadajícího záření a zachycenou energii jsou schopny s velkou účinností (až 85 % u fotosystému II) převést do reakčních center k využití ve fotochemických procesech. Zbývající část se ztrácí přeměnou na teplo (asi 10 %) a na fluorescenční záření (5 %). Přeměnou na teplo (nepřímo, reakcí s karotenoidy) jsou deexcitovány hlavně ty molekuly chlorofylu, které přešly do tripletního stavu. Karotenoidy v anténách za normálních podmínek tedy velmi účinně brání reakci tripletních chlorofylů s kyslíkem, která by vedla ke vzniku nebezpečného singletního kyslíku. V případě nadbytku radiační energie lze pozorovat aktivaci dalších systémů ochrany, jejichž smyslem je snížit množství energie převáděné z antén k reakčním centrům:

- dochází ke strukturálním změnám ve vnějších anténách fotosystému II, a sice k aglomeraci molekul chlorofylu, k agregaci proteinpigmentových jednotek, a dokonce i k odpojení části antén od fotosystému II a k jejich přesunu k fotosystému I.
- dochází k podstatnému zvýšení deexcitační činnosti karotenoidů, které přeměňují excitační energii na tepelnou, a to nejen od tripletních, ale i od singletních excitovaných molekul chlorofylu, a v případě potřeby zneškodňují i singletní kyslík.

Obě tyto reakce "automaticky", reversibilně, a hlavně velmi rychle reagují na aktuální energetickou potřebu fotochemických procesů pomocí *citlivosti na změny pH* v lumen tylakoidu. Při nasycení fotochemických procesů zářením dochází k zvláště velkému nahromadění vodíkových iontů v lumen (není dostatek ADP pro tvorbu ATP) a *nízké pH aktivuje enzymy*, které se podílejí na výše uvedených změnách. Ochranná funkce xantofylů při přeměně nadbytku radiační energie na teplo je mimořádně významná. Zvláště účinný je v tomto směru *zeaxantin*, který se vytváří snadnou deepoxidací z neúčinného violaxantinu právě jen za nadbytku záření a poklesu pH v lumen:

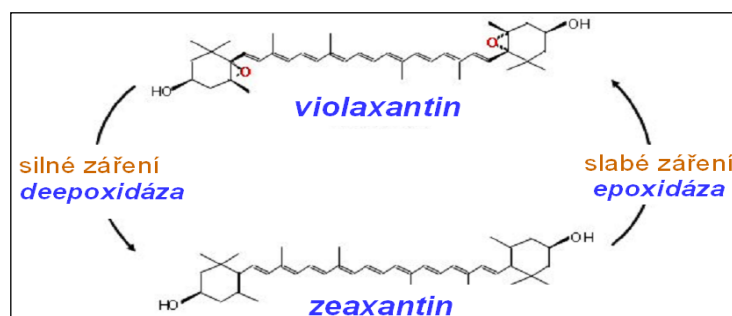


Schéma funkce xantofylového cyklu při regulaci přeměn excitační energie ve světlosběrných komplexech. Aktivita deepoxidázy je stimulována nízkým pH (= za silného záření), naopak epoxidáza má optimální funkci při pH 7,5 a je tedy nejvíce aktivní za tmy či za velmi slabého záření.

b) snížení účinnosti vlastních fotochemických procesů.

Hromadění produktů primárních procesů fotosyntézy, ať už v důsledku jejich příliš rychlé tvorby (vysoká ozářenost), nebo jejich malé spotřeby (zpomalení růstu působením stresu) vede ke zpomalení až zastavení fotochemických procesů, a tím i ke zvýšení nebezpečí fotodestrukce. Snížení účinnosti energetických přeměn v primárních procesech fotosyntézy, tedy i snížení rychlosti tvorby ATP a NADPH, může být v uvedených případech výhodné, neboť umožňuje zachovat po delší dobu transport elektronů. Jednou z cest ke snížení účinnosti primárních procesů by mohl být přenos části elektronů z plastochinonů na cytochrom b₅₅₉, který je součástí fotosystému II, a jejich návrat zpět do reakčního centra na

chlorofyl P680. O skutečné významnosti tohoto cyklického transportu ve fotosystému II u rostlin v přírodních podmínkách však dosud mnoho nevíme.

Nepochybně významný je však jiný způsob "znehodnocení" transformované energie, a to v samém závěru lineárního transportu elektronů, které z redukovaného ferredoxinu nepostupují obvyklou cestou na NADP, nýbrž redukuje kyslík (*Mehlerova reakce*). Vznikající silně reaktivní superoxid je ale nutno velmi rychle inaktivovat pomocí enzymu superoxid-dismutázy a navazující série reakcí v přítomnosti antioxidačních substrátů, askorbátu a glutationu, kterých je v chloroplastech vždy velké množství. Reakce již byly schematicky znázorněny na straně 133. Je zřejmé, že se při nich spotřebovává i jisté množství NADPH. Zachování lineárního toku elektronů pomocí Mehlerovy reakce i při nedostatku obvyklého akceptoru (NADP) pomáhá tedy udržovat transport protonů do lumen tylakoidu. Nízké pH v lumen, jak již víme, má zásadní důležitost pro správnou funkci dalších ochranných mechanismů, především xantofylového cyklu.

c) snížená rychlost opravy fotosystému II.

Poškození proteinu D1 ve fotosystému II je nejčastějším průvodním znakem fotoinhibice. Současně je však možná i jeho velmi snadná výměna (syntéza probíhá v chloroplastu a je mimořádně rychlá!). K výměně poškozeného proteinu se však musí celý fotosystém přemístit z přitisknuté (granální) části tylakoidní membrány do volné (stromatální) části. Ukazuje se, že snadná inaktivace proteinu D1 může být vlastně velmi účinným způsobem ochrany ostatních částí chloroplastu před poškozením. Proces obnovy proteinu D1 je totiž zajímavě regulován. Jeho syntéza se zrychluje se vzestupem ozáření, ovšem po dosažení saturačních hodnot se opět zpomaluje. Většina inaktivovaných fotosystémů zůstává za nadměrné ozáření ve granální části membrán, a absorbované záření se v nich přeměňuje na teplo. Teprve po poklesu ozáření přestávají plnit ochrannou funkci a jsou rychle opraveny.

Stresové účinky extrémních teplot

Vliv příliš vysokých teplot

Při zvýšení teploty zhruba nad 40°C dochází u většiny druhů rostlin k zásadním změnám ve fyzikálně-chemických vlastnostech buněčných membrán i proteinů. U některých zvláště citlivých druhů lze tyto změny zaznamenat již v teplotním intervalu 35 až 40°C. Lipidová vrstva membrán přechází do lamelárně-kapalného (superfluidního) stavu, ve kterém nemůže plnit svoje základní funkce. Stává se propustnou pro ionty a přestává poskytovat dostatečně pevnou oporu pro membránové proteiny. U proteinů (nejen membránových) dochází navíc za vysoké teploty ke změnám konformace, a tím i ke ztrátě jejich funkce.

K nejsnáze postiženým pravidelně patří thylakoidní membrány v chloroplastech. Velmi nápadným indikátorem vznikajícího stresu je poškození fotosystému II, které lze lehce zjistit měřením fluorescence chlorofylu *in vivo*. Za zvyšující se teploty dochází nejprve k rozpadu jednotlivých částí fotosystému (především k odtržení světlosběrných komplexů), a teprve až později k denaturaci proteinů.

Jinou rychlou metodou k určování stupně odolnosti k vysokým teplotám je mikroskopické pozorování buněk za postupného zvyšování jejich teploty. Dosažení kritické teploty se projeví zastavením proudění cytoplazmy v důsledku rozpadu cytoskeletu.

Teplotní rozmezí přechodu membránových lipidů do tekutého stavu, vedoucí ke ztrátě funkčnosti membrány, závisí hlavně na jejich chemickém složení. Ke zvýšení kritické teploty (a tím i ke zvýšení odolnosti k vysokým teplotám) přispívá vyšší podíl nasycených mastných kyselin (v poměru k nenasyčeným kyselinám), a také vyšší obsah sterolů v lipidové vrstvě. Stavová změna lipidové vrstvy je vratná a při poklesu teploty pod kritickou hodnotu dochází rychle k obnově původní struktury a funkce. Poškození termolabilních proteinů, včetně enzymů s klíčovým postavením v metabolických a transportních procesech, je mnohdy

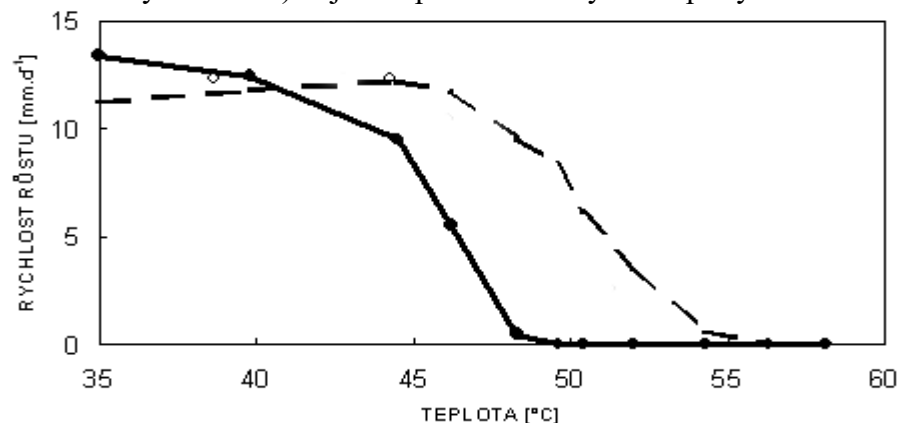
nevratné a je nutné je nahradit novými. Obnova normálního provozu buňky po snížení teploty tedy závisí na tom, do jaké míry zůstala zachována funkčnost proteosyntetického aparátu.

Celkový stupeň poškození buněk je dán součinem aktuální teploty a doby jejího působení. *Při teplotách nad 50 až 55°C i krátkodobé působení, trvající několik desítek minut, způsobuje nevratné poškození exponovaného orgánu a jeho odumření.* K vzácným výjimkám patří některé vytrvalé druhy rostlin z teplých pouští a polopouští. Zejména pak sukulenty, které se velmi špatně "zbavují" tepla jak konvekcí (malý povrch), tak i výparem (mají zavřené průduchy v nejteplejší části dne). U několika druhů nopálu (*Opuntia*) bylo zjištěno úspěšné přežití teplot 60 až 65°C po dobu několika desítek minut. To už je ale skutečně horní hranice termotolerance pro eukaryotní organismy v *aktivním stavu*; odolnější jsou již jen některé sinice a bakterie žijící např. v horkých pramenech při teplotách blízkých bodu varu.

V *dormantním stavu* mají rostliny vyšší odolnost k přehřátí než za aktivního růstu. Zcela mimořádně odolná jsou semena, která v některých případech přežívají bez poškození krátkodobé zvýšení teploty na 120°C. Semena některých druhů rostlin z oblastí s častým výskytem požárů dokonce takové teploty vyžadují ke stimulaci klíčení.

Aklimační reakce na zvýšenou teplotu lze pozorovat již za necelou hodinu od začátku působení, a to především ve výrazných změnách v zastoupení proteinů. Ke změnám chemického složení membrán dochází pomaleji, obvykle až za několik dní. Díky aklimačním změnám může být kritická teplota posunuta až o pět stupňů .

Proteiny indukované zvýšenou teplotou (heat shock proteins, HSP) patří k nejdéle známým a také k evolučně nejstarším, neboť řada z nich se vytváří při zvýšení teploty (přibližně nad 35 °C) jak u rostlin a živočichů, tak i u bakterií a hub. K indukci jejich tvorby dochází po navázání specifických proteinů regulujících transkripci (*heat-shock factors*) na příslušné úseky DNA (*heat-shock elements*) v těsné blízkosti genů pro HSP. Regulační proteiny jsou přítomny v buňkách stále, ovšem v nefunkčním stavu. K jejich aktivaci (spojením do trimerových shluků) dojde až po náhlém zvýšení teploty.



Závislost rychlosti růstu na teplotě u mladých rostlin prosa (*C₄* rostlina s optimem růstu za vyšších teplot!). Plná čára - kontrolní rostliny pěstované při teplotě 35°C, čárkovaně jsou vyznačeny reakce rostlin vystavených 24 hodin před měřením teplotě 45°C (po dvě hodiny).

Poškození rostlin chladem

Mnoho tropických a subtropických rostlin, u nás pak některé užitkové rostliny původem z teplejších oblastí (např. okurky, rajčata, papriky a kukuřice), mohou být vážně poškozeny nízkými teplotami ještě *nad bodem mrazu* (= *chladem*). Doba, po kterou chlad působí, je velmi důležitá. Například listy okurky jsou poškozeny při teplotě +10 °C až po týdenní expozici, při +8 °C již za 3 dny a při +3 °C již během několika hodin. Velmi citlivé na chlad jsou také květní orgány v raném stadiu vývoje a v průběhu gametogeneze, a to i u rostlin, jejichž vegetativní orgány na chlad citlivé nejsou.

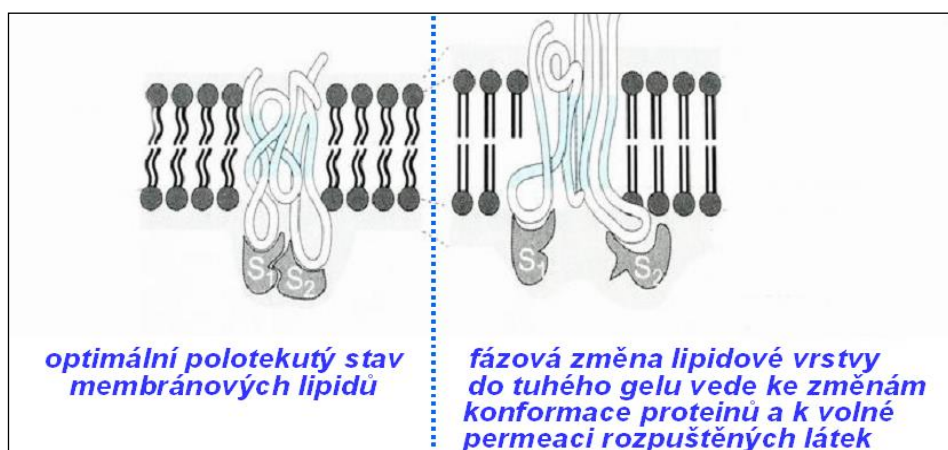
Většina proteinů není nízkými teplotami poškozována, a tak primární účinky nepříznivého působení chladu je nutno hledat především ve změně fyzikálně-chemických vlastností

membrán. Pokud jejich lipidová vrstva přejde z optimální polotekuté konzistence do stavu pevného gelu, nedaří se již udržovat dokonalou celistvost membrány, a to zejména v důsledku oslabení vazby lipidů k membránovým proteinům. Volná propustnost membrán pro ionty pak vede ke ztrátě transmembránového potenciálu, k zastavení selektivního a aktivního transportu, a také k poruše osmotických funkcí, včetně udržování turgorového tlaku. Propustnost thylakoidních membrán v chloroplastech a vnitřní membrány mitochondrií znemožňuje nahromadění vodíkových iontů při transportech elektronů, a není tudíž možné vytvářet ATP pomocí H^+ -ATP-syntáz. Po jisté době trvání tohoto stavu (několik hodin až dní) musí nutně dojít k vyčerpání energetických zdrojů a k odumření buňky.

K poruše struktury a funkce membrán při působení chladu může dojít i nepřímo peroxidací membránových lipidů. Nebezpečí tohoto oxidativního poškození membrán vzrůstá za nízkých teplot hlavně proto, že jsou zpomaleny až zastaveny růstové procesy. Hromadění nevyužitých produktů fixace CO_2 v chloroplastech působí inhibičně na tvorbu produktů fotochemických procesů a přebytek excitační energie vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Obecné zpomalení všech biochemických procesů za nízkých teplot vede, kromě jiného, i ke snížení rychlosti syntézy antioxidantních substrátů, což jen přispívá ke zvýšení nebezpečí oxidačního poškození, a to v první řadě membrán chloroplastů.

Za nízkých teplot bývají zjišťovány i změny ve struktuře cytoskeletu (depolymerace mikrotubulů). Z organel jsou nejcitlivější na nízké teploty již zmíněné chloroplasty, méně pak mitochondrie a peroxisomy. Tonoplast a plazmatická membrána patří k relativně nejvíce odolným buněčným strukturám.

Aklimační změny za nízkých teplot jsou spojeny s hromaděním osmoticky aktivních látek, s tvorbou stresových (chladových) proteinů, s tvorbou "antioxidačních" enzymů a substrátů, a také se změnami chemického složení lipidové vrstvy membrán. Zvyšuje se v ní zastoupení nenasycených mastných kyselin, které vede ke snížení kritické teploty přechodu lipidů do gelového stavu. Na řízení aklimačních změn se podílejí i některé fytohormony, ze kterých nejvýznamnější úlohu má kyselina abscisová.



Změny struktury biologických membrán pod vlivem nízké teploty

Poškození rostlin mrazem

Při poklesu teplot pod nulu $^{\circ}C$ (= mráz) již voda může přejít do pevného skupenství, což představuje pro všechny rostliny vážné nebezpečí. Toto nebezpečí vyplývá nejen z možného mechanického poškození buněk krystalky ledu, ale i z náhlého snížení tenze vodních par nad ledovými krystalky (tedy velké "suchosti" vzduchu). Led se může tvořit ve všech vodou bohatých strukturách, v symplastu i v apoplastu, tedy i v cévách a sítkovicích. Led vytvořený uvnitř živých buněk (v symplastu) vede téměř vždy k jejich rychlému odumírání, ovšem tento typ mrznutí se vyskytuje jen výjimečně u zcela neodolných rostlin či při velmi rychlém

poklesu teploty. *Nejčastěji a také nejdříve dochází k tvorbě ledu jen v apoplastu*, tedy v buněčných stěnách, v intercelulárách a v xylému.

Voda v apoplastu rostlin může začít mrznout při teplotách -1 až -3°C , v závislosti na obsahu osmotik, které snižují bod tuhnutí. Avšak ani při teplotách nižších, než je očekávaný bod tuhnutí nemusí ještě nutně dojít k tvorbě ledu. Pokud nejsou přítomná vhodná krystalizační jádra, zůstává voda v apoplastu i v symplastu v tekutém podchlazeném (metastabilním) stavu, a to v krajním případě až do teploty -38°C , kdy už dochází ke spontánní krystalizaci. *K iniciaci krystalizace podchlazené vody mohou přispívat i některé proteiny* vylučované některými druhy bakterií, které žijí na povrchu listů (např. *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*). Jejich odstranění vede k výraznému zvýšení odolnosti listů k poškození mrazem.

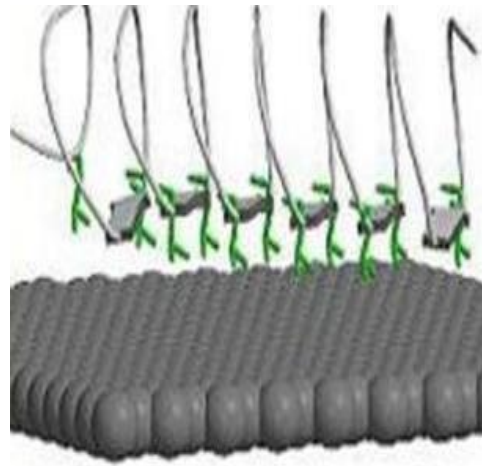
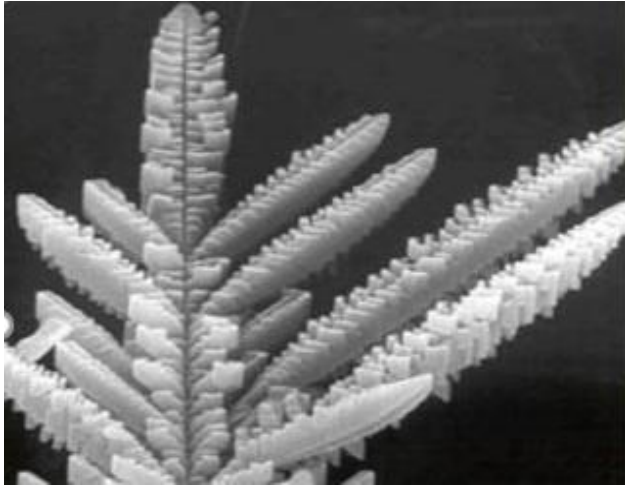
Při delší době trvání mrazu se krystalky ledu postupně rozrůstají. Růst krystalů je podporován pasivním přesunem vody z cytosolu do apoplastu v důsledku značně nízkého vodního potenciálu na povrchu ledu (při -5°C jen asi -6 MPa !). Při překročení jisté hranice procesu mrznutí, která je specifická pro různá pletiva a druhy, dochází k nevratnému poškození buněk. Bezprostřední příčinou odumírání může být jednak silná *dehydratace* buněčného obsahu, jednak mechanické poškození buněčné stěny a plazmalemy ostrými krystalky ledu pronikajícími z apoplastu. Krystaly ledu také indukují tuhnutí zbytků tekuté vody udržované v podchlazeném stavu uvnitř buňky.

Odolnost rostlin vůči mrazu (*mrazuvzdornost*) je založena v prvé řadě na schopnosti *zabránit vzniku ledu uvnitř buněk* (v symplastu) a *dlouhodobě tolerovat přítomnost ledu v apoplastu* (omezit jeho mechanické i dehydratační účinky). Snížení bodu tuhnutí roztoků v symplastu je možné přítomností velkého množství osmoticky aktivních látek (cukrů, aminokyselin, polyalkoholů ...). Tyto sloučeniny mají současně i významný vliv na tlumení negativních účinků *dehydratace* (společně s některými stresovými proteiny, viz níže). Další možností je schopnost udržovat po dlouhou dobu vodu v symplastu v tekutém podchlazeném stavu, což je podmíněno odstraněním všech látek, které by mohly sloužit jako krystalizační jádra. K omezení destrukčních účinků ledu, vznikajícím v apoplastu, přispívá zvýšená mechanická pevnost buněčné stěny.

Odolnost k *extrémně nízkým* teplotám (pod -25 až -30°C) je vždy spojena se schopností snášet silnou *dehydrataci buněk* (vakuoly téměř mizí, voda zůstává v tenkých zbytcích cytosolu okolo organel a plazmalemy). Bližší popis mechanismů, na kterých je založena tolerance značného vyschnutí cytosolu, je uveden v následující kapitole věnované vlivu nedostatku vody na rostliny.

Proteiny indukované nízkou teplotou mají mimořádně významnou úlohu při zvyšování odolnosti vůči chladu a mrazu. Časté jsou glykoproteiny a několik typů silně hydrofobních proteinů s velmi účinnou schopností chránit některé enzymy před denaturací. Nízkou teplotou je indukována exprese celé řady genů, která vede k syntéze jak již zmíněných ochranných metabolitů, odolnějších enzymů i strukturních proteinů. Tak například v buněčných stěnách hrachu po několikadenním pěstování za teploty 2°C se zdvojnásobilo množství proteinů bohatých na hydroxyprolin (především extensin), které zpevňují buněčnou stěnu a tím omezují její poškození při tvorbě ledu i při dehydrataci. Chladem a se také indukují enzymy lipidového metabolismu, jejichž činností dochází ke změnám složení membránových lipidů.

Zvláštní skupinu tvoří *protimrazové proteiny* (*antifreeze proteins*), které se objevují v hojném množství v apoplastu mrazuvzdorných druhů po indukci nízkou teplotou. Mají unikátní schopnost přilnutí (adsorbce) na povrch vznikajících krystalků ledu. Přístup dalších molekul vody ke krystalku je pak omezen a jeho růst se velmi zpomalí. Tímto způsobem je také inhibována rekrystalizace ledu, při které přednostně rostou velké krystaly na úkor malých. Při vzniku velkých krystalků vždy vzrůstá nebezpečí mechanického poškození buněčné stěny a plazmatické membrány.



Ukázka obvyklého způsobu růstu krystalů ledu (vlevo). V pravém obrázku je schematicky naznačen ochranný mechanismus „antifreeze“ proteinů dosedajících na povrch ledu.

Dosažení vysoké odolnosti k nízkým teplotám je spojeno s utlumením většiny buněčných funkcí a vlastní proces dehydratace musí probíhat pomalu, řízeně. Nelze jí tedy dosáhnout při náhlém poklesu teploty, ani trvale udržovat jako konstituční znak. Odolnost vůči mrazu má z těchto důvodů silně sezónní charakter. I ty druhy, které jsou v zimním období vysoce odolné (naše jehličnaté dřeviny, ozimé obiloviny, aj.), by v *letních měsících* utrpěly vážné poškození při náhlém poklesu teplot pod -3 až -4 °C.

Proces zvyšování odolnosti vůči mrazu (*otužování*) má u různých druhů odlišný charakter. Nejsložitější bývá u dřevin, kdy k zastavení růstu a k některým dalším přípravným změnám dochází již koncem léta. Pod vlivem postupně se snižujících denních teplot a zejména *zkracování délky dne* dochází pak k plynulému zvyšování odolnosti až do nástupu zimních mrazů. U většiny mrazuvzdorných bylin je indukce odolnosti rychlejší a jednodušší, obvykle stačí několik dnů s teplotami blízkými nule. Indukce odolnosti vůči mrazu je podmíněna přítomností *kyseliny abscisové ve zvýšené koncentraci* a dostatkem asimilátů.

Periodická aklimace rostlin k nízkým teplotám u našich dřevin před příchodem zimy („podzimní syndrom“)

Počátečním signálem k zahájení aklimace je **zkracující se délka dne** (obvykle již v srpnu, tedy bez vlivu nízkých teplot!)

Počáteční fyziologickou reakcí je výrazná změna v hladinách **fytohormonů** (vzestup konc. kyseliny abscisové, snížení auxinů, cytokininů a gibberelinů).

Následuje série změn struktur a funkcí, např.

- ◆ zastavuje se činnost meristémů (v pupenech i ve stoncích – kambium)
- ◆ zpomaluje se respirace a většina syntetických procesů,
- ◆ mění se ultrastruktura buněk (centrální vakuola se dělí na menší, plazmodesmy se uzavírají, plazmalema vytváří záhyby, zmenšují se mitochondrie, atd.)
- ◆ terminální pupeny se mění na zimní typ.

K dokončení vstupu do dormance a k výraznému **zvýšení odolnosti** vůči mrazu je již nutné **působení nízkých teplot** (průměr 0 až 7 °C).

Ke ztrátě vnitřní dormance dochází za 5-10 týdnů působení nízkých teplot. Pak už je dormance udržovaná jen vnějšími faktory (= vynucená dormance).

4.3 Vliv nedostatku vody a minerálních živin

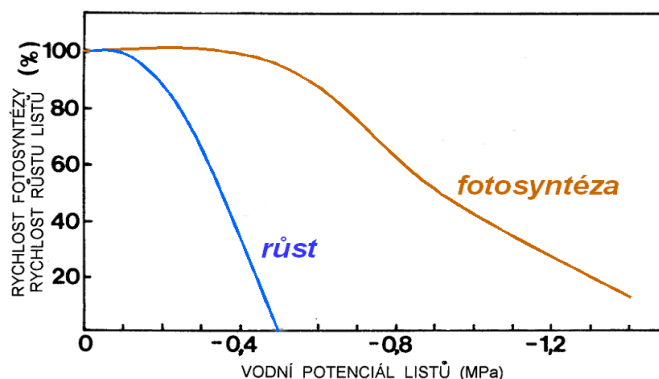
Nedostatek vody

Ze všech abiotických faktorů, které omezují růst a produktivitu rostlinstva na kontinentech naší planety, stojí na prvním místě nedostatek vody. Voda, na rozdíl od minerálních živin, má velmi rychlý koloběh v ekosystémech a její zásoba v rostlinách i v půdě stačí jen na poměrně krátkou dobu. Doplnění zásob vody srážkami bývá obvykle nepravidelné, náhodné, a nejsou tedy vyloučeny ani delší periody sucha. Navíc vodní potenciál vzduchu v okolí listů je po jistou část dne velmi nízký, a proto terestrické rostliny ve všech typech prostředí jsou ohroženy vodním stresem.

K udržení maximální rychlosti růstu je zapotřebí udržovat plně turgescenční stav buněk, což se však v denních hodinách daří jen velmi zřídka. Příjem oxidu uhličitého pro fotosyntézu otevřenými průduchy je obvykle spojen s takovou ztrátou vody, jakou nelze okamžitě nahradit. Nejvíce postiženým orgánem jsou vždy listy. U běžných mezofytních druhů rostlin hodnoty vodního potenciálu listů do $-0,5$ MPa indikují působení mírného vodního stresu, od $-0,5$ do $-1,5$ MPa stres středně velký. Při hodnotách pod $-1,5$ MPa jde o stres velmi silný, kdy často klesá turgorový tlak v buňkách listů na nulu a listy vadnou.

Nejcitlivější reakce na nedostatek vody bývá pravidelně zjišťována u dlouhivého růstu buněk postižených orgánů. Je to pochopitelné, vždyť rychlost růstu je od jisté prahové hodnoty lineárně závislá na turgorovém tlaku. K měřitelnému zpomalení růstu dochází již při velmi malé ztrátě vody, kdy turgor klesne jen o $0,1$ až $0,2$ MPa z maximální hodnoty (tomu odpovídá pokles vodního potenciálu z nuly na přibližně $-0,1$ až $-0,2$ MPa). Úplné zastavení růstu nastává při poklesu turgoru na prahovou hodnotu pro růst, která leží obvykle mezi $-0,3$ až $-0,5$ MPa. K zastavení růstu tedy dojde dříve než ke zjevnému vadnutí listu (nulový turgor), či k ovlivnění hlavních metabolických procesů včetně fotosyntézy. V důsledku toho se v rostlině hromadí nevyužitá asimiláty.

Při poklesu vodního potenciálu buněk zhruba na hodnotu $-0,2$ až $-0,8$ MPa dochází také k rychlým změnám aktivity enzymů. Aktivita některých se snižuje (např. *nitrátreduktáza*), u jiných naopak stoupá (*α -amyláza*, *ribonukleáza* a některé další *hydrolázy*). To má za následek změny v rychlosti mnoha procesů, dochází např. ke *zrychlení hydrolýzy škrobu* a naopak ke zpomalení redukce nitrátů. Dále je snížena tvorba cytokininů a zpomaluje se buněčné dělení.



Rozdíly mezi citlivostí růstových procesů a fotosyntézy na pokles vodního potenciálu u slunečnice.

Přibližně ve stejném rozmezí hodnot vodního potenciálu dochází v buňkách k velmi podstatnému (až čtyřicetinasobnému) zvýšení koncentrace *kyseliny abscisové*, zejména v listech, kde to má za následek zavírání průduchů. Pokles otevřenosti průduchů pak vede ke snížení rychlosti výměny plynů, a tím i rychlosti fotosyntézy a transpirace. Existuje řada důkazů, že zvýšení koncentrace kyseliny abscisové je při působení vodního stresu řízeno poklesem turgorového tlaku přes receptory mechanického napětí v plazmatické membráně, nikoli tedy přímo změnami termodynamického stavu (chemického potenciálu) vody.

Při větším poklesu vodního potenciálu k hodnotám okolo -1,0 MPa dochází u mnoha druhů k tvorbě aminokyseliny *prolinu*, jejíž koncentrace se zvyšuje často až stonásobně. Některé druhy reagují syntézou jiných metabolitů, zejména cukrů, složitějších alkoholů (*polyolů*) a kvartérních dusíkatých sloučenin (*betainy*). Tyto syntézy vedou k výraznému zvýšení osmotického tlaku v buňkách (tzv. osmotické přizpůsobení, *osmotic adjustment*), které umožňuje osmotický příjem vody do buněk i za klesajícího obsahu vody (a tím i sníženého vodního potenciálu) v buněčných stěnách, v xylému a v půdě okolo kořenů. Zmíněné organické sloučeniny nenarušují ani ve větší koncentraci enzymatické procesy v buňkách (= *kompatibilní osmotika*) a hrají také významnou úlohu při ochraně hydratačních obalů buněčných makromolekul (proteinů, nukleových kyselin) a biomembrán.

Jestliže se vodní potenciál listů dále snižuje (od -1,0 do -2,0 MPa), dochází již u běžných mezofytních rostlin k vážným metabolickým změnám. Rychlost fotosyntézy klesá na nulu a zpomalují se vnitrobuněčné transportní procesy. Aktivita hydrolytických procesů (a někdy i rychlost respirace) se obvykle naopak zvyšuje. Překvapivě málo citlivé k vodnímu stresu jsou dálkové transportní procesy v lýku. To umožňuje rostlinám i při velkém vodním deficitu mobilizovat rezervy organických látek ve starších orgánech a přesunout je do mladších, zejména pak do generativních orgánů k dokončení reprodukčního procesu.

Pokud v této pokročilé fázi vodního stresu dojde k doplnění ztrát vody, všechny buněčné funkce se postupně vracejí do normálního stavu, i když tento návrat není okamžitý (obvykle trvá několik dní). V případě delšího trvání nedostatku vody může silnou dehydratací dojít k tak vážným změnám (především funkce membrán a organel), že odumření orgánu či celé rostliny je nevyhnutelné.

Komplexy změn v rostlinách za nedostatku vody:

a) mírný nedostatek (do ztráty 50% z maximálního obsahu vody, obvykle snadno vratné změny):

- **růstové změny**: zpomalení až zastavení dlouhivého růstu buněk listů (poklesem turgoru, nejcitlivější reakce), zastavení tvorby nových listů, větví a odnoží. Pokračuje ale tvorba semen a růst kořenů!
- **metabolické změny**, především zpomalení až zastavení fixace CO₂ (v důsledku uzavření průduchů), ale i dalších syntetických procesů. Rychlost respiračních a translokačních procesů se nesnižuje!

b) velký nedostatek (obtěžně vratné či zcela nevratné změny):

- **strukturní a funkční změny proteinů a membrán** (především změnami hydratace), nevratná degradace polyribosomů (konec proteosyntézy)
- **mechanické poškození plasmalemy** (především odtržením plazmatické membrány od buněčné stěny, zničení plazmodesmat. spojů).
- **oxidační poškození** (aktivovanými formami kyslíku).

Uvedené komplexní změny metabolických procesů v průběhu působení nedostatku vody jsou spojeny s regulací genové aktivity, na které bezprostředně závisí zvyšování či snižování rychlosti tvorby enzymů i strukturních proteinů, nepřímo pak rychlosti tvorby ostatních metabolitů. Zvláště významná je tvorba mnoha ochranných („stresových“) proteinů. Kyselina abscisová patří k významným mediátorům exprese genů pro tyto proteiny.

Proteiny indukované dehydratací (*dehydration-induced proteins*) jsou do značné míry podobné skupině *chladových* proteinů a také skupině stresových proteinů indukovaných vysokým obsahem solí v půdě. Je to pochopitelné, protože jak za nízkých teplot, tak při zasolení půdy jsou rostliny ohroženy dehydratací buněk. Je ale potřeba upozornit na to, že tvorba části chladových proteinů je indukována pouze nízkou teplotou, a nikoliv dehydratací či kyselinou abscisovou.

Dehydratace vyvolává především tvorbu enzymů nezbytných pro zvýšení syntézy osmoticky aktivních látek. Tak např. k syntéze glycinbetainu z cholinu je nutná cholinmonoesteráza a betainaldehyddehydrogenáza. Podstatně se zvyšuje tvorba řady enzymů metabolismu sacharidů, což vede k hromadění jednoduchých cukrů a fruktanů. Jejich významná úloha pro zachování funkčnosti membrán a stabilizaci struktury proteinů i za pokročilého vodního stresu byla již mnohokrát dokázána.

Zvláštní skupinou asi dvaceti stresových proteinů které se nově vytvářejí při nedostatku vody v buňkách jsou **dehydriny**. Jsou prakticky totožné s proteiny které se hromadí při normálním (tedy nestresovém) procesu zasychání embrya v dozrávajících semenech, a pro které bylo již dříve zavedeno označení LEA-proteiny (*Late Embryogenesis Abundant proteins*). Nejčastěji se jim přisuzuje funkce *ochrany strukturní integrity* proteinů, nukleových kyselin a membrán (udržováním hydratačních obalů), a také spoluúčast na reparaci poškozených buněčných struktur. Tvorba dehydrinů je regulována fytohormonálně (především kyselinou abscisovou a brassinosteroidy). Pro přežití dehydratace jsou nezbytné.

Suchovzdorné rostliny (xerofyty nesukulentního typu), rostoucí v aridních oblastech (pouště, polopouště), obvykle tolerují mnohem větší pokles obsahu vody v buňkách než mezofytní druhy z oblastí na srážky bohatších. Extrémním případem suchovzdornosti jsou druhy, které snášejí téměř úplné vyschnutí bez vážného poškození. Tuto obdivuhodnou schopnost mají nejen některé evolučně starší skupiny organismů (řasy, lišejníky a některé mechy), ale i některé cévnaté rostliny. Především jistá část kapradin (asi 200 druhů), ale i některých krytosemenných rostlin (asi 100 druhů, např. z čeledí *Poaceae*, *Cyperaceae*, *Scrophulariaceae*, *Gessneriaceae*), rostoucích hlavně v aridních oblastech Afriky a Austrálie.

Funkční podstata vysoké odolnosti k vyschnutí je založena na několika současně přítomných strukturně-funkčních znacích (předpokladech). Je nutno zejména:

- *zabránit mechanickému poškození* plazmatické membrány a plazmodesmat,
- *obnovit funkčnost xylému* po úplném zavzdušnění (kavitaci) cév,
- *zabránit destrukci membrán a proteinů* při ztrátě vody z hydratačních obalů,
- *zabránit oxidačnímu poškození* buněčných struktur reaktivními formami kyslíku.

Je potřeba zdůraznit, že schopnost tolerovat vyschnutí měly všechny *prvotní* terestrické rostliny. V průběhu evoluce však pokročilejší skupiny rostlin byly schopny dlouhodobě udržovat vodu ve svých tělech. Jednak jejím efektivnějším příjmem a transportem (rozvoj kořenů, vznik xylémové transportní soustavy), jednak omezením ztrát výparem (tvorba kutikuly, průduchová regulace). U těchto skupin rostlin pak došlo ke ztrátě schopnosti tolerovat vyschnutí, ovšem genetická informace pro tuto schopnost zůstala v jejich genomu zachována. Došlo tedy ve skutečnosti jen ke ztrátě vybavování genetické informace, která se může opět obnovit vhodným procesem indukce:



Popsaná tolerance k velkým ztrátám vody je vcelku pasivní adaptační strategie (ve smyslu překonávání období s nedostatkem vody v téměř inaktivním stavu). Je výhodná v oblastech se silnou periodicitou srážek, kde růst a reprodukce může proběhnout v příznivější části roku. Pokud ovšem silný vodní stres působí *trvale* po celý rok, pak dočasný útlum životních procesů nic neřeší.

K minimalizaci ztrát vody při příjmu nezbytného množství CO₂ pro fotosyntézu slouží v první řadě průduchová regulace výměny plynů mezi listem a okolním vzduchem. Její základní principy byly již dříve vysvětleny. Zbývá jen dodat, že i u rostlin rostoucích na stejném stanovišti bývá obvykle velká mezidruhová variabilita v reakcích průduchů na vodní stres. Již zmíněný mechanismus zavírání průduchů, spouštěný snížením turgoru a přenosem signálu pomocí kyseliny abscisové, je kupodivu častější u mezofytů než u xerofytů. U této druhé skupiny bývá ale vyvinuta extrémně citlivá zavírací reakce působením snížené vlhkosti vzduchu přímo na svěrací buňky (tedy i za plné turgescence mezofylových buněk!). Na druhé straně jsou však známy xerofytní druhy, které zavírají průduchy až při značné ztrátě vody, při hodnotách vodního potenciálu okolo -4 až -5 MPa. Nejčastěji však u xerofytů dochází k zavírání průduchů při -1 až -2 MPa, zatímco u mezofytů při -0,5 až -1,0 MPa.

Mimořádně účinnou adaptací k omezení ztrát vody při asimilaci uhlíku jsou varianty fixačních cest typu C₄ a CAM, které se hojně vyskytují u rostlin ve všech aridních oblastech. Jak již víme z výkladu o biochemické podstatě těchto fixačních cest, dochází při jejich fungování ke zvýšení koncentrace CO₂ v okolí chloroplastů. Současně však, díky vysoké afinitě PEP-karboxylázy, bývá snížena koncentrace CO₂ v intercelulárách listů. Při stejné otevřenosti průduchů je u rostlin typu C₄ rychlejší tok CO₂ do listů, a tudíž transpirační spotřeba vody na jednotku vytvořené sušiny (*transpirační koeficient*) je podstatně menší než u rostlin typu C₃:

<i>typ rostliny</i>	<i>transpirační koeficient</i> [kg (vody). kg ⁻¹ (sušiny)]
C ₃	500 - 800
C ₄	200 - 350
CAM	50 - 100

Sukulentní rostliny vybavené metabolickou cestou CAM jsou ze všech rostlin nejdokonaleji adaptované k úspornému hospodaření s vodou. Je nutno zdůraznit, že hlavní podíl na jejich úspěšnosti nemají zásoby vody ve zdužnatělých orgánech, ale právě metabolismus CAM, umožňující ponechat průduchy ve světelné periodě dne zcela uzavřené. Koncentrace osmoticky aktivních látek je u nich pravidelně velmi malá, a tím i možnost většího snížení vodního potenciálu při zachování turgescence není možná. Nemohou proto přijímat vodu z tak suché půdy jako jiné xerofyty a jsou odkázány pouze na rychlý příjem při náhodných srážkách. Existuje však celá řada adaptačních mechanismů, které usnadňují rychlé a účinné využití srážkové vody (např. rychlý růst tenkých sorpčních kořenů kaktusů po ovlhčení půdy, okamžité naplnění kapacity velmenu u kořenů orchidejí či příjem vody sorpčními šupinami na povrchu listů bromélií).

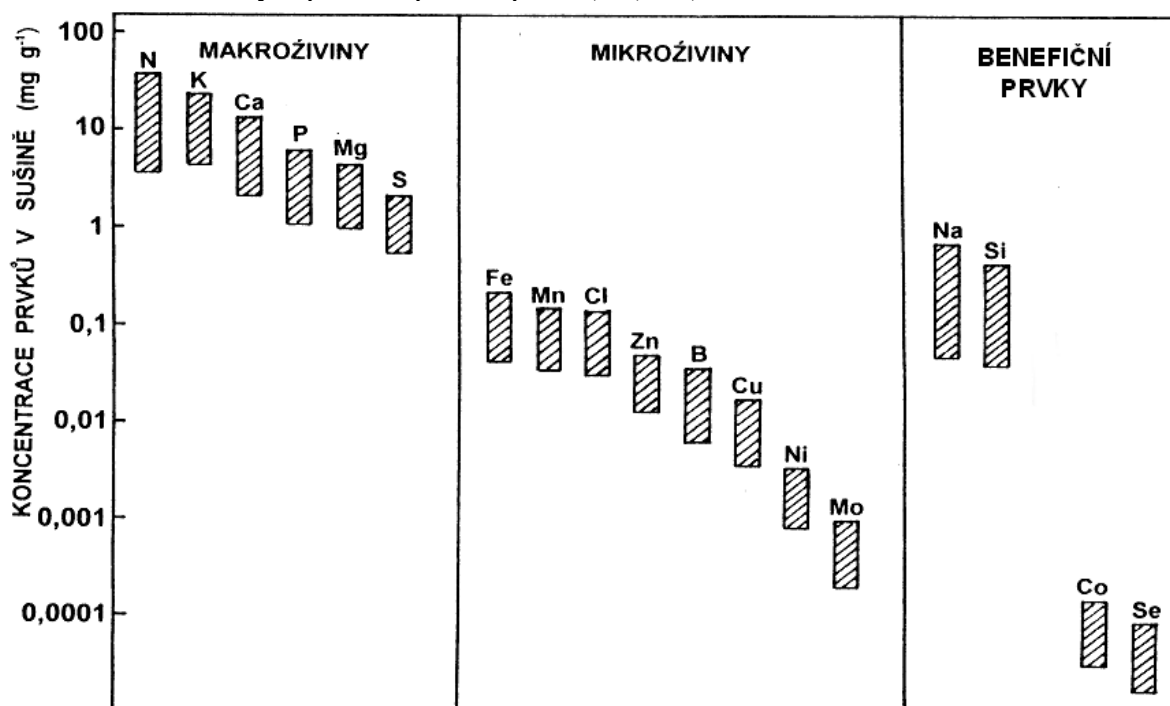
Fixační cesta CAM u sukulentních rostlin umožňuje udržovat fotosyntetickou aktivitu a pozitivní uhlíkovou bilanci i v podmínkách, kdy je příjem vody dočasně zastaven. Tyto rostliny mají také možnost dlouhodobě uzavřít průduchy a provádět *vnitřní recyklaci uhlíku* (fixaci CO₂ uvolněného z respiračních procesů). Na místech s trvalým dostatkem vody v půdě fixační cesta CAM není již tak prospěšná. I v případě přechodu na přímou efektivnější fixaci CO₂ u fakultativních CAM-rostlin) nelze změnit základní morfologické charakteristiky nevýhodné pro rychlý růst (zdužnatělé orgány s malým asimilačním povrchem), a sotva proto mohou obstát v konkurenci s rychleji rostoucími druhy.

Vliv nedostatku minerálních živin v prostředí

Nejpotřebnějšími prvky pro růst rostlin jsou uhlík, kyslík a vodík, které tvoří více než 90% biomasy. Rostlina je přijímá hlavně v plynné formě ze vzduchu (CO_2 , O_2), a také z vody. Všechny ostatní nezbytné prvky (= *minerální živiny*) získává rostlina z půdy, kde se vyskytují ve formě solí. Dostupné množství těchto prvků v půdě však mnohdy nestačí pokrýt potřebu rostlin, a pak dochází ke zpomalení růstu až k jejich vážnému poškození.

Za *nezbytné prvky* považujeme ty, bez kterých rostlina nemůže dokončit svůj životní cyklus, neboť jsou složkou některé nepostradatelné sloučeniny v rostlinném organismu. K nim patří v první řadě (kromě C, H, O), šest **makroživin** (*makroelementů*): **N, P, K, Ca, Mg, S**, jejichž obsah v jednom kilogramu sušiny rostlinné biomasy obvykle přesahuje jeden gram.

Podstatně nižší zastoupení (obvykle méně než 0.1 g.kg^{-1}) mají některé další prvky, označované jako **mikroživiny** (*mikroelementy*). Nepochybně nezbytné pro všechny rostliny jsou: **Fe, Cl, B, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni**, i když v některých případech (např. u niklu) zásoba v semenech postačuje k pokrytí potřeby i více generací. Kromě uvedených minerálních živin známe ještě několik prvků, které pro rostliny nejsou sice nezbytné, ale pro jisté skupiny rostlin jsou velmi **prospěšné** (*benefiční*), neboť stimulují jejich růst a zvyšují jejich odolnost ke stresům. K takovým prvkům patří např. **Na, Si, Co, Se**.



Obsah makroživin, mikroživin a benefičních prvků v sušině lučních rostlin. Sloupečky udávají rozsah variability hodnot (bez extrémů) u různých druhů rostlin v různých typech prostředí.

Jen velice vzácně může dojít k tomu, že by některý z nezbytných prvků v půdě zcela chyběl. Častějším případem je snížená koncentrace v *přijatelné iontové formě*. Způsob, jakým se projeví nedostatek živiny závisí zejména na tom, jakou má v rostlině funkci a jak snadno může být translokována ze starších orgánů do mladších.

Nedostatek živin se obvykle projevuje mnohem *pomalejší změnou funkcí* rostliny, než jak tomu bývá u jiných stresových faktorů. Nejčastěji pozorujeme zpomalení růstu, fotosyntézy a jiných procesů až po několikadenním působení. Rostliny mívají jistou část živin uloženou v zásobních formách, ze kterých mohou čerpat při jejich náhlém nedostatku v půdě. Také sama půda má značné tlumící schopnosti dané postupným doplňováním odčerpaných živin

mikrobiální dekompozicí půdní organické hmoty, zvětráváním minerálních částic a uvolňováním iontů živin z vazeb na koloidních částicích sorpčního komplexu půdy.

Změny v rychlosti růstu, ve tvaru a v barvě orgánů, či dokonce jejich zrychlené stárnutí a odumírání lze pozorovat jen při velmi vážném nedostatku živin. Proto *vizuální diagnóza* poruch v minerální výživě není spolehlivá. *Analýza obsahu živin v půdě* také neposkytuje dostatečně uspokojivou informaci o jejich možném nedostatku pro rostliny. Ne vždy je totiž možné stanovit chemickou analýzou půdních extraktů skutečnou dostupnost živin pro kořeny.

Analýza rostlin (obvykle listů) je již spolehlivější, i když i tento přístup má svoje úskalí. Především je nutno empiricky zjistit, jaký je vlastně optimální obsah té které živiny v biomase rostliny pro zajištění všech funkcí. Potíž je právě v tom, že optimální hodnoty (či spíše rozmezí hodnot) obsahu jednotlivých živin jsou silně závislé na druhu a stáří rostlin, a navíc jsou ovlivňovány vzájemnými interakcemi (mezi jednotlivými živinami). Užitečné informace lze získat i pomocí biochemických metod, neboť nedostatek některých mikroživin se projevuje velmi specifickými změnami enzymatické aktivity (viz dále u jednotlivých prvků).

Mladé, rostoucí části rostlin získávají minerální živiny nejen přímo z půdy, ale i ze svých stárnoucích orgánů. To je velmi časté u těch prvků, které nejsou zabudovány v příliš pevných vazbách. K prvkům s *velkou mobilitou* uvnitř rostliny patří dusík, fosfor, draslík, hořčík a chlor. Jsou snadno translokovány především ze starých listů do mladých (a také do plodů), proto první příznaky nedostatku se objeví u starých listů. Mnohem *menší mobilitu* má síra, zinek, mangan a měď. Vápník, železo a bor jsou po zabudování do biomasy téměř imobilní. Jejich nedostatkem proto trpí nejvíce listy mladé. Podívejme se nyní na nejzávažnější následky nedostatku jednotlivých živin.

Dusík je nejdůležitější ze všech minerálních živin - je přijímán z půdy v daleko největším množství a jeho hmotnostní podíl v biomase rostlin bývá obvykle 2 až 4 %. Přijatelných forem dusíku (hlavně nitrátových a amonných iontů) je v půdě vždy jen omezené množství, které navíc velice kolísá v závislosti na činnosti půdní mikroflóry. Proto je v přírodě růst rostlin téměř vždy do jisté míry omezován nedostatkem dusíku.

Průvodním znakem většího *nedostatku dusíku* je pokles obsahu bílkovin. Velmi nápadný je také snížený obsah chlorofylu. Listy, zvláště ty starší, jsou světleji zelené, později žloutnou a usychají. Úměrně s poklesem obsahu dusíku v listech se snižuje rychlost fotosyntézy listů a v důsledku toho i rychlost růstu. Nedostatek dusíku je také provázen *zvýšením poměru biomasy kořenů k nadzemní části*. Z toho je zřejmé, že nedostatek dusíku ovlivňuje procesy regulující meziorgánovou distribuci asimilátů v rostlině a tím i růstové procesy. Existuje několik hypotéz o možném regulačním mechanismu, které vycházejí jednak z působení metabolitů asimilace dusíku (některé aminokyseliny) a uhlíku (sacharóza) na alokaci asimilátů, jednak ze změn obsahu fytohormonů (cytokininy, kyselina abscisová, strigolaktony) a následného ovlivnění růstových procesů. Stresové účinky nemusí mít jen celkový nedostatek dusíku, ale i jeho jednostranná nabídka v amonné formě (např. u kyselých, podmačených či u trvale chladných půd, kdy je inhibována aktivita nitrifikačních bakterií). Příjem a asimilace amonných iontů jsou procesy spojené s výdejem vodíkových iontů, a tudíž i s poklesem pH jak v buňkách kořenů, tak i v rhizosféře. V citlivosti na toxické působení amonných iontů jsou ovšem velké mezidruhové rozdíly.

Fosfor bývá v půdním roztoku vždy jen ve velmi malé koncentraci (pod 2 μM). Malá je také jeho celková zásoba ve většině půd a rychlost jeho uvolňování z půdních minerálů i z půdní organické hmoty. Proto rostliny trpí velmi často jeho nedostatkem. Fosfor (vesměs ve formě fosfátových iontů) plní v rostlinách velmi rozmanité funkce:

- je stavební součástí nukleových kyselin a fosfolipidů,
- zajišťuje rychlé energetické výměny pomocí vazeb v nukleotidech (ATP, GTP, aj.),

- aktivuje enzymy (fosforylací proteinu - apoenzymu),
- svou koncentrací reguluje celou řadu procesů (rychlost respirace, fotosyntézy, transportu). Nadbytečné (rezervní) fosfátové ionty jsou ve vegetativních částech rostlin ukládány ve vakuolách. V semenech bývá fosfor uložen ve forměpolyfosfátů (*fytáty*).

Príznaky deficiencie fosforu se projevují zcela jinak než u dusíku. Listy zůstávají sytě zelené, neboť obsah proteinů a chlorofylu na jednotku listové plochy nebývá snížen. Stonky a listy zakrňují, a také rychlost růstu kořenů se zpomaluje, i když méně než u nadzemních částí. Dozrávání plodů bývá za nedostatku fosforu opožděno. Pohyb fosforu v rostlinách je snadný a i jeho translokace ze stárnuících orgánů do mladých, rostoucích částí je běžná.

Draslík je prvek, jehož nedostatek v přírodě bývá mnohem méně častý než v případě dusíku a fosforu. Obsah draslíku v půdě velmi závisí na typu matečné horniny - živce, slídy i některé jíly mají draslíku dostatek a půdy na nich vzniklé jsou jím bohatě zásobeny. V případě nedostatku draslíku je silně omezen růst všech orgánů, vytvářejí se malé plody a hlízy, na listech vznikají nekrózy (od špičky a okrajů směrem k bázi). Stonky i kořeny jsou slabé a málo odolné vůči infekci i vůči jiným stresovým faktorům (sucho, mraz). Draslík není stavební součástí žádných trvalých struktur, ale přesto je nejhojnějším kationtem (100 až 200 mM, jak v cytosolu, tak i ve vakuolách). V rostlinách není metabolizován, nevytváří pevné komplexy (na rozdíl od Ca^{2+} a Mg^{2+}). Není proto kompetitorem pro jiné kationty a jeho transport v rostlině je mimořádně rychlý, k čemuž přispívají i hojné draslíkové kanály v membránách. Draslík má v rostlině několik značně odlišných funkcí:

- aktivuje mnoho enzymů, a to především udržováním optimální konformace a afinity k substrátu. Při nedostatku draslíku proto dochází kromě jiného i k hromadění primárních asimilátů v listech, neboť nejsou aktivní příslušné syntázy a kinázy katalyzující syntézu škrobu a transportních forem sacharidů,
- aktivuje procesy syntézy proteinů a činnost ATP-ázy v plazmatické membráně,
- je nutný pro dálkový transport aniontů jako doprovodný kationt, v lýku i jako osmotikum,
- je nutný pro všechny procesy závislé na osmotickém tlaku, tedy především pro dlouhivý růst, pohyby průduchů a některé další nastické pohyby (jako hlavní osmotikum zajišťuje dostatečný turgorový tlak).

Síra ve formě snadno rozpustných síranů bývá v půdě obvykle v dostatečném množství, a proto ke zjevnému nedostatku dochází jen velmi zřídka. Pokud k němu dojde, pak se vizuálně projevuje blednutím mladých listů, neboť redistribuce ze starších listů je velmi malá. Asimilace síry v rostlině byla již probrána ve 2. části učebních textů. Z přijatých síranů je vždy asimilováno jen takové množství, které rostlina nutně potřebuje. Neredukované sírany mohou být uloženy ve vakuole, ale také zabudovány do sulfolipidů a polysacharidů, Významnou zásobárnou redukované síry představuje glutation, kterého je zvláště velké množství (asi 50 %) v chloroplastech. Tam také plní významnou antioxidační funkci. Glutation je výchozí sloučeninou pro tvorbu fytochelatinů (viz dále v kapitole o působení těžkých kovů). Síru obsahuje i celá řada sekundárních metabolitů (např. alliin v česneku a cibuli, glukosinoláty u brukvovitých). Nedostatek síry vyvolává poruchu syntézy proteinů a chlorofylu, a v důsledku toho dochází ke zpomalení růstu nadzemních částí. Kořeny obvykle nebývají postiženy.

Hořčík je také prvek, kterého bývá ve většině půd dostatek. Přesto se v současné době stává hlavní limitující živinou pro vegetaci v oblastech s kyselými půdami. Za nízkého pH a za zvýšeného přísunu aniontů (NO_3^- , SO_4^{2-}) ve srážkové vodě bývá vyplavován ze sorpčního komplexu rhizosféry do hlubších vrstev půdy. K prvním symptomům nedostatku hořčíku patří žloutnutí starších listů (úbytek chlorofylu), snížený obsah proteinů a snížená rychlost

fotosyntézy. Kromě vazby v molekule chlorofylu hořčík aktivuje celou řadu enzymů, včetně hlavního karboxylačního enzymu *Rubisco*.

Vápník je obsažen v nedostatečném množství pouze v některých velmi kyselých půdách. Obdobně jak u hořčíku, kyselé deště přispívají k jeho rychlému vyplavování z půdy. Nedostatek vápníku se nejvíce projevuje u mladých orgánů. Vápník (na rozdíl od hořčíku) není transportován lýkem a proto také není retranslokován ze starých orgánů do mladých. Nejvíce jeho nedostatkem trpí meristematická pletiva, protože bez Ca-pektátu nelze vytvořit střední lamelu při dělení buněk a ani dostatečně pevnou buněčnou stěnu. Dochází k deformacím růstu, někdy až k odumření meristémů. Také správná funkce membrán není bez vápníku možná - je nutný k zachování soudržnosti fosfolipidové vrstvy. Celkový obsah vápníku bývá v rostlinách (zejména dvouděložných) značný, ovšem většinou se na něm podílejí nerozpustné soli (hlavně uhličitan a šřavelan) uložené ve vakuole či v buněčné stěně. Koncentrace vápníku v cytosolu je přísně udržována na velmi nízké úrovni (0,1 až 0,2 μM). Důvodů prototo omezení je několik. Především by mohlo dojít k inaktivaci fosfátů tvorbou nerozpustných vápenatých solí. Za vyšší koncentrace v cytosolu by také vápník nemohl plnit významnou úlohu při vnitrobuněčných přenosech signálů a u celé řady enzymatických aktivit. Při transportu v buňkách je vápník obvykle vázán na bílkovinu *calmodulin*.

Železo se vyskytuje v hojné míře prakticky ve všech půdách, ovšem ne vždy ve formě dostupné pro rostliny. Při snížené aciditě (nad pH 5) přechází za dostatku kyslíku většina rozpustných železnatých sloučenin na mnohem *méně rozpustné soli železité*. Nedostatek dostupného železa je proto častý na půdách s alkalickou reakcí (např. na vápencovém podkladu). Zjevné příznaky špatného zásobení rostlin železem jsou podobné jako u hořčíku (ztráta chlorofylu), avšak s tím rozdílem, že jako prvé jsou postiženy mladé listy. Translokace železa ze starších listů není téměř možná, neboť je vázáno v pevných komplexech. Železo je významnou součástí mnoha enzymů, především v hemových skupinách cytochromů, peroxidázy a katalázy, ale i v nehemových vazbách Fe-S proteinů (např. ferredoxin, akonitáza, Fe-superoxiddismutáza). Všechny tyto enzymy mají redoxní funkci, neboť snadná a vratná změna oxidačního stupně železa umožňuje přenosy elektronů. Známe ovšem i neredoxní typy enzymů s obsahem železa, které jsou nutné pro syntézu etylénu, mastných kyselin a *chlorofylu*. Proto se nedostatek železa projevuje nejnapadněji blednutím listů (= sníženým obsahem chlorofylu).

Pro příjem železa z málo rozpustných forem v půdě jsou u některých druhů rostlin vyvinuty zajímavé adaptace. Jednou z možností, kterou využívají hlavně dvouděložné rostliny, je vylučování komplexotvorných organických kyselin a fenolických látek. Železité ionty jsou pak na povrchu kořenů uvolněny z komplexů, redukovány na Fe^{2+} a teprve pak přijímány. Dokonalejší adaptační strategií, účinnou i na velmi alkalických půdách, je chelátová vazba trojmocného železa bez nutnosti okyselovat okolí kořene. Předpokladem však tvorba a vyloučení zvláště silných chelatizačních sloučenin, označovaných jako *fyto siderofory* (obvykle typu iminokarboxylových kyselin). Rostlina pak přijímá celý chelátový komplex, a až v kořenech dochází k uvolnění Fe^{3+} a k redukcí na Fe^{2+} . Tato cesta získávání železa je obvyklá jen u trav.

Chlor je přijímán ve formě chloridů, a to obvykle ve větším množství, než kolik je nutné. Příznaky jeho nedostatku se u rostlin v přírodě neprojevují, lze je však vyvolat pokusně: růst bývá velmi zpomalen, listy blednou a vadnou. Stopová množství chloru lze nalézt v rostlinách ve více než stovce organických sloučenin (včetně bílkovin), z nichž mnohé zabezpečují zcela základní funkce (např. fotolýzu vody při fotosyntéze, aktivaci ATP-ázy v tonoplastu, dělení buněk, růstové regulace). Významná je i funkce chloridových iontů jako osmotika, zejména při pohybech prùdchů.

Mangan bývá v půdách v dostatečném množství, i když, obdobně jako v případě železa, rozpustnost jeho solí je při vyšším pH malá. Je přijímán jako Mn^{2+} či v chelátové formě a jeho nedostatek (což je vzácný případ) se projeví v první řadě rozpadem thylakoidních membrán chloroplastů, navenek pak mozaikovitou chlorózou listů. Mangan má klíčovou úlohu při fotolýze vody, je aktivátorem několika desítek enzymů a součástí některých redoxních systémů.

Bór je prvek, jehož obsah v půdách značně kolísá a příznaky jeho nedostatku byly pozorovány už dávno (srdéčková hniloba řepy, skvrnitost jablek, snížení rychlosti fixace dusíku hlízkovými bakteriemi, aj.). Často jde však o interakci s jinými prvky. Prvním, i když méně zjevným příznakem nedostatku bóru, je zpomalení buněčného dělení v apikálních meristémích, což se dává do souvislosti s prokázanou inhibicí syntézy nukleových kyselin, syntézy membrán a buněčné stěny. Detailní informace o všech aspektech mechanismu působení bóru v rostlině nám dosud chybí. Není součástí žádného ze známých enzymů, ani žádný neaktivuje. Zcela jistě však má nezastupitelnou úlohu při tvorbě funkčních komplexů s řadou sacharidů, hemicelulóz a fenolických látek.

Zinek, měď, molybden a nikl patří sice mezi prvky nezbytné pro růst, avšak jejich potřeba je tak nepatrná, že se s projevy nedostatku v přírodě sotva setkáme. Všechny tyto prvky jsou především významnou součástí některých enzymů.

Zinek obsahují např. alkalické fosfatázy, RNA-polymeráza, alkoholdehydrogenáza a karbonátanhydráza. Kromě toho aktivuje několik desítek dalších enzymů nutných pro syntézu proteinů, pro metabolismus sacharidů, degradaci RNA, syntézu tryptofanu a auxinů.

Měď je součástí mnoha proteinů s redoxní funkcí, např. cytochromoxidázy, askorbát-oxidázy, polyfenoloxidázy a plastocyaninu.

Molybden je obsažen především v molybdopterinovém kofaktoru enzymů nitrogenázy, nitrátreduktázy a xantinoxidázy/reduktázy. Nedostatek molybdenu se projevuje zpomalením růstu, chlorózami a nekrózami listů. Zvláště náchylné jsou bobovité rostliny, kukuřice a kvěťák.

Nikl byl zařazen mezi nezbytné prvky jako poslední (v roce 1988) když se ukázalo, že nikl obsahující enzym ureáza je skutečně nutná pro biochemické funkce rostlin, zejména pak těch druhů, které vytvářejí hodně ureidů jako transportních dusíkatých látek (např. Bobovité a javorovité).

Sodík patří už mezi *benefiční prvky*, stejně tak jako následující křemík, kobalt a selen. Zvláště důležitý je pro halofytní rostliny, ale i pro některé další tzv. natrofilní druhy včetně řepy a kukuřice. U halofytů může nahrazovat draslík v úloze hlavního osmotika. U C_4 rostlin významně stimuluje syntézu fosfoenolpyruvátu z pyruvátu.

Křemík je zvláště hojně přijímán rostlinami z čeledí šáchorovitých a lipnicovitých. Zpevňuje buněčnou stěnu a tím zvyšuje i mechanickou odolnost listů a stébel vůči mechanickému poškození (poléhání), i vůči ataku herbivorů a patogenů.

Kobalt je nutný pouze pro zdárný vývoj symbiotické fixace dusíku u těch druhů rostlin, které jsou ji schopny provozovat (je součástí vitamínu B_{12} v hlízkových bakteriích).

Selen je vázán v aminokyselinách selenocysteinu a selenometioninu. Na rozdíl od živočichů však pro rostliny tyto aminokyseliny nejsou nezbytné.

4.4. Vliv zasolení, acidity a hypoxie půdy

Silně zasolené a kyselé půdy

Zasolené půdy se vyskytují nejen v blízkosti moře, ale i ve vnitrozemských oblastech, kde potenciální výpar (tj. množství vody které by se za daných klimatických podmínek odpařilo, pokud by byla voda v půdě stále v dostatečném množství) převažuje nad srážkami. Jde především o rozsáhlé pouště a polopouště na všech kontinentech. K lokálnímu zasolení může dojít i na dlouhodobě zavlažovaných pozemcích.

Problémy, kterým rostliny musí čelit při růstu na zasolených půdách, jsou komplexní povahy. Kromě vlastního toxického vlivu vysoké koncentrace některých iontů (zejména Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} a Mg^{2+}) to bývá velmi nízký vodní potenciál a zhoršené fyzikální vlastnosti půdy. Neadaptované rostliny hromadí ve svých buňkách uvedené ionty v takovém množství, které je neslučitelné s normální funkcí enzymů. Velmi brzy pak dochází k zastavení dělivého i dlouhivého růstu a nakonec k odumření celé rostliny.

Přesto známe řadu druhů, které snášejí bez poškození i značné zasolení půdy (halofytní rostliny). Adaptace k zasolení probíhala několika směry. U části druhů je příjem solí dokonale kontrolován vysokou selektivitou plazmatické membrány pro transport iontů do buněk kořenů, takže i v podmínkách silného zasolení (např. u mangrovů na mořských pobřežích) proudí v xylému téměř čistá voda. Tyto druhy mají též schopnost dobrého rozlišení iontů Na^+ a K^+ (s preferencí příjmu K^+).

Glykofyty - do 1% obsahu solí v půdním roztoku (= 10 g l⁻¹)
Halofyty - obvykle do 5 až 10 % (extrém 26% - *Salicornia* sp.)
Mořská voda - průměrný obsah solí 3,5%
- hlavní složky: **NaCl (78%), MgCl₂ (10%), MgSO₄(5%), CaSO₄ (4%), KCl (2%)**
- vodní potenciál **-2,7 MPa!**
Pokud hodnota vodního potenciálu vody v půdě klesne pod hodnotu -1,5 MPa, pak běžné rostliny (glykofyty) ji nejsou schopny již přijímat!
Dominantní solí na půdách v blízkosti moře je NaCl, ve vnitrozemských zasolených půdách spíše sírany a uhličitany.

U většiny halofytů však není příjem solí tak dokonale řízen, což vede k jejich hromadění v listech. Avšak i u těchto druhů jsou organely a enzymy v cytosolu citlivé na vyšší obsah solí, a proto jsou soli ukládány do vakuoly a apoplastu. Vysoký osmotický tlak vakuolární šťávy musí být vyrovnáván zvýšenou koncentrací kompatibilních osmoticky aktivních látek v cytosolu (sacharidů, prolinu, aj.). Část solí bývá vylučována na povrch listu .

Hodnoty vodního potenciálu zasolených půd bývají běžně sníženy pod -1 MPa. Pokud je vystavena běžná, neadaptovaná rostlina náhlému působení zasolené půdy, jednou z prvních reakcí je zvýšení osmotického tlaku v buňkách kořenů (osmoregulací). Jen tak lze snížit hodnoty vodního potenciálu na úroveň nižší, než je v půdě, což je podmínkou pro zachování příjmu vody. U halofytů obou uvedených skupin jsou hodnoty osmotického tlaku trvale velmi vysoké (i více než 10 MPa!). Další významnou reakcí je tvorba stresových proteinů, které jsou velmi podobného typu jak při stresech z vysoké teploty a z nedostatku vody.

Silně kyselé půdy

Acidifikace půd představuje v současné době závažný problém nejen ve střední Evropě, ale i na jiných kontinentech. Nadměrná kyselost půdy může mít velmi rozmanité příčiny i následky pro růst rostlin. Na poklesu pH půdy se podílí nejen vstup vodíkových iontů z kyselých srážek, ale i nevhodný způsob obhospodařování (nadměrné hnojení dusíkatými

hnojiv, dlouhodobé pěstování monokultur stejných plodin, sklizeň a odvoz veškeré biomasy). Vzestup koncentrace iontů H^+ je účinně tlumen pouze na půdách s vyšším obsahem $CaCO_3$. Na většině ostatních půd má dominantní úlohu v řízení pH komplex s hydratovanými ionty hliníku, který umožňuje pokles pH až na hodnotu 3,5. Hodnoty nižší jsou již v přírodě výjimečné (např. některé rašelinné půdy či půdy s vyšším obsahem síry).

Přímé poškození rostlin vysokou koncentrací vodíkových iontů je poměrně vzácné, neboť k němu dochází obvykle až při hodnotě pH 3 a nižší. Mnohem významnější je tedy nepřímé negativní působení zvýšenou rozpustností některých sloučenin v půdě při nízkém pH. Zejména dochází k uvolňování vysoce toxických iontů hliníku (Al^{3+}). Také volné ionty Fe^{2+} a Mn^{2+} působí v nadbytku toxicky.

Vysoká koncentrace vodíkových iontů v půdě vytěsňuje kationty (zejména Ca^{2+} , Mg^{2+} a K^+) ze sorpčních vazeb na koloidech a snadno dojde k jejich vyplavení z půdy. Rostliny pak trpí nedostatkem těchto kationtů. Dále je snížena dostupnost fosforu (vazbami na volné ionty hliníku a železa se tvoří nerozpustné sloučeniny) i nitrátového dusíku, protože nitrifikační bakterie jsou citlivé na pokles pH.

Rostliny, které úspěšně rostou na kyselých půdách, jsou adaptovány k tolerování nepřímých vlivů nízkého pH. V první řadě to bývá tolerance k vysoké koncentraci hliníku, manganu a železa. Tyto adaptované druhy nejsou z fyziologického hlediska obligátně acidofytní, neboť v kultivaci dobře rostou ve značně širokém rozmezí pH. Vyhraněná ekologická vazba na stanoviště s nízkým pH půdy bývá podmíněna nepřímo řadou dalších faktorů, které jsou často jen v koincidenci (nikoli tedy v příčinném vztahu) s hodnotou pH.

Negativní působení kyselých půd na rostliny

Primární vlivy:

- toxické působení vysoké koncentrace Al^{3+} a Mn^{2+} ,
- inhibiční vliv nedostatku dostupného P, Ca, Mg.
- inhibiční vliv vysoké koncentrace vodíkových iontů na funkce kořenů (zejména na transportní procesy),
- inhibiční vliv vysoké koncentrace amonných iontů,

Sekundární vlivy (v důsledku inhibice růstu a funkce kořenů):

- omezený příjem vody (\Rightarrow náchylnost k vodnímu stresu),
- omezená kapacita příjmu živin (\Rightarrow zpomalení mnoha fyziologických procesů včetně růstu, náchylnost ke stresům)
- snížená odolnost vůči patogenům.

Adaptační znaky rostlin velmi odolných k toxickému působení Al^{3+}

- chelatizace Al, Fe, Mn v okolí kořenů vylučováním aniontů organických kyselin (zejména jablečné a citronové) kořeny,
- efektivnější příjem a využití Ca, Mg a P (zejména nedochází k blokování vápníkových kanálů!),
- selektivní vazba Al^{3+} v buněčných stěnách omezující jeho inhibiční vliv na příjem kationtů živin,
- dokonalejší chelatizace Al^{3+} v cytosolu (pomocí org. kyselin) a ukládání inaktivních komplexů ve vakuole,
- vyšší selektivita v příjmu forem dusíku (preference NO_3^-).

Mechanismus toxického působení iontů Al^{3+}

- blokování vazebných míst pro Ca^{2+} a Mg^{2+} v apoplastu a výrazné omezení rychlosti jejich transportu do cytoplasmy,
- rozvrat v signálních a aktivačních procesech, jejichž řízení je normálně závislé na náhlých změnách koncentrace Ca^{2+} ,
- blokování vazby Ca^{2+} do pektátů (inhibice dělení a růstu buněk).

Zřídka bývá nalezena jasná závislost mezi stupněm poškození rostlin a koncentrací Al^{3+} v půdě či v rostlinách! Poškození spíše záleží na poměru koncentrací Ca^{2+} a Al^{3+} v půdním roztoku.

Při poklesu poměru Ca^{2+}/Al^{3+} :

pod 10 - dochází k poškození jen velmi citlivých druhů,

pod 1 - poškození již dosti odolných druhů (např. smrk),

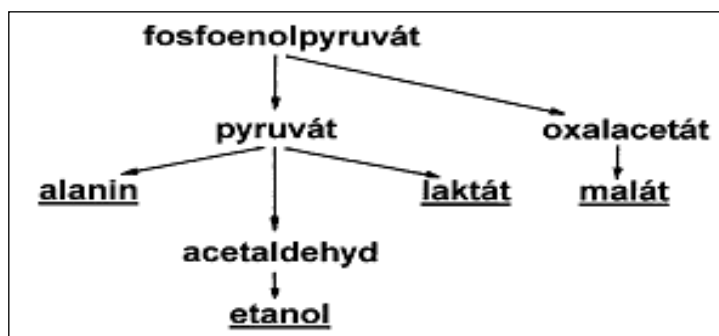
pod 0,05 - poškození i těch nejodolnějších druhů (např. acidofilní trávy).

Přídavkem Ca^{2+} a Mg^{2+} do rhizosféry lze tedy toxicitu Al^{3+} snížit!

Nedostatek kyslíku v půdě (hypoxie)

Nadzemní části rostlin jsou obklopeny vzdušným prostředím, ve kterém je koncentrace kyslíku vysoká a stálá (přibližně 21 objemových procent). Ve zcela jiné situaci jsou ale podzemní orgány, neboť koncentrace kyslíku v plynné fázi půdního systému je trvale snížena ve srovnání s volnou atmosférou. Kyslík je totiž nepřetržitě odebírán nejen respiračními procesy kořenů, ale i respiračními procesy půdní mikroflóry. V půdě s dostatkem velkých pórů není toto snížení v okolí kořenů velké (nanejvýš na polovinu koncentrace ve volné atmosféře), díky rychlému doplňování difúzním tokem ze vzduchu nad povrchem půdy. Pokud je ovšem vzdušných pórů málo, a navíc jsou úzké (jak tomu bývá u těžkých jílových půd), nebo v důsledku zvýšeného obsahu vody v půdě (zamokření), pak může koncentrace kyslíku v rhizosféře klesnout na hodnoty blízké nule. Tyto hypoxické až anoxické podmínky způsobují vážný stres u těch druhů rostlin, které nemají vhodné adaptace.

Jakmile koncentrace kyslíku v půdním vzduchu v okolí kořenů klesne pod 2 až 4 % (objemová), dochází k inhibici aerobních respiračních procesů, a to jak v buňkách kořenů, tak i u půdních mikroorganismů. V první řadě je zpomalena až zastavena funkce elektronového transportního řetězce v mitochondriích a hromadí se NADH inhibuje činnost citrátového cyklu. Glykolýza inhibována není, neboť nevyžaduje kyslík a její hlavní produkt, pyruvát, může být zpracován náhradní anaerobní cestou (fermentací). Při fermentačním metabolismu je spotřebováván i NADH vznikající při glykolýze, takže nic nebrání tomu, aby reakce probíhaly tak dlouho, dokud je k dispozici primární substrát.



Možné cesty zpracování produktů glykolýzy při nedostatku kyslíku v buňkách

Přechod na uvedené anaerobní disimilační procesy má pro rostlinu velmi vážné následky. Především trpí nedostatkem energie. Zatímco z jednoho molu glukózy lze získat aerobní

cestou až 32 molů ATP, anaerobním rozkladem jen dva. Na pokrytí normálních energetických potřeb musí proto rostlina v prostředí bez kyslíku spotřebovat mnohonásobně větší množství organických látek (zrychlenou glykolýzou), což brzy vede k jejich úplnému vyčerpání. Dalším nebezpečím jsou konečné produkty fermentace, neboť etanol a zejména kyselina mléčná jsou ve vyšší koncentraci toxické sloučeniny.

Kromě přímého negativního působení nedostatku kyslíku na fyziologické procesy dochází i v *chemismu půdy* k celé řadě změn, které nepřímě ohrožují rostliny. Mnoho druhů půdních mikroorganismů je dobře adaptováno pro život v anaerobním prostředí. Mají totiž schopnost při svých respiračních procesech využívat místo kyslíku i jiné látky jakožto akceptory elektronů a převádět je do redukovaného stavu. Jednou z možností je redukce nitrátů na molekulový dusík (denitrifikace). Pro rostliny mnohem nebezpečnější je však redukce síranů na sirovodík, a také uvolnění dvojmocných iontů železa a manganu redukcí oxidovanějších nerozpustných forem. Vzniklé látky jsou ve vyšší koncentraci toxické a navíc Fe^{2+} váže volné fosfátové ionty do nerozpustné soli. Za nedostatku kyslíku je silně inhibována činnost nitrifikačních bakterií. Většina přijatelného dusíku je proto ve formě amonných iontů, které mohou působit ve vyšší koncentraci na některé druhy rostlin inhibičně až toxicky.

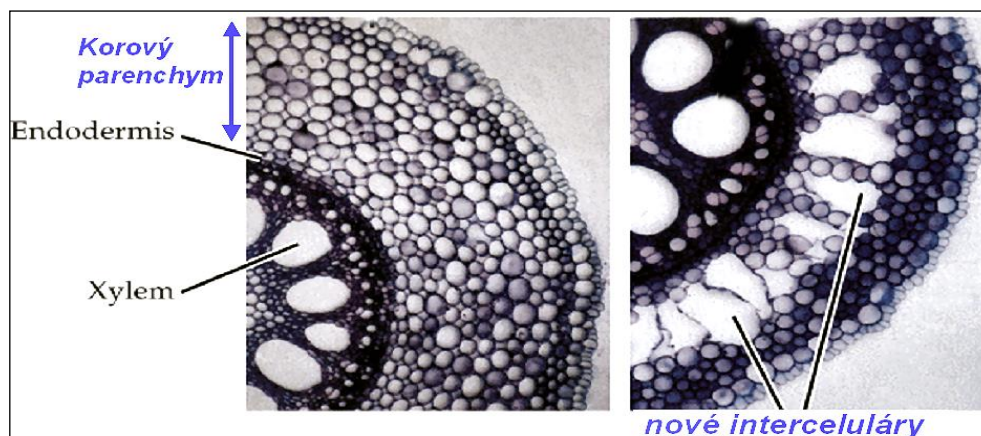
Aklimační reakce na náhlé snížení koncentrace kyslíku (např. při silných deštích či po zaplavení půdy) má značně komplexní charakter. Dochází především ke změnám v koncentraci *fytohormonů* a k syntéze stresových proteinů. Zvyšuje se syntéza *kyseliny abscisové*, která zprostředkovává regulaci řady procesů i v nadzemních orgánech (zavírání průduchů, inhibici růstu, aj.). Tvorba *cytokininů* v kořenech je naopak zpomalena a stejně tak i tvorba *etylénu*, protože vyžaduje kyslík. Přesto koncentrace etylénu v kořenech vzrůstá, neboť jsou značně omezeny jeho ztráty difúzí do okolního prostředí. Bylo také zjištěno, že hypoxickém prostředí stoupá citlivost buněk na působení etylénu. Etylén je pravděpodobně hlavním signálem ke spuštění celé řady dalších aklimačních reakcí. Jednou z prvních je indukce tvorby enzymů rozkládajících pektinové střední lamely buněčných stěn. Dochází tak k rychlé tvorbě rozsáhlých *intercelulár* v parenchymatických pletivech kořenů a stonku. Jejich propojením vznikají podélné kanálky, kterými do kořenů difunduje kyslík z nadzemních částí. Nově vytvářené kořeny jsou nápadně ztlustlé a velmi málo větvené.

Proteiny indukované sníženou koncentrací kyslíku (anaerobic stress proteins, ASP) můžeme v buňkách dokázat nejen za úplné anoxie, ale už při snížení koncentrace kyslíku ve vzduchu v okolí rostliny asi na 4 %. Jejich indukce je poněkud pomalejší než u předešlých skupin stresových proteinů, nicméně už po pěti hodinách trvání nedostatku kyslíku představuje tvorba ASP přibližně tři čtvrtiny celého objemu proteosyntézy. Je to dáno také tím, že jejich tvorbě předchází útlum syntézy mnoha proteinů vyskytujících se v buňkách za dostatku kyslíku. Početnou skupinu v ASP, kterých celkem známe asi 20, tvoří enzymy nutné pro některé specifické cesty metabolismu sacharidů, ale i pro glykolýzu a fermentační procesy (např. *alkoholdehydrogenáza*, *pyruvátdekarboxyláza* a *laktátdehydrogenáza*).

I přes velmi nepříznivé účinky hypoxického prostředí na rostliny a velmi dramatické změny v buňkách po jeho náhlém navození, známe celou řadu druhů, které úspěšně rostou na trvale zamokřených či zaplavených půdách. Na těchto lokalitách bývají dokonce dosahovány špičkové hodnoty produkce biomasy (např. rákosiny, rýžová pole). Z toho je zřejmé, že adaptační schopnosti některých druhů jsou skutečně dokonalé.

Základem úspěšného *přizpůsobení mokřadních rostlin* je zajištění rychlého transportu kyslíku do kořenů. Rozsáhlý systém intercelulár, tvořící až 60 % z celkového objemu pletiv ve stoncích a kořenech, patří u nich k trvalým, konstitučním znakům. Transport plynů v intercelulárách neprobíhá pouze difúzí, ale i mnohem rychlejším hromadným tokem (*mass-flow*). K tlakovému rozdílu (jakožto hybné síly hromadného toku) dochází jednak kolísáním teploty nadzemních částí v průběhu dne, jednak snadným únikem vydýchaného oxidu uhličitého do vody v okolí kořenů. Kyslík transportovaný do kořenů je využíván nejen

k respiračním procesům, ale i k detoxikaci rhizosféry, především k oxidaci Fe^{2+} a Mn^{2+} na nerozpustné sloučeniny



U kořenů rostoucích za dostatku kyslíku v půdě (levý obrázek) nejsou téměř žádné interceluláry, avšak za nedostatku kyslíku (po náhlém zaplavení) se rychle vytvářejí (vpravo).

Adaptované rostliny mají kromě výhodných morfologických znaků i řadu trvalých metabolických zvláštností. Patří k nim např. velmi dokonalé řízení rychlosti glykolýzy a tudíž u nich nedochází za nedostatku kyslíku k tak prudkému zrychlení rozkladných procesů, které by vedlo k vyčerpání rezerv. Také konečné produkty fermentace (především ethanol) bývají velmi účinně vylučovány z kořenů do vnějšího prostředí. Někdy také mohou převažovat méně toxické produkty, jako např. malát, alanin či glycerol. U druhů tolerantních k nedostatku kyslíku dochází k syntéze stresových proteinů rychleji než u druhů netolerantních.

4.5. Působení toxických polutantů

Plynné, kapalné i pevné složky prostředí, ve kterém v přírodě rostliny rostou, jsou velmi pestrá směsí desítek chemických sloučenin, z nichž některé mohou mít výrazně inhibiční až toxické účinky. Z plynů je nejvíce nebezpečný ozón a oxid siřičitý, v půdě pak ionty těžkých kovů a aromatické organické látky. Stále vyšší obsah toxických látek v prostředí je spojen hlavně s průmyslovou a zemědělskou činností člověka (spalování fosilních paliv, používání umělých hnojiv, pesticidů, detergentů atd.). Tak se dostávají do prostředí i sloučeniny, které se v přírodě nikdy dříve nevyskytovaly (*xenobiotika*).

Ozón je obvykle nejtoxičtější složkou přízemní vrstvy atmosféry (*troposféry*), i když jeho koncentrace velmi kolísá jak časově tak místně (průměrná hodnota maxim bývá v rozmezí 300 až 500 $\mu\text{g m}^{-3}$). Naprostá většina troposférického ozónu vzniká fotolýzou oxidů dusíku (NO , NO_2), a také některých plynných organických sloučenin (uhlovodíků). K rozkladu těchto látek dochází účinkem ultrafialového záření. Velké koncentrace ozónu se proto nejčastěji vytvářejí v horních vrstvách znečištěného ovzduší vystavených intenzivnímu slunečnímu záření, zvláště pokud déle trvá inverzní typ počasí s malou turbulentní výměnou. Vznikající ozón může být v tom případě velmi nebezpečný pro rostliny v horských oblastech. Koncentrace ozónu ve vzduchu bývá obvykle nejmenší v noci a nejvyšší v odpoledních hodinách. Nejvíce poškozené bývají druhy s intenzivní výměnou plynů v listech.

Ozón vstupuje do listů výhradně průduchy a již v intercelulárách, v kontaktu s vlhkými buněčnými stěnami, se rychle rozkládá. Průnik nerozloženého ozónu přes plazmatickou membránu je stěží možný. Při rozkladu ozónu vzniká nejen molekulový kyslík, ale jako meziprodukty i reaktivní superoxid (O_2^-), peroxid vodíku a hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$). Tyto sloučeniny v prvé řadě způsobují nekatalyzovanou oxidaci složek buněčné stěny (zejména proteinů a fenolických látek), a složek plazmatické membrány (lipidů i proteinů).

Tvorba nekrotických skvrn na listech poškozených ozónem velmi často připomíná symptomy hypersensitivní reakce na poškození patogeny (viz str. 165). Na počátku této reakce, vedoucí k náhlé smrti buněk, je také tvorba aktivních forem kyslíku v buněčné stěně, a tak lze oprávněně spekulovat o obdobném mechanismu obou reakcí, i když je spuštěn velmi odlišnými primárními podněty. Pak už není tolik překvapující zjištění, že ozónem bývá indukována (kromě jiného) tvorba proteinů se specifickým ochranným účinkem proti patogenům, např. lytické enzymy *chitináza* a *glukanáza*. Při působení ozónu dochází velmi rychle ke zvýšené tvorbě etylénu (expresí genu pro ACC-syntázu), ovšem tvorba etylénu spíše urychluje poškození a smrt buněk (při zablokování tvorby etylénu je poškození menší!). K zesílení negativního působení ozónu může pravděpodobně přispívat reakce uvolněného etylénu s ozónem v buněčné stěně provázená vznikem superoxidu a reaktivních aldehydů. Odumírání buněk pod vlivem vyšších dávek ozónu nemusí být způsobováno pouze "programovanou" hypersensitivní reakcí, ale i neregulovaným způsobem po vážném narušení integrity plazmatické membrány peroxidací lipidů.

Ne vždy však působení ozónu musí končit odumíráním buněk. Při interakci menších (neletálních) dávek ozónu s buněčnou stěnou se aktivují i některé *ochranné mechanismy*, které omezují možné poškození buněk. Zvyšuje se aktivita glutathion-s-transferázy, která odstraňuje produkty peroxidace lipidů. Zvyšuje se také aktivita "antioxidačních" enzymů, *superoxiddismutázy*, *askorbátperoxidázy* a *glutathionreduktázy*. Je stimulována tvorba ligninu a extensinu v buněčných stěnách. Při *dlouhodobém působení* i poměrně nízké koncentrace ozónu však může dojít ke chronickému poškození listů, které se vyznačuje snížením antioxidační ochrany, úbytkem *Rubisco*, poklesem rychlosti fotosyntézy a rychlým stárnutím.

Oxid siřičitý se sice v atmosféře Země vyskytoval i před industriální érou (z vulkanických emisí), ovšem v důsledku spalování uhlí s velkým obsahem síry se jeho koncentrace postupně zvyšovala až do fytotoxických hodnot. V současné době již nepůsobí SO₂ tak vážné problémy jako kdysi, neboť uhlí se spaluje již méně a velké spalovny (hlavně tepelné elektrárny) jsou vybaveny odsiřovacími zařízeními.

Oxid siřičitý vstupuje do listů hlavně otevřenými průduchy a difúzí v intercelulárách se snadno šíří ke všem buňkám listového mezofylu. Po proniknutí buněčnou stěnou se rychle rozpouští a mění na siřičitanové anionty, jejichž naprostá většina vstupuje do chloroplastů. Tam se v menších koncentracích neprojeví škodlivě, neboť za dostatku záření dochází právě v chloroplastech k jejich redukci (na siřičitanový iont) a k následnému zabudování do organických sloučenin. Ve vyšší koncentraci však siřičitanové ionty způsobují nadměrné snížení pH cytosolu a blokují činnost karboxylačního enzymu *Rubisco*, čímž je inhibován i průběh sekundárních procesů fotosyntézy.

V odolnosti k toxickému působení SO₂ existují velké mezidruhové rozdíly. Nejvíce ohroženy bývají druhy s dlouhověkými listy, zejména jehličnaté stromy, a také některé stélkaté rostliny s růstovou aktivitou v zimním období, kdy bývá koncentrace SO₂ nejvyšší.

Aklimační reakce na působení SO₂ zahrnují zvýšení aktivity enzymů metabolismu síry a také zvýšení tlumící (pufrovací) kapacity buněk. Tato kapacita je ale závislá na dostatečném zásobení rostliny bazickými kationty (Ca²⁺, Mg²⁺). Nedostatek těchto prvků je běžný na acidifikovaných půdách, ke kterým patří většina našich lesních půd, především pak v horských oblastech. Deficitní rostliny z těchto oblastí jsou proto značně náchylnější na poškození oxidem siřičitým.

Bylo zjištěno, že druhy s fixační cestou C₄ jsou mnohem odolnější vůči toxickému působení SO₂ než rostliny typu C₃. Je to dáno hlavně menší citlivostí PEP-karboxylázy k SO₂ a lokalizací Calvinova cyklu do velmi dobře chráněných buněk pochev cévních svazků se zvýšenou koncentrací CO₂.

Těžké toxické kovy, zejména zinek, olovo a kadmium, se dostávají do půdy ve větších množstvích usazováním prachu z průmyslových procesů a z odpadních vod. Ionty těchto

kovů jsou velmi snadno přijímány kořeny, neboť selektivita transportních proteinů je zřejmě nedostatečná pro jejich rozlišení od těch prvků, které jsou pro život rostliny nezbytné. Po vstupu do buněk inaktivují některé enzymy a redoxní systémy. Inhibice dělení a dlouhivého růstu buněk, která se projevuje zejména zpomalením růstu primárního kořene, bývá jedním z prvních příznaků jejich toxického působení.

Do nadzemních orgánů je z kořenů translokována jen menší část přijatých iontů těžkých kovů, přesto jejich působení na inhibici základních metabolických procesů v listech (asimilace uhlíku, dusíku, respirace) je obvykle vážné a velmi brzo prokazatelné.

Zvláštnosti těžkých kovů ve vztahu k rostlinám

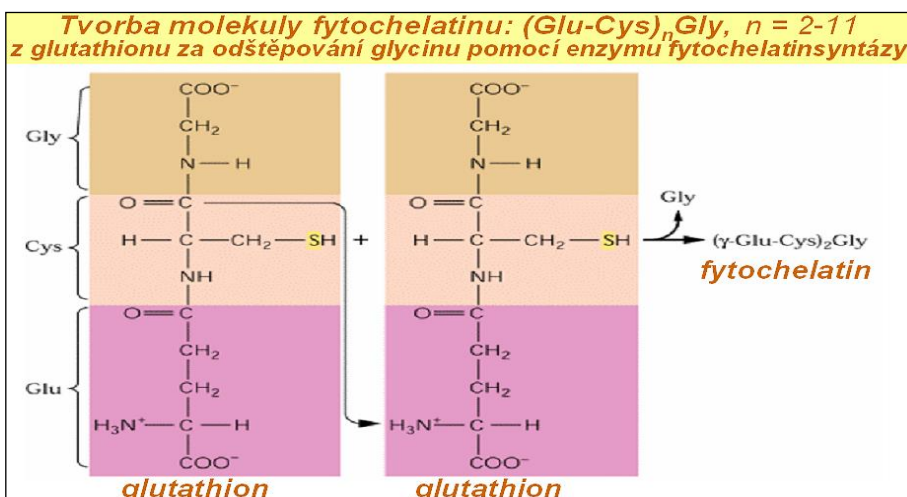
Významnější prvky s hustotou nad 5 g cm^{-3} (= těžké kovy):

As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Zn

- část z nich jsou prvky pro rostliny nezbytné (**mikroživiny**), ovšem všechny jsou v nadbytku toxické,
- v rostlinách mají převážně katalytickou a redoxní funkci,
- v půdě i v rostlinách se mohou vyskytovat ve více formách (z hlediska valence, iontové vazby, hydratace ...),
- snadno vytvářejí chelátové vazby s řadou sloučenin v půdě i v rostlinách,
- v půdě jsou vázány v dosti pevných vazbách, ovšem vzhledem k nepatrné potřebě rostlin (v případě mikroživin) zřídka jsou rostliny omežovány jejich nedostatkem.

V odolnosti rostlin k působení těžkých kovů existují velké rozdíly nejen mezi druhy, ale i uvnitř téhož druhu. Odolné rostliny (např. některé trávy) mohou především značně znesnadňovat vstup toxických iontů do cytosolu, a to jednak vylučováním organických kyselin do rhizosféry a i větší selektivitou transportních proteinů v plazmatické membráně.

K vnitrobuněčným detoxifikačním mechanismům patří především tvorba obecně stresových (nespecifických) proteinů a odolnějších izoenzymů. Další velmi účinnou aklimační reakcí je tvorba specifických sloučenin (*fytochelatinů*) schopných inaktivovat těžké kovy vazbou do chelátových komplexů. Fytochelatiny jsou zvláštní malé polypeptidy odvozené od tripeptidu glutathionu (viz rámeček níže). Vznikají spojením dvou až 11 molekul kyseliny γ -glutamové a cysteinu s jednou molekulou glycinu. Syntéza fytochelatinů neprobíhá na ribosomech, ale přímou biochemickou cestou, nicméně je indukována až přítomností iontů kovů v cytosolu. Komplexně vázané toxické ionty jsou transportovány do vakuoly, kde po uvolnění z fytochelatinu jsou opět inaktivovány vysokou koncentrací organických kyselin. Podobnou chelatační funkci mají i proteiny ze skupiny *metalothioneinů*, které jsou běžné u živočichů, ale najdeme je i u některých druhů rostlin.



4.6 Interakce rostlin s jinými organismy

Při studiu vztahů mezi prostředím a funkcemi rostlin nemůžeme zanedbat biotické složky prostředí, protože rostliny v přírodě nežijí nikdy bez interakcí s jinými organismy. Mechanismus vzájemného ovlivňování může být založen na změnách fyzikálně-chemických složek prostředí (kompetice o zdroje, alelopatie), anebo na přímém působení (herbivorie, parazitismus, symbiózy).

Kompetice, alelopatie, mykorhiza

Kompetice poškozují rostliny v těch případech, kdy množství zdrojů hmoty a energie (hlavně záření, vody a minerálních živin) není dostatečné pro optimální růst všech rostlin na určitém místě, a proto rychlost růstu některých z nich (nebo všech) je snížena. Toto snížení však musí být vyvoláno aktivitou sousedících rostlin, nikoli jen obecným nedostatkem zdroje. Různé druhy rostlin nemají obvykle stejnou schopnost využívat zdroje, a tak se velmi často setkáváme s dominancí jednoho, nejlépe adaptovaného druhu nad ostatními.

Zvláště zřetelný je tento vztah při kompetici o záření, kdy vysoká potenciální rychlost růstu stonků a listů rozhoduje o kompetiční úspěšnosti. Vzhledem k jednosměrnému toku záření znamená rychlé vytvoření velké listové plochy jedním druhem v dostatečné výšce nad ostatními téměř úplné využití tohoto zdroje. Konkurence o vodu a živiny, vzhledem k jejich difusnímu charakteru, je méně dramatická a není jen otázkou potenciální rychlosti růstu kořenů. Velmi záleží i na jiných jejich vlastnostech, např. na schopnosti snížit vodní potenciál či na efektivitě příjmu živin.

Základní *mechanismus kompetičních vztahů*, založený na rozdílech ve využívání zdrojů, je jednoduchý, ale jeho fungování v přírodě je často obtížně vysvětlitelné. Především pro silný synergický vztah mezi kořeny a nadzemními částmi - rychlejší příjem živin vede k rychlejšímu růstu listů, a tudíž k výhodě při kompetici o záření. Obdobně zase vrozená schopnost rychlejšího růstu stonků a listů, umožňující dokonalejší příjem záření a vyšší rychlost fotosyntézy, vede i k rychlejšímu růstu kořenů a k výhodě v kompetici o živiny. Určit primární příčinu kompetiční úspěšnosti je velmi obtížné. Často může být založena jen na zcela malém a obtížně měřitelném rozdílu na počátku růstu, který vzhledem k exponenciálnímu průběhu růstových procesů má dalekosáhlé následky.

Kompetice je velmi významnou (nikoli však jedinou) biotickou interakcí, určující strukturu a fungování rostlinných společenstev. Její podstatou jsou genotypově vázané rozdíly v základních fyziologických procesech. Naše znalosti o průběhu těchto procesů v přírodních podmínkách však obvykle nedostačují k uspokojivému vysvětlení kompetice. Zjednodušené spekulace mohou velmi zkreslovat skutečný stav.

Alelopatie je zvláštním případem vzájemného ovlivňování rostlin na čistě chemickém základu. Každá rostlina obsahuje velké množství sekundárních metabolitů, z nichž některé mohou působit inhibičně až toxicky na jiné rostliny vyskytující se v jejich těsné blízkosti. Pokud skutečně dojde k přenosu účinné látky a k ovlivnění sousední rostliny, pak teprve hovoříme o *alelopatii*.

Významnost alelopatie jako příčiny biotických stresů rostlin v přírodních podmínkách stále patří mezi velmi rozporuplnou a málo probádanou oblast rostlinné fyziologie. Existují sice nesčetná pozorování negativního vzájemného ovlivňování rostlin a také potenciální účinek mnoha rostlinných metabolitů na jiné rostliny je dobře znám, ovšem k důkazu alelopatického působení to ještě zdaleka nestačí. Účinné látky musí být z jedné (zdrojové) rostliny vyloučeny a přeneseny na jinou (cílovou) rostlinu v dostatečné koncentraci. Při tomto transportu nutně dojde k poklesu jejich koncentrace vzhledem k neusměrněnému šíření difúzí, možné sorpci na koloidech či částečnému mikrobiálnímu rozkladu. A také zdrojová rostlina musí být vůči účinné látce mnohem méně citlivá než rostlina cílová.

Uvolňování a přenos malých koncentrací organických sloučenin je zejména v půdě velmi obtížné sledovat. Ještě obtížnější je ale v silně heterogenním půdním prostředí dokázat, že výsledný efekt (ovlivnění cílové rostliny) byl vyvolán pouze metabolity vyloučenými ze zdrojové rostliny, a ne nějakým jiným způsobem.

Vzhledem k uvedeným potížím je hodnověrných důkazů o alelopatickém působení látek vyloučených z živých rostlin velmi málo. Toto působení je teoreticky možné i u nadzemních orgánů přenosem těkavých látek (hlavně terpenů) či smýváním netěkavých metabolitů vyloučených na povrch listů, ale hlavní význam bude mít nepochybně v kořenové zóně. Velká pozornost je v současné době věnována těm druhům, které sice mají špatné kompetiční předpoklady (zejména pokud mají vrozeně pomalý růst, a tudíž i malý odběr živin a vody z půdy), ale přesto v přírodě vytvářejí souvislé porosty, ve kterých se jiným druhům nedaří. K takovým druhům patří např. metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*), česnek medvědí (*Alium ursinum*), nebo bažanka lesní (*Mercurialis perennis*). Velmi častým objektem zájmu je také vzájemné ovlivňování trav a jetelovin, u kterých bylo dokázáno alelopatické působení ve zjednodušených podmínkách vodních kultur. K vzájemnému ovlivňování u nich dochází především pomocí fenolických sloučenin (*skopoletin*, *eskulin*).

Poněkud lépe prozkoumané je nepřímé alelopatické působení, zprostředkované metabolity uvolněnými mikrobiálním rozkladem z odumřelých částí rostlin. Zvláštní postavení mají i v tomto případě fenolické látky, které se nacházejí v půdě v hojném množství jako produkty rozpadu některých složek biomasy, především ligninu. K těm jednodušším patří např. kyselina fenyloctová, benzoová, hydroxycinnamová, nebo i známý *juglon* (5-hydroxy- α -naftochinon), který způsobuje silnou toxicitu rozkládajících se listů ořešáku na řadu druhů zahradních rostlin. Ze složitějších sloučenin bývají hojné flavonoidy a taniny.

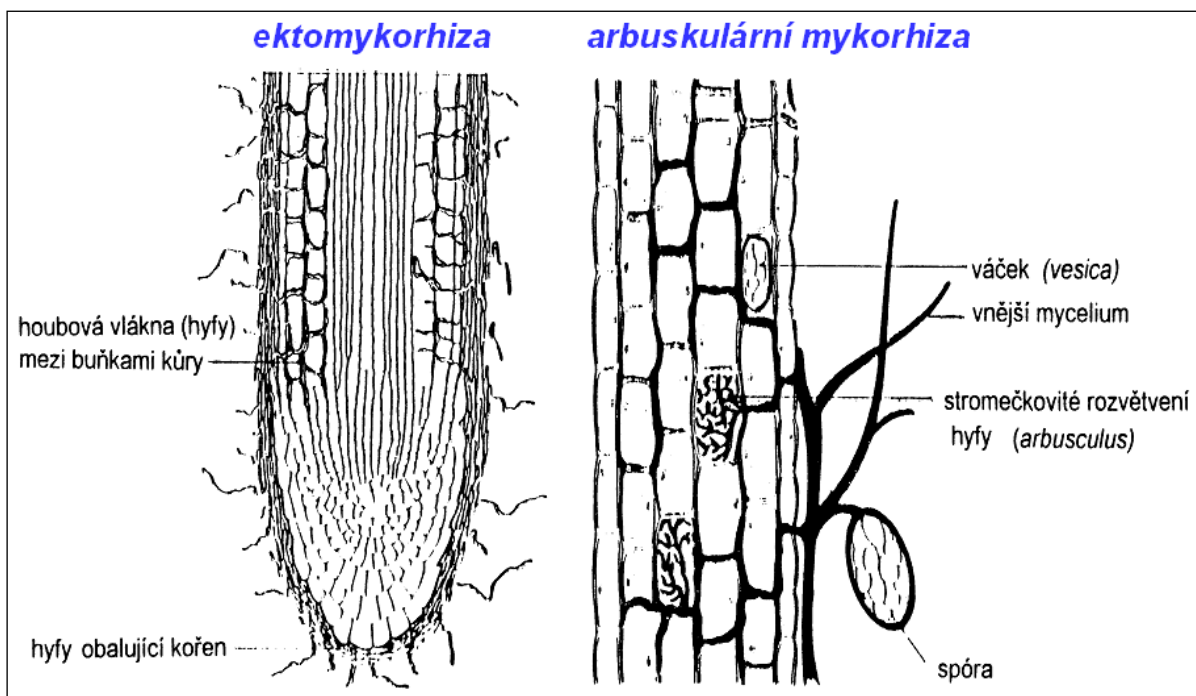
Mechanismus působení látek s potenciálním alelopatickým účinkem je dosud znám velmi nedostatečně. Inhibice membránových funkcí, včetně příjmu iontů minerálních živin, inhibice dělivého i dlouhivého růstu buněk, a inhibice klíčení patří k nejčastěji pozorovaným účinkům. Citlivost různých druhů rostlin je vůči zmíněným sloučeninám značně rozdílná a lze proto předpokládat existenci rozdílně účinných detoxikačních schopností.

Mykorhiza je velmi dokonale řízený vztah mezi kořeny rostlin a některými druhy hub. Existuje celá řada strukturně i funkčně odlišných typů tohoto těsného spojení. U *ektomykorhizy* (*EcM*) jsou kořeny obaleny pochvou z houbových vláken, které částečně pronikají i do mezibuněčného prostoru v kůře, ale nikoliv do buněk. Hyfy hub (převážně z třídy hub stopkovýtusných, *Basidiomycetes*, v menší míře to mohou být i houby vřeckovýtusné, *Ascomycetes*) jsou nejen nahloucheny kolem kořene, ale bohatě se větví i v půdě. Tento typ mykorhizy je velmi častý u lesních stromů a mykobionty mohou být stovky druhů hub.

U *endomykorhizy* pronikají houbová vlákna přímo do buněk kůry. Kromě velmi specializovaných variant u rostlin čeledi *Orchidaceae* a řádu *Ericales*, je u většiny čeledí vyšších rostlin daleko nejčastější *arbuskulární mykorhiza* (AM). Jedná se o celosvětově nejrozšířenější typ mykorhizy, který zcela dominuje ve všech porostech trav a jiných bylin. Zúčastněných druhů hub je sice jen malý počet (jedná o glomeromycety, *Glomeromycota*) avšak jsou neobyčejně rozšířené. Žijí pouze symbioticky (ne saprofytický, jako většina hub), nelze je tedy pěstovat bez hostitelské rostliny a ani u nich neznáme žádná pohlavní stadia. Jejich hyfy prorůstají do korových buněk, ve kterých se větví do charakteristického "stromčekového" útvaru (*arbusculus*). Na takto zvětšeném povrchu hyf probíhá veškerá výměna metabolitů mezi hostitelskou rostlinou a mykobiontem.

Vnější, mimokořenové mycelium vytváří rozsáhlou síť v okolní půdě a někdy dokonce propojuje několik hostitelských rostlin navzájem. Toto propojení umožňuje i výměnu metabolitů (především uhlíkatých látek) mezi jednotlivými rostlinami v daném společenstvu,

jak bylo v nedávné době bezpečně prokázáno. To může být velmi výhodné např. pro mladé semenáčky stromů, pokud vyrůstají v silně zastíněných podmínkách a mají tudíž nedostatek asimilátů. Přesun části asimilátů ze starších, výhodněji exponovaných jedinců (i jiného druhu!) může zajistit jejich přežití a zrychlení růstu. Síť mycelia dokonce může zprostředkovat i úplné a trvalé parazitování některých nezelených rostlin (např. terestrických orchidejí z čeledi hnilákovitých, *Monotropaceae*) na blízkých dřevinách.



Charakteristické útvary na kořenech rostlin s vyvinutou mykorhizou dvou nejčastějších typů.

Mykorhiza usnadňuje rostlinám příjem vody a minerálních živin. Daleko největší význam má pro příjem fosforu, kterého je v půdním roztoku vždy jen nepatrná koncentrace a transport fosfátových iontů ke kořenům rostlin ze vzdálenějších míst je velmi pomalý. Hyfy hub podstatně zvětšují sorpční povrch (délka hyf je až tisíckrát větší než délka kořenů!), a tím zrychlují odběr živin i z málo koncentrovaného půdního roztoku. Význam mykorhizy vzrůstá nejen v živinami chudé půdě, ale také při malé půdní vlhkosti, kdy difúze vody a solí k sorpčnímu povrchu kořenů je zvláště zpomalena. Mykorhiza je samozřejmě výhodná i pro zúčastněné houby, které získávají z rostliny organické látky (hlavně cukry a aminokyseliny). Tento odběr představuje přibližně 5 až 10 % všech asimilátů vytvářených fotosyntézou.

Arbuskulární mykorhiza, na rozdíl od ektomykorhizy, je velmi proměnlivý typ vzájemného vztahu, jehož intenzita velmi kolísá v průběhu roku. Snadno může také přejít od oboustranně výhodné symbiózy k parazitismu. Rychlost výměn uhlíkatých látek a fosforu mezi houbou a rostlinou velmi závisí na vnějších podmínkách i na vývojovém stádiu rostliny. Proto také rostliny s mykorhizou nemusí mít vždy rychlejší růst (či výnos u zemědělských plodin) ve srovnání s rostlinami stejného druhu bez mykorhizy. Růstová deprese infikovaných rostlin bývá obvykle pozorována na půdách s dostatkem fosforu.

V současné době se množí důkazy o velkém významu mykorhizy pro *ochranu kořenů před infekcí* patogenními mikroorganismy (hlavně houbami). Zvláště u druhů s kořeny hodně větvenými, které mají velké množství citlivých meristematických zón, může převažovat tato ochranná funkce nad nutričními výhodami, které z mykorhizy mohou plynout. Poznatky o významnosti mykorhizy pro růst a zdravotní stav rostlin se rychle přenášejí i do zemědělské praxe. Semena celé řady plodin (zejména obilovin) se již nezdávka ošetřují před výsevem inokulem vhodných kmenů mykorhizických hub.

Interakce rostlin s herbivory

Rostliny jsou vystaveny stálému nebezpečí poškození svých orgánů mnoha druhy živočichů, zejména z početných skupin fytofágního hmyzu, ale i pastvou evolučně vyspělejších býložravců. Kromě mnoha morfologických a morfogenetických adaptací k omezení herbivorie (např. ostré trny či trichomy, vysoký obsah tuhých sklerenchymatických pletiv či schopnost rychlé regenerace poškozených orgánů) jsou také velmi časté i rozmanité biochemické adaptace.

Z velkého množství sekundárních metabolitů, které se syntetizují v rostlinách, mnohé působí odpudivě až toxicky na herbivorní živočichy. Z hlediska množství, v jakém se vyskytují, lze je rozdělit do dvou kategorií. První z nich zahrnuje látky *kvalitativně* významné, které se sice vyskytují jen v malých koncentracích, ale zato jsou pro živočichy velmi toxické. Patří sem nejrůznější alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík, glukosinoláty a mnoho dalších. Rostliny s kvalitativně významnými ochrannými metabolity jsou sice před většinou herbivorů dobře chráněny, nicméně bývají ohrožovány specializovanými škůdci, kteří v koevolučním procesu získali dokonalou rezistenci vůči příslušnému toxinu (např. vytvářejí specifický enzym, který je schopen toxin inaktivovat).

Do druhé kategorie řadíme *kvantitativně* významné metabolity, které sice nejsou tak toxické, ale ve větším množství (často tvoří více než 10% sušiny!) způsobují špatnou stravitelnost, nechutnost až toxicitu (např. lignin, taniny a fenolické látky). Energetická náročnost syntézy těchto metabolitů je vysoká a rostliny, které jsou jimi vybaveny, mají obvykle pomalejší růst. Tato zdánlivá nevýhoda však za jistých okolností může být vyvážena bezpečnější ochranou před poškozením, neboť jen málo živočišných druhů ji dokáže překonat.

Interakce býložravých živočichů s rostlinami je do značné míry dynamický proces, ve kterém hrají významnou úlohu také stresové reakce postižené rostliny. Jejich podrobný výzkum je teprve v začátcích. Přesto je dokázáno, že syntéza toxických metabolitů, např. inhibitorů proteáz, se může až překvapivě rychle zvýšit po napadení rostliny živočišným škůdcem. Ke zrychlení syntézy dochází nejen v narušeném orgánu, ale i v ostatních částech rostliny, které nebyly narušeny. To ovšem vyžaduje *přenos signálu*, ke kterému může být využita jak chemická cesta (pomocí sloučenin typu *fytohormonů*, např. jasmonové kyseliny, viz obrázek), tak i změny elektrického potenciálu. Dokonce existují důkazy o bezkontaktním přenosu signálu k tvorbě inhibitorů proteáz z poraněné rostliny na sousední zdravé rostliny pomocí těkavé sloučeniny metyljasmonátu.

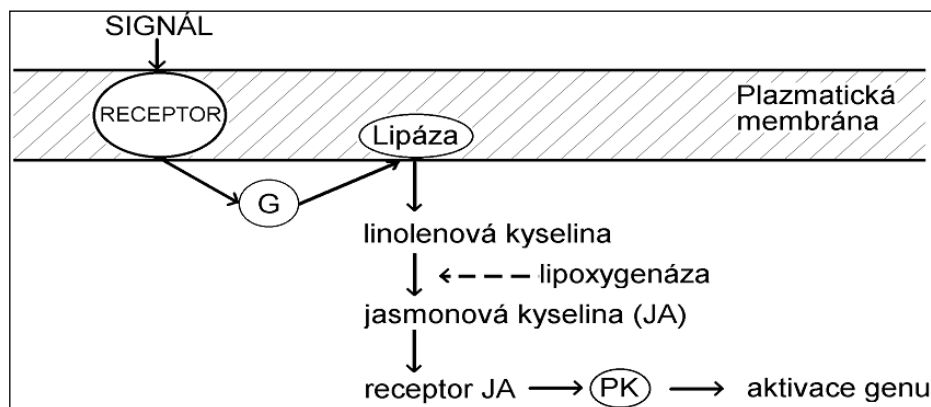


Schéma přenosu signálu pomocí jasmonové kyseliny, která se tvoří z linolenové kyseliny (dehydrací a β -oxidací) za účasti enzymu lipoxygenázy. Linolenová kyselina je uvolňována membránově vázanou lipázou po její aktivaci signálem přeneseným z receptoru. Tato cesta, běžná při poranění listu herbivory i některými patogeny, vede zejména k tvorbě inhibitorů proteáz, které působí herbivorům poruchy trávení. (G = G-protein, PK = proteinkináza).

Interakce rostlin s patogenními mikroorganismy

Kromě živočichů ohrožují rostliny i *patogenní mikroorganismy* (viry, bakterie, houby). Jejich průnik do buněk je sice ztížen pevnou buněčnou stěnou, avšak ani ta není pro řadu z nich nepřekonatelnou překážkou. Především patogenní houby disponují celou řadou velmi účinných lytických exoenzymů. Není snad potřeba připomínat, že také každé mechanické poranění rostlinných orgánů představuje otevřenou bránu infekci.

Hlavní skupiny fytopatogenních mikroorganismů

- **houby**: nejpočetnější skupina (asi **8000 druhů** z celkového počtu asi 50 000) a také nejagresivnější (schopnost pronikat i do neporušených pletiv) s širokým spektrem penetračních a nutričních mechanismů,
- **viry**: asi **500 druhů** obligátních endoparazitů, pronikají jen do poraněných orgánů, ovšem mohou být v rostlině transportovány cévními svazky a plasmodesmaty.
- **baktérie**: asi **200 druhů** z celkového počtu asi 6000, obvykle pronikají jen do poraněných orgánů (ne však vždy), možnost šíření cévními svazky je velmi malá.

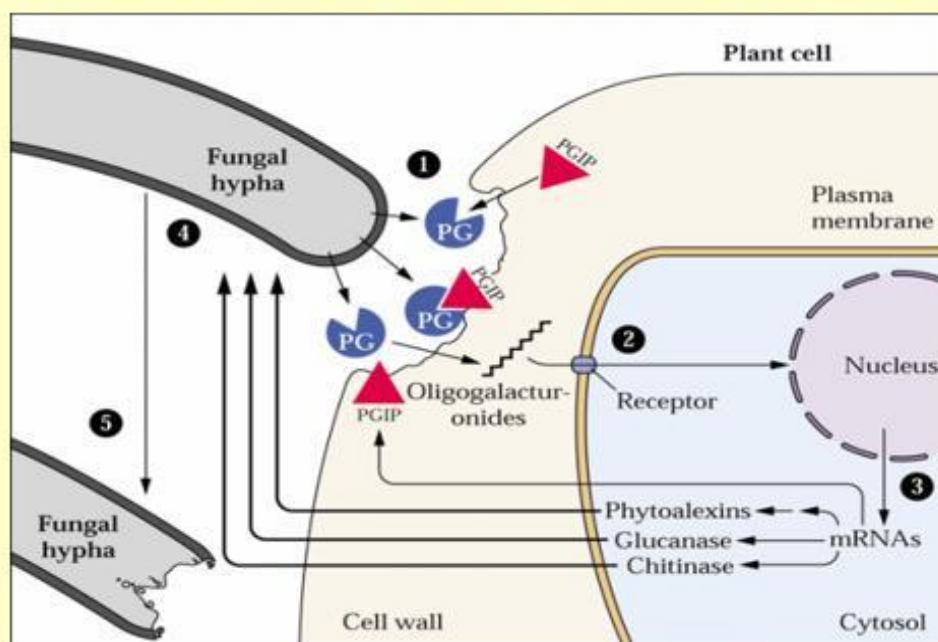
Nejen průnik, ale často již kontakt patogenního organismu s buňkou vyvolává celou řadu koordinovaných vnitrobuněčných procesů, jejichž cílem je omezit či zcela eliminovat jeho vstup a šíření do dalších buněk. Jen málo z těchto procesů má zcela obecný charakter, spíše lze pozorovat velkou rozmanitost u jednotlivých skupin rostlinných druhů a jejich orgánů.

Na počátku všech obranných reakcí musí ovšem být podnět k jejich spuštění, kterým obvykle bývá specifický metabolit (**elicitor**) uvolňovaný při počáteční interakci buňky s patogenem a identifikovaný vhodným receptorem hostitelské rostliny. Jako elicitory mohou sloužit jednak některé metabolity vylučované patogeny (*exogenní elicitory*, např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy), ale i sloučeniny, které se uvolňují z narušených buněčných stěn obou organismů (*endogenní elicitory*). K těm patří např. oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolyzou buněčné stěny patogenních hub, či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky.

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na **aktivaci vhodných genů**. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí specifických receptorů v plazmatické membráně a navazující sítě vnitrobuněčného přenosu signálu, jejíž obecné rysy byly již zmíněny. Způsob vlastního přenosu se může lišit podle typu elicitoru a intenzity jeho působení. Kromě "klasické" signalizace zvýšenou koncentrací iontů vápníku a aktivací proteinkináz bývá velmi často pozorována i tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolaná elicitory. Na signalizaci se podílí především peroxid vodíku, jehož zvýšené množství je možné zjistit už po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Kromě možného přímého účinku peroxidu vodíku na expresi genů existuje ještě nepřímá cesta, při které nejprve peroxidací lipidů v membránách vzniká kyselina jasmonová a metyljasmonát a ty pak ovlivňují transkripci. Při napadení rostliny patogeny se rychle zvyšuje tvorba etylénu, který se rovněž podílí na iniciaci genové exprese, a to i v buňkách sousedících s buňkou napadenou. Vlastní obranné reakce zahrnují jednak tvorbu specifických *stresových proteinů* a jednak syntézu a hromadění chemicky jednodušších sloučenin s výrazným antibiotickým účinkem.

Iniciace aktivních obranných reakcí při pronikání houbové hyfy do buňky endogenními elicitory

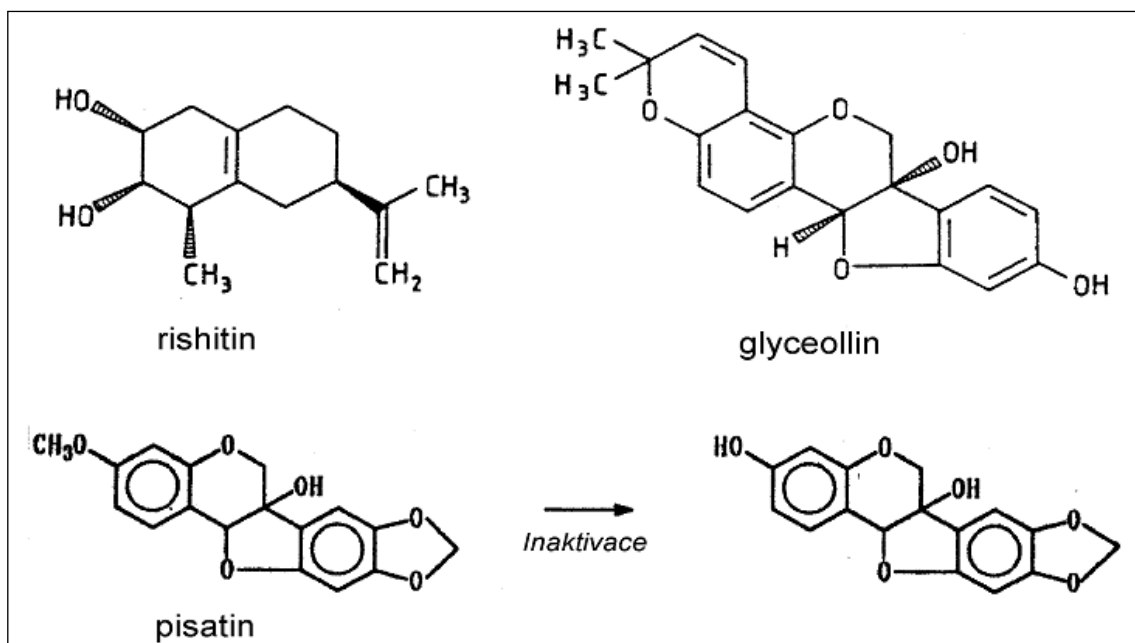
(PG - polygalakturonáza, PGIP - specifický protein inhibující polygalakturonázu)



Proteiny indukované patogeny tvoří mimořádně početnou a různorodou skupinu, která je dále dělena na podskupiny podle velikosti a podle převažujících funkcí. Kromě *obecně stresových proteinů*, jejichž význam pro zvýšení nespecifické odolnosti a nápravě poškozených částí buněk byl již zmíněn na str. 132, vyskytují se zde i proteiny se specifickými antimikrobiálními účinky. K těm patří zejména enzymy, které jsou schopny hydrolyzovat buněčnou stěnu patogenů a přitom produkovat elicitory dalších obranných reakcí (např. *chitináza* a *1,3-β-glukanáza*), Silné fungicidní účinky mají *proteiny inaktivující ribozómy*. Zvláštní skupinu obranných proteinů tvoří *tioniny*, které lze nalézt velmi rychle po kontaktu buňky s patogenem v buněčné stěně. Působí na široké spektrum patogenů, pravděpodobně vytvářením pórů v jejich membránách. Velmi rychle jsou také indukovány *proteiny přenášející lipidy*. Jsou potřebné i k tvorbě zesílené kutikuly.

Sekundární metabolity s ochrannou funkcí jsou u některých druhů rostlin přítomny *trvale*, i když v menším množství než při infekci. Patří k nim nejrozmanitější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy, které bývají souhrnně označovány jako **fytoncidy**.

Zvláštní skupinu velmi účinných, specifických nízkomolekulárních obranných látek tvoří **fytoalexiny** které se za normálních okolností v buňkách nevyskytují, ale začnou se vytvářet až po napadení patogenem. V současné době je známo více než 300 fytoalexinů, které po chemické stránce patří mezi velmi různorodé typy sloučenin. U systematicky příbuzných druhů se obvykle vyskytují podobné typy fytoalexinů. Tak např. u rostlin čeledi *Fabaceae* převažují izoflavonoidy, u jiných čeledí to mohou být seskviterpeny (*Solanaceae*), diterpeny (*Poaceae*), furanokumariny (*Apiaceae*), či stilbeny (*Vitaceae*). U téže rostliny se někdy mohou tvořit dva i více různých typů fytoalexinů. Většina z těchto sloučenin je lipofilní povahy, což jim usnadňuje pronikání přes plazmatickou membránu patogenů. Poškození membránových funkcí patří také k nejčastějším mechanismům působení fytoalexinů na patogenní organismy. Fytoalexiny mají vysoce toxické účinky již v koncentracích od 10^{-6} M, a to hlavně na patogenní houby, méně pak na bakterie.



V horní části obrázku jsou uvedeny chemické vzorce dvou hojných fytoalexinů: rishitin (seskviterpenový derivát z infikovaných brambor) a glyceollin (izoflavonoid z rostlin sóji). V dolní části obrázku je znázorněn jednoduchý způsob inaktivace fytoalexinu pisatinu v rostlinách hrachu patogenní houbou *Nectria haematococca*.

Poměrně častá a překvapivě účinná reakce na průnik patogenů je řízená tvorbou ochranných nektróz. V napadené buňce mohou být během několika desítek minut po kontaktu houbové hyfy s plazmalemou spuštěny biochemické procesy vedoucí k rychlé zkáze jak vlastní buňky, tak i houbové hyfy. Při této tzv. *hypersenzitivní reakci* dochází k rozpadu membránového systému hlavně náhlým zvýšením koncentrace aktivních forem kyslíku ("oxidative burst") a aktivací lipáz, i když někdy je provázáno tvorbou některých dalších toxických látek (např. polyfenolů). Tvorba aktivních forem kyslíku obvykle začíná aktivací *NADPH-dependentní superoxidsyntázy* v plazmatické membráně vhodnými elicitory vylučovanými buď přímo patogenem či vznikající po narušení buněčné stěny a plazmalemy. Současně také dochází k inhibici antioxidantních enzymů v buňce. V konečném důsledku pak dochází k rychlé peroxidaci a k rozpadu membránových systémů, a tím i ke smrti buňky. V další fázi dojde k odumírání buněk i v blízkém okolí místa infekce. Lokalizovaná nektróza většinou dosti spolehlivě zastaví pronikání a další šíření infekce.

Jiným typem obranných reakcí rostlin je rychlé zvýšení tvorby polysacharidu kalózy (1,3- β -glukan), který pak vyplňuje buňky v okolí infikovaného místa. Kalóza je velmi odolná vůči houbovým hydrolázám. Pokud je šíření infekce pomalé, pak se po jisté době může poblíž ohniska infekce založit sekundární meristém (felogen), produkující silně suberinizované či lignifikované buňky s velmi dobrou ochrannou funkcí. Někdy dochází i k tvorbě odlučovací vrstvy a celá infikovaná část rostliny odpadne.

Uvedená ochranná opatření rostlin vůči patogenům nejsou samozřejmě zcela nepřekonatelná, zejména pro některé silně virulentní kmeny hub. Jejich úspěšnost spočívá jednak v mimořádně rychlém růstu hyf (šíří se rychleji než se stačí aktivovat obranné reakce), jednak v tvorbě specifických látek (*supresorů*), které potlačují vznik hypersenzitivní reakce, tvorbu stresových proteinů a ostatních ochranných metabolitů. Patogenní houby také disponují bohatým arzenálem buněčných jedů, jako je např. *fusicoccin* (diterpenglukozid houby *Fusicoccum amygdalii*) způsobující hyperpolarizaci buněčných membrán silnou stimulací činnosti protonových pump. Detailním studiem interakcí rostlin s patogenními organismy se zabývá specializovaný vědní obor *fytopatologie*.

Kontrolní otázky ke 4. části učebního textu Fyziologie rostlin

1. Jaké jsou nejčastější společné typy stresových reakcí rostlin při působení rozmanitých nepříznivých vnějších faktorů?
2. Jakým způsobem (mechanismem) mohou chránit buňky před působením nepříznivých vnějších faktorů stresové proteiny?
3. Jakým mechanismem se mohou deaktivovat v buňkách reaktivní formy kyslíku?
4. Jakými mechanismy se rostliny mohou chránit před destrukčními účinky UV - záření?
5. Jaké buněčné struktury jsou nejcitlivější na působení vysokých teplot, při jak vysoké teplotě začíná být jejich poškození pozorovatelné a jaká teplota již má letální účinek?
6. Proč u citlivých rostlin dochází k trvalému poškození teplotami mírně nad nulou (chladem) jen po jejich delším působení?
7. Jaké jsou dva hlavní mechanismy destrukčního působení mrazu na rostliny?
8. Jakými způsoby mohou rostliny zvyšovat svoji odolnost vůči mrazu?
9. Jaké procesy v rostlinách jsou zvláště citlivé (zpomalují se) již za velmi mírného úbytku vody v buňkách?
10. Jaké strukturní a funkční vlastnosti umožňují některým druhům rostlin snášet bez vážnějšího poškození téměř úplné vyschnutí?
12. K jakým změnám (biochemickým, strukturním) dochází u běžných rostlin, pokud jsou jejich kořeny v anaerobních podmínkách (např. po zaplavení)?
13. Jaké adaptační mechanismy umožňují některým druhům rostlin dlouhodobě růst v zaplavených půdách s nedostatkem kyslíku?
14. Na silně kyselých půdách je růst rostlin jen zřídka omezován přímým účinkem zvýšené koncentrace vodíkových iontů, významnější jsou nepřímé účinky řady pedochemických faktorů. O které se hlavně jedná?
15. Jaké jsou hlavní adaptační mechanismy rostlin směřující k omezení toxického působení sloučenin těžkých kovů na jejich buněčné funkce?
16. Jaké jsou hlavní rozdíly mezi ektomykorhizou a endomykorhizou arbuskulárního typu?
17. Z jakých důvodů bývá mykorhiza pro rostliny obvykle velmi prospěšná?
18. Jaké typy sekundárních metabolitů zvyšují ochranu rostlin před býložravci?
19. Při infekci rostliny patogenními mikroorganismy dochází k rychlé syntéze celé řady funkčně odlišných ochranných metabolitů. Které z nich patří k nejdůležitějším?