

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO NA AKTIVITU A
OBSAH ENZYMU RUBISCO
VE SLUNNÝCH A STINNÝCH JEHLICÍCH SMRKU ZTEPILÉHO

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

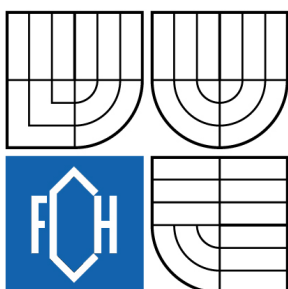
AUTHOR

Bc. LENKA ŠIBRAVOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV ZVÝŠENÉ KONCENTRACE OXIDU UHLIČITÉHO NA AKTIVITU A OBSAH ENZYMU RUBISCO VE SLUNNÝCH A STINNÝCH JEHLICÍCH SMRKU ZTEPILÉHO

INFLUENCE OF ELEVATED CARBON DIOXIDE CONCENTRATION AT RUBISCO ACTIVITY
AND ITS CONTENT IN SUNNY AND SHADED NEEDLES OF NORWAY SPRUCE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LENKA ŠIBRAVOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2009

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo stanovit obsah a aktivitu enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích smrku ztepilého (*Picea abies* [L.] Karst.) a potvrdit nebo zamítnout aklimační depresi na úrovni enzymu Rubisco. Vzorky byly odebírány na Experimentálním ekologickém pracovišti AV na Bílém Kříži, kde byly smrky kultivovány ve dvou lamelových kultivačních sférách s odlišnou koncentrací CO₂. V jedné sféře se nacházela koncentrace 350 μmol CO₂ mol⁻¹ a ve druhé 700 μmol CO₂ mol⁻¹.

Aktivita enzymu Rubisco byla stanovena spektrofotometricky, obsah enzymu byl stanoven metodou SDS-PAGE. Vzorky jehlic byly odebrány v polovině června a na konci září. Bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace oxidu uhličitého nemá významný vliv na aktivitu Rubisco. Naopak rozdílná expozice měla významný vliv na aktivitu Rubisco v červnu, kdy byla zjištěna statisticky významně nižší aktivita Rubisco u stinných jehlic než u jehlic slunných. Naproti tomu ve vzorcích z konce září nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi aktivitou Rubisco ve slunných a stinných jehlicích.

Zatímco v červnových vzorcích nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi jehlicemi A a E, ve vzorcích z konce září byl zjištěn o 34 % nižší obsah Rubisco v jehlicích E nežli v jehlicích A, což svědčí o výrazné aklimační depresi obsahu Rubisco. Obsah Rubisco byl v září několikrát vyšší než v červnu, což dokazuje postupné, dlouhodobé budování asimilačního aparátu u jehličnatých stromů.

ABSTRACT

Diploma thesis's aim was to determine Rubisco activity and its content in sunny and shaded needles of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) and confirm or refuse acclimation on Rubisco enzyme level. Samples were taken on the Experimental ecology station Czech Academy of Sciences at Bílý Kříž (Beskydy Mountains) where needles were cultivated in two cultivation spheres with different concentrations CO₂. One cultivation sphere contains atmosphere with ambient (A) concentration CO₂ (350 μmol CO₂ mol⁻¹) and the other contains atmosphere with elevated (E) concentration CO₂ (700 μmol CO₂ mol⁻¹).

Rubisco activities were determined spectrophotometric, Rubisco content was determined by SDS-PAGE method. Samples were taken in the middle of June and in the end of September. Elevated concentration CO₂ did not have significant influence on Rubisco activity. Whereas different exposition had significant influence on Rubisco activity in June, when was found lower Rubisco activity in shaded needles than in sunny needles. In September were not found significant differences in Rubisco activity between sunny and shaded needles.

We did not find statistically significant differences in Rubisco content between A and E needles in June. In contrary, we found about 34 % lower Rubisco content in E needles than in A needles, which confirms acclimation on Rubisco enzyme level. In September Rubisco content was several times higher than in June, which evidences the long term building photosynthetic apparatus in coniferous trees.

KLÍČOVÁ SLOVA

Smrk ztepilý, aktivita a obsah Rubisco, slunné a stinné jehlice, aklimace

KEYWORDS

Norway spruce, Rubisco activity and content, sunny and shaded needles, acclimation

ŠIBRAVOVÁ, L. *Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích smrku ztepilého*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 60 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, PhD.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

*Chtěla bych vyjádřit poděkování vedoucímu
diplomové práce, panu
PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D.
za účinnou pomoc při řešení této práce.*

OBSAH

1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Fotosyntéza.....	11
2.1.1 Mechanismus fotosyntézy	12
2.1.2 Faktory ovlivňující fotosyntézu.....	15
2.2 Rostliny C ₃ , C ₄ a CAM.....	17
2.3 Přímé účinky zvýšené koncentrace CO ₂ na rostliny	19
2.3.1 Rychlost fotosyntézy	19
2.3.2 Interakce teploty a zvýšené koncentrace CO ₂	20
2.3.3 Aklimace na zvýšenou koncentraci CO ₂	20
2.4 Nepřímé vlivy CO ₂ na rostliny	20
2.4.1 Teplota	21
2.5 Účinky zvýšené koncentrace CO ₂ na stromy	21
2.6 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)	22
2.6.1 Struktura enzymu Rubisco	23
2.6.2 Karboxylace a oxygenace enzymu Rubisco	25
2.6.3 2-karboxyarabinitol-1-fosfát (CA1P)	27
2.6.4 Aktivasa Rubisco	28
2.6.5 Stanovení aktivity enzymu Rubisco	28
2.6.6 Stanovení obsahu enzymu Rubisco	30
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1. Materiál.....	33
3.2 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco	33
3.2.1 Přístroje.....	34
3.2.2 Chemikálie.....	34
3.2.3 Příprava roztoků	35
3.2.4 Extrakce enzymu	36
3.2.5 Měření aktivity	36
3.2.6 Výpočet aktivity a stupně aktivace enzymu Rubisko.....	36
3.3 Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco	38
3.3.1 Přístroje.....	38
3.3.2 Chemikálie.....	38
3.3.3 Příprava roztoků	39
3.3.4 Příprava gelů.....	39
3.3.5 Příprava vzorků	40
3.3.6 Elektroforéza	40
3.3.7 Zviditelnění bílkovin	41
3.3.8 Vyhodnocení.....	41
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	43
4.1. Výsledky.....	43
4.2. Diskuze	50
5 ZÁVĚR.....	53
6 LITERATURA	54
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATECH A SYMBOLŮ	60

1 ÚVOD

Fotosyntéza je základním procesem udržujícím život na Zemi. Je zdrojem kyslíku nutného pro dýchání. Fotosyntéza využívá energii slunečního záření k tvorbě energeticky bohatých organických látek (sacharidů) z jednoduchých anorganických látek (oxidu uhličitého a vody). Jedná se o proces vázaný na chloroplasty buněk a chlorofyly. Jako dodavatel energie slouží sluneční světlo. Fotosyntéza je složitý soubor reakcí, které můžeme rozdělit na primární a sekundární děje.

Fotosyntéza představuje základ rostlinné výroby, na její rychlosti závisí výnosy jednotlivých plodin. Zásadním způsobem se podílí na vytvoření a udržování dnešního složení atmosféry, včetně tvorby ochranné ozónové vrstvy. Kyslík, původně vedlejší produkt fotosyntézy, výrazně ovlivnil i směr vývoje organismů k současné rozmanitosti životních forem. Fotosyntéza se tak podílí i na zpomalování růstu koncentrace CO_2 v atmosféře.

Koncentrace CO_2 je naopak jedním z hlavních faktorů, který ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Působení zvýšené koncentrace CO_2 obecně vede jak ke zvýšení kapacity fotosyntézy (pozitivní aklimace), tak i k poklesu kapacity fotosyntézy (aklimační deprese). Mechanismy a příčiny aklimační deprese fotosyntézy jsou stále předmětem diskuzí a hypotéz. Aklimační deprese fotosyntézy bývá rovněž způsobena sníženou aktivitou nebo množstvím enzymu Rubisco.

Enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa) je nejhojnější protein na Zemi a tvoří až 50 % rozpustných listových bílkovin. V tomto enzymu je také obsažena podstatná část veškerého dusíku v listech. Katalyzuje připojení CO_2 k molekule ribulosa-1,5-bisfosfátu. Kromě této karboxylační reakce (fixace CO_2) katalyzuje oxygenační reakci, při níž se na molekulu stejného akceptoru váže molekulový kyslík a kromě 3-fosfoglycerátu vzniká fosfoglykolát. Z něho se sice v rostlinách syntetizuje serin a glycin, většina se však katabolicky odbourává. Rubisco je nejdůležitějším fotosyntetickým enzymem, protože tvoří vstupní bránu anorganického uhlíku do biosféry.

Vlivem zvýšené koncentrace CO_2 v atmosféře se u nás zabývá Ústav systémové biologie a ekologie (USB) AV ČR. Tato diplomová práce je součástí grantového projektu tohoto ústavu, na kterém se účastní rovněž katedra fyziky PřF Ostravské univerzity a ÚCHPBT Fakulty chemické VUT v Brně. Cílem práce bylo stanovit obsah a aktivitu enzymu Rubisco ve stinných a slunných jehlicích smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO_2 a potvrdit nebo zamítnout aklimační depresi na úrovni tohoto enzymu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosyntéza

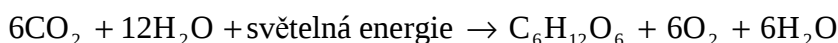
Fotosyntéza je jeden z nejstarších a současně nejdůležitějších dějů v živé přírodě, protože umožňuje existenci chemotrofních organismů:

1. Zachycuje sluneční energii a z nejjednodušší sloučeniny uhlíku, oxidu uhličitého, vyrábí organickou hmotu pro výživu chemotrofů.

2. Je hlavní producentem kyslíku, který je nepostradatelný pro existenci aerobních organismů [1].

Fotosyntéza je děj, který z CO_2 vytváří cukry, a tím obnovuje organické látky, které se při katabolismu neustále na CO_2 oxidují. Je to současně jediný biologický proces, který využívá energii nezemského původu – sluneční záření. V celkové bilanci představuje fotosyntéza děj, který je opakem dýchání [2].

Fotosyntézu můžeme shrnout do následující rovnice:



Za vzorcem $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ se skrývá sacharid glukosa, voda se v rovnici objevuje na obou stranách, protože během fotosyntézy je 12 jejích molekul spotřebováno a 6 molekul nově vytvořeno [3].

Soubor fotosyntetických reakcí zahrnuje:

- fyzikální procesy související s absorpcí záření a s přenosem zachycené energie k reakčním centrům fotosystémů,
- primární fotochemické procesy vázané na tylakoidní chloroplastové membrány a spojené s fotolýzou vody a přenosem elektronů redoxními systémy k redukci NADP a k energetické podpoře vzniku ATP z ADP
- sekundární biochemické procesy vázané na stroma chloroplastů, spojené s fixací CO_2 a jeho s redukcí vodíkem, uvolněným fotolýzou vody (Calvinův cyklus).

Ve fotosyntetickém Calvinově cyklu je prvním stabilním produktem kyselina 3-fosfoglycerová, tedy sloučenina se třemi atomy uhlíku. Rostliny s tímto typem fixace CO_2 se proto označují jako rostliny C_3 [2]. Mimo to existují i rostliny, kde primárním akceptorem CO_2 je fosfoenolpyruvát a meziproduktem je oxalacetát, který se dále přeměňuje převážně na malát nebo aspartát. Hovoříme proto o čtyřuhlíkové cestě a o C_4 rostlinách [1].

Příjem CO_2 do listu probíhá téměř výlučně difúzí. Molekuly CO_2 při tom překonávají difuzní odpor (průduchový a mezofylový). Mírou dostupnosti CO_2 pro fotosyntézu je především vodivost (otevřenost) průduchů [2].

Obecně se přijímají tři hlavní regulační mechanismy rychlosti fotosyntézy:

- 1) Při nízkých koncentracích CO_2 je limitována rychlost karboxylace ribulosa-1,5-bisfosfátu.

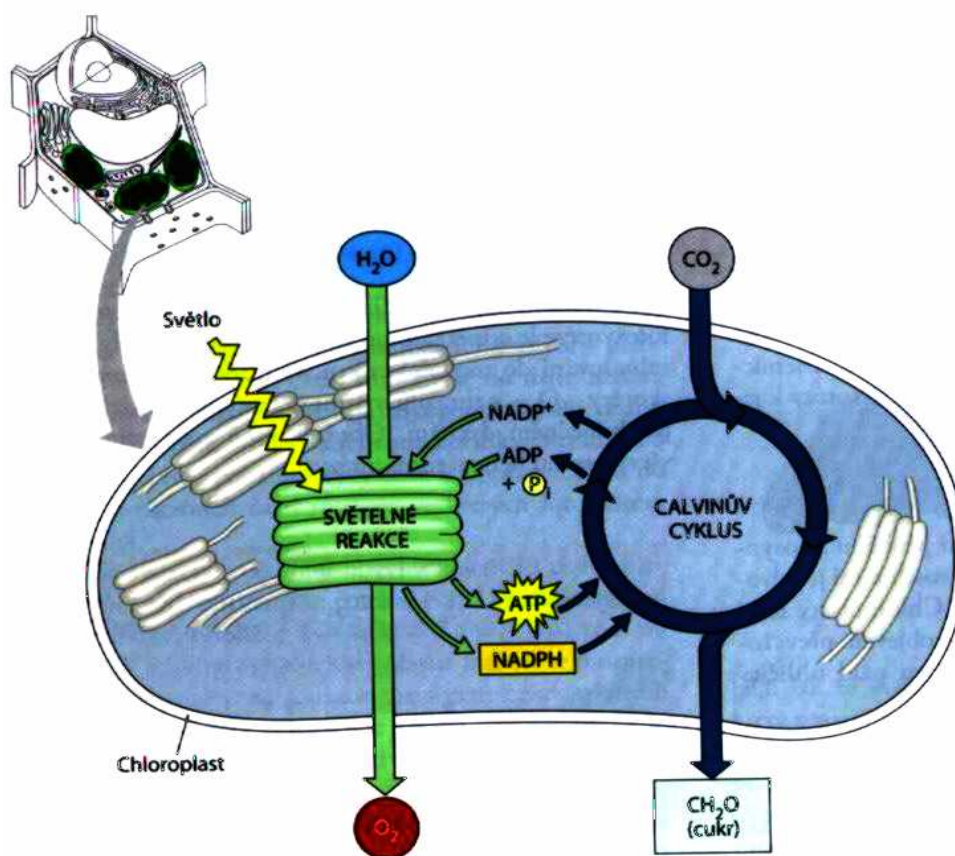
2) Při dostatku CO_2 a nízké ozářenosti je rychlost fotosyntézy limitována nedostatečnou rychlostí regenerace ribulosa-1,5-bisfosfátu. Toto je přímým důsledkem nedostatku ATP a NADPH, tedy nedostatečné rychlosti přenosu elektronů v systému tylakoidní membrány.

3) Při vysokých rychlostech fotosyntézy se může projevit ještě limitace anorganickým fosfátem. Při fotosyntéze jsou totiž z chloroplastů exportovány asimiláty především ve formě glycerinaldehydfosfátu nebo dihydroxyacetonfosfátu. Tento export se děje antiportem s anorganickým fosforem, který tak každou molekulou exportované triosy nahrazuje v chloroplastu fosfor. Nestačí-li obnovování obsahu fosforu v chloroplastu krýt potřeby zvýšené rychlosti fotosyntézy, dochází k jejímu poklesu [4].

Schopnost fotosyntézy mají nejen eukaryotní organismy – vyšší rostliny, zelené a hnědé řasy – ale i organismy prokaryotní – jednobuněčné sinice, zelené a purpurové bakterie [1].

2.1.1 Mechanismus fotosyntézy

Při fotosyntéze na sebe navazují dva děje: přenos elektronů uskutečňovaný složitými transmembránovými komplexy v tylakoidech a Calvinův cyklus, zahrnující přeměnu organických substrátů a lokalizovaný ve stromatu [2].



Obr. 1: Přehled fotosyntézy: spolupráce světelných reakcí a Calvinova cyklu [3].

2.1.1.1 Primární fáze fotosyntézy

Světelné reakce jsou kroky fotosyntézy, během kterých se sluneční energie přeměňuje na energii chemickou. Světlo pohlcené chlorofylem pohání přenos elektronů a vodíku z vody na příjemce NADP^+ , který dočasně skladuje elektrony obohacené energií. Při tomto pochodu je štěpena voda, světelné reakce jsou tedy tím stupněm fotosyntézy, který jako vedlejší produkt poskytuje O_2 . Světelné reakce využívají sluneční energii pro redukci NADP^+ na NADPH , a to připojením dvojice elektronů spolu s vodíkovým iontem neboli H^+ . Při světelných reakcích vzniká ATP; světlo pohání připojení fosfátové skupiny na ADP pochodem zvaným fotofosforylace. Světelná energie je tedy hned v úvodu přeměněna na chemickou energii v podobě dvou sloučenin: NADPH – zdroje energie obohacených elektronů („redukující síla“) a ATP [3].

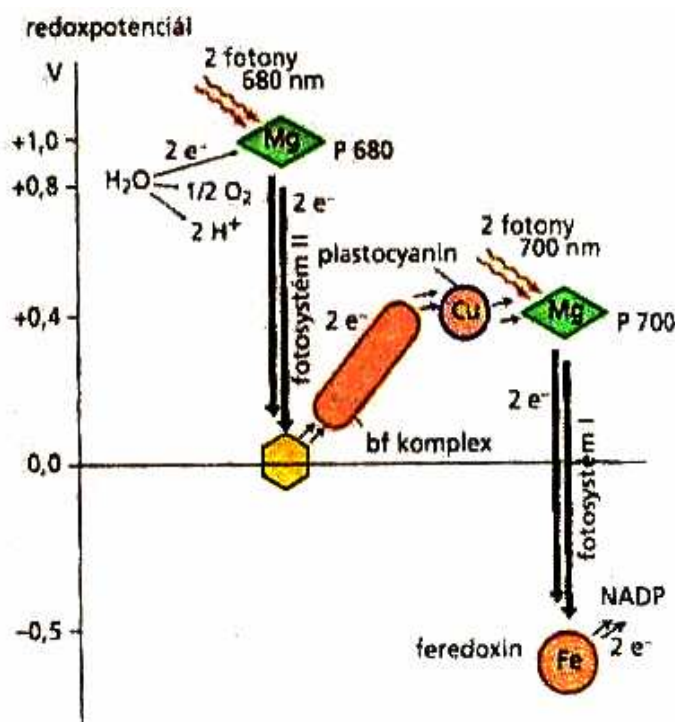
Primární fáze fotosyntézy se odehrává v tzv. fotosystémech, což jsou transmembránové proteinové komplexy v tylakoidech, na které jsou vázány přenašeče elektronů. Klíčový význam má chlorofyl. Chlorofyl má schopnost absorbovat energii fotonu, a tím přecházet do tzv. vzbuzeného stavu. V chloroplastu tvoří asi sto molekul chlorofylu tzv. anténu: molekuly chlorofylu si zde zachycenou energii mohou vzájemně předávat a nasměrovat ji k jediné určité molekule chlorofylu, značené P, která je součástí tzv. fotosyntetického reakčního centra. Ta je těsně propojena jednak s akceptorem elektronů o velmi nízkém redoxpotenciálu, jednak s donorem elektronů o vysokém redoxpotenciálu; rozdíly jejich redoxpotenciálů jsou blízké množství energie nesené fotonem, která je přibližně 1,8 eV. Právě molekula P excitovaná fotonem může předat elektron na akceptor, který se díky tomu stane silně redukující sloučeninou. Tato reakce je nesmírně rychlá a v rychlém sledu po ní následuje spontánní přechod elektronů na další akceptory o vyšším redoxpotenciálu. Tím se sice sníží energetický výtěžek děje, ale znemožní se návrat elektronu na molekulu chlorofylu a vyzáření energie fluorescencí. Ztracený elektron nahradí P 680 právě z molekuly vody, z níž vznikne O_2 [2].

Právě kvůli této ztrátě energie nestačí k přenosu elektronů z jedné molekuly vody na molekulu koenzymu jeden fotosystém: je potřeba dvou na sebe navazujících systémů, fotosystém II a fotosystém I. Pro fotosystém II je účinná vlnová délka světla 680 nm, molekula chlorofylu v reakčním centru se proto označuje jako P 680. Donorem elektronů je voda, konečným akceptorem plastochinon, podobný ubichinonu. Fotosystém I má v reakčním centru P 700, donorem je protein plastocyanin s atomem mědi (+0,4V), konečným akceptorem koenzym NADP^+ (-0,4 V). Na přenos jednoho elektronu je potřeba dvou fotonů [2].

Přechod elektronů od plastochinonu k plastocyaninu zajišťuje komplex cytochromů b_f v membráně tylakoidů, velmi podobný komplexu III z mitochondrií. Při tomto přechodu se energie uvolňuje, a díky tomu vzniká na membráně tylakoidů protonový gradient, který přítomná ATP-syntasa využívá k syntéze ATP; to je tzv. fotofosforylace. Na rozdíl od mitochondrií není vzniklý ATP k dispozici celé buňce, chloroplasty totiž nemají takový přenašečový systém pro ATP jako mitochondrie, ATP je využit v chloroplastech v Calvinově cyklu [2].

Za určitých podmínek využívají světlem vybuzené elektrony druhou dráhu, zvanou uzavřený elektronový tok, která využívá fotosystému I, nikoli však fotosystému II. Elektrony se z ferredoxinu vrací zpět do soustavy cytochromů a odtud pokračují do chlorofylu P700. Nedochází zde k žádné tvorbě NADPH , ani k uvolňování kyslíku. Uzavřený tok vyrábí pouze

ATP. Tato cesta je označována jako cyklická fotofosforylace. Neuzavřený elektronový tok vytváří ATP a NADPH ve zhruba stejných množstvích, ale Calvinův cyklus spotřebovává více ATP než NADPH. Uzavřený elektronový tok vyrovnává tento rozdíl. Pokud chloroplast spotřebuje Calvinovým cyklem téměř veškerý ATP, Calvinův cyklus se zpomalí a začne se hromadit NADPH. Vzestup NADPH může podnítit dočasné přesměrování toku elektronů z neuzavřeného na uzavřený až do doby, kdy dodávka ATP znovu uspokojí poptávku [3].



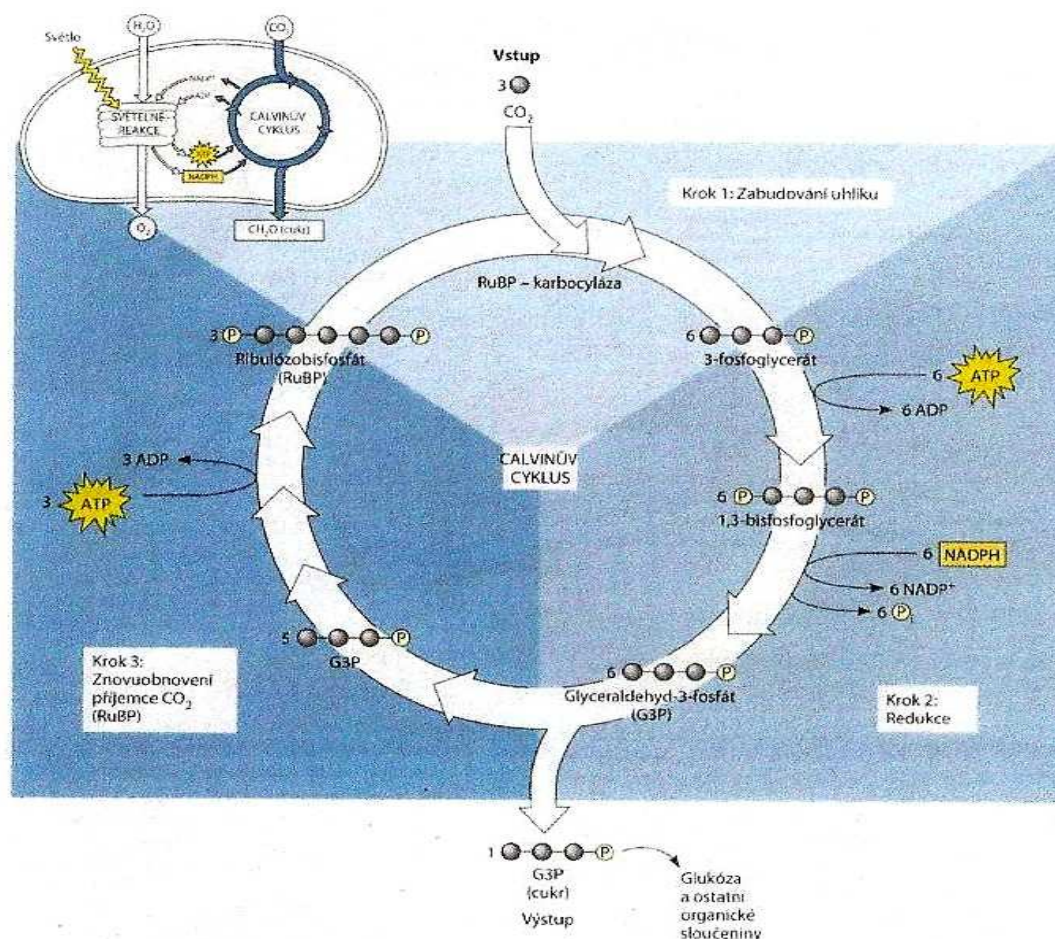
Obr. 2: Fotosyntetický tok elektronů se zřetel k redoxpotenciálu zúčastněných soustav [2].

2.1.1.2 Calvinův cyklus

Calvinův cyklus dostal jméno podle Melvina Calvina, který se svými spolupracovníky začal koncem 40. let minulého století osvětlovat jeho průběh. Cyklus začíná zabudováním vzdušného CO_2 do organické molekuly, která je přítomna v chloroplastu. Redukčním činidlem je NADPH, obsahující elektrony bohaté energií ze světelných reakcí. Stupněm fotosyntézy, ve které vzniká sacharid, je tedy Calvinův cyklus; jeho průběh je však nemožný bez účasti NADPH a ATP, vznikajících během světelných reakcí. Metabolické kroky Calvinova cyklu jsou někdy nazývány temnostní fází nebo reakcemi nezávislými na světle, protože ani jeden z kroků světlo ke svému průběhu přímo nepotřebuje. Přesto u většiny rostlin probíhá Calvinův cyklus během dne, jelikož pouze tehdy mohou být světelnými reakcemi obnovovány zásoby NADPH a ATP, spotřebované při redukci CO_2 na cukr. V podstatě tedy chloroplast využívá světelnou energii k vytváření sacharidu za součinnosti obou stupňů fotosyntézy [3].

Calvinův cyklus zabudovává každou molekulu CO_2 jejím připojením na monosacharid s pěti atomy uhlíku v molekule, zvaný ribulosa-1,5-bisfosfát. Enzym, který katalyzuje tento první krok, je ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa neboli Rubisco. Výsledkem reakce je meziprodukt se šesti atomy uhlíku v molekule, který je nestálý a okamžitě se rozpadá na dvě molekuly 3-fosfoglycerátu [3].

Každá molekula 3-fosfoglycerátu dostává od ATP další fosfátovou skupinu a stává se 1,3-bisfosfoglycerátem. Elektrony z NADPH redukují karboxylovou skupinu 3-fosfoglycerátu na karbonylovou skupinu, která uskládňuje více potenciální energie. Na každé tři molekuly CO_2 , vzniká šest molekul glyceraldehyd-3-fosfátu. Pouze jedna molekula této látky se třemi uhlíky může být započítána jako čistý výtěžek sacharidu. Posledním krokem Calvinova cyklu je přestavění pěti molekul glyceraldehyd-3-fosfátu na tři molekuly ribulosa-1,5-bisfosfátu [3].



Obr.3: Calvinův cyklus [3].

2.1.2 Faktory ovlivňující fotosyntézu

Fotosyntéza je ovlivňována řadou faktorů vnitřních i vnějších. V rámci vnitřních faktorů jde kromě strukturních a fyziologických činitelů především o obsah chlorofylu. Množství CO_2 redukováného na jednotku hmotnosti chlorofylu označujeme jako asimilační číslo. Při silném poklesu obsahu chlorofylu v listu se dostavuje tzv. chlorofylový kompenzační bod, tj. stav rovnováhy mezi fotosyntézou a dýcháním. Závislost mezi množstvím chlorofylu a rychlostí fotosyntézy není zpravidla přímá. Pro rychlost fotosyntézy je významný i věk listů. Maximální rychlosti fotosyntézy (tj. fotosyntetické dospělosti) dosahuje list v době, kdy jeho plocha dosahuje 50-80 % konečné plochy. V té době je v listu i největší obsah rostlinných hormonů podněcujících růst listu. Nejvyšší rychlost fotosyntézy je v listech ze střední části lodyhy [5].

Mezi strukturní faktory ovlivňující fotosyntézu patří zejména velikost a počet chloroplastů, tloušťka listových čepelí, počet průduchů, struktura mezibuněčných prostorů a tzv. listová pokrývnost [2].

Vnější faktory ovlivňující fotosyntézu jsou CO₂, teplota, voda, prvky minerální výživy (dusík, fosfor, hořčík, železo), spektrální složení a intenzita světla [4].

2.1.2.1 Listová pokrývnost

Listová pokrývnost znamená listovou plochu v m² připadající na 1 m² půdy. Hustý porost jako celek využívá světelné záření lépe při vertikálním než horizontálním postavení listů, které nedovoluje dostatečný průnik světla do hlubších vrstev porostu. Spodní listy pak začínají žloutnout. V nadměrné listové ploše klesá rychlost fotosyntézy, protože se zvyšuje obsah tzv. inhibičních (růst brzdících) látek a roste i intenzita výdeje vodních par (transpirace) [4].

2.1.2.2 Záření

Záření o vlnové délce 380-710 nm, jež je absorbováno asimilačními barvivy, označujeme jako fotosynteticky aktivní radiace. Absorpční spektrum hlavních asimilačních barviv, tj. chlorofylu *a* a *b* ukazuje, že maximum absorpce je ve světle červeném (610-710 nm) a modrofialovém (380-495 nm). Tyto vlnové délky světla jsou proto ve fotosyntéze nejúčinnější. Množství záření dopadající na jednotku listové plochy za jednotku času měříme jako ozáření v jednotkách energie (W.m⁻²) nebo v μmol (fotonů) m⁻² [2]. Na kvantitu světla jsou velmi náročné rostliny světlo milné. U nich se při snížené intenzitě světla záhy dostavuje tzv. světelný kompenzační bod, tj. vyrovnání fotosyntézy s dýcháním, takže nedochází k přírůstku ani úbytku sušiny [4].

2.1.2.3 Teplota

U většiny rostlin mírného pásma kolísá teplota, při níž čistá fotosyntéza začíná být měřitelná, mezi -3 až 0 °C (u jehličnanů při -7 až -5 °C). Při těchto teplotách je již zastaven růst a dochází tedy k hromadění asimilátů (cukry, dusíkaté organické látky, enzymy, fytohormony). Tropické rostliny zastavují fotosyntézu mezi +4 až +8 °C. Nejvyšší rychlost fotosyntézy (teplotní optimum) je u C₃ rostlin mezi 15-25 °C a kolem 30 °C se u nich již fotosyntéza zastavuje (teplotní maximum). Naproti tomu pro rostliny s cyklem C₄ jsou teploty 25-40 °C ještě optimální [2].

2.1.2.4 Oxid uhličitý

Při obsahu 0,01 % CO₂ ve vzduchu fotosyntéza začíná. Zvýšení z průměrného obsahu 0,03 % CO₂ ve vzduchu na deseti- až dvacetinásobek může zvyšovat rychlost fotosyntézy v závislosti na optimálním zastoupení ostatních faktorů, zvláště teploty, světla, vody, minerální výživy [4].

2.1.2.5 Voda

Dostatek vody je pro fotosyntézu nezbytný. Vadne-li rostlina, zavírají se průduchy, kterými do listů proniká CO₂. Během dne se proto jeví většinou pokles rychlosti fotosyntézy mezi 11. a 13. hodinou [4].

2.1.2.6 Minerální výživa

Ve fotosyntéze se vytvářejí prekurzory uhlíkatých skeletů, na něž se váží mnohé minerální živiny. Fotosyntéza také poskytuje redukční ekvivalenty (NADPH) a energetické platidlo ATP, které jsou nezbytné pro aktivní příjem minerálních živin a jejich akumulaci. Platí ovšem i opačný vztah. Minerální živiny tvoří nezbytnou součást fotosyntetických struktur a enzymů. To znamená, že v určitém rozsahu rychlost fotosyntézy podmiňuje rychlost příjmu minerálních živin, přičemž míra jejich dostupnosti spolurozhoduje o rychlosti fotosyntézy [4].

2.2 Rostliny C₃, C₄ a CAM

Calvinův cyklus používá k fixaci CO₂ většina rostlin a řas. Označujeme je jako C₃-rostliny, protože prvním produktem asimilace je tříuhlíková sloučenina, 3-fosfoglycerát [1]. Ve fotosyntéze rostlin C₃ hraje rozhodující úlohu množství a aktivita enzymu Rubisco. Zajímavé údaje o kvantitativním významu tohoto enzymu pro fotosyntézu při zvýšené koncentraci CO₂ uvádějí Theobald et al. [6]. Podle jejich názoru je při zvýšené koncentraci CO₂ maximální rychlost karboxylace úměrná obsahu Rubisco, zatímco při saturaci světlem se jedná o úměrnost s obsahem tylakoidní ATP-syntasy [4]. Nevýhodou tohoto způsobu fixace CO₂ je skutečnost, že v důsledku nízkého parciálního tlaku CO₂ v atmosféře a vysokého parciálního tlaku O₂ zde probíhá poměrně intenzivní fotorespirace [7].

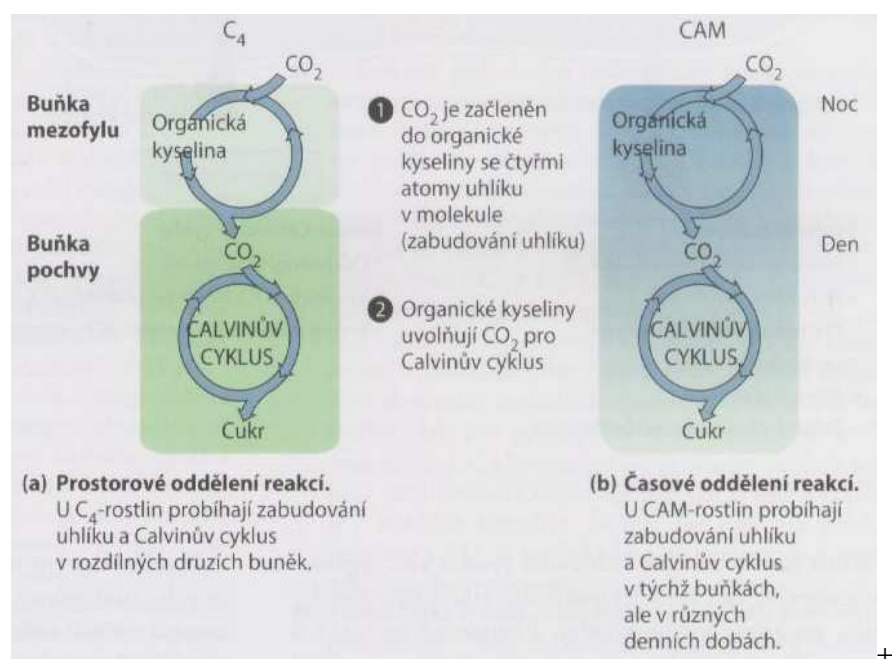
M. Hatch a C. Slack v roce 1970 objevili, že některé rychle rostoucí tropické rostliny jsou schopné fixovat CO₂ jiným způsobem. Primárním akceptorem CO₂ je při tom fosfoenolpyruvát a meziproductem místo 3-fosfoglycerátu oxalacetát, který se dále přeměňuje převážně na malát nebo aspartát. Hovoříme proto o čtyřuhlíkové cestě a o C₄-rostlinách. Dekarboxylací oxalacetátu se může vytvořit v místě Calvinova cyklu vysoká koncentrace CO₂, což umožňuje velkou rychlost a účinnost fotosyntézy. Čtyřuhlíková cesta byla prokázána u více než 500 druhů rostlin. Její význam spočívá v tom, že zvyšuje účinnost fixace CO₂ v lokalitách s intenzivním zářením, vysokou teplotou a omezeným přístupem vody. Na plném slunci listy C₄-rostlin (mají odlišnou morfologii stavby listu) obecně fixují CO₂ dvakrát rychleji než rostliny užívající C₃-cestu, protože fosfoenolpyruvát reaguje s nižší koncentrací CO₂, než potřebuje ribulosa-1,5-bisfosfát. Tím se CO₂ nakoncentruje pro činnost ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy v Calvinově cyklu. Stačí tedy menší přísun CO₂ do listu, jeho póry mohou být proto uzavřenější a tím jsou menší ztráty vodní páry. Další důvod zvýšené účinnosti fixace CO₂ C₄-cestou je, že ztráty CO₂ fotorespirací jsou velmi malé, protože oxygenace ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy je kompetitivně inhibována vysokou koncentrací CO₂ v listech C₄ rostlin [1].

Enzym Rubisco vykazuje mnohem menší afinitu k CO₂ než PEPc (fosfoenolpyruvátkarboxylasa), takže za stávající koncentrace CO₂ ve vzduchu není fotosyntéza listů rostlin C₃ saturována. U rostlin CAM, což jsou převážně sukulenty velmi dobře adaptované na růst v aridních teplých podmínkách, jsou průduchy otevřeny převážně v noci, kdy je CO₂ fixován enzymem PEPc a výsledný malát je pak hromaděn ve vakuole. Ve dne, s přivřenými až uzavřenými průduchy, je malát veden do cytoplazmy, kde je dekarboxylován a vzniklý CO₂ opět fixován enzymem Rubisco.

Z těchto rozdílů se pak odvozuje řada dalších rozdílů mezi uvedenými třemi skupinami rostlin. Většina rostlin na Zemi patří k typu C₃. Charakteristickým rozdílem mezi druhy C₃ a C₄ je jejich kvantový výtěžek pro příjem CO₂, což je poměr mezi fotosyntetickou absorpcí CO₂ a absorpcí fotonů listem. Vyšší kvantový výtěžek mají rostliny C₃, které fixují CO₂ jen

jednou. Ovšem při fotosyntéze listu je tento výtěžek snižován fotorespirací, která u C_4 rostlin je malá nebo zcela zanedbatelná. Proto v porostech mají rostliny typu C_4 vyšší účinnost využití záření než rostliny C_3 . Z rozdílné závislosti rychlosti fotosyntézy na teplotě u druhů C_3 a C_4 vyplývá, že větší fixace CO_2 porostem C_4 než C_3 projeví jen při vyšší teplotě. Udává se, že fotosyntéza C_3 druhů převyšuje druhy C_4 v podmínkách, kdy denní teplota během vegetace je nižší než $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Naopak druhy C_4 dominují při teplotách nad $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Rostliny CAM jsou obvykle charakterizovány mimořádně vysokými hodnotami účinnosti využití vody a nízkou produkcí sušiny. Z podrobnějších měření Nobela a Hartsocka [8] vyplývá, že zvýšení koncentrace CO_2 z $350\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ na $650\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ zvyšuje rychlost fotosyntetické fixace CO_2 během dne o 30 %, zatímco rychlost fixace v noci zůstává beze změny [4]. Tyto rostliny své průduchy otevírají během noci a uzavírají je během dne, tedy přesně obráceně, než jak se chovají ostatní rostliny. Uzavírání průduchů během dne pomáhá pouštním rostlinám zadržovat vodu, zároveň to však zabraňuje vstupu CO_2 do listů. Tyto rostliny přijímají CO_2 během noci, kdy jsou jejich průduchy otevřeny, a zabudovávají jej do rozličných organických kyselin. Buňky mezofylu u CAM rostlin uskladňují ve svých vakuolách organické kyseliny, které vytvářejí během noci, až do rána, kdy se uzavírají průduchy. Během dne, kdy mohou světelné reakce dodávat pro Calvinův cyklus ATP a NADPH je CO_2 z organických kyselin vytvořených během předcházejících noci uvolňován a v chloroplastech postupně zabudován do sacharidu.



Obr. 4: Srovnání C_4 a CAM fotosyntézy [3].

CAM dráha a C_4 dráha jsou si navzájem podobné v tom, že je CO_2 poprvé zabudován do organického meziproduktu ještě před vstupem do Calvinova cyklu. Rozdíl spočívá v tom, že zatímco u C_4 rostlin je úvodní krok zabudování uhlíku oddělen od průběhu Calvinova cyklu prostorově, u CAM rostlin probíhají tyto dva kroky v různých denních dobách [3].

2.3 Přímé účinky zvýšené koncentrace CO₂ na rostliny

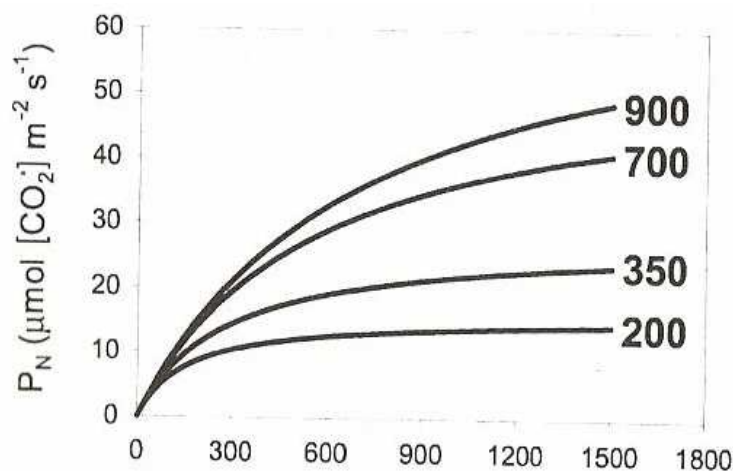
Přímé účinky zvýšené koncentrace CO₂ se projevují změnami rychlosti fotosyntézy, fotorespirace a vodivosti průduchů [4].

2.3.1 Rychlost fotosyntézy

Výsledkem změn rychlosti karboxylace a inhibice fotorespirace indukovaných zvýšením koncentrace CO₂ ve vzduchu obklopujícím fotosyntetické orgány je zvýšení rychlosti fotosyntézy. Míra tohoto zvýšení závisí na ostatních faktorech, a to zejména na dostupnosti zářivé energie. Obr. 5 názorně ilustruje vliv ozáření na rychlost fotosyntézy při různé koncentraci CO₂.

Je patrné, že vyšší koncentrace CO₂ působí výrazné zvýšení rychlosti fotosyntézy zejména při vyšších ozářeních. Ovšem zvýšení koncentrace CO₂ se příznivě projeví i při nižších ozářeních, což je významné pro fotosyntézu v době krátce po rozednění a před setměním. Většina rostlin je totiž limitována nedostatkem zářivé energie dopoledne i odpoledne. Kromě toho spodní patro hustých porostů vykazuje poměrně shodné hodnoty účinnosti využití záření. To lze nesporně přičíst shodnému mechanismu fotosyntézy u rostlin C₃. Tato účinnost je však i při podsaturačních ozářeních snižována ztrátami způsobenými fotorespirací. Inhibice této oxygenasové aktivity vyšší koncentrací CO₂ se ve všech případech projeví zvýšenou rychlostí fotosyntézy. Uvedený primární účinek změny koncentrace CO₂ pak působí na řadu dalších procesů, a nakonec ovlivňuje produktivitu rostlin.

Přímé působení CO₂ se projevuje nejen v souvislosti s karboxylací enzymu Rubisco. Je třeba vzít v úvahu také regulační účinky CO₂ na vazbu iontů Mn²⁺ na donorové straně fotosystému II, vazbu chinonů na akceptorové straně téhož fotosystému a aktivaci samotného enzymu Rubisco. Kvantitativně nejvýznamnější je zřejmě působení na enzym Rubisco, kdy se jedná o zvýšení rychlosti karboxylace, protože při standardní koncentraci CO₂ nejsou rostliny C₃ tímto substrátem saturovány, a inhibici oxygenasové aktivity enzymu Rubisco, která za standardní koncentrace CO₂ snižuje rychlost fotosyntézy o 20 až 50 %. CO₂ je kompetitivní inhibitor uvedené oxygenasové aktivity. Právě toto druhé působení může být mimořádně významné, protože jeho důsledkem je zvýšení rychlosti fotosyntézy i při její limitaci dostupností zářivé energie nebo CO₂ [4].



Obr. 5: Ilustrace závislosti rychlosti fotosyntézy na ozáření při různé koncentraci CO₂, kterou udávají čísla u jednotlivých křivek [4]

2.3.2 Interakce teploty a zvýšené koncentrace CO₂

Pro působení zvýšené koncentrace CO₂ na fotosyntézu rostlin je významná jeho interakce se změnou teploty. Při zvyšování teploty silně klesá hodnota specifitního faktoru (udávající poměr rychlosti karboxylace k rychlosti oxygenace při stejných koncentracích CO₂ a O₂), a to: větším poklesem rozpustnosti CO₂ vzhledem k O₂ a poklesem afinity Rubisco k CO₂ vzhledem k afinitě k O₂. Uvedený pokles specifitního faktoru Rubisco se promítá také v tom, že účinek zvýšené koncentrace CO₂ roste se zvyšující se teplotou. Z dosavadních experimentálních výsledků vyplývá, že interakce změny koncentrace CO₂ a změny teploty má na rychlost fotosyntézy velmi různorodý vliv. Například zvýšená koncentrace CO₂ působí na růst rostlin a jejich maximální rychlost fotosyntézy mnohem více při vyšších nežli při nízkých teplotách. Kromě toho teplotní optimum pro rychlost fotosyntézy saturevanou zářením se zvyšuje se zvýšením koncentrace CO₂ [4].

2.3.3 Aklimace na zvýšenou koncentraci CO₂

Aklimací většinou rozumíme přizpůsobení rychlosti fyziologických procesů, někdy i rostlinných struktur, na změněné hodnoty některého faktoru vnějšího prostředí. Jsou to změny, k nimž dochází při dlouhodobém pěstování rostlin při změněných, nejčastěji zvýšených koncentracích CO₂. Ukázalo se, že například samotná rychlost fotosyntézy se při dlouhodobější kultivaci rostlin v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ začne lišit (nejčastěji klesá) od rychlosti fotosyntézy rostlin pěstovaných za jinak srovnatelných podmínek při obvyklé koncentraci CO₂.

Pokles rychlosti fotosyntézy, snížení množství nebo aktivity Rubisco či dalších enzymů Calvinova cyklu při dlouhodobé kultivaci rostlin jsou v podmínkách vyšší koncentrace CO₂ pozorovány velmi často. Tento jev je označován jako aklimace. Obecně lze aklimaci na vyšší koncentraci CO₂ definovat jako soubor fyziologických změn, k nimž dochází při dlouhodobé kultivaci rostlin ve zvýšené koncentraci CO₂. To znamená, že fotosyntetická charakteristika listů, které se vyvinuly již v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂, se liší od charakteristiky listů rostlin, které byly v předchozím období kultivovány při okolní koncentraci CO₂. Nejnápadněji se tato aklimace projevuje postupným poklesem rychlosti čisté fotosyntézy, což bylo mnohokrát pozorováno a popsáno. Kromě toho se snižuje obsah dusíku, rozpustných bílkovin a Rubisco v listech. Obecně se předpokládá, že pokles rychlosti fotosyntézy při aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO₂ je způsoben zpětnovazebným účinkem asimilátů akumulovaných v listu na expresi genů [4].

Problematika aklimace rostlin při jejich dlouhodobé kultivaci při zvýšené koncentraci CO₂ není však dosud zdaleka vyjasněna. V zásadě jsou dva důvody pro tuto aklimaci:

- 1) Rostlina není schopna využít nadbytečné asimiláty, proto reguluje pokles aktivity jejich zdrojů.
- 2) Pro fotosyntézu při vyšší koncentraci CO₂ je postačující menší množství Rubisco [4].

2.4 Nepřímé vlivy CO₂ na rostliny

Samotné zvýšení rychlosti fotosyntézy vytváří větší množství asimilátů, které mohou buď inhibovat vlastní fotosyntézu nebo zvýšit alokaci sušiny do rostoucích kořenů nebo jiných sinků. Výsledkem vyšší rychlosti fotosyntézy může být také změna kvality biomasy s následnými příznivými nebo nepříznivými dopady na herbivorní faunu.

Zvýšená koncentrace CO_2 obvykle snižuje obsah dusíku v sušině rostliny a zvyšuje podíl sacharidů a fenolů. Změna hodnoty poměru C/N v rostlinách má však vliv na jejich nutriční a krmnou hodnotu také v tom smyslu, že rostliny pěstované při vyšší koncentraci CO_2 mají také vyšší obsah fenolických látek a taninů a jsou tužší [4].

2.4.1 Teplota

Zvýšení koncentrace CO_2 snižuje vodivost průduchů, a tím i výdej vody transpirací, a tedy i celkovou evaporací. Výsledkem je zvýšení teploty listů a celého porostu, které se rovněž projeví zvýšením teploty okolního vzduchu. Toto zvýšení může být v některých geografických oblastech velmi významné [4].

Zvýšení koncentrace CO_2 zvyšuje teplotní optimum fotosyntézy. S teplotou také klesá kvantový výtěžek fotosyntézy, tj. počet molů CO_2 fixovaného absorpcí jednoho molu fotonů. Avšak zvýšení tohoto výtěžku zvýšením koncentrace CO_2 je rovněž úměrné teplotě. Ještě uveďme kompenzační ozářenost, tj. ozářenost, při níž je příjem a výdej CO_2 listu v rovnováze. Ta s teplotou silně stoupá. Opět zvýšení koncentrace CO_2 zejména při vyšších teplotách tuto kompenzační ozářenost silně snižuje. To vše se pak promítá v relativní stimulaci rychlosti fotosyntézy vyjádřené poměrem rychlosti fotosyntézy při nízké a při zvýšené koncentraci CO_2 . Zvýšení rychlosti fotosyntézy zvýšenou koncentrací CO_2 může být zesíleno, pokud dojde současně ke zvýšení teploty, a to v rozmezí mezi teplotním minimem a optimem fotosyntézy. Při vyšších teplotách však další zvýšení teploty vzduchu může i na fotosyntézu působit inhibičně. Dále pak má teplota velmi silný vliv na rychlost dýchání. Její změna bývá podstatně větší než změna rychlosti fotosyntézy v příslušném teplotním rozmezí. Zvýšení samotné koncentrace CO_2 vede jednoznačně ke zvýšení rychlosti fotosyntézy a částečně nebo i úplné inhibici fotorespirace. Zvýšení jen teploty se však většinou projeví snížením hodnoty poměru mezi rychlostí fotosyntézy a rychlostí fotorespirace, protože pokles rozpustnosti CO_2 je větší než pokles rozpustnosti kyslíku. To znamená, že samotné zvýšení teploty mění poměr CO_2 ku O_2 v místě karboxylace ve prospěch O_2 a podporuje tak fotorespiraci [4].

Vyšší teploty podporují spotřebu asimilátů při růstu nebo jejich akumulaci v zásobních orgánech, takže případná inhibice fotosyntézy se ani při dlouhodobé kultivaci rostlin při zvýšené koncentraci CO_2 nemusí projevit. Proto může mít zvýšená koncentrace CO_2 příznivý vliv i v podmínkách stresu vyvolaného vysokými teplotami. Všeobecně se předpokládá, že budoucí zvyšování koncentrace CO_2 bude doprovázeno postupným zvyšováním teploty [4].

Kromě přímých (zejména na rostliny) a nepřímých (převážně na živočichy) účinků zvýšené koncentrace CO_2 se uplatní i další faktory související s antropogenními změnami naší planety. Například zvýšená depozice dusíku podporuje růst rychle rostoucích druhů rostlin. Ovšem vztah rostliny - ekosystém je neobyčejně složitým komplexem, v němž je rovnováha udržována mnoha vztahy [4].

2.5 Účinky zvýšené koncentrace CO_2 na stromy

Stromy nepředstavují homogenní skupinu rostlin. Nejčastější je členění na stromy opadavé a trvale zelené (jehličnany) se zcela odlišným ročním průběhem fotosyntézy, rozdílným obsahem dusíku v pletivech apod.

Rychlost fotosyntézy při zdvojnásobení koncentrace CO_2 se zvyšuje o 50 % až 60 %, přičemž nejsou jednoznačné výsledky o možných rozdílech mezi listnatými a jehličnatými stromy. Současně však je vhodné upozornit, že zejména pro stromy není měření rychlosti fotosyntézy metodou dostatečnou pro odhad změn v produkci biomasy. Důvodem mohou být sezónní změny v obsahu nestrukturních polysacharidů, emise izoprenů z listů a exudátů z kořenů, které mohou odvést nezanedbatelný podíl asimilátů. Obecně se ovšem předpokládá, že zvýšení koncentrace CO_2 zvýší účinnost fotosyntézy zejména snížením rychlosti fotorespirace, a to i při menší spotřebě dusíku vyvolané poklesem obsahu Rubisco.

Také u stromů dochází vlivem zvýšené koncentrace CO_2 k poklesu specifické listové plochy vyjádřené velikostí plochy listů vytvořené jednotkou hmotnosti jejich sušiny. Zvyšuje se obsah škrobu v listech i velikost a počet buněk. Ani sekundární metabolity nejsou chráněny před vlivem změny koncentrace CO_2 . Byly prokázány změny v obsahu ligninu, což se následně projevuje změnou kvality dřeva. Zvýšením koncentrace CO_2 dochází u stromů také ke zvýšení produkce izoprenů a ostatních uhlovodíků.

Zdá se, že zvýšená koncentrace CO_2 zvyšuje rychlost vývoje především v počátečních juvenilních fázích. Tato stimulace růstu zvýšenou koncentrací se projevila zejména u mladých stromů. Ke konci sledovaného období, tj. u stromů ve stáří 25 až 30 roků, se již neprojevily žádné rozdíly.

Při vyšších hodnotách listové plochy mohou jednotlivé stromy pěstované při vyšší koncentraci CO_2 vykazovat větší spotřebu vody než stromy rostoucí při standardní koncentraci CO_2 . Při omezené zásobě vody v půdě tak mohou nastat výrazné změny v růstu jednotlivých druhů. Je třeba si proto uvědomit, že předpokládaný pozitivní vliv zvýšené koncentrace CO_2 na účinnost vody nemusí být tak obecný jev, jak se většinou předpokládá.

Specifickou otázkou je mnohokrát citovaná aklimace rostlin na zvýšenou koncentraci CO_2 postupným poklesem rychlosti fotosyntézy. Marek et al. [9] prokázali u dvanáctiletých stromů smrku obecného aklimaci projevující se poklesem maximální rychlosti fotosyntézy o 38 % a účinnosti karboxylace o 32 %. Rychlost přenosu elektronů byla následně rovněž snížena. Urban a Marek [10] pak doložili také sníženou rychlost karboxylace při dlouhodobém působení zvýšené koncentrace CO_2 . Tento pokles byl doprovázen i změnami rychlosti regenerace substrátu pro karboxylaci. Je zajímavé, že uvedené změny stanovené v jarním období zdůvodnili autoři lokálním deficitem dusíku v asimilačním pletivu, zatímco na podzim se projevila nedostatečná kapacita sinku.

Míra zvýšení rychlosti fotosyntézy při zvýšené koncentraci CO_2 v závislosti na dostupnosti minerálních živin je u různých druhů dřevin rozdílná [4].

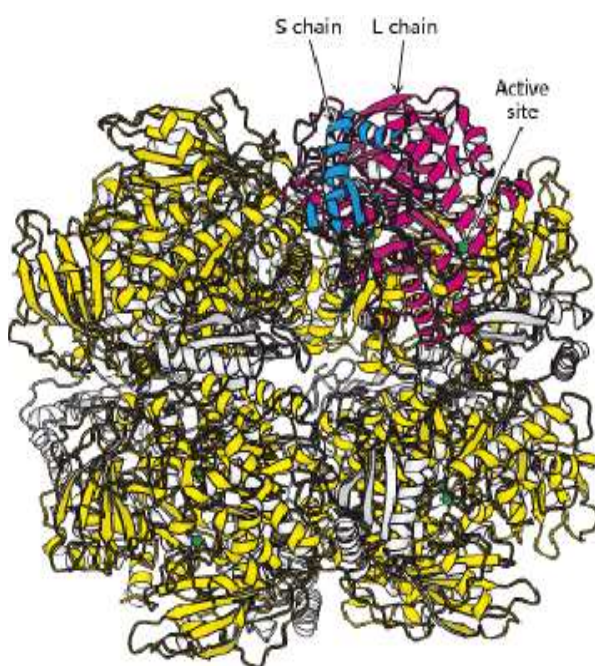
2.6 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)

Enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39) je nejhojnější protein na Zemi. Nachází se ve stromatu chloroplastů ve velké koncentraci a tvoří až 50 % rozpustných listových bílkovin [11]. V tomto enzymu je také obsažena podstatná část veškerého dusíku v listech [4]. Rubisco je počáteční enzym fotosyntetického a fotorespiračního metabolismu autotrofních rostlin. Katalyzuje karboxylaci ribulosa-1,5-bisfosfátu (RuBP) v Calvinově cyklu a oxygenaci stejného substrátu ve fotorespiračním cyklu [12, 13, 14]. Poměr mezi těmito dvěma metabolismy stejně jako množství a aktivita enzymu je dána účinností fotosyntézy a produktivitou rostlin. Proto je Rubisco zajímavý cíl pro

výzkumy, vedoucí k vytvoření rostlinných druhů se zlepšenou účinností karboxylace a sníženou fotorespirací [15, 16, 17].

Změny v aktivitě i v obsahu enzymu Rubisco jsou používány jako citlivý diagnostický parametr při zjišťování negativních efektů biotických i abiotických faktorů životního prostředí. Hlavním faktorem prostředí, který významně ovlivňuje růst a vývoj rostlin, je ozářenost

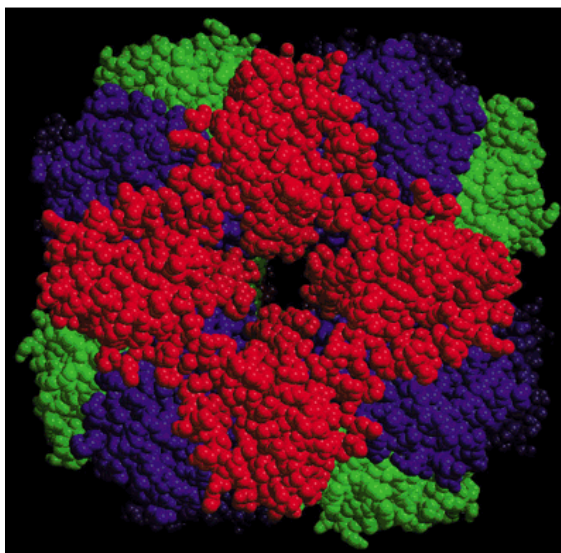
a koncentrace CO_2 v atmosféře. Působení zvýšené koncentrace CO_2 obecně vede jak ke zvýšení kapacity fotosyntézy (pozitivní aklimace) spojené se zvýšeným využitím absorbované energie ve fotochemických reakcích, tak i k poklesu kapacity fotosyntézy (aklimační deprese). Aktivita enzymu Rubisco může být stanovena *in vivo* použitím měření výměny plynů nebo *in vitro* spektrofotometrickými metodami. Obsah enzymu Rubisco může být stanovován separačními metodami, jako jsou gelová a kapilární elektroforéza a radioimunoprecipitační metoda [11].



Obr. 6: Struktura enzymu Rubisco [18].

2.6.1 Struktura enzymu Rubisco

Rubisco se vyskytuje ve dvou funkčních formách, které mají odlišnou strukturu, distribuci a citlivost na kyslík. Oxygenní fototrofy a mnoho fotosyntetických bakterií obsahuje formu I, skládající se z osmi velkých (L) katalytických podjednotek (každá 55 kDa) a osmi malých (S) podjednotek (každá 14 kDa), dávající dohromady hexadekamer L_8S_8 o molekulové hmotnosti okolo 560 kDa. Osm L podjednotek formy I je uspořádáno do oktamerního jádra obklopeného dvěma vrstvami 4S podjednotek, každá vrstva je lokalizována na opačné straně molekuly. Forma II enzymu Rubisco se nachází v některých fotosyntetických purpurových bakteriích a skládá se ze dvou L podjednotek (50 kDa každá) [19]. Katalytické centrum je na velkých podjednotkách, které jsou kódovány v DNA chloroplastu. Malé podjednotky jsou kódované v jádře [20].

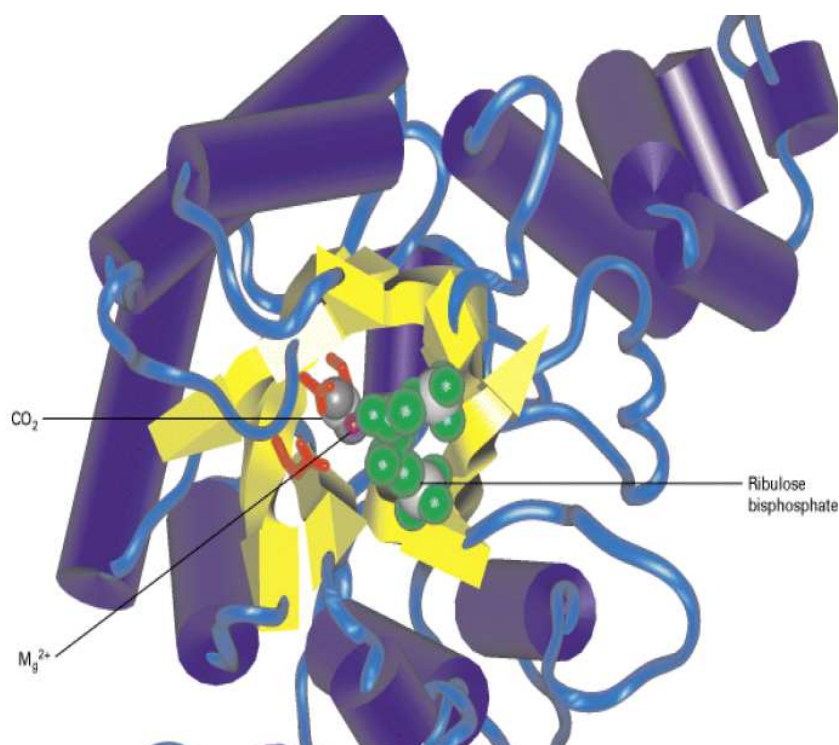


Obr. 7: Model struktury Rubisco. S podjednotky jsou značeny červeně, L podjednotky jsou zelené a modré [19].

V roce 1980 byl nalezen chloroplastový protein s molekulovou hmotností 720 kDa. Tento protein napomáhá správnému sbalení holoenzymu Rubisco, tak že vytváří meziprodukt s velkou podjednotkou Rubisco. [15, 21 - 26]. Crafts-Brandner a Salvucci [27] oznámili existenci proteinového komplexu o 120 kDa, který jednak váže prekursor malých podjednotek v cytosolu a redukuje jejich transport do chloroplastů a tak reguluje sbalení holoenzymu Rubisco. Aktivace Rubisco světlem *in vivo* umožňuje další specifický chloroplastový enzym aktivasa Rubisco, mající ATP-azovou aktivitu [17].

Využití rentgenové krystalografické analýzy vedlo k objevení struktury Rubisco z mnoha různých druhů rostlin [28 - 32]. Bylo zjištěno, že podjednotky Rubisco jsou symetricky organizované v L_8S_8 oktamerové struktuře. Bez ohledu na některé odlišnosti v aminokyselinovém složení nebyly stanoveny velké konformační rozdíly, dokonce i mezi takovými druhy jako je špenát a fotosyntetická bakterie *Rhodospirillum rubrum* [33]. Kvarterní struktura Rubisco ze špenátu je typická pro všechny vyšší rostliny a mnoho bakteriálních karboxylas [17, 20].

Aktivní místo je lokalizované na rozhraní mezi C-koncovou oblastí jedné velké podjednotky a N-koncovou oblastí druhé velké podjednotky. V jedné molekule L_8S_8 se tedy vyskytuje osm aktivních míst. Aktivní místo enzymu obsahují aminokyseliny: lysin, kyselina asparagová, kyselina glutamová a dále arginin, který se váže fosfátovou skupinu substrátu a histidin, který se uvolňuje při katalýze. Na N-konci jsou také místa, která se účastní vazby enzymu na substrát [17].



Obr. 8: Struktura aktivního místa: červeně: lysin 201, aspartát 203 a glutamát 204; hořečnatý ion je navázán na karbamát lysinu [18].

2.6.2 Karboxylace a oxygenace enzymu Rubisco

Karboxylační enzym rostlin C_3 , ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa váže na substrát (pětiuhlíkatý cukr ribulosa-1,5-bisfosfát) nejen molekulu CO_2 , ale také molekulu O_2 [4]. CO_2 a O_2 jsou tedy soutěžící substráty bifunkčního enzymu: při vysokém poměru CO_2/O_2 pracuje enzym jako karboxylasa, při nízkém poměru CO_2/O_2 jako oxygenasa [1].

Afinita Rubisco k CO_2 je sice podstatně větší než ke kyslíku, jenže v chloroplastech bývá mnohem vyšší koncentrace kyslíku než CO_2 [34]. Tato reakce s kyslíkem je podstatou fotorespirace, která snižuje množství fotosynteticky vytvářené hmotnosti sušiny až o jednu čtvrtinu za stávajících koncentrací CO_2 ($360 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) a O_2 ($210 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) v atmosféře. Tento poměr rychlosti fotosyntézy a fotorespirace právě ve prospěch fotosyntézy i při mnohem vyšší koncentraci kyslíku v atmosféře je dán kinetickými vlastnostmi enzymu Rubisco, kdy konstanta K_m pro O_2 je asi 700krát větší než je konstanta K_m pro CO_2 [4].

Fotorespirace je zřejmě neúspěšná reakce, která snižuje efektivitu začlenění uhlíku do organické sloučeniny. Soutěžení O_2 a CO_2 o vazbu na substrát Rubisco závisí na okolním poměru O_2/CO_2 a na specifickém faktoru ϕ [19], udávajícím poměr rychlosti karboxylace k rychlosti oxygenace při stejných koncentracích CO_2 a O_2 . Hodnota specifického faktoru kolísá od 88 do 131 s průměrem kolem 100. Nejvyšší hodnoty vykazují suchozemské rostliny C_3 , zatímco rostliny C_4 i sinice mají hodnoty nižší [4].

Rychlost karboxylace a oxygenace ukazují následující rovnice:

$$d[CO_2]/dt = v_c = (V_c / K_c) \cdot [CO_2]$$

$$d[O_2]/dt = v_o = (V_o / K_o) \cdot [O_2],$$

kde K_c : Michaelisova konstanta pro CO_2

K_o : Michaelisova konstanta pro O_2
 v_c : maximální rychlost pro karboxylaci
 v_o : maximální rychlost pro oxygenaci

Poměr karboxylace k oxygenaci katalyzované Rubisco:

$$v_c / v_o = (V_c \cdot K_o / V_o \cdot K_c) \cdot ([CO_2] / [O_2]) = \phi \cdot ([CO_2] / [O_2]),$$

kde specifický faktor ϕ . Vysoká hodnota ukazuje vyšší specifitu pro CO_2 [19].

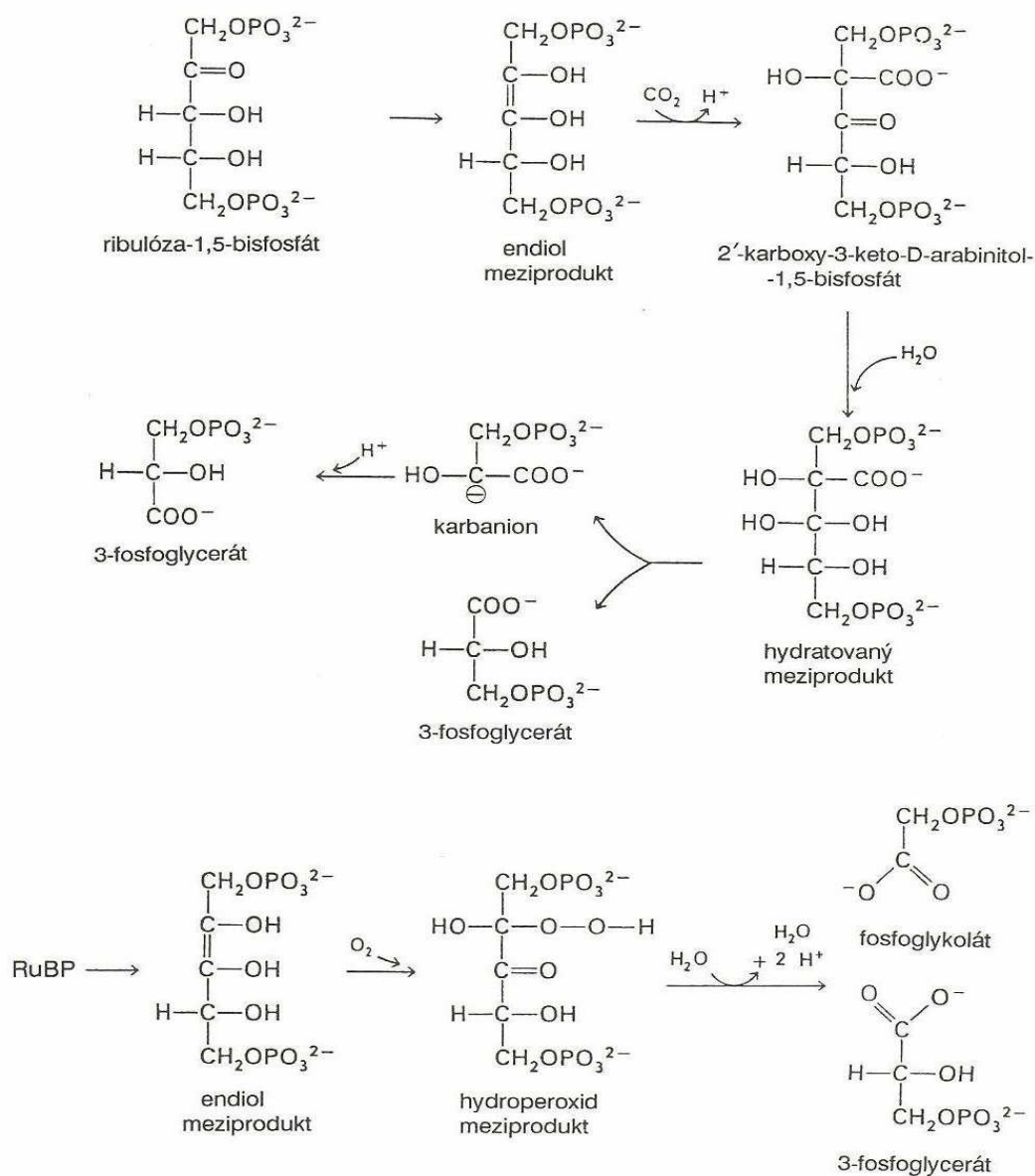
Fotorespirace začíná přenosem kyslíku pomocí enzymu Rubisco na stejný substrát, jako při karboxylaci (ribulosa-1,5-bisfosfát). Stálým produktem této reakce je jedna molekula 3-PGA a jedna molekula fosfoglykolátu. Z ní se záhy odštěpuje fosfátová skupina a vzniklý glykolát je transportován z chloroplastů do blízkých peroxizomů. Tam je oxidován na glyoxylát a ten dále trasaminován na glycin. Na tyto reakce v peroxizomu navazují další, tentokrát v mitochondriích: tvorba jedné molekuly serinu ze dvou molekul glycinu – uvolňuje se při tom po jedné molekule CO_2 a NH_2 . Serin může být jednak využíván v dusíkovém metabolismu buňky (syntéza dalších aminokyselin, bílkovin a jiných složitějších látek), ale může být také transportován zpět do peroxizomů, kde po transaminaci a redukci (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, ribulosa-1,5-bisfosfátu. Tím se celý cyklus uzavírá. U rostlin C_4 je fotorespirace zanedbatelná [4, 34].

Na karboxylační a oxygenační aktivitu Rubisco mají vliv strukturní změny při katalýze v aktivních místech molekuly [35]. Kvarterní komplexy enzymu s CO_2 , Mg^{2+} a CABP jsou studovány spektrofotometricky. RuBP se nemusí vázat pouze na katalytické místo enzymu, ale také na nekatalytické místo, které pravděpodobně souvisí s enzymovou regulací metabolismu [18, 36].

Při zvyšování teploty listu poměr mezi koncentrací CO_2 a O_2 v chloroplastech klesá, neboť CO_2 má za vyšších teplot menší rozpustnost ve vodě než kyslík. Podíl oxygenace, a tudíž i fotorespiračních ztrát, tedy nutně vzrůstá s teplotou [34]. Pokud je list saturován energií záření a nachází se v příznivé teplotě, tak rychlost fotosyntézy při nízkých koncentracích CO_2 je limitována množstvím karboxylačního enzymu (u C_3 rostlin) ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy/oxygenasy (Rubisco) a při vyšších koncentracích CO_2 kapacitou regenerace substrátu ribulosa-1,5-bisfosfátu (RuBP), která je zase určována dostupností ATP, tedy rychlostí přenosu elektronů a dostupností anorganického fosfátu. Tyto 3 druhy limitace rychlosti fixace CO_2 jsou obecně považovány za faktory determinující rychlost zabudování atmosférického CO_2 do organických látek. Přitom limitace fosfátem je detekovatelná svou necitlivostí na zvýšení koncentrace CO_2 nebo pokles koncentrace O_2 . Tento limitující faktor se vyskytuje především při vysokých rychlostech fotosyntézy. Při změně koncentrace CO_2 v závislosti na ozáření dochází nejen ke změnám Rubisco, RuBP a anorganického fosfátu, ale mění se i hladiny většiny ostatních metabolitů vyskytujících se v Calvinově cyklu [4].

Zvýšení koncentrace CO_2 umožňující vyšší rychlost fixace CO_2 bude vyžadovat menší množství enzymu Rubisco, a tak i menší množství dusíku [4].

Rubisco je aktivováno *in vitro* pomocí CO_2 , Mg^{2+} a některými metabolity. V aktivačním procesu je jeden zbytek lysinu karbamylován CO_2 molekulou, která je buď efektem nebo substrátem karboxylační reakce [12]. Z toho důvodu se CO_2 váže u Rubisco na dvě odlišná místa [17]. Tento proces (karbamylace Rubisco) je stimulován specifickým enzymem aktivasou Rubisco. U některých druhů se vyskytuje další specifická sloučenina, která řídí (tentokrát inhibuje) aktivitu Rubisco: 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát [34].

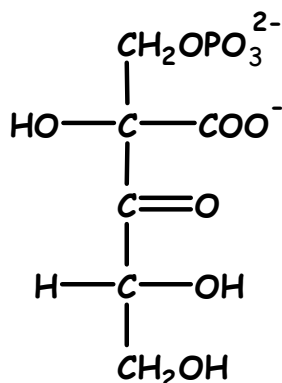


Obr. 9: Karboxylace (horní část) a oxygenace (spodní část) zprostředkovaná enzymem Rubisco [37].

2.6.3 2-karboxyarabinitol-1-fosfát (CA1P)

2-karboxyarabinitol-1-fosfát (CA1P) je přirozeně se vyskytující inhibitor Rubisco. Typické je, že množství CA1P je v noci vyšší než během dne, zatímco noční aktivita Rubisco je nižší než během dne. V nedávné době bylo potvrzeno, že se CA1P váže na Rubisco *in vivo* v noci. CA1P, který je pevně vázán na Rubisco, se uvolňuje na světle pomocí aktivasu Rubisco. Uvolněný CA1P je pak defosforylován specifickou CA1P fosfatasou (CA1Pasa) na

2-karboxy-D-arabinitol (CA) a anorganický fosfát [38]. CA1P byl poprvé izolován v listech tabáku a později ve fazolích [39].



Obr. 10: 2-karboxyarabinitol-1-fosfát (CA1P) [20].

2.6.4 Aktivasa Rubisco

Samotný enzym Rubisco je ve tmě neaktivní. Teprve po osvětlení je aktivován aktivasou Rubisco, vyskytující se ve stromatu chloroplastů [37]. Aktivasa se skládá se z monomerů velikosti 42-45 kDa, a může podporovat rychlejší přeměnu inaktivního komplexu Rubisco na aktivní formu [40]. Tato aktivace je nutná, aby enzym Rubisco mohl katalyzovat fotosyntetickou fixaci CO_2 [17].

Aktivasa Rubisco zvyšuje podíl aktivity Rubisco, podporuje disociaci pevně vázaného fosfátového cukru z aktivního místa enzymu a pravděpodobně navozuje konformační změny [17, 40 - 43].

Inaktivní enzym Rubisco je charakterizován pevnou vazbou ribulosa-1,5-bisfosfátu na nekarbamylované aktivní místo. Aktivasou se tato vazba uvolní, molekula Rubisco se karbamyluje a následně váže s Mg^{2+} . Aktivasa Rubisco byla prokázána u všech rostlin [37].

Aktivita aktivasy Rubisco je zvyšována při vzrůstu ozáření. Zářivá energie je nutná pro vytvoření takových koncentrací H^+ a Mg^{2+} ve stromatu, které jsou pro aktivaci nezbytné. Ovšem i při osvětlení nemusí být veškerý enzym Rubisco v aktivním stavu. Míra jeho aktivace závisí na vnějších faktorech (ozáření, CO_2 aj.) [37].

Genovými manipulacemi již byly vytvořeny rostliny s různě sníženým obsahem Rubisco. Bylo zjištěno, že podíl Rubisco na kontrole fotosyntézy závisí na vnějších i vnitřních faktorech [1].

Byly objeveny dvě isoformy aktivasy Rubisco (42 a 46 kDa) v různých druzích rostlin s odlišnou C-koncovou částí, jako výsledek spojování pre-mRNA. Obě isoformy katalyzují aktivaci Rubisco a hydrolyzují ATP, ale malé isoformy mají vyšší kapacitu než velké. Aktivace Rubisco pomocí aktivasy vyžaduje oboustranné rozpoznání obou proteinů [19].

2.6.5 Stanovení aktivity enzymu Rubisco

2.6.5.1 Gazometrické stanovení

Gazometrické metody jsou založeny na principu měření rychlosti spotřeby CO_2 rostlinami. Zjednodušeně lze říci, že pomocí těchto metod měříme pokles koncentrace CO_2 v okolí rostliny vyvolaný fotosyntetickou fixací molekul CO_2 . Podle uspořádání měřicí aparatury,

zejména zapojení infračerveného analyzátoru plynů (IRGA) do měřicího systému, rozlišujeme gazometrické metody za a) uzavřené (cirkulačního typu) a za b) otevřené (průtočného typu) [44].

Gazometrické metody se uplatnily již ve 30. letech minulého století, ale jejich největší rozvoj nastal v 50. letech, kdy se pro detekci koncentrace CO₂ začaly používat infračervené analyzátory. Princip všech těchto metod spočívá v tom, že rostlina, list nebo část se uzavře do vzduchotěsné komůrky, která je osvětlena a již prochází vzduch. Měří se úbytek koncentrace CO₂. Moderní metody měření umožňují stanovit nejen vlastní rychlost čisté fotosyntézy, ale i řadu dalších parametrů, které jsou významné pro interpretaci vlivu vnějších faktorů na rychlost čisté fotosyntézy [4].

Existují taky určité modifikace gazometrických metod měření, kdy se využívá radioaktivně značený ¹⁴CO₂. Toto je postup vhodný především pro studium transportu vznikajících asimilátů nebo jejich chemického složení [4].

2.6.5.2 Radiometrické stanovení

U této metody se nejdříve musí z reakční směsi odstranit veškerý oxid uhličitý a uhličitany. Do směsi se přidá známé množství ¹⁴C ve formě hydrogenuhličitanu draselného. Po přidání RuBP se odstartuje reakce, která se po 60 s zastaví přidávkem chlorovodíku. Odstraní se uvolněný oxid uhličitý a změří se radioaktivita produktu, která odpovídá množství asimilovaného CO₂ [45].

2.6.5.3 Spektrofotometrické stanovení

Stanovení aktivity enzymu Rubisco spektrofotometricky je založeno na změně absorbance při oxidaci NADH, ke které dochází při spřažení prvních tří reakcí Calvinova cyklu. Změna absorbance byla měřena při 340 nm. Tento postup stanovení vychází z metody Lilleyho a Wolkera [46].

Tissue et al. [47] upřednostňují postup, kdy se jehlice nejdříve zhomogenizují v 100 mol.m⁻³ HEPES, 5 mol.m⁻³ EDTA, 2% roztoku polyvinylpyrrolidinu, 14 mol.m⁻³ β-merkaptioethanolu. Supernatant se poté zmrazí v tekutém dusíku. Je to z toho důvodu, že jehlice obsahují terpeny a fenolické látky, které při zmražení poškozují strukturu Rubisco a tím snižují jeho aktivitu.

Portis et. al. [48] použili pro stanovení aktivity Rubisco směs enzymů fosfoglycerátmutasu, enolasu, pyruvátkinasu a mléčnou dehydrogenasu. Metoda je stabilní při koncentraci enzymu Rubisco 10 μg.l⁻¹ a teplotě 45 °C. Tato metoda dává stejné výsledky jako běžné stanovení.

Mezi další možnosti stanovení enzymu můžeme zařadit postup, kdy jsou jehlice borovice (*Loblolly pine*) extrahovány s tlumivým roztokem při 4 °C ve vysokorychlostním homogenizátoru. Homogenizované vzorky byly okamžitě zmrazeny a uskladněny v tekutém dusíku do analýzy. Poté byly rozmrazeny a centrifugovány při 13000 g po dobu 30 sekund v mikrocentrifugační zkumavce. Supernatant byl použit pro stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu Rubisco. Aktivační stav Rubisco byl zjištěn jako poměr počáteční a celkové aktivity [49].

Při spektrofotometrickém stanovení se rozlišuje počáteční a celková aktivita. Počáteční aktivita se stanovuje ihned po extrakci enzymu, proto se Rubisco nestačí aktivovat víc než bylo aktivované *in vivo* (fyziologicky aktivované množství). Při stanovení celkové aktivity jsou k extraktu přidány aktivační roztoky s KHCO₃ a MgCl₂ a směs se 10–15 minut inkubuje.

Při této inkubaci dochází k aktivaci všech aktivních center, která nejsou blokována pevně vázanými inhibitory. Po inkubaci vzorku je reakce iniciována přidavkem substrátu a měřena absorbance. Velikost naměřené aktivity závisí na množství enzymu, který přejde extrakcí a následnou centrifugací do supernatantu. Uvádí se, že do supernatantu přechází pouze 33 % z celkového množství enzymu [50].

2.6.6 Stanovení obsahu enzymu Rubisco

2.6.6.1 SDS-PAGE

Elektromigračními či elektroforetickými metodami nazýváme soubor technik, které využívají k separaci pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Elektroforéza jako separační technika byla prvně použita Tisellem, který na jejím základě už v roce 1937 rozdělil směs bílkovin.

Jestliže jsou látky nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, začnou se pohybovat konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě. Rychlost, kterou se ion v elektrickém poli pohybuje, může být vyjádřena vztahem:

$$v = \mu_c \cdot E,$$

v = rychlost iontu

μ_c = elektroforetická pohyblivost

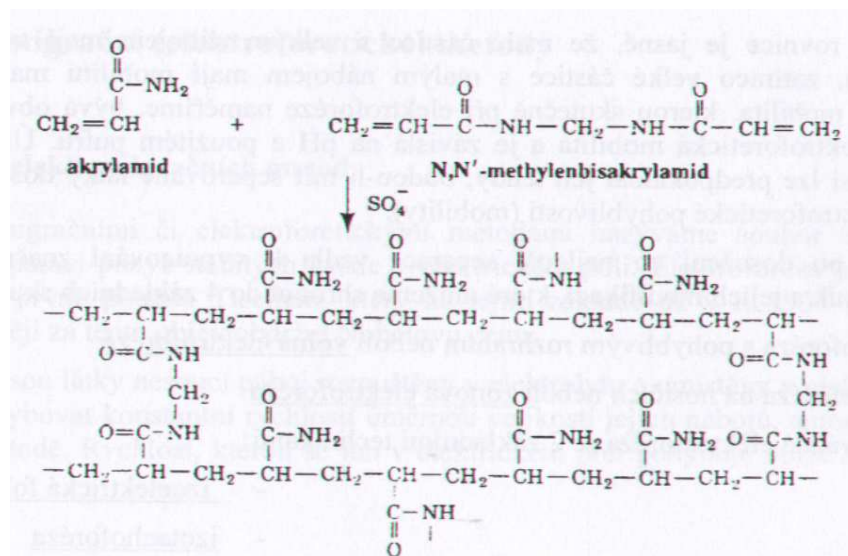
E = intenzita elektrického pole [51]

Elektroforetická pohyblivost μ_c určité nabité částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Jsou-li na začátku separace částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitější částice, které mají větší pohyblivost, a opoždějí se částice s menší pohyblivostí. Tím dochází k dělení [52].

Základem metody SDS-PAGE je elektroforéza komplexů denaturovaných peptidů s anionickým detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS). Nábojové rozdíly mezi různými peptidy se navázáním SDS téměř úplně potlačí, komplexy protein-SDS jsou v neutrálním a alkalickém prostředí silně negativně nabitě a putují k anodě. Procházejí-li polyakrylamidovým gelem o vhodné porózitě, je jejich pohyblivost dána velikostí molekuly [52]. Všechny bílkoviny váží asi 1,4 g SDS na 1 g bílkovin a při tom unifikuji i svou konformaci. Mobilita komplexu SDS – bílkovina v polyakrylamidovém gelu je přímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti příslušné bílkoviny [51]. Separované fragmenty jsou nejčastěji detekovány specifickým barvením, fluorescenčním nebo radioaktivním značením [48]. Nevýhodou je, že vazbou SDS na bílkovinu ve většině případů dochází ke ztrátě biologické aktivity bílkovin, takže např. enzymy již po proběhnutí elektroforézy není možné na základě aktivity prokázat [51].

Cleveland popsal modifikovanou verzi této metody. Bílkoviny jsou nejprve odděleny od kontaminujících látek SDS polyakrylamidovou elektroforézou a detekovány specifickým barvením. Vyříznuté plátky gelu, obsahující bílkoviny, jsou umístěny do drážek druhého diskontinuálního polyakrylamidového gelu. Studované bílkoviny jsou elektroeluvovány z plátku do zaostřovacího gelu, jenž obsahuje proteinasy s vysokou specifickou aktivitou. Zde probíhá štěpení. Peptidové fragmenty jsou pak elektroforetický separovány v polyakrylovém

gelu v přítomnosti SDS. Naštěpené a separované produkty jsou detekovány jako v případě klasické SDS-PAGE [53].



Obr. 11: Struktura polyakrylamidového gelu [51].

2.6.6.2 HPLC

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku.

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zachyceny, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně od sebe separují a na konec se dostávají dříve složky méně zadržované [52].

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. O separaci složek vzorku rozhoduje nejen jejich interakce se stacionární fází, ale i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi.

Klasické kolonové provedení nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem vysoce účinné kapalinové chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) [52].

Metoda HPLC se pro stanovení množství Rubisco používá v menší míře v porovnání s ostatními metodami. Při stanovení pomocí HPLC se používá gelová kolona, ve které nejrychleji procházejí velké molekuly a nejdéle jsou zadržovány malé molekuly. Antonov [54] použil kolonu Sepharose CL6B (0.9x50 cm) a jako eluční roztok HEPES o koncentraci 15 mmol·l⁻¹ a pH 7,6, obsahující EDTA (c = 0,1 mmol·l⁻¹), a 2-merkaptoethanol (c = 10 mmol·l⁻¹). Objemový průtok elučního roztoku byl 15 cm·min⁻¹ [50].

Metoda gelové chromatografie byla použita v práci Shena [55]. Použil kolonu TSKgel G3000SWXL (0,78 × 30 cm). Jako eluční roztok byl použit MOPS pufr o koncentraci 50 mmol·l⁻¹ a pH 7,0, obsahující Na₂SO₄ (c = 0,2 mol·l⁻¹). Objemový průtok elučního roztoku byl 0,5 ml·min⁻¹. Celé stanovení bylo prováděno při teplotě 4°C [50].

2.6.6.3 Imunochemické postupy

Tato metoda, stejně jako všechny ostatní imunochemické metody, využívá interakce antigenu se specifickými protilátkami *in vitro* za tvorby imunokomplexu antigen - protilátka. Stanovení tohoto komplexu je umožněno navázáním vhodné značky (v tomto případě enzymu) na jednoho z imunoreaktantů [56].

Kompetitivní ELISA - princip této metody je založen na tom, že antigen zakotvený na pevný nosič soutěží se stanovovaným antigenem ve vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky. Čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek, tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Nenavázané složky se odstraní a následně se přidá enzymem značená sekundární protilátka proti navázané protilátce. Konečná detekce je uskutečněna enzymovou reakcí, kdy vzniká barevný produkt. Intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky. Výhodou tohoto stanovení je možnost použití komerčně připravených značených protilátek (např. prasečí IgG proti králíčím IgG) [56].

Monoklonální protilátky, které mají vysokou specifitu a senzitivitu na stanovení určitého místa (epitopu) na molekule proteinu [57]. Jsou vhodné pro hodnocení interakcí mezi proteiny a pro hodnocení konformačních změn během aktivace a katalytického procesu.

Byly získány tři monoklonální protilátky proti Rubisco z mořských řas *Bryopsis maxima*, sedm monoklonálních protilátek proti Rubisco z *Nicotiana plumbaginifolia* [57] a šest monoklonálních protilátek z *Hordeum vulgare* [58].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

Materiálem pro stanovení obsahu a aktivity enzymu Rubisco, byly stinné a slunné jehlice smrku ztepilého (*Picea abies* [L.] Karst.). Odběry byly provedeny na Experimentálním ekologickém pracovišti AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech (obr. 12). Jehlice byly odebírány ze dvou lamelových kultivačních sfér s různou koncentrací CO₂. V jedné kultivační sféře je normální koncentrace CO₂ tj. 350 μmol CO₂ mol⁻¹ (A - ambient) a ve druhé sféře je dvojnásobná koncentrace CO₂ tj. 700 μmol CO₂ mol⁻¹ (E – elevated).

Jehlice byly odebírány dne 12. 6. 2008 (od 11:00 do 12:00 pro stanovení aktivity A a E slunných jehlic; od 12:00 do 13:00 pro stanovení aktivity A a E stinných jehlic; od 13:00 do 13:30 pro stanovení obsahu A a E slunných jehlic; od 13:45 do 14:05 pro stanovení A a E stinných jehlic) a 29. 9. 2008 (od 12:30 do 12:52 pro stanovení obsahu A a E slunných jehlic; od 13:48 do 14:21 stanovení aktivity A a E stinných jehlic; od 14:21 do 15:00 stanovení obsahu A a E stinných jehlic; od 12:00 do 13:30 pro stanovení aktivity A a E slunných jehlic).

Přibližná hmotnost jehlic v jednom vzorku byla 60 mg. Po naskenování se jehlice vložily do zkumavek Eppendorf a následně byly vnořeny do termosky s tekutým dusíkem. Vzorky se po příjezdu uchovávaly v mrazničce při teplotě -20 °C až do doby, než proběhla analýza.



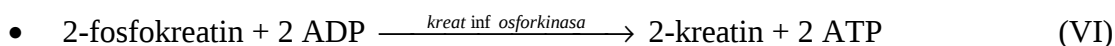
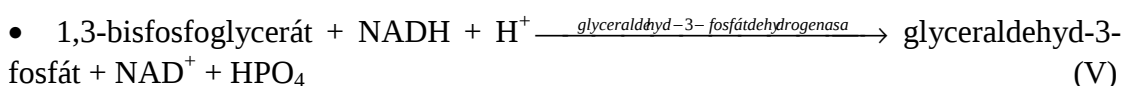
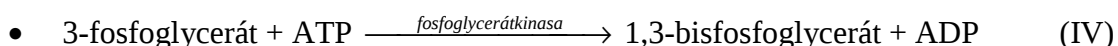
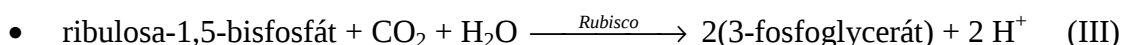
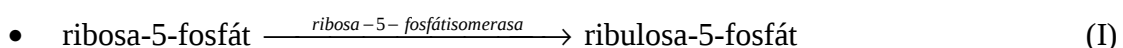
Obr. 12: Kultivační lamelové sféry na Bílém Kříži [59].

3.2 Spektrofotometrické stanovení počáteční a celkové aktivity Rubisco

Stanovení aktivity enzymu Rubisco vycházelo z metody Lilleyho a Walkera [46]. s extrakcí podle Besforda [60]. Počáteční aktivita byla stanovena podle Heringové [61]. Jako

substrát byl použit ribosa-5-fosfát, který se v reakční směsi transformuje na ribulosa-1,5-bisfosfát enzymy obsaženými v extraktu (reakce I, II). KHCO_3 , který uvolňuje CO_2 , byl do směsi přidáván jako druhý substrát reakce a aktivátor Rubisco. K aktivaci Rubisco byly též dodávány ionty Mg^{2+} ve formě MgCl_2 . Do reakční směsi byly přidány enzymy katalyzující reakce (III) – (V), NADH a ATP. Konečným produktem reakce je glycerinaldehyd-3-fosfát (reakce III – V). Aby se zabránilo hromadění ADP, který inhibuje enzym fosfoglycerátkinasu, je ATP fosforylováno v reakci (VI). Aktivita Rubisco byla počítána z úbytku absorbance při oxidaci NADH (reakce V) podle Lambert-Beerova zákona.

Tento postup stanovení aktivity Rubisco je založen na spřažení prvních tří reakcí Calvinova cyklu.



3.2.1 Přístroje

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

Centrifuga MLW T52.1

Spektrofotometr Helios γ od firmy Spectronic Unicam. Měřicí rozsah 190 – 1100 nm, spektrální šířka pásu 2 nm.

3.2.2 Chemikálie

Na_2EDTA – ethylendiamintetraoctan disodný; Sigma ALDRICH

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

DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH

BSA – bovinní sérový albumin; Sigma ALDRICH

MgCl_2 – chlorid hořečnatý; Sigma ALDRICH

KHCO_3 – hydrogenuhličitan draselný; Sigma ALDRICH

Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa; Sigma ALDRICH

Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH

R5P – ribosa-5-fosfát; Sigma ALDRICH

3-fosfoglycerátkinasa; Sigma ALDRICH

ATP – adenosin-5'-trifosfát; Sigma ALDRICH

Fosfokreatin; Sigma ALDRICH

Polyclar – polyvinylpolypyrrolidon; Sigma ALDRICH

NADH - β -nikotinamidadeninukleotid ; Sigma ALDRICH

3.2.3 Příprava roztoků

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

5,96 g HEPES a 0,186 g Na_2EDTA bylo rozpuštěno asi ve 400 ml vody, pH bylo upraveno pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$) na 7,8. Poté byl roztok převeden do 500 ml odměrné baňky a vodou doplněn po rysku.

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

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

5,96 g HEPES a 0,219 g Na_2EDTA bylo rozpuštěno asi ve 400 ml vody, pH bylo upraveno pomocí KOH ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$) na 8,0. Poté byl roztok převeden do 500 ml odměrné baňky a vodou doplněn po rysku.

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

3.2.3.3 Příprava extrakčního roztoku

V odměrné baňce 200 ml bylo rozpuštěno 0,156 g DTT, 0,0906 g MgCl_2 a 0,4 g BSA v zásobním roztoku HEPES-KOH, pH 7,8.

Takto připravený extrakční roztok obsahuje 50nM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na_2EDTA , 5mM DTT, 5 mM MgCl_2 a 0,2 % BSA.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.2.3.4 Příprava aktivačních roztoků

V odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,2285 g MgCl_2 v HEPES-KOH, pH 8,0.

V odměrné baňce na 50 ml bylo rozpuštěno 0,3003 g KHCO_3 v HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztoky jsou stálé a uchovávají se při laboratorní teplotě.

Z těchto roztoků se pipetuje po 50 μl do kyvety, což odpovídá konečné koncentraci 20 mM MgCl_2 a 25 mM KHCO_3 v aktivačním roztoku.

3.2.3.5 Příprava roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

6 mg enzymu bylo rozpuštěno v 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.6 Příprava roztoku kreatinfosfokinasy

2 mg enzymu bylo rozpuštěno v 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.7 Příprava roztoku R5P

6,2 mg enzymu bylo rozpuštěno v 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0.

Roztok se uchovává při teplotě -18 °C.

3.2.3.8 Roztok 3-fosfoglycerátkinasy

Byl použit komerčně vyráběný roztok.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.2.3.9 Příprava pracovního roztoku

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

0,019 g ATP

0,002 g NADH

0,013 g fosfokreatinu

0,008 g DTT

19 µl 3-fosfoglycerátkinasy

100 µl roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

100 µl roztoku kreatinfosfokinasy

Takto připravený pracovní roztok obsahuje po přidání aktivačních roztoků 50mM HEPES-KOH, pH 8,0, 20 mM MgCl₂, 25 mM KHCO₃, 3,5 mM ATP, 0,25 mM NADH, 5 mM fosfokreatinu, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 80 nkat 3-fosfoglycerátkinasy, 80 nkat glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy a 80 nkat kreatinfosfokinasy.

Pracovní roztok je stálý maximálně 6 hodin a uchovává se při laboratorní teplotě.

3.2.4 Extrakce enzymu

Přibližně 60 mg vzorku bylo rozdrceno v třecí misce s mořským pískem. Bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku a polyvinylpyrrolidon a vzorek byl asi 30 sekund homogenizován. Suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 1 minutu odstředována. Získaný extrakt byl použit k měření počáteční a celkové aktivity. Extrakt rychle stárne, proto bylo nutné zpracovat ho co nejrychleji.

3.2.5 Měření aktivity

3.2.5.1 Počáteční aktivita

Do optické kyvety bylo pro měření počáteční aktivity napipetováno 50 µl aktivačního roztoku MgCl₂, 50 µl aktivačního roztoku KHCO₃, 20 (nebo 50) µl extraktu, 850 (nebo 820) µl pracovního roztoku a 30 µl roztoku R5P. Po promíchání byl měřen pokles absorbance v intervalech 30s při vlnové délce 340 nm.

3.2.5.2 Celková aktivita

Do optické kyvety bylo pro měření celkové aktivity napipetováno 50 µl aktivačního roztoku MgCl₂, 50 µl aktivačního roztoku KHCO₃ a 20 (nebo 50) µl extraktu. Roztok byl promíchán a 15 minut inkubován. Po inkubaci bylo do kyvety přidáno 850 (nebo 820) µl pracovního roztoku a 30 µl roztoku R5P. Po promíchání byl měřen pokles absorbance v intervalech 30s při vlnové délce 340 nm.

3.2.6 Výpočet aktivity a stupně aktivace enzymu Rubisko

Měření absorbance v 30s intervalech byly získány hodnoty A. Z těchto hodnot byl vypočítán úbytek absorbance za ½ minuty ΔA. Ze změny absorbance v čase se pomocí Lambert-Beerova zákona vypočítala aktivita enzymu:

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

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

Aktivita enzymu je počítána z rychlosti úbytku substrátu (CO_2):

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

Hodnota ϵ pro NADH je $6300 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$, optická délka kyvety ke 1 cm.

Vzorový příklad výpočtu aktivity

Aktivita je počítána z lineární části naměřených dat. Přibližně 90 s se projevuje tzv. lag fáze, která je nelineární. Průměrná absorbance je uváděna za 30 s, proto ji převádíme na minuty, vynásobením dvěma.

Tabulka 1: Měření počáteční aktivity enzymu Rubico v extraktu vzorku Sa E slun_4 (29. 9. 2008)

Počáteční	Sa E slun_4	
t [s]	A	ΔA
30	0,596	0,004
60	0,592	0,003
90	0,589	0,004
120	0,585	0,004
150	0,581	0,003
180	0,578	0,004
210	0,574	0,004
240	0,570	0,004
270	0,566	0,004
300	0,562	0,003
330	0,559	0,004
360	0,555	
Průměr $\Delta A [\text{min}^{-1}]$		0,0074
Aktivita [$\mu \text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$]		8,963

Koncentrace v $1000 \mu \text{l}$ extraktu:

$$\Delta n = \frac{\Delta A [\text{min}^{-1}] \cdot V [\mu \text{l}]}{2 \cdot \epsilon [\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}] \cdot l [\text{cm}]} = \frac{0,0074 \cdot 1000}{2 \cdot 6300 \cdot 60} = 9,8598 \cdot 10^{-6} \mu \text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Koncentrace v celém objemu extraktu (5 ml):

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 9,8598 \cdot 10^{-6}}{0,02} = 0,0025 \mu \text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Aktivita Rubisco vztažená na jednotkovou plochu ($S = 0,000275 \text{ m}^2$) listu:

$$\Delta n = \frac{0,0025}{0,000275} = 8,9634 \text{ } \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$$

Z deseti stanovení ($n = 10$) byla vypočítána průměrná hodnota aktivit a stupeň aktivace v % podle vztahu:

$$\frac{A_p}{A_c} \cdot 100$$

kde A_p je aktivita počáteční a A_c je aktivita celková.

3.3 Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco

Stanovení vycházelo z metod Damervalové et al. [62] a Rogerse et. al. [63]. Metoda byla dále upravena Floriánem [64].

3.3.1 Přístroje

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

Centrifuga MLW T52.1

Míchačka – Vortex mixer od firmy Merci s.r.o.

Třepačka LT2

Termoblok TDB-100 firmy BIOSAN, Riga (Lotyšsko)

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

3.3.2 Chemikálie

Akrylamid; Serva

N,N'-metylenbisakrylamid; Serva

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma ALDRICH

SDS – dodecylsulfát sodný; Sigma ALDRICH

Peroxodisíran amonný; Serva

Bromfenolová modř Na sůl; Serva

Glycerol; Sigma ALDRICH

Glycin; Serva

2-merkapt ethanol; Sigma ALDRICH

Methanol CHROMASOLV, Siedel-de-Haën

Brilantní modř G 250 – Coomasie; Serva

Kyselina octová; Lachema

Ethanol; Lachema

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin; Serva

D-Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa – standard Rubisco; Sigma ALDRICH

3.3.3 Příprava roztoků

3.3.3.1 Roztoky pro přípravu gelů

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

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok B: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno ve 50 ml vody, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 8,8, poté byl roztok doplněn na 100 ml.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok C: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno ve 50 ml vody, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na pH 6,8, poté byl roztok doplněn na 100 ml.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok D: 10 g SDS bylo rozpuštěno ve 100 ml vody.

Roztok je nutno chránit před světlem.

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

Roztok je nutno připravit pro každé stanovení čerstvý.

Roztok F: 10 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 1 ml vody.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

TEMED: komerčně dodávaný roztok

3.3.3.2 Pomocné roztoky

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

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a používá se opakovaně.

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

Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Vzorkový pufr: 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkptoethanolu.

Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.3.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin

Stabilizační roztok: 100 ml methanolu + 400 ml vody

Barvicí roztok: 0,5 g Coomassie Blue R 250 + 450 ml methanolu + 100 ml koncentrované kyseliny octové + 450 ml vody

Odbarvovací roztok: 250 ml methanolu + 100 ml koncentrované kyseliny octové + 650 ml vody

3.3.4 Příprava gelů

Elektroforetická skla se nejdříve omyla vodou, poté odmašťovacím přípravkem, opláchl se destilovanou vodou a ethanolem. Před upnutím do stojanu byla vyleštěna buničinou namočenou v ethanolu. Skla byla upevněna do stojanu tak, že větší sklo bylo vzadu. Spodní hrany skel ležely na gumové podložce a tlakem byla zajištěna proti vytečení gelu. Ke stanovení byl použit 10% separační a 5% zaostřovací gel.

3.3.4.1 Separační gel

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

Tabulka 2: Objemy roztoků k přípravě 10% gelu (10 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	4,0
A	3,3
B	2,5
C	-
D	0,1
E	0,14
TEMED	0,004

Těsně před nalitím roztoku mezi skla byl přidán roztok E a roztok TEMED. Poté byl roztok nalit mezi skla, asi 2 cm od horního okraje. Zbylý roztok byl ponechán v kádince jako kontrola zatuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl převrstven butanolem pro správné vyrovnání hladiny a jako ochrana proti vypařování vody.

3.3.4.2 Zaostrřovací gel

Pomocí automatických pipet byly do kádinky odměřeny objemy roztoků podle tabulky 3.

Tabulka 3: Objemy roztoků k přípravě 10% gelu (10 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	2,1
A	1,0
B	-
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po ztuhnutí separačního gelu byl odstraněn butanol a gel byl několikrát vymyt destilovanou vodou. Po přidání roztoku E a roztoku TEMED byl zaostrřovací gel nalit na vrstvu separačního gelu téměř po okraj a do prostoru mezi skla byl nasazen elektroforetický hřebínek. Hřebínek se odstraňuje až před nanášením vzorků. Hotový gel je možné uchovávat v lednici, ale nejdéle do příštího dne.

3.3.5 Příprava vzorků

Přibližně 60 mg vzorku bylo rozdrceno v třecí misce s mořským pískem. Byly přidány 2 ml TRIS pufru a vzorek byl asi 30 sekund homogenizován. Suspenze byla přelita do centrifugační zkumavky a 1 minutu odstředována. 0,5 ml supernatantu bylo napipetováno do mikrozkuavky Eppendorf, poté bylo přidáno 0,5 ml vzorkového pufru a směs byla 5 minut vařena v termobloku. Po zchladnutí byly vzorky uchovávány v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.6 Elektroforéza

Sklo s připraveným gelem bylo vytaženo ze stojanu a očištěno od zbytků gelu. Opatrně byl odstraněn hřebínek a skla byla upevněna do stojanu pro elektroforézu větším sklem směrem ven. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby a vnitřní prostor stojanu byl až po okraj

naplněn elektrodoým roztokem, vnější prostor byl naplněn asi do poloviny. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do první pozice naneseo 10 µl standardu Rubisco (1mg.ml⁻¹) a do každé jamky 10 µl vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno konstantní napětí 140 V. V průběhu analýzy bylo nutné kontrolovat, zda elektrodoý pufr neprotéká z vnitřní části stojanu do vnější a popřípadě pufr doplnit. Elektroforéza probíhala 60 minut, dokud čelo vzorku nedostoupilo asi 2 cm od spodního okraje gelu.

3.3.7 Zviditelnění bílkovin

Skla s gelem byla vyjmuta ze stojanu a ponořena do misky s destilovanou vodou, menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle bylo horní sklo sejmuto. Otočením spodního skla pod vodou došlo k vyklopení gelu. Voda v misce byla vyjmuta a gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Poté byl roztok slit a 30 minut protřepáván s barvicím roztokem. Po uplynutí této doby byl gel promyt použitým odbarvovacím roztokem a poté přibližně 90 minut protřepáván s čistým odbarvovacím roztokem do dostatečného odbarvení. Po slití použitého roztoku byl gel promyt destilovanou vodou, položen na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie, která ho chrání před vysycháním. S gelem a roztoky pro přípravu gelů bylo, vzhledem k vysoké toxicitě akrylamidu, nutné pracovat v rukavicích. Hotové gely byly skladovány v ledničce při teplotě do 8 °C.

3.3.8 Vyhodnocení

Hotové gely byly skenovány, kvantifikace velké podjednotky byla provedena na HP Scanner programem AIDA (Advanced Image Data Analyzer, verze 3.23.00., Raytest, Germany). Zóny velkých podjednotek Rubisco byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Koncentrace Rubisco ve vzorku byly vypočítána porovnáním plochy zóny vzorku a plochy zóny standardu. Protože poměr velikosti plochy a koncentrace je ovlivněn mnoha faktory, bylo nutné nanést standard Rubisco na každý gel.

Vzorový příklad výpočtu obsahu enzymu Rubisco:

Tabulka 4: Výpočet obsahu Rubisco ve vzorku Sa E slun_4 (29 .9. 2008)

Sm E slun	plocha zóny	plocha (m ²)	c (g/m ²)
standard	198219,60		
1	119473,00	0,000262	9,201992
2	124161,40	0,000249	10,062379
3	132262,90	0,000296	9,016951
4	139751,60	0,000290	9,724610
5	147080,80	0,000292	10,164512

Obsah Rubisco v 1 ml extraktu:

$$c = \frac{119473}{198219,6} \cdot 2 = 1,205 \text{ mg.ml}^{-1}$$

Množství Rubisco v 2 ml extraktu (tj. v celkovém objemu):

$$m = 1,205 \cdot 2 = 2,411 \text{ mg} = 2,411 \cdot 10^{-3} \text{ g}$$

Množství Rubisco vztažené na jednotkovou plochu ($S = 0,000262 \text{ m}^2$):

$$c = \frac{2,411 \cdot 10^{-3}}{0,000262} = 9,202 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

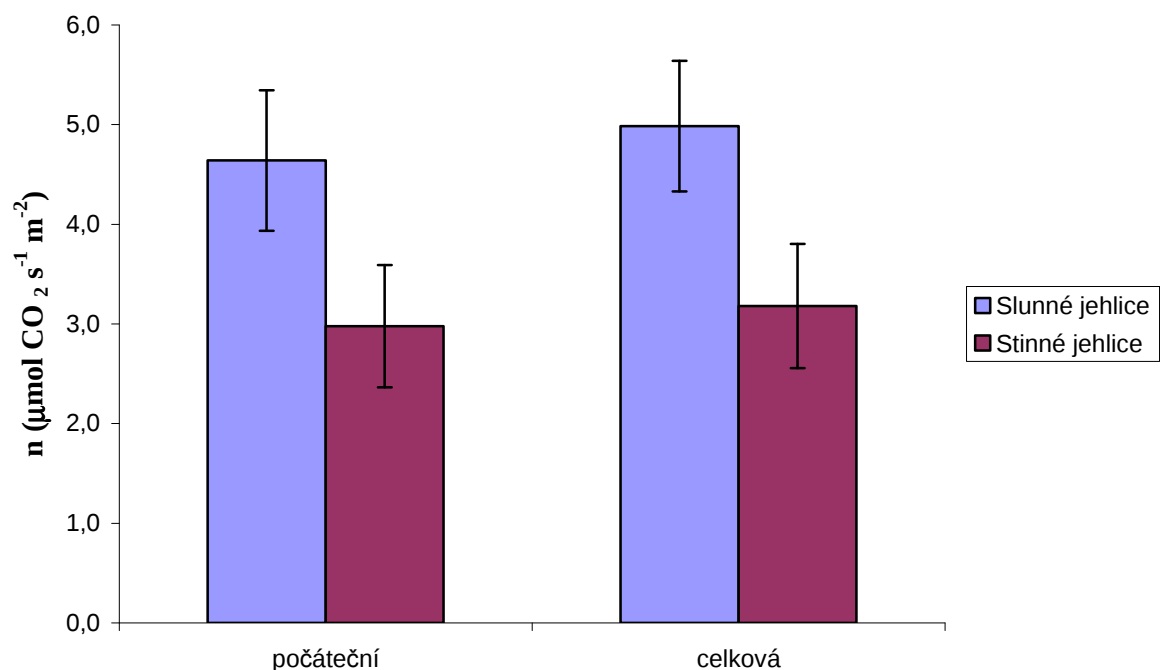
4.1. Výsledky

Tab. 5: Aktivita enzymu Rubisco v jehlicích smrku ztepilého v podmínkách zvýšené a normální koncentrace CO_2 ($n = 10$).

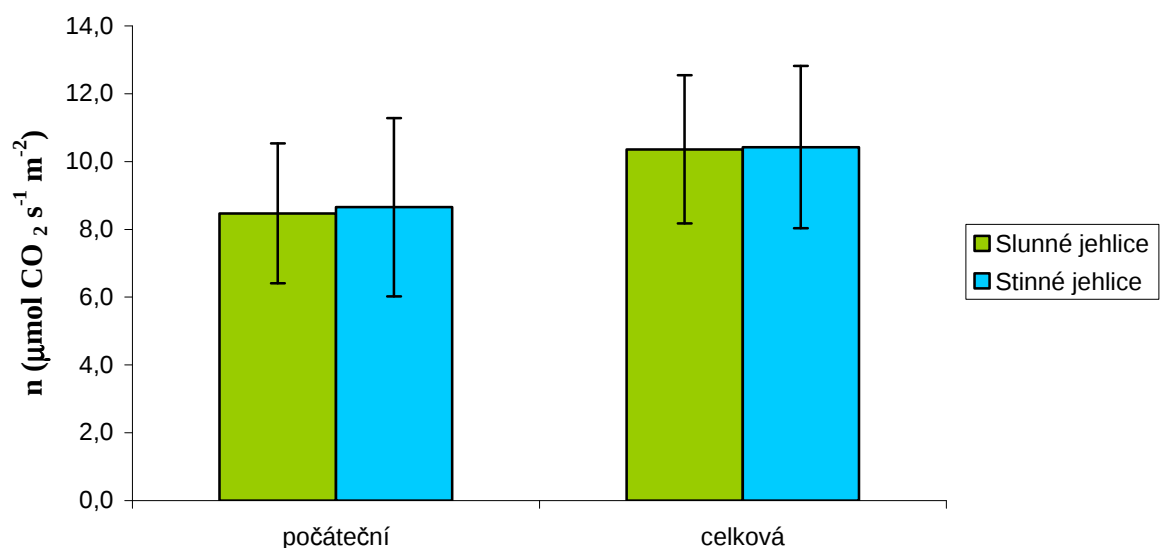
12. 6. 2008	počáteční ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)	interval spolehlivosti (IS)	celková ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)	IS	aktivace (%)
Sa A slun	4,64	0,70	4,99	0,65	93,06
Sa E slun	4,77	1,16	5,73	1,60	83,24
Sa A stín	2,98	0,61	3,18	0,62	93,62
Sa E stín	3,05	0,84	3,67	0,95	83,30
29. 9. 2008	počáteční ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)	interval spolehlivosti (IS)	celková ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)	IS	aktivace (%)
Sa A slun	8,47	2,06	10,36	2,18	81,75
Sa E slun	8,31	1,56	10,53	1,36	78,92
Sa A stín	8,65	2,63	10,43	2,39	83,01
Sa E stín	6,34	2,27	10,22	2,44	61,98

Tab. 6: Obsah enzymu Rubisco v jehlicích smrku ztepilého v podmínkách zvýšené a normální koncentrace CO_2 ($n = 10$).

odběry	12. 6. 2008	29. 9. 2008	12. 6. 2008	29. 9. 2008
	c (g/m^2)	c (g/m^2)	IS	IS
Sm A slun	2,42	14,69	0,21	2,05
Sm E slun	2,67	9,75	0,18	0,30
Sm A stín	2,15	2,16	0,12	0,28
Sm E stín	2,35	5,56	0,20	0,45



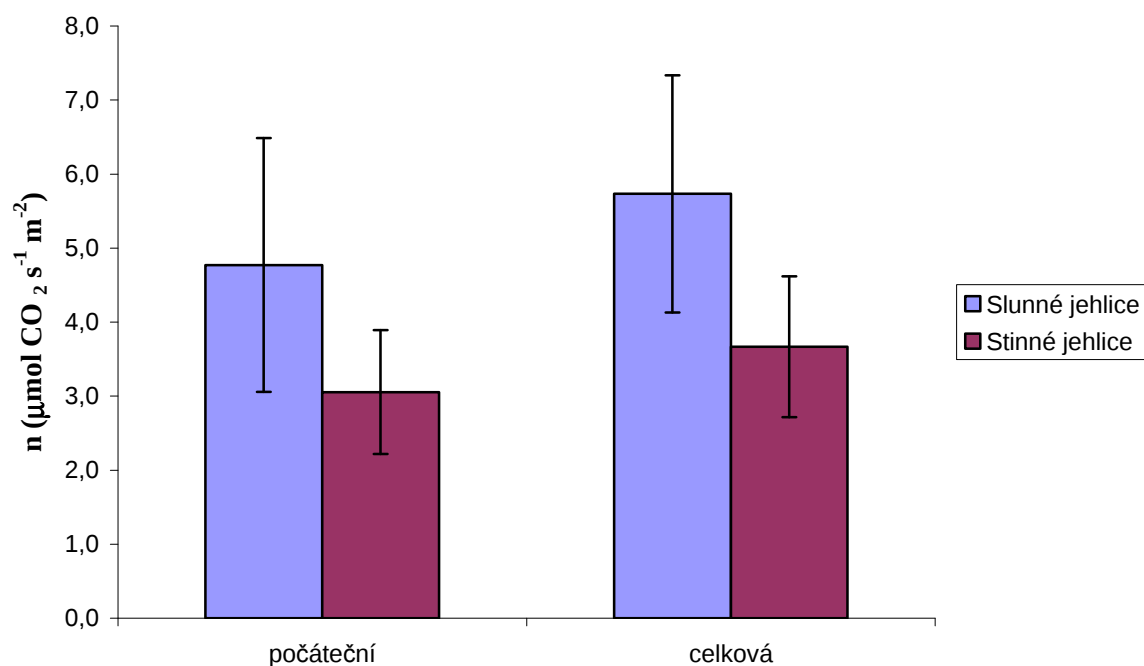
Obr. 13: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve vzorku s normální koncentrací CO_2 , 12. 6. 2008; ($n = 10$).



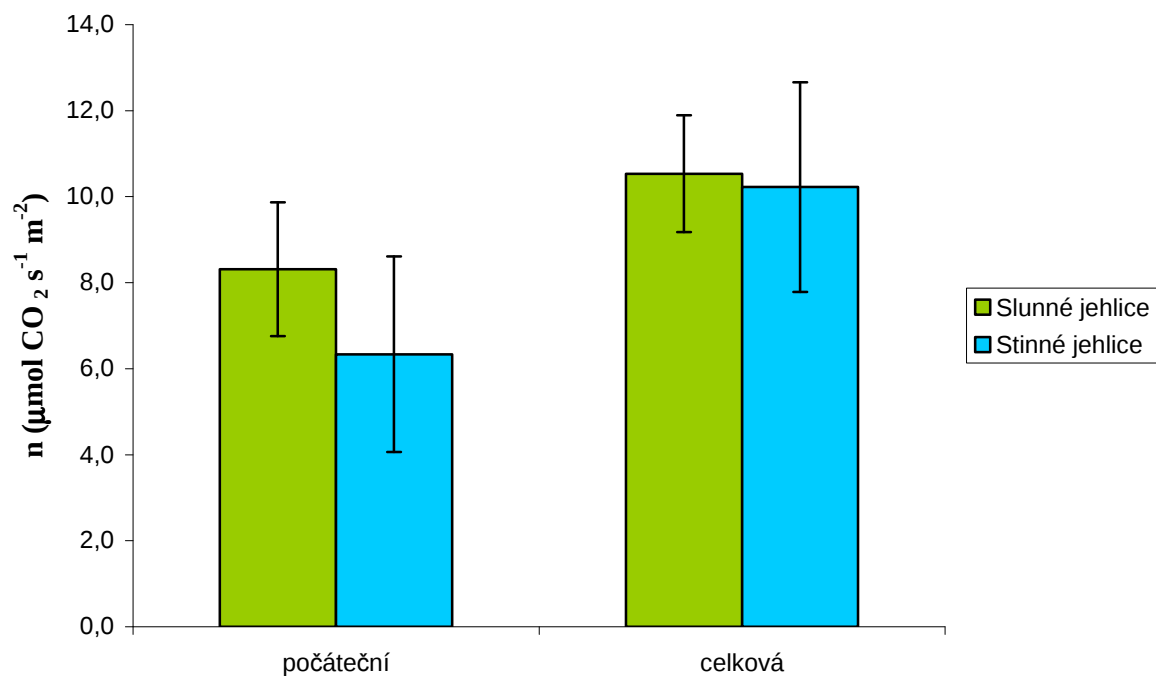
Obr. 14: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve vzorku s normální koncentrací CO_2 , 29. 9. 2008; ($n = 10$).

Ve vzorcích z 12. 6. 2008 byla zjištěna statisticky významně nižší aktivita Rubisco u stinných než u jehlic slunných. U počáteční aktivity bylo naměřeno snížení o 35 %, u celkové aktivity je to snížení o 36 %.

Ve vzorcích z 29. 9. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v aktivitě Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi.



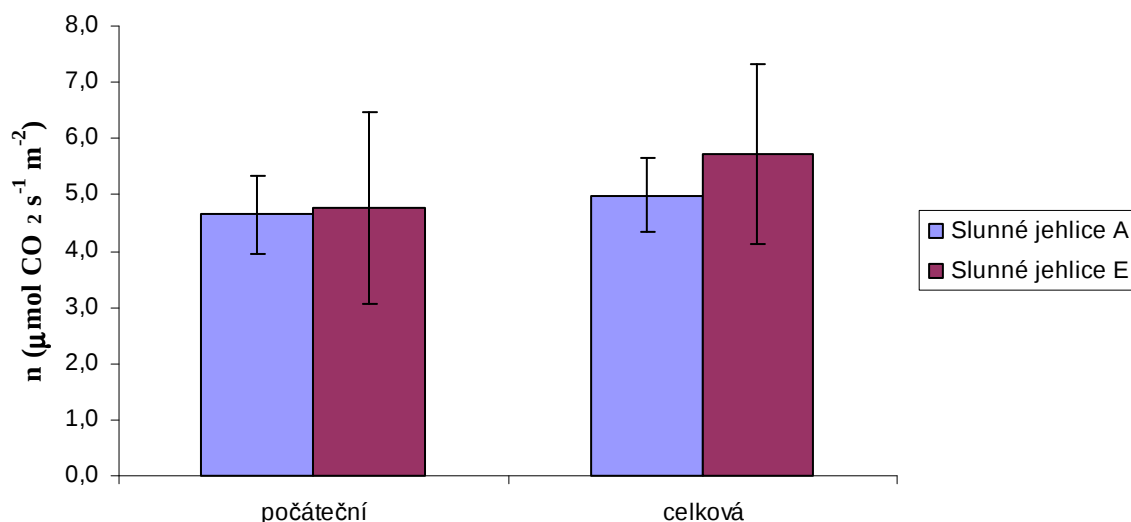
Obr. 15: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve vzorku se zvýšenou koncentrací CO_2 , 12. 6. 2008; ($n = 10$).



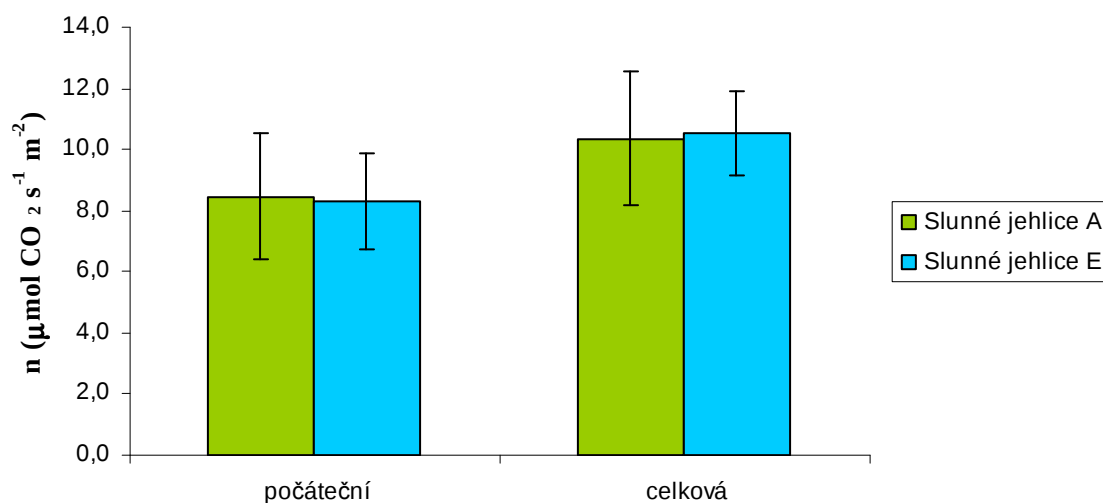
Obr. 16: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve vzorku se zvýšenou koncentrací CO_2 , 29. 9. 2008; ($n=10$).

Ve vzorcích z 12. 6. 2008 byla zjištěna statisticky významně nižší aktivita Rubisco u stinných než u jehlic slunných. U počáteční aktivity bylo naměřeno snížení o 36 %, u celkové aktivity je to snížení o 35 %.

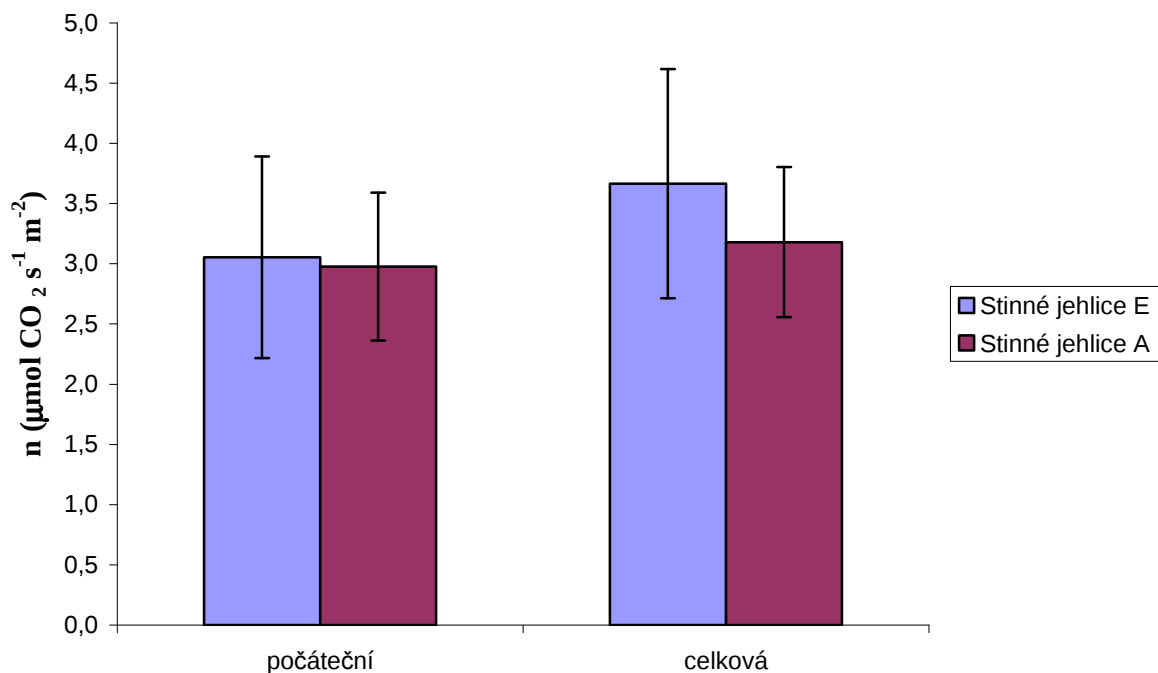
Ve vzorcích z 29. 9. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v aktivitě Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi.



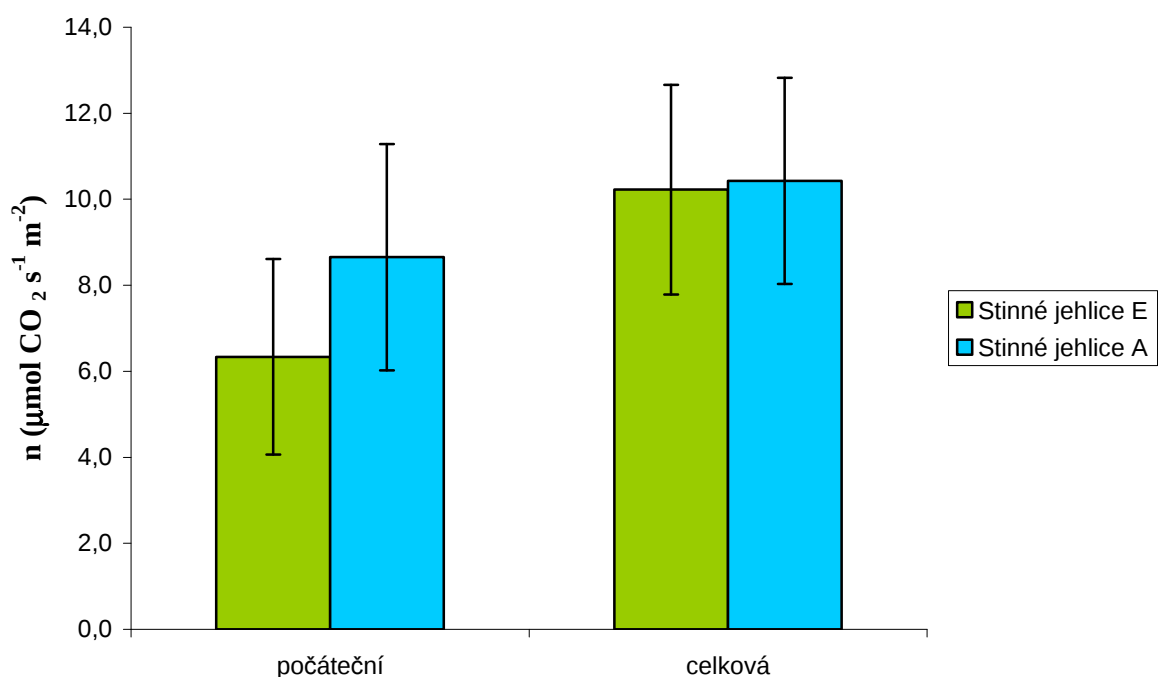
Obr. 17: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve slunném vzorku s odlišnou koncentrací CO_2 , 12. 6. 2008; ($n = 10$).



Obr. 18: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve slunném vzorku s odlišnou koncentrací CO_2 , 29. 9. 2008; ($n = 10$).



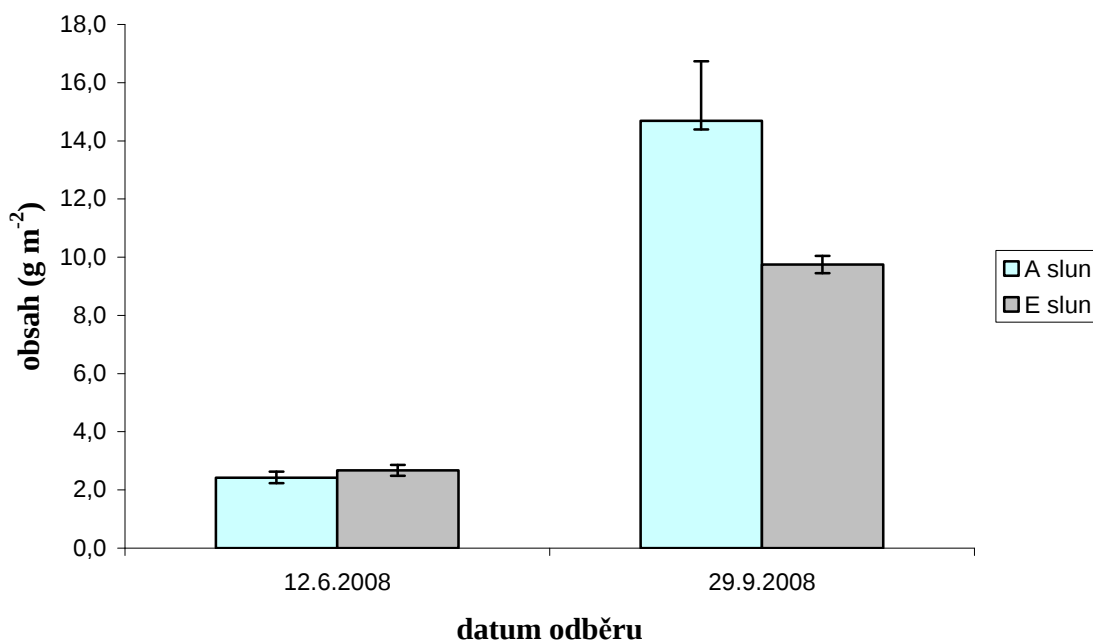
Obr. 19: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve stinném vzorku s odlišnou koncentrací CO_2 , 12. 6. 2008; ($n = 10$).



Obr. 20: Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco ve stinném vzorku s odlišnou koncentrací CO_2 , 29. 9. 2008; ($n=10$).

Při porovnání aktivity slunných a stinných jehlic v E a A při červnové kultivaci bylo zjištěno, že počáteční a celková aktivita je u slunných i stinných jehlic vyšší v E než v A .

Při porovnání počáteční a celkové aktivity slunných jehlic v E a A při podzimní kultivaci bylo zjištěno, že slunné jehlice v A mají vyšší počáteční aktivitu oproti E, ale nižší celkovou aktivitu než slunné jehlice v E. Počáteční aktivita slunných jehlic v A je o 2 % vyšší než v E. Celková aktivita u slunných jehlic v E je o 2 % vyšší než u slunných jehlic v A. U stinných jehlic je počáteční i celková aktivita vyšší v A než v E. Počáteční aktivita stinných jehlic v A je vyšší o 27 % než v E. Celková aktivita stinných jehlic v A je o 2 % vyšší než v E.

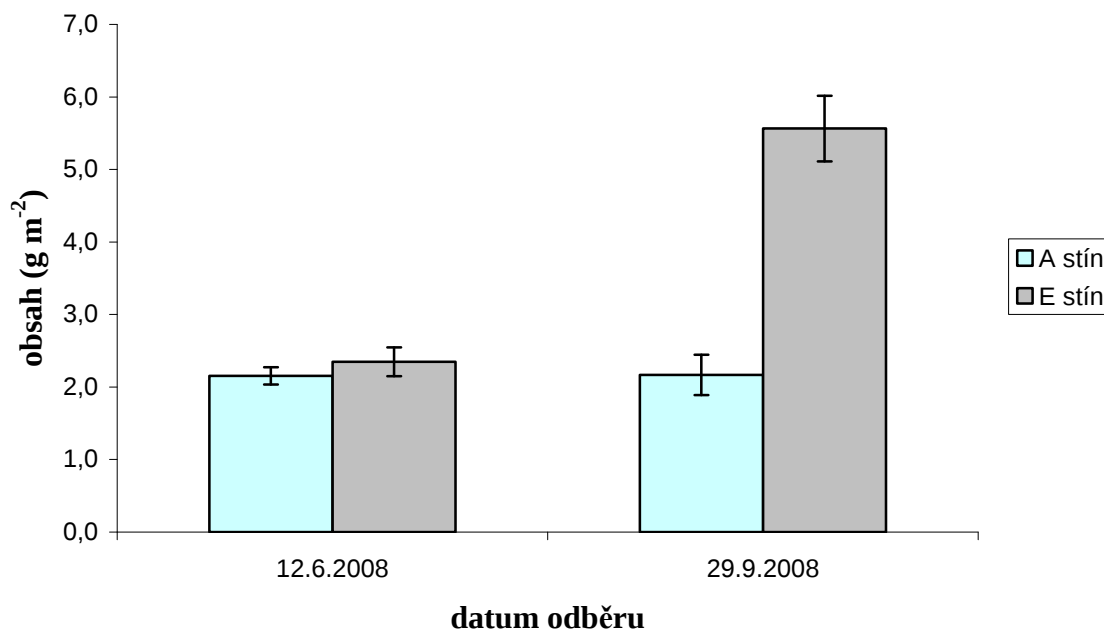


Obr. 21: Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných jehlicích A a E ($n = 10$).

Ve vzorcích z 12. 6. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi slunnými jehlicemi A a E.

Ve vzorcích z 29. 9. 2008 byl zjištěn o 34 % nižší obsah Rubisco ve slunných jehlicích E než v jehlicích A (aklimace).

Obsah Rubisco ve slunných jehlicích A byl v září 6krát vyšší než v červnu, ve slunných jehlicích E 3,6krát vyšší než v červnu.

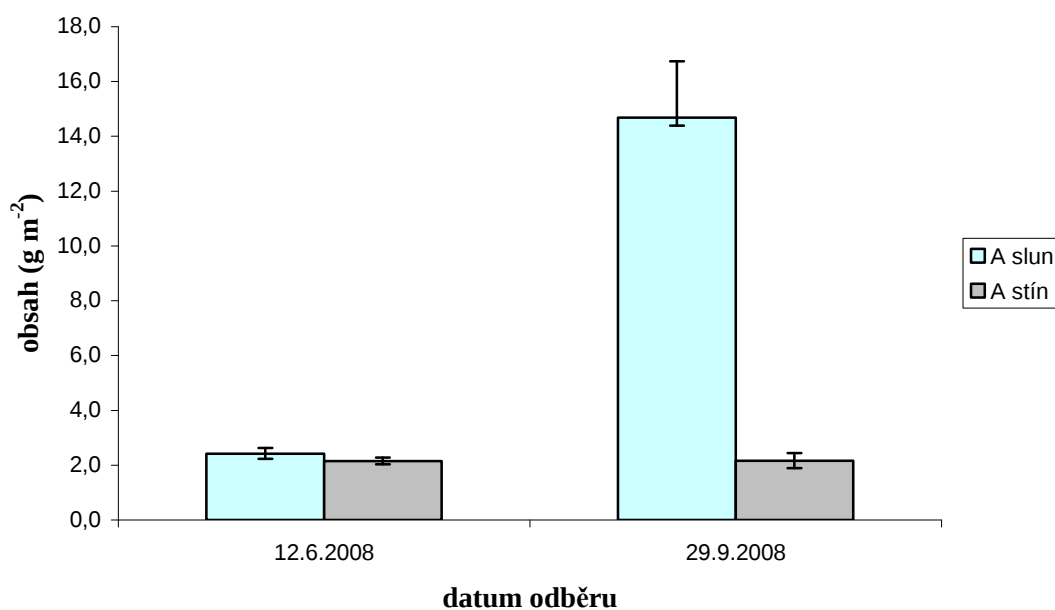


Obr. 22: Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve stinných jehlicích A a E ($n = 10$).

Ve vzorcích z 12. 6. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi stinnými jehlicemi A a E.

Ve vzorcích z 29. 9. 2008 byl zjištěn 2,6krát vyšší obsah Rubisco ve stinných jehlicích E než v jehlicích A.

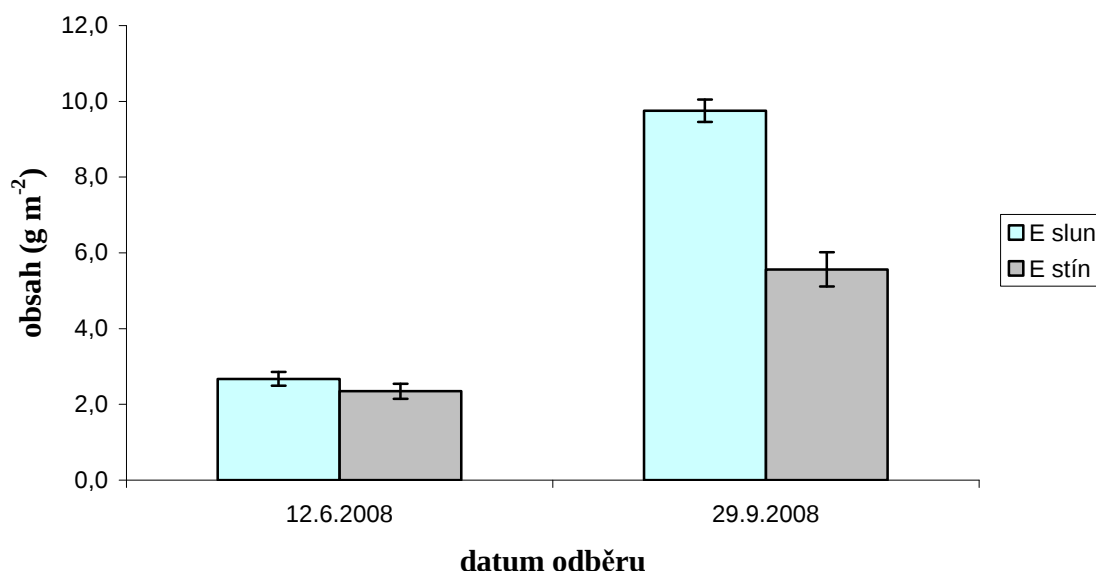
Obsah Rubisco ve stinných jehlicích E byl v září 2,4krát vyšší než v červnu, ve stinných jehlicích A byla v září naměřena téměř stejná hodnota jako v červnu.



Obr. 23: Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích A ($n = 10$).

12. 6 2008 byl obsah Rubisco ve slunných a stinných jehlicích v A téměř stejný. Zatímco 29. 9. 2008 byl obsah Rubisco ve slunných jehlicích A 6,8krát vyšší než ve stinných jehlicích A.

Obsah Rubisco ve slunných jehlicích A byl v září 6krát vyšší než v červnu, ve stinných jehlicích byl obsah v září téměř stejný jako v červnu.



Obr. 24: Srovnání obsahu enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích E ($n = 10$).

Ve vzorcích z 12. 6. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi E. 29. 9. 2008 byl obsah Rubisco ve slunných jehlicích E o 43 % vyšší než ve stinných jehlicích E.

Obsah Rubisco ve slunných jehlicích E byl v září 3,6krát vyšší než v červnu. Obsah Rubisco ve stinných jehlicích E byl v září 2,4krát vyšší než v červnu.

4.2. Diskuze

V červnu se naměřená počáteční aktivita pohybovala mezi 2,9 až 4,7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a celková aktivita od 3,1 do 5,7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. V září došlo ke zvýšení aktivity, kdy počáteční aktivita byla od 6,3 do 8,6 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a celková aktivita se pohybovala okolo 10 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Srovnání aktivit v červnu a v září je velmi problematické, neboť hodnota aktivity velmi závisí na okamžitých podmínkách při odběru.

V září tedy byla naměřena 2krát až 3krát vyšší aktivita slunných i stinných jehlic kultivovaných v A a E než v červnu.

V červnu se obsah enzymu Rubisco pohyboval okolo 2 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ ať se jedná o slunné nebo stinné jehlice kultivované v E a A atmosféře. V září se obsah Rubisco zvýšil nejvíce u A slunných jehlic na 14 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ a u E slunných na 9 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$. Obsah Rubisco v A stinných jehlicích se zvýšil nepatrně a v E stinných došlo ke zvýšení na 5,5 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$.

V září stejně jako u aktivity došlo ke zvýšení obsahu enzymu Rubisco oproti červnu. V září byla u slunných jehlic zjištěna výrazná redukce obsahu Rubisco v jehlicích E ve srovnání s jehlicemi A (aklimace), u stinných jehlic naopak byla naměřena výrazná stimulace obsahu Rubisco u jehlic E ve srovnání s jehlicemi A.

Myers et. al. [65] prezentoval aktivitu u borovice kadidlové (*Pinus teada* L.), kterou měřili v červenci a září. V červenci aktivita vykazuje hodnotu $14,03 \mu\text{mol s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a v září $17,35 \mu\text{mol s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Hrstka et al. [66] naměřili u smrku ztepilého hodnoty $1,0\text{--}3,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a Urban a Marek [67] uvedli aktivity měřené *in vivo* v rozmezí $4,0\text{--}7,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Aktivita Rubisco závisí na teplotě, rychlosti regenerace RuBP, intenzitě ozáření, koncentraci CO_2 , množství anorganického fosfátu a přítomnosti inhibitorů v aktivních místech [68]. Změny v celkové aktivitě během dne a noci mohou být důsledkem působení inhibitorů. Jedná se o inhibitor CA1P a řadu dalších jemu podobných inhibitorů. Noční inhibitor CA1P zodpovídá za nižší ranní a večerní hodnoty celkové aktivity Rubisco, protože se v noci nachází až na 90 % aktivních míst enzymu Rubisco. Inhibitor CA1P může být vytěsněn z aktivního místa pomocí SO_4^{2-} iontů nebo *in vivo* aktivasou Rubisco. Důležitá je také regulace aktivity Rubisco pomocí karbamylace. Karbamylace závisí na koncentraci CO_2 a Mg^{2+} , koncentraci RuBP, CA1P nebo na jiných fosforylovaných cukrech, které mohou blokovat aktivní místa aktivasy Rubisco [69].

Obsah enzymu Rubisco závisí především na přítomnosti určitého množství sacharidu (např. glukosy, sacharosy). Zvýšení množství těchto sacharidů vede k potlačení exprese genů Rubisco [68] a dochází ke snížení obsahu enzymu. Snížení obsahu Rubisco může být důsledkem neselektivního snížení dusíku v listech [70].

Literatura také uvádí, že obsah enzymu Rubisco je největší v době plného rozvinutí listů a v průběhu vegetační sezóny postupně klesá. Pak Rubisco postupně degraduje a dusík se přemísť do jiných částí rostoucí rostliny [70]. Naše měření tento závěr nepotvrzují, k nárůstu obsahu enzymu Rubisco došlo na podzim. Kalina [71] pozoroval u smrku hlavně na konci vegetační sezony aklimační depresi aktivity enzymu Rubisco, zatímco během jarního období byla pozorována stimulace fotosyntetické aktivity související s účinnějším sinkem. Tento závěr naše měření potvrzují hlavně u slunných jehlic pěstovaných za normální koncentrace CO_2 .

Z dalších výsledků experimentů vyplývá odlišná odezva slunného a stinného asimilačního aparátu smrku ztepilého na zvýšenou koncentraci CO_2 . Slunné jehlice vykazovaly v tomto případě mírnou aklimační depresi aktivity enzymu Rubisco, zatímco u stinných jehlic v nižších korunových patrech byla pozorována stimulace CO_2 a zvýšená kapacita fotosyntézy při saturační koncentraci CO_2 [71].

Jev, při kterém dochází k pokles rychlosti fotosyntézy, snížení obsahu nebo aktivity Rubisco či dalších enzymů Calvinova cyklu při dlouhodobé kultivaci rostlin v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 se nazývá aklimace. Obecně se předpokládá, že pokles rychlosti fotosyntézy při aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 je způsoben zpětnovazebným účinkem asimilátů akumulovaných v listu na expresi genů [4].

Marek et al. [9] prokázali u dvanáctiletých stromů smrku obecného (*Picea abies*) aklimaci projevující se poklesem maximální rychlosti fotosyntézy o 38 % a účinnosti karboxylace o 32 %. Hodně prací popisuje rozdílnou reakci jednotlivých druhů a rodů rostlin na zvýšenou

koncentraci CO₂. Poorter [72] shrnul literární údaje postihující celkem 156 druhů, u nichž při zvýšení koncentrace CO₂ činila průměrná stimulace růstu 37 %. Kulturní rostliny reagovaly na zvýšenou koncentraci CO₂ víc (58 %) než planě rostoucí (35 %).

Woodward a Kelly [73] shrnují výsledky 100 rostlinných druhů. Z toho počtu pěstovaných při zvýšené koncentraci CO₂ byla aklimace prokázána u 74 % druhů. Rozdílná odezva na působení zvýšené koncentrace CO₂ byla rovněž pozorována mezi různými druhy stromů. Například, některé topoly spíše profitovaly ze zvýšeného přísunu CO₂, naopak smrk ztepilý vykazoval spíše aklimační depresi fotosyntézy [71].

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovit aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve stinných a slunných jehlicích smrku ztepilého (*Picea abies*) a potvrdit či zamítnout aklimační depresi na úrovni enzymu Rubisco.

Odběry vzorku jehlic probíhaly na Experimentální pracovišti Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR na Bílém Kříži v Moravskoslezských Beskydech. Smrky byly kultivovány ve dvou lamelových sférách s normální koncentrací CO_2 ($350 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) a zvýšenou koncentrací CO_2 ($700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). V průběhu roku se provedly dva odběry jehlic smrku ztepilého a to dne 12. 6. 2008 (od 11:00 do 13:00 pro stanovení aktivity; od 13:00 do 14:05 pro stanovení obsahu) a 29. 9. 2008 (od 12:30 do 15:00 pro stanovení obsahu; od 12:00 do 14:21 pro stanovení aktivity).

U vzorků byla stanovena počáteční a celková aktivita a obsah enzymu Rubisco. Stanovení aktivity vycházelo z metody Lilleyho a Walkera [46] s extrakcí podle Besforda [60]. Počáteční aktivita byla stanovena podle Heringové [61]. Stanovení obsahu enzymu Rubisco vycházelo z metod Damervalové et al. [62] a Rogerse et. al. [63]. Metoda byla dále upravena Floriánem [64].

V září byly naměřeny vyšší hodnoty počáteční aktivity u slunných jehlic kultivovaných v normální koncentraci CO_2 než za zvýšené kultivace. U stinných jehlic byla prokázána vyšší celková i počáteční aktivita za normální koncentrace CO_2 než za zvýšené koncentrace CO_2 . Při podzimní kultivaci slunných i stinných jehlic byly hodnoty celkové i počáteční aktivity vyšší ze zvýšené koncentrace CO_2 . Ve vzorcích z 29. 9. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v aktivitě Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi. Ve vzorcích z 12. 6. 2008 byla zjištěna statisticky významně nižší aktivita Rubisco u stinných než u slunných jehlic.

Ve vzorcích z 12. 6. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi jehlicemi kultivovanými v normální a zvýšené koncentraci CO_2 . Ve vzorcích z 29. 9. 2008 byla u slunných jehlic zjištěna výrazná redukce obsahu Rubisco v jehlicích kultivovaných ve zvýšené koncentraci CO_2 ve srovnání s jehlicemi kultivovanými za normální koncentrace CO_2 (aklimace), u stinných jehlic byla naopak naměřena výrazná stimulace obsahu Rubisco u jehlic za zvýšené koncentrace CO_2 ve srovnání s jehlicemi, které byly pěstované v normální koncentraci CO_2 . Ve vzorcích z 12. 6. 2008 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v obsahu Rubisco mezi slunnými a stinnými jehlicemi. Ve vzorcích z podzimního odběru byl zjištěn významně vyšší obsah Rubisco u slunných jehlic. Z našich měření vyplývá, že u podzimních slunných jehlic rostoucích v A byla prokázána aklimační deprese obsahu Rubisco. V září byl obsah enzymu Rubisco vyšší než v červnu, což ukazuje na dlouhodobé budování asimilačního aparátu u jehličnatých stromů.

6 LITERATURA

1. Vodrážka, Z. *Biochemie*. Academia, Praha 2002.
2. Rosypal a kol. *Nový přehled biologie*. Scientia, spol s.r.o., pedagogické nakladatelství, 2003. 824 s. ISBN 80-7183-268-5.
3. Neil, A. C., Reece, J. B. *Biologie*. 6th edition. Computer Press a.s. 1302 s. ISBN 80-251-1178-4.
4. Nátr, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*. Praha: ISV nakladatelství, 2000. 257 s. ISBN 80-85866-62-5.
5. Rosypal a kol. *Přehled biologie*. Praha: Scientia, spol. s.r.o., 1994. 635 s. ISBN 80-85827-32-8.
6. Theobald, J. C., Mitchell, R. A. C., Parry, M. A. J., Lawlor, D. W. Estimating the excess investment in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves of spring wheat grown under elevated CO₂. *Plant Physiol.*, 1998, roč. 118, s. 945-955.
7. Kodíček, M. *Biochemické pojmy, výkladový slovník*. Praha: vydavatelství VŠCHT. 171 s. ISBN 80-85866-62-5.
8. Nobel, P. S., Hartsak, T. L. Short-term and long-term response of Crassulacean acid metabolism plants to elevated CO₂. *Plant Physiol.*, 1986, roč. 82, s. 604-606.
9. Marek, M. V., Kalina, J. Matoušková, M. Response of photosynthetic karbon assimilation of Norway spruce exposed to long-term elevation of CO₂ concentration. *Photosynthetica*, 1995, roč. 31, s. 209-220.
10. Urban, O., Marek, M. V. Seasonal changes of selected parametre of CO₂ fixation biochemistry of Norway spruce under long-term impact of elevated CO₂. *Photosynthetica* 1999, roč. 36, s. 533-545.
11. Kalina, J., Urban, O., Bukovská, R. Rubisco – jeden z mnoha enzymů. *Chemické listy* 100, 2006, s. 700-708.
12. Lorimer, G. H. The carboxylation and oxygenation of ribulose-1,5-bisphosphate: the primary event in photosynthesis and photorespiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1981, roč. 32, s. 349-383.
13. Keys, A. J. Rubisco: its role photorespiration. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1986, roč. 313, s. 325-336.

14. Walter, D. A., Leegood, R. C., Sivak, M. N. Ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase: its role in photosynthesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B*, 1986, roč. 313, s. 305-324.
15. Ellis, R. J., Van der Vies, S. M., Hemmingsen, S. M. The molecular chaperone concept. *Biochem. Soc. Symp.*, 1989, roč. 55, s. 145-153.
16. Somerville, C.R. Future prospects for genetic manipulation of Rubisco. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B*, 1986, roč. 313, s. 459-469.
17. Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L. Investigations on the structure and conformational dynamics in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) molecule. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 1995, 21(1), s. 90-99.
18. Hašlerová, L. *Rubisco*. [online]. [cit. 16. 2. 2009]. Dostupné na [www: http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf](http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf).
19. Taiz, L., Zeiger E. *Plant Physiology* [online], Four Edition, Publisher by Sinauer Associates, 2006, [cit. 8. 3. 2009]. Dostupné na [www: http://www.4e.plantphys.net/index.php](http://www.4e.plantphys.net/index.php).
20. Šantrůček, J. *Fotosyntéza II* [online]. [cit. 26. 3. 2009]. Dostupné na [www: http://www.kfr.prf.jcu.cz/download/lectures/KBE562/KBE562_05-2008](http://www.kfr.prf.jcu.cz/download/lectures/KBE562/KBE562_05-2008).
21. Gatenby, A. A. Synthesis and assembly of bacterial and higher plant rubisco subunit in *Escherichia coli*. *Photosynth. Res.*, 1988, roč. 17, s. 145-157.
22. Hemmingsen, S. M., Ellis, R. J. Purification and properties of ribulose bisphosphate carboxylase large subunit binding protein. *Plant Physiol.*, 1986, roč. 80, s. 269-276.
23. Roy, H., Canon, S. Ribulose bisphosphate carboxylase assembly: What is the role of the large subunit binding protein? *Trends. Biochem. Sci.*, 1988, roč. 13, s. 163-164.
24. Roy, H., Canon, M., Gilson, M. *Assembly of Rubisco from native subunits*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1988, roč. 957, s. 323-334.
25. Roy, H. A model system for studying the mechanism of chaperonin action. *The Plant Cell*, 1989, roč. 1, s. 1035-1042.
26. Roy, H. Assembly of in vitro synthesized large subunit into ribulose-bisphosphate carboxylase-oxygenase formation and discharge of an L-8-like species. *J. biol. Chem.*, 1993, roč. 268 (18), s. 13519-13525.
27. Drafte-Branden, S. J., Salvucci, M. E. The Rubisco komplex protein: A protein induced by fruit removal that forms a komplex with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta*, 1994, roč. 194, s. 110-116.

28. Baker, T. S., Suh, S. W., Eisenberg, D. Structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: Form II crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, roč. 74, s. 1037-1041.
29. Anderson, I., Branden, C. I. Large single crystal of spinach Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase suitable for X-ray studies. *J. Mol. Biol.*, 1984, roč. 172, s. 363-366.
30. Nakagawa, H., Sugimoto, M., Kai, Y., Farada, Sh., Miki, K., Kassai, N., Saeki, K., Kakuno, T., Horio, T. Preliminary crystallographic study of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Chromatium vinosum*. *J. Mol. Biol.*, 1986, roč. 191, s. 577-578.
31. Chapman, M. S., Suh, S. W., Cascio, D., Smoth, W. W., Eisenberg, D. S. Sliding-layer conformational change limited by the quaternary structure of plant Rubisco. *Nature*, 1987, roč. 329, s. 354-356.
32. Chapman, M. S., Suh, Curmi, P. M. G., Cascio, D., Smith, W. W., Eisenberg, D. S. Tertiary structure of plant Rubisco: Domains and their contacts. *Science*, 1988, roč. 241, s. 71-74.
33. Schneider, G., Knight, St., Anderson, I., Branden, C.-I., Lindqvist, Y., Lundquist, T. *Comparison of the crystal structure of L_2 and L_8S_8 Rubisco suggests a functional role for small subunit*. *EMBO J.*, 1990, roč. 9, s. 2045-2050.
34. Gloser, J. *Fyziologie rostlin*. Vydavatelství Masarykovy univerzity. 137 s. ISBN 80-210-1062-2.
35. Pierce, J., Reddy, G. S. The site for catalysis and activation of ribulosebisphosphate carboxylase share a common domain. *Arch. Biochem. Biophys*, 1986, roč. 245, s. 483-493.
36. Kokota, A., Higashioka, M., Tatra, T., Usuda, H., Radano, A., Murayma, H. Binding of ribulose-1,5-bisphosphate to the non-catalytic sites of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its metabolite implications. *Plant and Cell Physiology*, 1994, roč. 35 (2), s. 317-321.
37. Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebanák, J. a kol. *Fyziologie rostlin*. Praha 1998. Academia nakladatelství akademie věd ČR, 484 s., ISBN 80-200-0586-2.
38. Andralojc, P. J., Ryan, J. E., Parry, M. A. J., Keys, A. 2-carboxyarabinitol 1-phosphate (CA1P) formation through a phosphate exchange catalysed by the CA1P phosphatase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biochem. J.* (1996) 316, s. 389-393.
39. Andralojc, P. J., Ryan, J. E., Parry, M. A. J., Keys, A. Rubisco regulation: the purification and molecular analysis of CA1P-phosphatase. *Journal of Experimental Botany*, 47, s. 75-76, ISSN: 0022-0957.

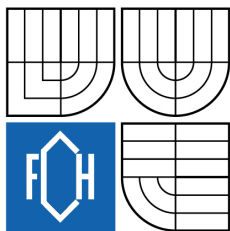
40. Lilley, R. McC., Portis, A. R. Activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) by Rubisco activase. *Plant Physiol*, 1990, roč. 94, s. 245-250.
41. Salvucci, M. E., Portis, A. R., Ogren, W. L. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in vivo. *Photosynth. Res.*, 1985, roč. 7, s. 193-201.
42. Portis, A. R., Salvucci, M. E., Ogren, W. L. Activation of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO₂ and ribulose bisphosphate concentrations by Rubisco aktivase. *Plant Physiol*, 1986, roč. 82, s. 967-971.
43. Portis, A. R. Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, roč. 1015, 15-28.
44. Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy gazometricky. [online]. [cit. 5. 4. 2009]. Dostupné na www: <http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/gazometrie.pdf>.
45. Reid, C. D., Tissue, D. T., Fiskus, E. L. Strain, B. R. Comparison of spectrofotometric and radioisotopic methods for the assay of Rubisco in ozone-treated plants. *Physiol. Plant.*, 1997, roč. 101, s. 398–404.
46. Lilley, R.M., Walker, D.A. An improved spectrophotometric assay for ribulose carboxylase. *Biochem Biophys. Acta*, 1997, roč. 358, s. 226–229.
47. Tissue, d. T., Thomas, R. B., Strain, B. R. Long-term effects of elevated CO₂ and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedling. *Plant, Cell and Environment*, 1993, roč. 16, s. 859-865.
48. Schrader, S. M., Salvucci, M. E., Portis, A. R. A spectrophotometric assay to measure Rubisco activase activation activity under varying ATP:ADP ratios. *American Society of Plant Biologists*.
49. Rogers, A., Ellsworth, D., Humpries, S. Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO₂. *Journal of Experimental Botany*, 2001, roč. 52, s. 1555–1561.
50. Zachová, L. Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na množství a aktivitu enzymu Rubisco. Diplomová práce VUT, Brno 2008.
51. Králová, Fukal, Rauch, Ruml *Bioanalytické metody*. Vydavatelství VŠCHT Praha. 254 s. ISBN 978-807080-449-3.
52. Klouda, P. Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
53. Vaňková, H. Peptidové mapy. *Chemické list* 93, 1999. s. 120-127.

54. Antonov, Y., Soshinsky, A. Interactions and compatibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from alfalfa with pectin in aqueous medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2000, roč. 27, s. 279–285.
55. Shen, L., Zheng-Yu, W., Masayuki, K., Tsunenori, N. The Dimerization of Folded Monomers of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, roč. 10, s. 7023–7026.
56. Enzymová analýza. [online]. [cit. 5. 4. 2009]. Dostupné na [www: http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html](http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html).
57. Vora, S. Monoclonal antibodies in enzyme research: Present and potential applications. *Anal. Biochem.*, 1985, roč.144, s. 307-318.
58. Kajikawa, H., Okada, M., Ishikawa, F., Okada, Y., Nakayma, K. Immunochemical studies on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplast of the marine alga *Bryopsis maxima*. *Plant Cell Physiol.*, 1988, roč. 29, s. 549-556.
59. Ústav systémové biologie a ekologie Akademie věd ČR. [online]. [cit. 18. 4. 2009]. Dostupné na [www: http://www.usbe.cas.cz/lefr/bily_kriz.htm](http://www.usbe.cas.cz/lefr/bily_kriz.htm).
60. Besford, R.T. Some properties of ribulose bisphosphate carboxylase extracted from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1984, roč. 35, č. 153, s. 495–504.
61. Heringerová, P. *Aktivita enzymu Rubisko u smrku ztepilého v průběhu dne*. Diplomová práce VUT, Brno 2004.
62. Damerval, C., Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H. Technical improvement in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis*, 1986, roč. 7, s. 52–54.
63. Rogers, A., Ellsworth, D. S., Humphries, S. W. Possible explanation of disparity between the in vitro an in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated CO₂. *Journal of Experimental Botany*, 2001, roč. 52, č. 360, s. 1551–1561.
64. Florián, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Diplomová práce VUT, Brno 2006.
65. Myers, D. A., Thomas, R. B., Deluca, E. H. Photosynthetic capacity of loblolly pine (*Pinus teada* L.) trees dutiny the first zdar of karbon dioxide enrichment in forest ecosystem. *Plant, Cell and Environment*, 1999, roč. 22, s. 476-481.
66. Hrstka, M., Urban, O., Marek, M. Long-term effect elevated CO₂ spatial differentiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in Norway spruce canopy. *Photosynthetica*, 2005, roč. 43, s. 211–216.

67. Urban, O., Marek, M. Seasonal changes of selected parameters of CO₂ fixation biochemistry of Norway spruce under the long-term impact of elevated CO₂. *Photosynthetica*, 1999, roč. 36, s. 533–545.
68. Hrstka, M., Urban, O., Petruš, E., Babák, L. Diurnal regulation of ribulose-1,5-bisphosphate/carboxylase activity and its content in Norway spruce needles. *Photosynthetica*, 2007, roč. 45 (3), s. 334–339.
69. Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Parmar, S., Keys, A. J., Habash, D., Paul, M. J., Alred, R., Quick, W. P., Servaites, J. C. Regulation of Rubisco by inhibitors in the night. *Plant, Cell and Environment*, 1997, roč. 20, s. 528–534.
70. Hrstka, M., Zachová, L., Urban, O., Košvancová, M. Seasonal changes of Rubisco activity and its content in Norway spruce exposed to ambient and elevated CO₂ concentration. *Chemické listy*, 2008, roč. 102, s. 265–1309.
71. Kalina, J. *Studium vlivu zvýšené koncentrace CO₂: metodické příspěvky ke studiu fotosyntézy*. Habilitační práce. Ostravská univerzita v Ostravě, 2005.
72. Poorter, H. Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio*, 1993, roč. 104/105, s. 77–97.
73. Woodward, F. I., Kelly, C. K. The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytol.*, 1995, roč. 131, s. 311–327.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATECH A SYMBOLŮ

ADP	adenosindifosfát
NADP	nikotinamidadenindinukloetidfosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
3-PGA	fosfoglycerát
PEPc	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
RuBP	ribulosa–1,5–bisfosfát
CA1P	2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát
CABP	2-karboxy-D-arabinitol–1,5–bifosfát
IgG	imunoglobulin G
DNA	kyselina deoxyribonukleová
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Essay
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylovém gelu za použití SDS
SDS	dodecylsulfát sodný



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0253/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lenka Šibravová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce:		

Název diplomové práce:

Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích smrku ztepilého

Zadání diplomové práce:

1. Srovnat aktivitu a obsah enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích smrku ztepilého v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého.
2. Potvrdit či zamítnout existenci aklimační deprese na úrovni enzymu Rubisco ve slunných a stinných jehlicích, popř. popsat její průběh.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Lenka Šibravová
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty