

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha, 2013

Bc. Jana Horská

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



ANATOMICKÁ ANALÝZA MEZOFYLU STINNÉHO A SLUNNÉHO LISTU

BUKU LESNÍHO POD VLIVEM ZVÝŠENÉ KONCENTRACE CO₂

Anatomical study of shade and sun European beech leaf
under elevated CO₂

Bc. Jana Horská

ŠKOLITEL: Mgr. Zuzana Lhotáková Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15. 8. 2013

Jana Horská

Poděkování:

Můj dík patří především školitelce Zuzce Lhotákové, za její vstřícnost a trpělivost; konzultantkám prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. a RNDr. Lucii Kubínové, CSc. za cenné připomínky, kterých se mi z jejich stran při vytváření této práce dostalo. Dále děkuji kolegům ze spoluřešitelských pracovišť, z Centra výzkumu globální změny AV ČR za umožnění práce na experimentálním stanovišti na Bílém Kříži a z Fyziologického ústavu AV ČR v Krči. Práce byla finančně podpořena z projektu GAČR P501/10/0340.

Děkuji také svým rodičům, za to, že mě provázeli svou modlitbou.

V Praze dne 15. 8. 2013

Jana Horská

ABSTRAKT

Práce se zabývá vyhodnocením vlivu koncentrace CO₂ a ozáření na vybrané anatomické parametry listu buku lesního, *Fagus sylvatica* L. Proces fotosyntézy je zásadně ovlivňován řadou vnějších faktorů, mezi nimi atmosférickou koncentrací CO₂ a ozářeností a úzce souvisí s anatomickými parametry listu. Jedním z těchto důležitých anatomických parametrů ovlivňujících rychlost asimilace je vnitřní povrch listu, který představuje plochu mezofylu, na které dochází k výměně plynů.

Experimentální materiál využitý v této práci byly listy z juvenilních stromů buku lesního zasazených v r. 2005 a rostoucích v aktuální koncentraci CO₂ (390ppm, AC) a ve zvýšené koncentraci CO₂ (700 ppm, EC) na experimentálním stanovišti Bílý Kříž v Beskydech Centra výzkumu globální změny AV ČR. Vyhodnoceny byly anatomické parametry slunných a stinných listů z obou ošetření CO₂ odebrané ve dvou sezónách s odstupem tří let (2009 a 2012). Ke stanovení anatomických parametrů listu byly využity stereologické metody, které poskytují nevychýlený odhad měřených parametrů, především metoda fakír pro stanovení vnitřního povrchu listu.

Na listech odebraných v roce 2009 byl účinek EC zaznamenán pouze ve snížení zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu. V roce 2012 způsobila EC u listů navýšení mocnosti palisádového parenchymu a trend navýšení mocnosti listu a zvýšení vnitřního povrchu listu. Vliv ozáření na anatomické parametry listu byl

výraznější než vliv CO₂. Listy se významněji lišily v závislosti na podmínkách osvitů v parametrech mocnosti listu, mocnosti mezofylu a jednotlivých parenchymů a ve vnitřním povrchu mezofylu. Měřené parametry vždy dosahovaly vyšších hodnot u slunných listů bez ohledu na koncentraci CO₂. Parametr hustoty vnitřního povrchu listu dosahoval výraznější změny mezi slunnými a stinnými listy v podmínkách AC oproti EC. Obsah fotosyntetických pigmentů v listech klesal se zvýšenou koncentrací CO₂ i se zvýšenou ozářeností. Data získaná porovnáním parametrů v jednotlivých letech nepotvrdila uniformitu odpovědi na dlouhodobě zvýšenou koncentraci CO₂.

Získané výsledky byly diskutovány s literárními údaji, které uvádí hodnoty vnitřního povrchu mezofylu stanovené pomocí metod založených na modelech. Stereologická metoda fakír byla v předkládané práci poprvé s úspěchem použita na bifaciální list. Význam práce je v originalitě použitého kvantitativního přístupu s použitím stereologických metod. Stereologická metoda fakír byla shledána jako univerzálně využitelná pro odhad vnitřního povrchu mezofylu z nejrůznějšího listového materiálu, s ohledem na jeho konkrétní strukturální vlastnosti.

KLÍČOVÁ SLOVA:

bifaciální list, *Fagus sylvatica* L., fotosyntéza, fotosyntetické pigmenty, metoda Fakir, ozářenost, slunný a stinný list, stereologické metody, vnitřní povrch listu, zvýšená koncentrace CO₂.

ABSTRACT

The present Master thesis focuses on evaluation of CO₂ concentration and irradiance on selected leaf anatomical parameters of European Beech (Common Beech) *Fagus sylvatica* L.. The process of photosynthesis is remarkably determined by numerous external factors, among them by atmospheric CO₂ concentration and irradiance and is closely correlated with leaf anatomical parameters. One of these most important anatomical parameters affecting the net assimilation rate is an internal leaf surface, which corresponds to mesophyll area available for gas exchange.

Experimental material of the study was sampled from the leaves of juvenile trees of *F. sylvatica* planted in 2005 and growing under ambient (390 ppm, AC) and elevated (700 ppm, EC) CO₂ concentrations on the experimental site of the Global Change Research Center AS CR at Bílý Kříž in the Beskydy Mountains. Sun and shade leaves were sampled from trees of both CO₂ treatments in two seasons 3 years apart (2009 and 2012). To determine leaf anatomical parameters, the stereological methods were applied, which yield unbiased estimation of measured parameters, particularly the Fakir method for internal leaf surface determination.

The EC effect was observed on the leaves sampled in 2009 only in the decrease of proportion of intercellular spaces in mesophyll. In 2012, the EC treated leaves exhibited higher thickness of palisade parenchyma and a trend of higher leaf thickness and an increase in internal leaf surface. The effect of irradiance was more pronounced comparing to the effect of CO₂ concentration. Leaves exhibited different parameters in dependence on irradiance: leaf thickness,

thickness of mesophyll and both parenchymas and internal leaf surface. The measured parameters reached higher values for sun leaves irrespective of CO₂ concentration. The parameter of density of internal leaf surface reached more significant changes between sun and shade leaves under conditions of AC comparing to EC treatment. The content of photosynthetic pigments in leaves decreased in leaves growing under elevated CO₂ concentration and higher irradiance. Data obtained in both years did not prove uniformity of tree response to long-term elevated CO₂ concentration treatment.

Obtained results were discussed with literature, which report the values of internal leaf surface determined using model-based methods. The stereological method of Fakir was the first time applied for the bifacial leaf in the present study. Importance of contribution of the present thesis lays in originality of the methodical approach used with the application of stereological methods. The stereological Fakir method was found to be applicable universally for estimation of the internal leaf surface from the various leaf material with regard to its particular anatomical structure.

KEY WORDS:

bifacial leaf, *Fagus sylvatica* L., photosynthesis, photosynthetic pigments, Fakir method, irradiance, sun and shade leaf, stereological methods, internal leaf surface, elevated CO₂ concentration

Obsah dokumentu

Úvod	12
1.1 Cíle práce, hypotézy	14
Kapitola 2 Literární přehled	15
2.1 Koncentrace CO ₂	15
2.1.1 Závislost rychlosti asimilace na koncentraci CO ₂	16
2.1.2 Asimilace dřevin při zvýšené koncentraci CO ₂	17
2.1.3 Fyziologické a metabolické změny vyvolané zvýšenou koncentrací CO ₂	21
2.1.4 Anatomické změny vyvolané zvýšenou koncentrací CO ₂	23
2.2 Ozáření	23
2.2.1 Závislost rychlosti asimilace na ozáření	23
2.2.2 Diferenciace slunných a stinných listů	25
2.2.3 Anatomická stavba slunného a stinného listu	27
2.3 Vybrané anatomické parametry	32
2.3.1 Závislost rychlosti asimilace na anatomických parametrech mezofylu	33
Kapitola 3 Metodika	37
3.1 Experimentální porost	37
3.2 Konfokální mikroskopie	39
3.2.1 Měření vybraných anatomických parametrů	40
3.2.2 Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů	46
3.3 Použité statistické metody	47
Kapitola 4 Výsledky	49
4.1 Výsledky pro rok 2009	49
4.2 Výsledky pro rok 2012	53
4.3 Porovnání výsledků roku 2009 a 2012	64

Kapitola 5 Diskuze	66
5.1 Aplikace stereologické metody fakír na bifaciální list buku lesního	66
5.2 Vliv koncentrace CO ₂	70
5.3 Vliv ozáření	73
Kapitola 6 Závěr	79
Zdroje a použitá literatura	83
Příloha.....	92

Seznam použitých zkratek

<i>A₄₈₀</i>	absorbance při vlnové délce 480nm
<i>A</i>	rychlost asimilace CO ₂ (μmol m ⁻² s ⁻¹)
<i>AC</i>	aktuální koncentrace CO ₂
<i>A_{max}</i>	světelně satureovaná rychlost asimilace CO ₂ (μmol m ⁻² s ⁻¹)
<i>DMF</i>	dimethylamid kyseliny mravenčí
<i>EC</i>	zvýšená koncentrace CO ₂
<i>FAR</i>	fotosynteticky aktivní radiace
<i>Chl_a</i>	chlorofyl <i>a</i>
<i>Chl_b</i>	chlorofyl <i>b</i>
<i>Car</i>	karotenoidy a xantofyly
<i>IAS</i>	(intercellular air space), zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu listu (%)
<i>ISD</i>	(internal surface density) hustota vnitřního povrchu mezofylu
<i>RuBP</i>	ribulóza-1,5-bisfosfát
<i>S</i>	plocha listu (cm ²)
<i>S_c</i>	plocha chloroplastů vystavená mezibuněčným prostorám
<i>SLA</i>	(specific leaf area), specifická plocha listu (m ² .kg ⁻¹)

S_{mes}	vnitřní povrch mezofylu
S_{mes}/S	vnitřní povrch listu ($m\ m^{-2}$) (vnitřní povrch mezofylu vztažený na jednu plochu listu)
t_{leaf}	mocnost listu
t_{mes}	mocnost mezofylu
t_{PM}	mocnost palisádového parenchymu
TPU	triózafosfáty
t_{SM}	mocnost houbovitého parenchymu
V_{leaf}	objem listu [μm^3],
V_m	objem mezofylu [μm^3]

Úvod

V posledních desetiletích jsme svědky zvyšování atmosferické koncentrace CO₂. Současná koncentrace CO₂ 398,58 ppm, pro červen roku 2013¹, je přibližně o 100 ppm vyšší než před sto lety. Nabízí se otázka, jakým způsobem na tuto změnu reagují rostliny, pro které je CO₂ substrátem ve fotosyntéze. Z praktických důvodů se mnoho studií zabývalo především bylinnými zástupci rostlin, s novými technickými možnostmi je stále více pozornosti věnováno reakcím dřevin.

Víme, že proces fotosyntézy ovlivňuje koncentraci CO₂ na globální úrovni a především fotosyntetická aktivita lesů severní polokoule zapříčiňuje roční dynamiku globální atmosferické koncentrace CO₂. Dřeviny hrají významnou klimatizační roli v krajině a zásadním způsobem utváří životní prostředí. Lesy představují úložiště pro uhlík, na rozdíl od zemědělsky obdělávané půdy, která je intenzivně využívána a z globálního hlediska je spíše zdrojem uhlíku. Ukazuje se však, že ukládání uhlíku v lesních porostech je značně limitováno obsahem dusíku v půdě a také zvyšující se koncentrací ozonu v ovzduší. Kromě toho jsou dřeviny významnou surovinou pro lidskou společnost a představují často využívaný obnovitelný zdroj. To vše jsou důvody, proč je důležité zajímat se o reakci dřevin na změnu klimatických podmínek.

Reakce rostlin na zvýšenou koncentraci atmosferického CO₂ je obecně pozorována jako navýšení rychlosti asimilace CO₂ velmi často následované aklimační depresí fotosyntézy. Se zvýšenou koncentrací CO₂ se navyšuje obsah nestrukturních sacharidů v rostlinných pletivech, dochází k nárůstu celkové biomasy a změnám v některých anatomických parametrech listů, které jsou s fotosyntézou úzce

¹ www.co2now.org

spojeny. Růst dřevin ve zvýšené koncentraci CO₂ je doprovázen zvýšením celkové mocnosti listů, mocnosti mezofylu a velikosti mezofylových buněk, zvyšuje se také plocha vnitřního povrchu listu. Hodnocení anatomických parametrů je v současnosti prováděno metodami kvantitativní anatomie, které jsou mnohdy založeny na modelu, tedy aproximaci rostlinných buněk a pletiv geometrickými tělesy. V této práci byly použity stereologické metody kvantitativní anatomie, které jsou založeny na designu testovacího systému, kterým se daný parametr odhaduje. Jejich výhoda spočívá především v nezávislosti na tvaru měřených objektů, což umožňuje získat nevychýlený odhad anatomických parametrů.

Na území České republiky se od roku 2000 dlouhodobě zvyšuje podíl listnatých dřevin, zejména dubu a buku. Buk v současnosti tvoří 7,5% z celkové plochy porostní půdy². Nárůst atmosferické koncentrace CO₂ může znamenat ohrožení schopnosti kompetice buku v rámci lesního porostu. Semenáčky ale i dospělí jedinci buku lesního mohou být ohroženy změnami, které nárůst CO₂ doprovází, a to dlouhodobější zamokření nebo zaplavení, intenzivní sucha, objevující se během růstové sezóny (Gessler et al., 2007) a také mrazové periody, vyskytující se na obou koncích prodlouženého vegetačního období.

Tato práce byla vypracována v rámci projektu GAČR P501/10/0340 Vliv zvýšené koncentrace CO₂ a ozářenosti na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu dřevin na různých hierarchických úrovních. Cílem této práce je kvantifikovat parametry mezofylu buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) ve vztahu k podmínkám koncentrace CO₂ a ozářenosti. Práce navazuje na výsledky kolegů řešitelského týmu, kteří se v rámci výše zmíněného projektu věnují dalším oblastem tohoto tématu.

2 www.eagri.cz

1.1 Cíle práce, hypotézy

Cílem práce je

1. aplikovat stereologickou metodu fakír na bifaciálním listu buku lesního pro stanovení vnitřního povrchu mezofylu a dosažené výsledky porovnat s literárními údaji.
2. Vyhodnotit vliv zvýšené koncentrace CO_2 na vybrané anatomické parametry mezofylu slunného a stinného listu.
3. Porovnat vybrané anatomické parametry slunných a stinných listů rostoucích při zvýšené a aktuální atmosferické koncentraci CO_2 .

Stanovené hypotézy:

1. První cíl je metodického charakteru, předpokladem pro jeho splnění je univerzalita stereologické metody fakír. Hypotéza nebyla stanovena.
2. Zvýšená koncentrace CO_2 povede ke změnám vybraných anatomických parametrů listu buku lesního:
 - zvýšení mocnosti listu,
 - zvýšení mocnosti palisádového parenchymu,
 - zvýšení vnitřního povrchu listu, S_{mes}/S .
3. Rozdíl vybraných anatomických parametrů mezi slunnými a stinnými listy bude méně výrazný při zvýšené koncentraci CO_2 .

Kapitola 2 Literární přehled

Fotosyntéza je proces, kterým rostliny získávají energii ze světelného záření k zabudování CO_2 do vlastních molekul a k následnému vytváření sacharidů a dalších zásobních nebo strukturních látek. Získání energie ze světelného záření je závislé na přítomnosti pigmentů v thylakoidálních membránách chloroplastů. Pigmenty, především chlorofyly a karotenoidy, absorbují záření v oblasti viditelného spektra (400–700nm). Proces fotosyntézy je ovlivněn jednak vnějšími parametry: atmosferickou koncentrací CO_2 , ozářeností, teplotou, jednak vnitřními parametry: vodivostí průduchů, množstvím enzymu Rubisco a dalších fotosyntetických komponent v listech a také anatomickými parametry listu (Terashima et al., 2006). Zde bude věnována pozornost především prvním dvěma jmenovaným, tedy atmosferické koncentraci CO_2 a ozářenosti.

Fotosyntéza je v rostlinném těle lokalizovaná především v buňkách mezofylu listu a její rychlost je úzce spojena s anatomickými parametry tohoto pletiva. Změna anatomických parametrů mezofylu může míru asimilace významně ovlivnit. Pro stanovení změn parametrů anatomických struktur je vhodné použití stereologických metod. Stereologické metody poskytují nevychýlený odhad a jsou nezávislé na tvaru měřeného objektu (Weibel 1979, Kubínová a Janáček 2001).

2.1 Koncentrace CO_2

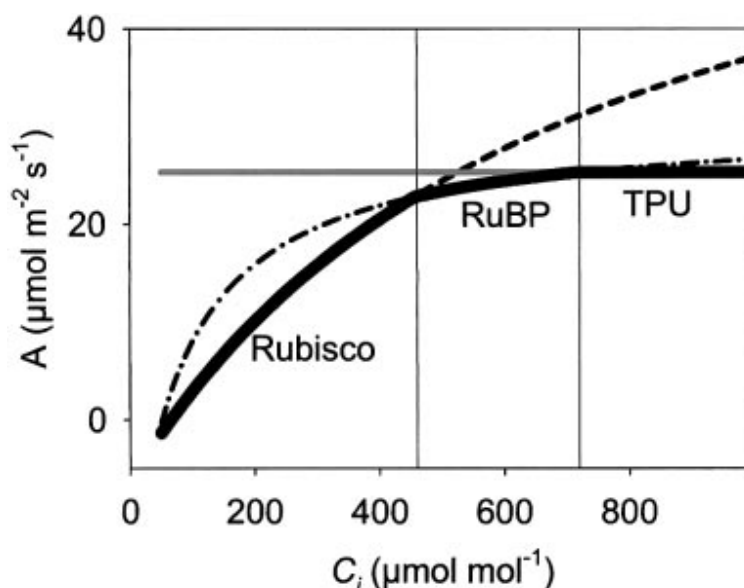
Následující kapitola bude věnována nejprve vlivu koncentrace CO_2 na rychlost asimilace a změny, které zvýšená koncentrace v procesu fotosyntézy vyvolává. Parametry listu a listového mezofylu s mírou

asimilace v listech úzce souvisí, další pozornost proto bude zaměřena na mezofyl listu, který představuje podstatnou většinu veškerých fotosyntetických pletiv v rostlině a obecně se předpokládá, že změny v parametrech tohoto rostlinného pletiva mohou vést a často vedou ke změnám v rychlosti fotosyntézy.

2.1.1 Závislost rychlosti asimilace na koncentraci CO₂

Rychlost asimilace A , je vyjádřena jako počet molekul CO₂ asimilovaných za časový úsek vztažený na jednotkový povrch listu. Je udávána jako $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Světlem saturevanou hodnotu rychlosti asimilace označujeme symbolem A_{max} , míra asimilace saturevaná světlem i množstvím CO₂ je označována jako A_{sat} . Při konstantní saturační ozáření můžeme pozorovat změnu rychlosti asimilace s rostoucí koncentrací CO₂ v mezibuněčných prostorech listů. Tato závislost je vyjádřena CO₂ – křivkou, Obr. 2.1. Při nízkých koncentracích CO₂, je asimilace limitována obsahem aktivního enzymu Rubisco v listech. Nad saturační koncentrací CO₂; současná koncentrace blíží se 400 ppm stále nepředstavuje pro rostliny saturační (Korner, 2003); je fotosyntéza limitována rychlostí regenerace substrátu, ribulose-1,5 – bisfosfátu, prvotního příjemce CO₂ v Calvinově cyklu C₃ rostlin. Při dalším navýšení koncentrace CO₂ v mezibuněčných prostorech je rychlost asimilace limitována spotřebou triózaofosfátů (Long et al., 2003). Pokud je intenzita dopadajícího záření nižší než 250 $\mu\text{mol}(\text{fotonů})/\text{m}^2/\text{s}$ vliv zvýšené koncentrace CO₂ se neprojeví, množství dopadajícího světla je v takovém případě hlavním limitujícím faktorem. Při zvýšené koncentraci CO₂ (EC) je podpořena asimilace zvýšenou koncentrací CO₂ v mezibuněčných prostorech a dochází ke snížení vodivosti průduchů (Ainsworth, Rogers, 2007), což může zvýšit efekt využití slunečních skvrn, které se v listové koruně stromů objevují (Way,

Pearcy, 2012). Se sníženou vodivostí průduchů je také spojeno účinnější využití vody rostlinami (Niinemets et al., 2011).



Obr. 2.1: Křivka závislosti rychlosti asimilace CO_2 , A , na koncentraci oxidu uhličitého v mezibuněčných prostorech, C_i , při saturační ozáření pro C_3 rostliny. Svislé čáry rozdělují graf na fáze limitace fotosyntézy, nejprve limitace množstvím aktivního enzymu Rubisco v listech, poté rychlostí regenerace ribulózy-1,5-bisfosfátu (RuBP), následně spotřebou triózaofosfátů (TPU). Čerchovaná, přerušovaná a šedá křivka představují limitace jednotlivými faktory. Zdroj: Long et al., 2003, upraveno.

2.1.2 Asimilace dřevin při zvýšené koncentraci CO_2

Krátkodobé navýšení koncentrace CO_2 asimilační rychlost v listech zpravidla zvyšuje. Experimenty, ve kterých byly rostliny vystaveny krátkodobě EC, vykazovaly navýšení asimilační aktivity, např.: půlroční experiment se semenáčky *Fagus crenata* pěstovanými v 550 a 750 ppm (Hirano et al, 2012). Při dlouhodobějším vystavení rostlin EC se můžeme setkat se dvěma typy odpovědi. Buď nadále dochází ke stimulaci fotosyntézy, jak např. uvádí Wang et al. (2000), kteří v dvouletém experimentu s topoly popisují navýšení rychlosti asimilace CO_2 u všech experimentálních jedinců. Výsledky studie autorů Zott et al. (2005) potvrzují také tento trend. Během tříletého

experimentu s dospělými opadavými stromy *Fagus sylvatica* (L.), *Quercus petraea* (Matt.), *Carpinus betulus* (L.), *Tilia platyphyllos* (Scop.), *Acer campestre* (L.), and *Prunus avium* (L.), vystavenými koncentraci CO₂ 530 ppm, se asimilační aktivita udržela zvýšená oproti jedincům rostoucím v AC. Dlouhodobou stimulaci fotosyntézy uvádí také Cseke et al (2009), během osmiletého experimentu se dvěma klony topolů *Populus tremuloides* (Michx.) při EC 560 ppm. Skutečnost nepřetržité stimulace asimilační aktivity je možné vysvětlit hypotézou aktivního sinku, pravděpodobně podzemního (Smith et al., 2013), který přijímá vytvořené asimiláty, tím rostlina může předcházet akumulaci produktů fotosyntézy v listech a zabraňovat vzniku aklimační deprese fotosyntézy (Zotz et al., 2005; Smith et al., 2013). Ainsworth, Rogers (2007) k tomu dodávají, že pokud tok asimilátů z chloroplastů přesáhne kapacitu sinku pro jejich další přesun a využití, dochází k signalizaci této nerovnováhy do mezofylových buněk. Tato signální dráha pravděpodobně zahrnuje hexokinázu, fungující jako čidlo toku asimilátů. Odpověď na zvýšené množství sacharidů se u jednotlivých druhů liší, pravděpodobně u všech cílí na malou podjednotku Rubisca přes transkripční a translační kontrolní mechanismy nebo zabraňuje vytvoření holoenzymu, čímž je snižováno množství aktivního Rubisca.

Druhý způsob odpovědi na EC je snížení fotosyntetické aktivity v listech. V podmínkách dlouhodobě zvýšené koncentrace CO₂ dochází k poklesu rychlosti fotosyntézy v porovnání s rychlostí asimilace jedinců pěstovaných v aktuální koncentraci CO₂. Mluvíme o takzvané aklimační depresi fotosyntézy. U dlouhodobě pěstovaných buků ve zvýšené koncentraci 570 ppm CO₂ došlo během třetí sezóny ke snížení rychlosti asimilace ve srovnání s kontrolními buky rostoucími v aktuální koncentraci CO₂ (Egli et al., 2001). Podobně také Marek et al. (2002) popisují ve třetí experimentální růstové sezóně mladých jedinců smrku rostoucích v EC pokles světlem a CO₂

saturované asimilační aktivity oproti jedincům z aktuální koncentrace CO₂ (AC), výraznější projev aklimační deprese byl zaznamenán u slunných jehlic. Pokles fotosyntetické aktivity dokumentují výsledky tříletého experimentu s jedinci *F. sylvatica*, vystavenými koncentrací 700 ppm (Košovancová et al., 2009), a také půlročního pokusu s jedinci druhu *Larix kaempferi* (Carr.) pěstovaného při EC 720ppm (Eguchi et al., 2004). Aklimační depresi *Fagus sylvatica* a *Picea abies* v podmínkách EC, 700 ppm potvrzují Hrstka et al. (2012). Pozorovány byly také sezónní změny míry aklimační deprese. Zatímco fotosyntetická aktivita buku lesního se se stářím listu snižovala, smrk ztepilý vykazoval vyšší potlačení fotosyntetické aktivity v červenci než v srpnu tedy na začátku růstové sezóny (Egli et al. 1998). Toto pravděpodobně souvisí se sezónní změnou obsahu Rubica v listech (Hrstka et al., 2012). Aklimační deprese je způsobena jednak sníženou expresí genů kódujících komponenty nutné k fotosyntéze (van Oosten et al., 1994), jednak zvýšením poměru C:N v listech (Nakano et al., 1997), což je obojí zapříčiněno vyšší koncentrací asimilátů v listech. Poslední z příčin vyvolávající aklimační depresi je snížená aktivita uhlíkového sinku, který přijímá vytvořené asimiláty (Pérez et al., 2005).

Míru aklimační deprese mohou umocnit půdní podmínky, např. obsah dusíku v půdě a jeho dostupnost. Při dostatečném přísunu dusíku z půdy, aklimační deprese fotosyntézy nenastala (Stitt, Krapp, 1999). Obdobnou situaci dokumentuje i Eguchi et al. (2004) u modřínu: zatímco v experimentálních podmínkách EC a dobře dostupného množství dusíku A_{max} vzrostla, v opačných podmínkách, tedy při EC a nízké dostupnosti dusíku, byla redukce fotosyntetické aktivity buku pozorována pouze ojediněle (Egli et al., 1998). Buk při zvýšené koncentraci CO₂ výrazněji snižuje asimilační aktivitu na kyselých substrátech oproti substrátům zásaditým (Egli et al., 1998).

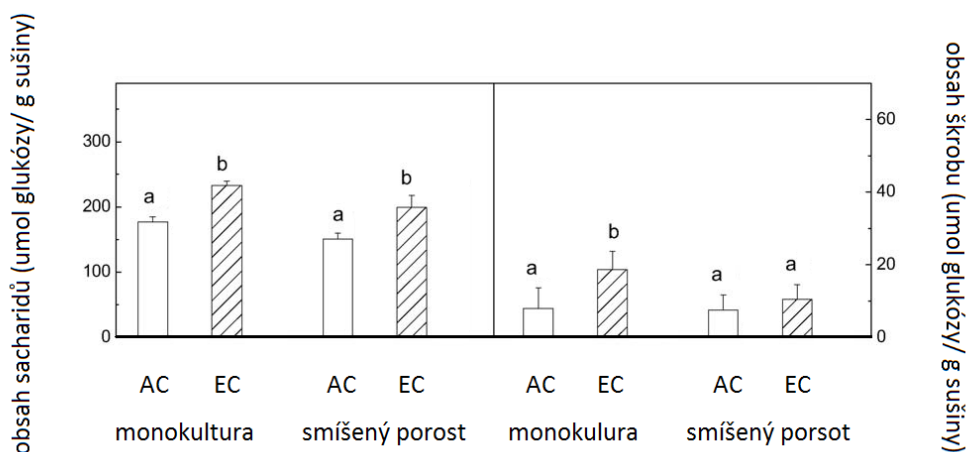
EC zvyšuje asimilační aktivitu různých skupin rostlin odlišnou měrou. Studie, která porovnává výsledky jiných prací a zkoumá odpověď asimilační aktivity na zvýšenou koncentraci CO₂ v rámci funkčních ekologických skupin rostlin (plodiny a traviny C3 a C4 typu, křoviny, stromy a další). Nejvyšší nárůst A_{sat} zaznamenali v ekologické skupině stromů (Ainsworth, Rogers, 2007). Přestože se u dřevin v podmínkách EC aklimační deprese vyskytuje, množství asimilovaného uhlíku je o 19 až 46% vyšší (pro EC odpovídající úrovni odhadované pro polovinu 21. století) ve srovnání s jedinci v aktuální koncentraci CO₂ (Leakey et al., 2009). Aklimační deprese fotosyntézy tedy zcela neeliminuje zesílenou odpověď asimilace na EC .

Významnou roli v reakci na EC hraje také genetická odlišnost jedinců. Pokusy prováděné se dvěma klony *Populus tremuloides* prokázaly závislost reakce rychlosti fotosyntézy v podmínkách EC na genotypu (Wang et al, 2000). Zkoumané klony druhu *Populus tremuloides* při zvýšené koncentraci CO₂ shodně zvyšovaly asimilační aktivitu. Způsob hospodaření studovaných klonů s produkty fotosyntézy byl odlišný. Zatímco první klon využíval asimiláty k růstu, druhý klon využíval získanou energii k tvorbě sekundárních metabolitů, k tloušťnutí buněčné stěny (Cseke et al., 2009). Klony disponovaly odlišnými aktivními sinky, úložišti, do kterých mohly ukládat přebytečné asimiláty a pravděpodobně se tím ubránily aklimační depresi fotosyntézy. Rozdíl míry transkripční aktivity v listech byl velmi malý navzdory pozorované statisticky významné odlišnosti nakládání s asimiláty. Oba klony aktivovaly odlišné metabolické dráhy v reakci na EC. Různá, často zcela opačná aktivita metabolických drah u sledovaných klonů byla pozorována už v kontrolních podmínkách. Za příčinu využití různých aktivních sinků tak byla označena spíše sezónní, vývojová a genotypová variabilita než působení EC (Cseke et al., 2009). Genetickou odlišnost jako část celkové odlišnosti odpovědí

rostlin na vnější podmínky uvádí jako obzvlášť vysokou především u lesních stromů Zigenhagen, Kausch, (1995).

2.1.3 Fyziologické a metabolické změny vyvolané zvýšenou koncentrací CO₂

Změny v procesu fotosyntézy způsobené dlouhodobě zvýšenou koncentrací CO₂ jsou doprovázeny zvýšením poměru C : N v biomase rostlin. Změny tohoto poměru jsou způsobeny také navýšením obsahu nestrukturních sacharidů v těle rostliny. Zvýšený obsah nestrukturních sacharidů je považován za obecnou odpověď dřevin na EC (Saxe et al., 1998). Výsledky pětíměsíčního experimentu se semenáčky *Fagus sylvatica* L. popisují navýšení nestrukturních sacharidů v listech, přičemž množství sacharidů bylo odlišné také v závislosti tom, zda pokusné rostliny tvořily monokulturu nebo rostly ve smíšeném porostu, Obr. 2.2 (Liu, et al., 2005). Zvýšené množství nestrukturních sacharidů v listech uvádí také Moore et al. (1998); Leakey et al., (2002); Zotz et al (2005). Zvyšování obsahu



Obr. 2.2: Obsah nestrukturních sacharidů v listu buku při aktuální, AC, (prázdný sloupec) a zvýšené, EC, (šrafovaný sloupec) koncentraci CO₂, porovnání jedinců pěstovaných v monokultuře a ve smíšeném porostu. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, odlišná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl, když $p < 0,05$. Zdroj: Liu et al., 2005, upraveno.

nestrukturních sacharidů během jedné růstové sezóny v listech a později také ve dřevě větví dospělců listnatých stromů popisuje ve své studii také Korner (2003).

Protože velká část dusíku v listech rostlin je obsažena v enzymu Rubisco a fotosyntetických pigmentech, je třeba zmínit také způsob chování těchto látek při růstu v EC v souvislosti se změnou poměru C:N v listech rostlin. S nárůstem obsahu sacharidů v pletivech dochází ke snížení exprese genů pro transkripci Rubisca a dalších enzymů potřebných k fotosyntéze (Pérez et al., 2005). V podmínkách EC se snížila maximální asimilační aktivita enzymu Rubisco v listech *Shorea leprosula* (Leakey et al., 2002). *Picea abies* a *Fagus sylvatica* v EC snížily obsah Rubisca vztažený na plochu listu, ale množství Rubisca v aktivní formě u nich bylo vyšší (Košovancová et al., 2009). Z toho je patrné, že aktivita Rubisca a jeho obsah v listu jsou dvě nezávislé veličiny.

Podmínky EC vyvolaly snížení obsahu Rubisca (vztaženého na plochu listu), ale koncentrace dusíku a chlorofylů na plochu listu se neměnila. Došlo ovšem ke snížení obsahu dusíku a chlorofylů vztažených na hmotnost listu. Menší obsah dusíku a chlorofylů na hmotnostní jednotku listu nepřímo poukazuje na pozorovanou zvýšenou koncentraci nestrukturních sacharidů (Leakey et al., 2002). Bylo zaznamenáno, že obsah Rubisca v listu má také sezónní průběh. obsah Rubisca v listu *F. sylvatica* se během růstové sezóny snižoval. To podporuje hypotézu, která pokládá za jednu z příčin aklimační deprese intenzitu aktivního sinku: velikost sinku bývá na konci vegetační sezóny nižší oproti jarnímu období (Hrstka et al., 2012).

2.1.4 Anatomické změny vyvolané zvýšenou koncentrací CO₂

Odlišný obsah asimilátů v listech může vést ke změnám parametrů anatomických struktur listu, popřípadě dalších částí rostlinného těla, např. kmene (Cseke et al., 2009, Hirano et al., 2012). Dlouhodobé vystavení zvýšené koncentraci CO₂ vedlo k navýšení celkové mocnosti listu (Saxe et al., 1998; Eguchi, et al., 2004, Myiazawa et al., 2011, Xu et al., 2012, Hirano et al., 2012), zvětšení listové plochy (Hirano et al., 2012) nárůstu mocnosti mezofylu a velikosti mezofylových buněk (Xu et al., 2012). Zotz et al. (2005) popisuje mírný ale statisticky nevýznamný nárůst mocnosti listu dospělých dřevin vystavených 3 roky EC. V experimentu Wanga et al. (2000) je popsána reakce *Populus tremuloides* (Michx.) na EC (700 ppm) jako celkový nárůst biomasy, který doprovázel navýšení *A*. Nejednotnost reakcí dřevin na EC dokumentuje studie Zotz et al. (2005), kde se s (*SLA*) a celková mocnost listů pěstovaných v AC a EC (530 ppm) statisticky významně nelišila. Tento tříletý experiment byl prováděn s dospělými listnatými stromy. Významná redukce *SLA* při EC byla pozorována u semenáčků *Shorea leprosula* (Leakey et al., 2009).

2.2 Ozáření

Vliv intenzity dopadajícího záření na rychlost asimilace a parametry mezofylu bude pojednán v následující části. Jelikož se práce zajímá také o reakci slunných a stinných listů na zvýšenou koncentraci CO₂, budou některé odstavce věnovány interakci těchto faktorů.

2.2.1 Závislost rychlosti asimilace na ozáření

Množství dopadajícího záření má zásadní vliv na rychlost fotosyntézy. V podmínkách konstantní koncentrace CO₂, ve kterých je měněna pouze hodnota fotosynteticky aktivní radiace (FAR), dochází

se zvyšující se FAR ke zrychlení asimilace (Brooks et al., 1994, Holíšová et al., 2012). S nízkou intenzitou dopadajícího záření, nižší než $250 \mu\text{mol (fotonů)}/\text{m}^2/\text{s}$ (Marek a kol., 2011), dochází k limitaci fotosyntézy množstvím dopadajícího světla. Hodnoty ozáření, $500 - 1000 \mu\text{mol (fotonů)}/\text{m}^2/\text{s}$ představují tzv. saturační intenzitu FAR C3 rostlin, konkrétně pro *Fagus crenata* jsou uváděny hodnoty saturační ozáření $300-400 \mu\text{mol (fotonů)}/\text{m}^2/\text{s}$ (Koike and Maruyama, 1998); více než $500 \mu\text{mol (fotonů)}/\text{m}^2/\text{s}$ (Uemura et al., 2000). Nad hodnotou saturační intenzity FAR zůstává rychlost asimilace přibližně konstantní až do doby, kdy při vysokých intenzitách FAR začne docházet k fotoinhibici a poklesu asimilační rychlosti (Marek a kol., 2011).

Využití dopadajícího světla mezi jednotlivými ekotypy rostlin je různě efektivní. Je obecně přijímáno, že světlomilné druhy dosahují při saturační ozáření vyšších hodnot A_{max} než stínomilné (Kozłowski, Pallardi, 1997). Přesto se vyskytují práce, které tento předpoklad nepotvrzují. Výsledky studie Hanba et al. (2002) popisují reakci světlomilného druhu *Acer rufrinerve*, který během ročního pokusu v podmínkách vysokého osvitu dosahoval podobných hodnot A_{max} jako druh stínomilný nebo druh z hlediska požadavků na osvit neutrální. Ovšem pokud byly srovnávány absolutní hodnoty A_{max} jednotlivých druhů v podmínkách stinných a slunných, všechny tři druhy javorů měly A_{max} vyšší v podmínkách vysoké ozáření (Hanba et al., 2002). Rozdílná A_{max} je pozorována také v rámci jedné rostliny. Slunné listy dosahují vyšší A_{max} , oproti stinným (Brooks et al., 1994; Urban et al., 2007). Stejný projev listových ekotypů zaznamenali Urban et al., (2007). Slunné listy měly významně vyšší maximální rychlost karboxylace enzymem Rubisco oproti stinným listům. A_{max} slunných listů byla navíc doprovázena zvýšenou vodivostí průduchů. Výrazně vyšších hodnot vodivosti dosahovaly průduchy slunných listů také v časovém úseku před přímým osvětlením (Urban et al., 2007).

Rychlost asimilace slunných a stinných listů v podmínkách zvýšené koncentrace CO_2 je závislá na mnoha dalších faktorech, jako je obsah dusíku a Rubisca v listech a také na dostupnosti vody. Slunné listy dosahovaly vyšších hodnot asimilace v podmínkách EC pouze při dostatečném zásobení dusíkem, v období sucha k navýšení asimilace nedošlo. Oproti tomu stinné listy v době sucha v podmínkách EC dosahovaly významně vyšších hodnot aktivity fotosyntézy než v AC (Wang et al., 2000).

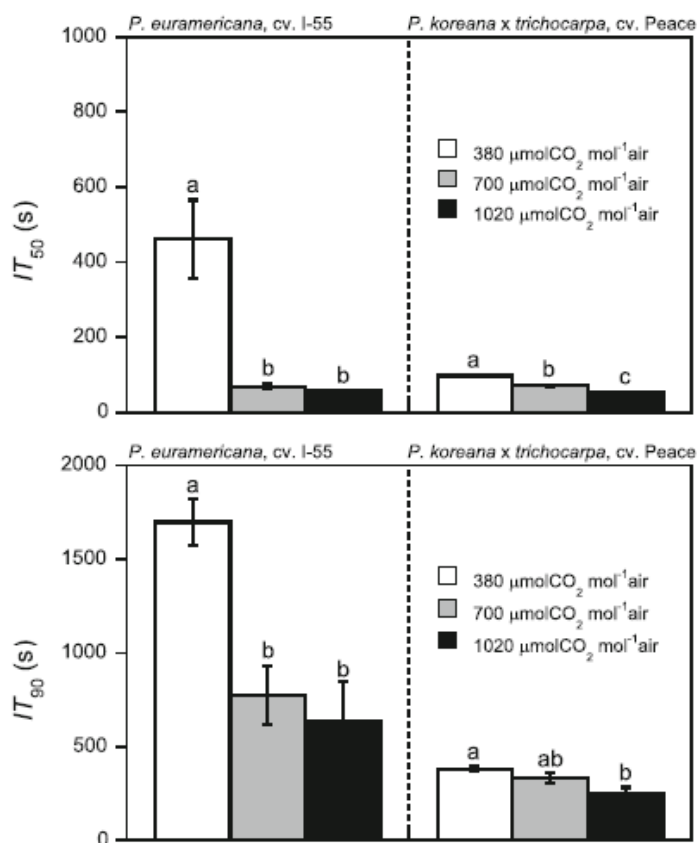
2.2.2 Diferenciace slunných a stinných listů

Prostorové uspořádání rostlinného porostu nebo koruny dřevin ovlivňuje pronikání světla k listům. Na základě odlišné ozáření se vytváří struktury přizpůsobené dané intenzitě dopadajícího světla, rozlišujeme stinné a slunné listy

Za přirozených podmínek se množství dopadajícího světla liší napříč porostem a většina listů v korunách stromů, je vystavena proměnlivé intenzitě dopadajícího záření (Urban et al. 2007). Předpokládá se, že rychlost nástupu fotosyntézy v těchto podmínkách může mít zásadní vliv na celkové množství asimilovaného uhlíku v dynamicky osvětlených listech (Urban et al., 2007). Některé studie dokumentují rychlejší nástup fotosyntézy ve stinných listech (Küppers, Schneider, 1993, Urban et al., 2008). Jiné práce popsaly opačné tendence (Tausz et al. 2005).

Rychlost nárůstu fotosyntézy může být umocněna podmínkami zvýšené koncentrace CO_2 . Vyšší koncentrace CO_2 v mezibuněčných prostorech napomáhá v podmínkách měnícího se ozáření rychlejšímu nástupu fotosyntézy a dochází k rychlejší fotoaktivaci Rubisca (Košovcová et al., 2009). Větší zisk biomasy byl pozorován v podmínkách EC (oproti AC) jak při kontinuální ozáření, tak

při dynamickém světelném režimu. Nejvyššího zisku biomasy rostlina dosahovala při kontinuálním osvětlení, ale relativní zisk byl vyšší při režimu krátkých světelných intervalů (Leakey et al., 2002). Fotosyntéza slunných listů buku lesního rostoucího v EC vykazovala rychlejší nárůst asimilace během počáteční fáze (prvních 60s) iniciace fotosyntézy při přechodu ze tmy do saturované ozáření oproti jedincům rostoucím v podmínkách AC. V pozdější fázi iniciace nebyl mezi variantami ošetření CO_2 pozorován významný rozdíl (Kořvancová et al., 2009).



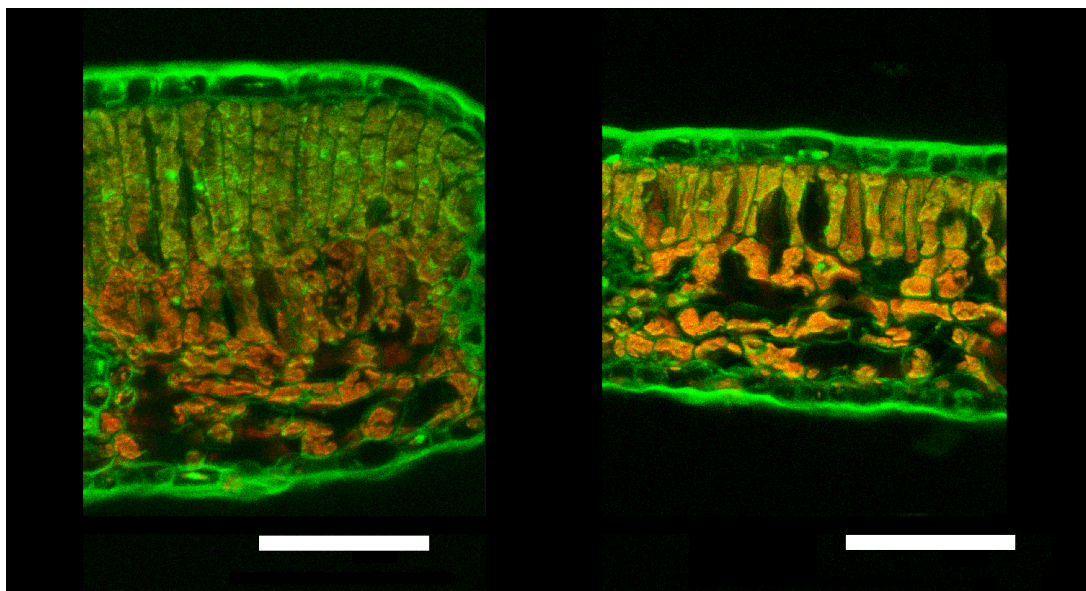
Obr. 2.3: Závislost rychlosti dosažení 50% (IT_{50}) a 90% (IT_{90}) rovnovážného stavu fotosyntézy na ošetření CO_2 genotypů *Populus euramericana* cv. I-55 a *Populus koreana x trichocarpa* cv. Peace. Zdroj Tomimatsu et al., 2012, upraveno.

Dva genotypy *Populus euramericana* cv. I-55 a *Populus koreana* x *trichocarpa* cv. Peace měly v podmínkách EC vyšší hodnoty indukčního stavu fotosyntézy a kratší indukční čas (čas během kterého rychlost fotosyntézy dosáhne maximální hodnoty). Přesto I-55 vykazoval v EC vyšších hodnot indukčního stavu fotosyntézy a kratšího indukčního času oproti genotypu cv. Peace, Obr. 2.3, takže asimiloval více CO₂. Během indukční periody měl genotyp cv. Peace 5 – krát vyšší vodivost průduchů než I-55, nezávisle na ošetření CO₂. To naznačuje, že počáteční odpověď na indukci fotosyntézy může být způsobena regenerací RUBP a/nebo obnovou metabolitů Calvinova cyklu, ale není způsobena vodivostí průduchů (Tomimatsu et al., 2012). Stimulace fotosyntézy v podmínkách EC a změny se ozáření vedla ke zvýšení množství asimilovaného uhlíku *F. Sylvatica* a *P. Abies*. oproti jedincům v AC (Holišová et al., 2012). Popsána byla také zvýšená míra fixace CO₂ v podmínkách EC po skončení krátké světelné periody (Leakey et al., 2002). Jestliže tedy zvýšená koncentrace CO₂ vede k rychlejšímu nástupu fotosyntézy, pak je možné očekávat jisté zvýhodnění jedinců rostoucích v nižších patrech lesa, např. semenáčků dřevin (Nienemets et al, 2007).

2.2.3 Anatomická stavba slunného a stinného listu

Struktura listů je vytvářena v závislosti na podmínkách ozáření. Anatomicky rozlišujeme slunné a stinné listy. Obecně můžeme v listech pozorovat jednu až tři vrstvy palisádového parenchymu, stinné listy mívají pouze jednu vrstvu. Listy rostoucí v podmínkách s vysokou ozářeností mají buňky palisádového parenchymu vyšší (Slaton, Smith, 2002), Obr. 2.4. Celková mocnost slunných listů dosahuje vyšších hodnot než listů rostoucích ve stinných podmínkách (Ziegenhagen, Kausch, 1995),

Počet vrstev palisádového parenchymu, může být určen světelnými podmínkami předchozího roku. Například *Fagus crenata* Blume vytváří dvě vrstvy palisádového parenchymu na místě, kde v předešlém roce byly podmínky vysoké ozáření. Jiný druh, *Fagus japonica* Maxim. ovšem na změnu světelných podmínek změnou počtu vrstev palisádového parenchymu nereaguje, vytváří vždy jen jednu vrstvu palisádového parenchymu. Oba druhy dokáží reagovat na změnu ozáření změnou délky jednotlivých buněk palisádového parenchymu (Uemura et al., 2000). Dochází-li ke zvyšování mocnosti palisádového parenchymu je to způsobeno jak periklinálním dělením buněk, tak prodlužováním buněk palisádového parenchymu (Terashima et al., 2006).



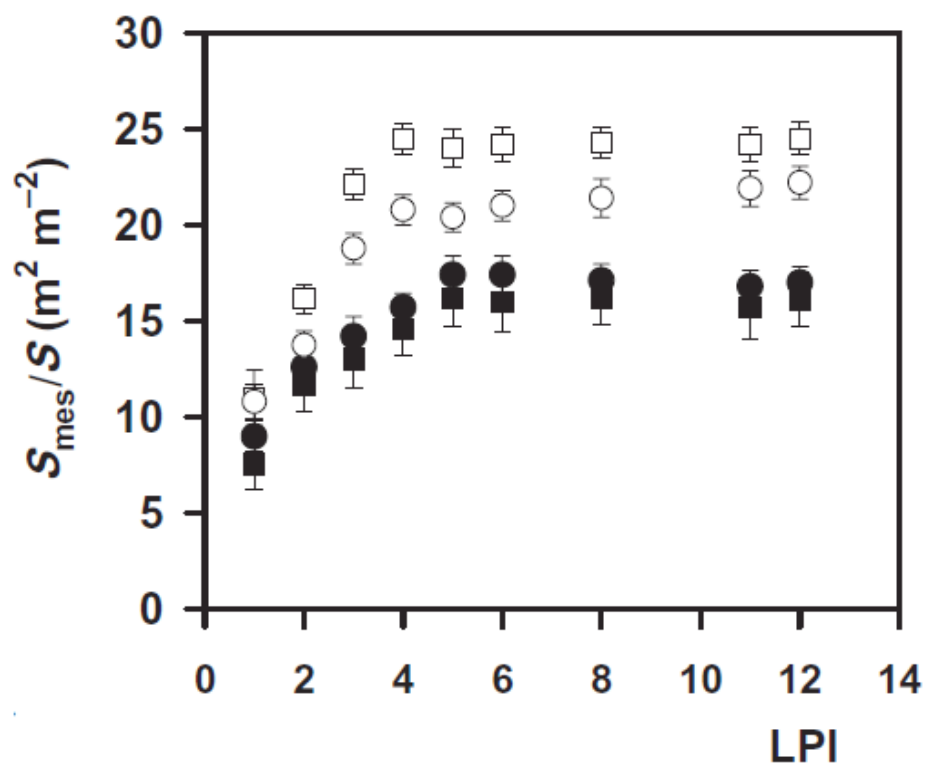
Obr. 2.4: Příčný řez slunného (vlevo) a stinného (vpravo) listu *Fagus sylvatica* (L.) vidíme, shora, vrstvu epidermálních buněk, palisádový parenchym, dlouhé protáhlé válcovité buňky, které jsou v těsném sousedství. Houbovitý parenchym tvoří buňky spíše kulovitěho tvaru s poměrně velkými mezibuněčnými prostory. Na houbovitý parenchym navazuje spodní vrstva epidermálních buněk. Úsečka označuje 50 μ m. Zdroj: Autor

Dřeviny mají různou kapacitu pro využití světla (Hanba et al., 2002) a světelné podmínky různě ovlivňují obsah asimilátů v listech a jejich anatomické parametry. Semenáčky *Quercus robur* L. hromadily velké množství škrobu v kořenech a vykazovaly vyšší produktivitu nadzemní části v zastíněných podmínkách (25% plné ozáření) oproti plné ozáření (Ziegenhagen, Kausch, 1995). To může poukazovat na zvýhodněné růstové podmínky semenáčků ve spodních patrech porostu při dynamických světelných podmínkách (Niinemets et al., 2007) a v odlišnosti využití přímého a difuzního záření rostlinami.

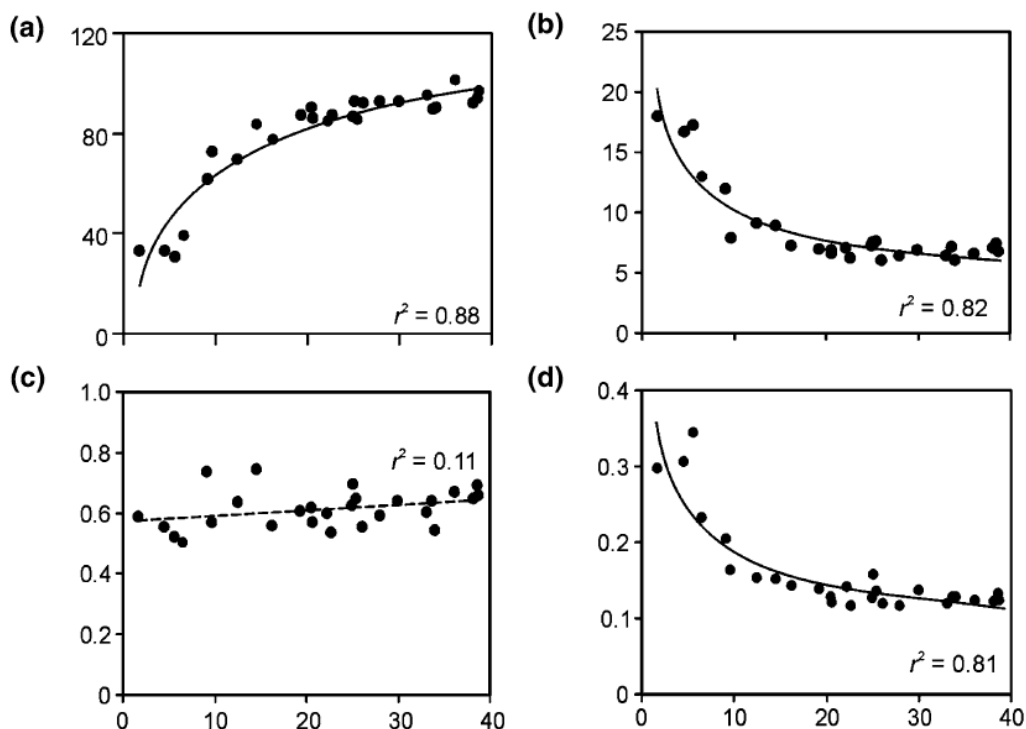
Následkem zastínění měly listy dubů nižší mocnost a zároveň docházelo k rozšíření buněk palisádového parenchymu. Mladé duby ve stinných podmínkách prodlužovaly internodia a zvětšovaly listovou plochu. Tyto reakce směřovaly k zachycení většího množství fotosynteticky aktivní radiace. Ačkoliv počet listů zastíněných jedinců byl menší, listy měly větší velikost (Ziegenhagen, Kausch, 1995). Je nutno poznamenat, že dub je druh, který hromadí škrob v semenáčcích v extrémním množství, navíc duby v 25% zastínění měly vysokou kapacitu kořenů pro ukládání asimilátů (Ziegenhagen, Kausch, 1995). Naopak snížený obsah sacharidů při zastíněných podmínkách doprovázený menším počtem mezofylových buněk o větší velikosti byl zaznamenán v listech jasmínu (Deng et al., 2012). Změnu parametrů mezofylu listu s různou intenzitou osvětlení popisuje Hanba et al. (2002): tři druhy javorů pěstované celou dobu experimentu při třech úrovních osvitu (plný osvit, 17% plného osvit a 7% plného osvit) reagovaly na podmínky plného osvitu odlišně. Zatímco světlomilný *Acer rufinerve* zvýšil mocnost mezofylu a hodnoty S_{mes} , a S_c , stínomilný, *Acer palmatum*, a z hlediska osvětlení neutrální, *Acer mono*, na vysoké osvětlení změnou anatomických parametrů listu významně nereagovaly (Hanba et al., 2002). Se zvýšenou ozářeností byl zaznamenán nárůst mocnosti listu

semenáčků buku lesního (Aranda et al., 2001) a mocnosti listů *B. ermanii*, *F. crenata* a *A. rufinerve* (Oguchi et al., 2005). Stejně tak docházelo při vyšší ozáření ke zvětšení listové plochy již zmíněných tří druhů javorů (Hanba et al., 2002). Struktura listu je ovlivněna jak intenzitou světla, tak dostupností vody. Roční experiment s *Populus tremula* L., poukazuje na rozhodující vliv světelných podmínek při tvorbě listových struktur oproti dostupnosti vody. V podmínkách vysoké ozáření nezávisle na dostupnosti vody byly v listech přítomny dvě vrstvy palisádového parenchymu, listy byly silnější, měly vyšší S_{mes}/S , Obr. 2.5 a obsahovaly méně mezibuněčných prostor než listy ze stinných podmínek (Tosens et al., 2012,a).

V závislosti na intenzitě ozáření se mění také množství pigmentů v listech. Udává se v různých jednotkách v zásadě dvojím způsobem, buď jako hmotnost pigmentů vztažená na sušinu listu, nebo jako hmotnost pigmentů na jednotkovou plochu listu. Jednotlivá vyjádření vykazují odlišné chování v závislosti na ozáření. Hmotnost pigmentů vztažená na hmotnost listu se výrazně měnila s typem listoví, pro slunné listy dosahovala nižších hodnot, než pro stinné (Uemura et al., 2000). To lze vysvětlit tím, že slunné listy mívají zpravidla vyšší mocnost (Ziegenhagen et Kausch, 1995) a celkovou vyšší hmotnost sušiny na jednotku plochy listu než listy stinné (Niinemets et al., 2010). V případě vyjádření koncentrace pigmentů na listovou plochu s vyšším množstvím ozáření je změna výrazně menší (Hanba et al., 2002). Množství hmotnosti sušiny na list a obsahu jednotlivých pigmentů v listech v závislosti na průměrné denní ozáření ilustrují grafy na Obr. 2.6.



Obr. 2.5: Změny vnitřního povrchu listu, S_{mes}/S , *Populus tremula* v závislosti na stáří listu, LPI (leaf plastochron index) udává biologické stáří listu, pro dospělý list je $LPI \geq 5$. Prázdné čtverce: vysoká ozáření, dobrá dostupnost vody, plné čtverce: vysoká ozáření, nedostatek vody, prázdný kruh: nízká ozáření, dobrá dostupnost vody, plný kruh: nízká ozáření, nedostatek vody. Zdroj Tosens et al., 2012, a.



Průměrné sezónní množství dopadajícího světla ($\text{mol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$)

Obr. 2.6: Vliv průměrného sezónního množství dopadajícího světla na (a) množství sušiny na plochu listu (g.m^{-2}), (b) množství chlorofylu na sušinu listu ($\mu\text{mol.g}^{-1}$), (c) množství chlorofylu na plochu listu (mmol.m^{-2}) a (d) podíl dusíku zabudovaného do světlosběrných struktur (%) pro opadavý druh *Tilia cordata*. Zdroj: Niinemets et al., (2010), upraveno.

2.3 Vybrané anatomické parametry

Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, rostliny reagují na změny vnějších podmínek, CO_2 a ozáření, přizpůsobením parametrů anatomických struktur. Anatomické parametry listů mají zásadní vliv na rychlost asimilace. Vnitřní povrch listu představuje plochu na které dochází k difuzi CO_2 do mezofylových buněk a následně chloroplastů. Koncentrace CO_2 v mezibuněčných prostorech a velikost povrchu na

kterém CO₂ difunduje tak zásadním způsobem určuje rychlost fotosyntézy (Terashima et al., 2011; Niinemets et al., 2011). Parametry měřené v této práci byly vybrány s ohledem na jejich těsný vztah k rychlosti asimilace.

2.3.1 Závislost rychlosti asimilace na anatomických parametrech mezofylu

S rychlostí asimilace úzce souvisí anatomický parametr mezofylu: plocha chloroplastů vystavená mezibuněčným prostorám, S_c . Výrazné navýšení A_{max} a také plochy chloroplastů vystavené mezibuněčným prostorám, S_c , pozorovali Oguchi et al., (2003) při přechodu ze stinných do plně osvětlených podmínek. Stejně se chovaly druhy *Betula ermanii* Cham. a *Acer Rufinerve* Sieb. Et Zucc. (Oguchi, et al., 2005). A_{max} ve vztahu k S_c a obsahu Rubisca v listech dvou druhů *A. rufinerve* a *A. mono* vykazovala pozitivní lineární závislost při různých intenzitách osvětlení (Hanba et al., 2002). Listy *B. ermanii* rostoucí při nízké ozáření byly poměrně tlusté a měly stěny mezofylových buněk bez chloroplastů a jiných organel. Při přesunu do podmínek s plným osvitem došlo ke zvýšení A_{max} , aniž by se změnila mocnost mezofylu. *A. rufinerve* při stejné změně podmínek vykazoval jak zvýšení A_{max} , tak navýšení mocnosti mezofylu. *Fagus crenata* Blume na vyšší ozáření tímto způsobem reagovat nedokázal (Oguchi et al., 2005). Mocnost listu určuje maximální hodnoty A_{max} v situacích, kdy dochází ke změně podmínek stinných na podmínky plného osvitu. Stinné listy zvyšovaly A_{max} jen tehdy, pokud disponovaly volným prostorem pro vystavení chloroplastů mezibuněčným prostorám (Oguchi et al., 2005), tedy tehdy, pokud dokázaly zvýšit hodnotu S_c . Udržení schopnosti přizpůsobení se osvitu u dospělých listů nemusí být výhodné. Vyšší mocnost listu může napomáhat k udržení vyššího vnitřního povrchu listu, který zároveň představuje prostor k vystavení chloroplastů. Mít

silné listy ale znamená vytvářet velké množství biomasy, což může být pro stinné listy energeticky náročná záležitost (Oguchi et al., 2005). Tuto hypotézu nepodporují Slaton, Smith (2002), kteří uvádí jen slabý vzájemný vztah mezi mocností listu a vnitřním povrchem listu S_{mes}/S , mnohem těsnější vztah popsali pro S_{mes}/S a zastoupení mezibuněčných prostor v listu.

V literatuře je používána nejednotná symbolika některých anatomických parametrů. Mocnost jednotlivých pletiv listu je shodně označována symbolem t s příslušným indexem, udávána v μm (Tosens et al., 2012,b). Plocha listu je nejčastěji vyjádřena pomocí symbolu S , případně A (Eguchi et al., 2004, Slaton, Smith, 2002), v cm^2 . SLA [$\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$] (specific leaf area), specifická plocha listu, je stanovená jako listová plocha vztažená na hmotnost listu (Leakey, 2002; Eguchi et al., 2004; Košovcová, 2009), případně SLM , (specific leaf mass), specifická listová hmotnost, která je vyjádřena opačným způsobem, a sice [$\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$] (Aranda et al., 2001). Zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu je označováno symbolem IAS (intercellular air space), [%] (Slaton, Smith, 2002), hustota vnitřního povrchu mezofylu je označována symbolem ISD (internal surface density), vyjádřená v jednotkách [$\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$] (Lhotáková et al., 2012), práce Slaton a Smith (2002) zmiňuje také hustotu pletiva (počet buněk na objem pletiva) a pórovitost mezofylu, která je vyjádřená jako objemový podíl mezibuněčných prostor a celkového objemu mezofylu (Hanba et al., 1999).

Dalšími anatomickými parametry, které ovlivňují rychlost asimilace přímo a nebo nepřímo přes vodivost mezofylu pro CO_2 , je S_{mes} , povrch mezofylu vystavený mezibuněčným prostorům vztažený na jednotku plochy listu (Myiazawa, Terashima, 2001; Hanba et al., 2002; Oguchi et al., 2005; Terashima et al., 2011), případně S_{mes}/S (Tosens et al., 2012,a) v některých pracích vyjádřený jako A_{mes}/A , (Eguchi et al.,

2004, Slaton, Smith, 2002), popřípadě S_m (Syvertsen et al., 1995) v jednotkách $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-2}$, S_c/S povrch chloroplastů vystavený mezibuněčným prostorům na jednotku plochy listu (Tosens et al., 2012,a). Další geometrický parametr mezofylu V_{mes} , objem mezofylu na jednotku povrchu listu, významně koreloval s maximální karboxylační aktivitou Rubisco a kapacitou elektronového transportu (Niinemets et al., 2007, Miyazawa et al., 2011).

V této práci byly stanoveny následující parametry listů, v závorkách jsou uvedeny příslušné jednotky: celková mocnost listu, t_{leaf} , mocnost palisádového parenchymu, t_{pm} , mocnost houbového parenchymu, t_{sm} celková mocnost mezofylu, t_{mes} , (vše $[\mu\text{m}]$), zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu listu IAS [%] a hustota vnitřního povrchu mezofylu ISD $[\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}]$. Z naměřených hodnot bylo dále dopočítáno: celkový objem listu, V_{leaf} , $[\mu\text{m}^3]$, objem mezofylu, V_m , $[\mu\text{m}^3]$ a vnitřní povrch listu S_{mes}/S $[\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-2}]$. Vnitřní povrch listu bude dále v této práci označován symbolem S_{mes}/S a je stanoven jako podíl povrchu mezofylu vystaveného mezibuněčným prostorům, vztaženého na jednotkovou plochu listu. S_{mes}/S představuje plochu, na které dochází k výměně plynů. Jeho vliv na rychlost asimilace rostlin je zřejmý a proto mu byla v této práci věnována pozornost. Způsob výpočtu parametrů je podrobně popsán v kap. 3.2.1.

Vyhodnocení anatomických parametrů může být prováděno v zásadě dvojím způsobem. Prvním z nich je vytvoření modelu, který přirovnává mezofylové buňky geometrickým tělesům (Nobel, 2005) nebo použití různých korekčních faktorů v závislosti na tvaru buněk (Thain, 1983; Evans et al., 1994). Z šikmých paradermálních řezů jsou stanoveny parametry listu, jako je výška, průměr a tvar buněk. Buňky jsou rozděleny do několika kategorií a je vyjádřeno jejich zastoupení v rostlinném pletivu (Slaton, Smith, 2002). Tyto modely vnášejí do kvantitativního odhadu geometrických parametrů mezofylu

chyby, plynoucí z jedinečného tvaru každé buňky. Druhým způsobem odhadu geometrických parametrů mezofylu, který byl použit v této práci, jsou stereologické metody. Stereologické metody pracují s trojrozměrnými testovacími systémy a jsou zcela nezávislé na tvaru pozorovaných struktur. Odhad geometrických parametrů mezofylu, který poskytují je nevychýlený (Weibel 1979, Kubínová a Janáček 2001).

Kapitola 3 Metodika

3.1 Experimentální porost

Buk lesní patří v současné době mezi nejrozšířenější listnaté stromy na území ČR, tvoří 7,5% z celkové porostné plochy³. Proto je mu věnována pozornost a vyvíjena snaha postihnout jeho šance obstát v prostředí předpokládaných klimatických změn.

Veškerý listový materiál, analyzovaný v této práci byl odebrán na experimentálním ekologickém stanovišti ekologické fyziologie rostlin Centra výzkumu globální změny AV ČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech (49° 30' s. š., 18° 32' v. d., 908 m.n.m.).

Stromy byly pěstovány ve dvou sférách (rozměry 9x9x6m), Obr. 3.1.



Obr. 3.1: Centrum výzkumu a globální změny AV ČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech, pohled na skleněné sféry. Zdroj: <http://www.czechglobe.cz/>

3 www.eagri.cz

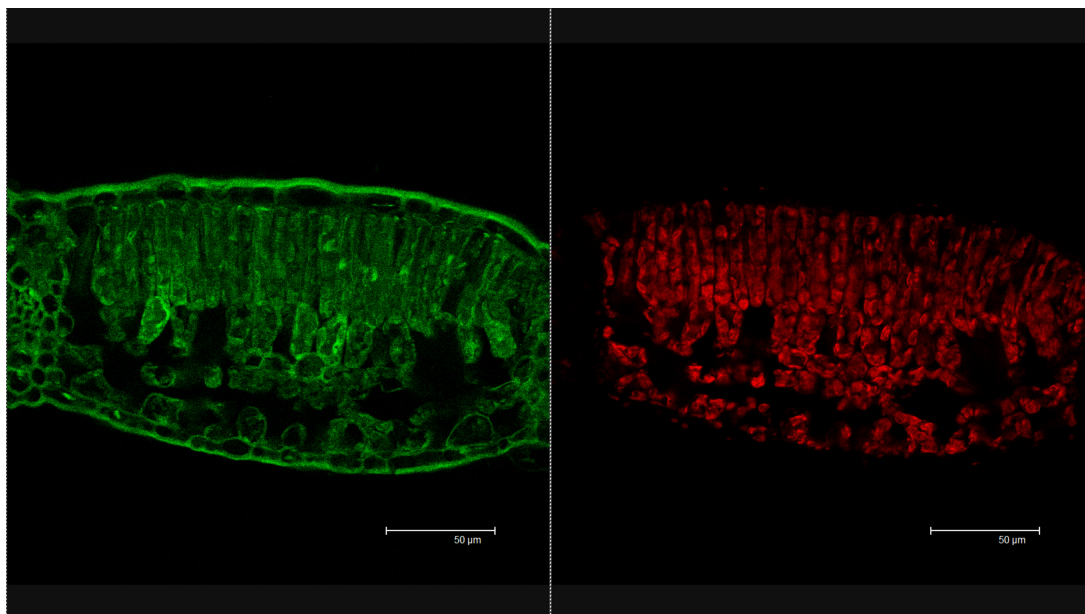
Jedná se o skleněné sféry s automaticky nastavitelnými okny. Teplota i vlhkost jsou ve sférách automaticky regulovány tak, aby byly srovnatelné s hodnotami v jejich okolí, pouze ozáření dosahuje až o 30% nižší intenzity. Koncentrace CO₂ v první sféře je shodná s aktuální atmosferickou koncentrací CO₂, ve druhé sféře je koncentrace CO₂ 700 ppm (Marek et al., 2002)

Ve sférách je pěstován zapojený porost smrku ztepilého a buku lesního, jedná se o juvenilní jedince ošetřené od roku 2005, v době zasazení do experimentálního systému dosahovali stáří přibližně 10–ti let.

Zpracované vzorky byly odebrány ve dvou termínech, na konci srpna roku 2009 a na konci července roku 2012. Během tří let došlo v porostu k růstovým změnám a patra větví se pod vlivem světelných podmínek morfologicky rozčlenila na stinná a slunná. Z těchto důvodů byly v roce 2009 odebírány pouze slunné listy, dřeviny dosahovaly relativně nízkého vzrůstu a v celé koruně byl dostatek světla, v roce 2012 již byly odebrány jak listy slunného tak stinného ekotypu. Jednalo se o dospělé plně vyvinuté listy. V roce 2009 tak byly odebrány listy z pěti jedinců ve dvou variantách, jeden list ze stromu ze sféry s AC, jeden list ze stromu ze sféry s EC. V roce 2012 byly odebrány listy slunného a stinného ekotypu ze sedmi stromů ze sféry s AC, stejný odběr proběhl ve sféře s EC. Ihned po odběru byly listy zamrazeny a ve zmraženém stavu skladovány až do analýzy.

3.2 Konfokální mikroskopie

Při dalším zpracování byl ze střední části každého listu mimo hlavní žilky vyříznut segment o ploše $0,5\text{cm}^2$. Takto vytvořený vzorek byl na nejméně 10 min vložen do destilované vody. Pomocí ručního mikrotomu byly vytvořeny řezy o tloušťce $100\text{ }\mu\text{m}$, z těchto řezů byly připravovány dočasné preparáty montované do vodního prostředí. Listy nebyly žádným způsobem barveny, při snímání byla využita autofluorescence vzorků, indukovaná laserem o vlnové délce 488nm . Autofluorescence byla detekována ve dvou kanálech, Obr. 3.2. Zelený kanál, $553 - 558\text{nm}$, odpovídá autofluorescenci fenolických látek, zejména těch obsažených v buněčných stěnách, červený kanál, $640 - 703\text{nm}$, odpovídá autofluorescenci chlorofylů. Konfokálním mikroskopem Leica SP2 s planapochromatickým objektivem $20\times$ (numerická apertura $0,7$) s vodní imerzí. Byly vytvářeny série optických řezů. Každá série se skládala z 11 nebo více snímků



Obr. 3.2: Konfokálním mikroskopem snímané kanály, zelený, $553-558\text{nm}$, červený, $640-703\text{nm}$. Zdroj: Autor.

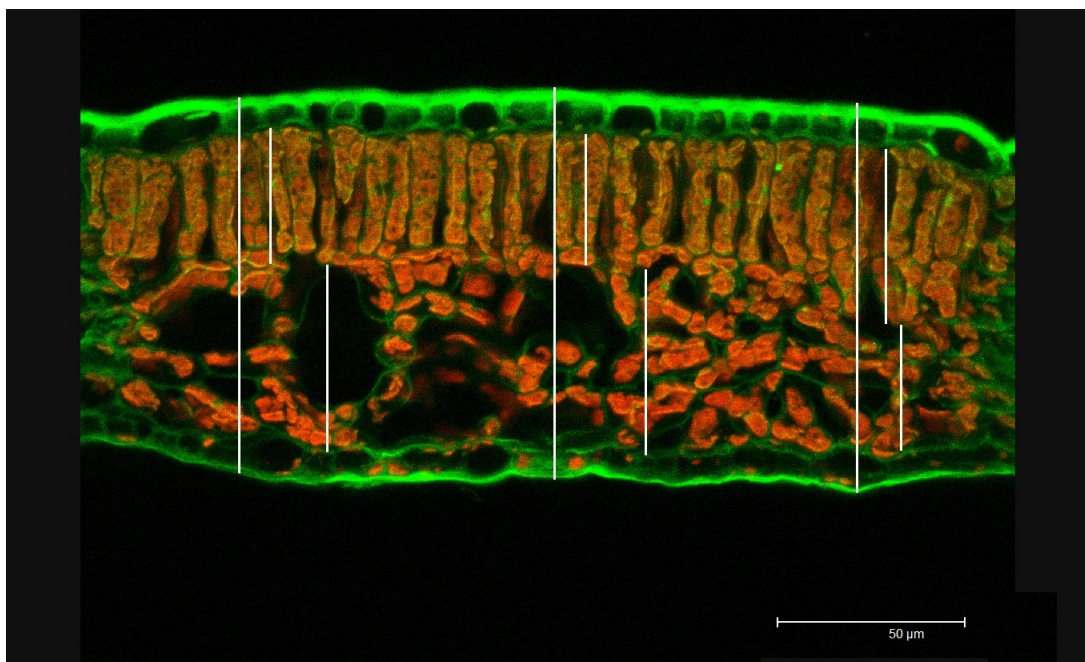
s intervalem mezi jednotlivými snímky přibližně 1 μm . Pro každý strom bylo vytvořeno nejméně 7 sérií optických řezů, ze dvou až čtyř dočasných preparátů.

3.2.1 Měření vybraných anatomických parametrů

Vyhodnocení sérií optických řezů bylo prováděno pomocí softwaru Ellipse 2.08 (ViDiTo Košice, SK). Celková mocnost listu, mocnost palisádového a houbovitého parenchymu byla měřena ručně. Odhad hustoty vnitřního povrchu mezofylu a zastoupení mezibuněčných prostor byly hodnoceny pomocí metody fakír a bodové metody. Měření plochy listu bylo prováděno z fotografií listů pomocí prahování v softwaru ImageJ.

K měření mocnosti pletiv, vyjádřené v μm , byl využit snímek listu získaný na konfokálním mikroskopu Leica SP2, mocnost byla měřena vždy na třech snímcích listu. Tři linie celkové mocnosti listu, tři linie mocnosti palisádového parenchymu a tři linie pro houbovitý parenchym, tak jak je vidět na Obr. 3.3.

Mocnost mezofylu byla vyjádřena jako součet mocností palisádového a houbového parenchymu. K dalšímu měření byla vybrána okna pomocí systematicky rovnoměrně náhodného výběru (Kubínová, Albrechtová, 1999) v modulu rectangles (velikost okna 350x350px, rozestup mezi okny: 500x500px). Jak je vidět na Obr. 3.4, struktura listu nezasahuje do všech oken. Pro každý strom byly vyhodnoceny celkem tři až čtyři optické série. Což představuje průměrně 22 vyhodnocených oken na list. V každém z těchto 22 oken byl bodovou metodou vyhodnocen poměr zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu listu, Obr. 3.5. Střední snímek ze série reprezentoval celou optickou sérii a na základě zastoupení mezibuněčných prostor



Obr. 3.3: Ruční stanovení celkové mocnosti listu, palisádového a houbovitého mezofylu. Vždy je zaznačena zprava: celková mocnost listu, mocnost palisádového parenchymu a mocnost houbovitého parenchymu. Zdroj: autor.

a mezofylu tohoto středního snímku byl stanoven poměr mezibuněčných prostor pro celou sérii.

Odhad plochy $estA$ dané struktury byl stanoven podle vzorce (1)

$$est A = P \cdot a, \quad (1)$$

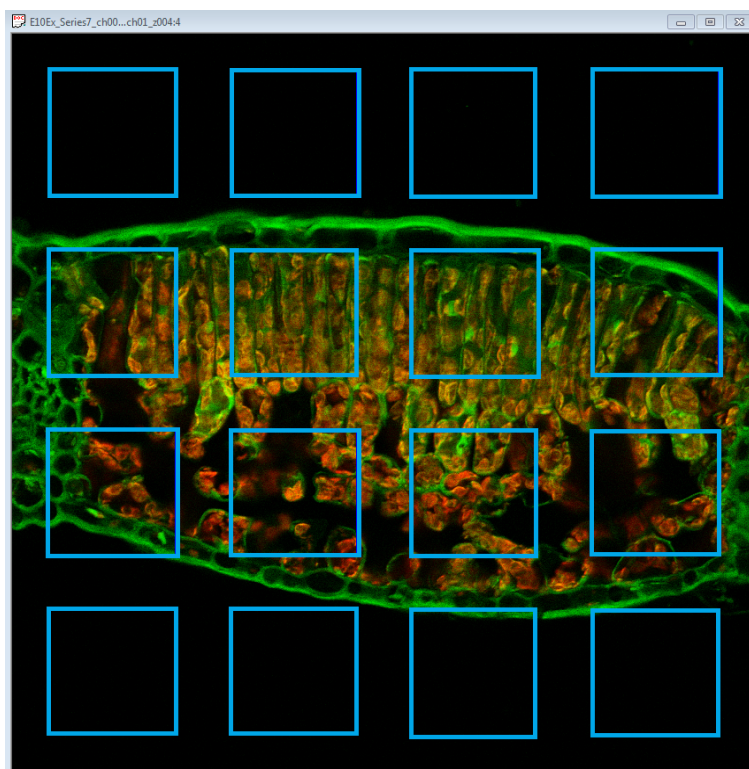
kde P je počet označených bodů náležejících dané struktuře a a je čtvercová plocha náležející každému jednomu bodu z bodové mřížky.

Zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu listu IAS , vyjádřené v %, bylo stanoveno ze středního řezu série vždy jako průměrná hodnota pro celé okno série optických řezů. Počet bodů náležejících mezofylu M , a počet bodů náležejících mezibuněčným prostorům MP ,

v řezu, získané bodovou metodou, Obr. 3.6, byly dosazeny do vzorce (2)

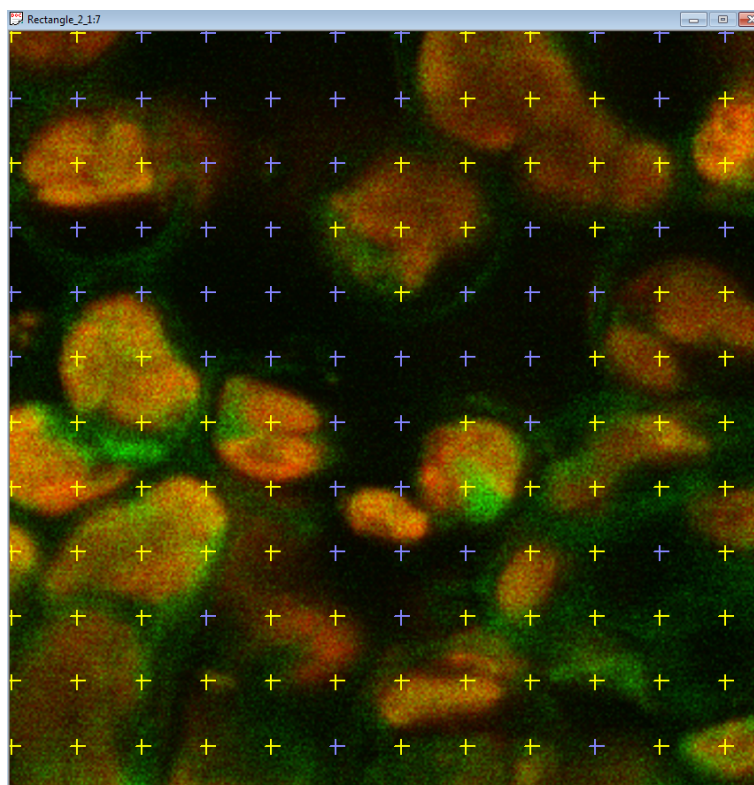
$$IAS = \frac{MP}{MP + M} \quad (2)$$

Stejná okna jako pro bodovou metodu byla použita k vyhodnocení plochy vnitřního povrchu mezofylu stereologickou metodou fakír (Kubínová, Janáček, 1998). Série optických řezů v daném okně byla protnuta 3 sadami na sebe kolmých čárových sond, Obr. 3.7, které byly označovány při vstupu a výstupu do/ z mezofylové buňky. Rozestup jednotlivých sond byl 15 px.



Obr. 3.4: Systematicky rovnoměrně náhodný výběr oken provedený v sérii optických řezů, pozice prvního okna je náhodná. Zdroj: autor.

Sondy vytvořily průsečíky testovacího systému s povrchem mezofylových buněk vystaveným mezibuněčným prostorům, Obr. 3.7. Metoda fakír byla uplatněna vždy na 11-ti následných optických řezech, což představuje přibližně 10µm celkové mocnosti listu.



Obr. 3.5: Vyhodnocení poměru zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu. Žluté body označují mezofyl, fialové mezibuněčné prostory. Zdroj: autor.

Odhad velikosti plochy naměřeného povrchu mezofylu, $estS$ je odvozena z počtu průsečíků podle vzorce (3),

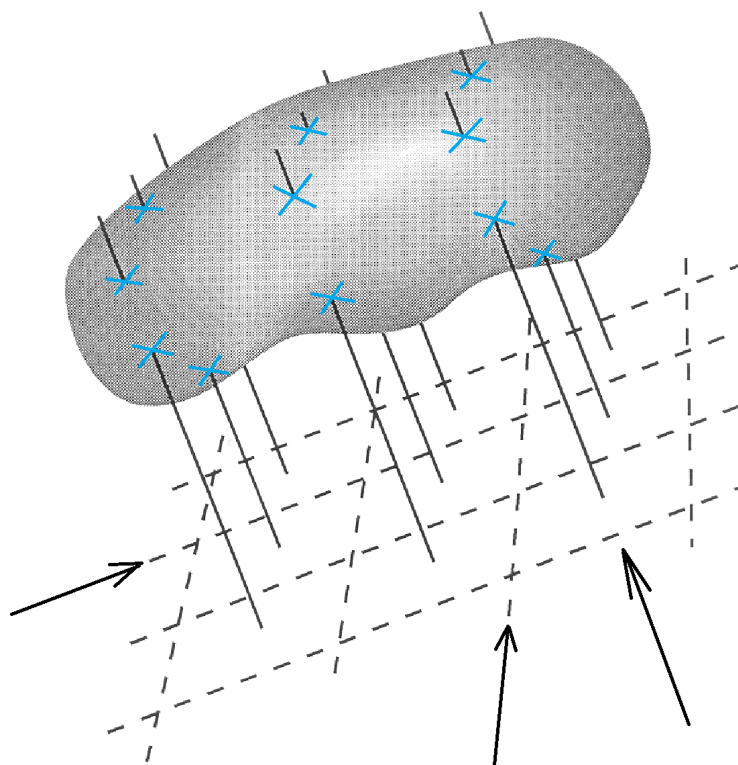
$$estS = \frac{2}{3} \cdot u^2 \cdot (I_1 + I_2 + I_3) \quad , \quad (3)$$

kde u je konstantní vzdálenost mezi sousedními rovnoběžnými čarami mřížky a I_i (kde i nabývá hodnot 1,2,3) je počet průsečíků s i -tou sondou (Kubínová, Albrechtová 1999).

Hustota vnitřního povrchu mezofylu ISD , vyjádřená v jednotkách $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$, byla stanovena pro každé měřené okno série optických řezů, jako podíl odhadu mezofylové plochy získaného metodou fakír, $estS$, vzorec (3), a objemu měřeného pletiva, vzorec (4):

$$ISD = \frac{estS}{(PM + M) \cdot k \cdot l} \quad , \quad (4)$$

kde PM je počet bodů v řezu náležejících mezibuněčným prostorům, M je součet bodů v řezu náležejících mezofylu, k je plocha čtverce náležejícího jednomu bodu v bodové metodě a l je vzdálenost mezi prvním a posledním řezem dané série optického řezu.



Obr. 3.6: Grafické znázornění sondy fakír. Šipky naznačují tři sady na sebe kolmých čárových sond, modré křížky označují průnik sondy do mezofylové buňky. Zdroj: Kubínová a Janáček, 1998, upraveno.

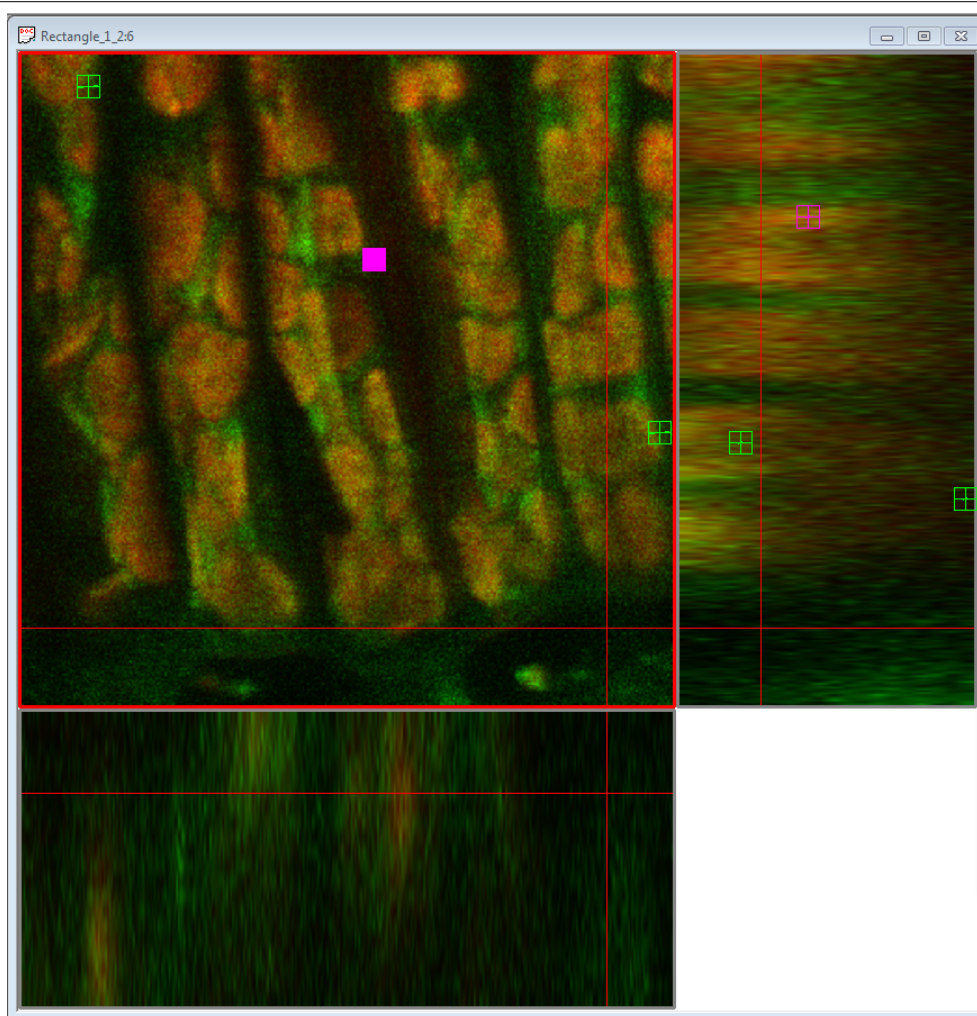
Celkový objem mezofylu, V_{mes} , byl vyjádřen v jednotkách μm^3 , jako mocnost mezofylu t_{mes} násobená plochou listu S , vzorec (5)

$$V_{mes} = t_{mes} \cdot S \quad . \quad (5)$$

Povrch mezofylu vystavený mezibuněčným prostorům, S_{mes} , vyjádřený v jednotkách μm^2 byl stanoven jako objem mezofylu, V_{mes} , násobený hustotou vnitřního povrchu mezofylu, ISD , vzorec (6)

$$S_{mes} = V_{mes} \cdot ISD \quad . \quad (6)$$

Ze získaných parametrů byla vypočtena hodnota vnitřního povrchu listu S_{mes}/S za účelem srovnání získaných výsledků s literaturou. Hodnota vnitřního povrchu listu S_{mes}/S , vyjádřená v jednotkách $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-2}$, byla získána jako podíl povrchu mezofylu vystaveného mezibuněčným prostorům S_{mes} a plochy listu, S . Stanovení plochy listu, S , bylo vytvořeno na základě snímků získaných fotoaparátem Panasonic DMC-FZ7. Plocha listu byla vyhodnocena v softwaru ImageJ. Prahováním snímku byl vytvořen binární obraz a stanovena jeho plocha.



Obr. 3.7: Vyhodnocení hustoty vnitřního povrchu mezofylu pomocí stereologické metody fakír. Každý zelený čtverec uvnitř rozdělený na čtyři dílčí pole představuje průnik jedné sondy fakír s aktuálním optickým řezem, růžově obarvená sonda značí průsečík sondy s povrchem mezofylové buňky sousedící s mezibuněčným prostorem. Obdélník vedle a pod hlavním oknem jsou boční pohledy do série pod sebou seskládaných oken série optických řezů. Zdroj: atuator.

3.2.2 Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů

Vedle měření anatomických parametrů listů byla provedena také analýza obsahu fotosyntetických pigmentů v listech, konkrétně obsah

chlorofylu *a* (Chl_a), *b* (Chl_b) a karotenoidů (*Car*). Za tímto účelem byly odebírány vzorky listů do mikrozku mávek, přibližně 0,5 cm² plochy listu. Byla stanovena čerstvá hmotnost vzorků. Pigmenty byly následně extrahovány pomocí čistého dimethylamidu kyseliny mravenčí (DMF) podle Porra et al. 1989. Po 7 dnech uchovávání v lednici při 4°C a za nepřístupu světla byl extrakt ředěn 1:4 čistým DMF. Absorbance extraktu byla stanovena při konkrétních vlnových délkách 480 nm (A_{480}), 647 nm (A_{647}), 664 nm (A_{664}) a 750 nm (A_{750}) na spektrofotometru (Unicam Helios α , Velká Británie).

Sada paralelně odebraných vzorků byla po zvážení čerstvé hmotnosti vložena na 48 hodin do sušárny při teplotě 60°C a vysušena do konstantní hmotnosti. Poté byla zvážena hmotnost sušiny pro stanovení množství pigmentů v sušině.

Koncentrace pigmentů v extraktu, vyjádřená v jednotkách mg · g⁻¹, byla stanovena podle následujících vzorců dle Wellburn 1994.

Stanovení obsahu chlorofylu *a*, Chl_a , vzorec (8), chlorofylu *b*, Chl_b , vzorec (9), karotenoidů, *Car*, vzorec (10)

$$Chl_a = 11,65 \cdot A_{664} - 2,96 \cdot A_{647} \quad (8)$$

$$Chl_b = 20,81 \cdot A_{647} - 4,53 \cdot A_{664} \quad (9)$$

$$Car = \frac{1000 \cdot A_{480} - 0,89 \cdot Chl_a - 52,02 \cdot Chl_b}{245} \quad (10)$$

Před dosazením do vzorců byla od hodnot absorbance A_{480} , A_{647} a A_{664} byla z korekčních důvodů odečtena hodnota A_{750} .

3.3 Použité statistické metody

K vyhodnocení výsledků byl použit statistický program NCSS 2000 (NCSS, USA). Data z roku 2009 byla vyhodnocena jednovýběrovým

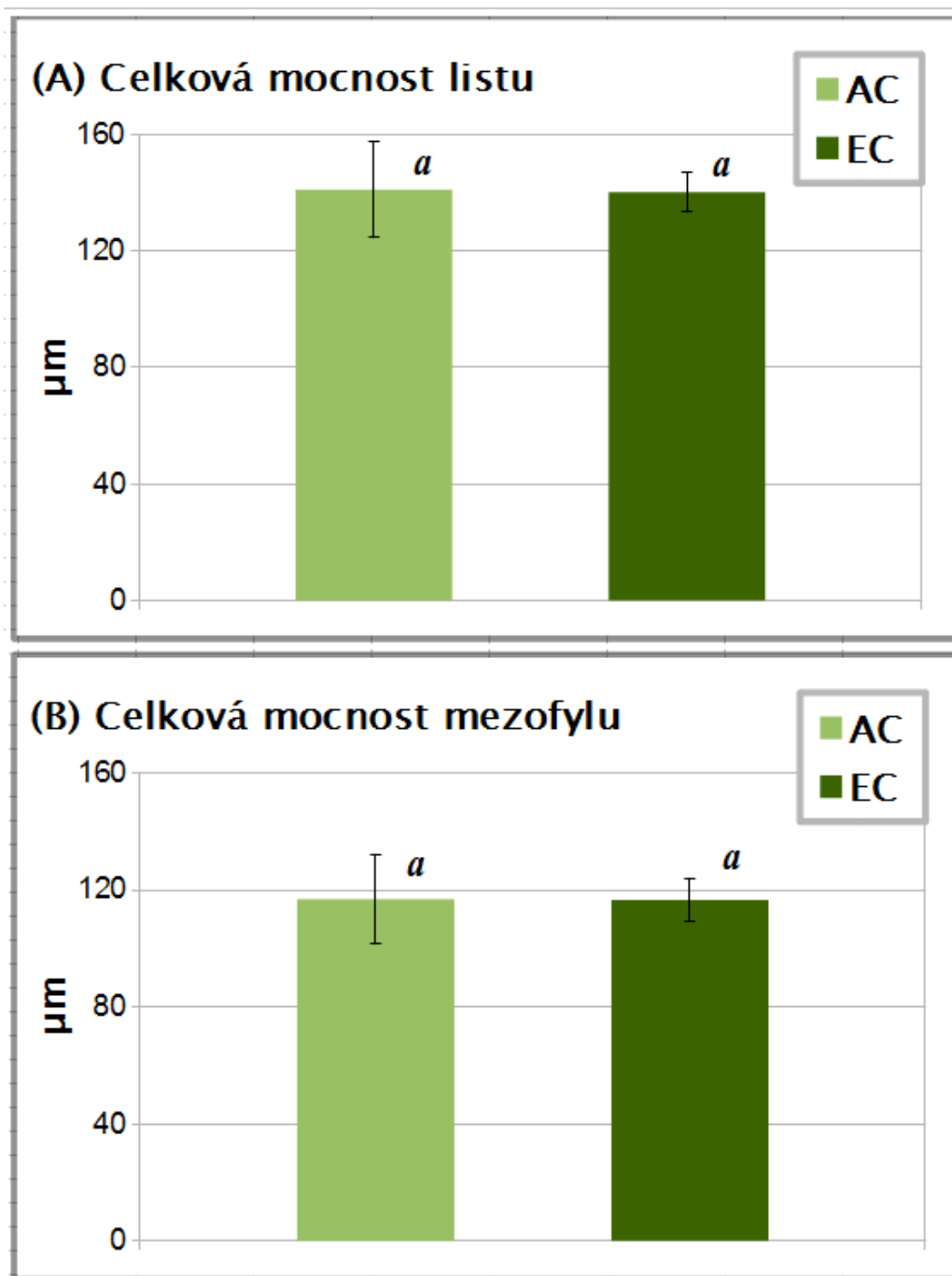
t- testem. Pro hodnocení dat s interakcí více proměnných, z roku 2012, byla použita metoda Analýza rozptylu ANOVA, modul Repeated Measures. Pevný efekt zde představovalo ošetření CO₂, 7 vybraných opakování (stromů) v každé variantě bylo definováno jako náhodný efekt hierarchicky uspořádaný uvnitř pevného efektu ošetření CO₂. Pro každou kombinaci těchto dvou efektů (koncentrace CO₂ a strom) existuje pevný efekt v podobě slunné a stinné pozice listu. Použitý modul provádí jednak hodnocení variability hodnot pro jednotlivé stromy mezi sebou, jednak variabilitu uvnitř každého jednoho stromu. Získané výsledky, které prokázaly statisticky významný rozdíl daného parametru v ošetření různou koncentrací CO₂ v závislosti na intenzitě ozáření byl dále zhodnocen jednovýběrovým t- testem. Porovnání výsledku t- testu (velikost p hodnoty) byly využity k vyhodnocení síly diferenciací slunného a stinného ekotypu listu v AC a v EC.

Kapitola 4 **Výsledky**

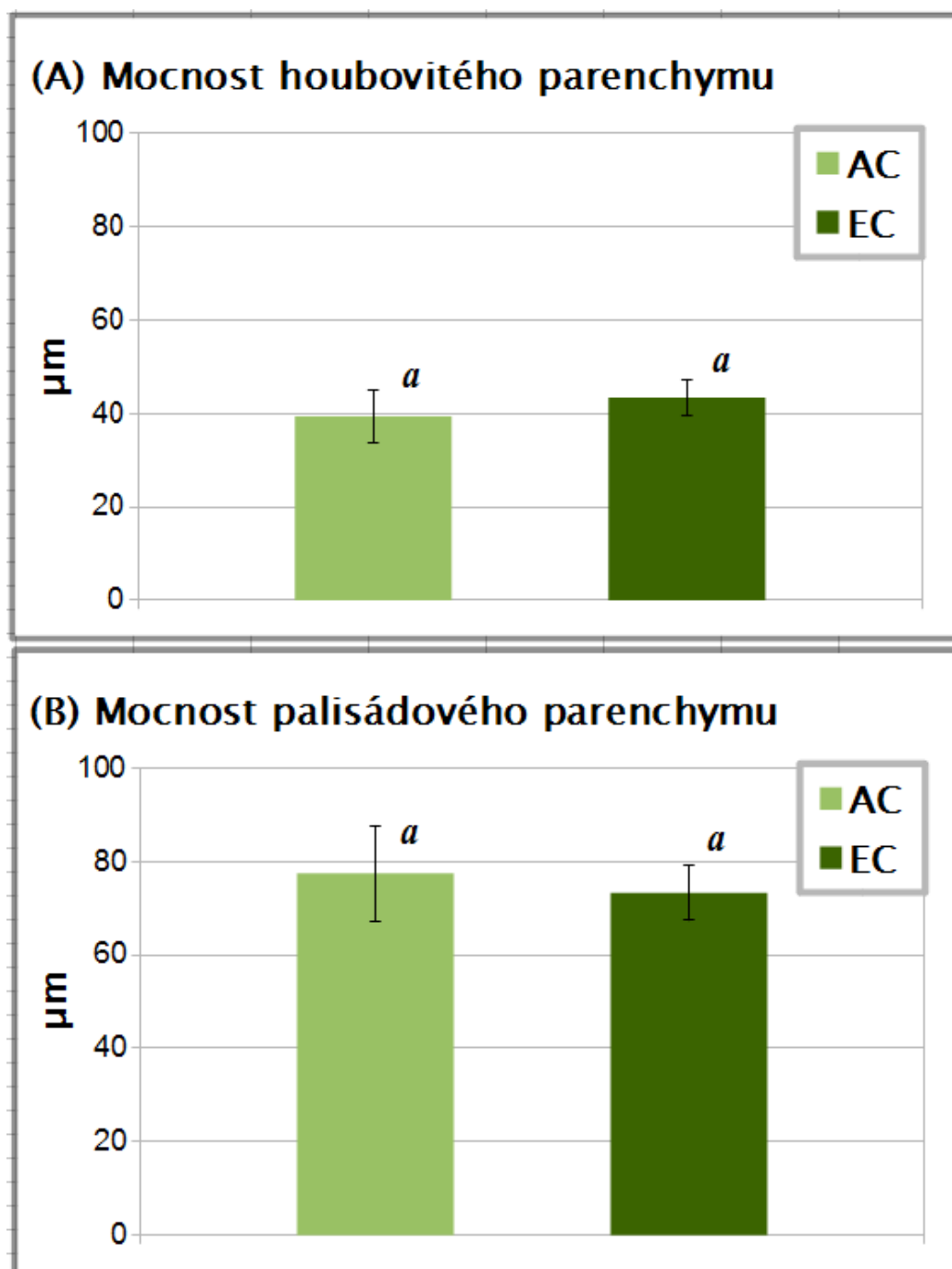
4.1 Výsledky pro rok 2009

Následující text shrnuje výsledky získané z listového materiálu odebraného roku 2009. Parametry jsou hierarchicky seřazeny podle náročnosti jejich stanovení od mocnosti listu k hustotě vnitřního povrchu mezofylu. Tabulka statistických signifikancí je uvedena níže.

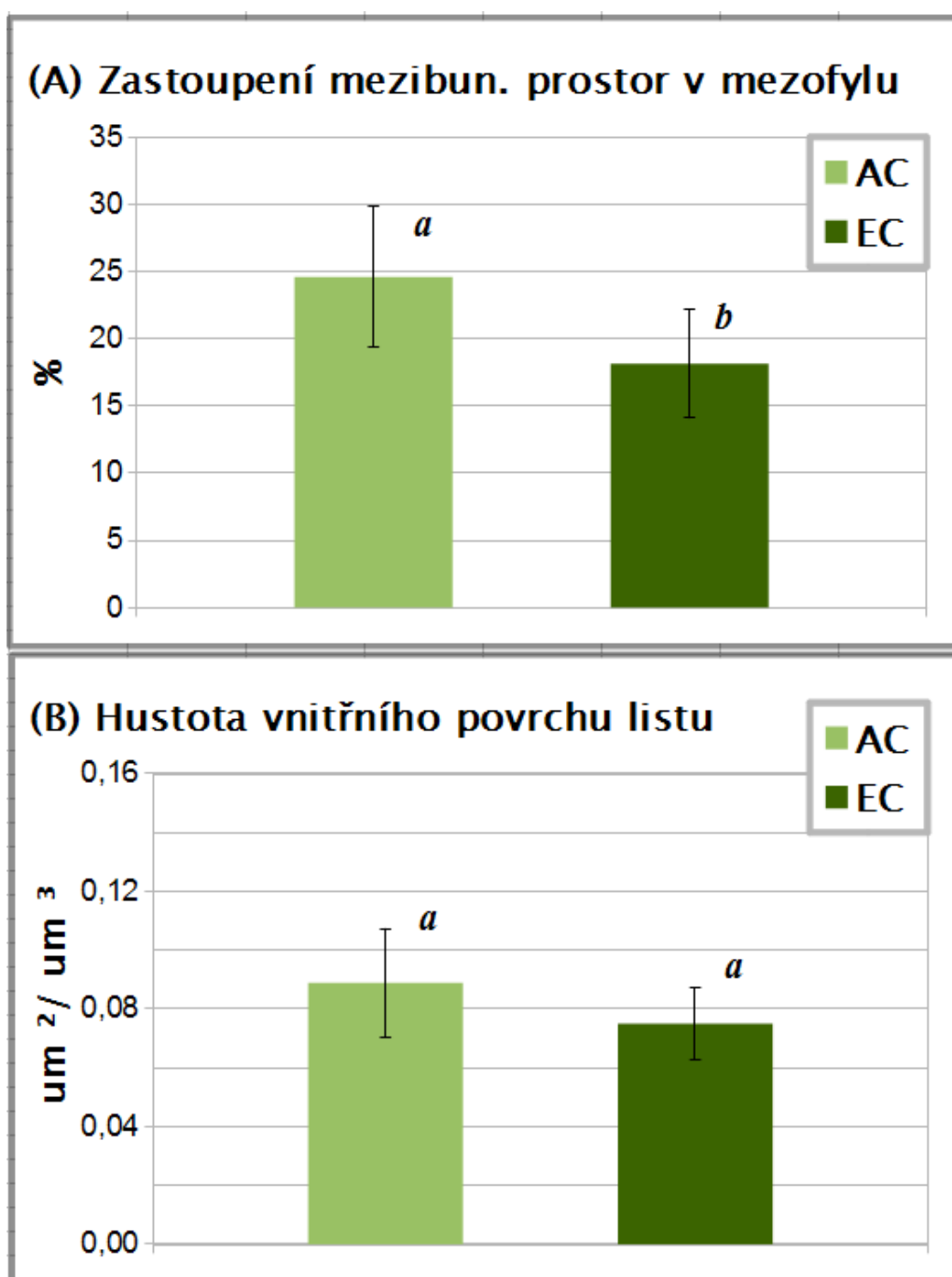
Zvýšená koncentrace CO₂ neměla vliv na celkovou mocnost listů, nedošlo ani k navýšení celkové mocnosti mezofylu, Graf 4.1. Stejně tak nedošlo k významným změnám v mocnosti palisádového a houbovitého parenchymu, Graf 4.2. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán v případě parametru zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu listu. Listy rostoucí v aktuální koncentraci CO₂ měly mezofyl více prostoupený mezibuněčnými prostory než listy z EC. Hustota vnitřního povrchu listů se v závislosti na odlišném ošetření CO₂ statisticky významně neměnila, Graf 4.3.



Graf 4.1: (A), celková mocnost listů, (B) celková mocnost mezofylu listů buku lesního odebíraných v roce 2009. AC, aktuální koncentrace CO₂, EC zvýšená koncentrace CO₂. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán, když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.



Graf 4.2: (A), mocnost houbovitého parenchymu listů, (B) mocnost palisádového parenchymu listů buku lesního odebíraných v roce 2009. AC, aktuální koncentrace CO_2 , EC zvýšená koncentrace CO_2 . Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán, když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.



Graf 4.3: (A), zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu, (B) hustota vnitřního povrchu listů buku lesního odebíraných v roce 2009. AC, aktuální koncentrace CO_2 , EC zvýšená koncentrace CO_2 . Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.

4.2 Výsledky pro rok 2012

Následující kapitola shrnuje výsledky získané z listového materiálu odebraného roku 2012. Parametry jsou seřazeny podobně jako výsledky z roku 2009. V textu jsou pro každý parametr uvedeny nejprve výsledky analýzy rozptylu Repeated measures, je zhodnocen vliv CO₂, ozáření a interakce těchto faktorů. Následují výsledky t – testu, které porovnávají anatomický parametr slunného a stinného listu vždy v jedné z koncentrací CO₂. Za textem následuje tabulka statistických signifikancí, pro analýzu rozptylu Tabulka 4.1 a pro t – testy Tabulka 4.2. V tabulce jsou uváděny tři hladiny významnosti, na rozdíl od grafů a textu, kde je zaznamenána odlišnost souborů na hladině pravděpodobnosti $\alpha=0,05$. Tabulka a grafy jsou uvedeny za výčtem textu.

Mocnost listu byla ovlivněna ozářeností. Vliv CO₂ ani interakce působení koncentrace CO₂ a ozáření prokázán nebyl. Slunné listy v podmínkách AC dosahovaly statisticky významně vyšší mocnosti listu než stinné, stejně tak se chovaly listy v podmínkách EC, Graf 4.4(A).

Celková mocnost mezofylu listu byla stejně jako mocnost listu ovlivněna pouze ozářeností. Statisticky významný vliv koncentrace CO₂ ani interakce CO₂ a ozáření prokázány nebyly. Slunné listy v podmínkách AC měly mocnost mezofylu statisticky významně vyšší než stinné. Stejný rozdíl byl pozorován v podmínkách EC, Graf 4.4(B).

Mocnost houbovitého parenchymu reagovala také pouze na intenzitu ozáření. Vliv CO₂, ani interakce CO₂ a ozáření prokázány nebyly. Statisticky významně vyšší mocnosti houbovitého parenchymu v podmínkách AC dosahovaly slunné listy oproti stinným,

v podmínkách EC byl pozorován pouze trend navýšení mocnosti houbovitého mezofylu slunných listů, Graf 4.5(B).

Mocnost palisádového parenchymu vykazovala závislost na koncentraci CO_2 i na ozáření, vliv interakce těchto faktorů na hodnoty mocnosti palisádového parenchymu prokázán nebyl. Mocnost palisádového parenchymu byla statisticky významně vyšší u slunných listů v obou koncentracích CO_2 , Graf 4.5(A).

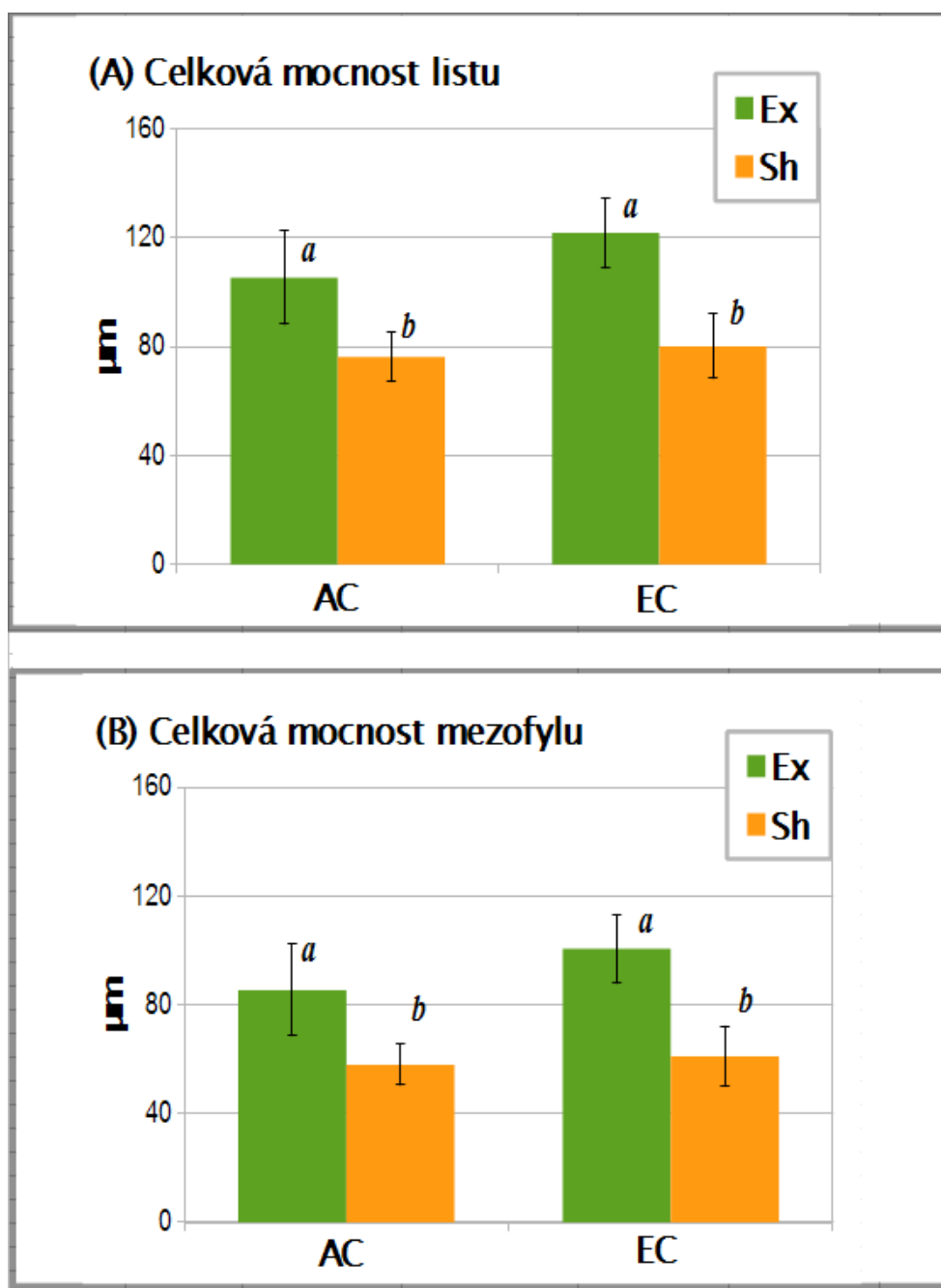
Plocha listu se výrazně lišila v závislosti na různé intenzitě ozáření, ovlivnění koncentrací CO_2 bylo pozorováno pouze jako tendence. Interakce koncentrace CO_2 a ozáření prokázána nebyla. Plocha slunných listů byla statisticky významně větší v podmínkách AC i EC, Graf 4.6(A).

Zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu listu nebylo ovlivněno ani koncentrací CO_2 , ani mírou ozáření. Nebyl prokázán ani vliv interakce těchto faktorů. Odlišnost tohoto parametru u slunných a stinných listů v AC a EC prokázána nebyla, Graf 4.6(B).

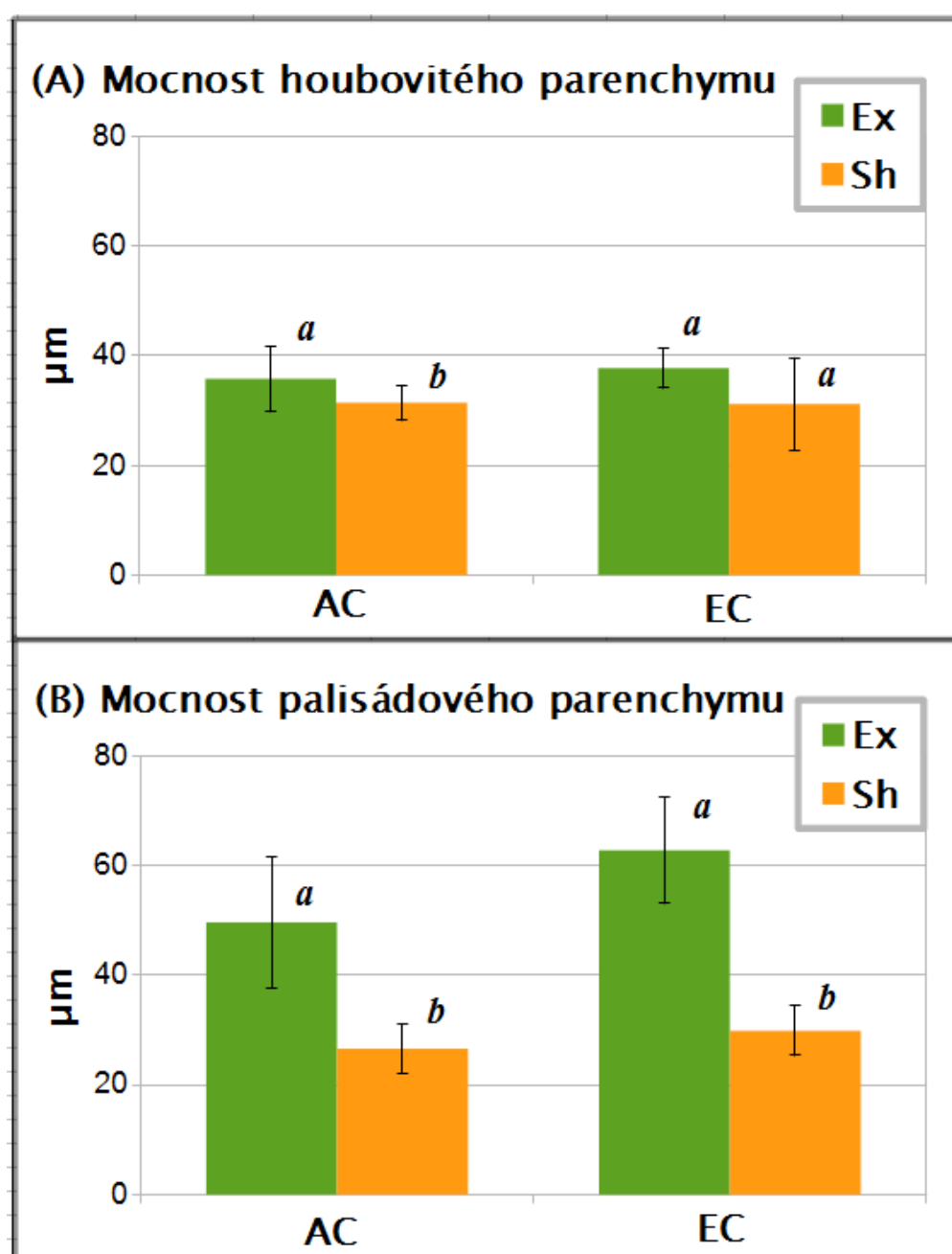
Hustota vnitřního povrchu listu nebyla ovlivněna koncentrací CO_2 , odlišnost byla prokázána u ozáření a reagovala na interakci obou faktorů. Slunné listy v podmínkách AC dosahovaly statisticky významně nižší hustoty vnitřního povrchu mezofylu než listy stinné. Rozdíl mezi slunnými a stinnými listy v podmínkách EC pro tento parametr pozorován nebyl, Graf 4.6(C).

Povrch mezofylu vystavený mezibuněčným prostorám, S_{mes} se lišil v závislosti na koncentraci CO_2 i ozáření. Interakce CO_2 a ozáření nebyla prokázána. Rozdíl S_{mes} mezi slunnými a stinnými listy se v obou koncentracích choval stejným způsobem, S_{mes} slunných listů byl významně vyšší než stinných, Graf 4.7(A).

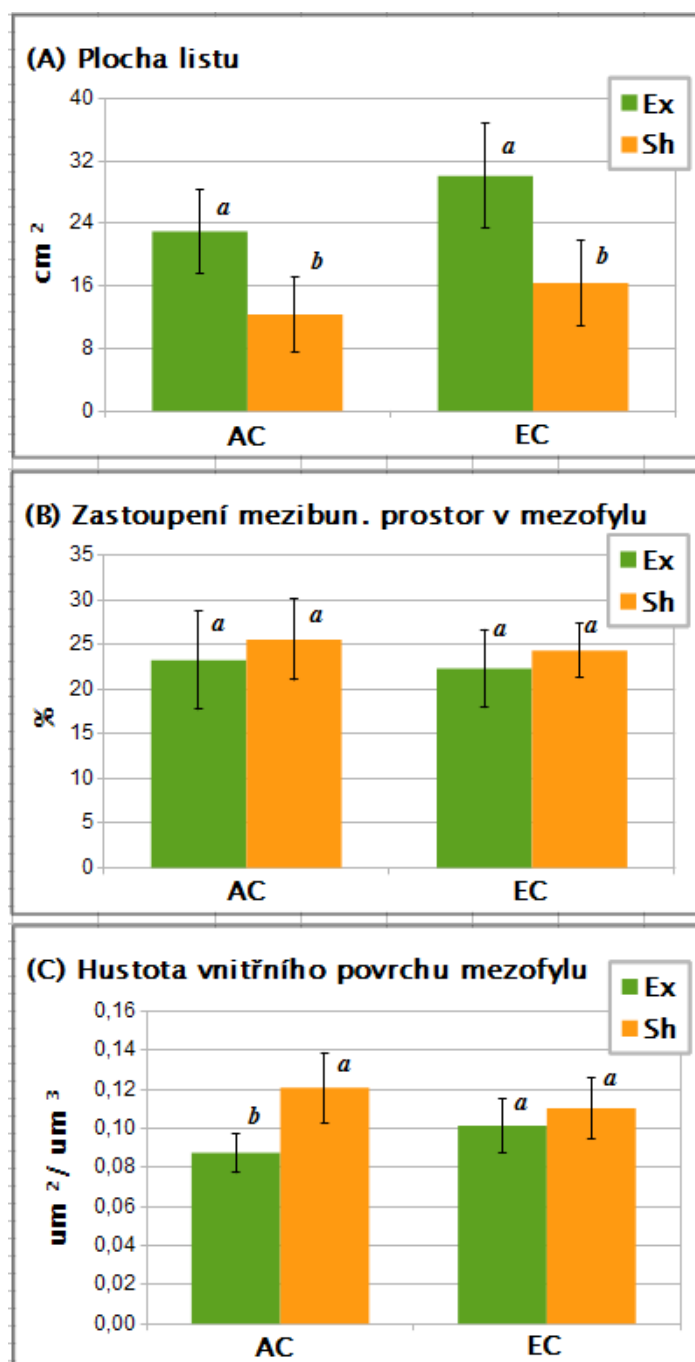
Vnitřní povrch listu na jednotkovou plochu listu S_{mes}/S , vykazoval závislost na ozáření, vliv koncentrace CO_2 ani interakce ozáření a koncentrace CO_2 nebyly prokázány. Odlišnost slunných a stinných listů byla pro tento parametr pozorována pouze ve zvýšené koncentraci CO_2 , slunné listy dosahovaly vyšších hodnot S_{mes}/S než listy stinné, Graf 4.7(B).



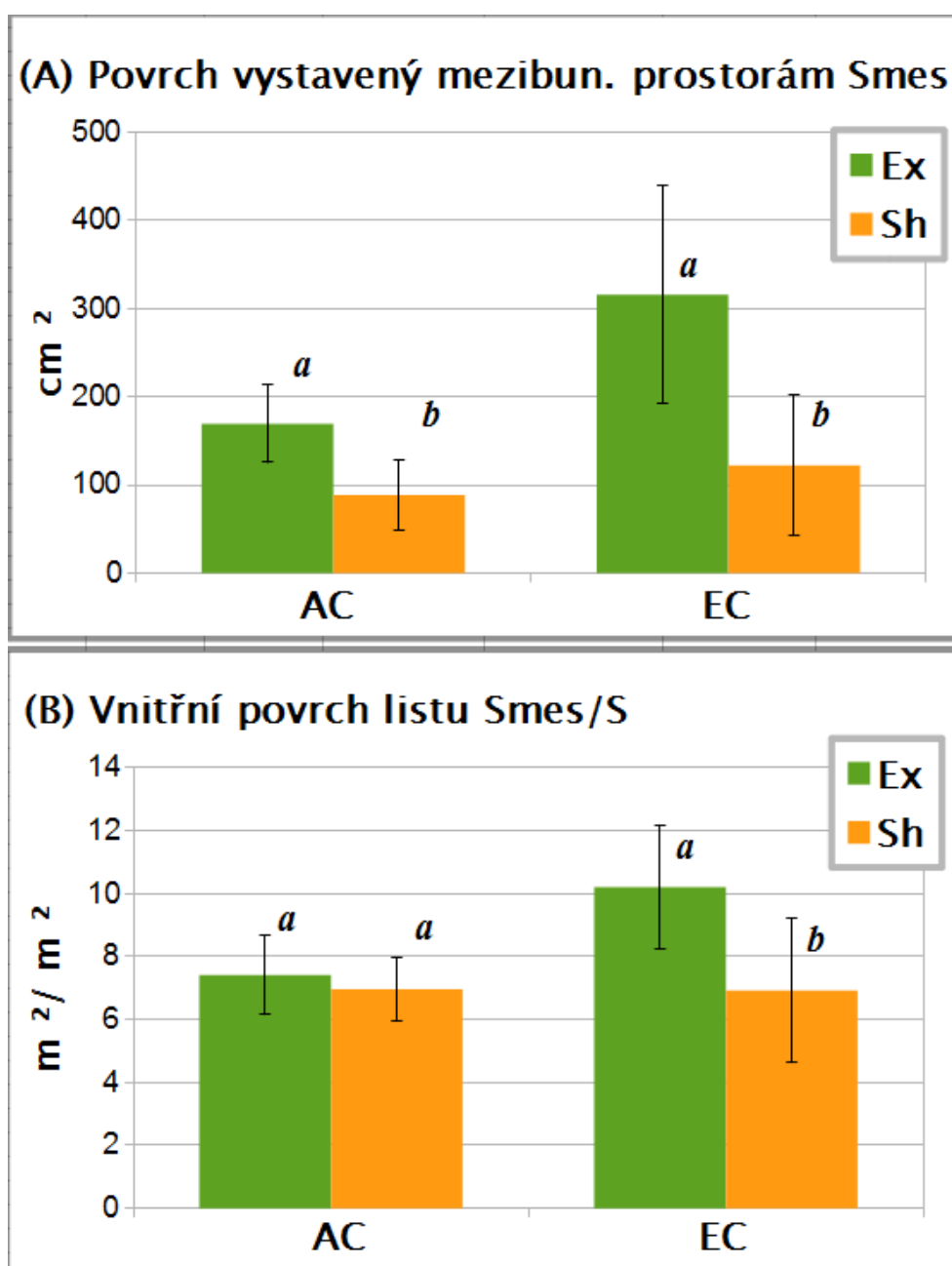
Graf 4.4: (A), celková mocnost listů, (B) celková mocnost mezofylu listů buku lesního odebíraných v roce 2012. AC, aktuální koncentrace CO₂, EC zvýšená koncentrace CO₂, Ex, slunná varianta, Sh, stinná varianta. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán, když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.



Graf 4.5: (A), mocnost houbovitého parenchymu listů, (B) mocnost palisádového parenchymu listů buku lesního odebíraných v roce 2009. AC, aktuální koncentrace CO₂, EC zvýšená koncentrace CO₂. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.



Graf 4.6: (A) plocha listu, (B) zastoupení mezibuněčných prostor v listu, (C) hustota vnitřního povrchu listu buku lesního odebíraných v roce 2012. AC, aktuální koncentrace CO₂, EC zvýšená koncentrace CO₂. Ex, slunná varianta, Sh, stinná varianta. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.



Graf 4.7: (A) povrch mezofylu vystavený mezibuněčným prostorám, S_{mes} , (B) vnitřní povrch listů buku lesního odebíraných v roce 2012. AC, aktuální koncentrace CO₂, EC zvýšená koncentrace CO₂, Ex, slunná varianta, Sh, stinná varianta. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.

parametr	t_{leaf}		t_{mes}		t_{SM}	
	p	sig	p	sig	p	sig
CO ₂	0,0961	*	0,1032	n.s.	0,7076	n.s.
IR	0,00001	***	0,000022	***	0,0391	**
CO ₂ xIR	0,2357	n.s.	0,2520	n.s.	0,6591	n.s.
parametr	t_{PM}		S		IAS (%)	
	p	sig	p	sig	p	sig
CO ₂	0,0380	**	0,0560	*	0,5509	n.s.
IR	0,000002	***	0,000029	***	0,2735	n.s.
CO ₂ xIR	0,1607	n.s.	0,4251	n.s.	0,9401	n.s.
parametr	ISD		S_{mes}		S_{mes}/S	
	p	sig	p	sig	p	sig
CO ₂	0,8016	n.s.	0,0158	**	0,0538	*
IR	0,0013	***	0,0012	***	0,0283	**
CO ₂ xIR	0,0340	**	0,1091	n.s.	0,0816	*

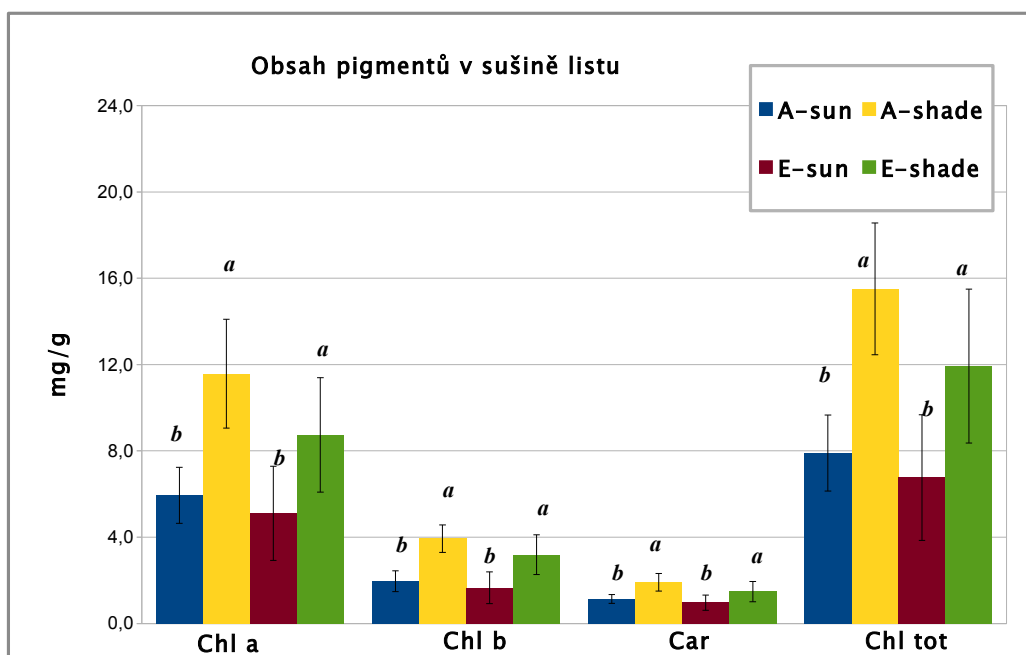
Tabulka 4.1: Výsledky analýzy rozptylu Anova, Repeated measures pro rok 2012, Zhodnocení vlivu koncentrace CO₂, ozáření a kombinace těchto faktorů na vybrané parametry listů buku lesního. CO₂, vliv koncentrace CO₂, IR, vliv ozáření, CO₂ x IR, vliv interakce koncentrace CO₂ a ozáření t_{leaf} , mocnost listu, t_{mes} , celková mocnost mezofylu, t_{SM} , mocnost houbovitého parenchymu, t_{PM} , mocnost palisádového parenchymu, S , plocha listu, $IAS\%$, zastoupení mezibuněčných prostor v listu, ISD , hustota vnitřního povrchu mezofylu, S_{mes} , vnitřní povrch mezofylu, S_{mes}/S , vnitřní povrch mezofylu vztažený na jeden povrch listu. p, hladina pravděpodobnost zamítnutí H_0 , sig, statisticky významný rozdíl, *; **, *** statisticky významný rozdíl, když $p < 0,1$; resp. $p < 0,05$; resp. $p < 0,01$; n.s., nesignifikantní rozdíl.

parametr	t_{leaf}			t_{mes}			t_{SM}		
	p	sig	H_1	p	sig	H_1	p	sig	H_1
A(Ex=Sh)	0,0007	***		0,0015	***		0,0774	*	
H_{1A}	0,0004	***	Ex>Sh	0,0008	***	Ex>Sh	0,0387	**	Ex>Sh
E(Ex=Sh)	0,0033	***		0,0039	***		0,1751	n.s.	
H_{1E}	0,0017	***	Ex>Sh	0,0019	***	Ex>Sh	0,0876	*	Ex>Sh
parametr	t_{PM}			S			IAS (%)		
	p	sig	H_1	p	sig	H_1	p	sig	H_1
A(Ex=Sh)	0,0009	***		0,0003	***		0,4607	n.s.	
H_{1A}	0,0004	***	Ex>Sh	0,0001	***	Ex>Sh			
E(Ex=Sh)	0,0009	***		0,0074	***		0,4276	n.s.	
H_{1E}	0,0005	***	Ex>Sh	0,0037	***	Ex>Sh			
parametr	ISD			S_{mes}			S_{mes}/S		
	p	sig	H_1	p	sig	H_1	p	sig	H_1
A(Ex=Sh)	0,0040	***		0,0000	***		0,5440	n.s.	
H_{1A}	0,0020	***	Ex<Sh	0,00003	***	Ex>Sh			
E(Ex=Sh)	0,2401	n.s.		0,0243	**		0,0482	**	
H_{1E}				0,0121	**	Ex>Sh	0,0241	**	Ex>Sh

Tabulka 4.2: Výsledky T-testu pro rok 2012, porovnání odlišnosti parametrů slunných a stinných listů buku lesního v podmínkách AC a EC. t_{leaf} , mocnost listu, t_{mes} , celková mocnost mezofylu, t_{SM} , mocnost houbovitého parenchymu, t_{PM} , mocnost palisádového parenchymu, S, plocha listu, IAS%, zastoupení mezibuněčných prostor v listu, ISD, hustota vnitřního povrchu mezofylu, S_{mes} , vnitřní povrch mezofylu, S_{mes}/S , vnitřní povrch mezofylu vztažený na jeden povrch listu. p, hladina pravděpodobnost zamítnutí H_0 , sig, statisticky významný rozdíl, *, **, *** statisticky významný rozdíl, když $p < 0,1$; resp. $p < 0,05$; resp. $p < 0,01$; n.s., nesignifikantní rozdíl, A(Ex=Sh) nulová hypotéza: v aktuální koncentraci je parametr slunných listů = parametru stinných listů, E(Ex=Sh) nulová hypotéza: ve zvýšené koncentraci je parametr slunných listů = parametru stinných listů, H_1 .alternativní hypotéza, Ex>Sh, Sh>Ex, parametr slunného listu je větší, resp. menší než parametr stinného listu.

Obsah fotosyntetických pigmentů v listech, rok 2012

Pro listy odebrané v roce 2012 byly stanoveny obsahy pigmentů chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, karotenoidů a xantofylů a chlorofylů dohromady, Graf 4.8. Výsledky statistického vyhodnocení jsou uvedeny, Tabulka 4.3, Tabulka 4.4.



Graf 4.8: Obsah pigmentů v listech z odběru roku 2012. A-sun, slunný list z aktuální koncentrace CO₂, E-sun, slunný list ze zvýšené koncentrace CO₂, A-shade, stinný list z aktuální koncentrace CO₂, E-shade, stinný list ze zvýšené koncentrace CO₂. *Chl_a*, chlorofyl a, *Chl_b*, chlorofyl b, *Car*, karotenoidy a xantofyly, *Chl_{total}*, chlorofyly dohromady, Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku, statisticky významný rozdíl byl zaznamenán když $p < 0,05$. Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl.

parametr	<i>Chl_a</i>		<i>Chl_b</i>	
	p	sig	p	sig
CO ₂	0,0173	**	0,0275	**
IR	0,00001	***	0,000002	***
CO ₂ xIR	0,2168	n.s.	0,3953	n.s.
parametr	<i>Car</i>		<i>Chl_{total}</i>	
	p	sig	p	sig
CO ₂	0,0149	**	0,0176	**
IR	0,0002	***	0,00001	***
CO ₂ xIR	0,3580	n.s.	0,2491	n.s.

Tabulka 4.3: Výsledky analýzy rozptylu Anova, Repeated measures pro rok 2012, stanovení pigmentů v listech. *Chl_a*, chlorofyl a, *Chl_b*, chlorofyl b, *Car*, karotenoidy a xantofyly, *Chl_{total}*, chlorofyly dohromady, CO₂, vliv koncentrace CO₂, IR, vliv ozáření, CO₂ x IR, vliv interakce koncentrace CO₂ a ozáření, p, pravděpodobnost, sig, statisticky významný rozdíl, *, **, *** statisticky významný rozdíl, když p<0,1; resp. p<0,05; resp. p<0,01; n.s., nesignifikanční rozdíl.

parametr	<i>Chl_a</i>			<i>Chl_b</i>		
	p	sig	H ₁	p	sig	H ₁
A(Ex=Sh)	0,00024	***		0,00006	***	
H ₁	0,00012	***	Ex<Sh	0,00003	***	Ex<Sh
E(Ex=Sh)	0,0166	***		0,0055	***	
H ₁	0,0083	***	Ex<Sh	0,0028	***	Ex<Sh
parametr	<i>Car</i>			<i>Chl_{total}</i>		
	p	sig	H ₁	p	sig	H ₁
A(Ex=Sh)	0,00088	***		0,00014	***	
H ₁	0,00044	***	Ex<Sh	0,00007	***	Ex<Sh
E(Ex=Sh)	0,0451	***		0,0125	**	
H ₁	0,0226	***	Ex<Sh	0,0062	***	Ex<Sh

Tabulka 4.4: Výsledky t-testu pro rok 2012, stanovení pigmentů v listech. *Chl_a*, chlorofyl a, *Chl_b*, chlorofyl b, *Car*, karotenoidy a xantofyly, *Chl_{total}*, chlorofyly dohromady, p, pravděpodobnost, sig, statisticky významný rozdíl, *, **, *** statisticky významný rozdíl, když p<0,1; resp. p<0,05; resp. p<0,01; n.s., nesignifikanční rozdíl, A(Ex=Sh) nulová hypotéza: v aktuální koncentraci je parametr slunných listů = parametru sinných listů, E(Ex=Sh) nulová hypotéza: ve zvýšené koncentraci je parametr slunných listů = parametru sinných listů, H₁.alternativní hypotéza, AC>EC, AC<EC, parametr listu z aktuální koncentrace je větší, resp. menší než parametr listu ze zvýšené koncentrace CO₂

4.3 Porovnání výsledků roku 2009 a 2012

Pro anatomické parametry slunných listů hodnocené v obou sezónách (2009 i 2012) jsou uvedeny výsledky porovnání pro AC a EC v tabulce 4.5. Grafické znázornění najde čtenář v kapitolách věnovaných jednotlivým rokům.

Na rozdíl od roku 2009, kdy mocnost listu, celková mocnost mezofylu i mocnosti palisádového i houbovitého parenchymu byly shodné u listů z AC i EC, v roce 2012 byla mocnost slunných listů, celková mocnost jejich mezofylu a palisádového parenchymu vyšší u listů stromů ošetřených EC. Zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu bylo pozitivně ovlivněno zvýšenou koncentrací pouze v roce 2009. Naopak hustota vnitřního povrchu mezofylu vzrostla u slunných listů z EC pouze v roce 2012.

T-test		parametr	t_{leaf}	t_{mes}	t_{SM}	t_{PM}	IAS (%)	ISD
2009	H ₀ (AC=EC)	p	0,9014	0,9728	0,2400	0,4207	0,0855	0,2560
		sign	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
	H ₁	p					0,0427	
		sign					**	
		H ₁					AC>EC	
2012	H ₀ (AC=EC)	p	0,1127	0,1219	0,5625	0,0514	0,7973	0,0623
		sign	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
	H ₁	p	0,0563	0,0610		0,0257		0,0311
		sign	*	*		**		**
		H ₁	AC<EC	AC<EC		AC<EC		AC<EC

Tabulka 4.5: Výsledky t-testu parametrů listového materiálu z roku 2009 a 2012, porovnání odlišnosti parametrů slunných listů buku lesního v podmínkách AC a EC. t_{leaf} , mocnost listu, t_{mes} , celková mocnost mezofylu, t_{SM} , mocnost houbovitého parenchymu, t_{PM} , mocnost palisádového parenchymu, S , plocha listu, $IAS\%$, zastoupení mezibuněčných prostor v listu, ISD , hustota vnitřního povrchu mezofylu, S_{mes} , vnitřní povrch mezofylu, S_{mes}/S , vnitřní povrch mezofylu vztažený na jeden povrch listu. p, pravděpodobnost, sig, statisticky významný rozdíl, *, **, *** statisticky významný rozdíl, když $p < 0,1$; resp. $p < 0,05$; resp. $p < 0,01$; n.s., nesignifikanční rozdíl, A(Ex=Sh) nulová hypotéza: v aktuální koncentraci je parametr slunných listů = parametru stinných listů, E(Ex=Sh) nulová hypotéza: ve zvýšené koncentraci je parametr slunných listů = parametru stinných listů, H₁.alternativní hypotéza, AC>EC, AC<EC, parametr listu z aktuální koncentrace je větší, resp. menší než parametr listu ze zvýšené koncentrace CO₂. Pro 2009 n=5, pro 2012 n=7

Kapitola 5 Diskuze

Následující kapitola je věnována zhodnocení výsledků. Jednotlivé části diskutují konkrétní výsledky práce, srovnávají je s nastudovanými údaji z literatury a vyhodnocují hypotézy, tak jak byly na začátku práce stanoveny. Nejprve je diskutována aplikace stereologické metody fakír a je vysloven závěr, zda je možné srovnávat výsledky této stereologické metody s údaji v literatuře. Další část hodnotí vliv CO_2 a vliv ozáření na změny vybraných anatomických parametrů listů buku lesního.

5.1 Aplikace stereologické metody fakír na bifaciální list buku lesního

S použitím stereologické metody fakír na bifaciálním listu buku lesního, byly získány nevychýlené odhady hustoty vnitřního povrchu mezofylu. Z nich byl stanoven vnitřní povrch listu, S_{mes}/S , tedy hodnota, která charakterizuje povrch stěn mezofylových buněk v kontaktu s mezibuněčnými prostory, hranici plynné a kapalně fáze (Terashima et al., 2011), na které dochází k výměně plynů. Získané výsledky, které dosahují hodnot $8,8 \pm 2,2 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-2}$ pro slunné listy a $6,9 \pm 1,8 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-2}$ pro listy stinné, byly porovnány s literárními zdroji. Hodnoty S_{mes}/S pro listnaté opadavé stromy s bifaciálními listy jsou v Tab. 5.1. Z tabulky je patrné, že hodnoty získané stereologickými metodami jsou řádově srovnatelné s výsledky jiných studií. Je třeba poznamenat, že veškerá data uvedená v tabulce, kromě výsledků z této práce, byla získána pomocí modelování mezofylových buněk standardními geometrickými tělesy či s použitím různých korekčních faktorů (Thain 1983, Evans et al. 1994). Při těchto odhadech může docházet k nadhodnocení parametru vnitřního

povrchu listu, někdy až dvacetinásobnému (Slaton, Smith, 2002). Příčinou nadhodnocení je jednak samotné matematické vyjádření tvaru buněk jako kulovitých, elipsoidních nebo cylindrických těles. Větší chyba je pravděpodobně do odhadu vnesena tím, že některé z modelů neuvažují vzájemný kontakt stěn mezofylových buněk, čímž stanovenou plochu mezofylu výrazně zvyšují (Slaton, Smith, 2002). Především v případě palisádového parenchymu některých druhů může být kontakt mezofylových buněk při velmi těsném uspořádání značný (Hanba et al., 1999). Slaton, Smith (2002) uvádí, že až 95% povrchu buněk palisádového parenchymu listu xeromorfních rostlin je navzájem v kontaktu. Podobnou situaci jsem pozorovala při vyhodnocování povrchu mezofylových buněk vystaveného mezibuněčným prostorám, zejména u palisádového parenchymu. Podíl stěn v přímém kontaktu se stěnami sousedních buněk a stěn v kontaktu s mezibuněčnými prostory však nebyl v mé práci kvantitativně stanoven. Prakticky je možné tento údaj získat s použitím upraveného modulu fakír v programu Ellipse 2.08 (Dr. Janáček, osobní sdělení), který umožňuje odlišovat při měření několik kategorií sledovaného povrchu.

autor	rostlinný druh	podmínky ozáření	S_{mes}/S	metoda stanovení
Hanba et al., 2002	<i>Acer mono</i>	17% IR	8,0	Thain (1983)*
Hanba et al., 2002	<i>Acer mono</i>	7% IR	6,5	
Hanba et al., 2001	<i>Acer mono</i> Maxim.	17% IR	14,0	
Hanba et al., 2002	<i>Acer palmatum</i>	17% IR	8,0	
Hanba et al., 2002	<i>Acer palmatum</i>	7% IR	8,0	
Hanba et al., 2001	<i>Acer palmatum</i> Thunb.	17% IR	8,0	
Hanba et al., 2002	<i>Acer rufinerve</i>	17% IR	9,0	
Hanba et al., 2002	<i>Acer rufinerve</i>	7% IR	9,0	
Hanba et al., 2001	<i>Acer rufinerve</i> Sieb. et Zucc.	17% IR	8,5	
Horská, 2013	<i>Fagus sylvatica</i> L.	stinný ekotyp	$6,9 \pm 1,8$	stereologické metoda fakír**
Tosens et al, 2012	<i>Populus tremula</i> L.	nízká IR	15,0	Evans et al. (1994)*
Syvertsen et al., 1995	<i>Prunus persica</i> L. Batsch	stinný ekotyp	26,6	Thain (1983) a Evans et al. (1994)*
Hanba et al., 2002	<i>Acer mono</i>	plná IR	12,0	Thain (1983)*
Hanba et al., 2001	<i>Acer mono</i> Maxim.	plná IR	12,0	
Hanba et al., 2002	<i>Acer palmatum</i>	plná IR	10,0	
Hanba et al., 2001	<i>Acer palmatum</i> Thunb.	plná IR	10,0	
Hanba et al., 2002	<i>Acer rufinerve</i>	plná IR	18,5	
Hanba et al., 2001	<i>Acer rufinerve</i> Sieb. et Zucc.	plná IR	18,0	
Hanba et al., 2001	Steud.		20,0	
Horská, 2013	<i>Fagus sylvatica</i> L.	slunný ekotyp	$8,8 \pm 2,2$	stereologické metoda fakír**
Hanba et al., 2001	<i>Populus maximowiczii</i> A. Henry		78,0	Thain (1983)*
Tomás et al., 2013	<i>Acer negundo</i>		$14,4 \pm 2,4$	Thain (1983) a Evans et al. (1994)*
Tomás et al., 2013	<i>Alnus subcordata</i>		$16,3 \pm 2,8$	
Tomás et al., 2013	<i>Betula pubescens</i>		$20,9 \pm 0,4$	
Tomás et al., 2013	<i>Catalpa speciosa</i>		$24,9 \pm 3,8$	
Tomás et al., 2013	<i>Quercus brantii</i>		$31,0 \pm 0,9$	Evans et al. (1994)*
Tosens et al, 2012	<i>Populus tremula</i> L.	vysoká IR	24,0	
Syvetsen et al., 1995	<i>Prunus persica</i> L. Batsch	slunný ekotyp	30,1	Thain (1983) a Evans et al. (1994)*
Slaton et Smith, 2002	<i>Prunus serotina</i>		$5,9 \pm 0,4$	Thain (1983)*

Tabulka 5.1: Tabulka hodnot vnitřního povrchu listu vztaženého na jednotkovou plochu listu listu, S_{mes}/S , uváděných literárními zdroji pro listnaté opadavé stromy, IR, ozáření, *, model dle příslušného autora, **,stereologická metoda fakír (Kubínová a Janáček, 1998).

Stereologické metody, které byly použity ke stanovení S_{mes}/S v této práci jsou na tvaru sledované struktury nezávislé (Kubínová a Janáček, 2001). Metoda fakír umožňuje respektovat tvar buněk i jejich polohu vůči sobě pomocí trojrozměrného systému sond. Pozorovatel označuje povrch mezofylu vystaveného mezibuněčným prostorům při přechodu sondy na hranici mezibuněčného prostora – buněčná stěna mezofylové buňky. Stereologické metody nevytváří aproximace tvarů buněk na určitý tvar, ale hodnotí konkrétní nasnímanou strukturu. Riziko nadhodnocení odhadu je zde oproti metodám založeným na modelu minimální. Podmínkou je zaškolení a kalibrace pozorovatele, během kterého se pozorovatel naučí jednoznačně rozeznávat struktury listu a odlišit hranice jednotlivých mezofylových buněk.

K odhadu hustoty vnitřního povrchu mezofylu pomocí stereologické metody fakír byly použity zmrazené listy buku lesního. Je mi známo, že zmrazení méně sklerifikovaných rostlinných pletiv vede ke změně v nich obsažené vody ve skupenství ledu a může způsobit zhroucení buněčných stěn (Ashworth et al., 1993 a 2002), nicméně mnohé dřeviny s tuhou buněčnou stěnou na zmrazení kolapsem buněk nereagovaly (Malone and Ashworth, 1991). Tato práce vychází z předešlých experimentů s jehlicemi smrku, u kterých nebylo pozorováno poškození buněčných stěn vlivem zmrazení a nebyly shledány rozdíly v hustotě povrchu mezofylu (ISD) naměřené na čerstvém a zmrazeném materiálu (Lhotáková et al., 2008).

Metoda fakír je využitelná i pro práci s rostlinným materiálem, který kolapsu buněčných stěn při zmrazení podléhá. Úspěšné měření hustoty vnitřního povrchu mezofylu bylo provedeno na sériích optických řezů získaných konfokálním mikroskopem z klasických parafínových řezů jehlic jedle balzámové (Lhotáková et al., 2007). Jedinou podmínkou pro vytvoření sérií optických řezů na konfokálním

fluorescenčním mikroskopu je zachování autofluorescence rostlinného materiálu nebo fluorescenční barvení buněčných stěn.

5.2 Vliv koncentrace CO₂

Zvýšená koncentrace CO₂ v tomto experimentu měla za následek navýšení mocnosti palisádového parenchymu v roce 2012, tedy po sedmi letech experimentálního ošetření, což je v souladu s reakcí dalších druhů dřevin (Saxe et al., 1998; Eguchi et al., 2004; Ferris et al., 2001).

Důvod, proč navýšení mocnosti palisádového parenchymu nebylo v mé práci zjištěno na experimentálním materiálu z roku 2009, tedy po čtyřech letech ošetření EC, může být vysvětlen několika způsoby:

Odběry v obou sezonách se liší počtem experimentálních vzorků. Zatímco v roce 2009 byly odebírány vzorky pouze vzorky slunných listů z 5ti stromů z každé varianty ošetření CO₂ (celkem 10 listů). Pro statistické vyhodnocení považuji 5 vzorků na variantu jako nezbytné minimum a neprůkazné rozdíly mezi ošetřením CO₂ mohly být zjištěny právě díky minimálnímu počtu pozorování. Proto byl v roce 2012 počet sledovaných stromů navýšen na 7. Z důvodu postupného zapojení porostu a diferenciací koruny byly vzorky v roce 2012 odebrány ze slunných i stinných listů, také z obou variant ošetření CO₂ (celkem 28 listů).

Výsledky studií prováděných ve FACE (free air CO₂ enrichment) naznačují, že EC má vliv na rychlost vývoje listu, na dělení a zvětšování buněk v raných stádiích růstu listu (Ferris et al., 2001). Doba odběrů listů pro tento experiment se mezi oběma sezonami lišila. V roce 2009 byl odběr proveden na konci srpna, a v roce 2012 na konci července, tedy o něco dříve. Touto dobou by měly být listy

již plně vyvinuté. Přesto je možné, jak uvádí některé studie, pokud CO₂ přispívá k urychlení nebo naopak zpomalení vývoje listu, pak je možné, že změny, které byly pozorovány byly vyvolány odlišnou rychlostí vývoje listu (Ferris et al. 2001).

Dalším důvodem může být samotná délka experimentu, Tricker et al. (2004) pozorovali změnu mocnosti parenchymů druhu *Populus* v prvním roce ošetření EC ale následujících dvou sezonách již ne. S ohledem na variabilitu odpovědi jednotlivých stromů (Saxe et al., 1998) se můžeme domnívat, že buk může vykazovat opačný trend a odpovídat na zvýšenou koncentraci CO₂ s několikaletým zpožděním.

Zároveň se zvýšením mocnosti palisádového parenchymu byla pozorována v roce 2012 tendence navýšení vnitřního povrchu listu v EC. Eguchi et al. (2004) ovšem uvádí navýšení vnitřního povrchu listu v podmínkách EC zároveň se zvýšením asimilační aktivity pouze za dostatečné dostupnosti dusíku. Navýšení asimilační aktivity, stejně tak jako nárůst vnitřního povrchu listu, v podmínkách EC a dobré dostupnosti dusíku Eguchi et al. (2004) připisují změnám velikosti a počtu buněk v mezofylu. Pokud byl dusík dobře dostupný, velikost buněk se zmenšila, ale vzrostl jejich počet. Naopak při nízké dostupnosti dusíku v podmínkách EC velikost buněk rostla a počet mezofylových buněk klesal, což se na vnitřním povrchu listu projevilo jeho zmenšením, spolu se snížením fotosyntetické kapacity listu (Eguchi et al. 2004). V případě dobré dostupnosti N a EC tedy listy efektivně využily dostupných zdrojů, CO₂ a dusíku, k navýšení kapacity fotosyntetických pletiv. Zdá se, že dostupnost dusíku hraje významnou roli, v případě jeho nedostatku neumí rostliny využít výhodu, kterou pro ně zvýšená koncentrace CO₂ může představovat (Egli et al., 2001; Miyazawa et al., 2011). Tato práce dostupnost dusíku nezohledňuje, pozornost v ní byla soustředěna především na anátmoické parametry listu

Co se týče strategií zvětšování povrchu mezofylu, je jim věnována práce Terashima et al. (2011). Uvádí čtyři možné varianty zvětšení plochy povrchu mezofylu: i) prodloužením buněk, ii) prodloužením buněk s doprovodným buněčným dělením, iii) zmenšením velikosti buněk a navýšením jejich počtu, nebo iii) zvrásněním povrchu buněk. K tomu, aby došlo k navýšení S_{mes}/S je nutné dosáhnout vyšší mocnosti listu, protože je třeba vytvořit prostory pro umístění chloroplastů, jejichž povrch sousedící s buněčnou stěnou vystavenou mezibuněčným prostorům v konečném důsledku vytváří významný rozdíl v rychlosti difuze CO_2 do listů (Terashima et al., 2011).

Anatomické parametry listů reagovaly odlišným způsobem v jednotlivých letech. Zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu byl průkazně nižší u listů z EC pouze v roce 2009. Naopak v roce 2012 byly pozorovány tendence navýšení mocnosti listu a mocnosti mezofylu v podmínkách EC ve srovnání s AC, průkazný rozdíl byl zaznamenán v případě mocnosti palisádového parenchymu a hustoty vnitřního povrchu listu. Nekonzistence odpovědi na EC při srovnání po čtyřech letech experimentu by mohla přispívat k vyšší pravděpodobnosti vysvětlení malým počtem experimentálních vzorků. Roli může hrát odlišná doba odběru, jak již byla diskutována výše. Je také možné, že stromy v dlouhodobě navýšené koncentraci CO_2 začaly využívat systémové signalizace dospělých listů směrem k vyvíjejícím se listům, jak ji popisuje Miyazawa et al. (2011). Vyvíjející se listy formovaly své anatomické parametry na základě signálů přicházejících z dospělých listů.

Snížený obsah všech sledovaných fotosyntetických pigmentů u listů ošetřených EC, zaznamenaný v roce 2012 byl jednotný a souhlasil s údaji uváděnými v literatuře. U dřevin pěstovaných při vyšší koncentraci CO_2 docházelo ke snížení obsahu pigmentů v listech vyjádřených v mg na gram sušiny listu (Leakey et al, 2002).

Změna mocnosti palisádového parenchymu následovaná trendem ke zvyšování vnitřního povrchu listu, pozorovaná v této práci, může naznačovat některou ze strategií zvětšování povrchu mezofylu uvedených výše. Stereologickou metodou fakír byla získána hustota vnitřního povrchu listu. Z těchto dat nejsme schopni vyslovit, jakým způsobem přesně ke změně povrchu mezofylových buněk docházelo. Domnívám se, že hypotéza byla stanovena správně, zvýšená koncentrace CO_2 způsobila navýšení mocnosti palisádového parenchymu a vedla k trendu navýšení mocnosti listu a ke zvýšení vnitřního povrchu listu.

5.3 Vliv ozáření

Míra ozáření měla vliv na všechny sledované parametry kromě zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu listu. Postupně bude věnována pozornost jednotlivým sledovaným parametrům mezofylu a diskutována jejich závislost na ozáření.

MOCNOST PLETIV

Reakce mezofylu a jeho mocnosti na ozáření byla velmi uniformní. Jak v aktuální, tak ve zvýšené koncentraci CO_2 byla celková mocnost mezofylu, palisádového i houbovitého parenchymu vyšší v případě slunných listů. Houbovitý parenchym nevykazoval tak silnou odpověď jako palisádový (Tabulka 4.1). To odpovídá vlastnostem obou parenchymů. Palisádový parenchym slouží zejména k absorpci přímého slunečního záření a vedení tohoto záření k buňkám houbovitého parenchymu (Smith et al., 1997). Přímého záření je v případě slunných listů velké množství, listy proto investují energii do vytvoření palisádového parenchymu, aby dopadající záření maximálně využily. Odpověď houbovitého parenchymu na míru ozáření dosahovala různé míry mezi koncentracemi CO_2 , větší

rozdíl byl pozorován v podmínkách AC (Tabulka 4.2). Slunné listy dosahovaly statisticky významně vyšší mocnosti houbovitého parenchymu než stinné, kdežto v EC nebyl rozdíl mocnosti houbovitého parenchymu statisticky významný. Vysvětlení lze hledat v rychlosti asimilace. V podmínkách EC dochází ke stimulaci fotosyntézy (Kořvancová et al., 2009), rostlina vytváří více asimilátů (Liu et al., 2005) a zvyšuje se množství biomasy (Wang et al., 2000), navíc dochází ke zvýhodnění stinných listů ve EC. Stinné listy v podmínkách dynamického světelného režimu a EC dosahovaly vyššího zisku asimilátů (Leakey et al., 2002; Kořvancová et al., 2009). Stinné listy se tedy v podmínkách EC mohou hodnotami některých parametrů přiblížit hodnotám slunných listů.

Navyšování celkové mocnosti listu je v literatuře uváděno jako častý důsledek zvýšené ozářenosti (Ziegenhagen et al., 1995; Aranda et al., 2001). Slunné listy se snaží využít dostupného zdroje energie, pokud k tomu mají také další příznivé podmínky, např. dostatek dusíku. Není překvapivé, že s mocností celého listu se zvyšuje také mocnost mezofylu a v určitém poměru vůči sobě i mocnost parenchymů. Zdá se ale, že palisádový parenchym k navýšení mezofylu přispívá větší měrou: nižší mocnost listů opadavých dřevin způsobená nižší ozářeností byla spojena se snížením zejména mocnosti palisádového parenchymu (Ziegenhagen et al., 1995; Aranda et al., 2001; Wyka et al., 2012). Přičemž houbovitý parenchym na odlišné podmínky ozářenosti výrazně nereagoval a odlišnost mocnosti svrchní a spodní pokožky listu se také neměnila (Aranda et al., 2001).

Vyšší mocnost slunných listů může být také vysvětlena následujícím způsobem. Jestliže mají slunné listy větší množství Rubisca na plochu listu, mohou vytvářet také větší vnitřní povrch listu, S_{mes}/S , který je předpokladem pro zvýšení S_c . Při vyšším S_c se navýší koncentrace

CO₂ v chloroplastech. Pokud v listu dojde ke změně mocnosti mezofylu, projeví se to také na celkové mocnosti listu (Terashima et al., 2011). Listy s vysokou mocností, které mají velkou hodnotu S_{mes} , jsou zvýhodněné v podmínkách vysoké ozáření, kde mohou dosahovat vysokých hodnot asimilace (Terashima et al., 2011). Mocnost listu je vytvářena jako kompromis mezi nárůstem v S_c pro rozpouštění CO₂, které je pro rostlinu výhodné z hlediska asimilace a snížením množství energie na výstavbu a údržbu listu (Terashima et al., 2006). Byly pozorovány případy, kdy výsledný zisk asimilovaného uhlíku v dynamických světelných podmínkách převýšil investici biomasy do navýšení mocnosti listu (Oguchi et al., 2008). Kapacita k přizpůsobení rostlin dynamickým světelným podmínkám by mohla přispívat k urychlení růstu (Oguchi et al., 2008).

Silnější vztah mezi LMA a A_{max} opadavých stromů může vycházet z vyššího příspěvku mezofylu k navýšení objemu listu, především palisádovým parenchymem (Wyka et al., 2012). Odlišný příspěvek jednotlivých parenchymů k celkovému objemu pletiva může vyvolávat také variabilita v množství dusíku mezi funkčními typy listů. Listy opadavých dřevin měly vyšší průměrné množství dusíku na hmotnost listu, to může vysvětlovat fakt, že stromy vykazovaly vyšší A_{max} navzdory nižší LMA (oproti sledovaným jehličnanům) (Wyka et al., 2012). Rozdílnost slunného a stinného ekotypu je u listnatých stromů mnohem výraznější než u stálezelených jehličnanů, což může vyplývat z víceletého cyklu tvorby jehlic u jehličnanů (Wyka et al., 2012).

ZASTOUPENÍ MEZIBUNĚČNÝCH PROSTOR

Hanba et al. (1999) popisují negativní lineární závislost porozity mezofylu na mocnosti listu. Porozita mezofylu byla poměrně malá u stálezelených druhů s tendencí být nižší u druhů s vysokou

mocností mezofylu (Hanba et al, 1999). Tato zjištění souhlasí s našimi výsledky, kdy zastoupení mezibuněčných prostor bylo nezávislé na vnějších podmínkách, tedy koncentraci CO₂ a ozáření, ale formovalo se v závislosti na mocnosti listu případně mocnosti mezofylu (Příloha, Graf P1A, B). Mocnost listu na zvýšení koncentrace CO₂ a ozáření odpovídala přímo úměrně. Podle statistických významností vlivu jednotlivých faktorů (Tabulka 4.1) se jeví reakce na ozáření intenzivnější oproti reakci na EC. Podobný jev, tedy jednoznačně silnější efekt ozáření na formování vnitřních parametrů mezofylu (vnitřní povrch listu, objemová hustota mezofylu) oproti efektu okolní koncentrace CO₂, byl popsán také u jehlic smrku ztepilého (Lhotáková et al. 2012).

Hanba et al. (2002) uvádí nižší porozitu mezofylu při plné ozáření ve srovnání se stinnými podmínkami, ovšem hodnoty mocnosti mezofylu experimentálních jedinců jsou u plně ozářených listů vyšší. Podíl zastoupení intercelulár v mezofylu může ovlivňovat vodivost pro CO₂ plynné fáze v mezofylu listu. Pokud vodivost mezofylu pro CO₂ v plynné fázi významně ovlivňuje celkovou vodivost mezofylu, pak by měla celková vodivost mezofylu vzrůstat s jeho pórovitostí (%IAS). Tomás et al. (2013) ovšem uvádějí, že podíl mezibuněčných prostor na limitaci vodivosti mezofylu je poměrně nízký (4–22%), zejména proto, že rychlost difuze CO₂ ve vzduchu v mezibuněčných prostorech je vyšší než rychlost jeho difuze uvnitř buněk. Pokud by byla limitujícím faktorem celkové vodivosti mezofylu pro CO₂ vodivost vodní fáze, předpokládáme pozitivní korelaci celkové vodivosti mezofylu pro CO₂ s parametrem S_c . Pozitivní vztah mezi S_c a vodivostí mezofylu, spolu s pozitivní korelací k rychlosti čisté asimilace uvádějí Tosens et al. (2012,a) pro *Populus tremula*. Tosens et al (2012,b) uvádí největší limitaci celkové vodivosti mezofylu právě vodní fázi.

HUSTOTA VNITŘNÍHO POVRCHU MEZOFYLU

Navýšení ISD u slunných listů v AC je možné vysvětlit stejnou teorií jako v případě houbovitého parenchymu, listy v podmínkách EC pravděpodobně díky účinnějšímu využití koncentrace CO_2 mohou hodnoty anatomických parametrů přibližovat hodnotám listů slunných, podrobněji bylo uvedeno výše. Hustota vnitřního povrchu mezofylu byla stanovena u slunných a stinných jehlic smrku ztepilého (Lhotáková et al. 2012), ale nevykazovala závislost ani na koncentraci CO_2 ani na ozáření. Hustota povrchu mezofylu není běžně uváděným parametrem v literárních údajích. V mé práci byla ISD získána pomocí stereologické metody fakír, která není široce využívána.

VNITŘNÍ POVRCH LISTU

Vnitřní povrch listu *F. sylvatica*, který byl stanoven v této práci vykazuje závislost na intenzitě ozáření, přičemž hodnoty S_{mes}/S u slunných listů byly vyšší než stinných pouze v podmínkách EC. Závislost S_{mes}/S na intenzitě ozáření uvádí studie Terashima et al. (2006), listy rostoucí ve slunných podmínkách měly vnitřní povrch listu vyšší než listy stinné. Také listy s vyšší mocností mezofylu měly tendenci dosahovat vyšších hodnot S_{mes}/S a menší objemový podíl mezibuněčných prostor a celkového mezofylového pletiva (Hanba et al, 1999). Srovnání průměrných hodnot pro všechny typy ošetření této práce vykazuje stejné chování: vyšší mocnost mezofylu je následována vyšším poměrem S_{mes}/S a nižší hodnotou IAS (Příloha, Grafy P1 a P2). Hanba et al, (1999) pozorovali vztah přímé úměry mezi S_{mes}/S a mocností listu u stálezelených druhů. Vyšší S_{mes}/S může být způsoben vyvinutějším palisádovým parenchymem v listech s vyšší mocností mezofylu, což dokumentuje práce Turrela (1936): palisádový parenchym má větší povrch mezofylu vystaveného

mezibuněčným prostorám než parenchym houbovité. Je zřejmé, že hodnoty S_{mes}/S závisí na uspořádání jednotlivých buněk v mezofylu, jejich velikosti a míře kontaktu mezi nimi.

Oguchi et al. (2008) uvádí strategii, jak zvýšit hodnoty S_{mes}/S . Je možné vyššího S_{mes}/S dosáhnout: i) větším počtem malých buněk na plochu listu beze změny jeho mocnosti, nebo ii) vytvořit více mezofylových buněk na plochu bez změny jejich velikosti, nebo iii) navýšit vertikální rozměr buněk bez horizontálního rozšíření. První varianta přispívá k nárůstu pevnosti/ tuhosti listu, zatímco druhá a třetí podporuje vzrůst kapacity zadržení vody a tepelné kapacity se zvýšenou mocností listu. Z toho můžeme uvažovat, jak se může list buku chovat se změnou klimatických podmínek. S nárůstem CO_2 v atmosféře je spojeno snížení vodivosti průduchů listů, čímž se dosahuje vyšší účinnosti vody, pro slunný list by v tom případě bylo výhodné navýšit počet buněk mezofylu o stejné velikosti, nebo zvyšovat vertikální hodnoty velikosti buněk, tedy dvě poslední jmenované varianty. S očekávanými extrémními teplotami a delšími suchy by bylo také výhodné volit druhé dvě varianty. Teorie tedy mluví ve prospěch navýšení mocnosti listu buku se změnou klimatických podmínek očekávaným směrem, k vyšším hodnotám atmosferické koncentrace CO_2 , větším výkyvům teplot a delším periodám sucha (Gessler et al., 2007).

Kapitola 6 **Závěr**

Tato kapitola stručně shrnuje splnění cílů a stanovených hypotéz. Hodnotí přínos práce a její výsledky zasazuje do širšího kontextu.

Má diplomová práce byla vypracovávána v rámci řešení grantového projektu GAČR P501/10/0340, který je zaměřen na studium vlivu zvýšené koncentrace CO₂ a ozáření na strukturu a funkci fotosyntetického aparátu buku lesního na různých hierarchických úrovních. V diplomové práci jsem se soustředila pouze na vyhodnocení a diskuzi výsledků anatomické analýzy mezofylu buku, kterou jsem sama prováděla. Výsledky mé práce budou prezentovány na 13. Konferenci experimentální biologie rostlin v Košicích (10. – 13. září 2013) a následně interpretovány společně s výsledky dalších spoluřešitelských pracovišť za účelem sepsání impaktované publikace.

Stanovené cíle práce považuji za úspěšně splněné:

Cíl 1.

Stereologická metoda fakír byla úspěšně aplikována na bifaciální list buku lesního. Hodnoty vnitřního povrchu listu S_{mes}/S získané touto metodou byly srovnatelné s hodnotami uváděnými v literatuře pro listnaté stromy. S ohledem na konkrétní experimentální materiál je po uvedených úpravách stereologická metoda fakír využitelná univerzálně pro odhad vnitřního povrchu listu S_{mes}/S z nejrůznějšího listového materiálu. Cíl aplikovat stereologickou metodu fakír na bifaciálním listu buku lesního pro stanovení vnitřního povrchu mezofylu byl úspěšně splněn.

Cíl 2.

Ze sledovaných anatomických parametrů mezfyly listu buku lesního na zvýšenou koncentraci CO₂ reagovaly jen některé a jejich změny nebyly konzistentní v obou sledovaných vegetačních sezónách. Odpověď listů buku lesního na dlouhodobé ošetření EC se projevila navýšením mocnosti palisádového parenchymu a tendencí k navýšení vnitřního povrchu listu S_{mes}/S . Na základě získaných výsledků nejsme schopni přesně definovat, jakým způsobem docházelo ke změně povrchu mezofylových buněk. Hypotéza nárůstu mocnosti palisádového parenchymu a zvýšení vnitřního povrchu listu, S_{mes}/S při EC nebyla vyvrácena. Zvýšení mocnosti listu v závislosti na koncentraci CO₂ průkazné nebylo.

Cíl 3.

Vliv ozáření na anatomické parametry listu byl zaznamenán u všech parametrů kromě zastoupení mezibuněčných prostor v mezofyly. Mocnost listu, mocnost mezofyly a jednotlivých parenchymů slunných listů byla vždy vyšší bez ohledu na koncentraci CO₂. Hustota vnitřního povrchu mezofyly se v aktuální koncentraci CO₂ statisticky významně lišila mezi slunnými a stinnými listy na rozdíl od varianty ze zvýšené koncentrace CO₂, kde hustota vnitřního povrchu listu nebyla závislá na ozáření. Tyto výsledky podporují stanovenou hypotézu, že diferenciaci slunných a stinných listů bude méně výrazná při zvýšené koncentraci CO₂. Parametr S_{mes}/S moji hypotézu nepotvrzuje, jeho rozdíl je vyšší mezi slunnými a stinnými listy ve zvýšené koncentraci.

Ve své diplomové práci jsem získala údaje o reakcích vybraných anatomických parametrů listu buku lesního na ozáření a zvýšenou

koncentraci CO₂. Studie byla sice provedena na juvenilních jedincích, ale v experimentálním systému, kde jedinec není izolovaný a je součástí zapojeného porostu. Podstatný význam má i zpracování materiálu ze dvou vegetačních sezón s tříletým odstupem. V průběhu růstu stromů a zapojování porostu na stanovišti totiž dochází ke změně světelných podmínek a reakce stromů na zvýšenou koncentraci CO₂ se může v čase měnit, jak dokumentuje i studie na topolech (Tricker et al. 2004). Velký podíl literárních údajů o reakcích dřevin na EC pochází ze studií na semenáčcích, které podle práce Egli et al. (1998) nejsou pro takové studie vhodné, protože většinou odpovídají odlišně než dospělí jedinci a je těžké pak takové výsledky vztahovat na vzrostlý lesní porost. V tomto smyslu Egli et al. (1998) varují, že závěry vyvozené ze studií s mladými jedinci mohou efekt EC na lesy v přirozených ekosystémech značně nadhodnocovat.

Dalším aspektem je dlouhodobost experimentů. Některé práce označují experimenty za dlouhodobé, pokud je experimentální materiál ošetřen déle než jednu růstovou sezónu. Avšak z hlediska délky života stromů je jedna růstová sezóna velmi krátkým časovým úsekem a nelze z ní vyvozovat závěry pro dlouhodobé chování stromů. Při vyhodnocování výsledků je třeba mít také na paměti genetickou variabilitu jednotlivých experimentálních jedinců. Ziegenhagen et al. (1995) uvádí, že genetická odlišnost lesních druhů je obzvlášť vysoká.

Z nastudovaných prací usuzují, že semenáčky a mladé stromky reagují odlišně než dospělé stromy. Problém je, že prací na dospělých stromech je stále nedostatek, kvůli náročnosti provedení takových experimentů. Z nastudovaných prací také většinou vyplývá, že dospělé stromy netrpí tak velkým nedostatkem rezervních úložišť, kam je možné v případě zvýšené asimilace ukládat přebytečné

asimiláty. V případě mladých jedinců je velmi častá aklimační deprese pravděpodobně z důvodu nevytvoření rezervních sinků pro takové stavy. Tyto skutečnosti je třeba brát v úvahu v případě zalesňování. Zdá se, že dospělé porosty buku lesního nebudou mít ve zvýšené atmosferické koncentraci CO₂ větší problémy. Co se týče nově vysazovaných semenáčků, předpokládám na základě studované literatury, že míra jejich kompetice v EC v kombinaci s provázejícími jevy bude značně snížena.

Na závěr bych ráda zdůraznila, že na základě citované literatury a vlastních výsledků nepozoruji obecný trend u buku, co se týče odpovědi na CO₂ ve fotosyntetické aktivitě, růstu, ani schopnosti kompetovat. Kvůli lišícím se interakcím mezi faktory prostředí musí být bráno v úvahu, že dlouhodobé růstové odpovědi buku na EC budou obecně různé a budou záviset na mnoha vlivech přirozeného lesního stanoviště (Gessler et al, 2007).

Zdroje a použitá literatura

Ainsworth EA, Rogers A. 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising CO₂ : mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell and Environment* 30(3): 258–270.

Aranda I, Bergasa LF, Gil L, Pardos JA. 2001. Effects of relative irradiance on the leaf structure of *Fagus sylvatica* L. seedlings planted in the understory of a *Pinus sylvestris* L. stand after thinning. *Annals of Forest Science* 58(6): 673–680.

Ashworth EN, Malone SR, Ristic Z. 1993. RESPONSE OF WOODY PLANT-CELLS TO DEHYDRATIVE STRESS. *International Journal of Plant Sciences* 154(1): 90–99.

Ashworth EN, Pearce RS. 2002. Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species. *Planta* 214(5): 798–805.

Brooks JR, Hinckley TM, Sprugel DG. 1994. Acclimation responses of mature abies amabilis sun foliage to shading. *Oecologia* 100(3): 316–324.

Ceulemans R, Mousseau M. 1994. Tansley review no-71 – effects of elevated atmospheric co₂ on woody-plants. *New Phytologist* 127(3): 425–446.

Cseke LJ, Tsai CJ, Rogers A, Nelsen MP, White HL, Karnosky DF, Podila GK. 2009. Transcriptomic comparison in the leaves of two aspen genotypes having similar carbon assimilation rates but different partitioning patterns under elevated CO₂. *New Phytologist* 182(4): 891–911.

Deng YM, Shao QS, Li CC, Ye XQ, Tang RS. 2012. Differential responses of double petal and multi petal jasmine to shading: II. Morphology, anatomy and physiology. *Scientia Horticulturae* 144: 19–28.

Egli P, Maurer S, Gunthardt-Goerg MS, Korner C. 1998. Effects of elevated CO₂ and soil quality on leaf gas exchange and above-ground growth in beech-spruce model ecosystems. *New Phytologist* 140(2): 185–196.

Egli P, Maurer S, Spinnler D, Landolt W, Gunthardt-Georg MS, Korner C. 2001. Downward adjustment of carbon fluxes at the biochemical, leaf, and

ecosystem scale in beech–spruce model communities exposed to long-term atmospheric CO₂ enrichment. *Oikos* **92**(2): 279–290.

Eguchi N, Fukatsu E, Funada R, Tobita H, Kitao M, Maruyama Y, Koike T. 2004. Changes in morphology, anatomy, and photosynthetic capacity of needles of Japanese larch (*Larix kaempferi*) seedlings grown in high CO₂ concentrations. *Photosynthetica* **42**(2): 173–178.

Eschrich W, Burchardt R, Essiamah S. 1989. The induction of sun and shade leaves of the European beech (*Fagus sylvatica* L.): anatomical studies. *Trees–Structure and Function* **3**(1): 1–10.

Evans JR, Voncaemmerer S, Setchell BA, Hudson GS. 1994. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**(4): 475–495.

Ferris R, Sabatti M, Miglietta F, Mills RF, Taylor G. 2001. Leaf area is stimulated in *Populus* by free air CO₂ enrichment (POPFACE), through increased cell expansion and production. *Plant Cell and Environment* **24**(3): 305–315.

Gessler A, Keitel C, Kreuzwieser J, Matyssek R, Seiler W, Rennenberg H. 2007. Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees–Structure and Function* **21**(1): 1–11.

Hanba YT, Kogami H, Terashima I. 2002. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. *Plant Cell and Environment* **25**(8): 1021–1030.

Hanba YT, Miyazawa SI, Terashima I. 1999. The influence of leaf thickness on the CO₂ transfer conductance and leaf stable carbon isotope ratio for some evergreen tree species in Japanese warm-temperate forests. *Functional Ecology* **13**(5): 632–639.

Hirano A, Hongo I, Koike T. 2012. Morphological and physiological responses of Siebold's beech (*Fagus crenata*) seedlings grown under CO₂ concentrations ranging from pre-industrial to expected future levels. *Landscape and Ecological Engineering* **8**(1): 59–67.

- Holisova P, Zitova M, Klem K, Urban O. 2012. Effect of Elevated Carbon Dioxide Concentration on Carbon Assimilation under Fluctuating Light. *Journal of Environmental Quality* 41(6): 1931–1938.
- Hrstka M, Urban O, Babak L. 2012. Seasonal changes of Rubisco content and activity in *Fagus sylvatica* and *Picea abies* affected by elevated CO₂ concentration. *Chemical Papers* 66(9): 836–841.
- Koike T, Kato S, Shimamoto Y, Kitamura K, Kawano S, Ueda K, Mikami T. 1998. Mitochondrial DNA variation follows a geographic pattern in Japanese beech species. *Botanica Acta* 111(1): 87–91.
- Korner C. 2003. Carbon limitation in trees. *Journal of Ecology* 91(1): 4–17.
- Kosvancova M, Urban O, Sprtova M, Hrstka M, Kalina J, Tomaskova I, Spunda V, Marek MV. 2009. Photosynthetic induction in broadleaved *Fagus sylvatica* and coniferous *Picea abies* cultivated under ambient and elevated CO₂ concentrations. *Plant Science* 177(2): 123–130.
- Kozlowski T.T. & Pallardy S.G. 1997 *Physiology of Woody Plants*. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Kubinova L, Janacek J. 1998. Estimating surface area by the isotropic fakir method from thick slices cut in an arbitrary direction. *Journal of Microscopy-Oxford* 191: 201–211.
- Kubinova L, Janacek J. 2001. Confocal microscopy and stereology: Estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. *Microscopy Research and Technique* 53(6): 425–435.
- Kuppers M, Schneider H. 1993. Leaf gas-exchange of beech (*fagus-sylvatica* l) seedlings in lightflecks – effects of fleck length and leaf temperature in leaves grown in deep and partial shade. *Trees-Structure and Function* 7(3): 160–168.
- Leakey ADB, Ainsworth EA, Bernacchi CJ, Rogers A, Long SP, Ort DR. 2009. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* 60(10): 2859–2876.

- Leakey ADB, Press MC, Scholes JD, Watling JR. 2002.** Relative enhancement of photosynthesis and growth at elevated CO₂ is greater under sunflecks than uniform irradiance in a tropical rain forest tree seedling. *Plant Cell and Environment* **25**(12): 1701–1714.
- Lhotakova Z, Albrechtova J, Janacek J, Kubinova L. 2008.** Advantages and pitfalls of using free-hand sections of frozen needles for three-dimensional analysis of mesophyll by stereology and confocal microscopy. *Journal of Microscopy* **232**(1): 56–63.
- Lhotakova Z, Urban O, Dubankova M, Cvikrova M, Tomaskova I, Kubinova L, Zvara K, Marek MV, Albrechtova J. 2012.** The impact of long-term CO₂ enrichment on sun and shade needles of Norway spruce (*Picea abies*): Photosynthetic performance, needle anatomy and phenolics accumulation. *Plant Science* **188**: 60–70.
- Lhotákova Z, Albrechtova J, Seidl Z, Kubinova L, Aitkenhead-Peterson J, Rock BN.** Vliv struktury mezofylu na odrazivost jehlic jedle balzámové (*Abies balsamea* L. Mill). 2007, Poster, XII Dny fyziologie rostlin, Olomouc 2007, Sborník abstraktů
- Liu XP, Grams TEE, Matyssek R, Rennenberg H. 2005.** Effects of elevated pCO₂ and/or pO₃ on C-, N-, and S-metabolites in the leaves of juvenile beech and spruce differ between trees grown in monoculture and mixed culture. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**(2): 147–154.
- Long SP, Bernacchi CJ. 2003.** Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* **54**(392): 2393–2401.
- Malone SR, Ashworth EN. 1991.** Freezing stress response in woody tissues observed using low-temperature scanning electron-microscopy and freeze substitution techniques. *Plant Physiology* **95**(3): 871–881.
- Marek M a kol. 2011.** Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu. Vyd. 1. Praha : Academia.
- Marek MV, Urban O, Sprtova M, Pokorný R, Rosova Z, Kulhavy J. 2002.** Photosynthetic assimilation of sun versus shade Norway spruce *Picea abies*

(L.) Karst needles under the long-term impact of elevated CO₂ concentration. *Photosynthetica* **40**(2): 259–267.

Matyssek R, Wieser G, Calfapietra C, de Vries W, Dizengremel P, Ernst D, Jolivet Y, Mikkelsen TN, Mohren GMJ, Le Thiec D, Tuovinen JP, Weatherall A, Paoletti E. 2012. Forests under climate change and air pollution: Gaps in understanding and future directions for research. *Environmental Pollution* **160**: 57–65.

Miyazawa SI, Terashima I. 2001. Slow development of leaf photosynthesis in an evergreen broad-leaved tree, *Castanopsis sieboldii*: relationships between leaf anatomical characteristics and photosynthetic rate. *Plant Cell and Environment* **24**(3): 279–291.

Miyazawa SI, Warren CR, Turpin DH, Livingston NJ. 2011. Determination of the site of CO₂ sensing in poplar: is the area-based N content and anatomy of new leaves determined by their immediate CO₂ environment or by the CO₂ environment of mature leaves? *Journal of Experimental Botany* **62**(8): 2787–2796.

Moore BD, Cheng SH, Rice J, Seemann JR. 1998. Sucrose cycling, Rubisco expression, and prediction of photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell and Environment* **21**(9): 905–915.

Moore BD, Cheng SH, Sims D, Seemann JR. 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell and Environment* **22**(6): 567–582.

Nakano H, Makino A, Mae T. 1997. The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology* **115**(1): 191–198.

Niinemets U. 2010. A review of light interception in plant stands from leaf to canopy in different plant functional types and in species with varying shade tolerance. *Ecological Research* **25**(4): 693–714.

Niinemets U, Flexas J, Penuelas J. 2011. Evergreens favored by higher responsiveness to increased CO₂. *Trends in Ecology & Evolution* **26**(3): 136–142.

- Niinemets U, Lukjanova A, Turnbull MH, Sparrow AD. 2007.** Plasticity in mesophyll volume fraction modulates light-acclimation in needle photosynthesis in two pines. *Tree Physiology* **27**(8): 1137–1151.
- Nobel PS. 2005** "Physicochemical and Environmental Plant Physiology, 3. vydání, San Diego, CA Academic Press/Elsevier
- Oguchi R, Hikosaka K, Hirose T. 2003.** Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy? *Plant Cell and Environment* **26**(4): 505–512.
- Oguchi R, Hikosaka K, Hirose T. 2005.** Leaf anatomy as a constraint for photosynthetic acclimation: differential responses in leaf anatomy to increasing growth irradiance among three deciduous trees. *Plant Cell and Environment* **28**(7): 916–927.
- Oguchi R, Hikosaka K, Hiura T, Hirose T. 2008.** Costs and benefits of photosynthetic light acclimation by tree seedlings in response to gap formation. *Oecologia* **155**(4): 665–675.
- Perez P, Morcuende R, del Molino IM, Martinez-Carrasco R. 2005.** Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* **53**(1): 13–27.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. 1989.** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents – verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta* **975**(3): 384–394.
- Saxe H, Ellsworth DS, Heath J. 1998.** Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytologist* **139**(3): 395–436.
- Slaton MR, Smith WK. 2002.** Mesophyll architecture and cell exposure to intercellular air space in alpine, desert, and forest species. *International Journal of Plant Sciences* **163**(6): 937–948.
- Smith AR, Lukac M, Hood R, Healey JR, Miglietta F, Godbold DL. 2013.** Elevated CO₂ enrichment induces a differential biomass response in a

mixed species temperate forest plantation. *New Phytologist* **198**(1): 156–168.

Smith WK, Vogelmann TC, DeLucia EH, Bell DT, Shepherd KA. 1997. Leaf form and photosynthesis. *Bioscience* **47**(11): 785–793.

Stitt M, Krapp A. 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell and Environment* **22**(6): 583–621.

Syvertsen JP, Lloyd J, McConchie C, Kriedemann PE, Farquhar GD. 1995. On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell and Environment* **18**(2): 149–157.

Tausz M, Warren CR, Adams MA. 2005. Dynamic light use and protection from excess light in upper canopy and coppice leaves of *Nothofagus cunninghamii* in an old growth, cool temperate rainforest in Victoria, Australia. *New Phytologist* **165**(1): 143–155.

Terashima I, Hanba YT, Tazoe Y, Vyas P, Yano S. 2006. Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany* **57**(2): 343–354.

Terashima I, Hanba YT, Tholen D, Niinemets U. 2011. Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis. *Plant Physiology* **155**(1): 108–116.

Thain JF. 1983. Curvature correction factors in the measurement of cell-surface areas in plant-tissues. *Journal of Experimental Botany* **34**(138): 87–94.

Tomas M, Flexas J, Copolovici L, Galmes J, Hallik L, Medrano H, Ribas-Carbo M, Tosens T, Vislap V, Niinemets U. 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* **64**(8): 2269–2281.

- Tomimatsu H, Tang YH. 2012.** Elevated CO₂ differentially affects photosynthetic induction response in two *Populus* species with different stomatal behavior. *Oecologia* **169**(4): 869–878.
- Tosens T, Niinemets U, Vislap V, Eichelmann H, Diez PC. 2012a.** Developmental changes in mesophyll diffusion conductance and photosynthetic capacity under different light and water availabilities in *Populus tremula*: how structure constrains function. *Plant Cell and Environment* **35**(5): 839–856.
- Tosens T, Niinemets U, Westoby M, Wright IJ. 2012b** Anatomical basis of variation in mesophyll resistance in eastern Australian sclerophylls: news of a long and winding path. *Journal of Experimental Botany* **63**(14): 5105–5119.
- Tricker PJ, Calfapietra C, Kuzminsky E, Puleggi R, Ferris R, Nathoo M, Pleasants LJ, Alston V, de Angelis P, Taylor G. 2004.** Long-term acclimation of leaf production, development, longevity and quality following 3 yr exposure to free-air CO₂ enrichment during canopy closure in *Populus*. *New Phytologist* **162**(2): 413–426.
- Turrell, F.M. 1936.** The area of the internal exposed surface of dicotyledon leaves. *American Journal of Botany* **23**,255–264.
- Uemura A, Ishida A, Nakano T, Terashima I, Tanabe H, Matsumoto Y. 2000.** Acclimation of leaf characteristics of *Fagus* species to previous-year and current-year solar irradiances. *Tree Physiology* **20**(14): 945–951.
- Urban O, Kosvancova M, Marek MV, Lichtenthaler HK. 2007.** Induction of photosynthesis and importance of limitations during the induction phase in sun and shade leaves of five ecologically contrasting tree species from the temperate zone. *Tree Physiology* **27**(8): 1207–1215.
- Urban O, Sprtova M, Kosvancova M, Tomaskova I, Lichtenthaler HK, Marek MV. 2008.** Comparison of photosynthetic induction and transient limitations during the induction phase in young and mature leaves from three poplar clones. *Tree Physiology* **28**(8): 1189–1197.
- van Oosten JJ, Wilkins D, Besford RT. 1994.** Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by CO₂ is mimicked by regulation by

carbohydrates – a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂. *Plant Cell and Environment* **17**(8): 913–923.

Wang XZ, Curtis PS, Pregitzer KS, Zak DR. 2000. Genotypic variation in physiological and growth responses of *Populus tremuloides* to elevated atmospheric CO₂ concentration. *Tree Physiology* **20**(15): 1019–1028.

Way DA, Pearcy RW. 2012. Sunflecks in trees and forests: from photosynthetic physiology to global change biology. *Tree Physiology* **32**(9): 1066–1081.

Weibel ER. 1979. Stereological methods. Vol. 1: Practical methods for biological morphometry. London: Academic Press.

Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophyll-a and chlorophyll-b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**(3): 307–313.

Xu CY, Salih A, Ghannoum O, Tissue DT. 2012. Leaf structural characteristics are less important than leaf chemical properties in determining the response of leaf mass per area and photosynthesis of *Eucalyptus saligna* to industrial-age changes in CO₂ and temperature. *Journal of Experimental Botany* **63**(16): 5829–5841.

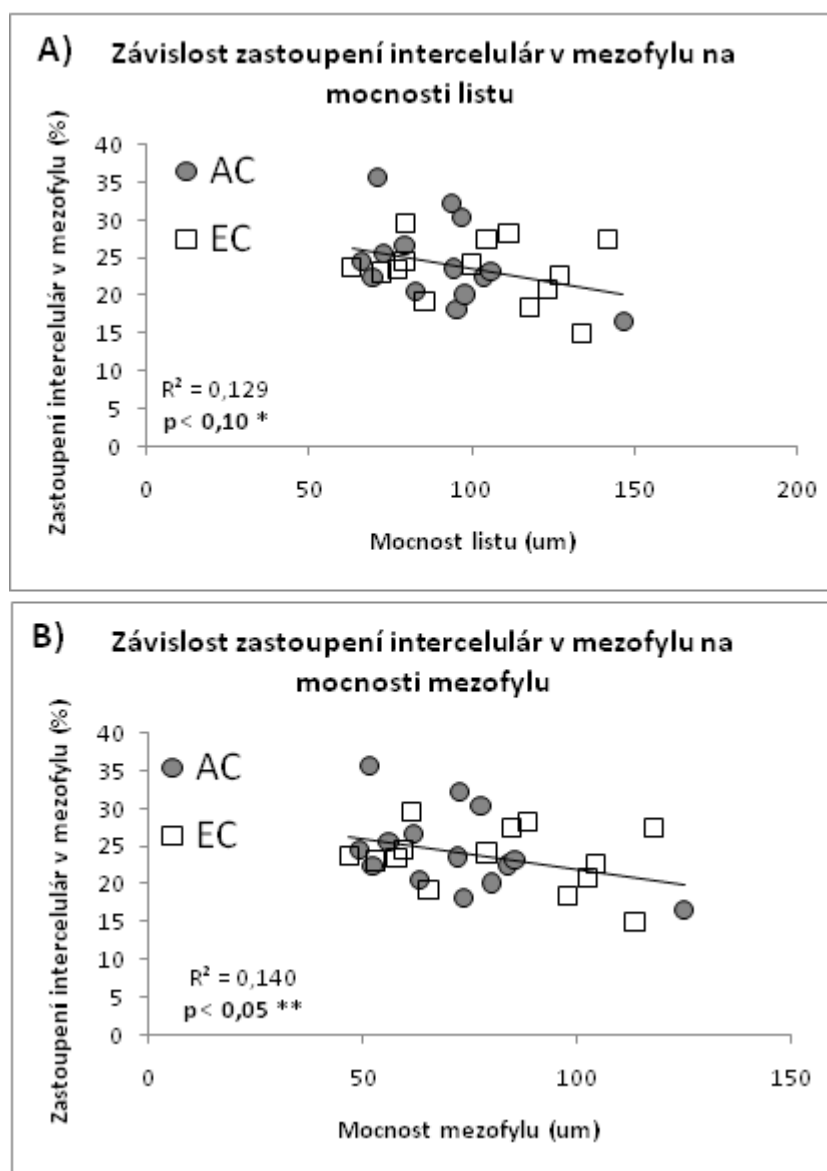
Yano S, Terashima I. 2001. Separate localization of light signal perception for sun or shade type chloroplast and palisade tissue differentiation in *Chenopodium album*. *Plant and Cell Physiology* **42**(12): 1303–1310.

Ziegenhagen B, Kausch W. 1995. Productivity of young shaded oaks (*quercus-robur* l) as corresponding to shoot morphology and leaf anatomy. *Forest Ecology and Management* **72**(2–3): 97–108.

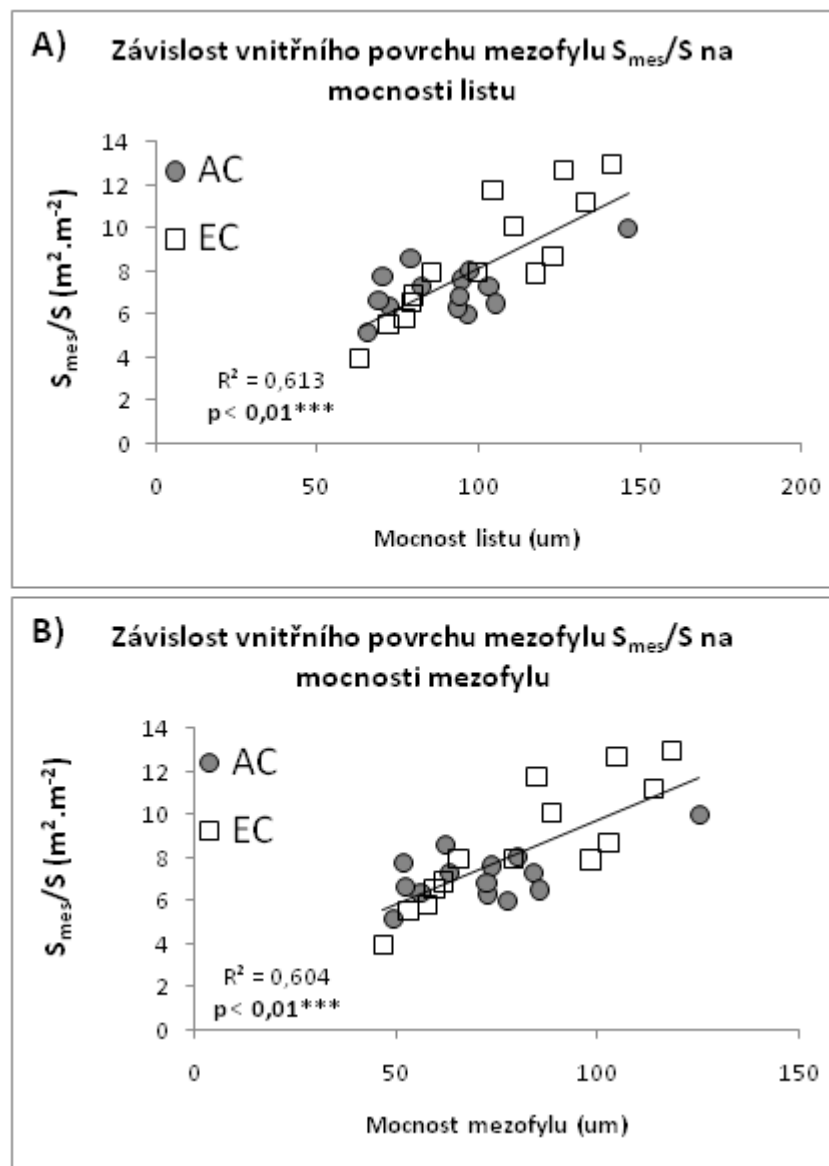
Zotz G, Pepin S, Korner C. 2005. No down-regulation of leaf photosynthesis in mature forest trees after three years of exposure to elevated CO₂. *Plant Biology* **7**(4): 369–374.

Příloha:

Grafy dokumentující závislost zastoupení mezibuněčných prostor na mocnosti listu a mocnosti mezofylu, Graf P 1 A , B, a závislost vnitřního povrchu mezofylu na mocnosti listu a mezofylu. Graf P2 A, B.



Graf P1: Vztah mezi vybranými anatomickými parametry mezofylu: A) Závislost zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu (% IAS) na mocnosti listu; B) Závislost zastoupení mezibuněčných prostor v mezofylu (% IAS) na mocnosti mezofylu. Korelace je statisticky průkazná, když $p < 0,10 *$; $p < 0,05 **$; $p < 0,01 ***$. AC, aktuální koncentrace CO_2 , EC zvýšená koncentrace CO_2 .



Graf P2: Vztah mezi vybranými anatomickými parametry mezofylu: A) Závislost vnitřního povrchu mezofylu S_{mes}/S na mocnosti listu; B) Závislost vnitřního povrchu mezofylu S_{mes}/S na mocnosti mezofylu. Korelace je statisticky průkazná, když $p < 0,10$ *; $p < 0,05$ **; $p < 0,01$ ***. AC, aktuální koncentrace CO_2 , EC zvýšená koncentrace CO_2 .