

Being green may not be easy, but it's definitely not boring.

Barry A. Palevitz

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie rostlin**

**Změny fotosyntetických struktur a fotosyntetické aktivity
během vývoje listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných
rostlinek *Nicotiana tabacum* vlivem ozáření –
fotoinhibice nebo senescence?**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Barbora Radochová

Praha 2006

Vedoucí disertační práce: Doc. RNDr. Ingrid Tichá, CSc.

Předkládaná disertační práce byla vypracována v průběhu postgraduálního studia na Katedře fyziologie rostlin, Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Vlastní experimentální činnost byla umožněna díky finanční podpoře Grantové Agentury Univerzity Karlovy (projekt 96/1998).

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podpořili při vzniku této práce. Poděkování patří zejména:

mojí školitelce Doc. RNDr. Ingrid Tiché, CSc. za trpělivé vedení mé disertační práce,

RNDr. Lucii Kubínové, CSc. za cenné rady a připomínky,

paní Aleně Dědičové za pomoc při statistickém zpracování dat,

Doc. RNDr. Jaromíru Kutíkovi, CSc. za cenné rady a pomoc při přípravě polotenkových řezů

a také všem kolegům nejen z naší laboratoře, kteří mi byli vždy ochotni přispět potřebnou radou.

Zvláštní dík patří mým i manželovým rodičům, zvláště oběma maminkám za hlídání mé dcery Aničky, a taky mému manželovi Mirkovi za lásku a psychickou podporu, díky které jsem mohla tuto práci dokončit.

Obsah

Seznam použitých zkratk	5
1. Úvod	6
2. Literární přehled	8
2.1. Anatomie listu	8
2.1.1. Vliv ozáření na anatomii listu	10
2.1.2. Anatomické změny během vývoje listu	12
2.2. Fotosyntéza	13
2.2.1. Vliv ozáření na fotosyntézu	15
2.2.1.1. Fotoinhibice	16
2.2.2. Fotosyntéza během vývoje listu	17
2.3. Specificita rostlin v <i>in vitro</i> podmínkách	18
2.3.1. Anatomie a morfologie listu v <i>in vitro</i> podmínkách	20
2.3.2. Fotosyntéza a růst rostlin v <i>in vitro</i> podmínkách	23
2.3.3. Vliv zvýšené hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO ₂ během <i>in vitro</i> kultivace – fotoautotrofní versus fotomixotrofní kultivace	24
2.3.3.1. Anatomie a morfologie listu při kultivaci <i>in vitro</i> za zvýšené hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO ₂	25
2.3.3.2. Fotosyntéza a růst při kultivaci <i>in vitro</i> za zvýšené hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO ₂	26
2.3.3.3. Fotoinhibice v <i>in vitro</i> podmínkách	27
2.3.4. Vliv snížené hladiny exogenně přidávané sacharózy během <i>in vitro</i> kultivace na fotosyntézu a růst rostlin	28
3. Materiál a metody	30
3.1. Pokusný materiál a jeho pěstování	30
3.2. Měření rychlosti čisté fotosyntézy a rychlosti temnotního dýchání kyslíkovou elektrodou	32
3.3. Měření fluorescenčních parametrů	33
3.4. Stanovení obsahu chlorofylů v listech	35
3.5. Měření anatomických parametrů listů	36
3.6. Měření růstových parametrů	38
3.7. Zpracování dat a jejich statistické vyhodnocení	38
4. Experimentální část	39
4.1. Růstové charakteristiky 4. listu během jeho vývoje	39
4.2. Anatomické charakteristiky 4. listu během jeho vývoje	43
4.3. Fotosyntetické charakteristiky 4. listu během jeho vývoje	56
4.4. Fluorescenční charakteristiky 4. listu během jeho vývoje	62
5. Diskuse	67
6. Závěr	76
7. Seznam citované literatury	77
8. Přílohy	89

Seznam použitých zkratk

- ADE – adaxiální epidermis
 ABE – abaxiální epidermis
 BHP – buňka houbového parenchymu
 BPP – buňka palisádového parenchymu
 F_0 – základní fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem při aplikaci červeného budícího paprsku o intenzitě $0,01 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, který je příliš slabý, aby způsobil redukci reakčních center PS II.
 F_M - maximální fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem po aplikaci saturačního pulzu, který má dostatečnou intenzitu, aby zredukoval všechna reakční centra fotosystému II.
 F_M' - maximální fluorescence emitovaná fotosyntetizujícím listem po aplikaci saturačního pulzu, který způsobí redukci těch reakčních center, která nebyla dosud zredukována působením aktinického záření
 F_S – ustálená fluorescence emitovaná fotosyntetizujícím listem, u něhož po aplikaci aktinického záření došlo k tzv. fluorescenční indukci
 F_V - variabilní fluorescence, která je rovna rozdílu $F_M - F_0$
 F_V/F_M – maximální fotochemická účinnost fotosystému II
 HI – ozáření $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ během kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách
 HP – houbový parenchym
 LHC I – světlosběrné komplexy fotosystému I
 LHC II – světlosběrné komplexy fotosystému II
 LI - ozáření $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ během kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách
 MI - ozáření $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ během kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách
 MP – mezibuněčné prostory
 NPQ – nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu *a*
 OEC – komplex vyvíjející kyslík
 P_N – rychlost čisté fotosyntézy
 PP – palisádový parenchym
 PP/HP – poměr palisádového a houbového parenchymu
 PS I – fotosystém I
 PS II – fotosystém II
 Q_A – plastochinon A
 Q_B – plastochinon B
 $\phi_{PS II}$ – aktuální fotochemická účinnost fotosystému II
 R_D – rychlost temnotního dýchání
 ROS – reaktivní formy kyslíku

1. Úvod

Kultivace *in vitro* podmínkách je v posledních desetiletích velmi rozšířenou metodou pěstování a množení rostlin, a to nejen pro komerční účely. Vlivem kultivačních podmínek na stavbu a funkci rostlinek se zabývalo a stále zabývá mnoho výzkumných týmů, které řeší zejména otázky související s ovlivněním vývoje rostlinek tak, aby dobře snášely aklimatizaci a další růst ve skleníku či polních podmínkách.

Konvenční podmínky pro *in vitro* kultivace jsou přitom pro vývoj a následnou aklimatizaci rostlinek poměrně nepříznivé. Nízká ozáření a koncentrace CO₂, přidávání jednoduchých sacharidů do média a vysoká vzdušná vlhkost v kultivačních nádobkách způsobují řadu anatomických, morfologických a fyziologických změn, v jejichž důsledku se rostlinky s transferem do *ex vitro* podmínek obtížně vyrovnávají.

V této souvislosti se pozornost výzkumníků často zaměřuje na fotoautotrofní kultivaci rostlinek, při které se obsah cukrů v médiu snižuje či zcela eliminuje, a to za současného zvýšení hladiny ozáření a koncentrace CO₂. Aplikace vyšší hladiny ozáření je však v *in vitro* podmínkách poněkud omezena náchylností těchto rostlinek k fotoinhibici. Fotoinhibice byla popsána – v případě fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek tabáku - již při ozáření okolo 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Projevy fotoinhibice jsou přitom do jisté míry podobné projevům stárnutí, tj. dochází při ní k poklesu fotosyntetické účinnosti a/nebo kapacity, klesá obsah chlorofylů *a+b* a poměr chlorofylů *a/b*, zvyšuje se obsah a deepoxidační stav pigmentů xanthofylového cyklu, klesá i aktuální a maximální fotochemická účinnost fotosystému II a zvyšuje se nefotochemické zhášení.

Dosavadní studie popisující fotoinhibici u fotoautotrofně pěstovaných rostlinek tabáku se týkaly plně rozvinutých listů nebo prvního plně rozvinutého listu počítáno od apexu. Protože vývoj listů probíhá při vyšší ozáření rychleji, a nadměrná ozáření může stárnutí urychlovat, je možné, že uvedené změny jsou ovlivněny též urychlením ontogeneze listu. Proto jsem ve své práci sledovala fotoautotrofně pěstované rostlinky tabáku (*Nicotiana tabacum* L. var. Samsun) během vývoje (čtvrtého) listu, a to při různých hladinách ozáření – konvenční (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a dvou zvýšených (180 a 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Cílem mé práce bylo:

- a) ověřit, zda se při růstu za vyšší ozářenosti urychlí vývoj listu a dříve nastoupí stárnutí; a to sledováním změn anatomie, růstu a fotosyntézy přesně definovaného listu,
- b) zjistit, zda se při kultivaci za nadměrné (tj. fotoinhibiční) ozářenosti nezmění průběh ontogenetických chodů charakteristických pro vývoj listu,
- c) zjistit, zda se fotoinhibice projevuje již u mladých listů.

2. Literární přehled

2.1. Anatomie listu

List je jedním ze tří základních orgánů vyšších rostlin. Je plastičtější než kořen a stonek, a v průběhu evoluce vzniklo mnoho různých typů listů s různými funkcemi. Nejběžnějším typem listu je list asimilační, jehož hlavní funkcí je fotosyntéza a transpirace. Těmto základním funkcím je přizpůsobena i jeho stavba (Bolhár-Nordenkamp 1985, Mauseth 1988).

Typický asimilační list je plochý a tenký. Velká plocha listu, jeho orientace a sklon jsou důležité pro zachycení světelného záření. Velký povrch listu je výhodný i pro dostatečný přísun CO₂ a malá tloušťka listu zase odpovídá možnostem pronikání světla. Rozložení listů na stonku (fylotaxe) tvoří přitom listovou mozaiku tak, aby jednotlivé listy byly co nejméně zastíněny.

Na povrchu listu se nachází pokožka (epidermis), která je obvykle tvořena jednou vrstvou kompaktních buněk. Výměna plynů s atmosférou je limitována průduchy, které jsou tvořeny dvěma specializovanými svěřacími buňkami s chloroplasty. Epidermální buňky bývají na povrchu listu vypouklé a fungují jako systém čoček, které soustředí světelné záření do vrstev mezofylu (Vogelmann et al. 1996). Epidermis chrání list proti nekontrolované ztrátě vody a proti poškození faktory prostředí, např. větrem nebo mikroorganismy. Obsahuje proto vrstvu kutikuly, vosků a trichomy, ale (u angiosperm) obvykle neobsahuje chloroplasty. Vrstva trichomů na povrchu pokožky udržuje kapky rosy nebo deště nad povrchem listu a brání tak poškození listu. Kapky vody mohou díky svému tvaru také fungovat jako čočky a zesilovat světelné záření v listu pod jednotlivými kapkami. Na okrajích listové čepele jsou stěny pokožkových buněk často zesílené, což vyztužuje listové okraje a zpevňuje list.

Svrchní (adaxiální) epidermis nemá obvykle stejný charakter jako epidermis spodní (abaxiální), což vyplývá patrně z toho, že faktory prostředí nepůsobí na obě strany listu stejně. Svrchní pokožka má vrstvu kutikuly a vosků silnější a ani distribuce průduchů nebývá rovnoměrná. Průduchy se nacházejí buď jen ve spodní epidermis (hypostomatické, např.

růže), ve svrchní i spodní epidermis (amfistomatické, např. tabák), nebo jen ve svrchní epidermis (epistomatické, např. leknín). Pokud jde o listy amfistomatické, bývá více průduchů zpravidla ve spodní epidermis, která není přímo vystavena slunečnímu záření. V závislosti na podmínkách prostředí se průduchy nacházejí ve stejné rovině jako epidermální buňky, mohou být však také vyvýšeny nad povrch epidermis nebo naopak vnořeny pod její povrch, případně se vyskytovat v tzv. průduchových kryptách.

Fotosynteticky aktivní listové pletivo, s velkým množstvím chloroplastů, se nazývá mezofyl. Mezi buňkami mezofylu se nacházejí mezibuněčné prostory, které slouží transportu plynů, zejména oxidu uhličitého a vodní páry. Mezibuněčné prostory začínají pod průduchovými štěrbinami, které ústí do poměrně velkých vzájemně propojených mezibuněčných prostor. Mezofylové buňky jsou obvykle uspořádány tak, že velkou částí svého povrchu sousedí s mezibuněčnými prostory a jen malou částí povrchu s ostatními mezofylovými buňkami. Tím se vytváří velký vnitřní povrch listu, který je obvykle 10 – 40 krát větší než listová plocha, což je důležité z hlediska transportu CO₂ do mezofylových buněk.

Mezofylové buňky mají obvykle velkou centrální vakuolu. Chloroplasty jsou umístěny v tenké vrstvě nástěnné cytoplazmy, a to zejména tam, kde buněčné stěny mezofylových buněk sousedí s mezibuněčnými prostory (Psaras et al. 1996). Vzhledem k tomu, že chloroplasty jsou turgorem pevně přitisknuty k buněčné stěně, je dráha CO₂ od povrchu buňky do chloroplastů krátká. Mezofyl bývá často rozlišen na dva typy parenchymu – palisádový a houbovitý. Nachází-li se palisádový parenchym pod svrchní a houbovitý parenchym u spodní epidermis, mluvíme o tzv. listu bifaciálním, který je nejčastějším typem uspořádání mezofylu a je typický i pro listy tabáku. Buňky palisádového parenchymu jsou válcovité a protažené ve směru kolmém na povrch listu. Protože mají přibližně kruhový průřez, souvisí spolu pouze malou částí svých buněčných stěn. Mezibuněčné prostory mezi palisádovými buňkami jsou úzké a fungují jako soustava světlovodných kanálů, kterými se světelné záření šíří do hlubších vrstev mezofylu (Vogelmann 1993). Buňky palisádového parenchymu obsahují mnohem více chloroplastů než buňky houbového parenchymu (Possingham a Saurer 1969, Wild a Wolf 1980). Houbový parenchym je tvořen nepravidelně uspořádanými buňkami různého tvaru, které vytvářejí trojrozměrnou síť s velkými mezibuněčnými prostory. Takováto stavba listu je výhodná pro efektivní využití světelného záření, které se odráží na površích buněk houbového parenchymu a zvyšuje absorpci světla chloroplasty v mezofylu (Vogelmann 2002). Vzhledem k tomu, že i hustota průduchů bývá vyšší na spodní epidermis, je tímto usnadněn i vstup a transport CO₂ do listu.

Cévní svazky jsou vnořeny do mezofylu a obklopeny pochvami, které tvoří jedna nebo více vrstev kompaktních buněk. Tyto buňky mohou být parenchymatické, kolenchymatické a/nebo sklerenchymatické a zajišťují, že vodivé elementy nejsou nikdy v kontaktu s mezibuněčnými prostory, ale pouze se živými buňkami.

2.1.1. Vliv ozáření na anatomii listu

Rostliny jsou schopné přizpůsobit se rozdílným hladinám ozáření tak, že vytváří listy slunného nebo stinného typu. Listy slunného a stinného typu se ve své anatomii výrazně liší (např. Björkman 1981, Bolhár-Nordenkamp 1985, Psaras et al. 1996, Smith et al. 1997, Lee et al. 2000, Vogelmann 2002, Pandey a Kushwaha 2005). Listy slunného typu bývají obvykle menších rozměrů (šířky a délky) a přitom dvakrát až třikrát tlustší než listy stinného typu. Redukovaná velikost listů způsobuje významný nárůst disipace tepla prouděním, což je důležité pro přežití rostlin na suchých stanovištích a při vysoké ozáření, kde jsou listy více ohroženy přehřátím a vysokou rychlostí transpirace (Smith et al. 1997). Větší tloušťka listu je způsobena zejména nárůstem objemu mezofylových buněk, které mají větší povrch a lepší absorpci CO₂, která jim umožňuje zvýšit rychlost čisté fotosyntézy (P_N) na jednotku listové plochy, ačkoliv P_N na jednotku biomasy se měnit nemusí. Listy slunného typu mají delší palisádové buňky a/nebo více vrstev palisádových buněk, které jsou větší, a velmi často i lépe vyvinutý houbový parenchym (Smith a Longstreth 1994, Psaras et al. 1996, Myers et al. 1997, Lee et al. 2000, Yano a Terashima 2004). Mezibuněčné prostory jsou u listů slunného typu menší, protože mezofyl je kompaktnější. Počet chloroplastů v buňkách mezofylu je vyšší, a to jak v palisádovém tak v houbovém parenchymu (Wild a Wolf 1980).

Listy slunného a stinného typu se liší také rozmístěním chloroplastů. Chloroplasty listů slunného typu se nacházejí zejména podél antiklinálních buněčných stěn, zatímco chloroplasty listů stinného typu podél buněčných stěn periklinálních. Tento rozdíl snižuje množství absorbovaného slunečního záření u listů slunného typu asi o 15% (Gorton et al. 1999), čímž se snižuje i pravděpodobnost poškození chloroplastů nadměrnou ozáření (Kasahara et al. 2002). Difúze CO₂ se změnou rozmístění chloroplastů nemění (Evans et al. 1994, Gorton et al. 2003).

Chloroplasty listů slunného a stinného typu se také liší v organizaci thylakoidních membrán (Adamson et al. 1991). Chloroplasty listů stinného typu mají velká nepravidelně

uspořádaná grana, zatímco chloroplasty listů slunného typu obsahují více gran, která jsou menší, mají více škrobu a menší plastoglobuly (Evans 1988).

Větší tloušťka listů slunného typu může být spojena s rovnoměrnějším rozmístěním průduchů na obou površích listu (Mott a Michaelson 1991), čímž se může zlepšit zásobení mezofylových buněk oxidem uhličitým. Průduchy na listech slunného typu bývají menší, ale jejich hustota bývá vyšší (Tichá 1982).

Pro absorpci světelného záření je důležitá i geometrie epidermálních buněk. Smith et al. (1997) uvádějí, že kruhové epidermální buňky jsou výhodnější pro listy stinného typu, neboť více zvyšují absorpční plochu, a to nejen pro převládající hladinu slabšího rozptýleného světelného záření, ale také pro přímé sluneční záření (sluneční skvrny), které proniká porostem a má nízký úhel dopadu. Kruhové epidermální buňky zaostřují světelné záření do mělkých hloubek, což je pro typicky stinné, tenké listy důležité. Při vyšší insolaci působí eliptické epidermální buňky hlubší zaostření dopadajícího světelného záření, což umožňuje jeho rovnoměrnější distribuci uvnitř tlustšího listu. Jakékoli ohýbání přímo dopadajícího světelného záření epidermálními buňkami je však důležité pro prodloužení dráhy fotonů uvnitř listu, které zvyšuje pravděpodobnost, že budou absorbovány chloroplasty (Vogelmann et al. 1996).

V extrémních klimatických podmínkách, jako například v pouštích, je hladina ozáření příliš vysoká a může být pro list škodlivá. V těchto podmínkách jsou listy přizpůsobeny svému prostředí vyšším obsahem trichomů, solných žlázek a epikutikulárních vosků, které zvyšují odrazivost světelného záření z povrchu listu, čímž redukuje jeho absorpci. Takovéto adaptace mohou snížit absorpci světelného záření až o 40%, čímž snižují zahřívání listu i ostatní problémy spojené s absorpcí příliš velkého množství energie (Vogelmann 2002).

Kromě anatomie listu ovlivňuje absorpci dopadajícího světelného záření i sklon listu (Valladares a Pearcy 1999, Gratani a Ghia 2002, Jiang et al. 2006). Cosinový zákon předpovídá přibližně 50% snížení ozáření dopadající v poledne na svrchní epidermis listu skloněného v úhlu 60°. Díky odrazu světelného záření z okolních objektů je navíc spodní epidermis takto skloněného listu vystavena asi jedné čtvrtině plného slunečního záření (Myers et al. 1997). Sklon listu může redukovat nadbytek světelného záření dopadajícího na svrchní stranu listu a zvýšit množství světelného záření dopadajícího na spodní stranu listu, kde se může využít chloroplasty umístěnými blízko povrchu.

2.1.2. Anatomické změny během vývoje listu

Během vývoje listu dochází k charakteristickým změnám v jeho anatomii (Tichá 1985). V průběhu vývoje narůstá tloušťka listu i všech typů listových pletiv. Epidermální buňky, původně polygonálního tvaru, se začínají lišit ve své velikosti a získávají charakteristický dlaždicový tvar (Donnelly et al. 1999). Narůstá tloušťka kutikuly i počet trichomů na jednotku listové plochy (Tichá 1985). Objevují se průduchy, jejichž hustota zpočátku prudce narůstá dělením a poté, s pokračujícím nárůstem listové plochy, pozvolna klesá (Rawson a Craven 1975). V určitém bodě vývoje listu se dělení průduchů zastaví, ale jejich růst ještě pokračuje (Evans a Ting 1974). Diferenciace průduchů obecně pokračuje, dokud list nedosáhne 10 až 50% své konečné velikosti (Tichá 1982).

Mezofyl není u velmi mladých listů ještě zřetelně diferencován na palisádový a houbový parenchym a buňky jsou velmi kompaktní, s malými mezibuněčnými prostory (Tichá 1985, Smith a Longstreth 1994, Ali et al. 1999). Se vzrůstající listovou plochou se buňky palisádového parenchymu podélně protahují a získávají tak svůj charakteristický sloupcový tvar. Poměr tloušťky palisádového a houbového parenchymu se zvyšuje, protože tloušťka buněk palisádového parenchymu narůstá více než tloušťka buněk parenchymu houbového. Začínají se vytvářet mezibuněčné prostory, jejichž formování se shoduje s dobou diferenciace průduchů (Donnelly et al. 1999). Tloušťka mezofylu se během vývoje listu – v závislosti na podmínkách prostředí - může více než ztrojnásobit (Smith a Longstreth 1994). Tento nárůst je způsoben zejména dělením buněk mezofylu a nárůstem jejich objemu (Possingham a Saurer 1969, Wild a Wolf 1980).

Mladé listy obsahují velké množství malých chloroplastů. Během expanze listu se počet chloroplastů v buňce zvyšuje, a to jak v palisádovém tak i v houbovém parenchymu (Possingham a Saurer 1969). V době intenzivního dělení chloroplastů se jejich velikost téměř nemění. K nárůstu velikosti chloroplastů dochází až po ukončení jejich dělicí aktivity (Maksymowych et al. 1999). V této době také chloroplasty mění svůj tvar z původně kruhovitých na diskovité.

Celkový počet chloroplastů v mezofylové buňce je v úzkém vztahu s velikostí buňky (Pyke a Leech 1991) a nárůst počtu chloroplastů během růstu mezofylové buňky je regulován. Vztah mezi počtem chloroplastů a velikostí buňky je tedy během růstu buňky konstatní (Pyke 1999). V průběhu růstu mezofylové buňky se chloroplasty nacházejí na velké části jejího povrchu a jak se buňka zvětšuje, jednotlivé chloroplasty se dělí a zvětšují tak, aby toto pokrytí

zůstalo zachováno. Počet chloroplastů v buňce klesá až během pozdní senescence listu (Wardley et al. 1984, Ford a Shibles 1988).

Také ultrastruktura chloroplastů se během vývoje listu značně mění (Kutík 1985, 1998). Chloroplasty mladých listů mívají jednoduchý systém thylakoidních membrán, tvořený několika vrstvami tenkých gran. Dospělé chloroplasty mají dobře vyvinuté thylakoidní membrány a obsahují velká škrobová zrna. Později, v průběhu stárnutí, dochází k rozpadu struktur thylakoidních membrán, dilataci thylakoidů, vymizení škrobu, nápadnému nárůstu počtu plastoglobulů a zmenšení velikosti chloroplastů (Kutík et al. 1985).

2.2. Fotosyntéza

Fotosyntéza je proces, kterým rostliny přeměňují anorganické sloučeniny v látky organické za pomoci světelného záření (Blankenship 2002). Fotosyntézu dělíme na dvě části. První je tzv. světelná fáze, která zahrnuje reakce bezprostředně související s absorpcí světelného záření a druhá je tzv. temnotní fáze, při níž se energie získaná ve světelné fázi zabudovává do chemických vazeb sacharidů.

Energie slunečního záření je nejprve absorbována pigmenty obsaženými v rostlině. Všechny pigmenty účastníci se fotosyntézy se nacházejí ve chloroplastech. Základním pigmentem je chlorofyl, i když všechny rostliny mají více druhů pigmentů, z nichž každý má svou specifickou funkci. Chlorofylů existuje několik typů, u vyšších rostlin se však nachází pouze typ *a* a *b*. V podstatně menším množství obsahují thylakoidní membrány také dva typy karotenoidů - karoteny a xanthofyly. Tyto fotosyntetické pigmenty absorbují světelné záření prostřednictvím svých valenčních elektronů, které se tak dostávají na vyšší energetickou hladinu. Excitovaný stav je vysoce nestabilní a elektrony v něm zůstávají jen velmi krátkou dobu (zpravidla méně než 10^{-12} s). Do základního stavu se mohou navrátit několika způsoby. Pro fotosyntézu jsou nejdůležitější zejména přenos energie na blízkou neexcitovanou molekulu s podobnými vlastnostmi a fotooxidace, při níž se excitovaná molekula oxiduje tím, že přeneše elektron na molekulu akceptoru, kterou tak redukuje. V prvním případě jde o předání energie mezi molekulami pigmentů v antenálních komplexech fotosystémů, ve druhém případě jde o přenos energie mezi chlorofylem reakčního centra fotosystému a jeho primárním akceptorem v elektrontransportním řetězci.

K absorpci a využití fotosynteticky aktivního záření dochází u vyšších rostlin ve specializovaných vnitřních membránách chloroplastů nazývaných thylakoidy. Pro fotosyntézu je významné i prostorové uspořádání jednotlivých komplexů. Thylakoidy vytvářejí kontinuální trojrozměrnou síť diferencovanou na granální (stěsnané) a stromální (nestěsnané) oblasti. Tato diferenciací umožňuje prostorové rozdělení fotosystémů a jejich světlosběrných komplexů. Fotosystém II (PS II) a jeho světlosběrný komplex LHC II se nachází převážně v granálních oblastech, fotosystém I (PS I) a jeho světlosběrný komplex LHC I pak v oblastech stromálních (Mustárky a Garab 2003). Separace těchto dvou pigmentových systémů je pravděpodobně důležitá při ochraně před neregulovaným tokem excitační energie mezi oběma fotosystémy (Trissl a Wilhelm 1993). Bez této ochrany by PS I, který je mnohem rychlejší než PS II, mohl způsobit narušení rovnováhy v distribuci energie mezi fotosystémy (Mustárky a Garab 2003). Rozmístění všech ostatních proteinů v thylakoidní membráně odráží jejich funkční spojení s PS II a/nebo PS I (tj. LHC II, Cyt b_6/f , plastocyanin), nebo morfologická omezení plynoucí z velikosti a tvaru komplexů (např. ATP syntáza) (Staehelin a van der Staay 1996).

Po absorpci světelné energie v antenálních systémech dochází k jejímu přenosu do reakčních center PS I a II. V reakčním centru PS II se excituje molekula chlorofylu *a*, která se podle svého absorpčního maxima označuje jako P680 (Barber a Kühlbrandt 1999). Její elektron se přenesou na feofytin a odtud na plastochinon Q_A . Oxidovaná molekula chlorofylu se zpětně redukuje elektronem získaným rozkladem vody v komplexu vyvíjejícím kyslík (OEC, oxygen evolving complex). Q_A postupně přenesou dva elektrony na druhý plastochinon Q_B , který se poté uvolní ze svého vazebného místa a nahradí oxidovanou molekulou tohoto přenašeče. Redukovaný Q_B^{2-} pak přijme dva protony ze stromatu, čímž vznikne plastochinol Q_BH_2 . Dále jsou elektrony přeneseny na cytochrom b_6/f . Tento komplex přenáší protony ze stromatu do lumenu thylakoidu, čímž se podílí na tvorbě protonového gradientu. Z komplexu b_6/f pokračují elektrony na plastocyanin a poté na reakční centrum PS I. Z PS I elektron přechází na ferredoxin. Z ferredoxinu může elektron přejít zpět na komplex cytochromu b_6/f , čímž se zvýší protonový gradient. Protonový gradient se pak využije na tvorbu ATP. Nebo může elektron z ferredoxinu přejít na NADP-reduktázu, která redukuje $NADP^+$ na NADPH.

V Calvinově cyklu, který probíhá ve stromatu chloroplastu, se enzymem ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxylázou/oxygenázou (Rubisco) vážou molekuly CO_2 na sloučeninu ribulóza-1,5-bisfosfát, která se za spotřeby ATP a NADPH přeměňuje na jednoduchý sacharid glyceraldehyd-3-fosfát a jeho izomer dihydroxyacetonfosfát. Tyto jednoduché sacharidy jsou

východiskem pro syntézu fruktóza-1,6-bisfosfátu a následně škrobu nebo sacharózy (Buchanan 2002).

2.2.1. Vliv ozáření na fotosyntézu

Anatomie listů slunného a stinného typu popsaná v kapitole 2.1.1. je v úzkém vztahu s jeho fotosyntetickými procesy. Aklimace rostlin na hladinu ozáření zahrnuje změny v obsahu fotosyntetických pigmentů, rychlosti čisté fotosyntézy (P_N) i rychlosti temnotního dýchání (R_D).

Obsah chlorofylů na jednotku listové plochy odráží schopnost listu absorbovat světelné záření. U listů slunného typu je obsah chlorofylů $a+b$ vyšší, stejně jako poměr chlorofylů a/b (Chaves 1994). Vyšší podíl chlorofylu b u listů stinného typu je patrně způsoben nárůstem velikosti světlosběrných komplexů PS II (LHC II), které obsahují většinu chlorofylu b , a/nebo snížením poměru PS II/PS I (Bolhár-Nordenkamp a Draxler 1993). Ostatní části fotosyntetického aparátu (tj. reakční centra, elektrontransportní řetězce a Rubisco) jsou zastoupeny, ve srovnání s listy slunného typu, méně (Evans 1988). Listy slunného typu mají také více pigmentů xanthofylového cyklu.

Vztah mezi P_N a hladinou ozáření lze vyjádřit tzv. světelnou křivkou fotosyntézy (Vogelmann 2002). Ve tmě k asimilaci uhlíku nedochází a listy uvolňují CO_2 dýcháním. Se zvyšující se ozáření asimilace CO_2 narůstá až se CO_2 uvolňované dýcháním vyrovná asimilaci CO_2 . Tento rovnovážný bod mezi asimilací a dýcháním se nazývá světelný kompenzační bod. Hladina ozáření, při které list dosáhne svého světelného kompenzačního bodu, je u listů stinného typu nižší, protože je nízké R_D . Nízké R_D je pravděpodobně základní adaptací, která umožňuje rostlinám přežít v podmínkách nízké ozáření. Zvyšování hladiny ozáření nad světelný kompenzační bod vede k přímo úměrnému nárůstu P_N . V této části křivky je fotosyntéza limitována světelným zářením. Při dalším zvyšování světelného záření dosáhne P_N své saturace, kdy další zvyšování hladiny ozáření již P_N nezvyšuje. V této fázi světelné křivky je P_N limitována jinými faktory než světelným zářením (například rychlostí transportu elektronů, aktivitou Rubisca nebo metabolismem triózafosfátů). Hladina ozáření, při které je P_N saturována, a tedy i maximální P_N , je u stinných listů značně nižší.

2.2.1.1. Fotoinhibice

Jsou-li listy vystaveny nadměrné ozáření, tzn. ozáření vyšší, než dokáží využít, může docházet k fotooxidativnímu poškození fotosyntetického aparátu, jehož následkem klesá fotosyntetická účinnost a/nebo maximální rychlost fotosyntézy (Björkman 1981, Powles 1984).

Během fotosyntézy dochází z důvodu velkých rozdílů v redoxním potenciálu mezi reaktanty a produkty a přítomnosti excitovaných meziproductů ke tvorbě reaktivních forem kyslíku a dalších oxidantů. Potenciálně škodlivé molekuly se vytváří ve třech základních místech fotosyntetického aparátu: v LHC II, v reakčních centrech PS II a na akceptorové straně PS I (Niyogi 1999). Hlavním místem vzniku fotooxidativního poškození je PS II.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) mohou způsobit oxidaci lipidů, proteinů a pigmentů v jejich bezprostřední blízkosti. V reakčních centrech PS II mohou ROS poškodit také proteinové podjednotky spojené s PS II, zejména D1 protein, čímž dochází k fotooxidativní inaktivaci celých reakčních center (Barber a Andersson 1992, Aro et al. 1993).

V průběhu evoluce si rostliny vytvořily řadu fotoprotektivních mechanismů, s pomocí kterých se se škodlivým vlivem nadměrné ozáření vyrovnávají, a to buď snížením absorpce záření (přizpůsobením velikosti světlosběrných komplexů), nebo alternativními dráhami transportu elektronů (například fotorespirace, cyklický transport elektronů v PS I, „water-water“ cyklus) či disipací nadměrně absorbovaného záření na teplo (xanthofylový cyklus) (Asada 1999, Niyogi 1999, Szabó et al. 2005). Z hlediska likvidace ROS jsou důležité antioxidanty (například α -tokoferol, askorbát, glutathion).

Jako indikátor stresu a tedy i fotoinhibice se často používá parametr F_v/F_M získaný měřením fluorescence chlorofylu *a* (Powles 1984). Tento parametr je v úzkém vztahu s kvantovým výtěžkem P_N v intaktních listech (Demmig a Björkman 1987, Russel et al. 1995) a u zdravých listů v podmínkách beze stresu se pohybuje v rozmezí 0.75 – 0.85 (Björkman a Demmig 1987). Pod vlivem stresu F_v/F_M klesá, a to v souvislosti s nárůstem hodnoty základní fluorescence (F_0) a/nebo poklesem hodnoty maximální fluorescence (F_M). Přestože změny v obou parametrech jsou způsobeny fotoinhibicí, je třeba mezi nimi rozlišovat. Nárůst F_0 bývá spojován s fotopoškozením, zatímco pokles F_M s fotoprotektivními mechanismy (Araus a Hogan 1994).

2.2.2. Fotosyntéza během vývoje listu

Vývoj fotosyntetické aktivity listu je úzce spojen jak s vývojem vnitřní stavby listu (a zejména chloroplastů), tak i s vývojem listové plochy a koncentrace chlorofylu.

V průběhu vývoje listu je možné rozlišit tři fáze: (1) utváření listu spojené s rychlou expanzí listové plochy, (2) období dospělosti listu po dosažení maximální listové plochy a (3) období senescence spojené s poklesem listové plochy (Šesták a Čatský 1985).

Utváření listu je zahájeno poté, co se listové primordium objeví na apikálním vrcholu prýtu. Zpočátku převažující buněčné dělení je vystřídáno rychlou expanzí buněk. Doba trvání dospělosti se u jednotlivých rostlinných druhů liší a začátek senescence je obvykle charakterizován symptomy degradace buněk a pletiv.

Listová plocha se často používá jako vztažná jednotka nejen pro fotosyntézu, ale i v dalších fyziologických studiích (Tichá 1985). Listová plocha narůstá během vývoje listu sigmoidálně a dělení buněk pokračuje, dokud list nedosáhne $\frac{1}{3}$ až $\frac{1}{2}$ celkové listové plochy (Possingham a Saurer 1969).

Paralelně s nárůstem listové plochy během vývoje listu výrazně narůstá obsah chlorofylů. Rychlost akumulace chlorofylů na jednotku listové plochy je vysoká v první polovině expanze listu a poté klesá. Akumulace chlorofylů na jednotku listové plochy dosahuje maximálních hodnot před, při nebo po dosažení maximální listové plochy. Poté rychlost rozkladu chlorofylů převažuje nad rychlostí jejich syntézy a obsah chlorofylů postupně klesá. Akumulace chlorofylu přitom probíhá rychleji než jejich rozklad (Šesták 1985).

V souladu s obsahem pigmentů narůstá během vývoje listu také obsah a aktivita enzymů účastnících se fotosyntézy, společně se zvyšováním kapacity světlosběrných procesů, aktivitou elektrontransportního řetězce a fotofosforylace. Eichelmann et al. (2004) uvádějí, že množství aktivního Rubisca se zvyšuje s vývojem PS I. Syntéza PS II začíná později a pokračuje ještě několik dní poté, co PS I dosáhne své plné aktivity. Světlosběrné komplexy PS II jsou zpočátku velké a jejich organizace není optimální, což vede k větším ztrátám excitační energie u mladých listů.

S výše uvedenými změnami souvisí i vývoj fotosyntetické aktivity listu. Mladé vyvíjející se listy mají zpočátku vysokou R_D , takže P_N dosahuje záporných hodnot (Tichá et al. 1985). Nízká P_N u mladých listů je spojena nejen s vysokou rychlostí R_D ale i s nízkou

vodivostí průduchů a mezibuněčných prostor. Vodivost průduchů i mezibuněčných prostor během vývoje listu vzrůstá, zatímco R_D klesá.

Rychlost čisté fotosyntézy během vývoje listu prudce stoupá a svého maxima dosahuje v době, kdy list dosáhl 35 – 100% své maximální listové plochy, u *Nicotiana tabacum* udávají Rawson a Craven (1974) hodnotu 37% z maximální listové plochy. Během senescence listu dochází pak k pozvolnému poklesu P_N i vodivosti průduchů a mezibuněčných prostor, a k opětovnému nárůstu R_D (Tichá et al. 1985).

2.3. Specificita rostlin v *in vitro* podmínkách

V posledních desetiletích minulého století se značně rozšířilo používání technik *in vitro* kultivace intaktních rostlin. Tyto techniky se využívají hlavně při rychlém množení (mikropropagaci) okrasných rostlin pro komerční účely (např. růže, karafiáty), užitkových plodin (např. brambory, řepa, banány, réva), pro výzkumné účely nebo pro udržení genofondu ohrožených druhů rostlin (např. agáve).

Konvenční podmínky kultivace, zahrnující zejména nízkou ozářenost, exogenní přidávání sacharidů a růstových regulátorů do média spolu s omezením výměny plynů mezi kultivační nádobkou a okolním prostředím, jsou však pro růst a vývoj rostlin poměrně nepříznivé.

Ozářenost spolu s koncentrací CO_2 má, stejně jako v přírodě, největší vliv na růst a vývoj rostlinek v *in vitro* podmínkách, protože mnoho druhů rostlin je schopno růst i v těchto podmínkách fotoautotrofně (Kozai et al. 1991, Düring a Harst 1996). Ozářenost obvykle používaná při *in vitro* kultivacích je často stejná nebo nižší než je jedna desetina ozářenosti, při které je fotosyntéza rostlin rostoucích v přírodě saturována světelným zářením (cca. $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Jako zdroj záření v *in vitro* podmínkách se nejčastěji používají zářivky se studeným bílým světlem, které jsou citovány v 90% vědeckých publikací. V případě komerčního množení užitkových plodin lze však s úspěchem použít i přirozené osvětlení (kultivační místnost s velkými okny), což popisují například Kodým a Zapata-Arias (1999) při kultivaci rostlinek *Musa acuminata*. Zářivky bývají umístěny v horní části nebo po stranách kultivační komory. Kitaya et al. (1995) sledovali vliv směru záření na růst rostlinek a zjistili, že kvalitnější (tj. silnější, s kratšími stonky) rostlinky *Solanum tuberosum* lze získat umístěním zářivek po stranách kultivační komory.

Koncentrace CO₂ v kultivačních nádobkách závisí na rychlosti příjmu CO₂ a respiraci rostliny, na koncentraci CO₂ v okolní atmosféře (např. v kultivační komoře) a na rychlosti výměny plynů mezi okolní atmosférou a kultivační nádobkou. Pro výměnu CO₂ mezi nádobkou a okolím je důležitý způsob uzavření nádobek. Ve vzduchotěsně uzavřených nádobkách (např. jsou-li víčka z aluminiové fólie nebo se k uzavírání nádobek použijí gumové zátky) není difúze CO₂ možná a koncentrace CO₂ v nádobkách během fotoperiody výrazně klesne, a to až na hodnoty odpovídající kompenzačnímu bodu fotosyntézy (např. Šantrůček et al. 1991, Navarro et al. 1994, Serret et al. 1996, Serret et al. 1997, Zobayed et al. 1999, Serret et al. 2001, Zobayed et al. 2001). Kozai et al. (1990) uvádějí, že koncentrace CO₂ v nádobkách byla vždy nižší než v okolní atmosféře, a to již při ozáření přesahující hodnotu 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Čím vyšší je přitom ozáření, tím rychleji koncentrace CO₂ v kultivační nádobce klesá (Düring a Harst, 1996, Serret et al. 2001). K výraznějšímu poklesu koncentrace CO₂ dochází také s prodlužující se dobou kultivace (Kozai et al. 1991). Rychlost vyčerpání CO₂ závisí přitom nejen na rychlosti fotosyntézy a dýchání, ale také na poměru čerstvé hmotnosti rostlinky vůči objemu kultivační nádobky (Šantrůček et al. 1991).

Snížením koncentrace CO₂ v nádobkách se zvýší koncentrace kyslíku a změní se poměr CO₂/O₂ v chloroplastu ve prospěch O₂. To podporuje oxygenázovou aktivitu Rubisca a způsobuje vysokou rychlost fotorespirace. Düring a Harst (1996) zjistili při kultivaci kříženců *Vitis berlandieri x Vitis riparia*, že po zvýšení koncentrace CO₂ v nádobkách ze 30 na 1200 ppm klesla rychlost fotorespirace z 53,6% na 3,3% P_N. Autoři usuzují, že za obvyklých koncentrací CO₂ (130 až 150 ppm) v těsně uzavřených nádobkách působí vysoká rychlost fotorespirace zřetelné snížení příjmu CO₂. To dokázali sérií dalších experimentů, kdy obvyklou koncentraci O₂ ve vzduchu (ca. 21%) snížili na 0% (nahrazením okolního vzduchu dusíkem N₂). Za těchto podmínek byla fotorespirace potlačena a fixace CO₂ vzrostla o 37 – 46%.

Výměna plynů mezi kultivační nádobkou a okolím je usnadněna, použijí-li se k uzavírání kultivačních nádobek speciální polyetylenové (Tichá 1996) nebo polypropylénové fólie (Kozai et al. 1991), které obsahují mikropóry umožňující výměnu plynů mezi nádobkou a okolím. Například Kozai et al. (1991) uvádějí, že použitím těchto fólií se výměna vzduchu v nádobkách zvýšila přibližně desetkrát. Toto zvýšení se projevilo i na kvalitě pěstovaných rostlin, které byly silnější a nevykazovaly žádné symptomy vitifikace. Použitím propustných víček je ovlivněna nejen koncentrace CO₂, ale dochází i ke snížení relativní vzdušné vlhkosti a nižší akumulaci etylénu v nádobkách (Zobayed et al. 1999). Koncentrace

CO₂ v kultivační komoře pak může být ještě zvyšována (například přidáním nádobek s karbonát-bikarbonátovým pufrem, jak uvádí Tichá (1996)).

Zatím nejdokonalejším způsobem výměny plynů mezi kultivační nádobkou a okolím je systém nucené ventilace, kdy se do kultivačních nádobek přivádí vzduch s přesně stanovenou koncentrací CO₂ (Zobayed et al. 1999). Nucená ventilace má pozitivní vliv na růst rostlinek, neboť zvyšuje rychlost pohybu vzduchu v kultivačních nádobkách (Kozai et al. 1990). K akumulaci etylénu při použití nucené ventilace prakticky nedochází, relativní vzdušná vlhkost je nižší (Nguyen et al. 2001, Zobayed et al. 2001).

Teplota vhodná pro růst tkáňových kultur se pohybuje v intervalu od 17 do 32°C. Rostliny tropického a subtropického pásu se přitom mohou pěstovat při mírně vyšších teplotách než rostliny mírného pásu (Kodym a Zapata-Arias. 1999). Teplota se zpravidla nastavuje pro kultivační komoru jako celek, uvnitř kultivačních nádobek však může být během světelné periody i o několik °C vyšší než v kultivační komoře, a to v závislosti na hladině ozáření (Kozai et al. 1990, Serret et al. 1996, Serret a Trillas 2000, Nguyen et al. 2001).

Významnou roli hraje při kultivaci rostlinek v *in vitro* podmínkách také složení média. Média se zpravidla optimalizují pro heterotrofní růst a nemusí být tedy optimální pro růst fotoautotrofní či fotomixotrofní. Například Kozai et al. (1991) popisují, že při fotoautotrofní kultivaci rostlinek *Fragaria x ananassa* na médiu Murashige a Skoog (Murashige a Skoog 1962) došlo po 21 dnech prakticky k vyčerpání PO₄³⁻ iontů z média a doporučují tedy obsah PO₄³⁻ iontů v médiu zvýšit. Obsah iontů v médiu závisí však nejen na jejich původní koncentraci a rychlosti jejich příjmu, svou roli hraje také objem média v kultivační nádobce.

Do média se obvykle přidává sacharóza jako zdroj uhlíku a energie. Výhodou je podpoření růstu, jsou-li rostlinky pěstovány při konvenčních podmínkách (*i.e.* nízká ozáření, nízká koncentrace CO₂), nevýhodou je vyšší nebezpečí bakteriální nebo houbové kontaminace médií a nutnost aklimatizovat rostlinky na fotoautotrofní růst po transferu do *ex vitro* podmínek (Preece a Sutter 1991).

2.3.1. Anatomie a morfologie listu v *in vitro* podmínkách

Vliv kultivačních podmínek na anatomii a morfologii listu i celých rostlinek byl předmětem zkoumání mnoha výzkumných týmů, které se zabývaly zejména srovnáváním *in*

vitro a *ex vitro* rostoucích rostlin, případně rostlin po aklimatizaci do *ex vitro* podmínek (Sutter a Langhans 1979, Wetzstein a Sommer 1983, Lee et al. 1985, Smith et al. 1986, Fabbri et al. 1986, Lee et al. 1988, Marín et al. 1988, Sutter 1988, Capellades et al. 1990, Johansson et al. 1992, Pospíšilová et al. 1999, Apóstolo et al. 2005, Fuentes et al. 2005).

Velká pozornost byla věnována povrchu listu, neboť rostlinky z *in vitro* podmínek mají jen tenkou vrstvu kutikuly a ztrácí schopnost zavírat průduchy, takže při transferu rychle ztrácí vodu transpirací (Pospíšilová et al. 1999). Johansson et al. (1992) naměřili u *in vitro* kultivovaných rostlinek *Rosa odorata* x *Rosa damascena* kutikulu jen 0,04 μm tlustou, ve srovnání s kutikulou na listech rostlinek ze skleníku (0,3-0,6 μm). Přitom byla kutikula stejně tenká na adaxiálním i abaxiálním povrchu listu. Redukovanou tloušťku kutikuly pozorovali i Marín et al. (1988) u *Prunus cerasus*, zjistili však, že kutikula má podobné složení, jako u rostlin rostoucích v *ex vitro* podmínkách. Rostlinky rostoucí v *in vitro* podmínkách mají často také malý obsah epikutikulárních a kutikulárních vosků, které jsou distribuovány po obou površích (Sutter a Langhans 1979, Zobayed et al. 2001). Vosky jsou přitom účinnou bariérou proti pronikání vody kutikulou a nedostatek vosků má za následek zvýšení kutikulární transpirace. Capellades et al. (1990) se na základě pozorování v rastrovacím elektronovém mikroskopu domnívají, že krystalická struktura epikutikulárních vosků je na listech *in vitro* rostoucích rostlinek *Rosa multiflora* odlišná. V některých případech vosky nekryjí úplně povrch listu a je vidět část epidermis (Sutter a Langhans 1979, Johansson et al. 1992). Sutter (1988) naopak popisuje jen malé změny ve struktuře epikutikulárních vosků u *Malus domestica*, *Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus* a *Liquidambar styraciflua*. Vosky jsou u těchto rostlinek přítomny v amorfní formě. Sutter (1988) navíc uvádí, že během aklimatizace rostlinek *Malus domestica* na *ex vitro* podmínky klesl relativní obsah vosku na jednotku listové plochy a tento pokles dává do souvislosti s nárůstem listové plochy bez současné odpovídající syntézy vosku.

Epidermální buňky na listech rostlin rostoucích v *in vitro* podmínkách mívají odlišný tvar ve srovnání s rostlinami rostoucími ve skleníku nebo v polních podmínkách. Johansson et al. (1992) popisují lehce nepravidelné (adaxiální povrch) a velmi nepravidelné (abaxiální povrch) epidermální buňky na listech *Rosa odorata* x *Rosa damascena*. Také buněčná stěna epidermálních buněk na listech *Rosa* je ve srovnání s *ex vitro* rostoucími rostlinkami tenčí. Wetzstein a Sommer (1983) popisují různé tvary (včetně trojúhelníkovitých a vejcovitých) a velikosti epidermálních buněk na listech *in vitro* kultivovaných rostlinek *Liquidambar styraciflua*. Marín et al. (1988) zjistili, že invaginace antiklinálních buněčných stěn, které pozorovali u epidermálních buněk sousedících s konci buněčných stěn mezi průduchy, se v *in*

in vitro podmínkách nevyskytovaly. Tyto invaginace dávají do souvislosti s pohyby svěracích buněk, neboť uvolnění této části buněčných stěn svěracích buněk může být pro pohyby průduchů důležité.

Průduchy na listech rostlinek kultivovaných v *in vitro* podmínkách bývají často kruhové, široce otevřené a vyvýšené nad povrch listu (Wetzstein a Sommer 1983, Marín et al. 1988, Sutter 1988, Blanke a Belcher 1989, Capellades et al. 1990, Johansson et al. 1992, Zobayed et al. 2001). Jejich hustota je přitom zpravidla vyšší než u rostlinek rostoucích ve skleníku nebo v polních podmínkách. Blanke a Belcher (1989) popisují průduchy u *Malus pumila* otevřené tak široce, že skrze štěrby lze vidět mezofylové buňky. Průduchy některých rostlin pěstovaných v *in vitro* podmínkách hůře fungují (Pospíšilová et al. 1999) - průduchy se uzavírají se zpožděním (Marín et al. 1988, Sutter 1988), neuzavírají se úplně (Düring a Harst 1996) nebo zůstávají stále otevřené (Blanke a Belcher 1989, Zobayed et al. 2001), což po transferu do *ex vitro* podmínek způsobuje nadměrnou a nekontrolovatelnou transpiraci. Nefunkčnost průduchů může být způsobena nedostatkem ABA během vývoje listů v *in vitro* podmínkách, případně nadbytkem některých exogenně dodávaných hormonů během kultivace (Mansfield 1994). Pro dobrou funkci průduchů je důležitá také iontová rovnováha v rostlinkách, protože nadměrná akumulace iontů K^+ nebo Na^+ a nedostatečné zásobení ionty Ca^{2+} může stimulovat široké otevření průduchů a redukovat jejich schopnost se uzavírat (Mansfield 1994).

Mezofyl v listech *in vitro* pěstovaných rostlinek bývá málo vyvinutý, s dominantními vakuolami a velkými mezibuněčnými prostory, které mohou během transferu do *ex vitro* podmínek přispívat ke značným deformacím (Wetzstein a Sommer 1983). Johansson et al. (1992) uvádějí, že u *in vitro* pěstovaných rostlinek *Rosa odorata x Rosa damascena* jsou buňky palisádového parenchymu v listech stejně velké jako buňky epidermální a zdůrazňují objemné mezibuněčné prostory. Rostlinky *Betula platyphylla* mají v *in vitro* podmínkách jen jednu vrstvu palisád, které jsou krátké, kruhové a volně uložené pod epidermis (Smith et al. 1986). Z celkové tloušťky listu zabírají palisády jen 21% (u rostlin rostoucích ve skleníku to je 38%). Také u rostlinek *Fragaria x ananassa* byla zjištěna jen jedna vrstva malých, hruškovitých palisád a velké mezibuněčné prostory (Fabbri et al. 1986). Chloroplasty v mezofylových buňkách *Rosa odorata x Rosa damascena* nebyly kultivací rostlin v *in vitro* podmínkách ovlivněny a obsahovaly thylakoidy, několik plastoglobulů a někdy značné množství škrobu (Johansson et al. 1992). Naproti tomu Lee et al. (1985) uvádějí, že chloroplasty rostlinek *Liquidambar styraciflua* měly při kultivaci za nízké ozáření nepravidelně uspořádané thylakoidy a méně vyvinutá grana (Lee et al. 1985).

Plocha, kterou zabírala vodivá pletiva ve střední žilce, byla v listech rostlinek *Betula platyphylla* významně snížena (Smith et al. 1986). Xylémové a floémové buňky zaujímaly pouze 13% z plochy příčného řezu. Listy z rostlin rostoucích ve skleníku přitom měly střední žilky s dobře vyvinutým vaskulárním systémem, který zaujímal 27% z plochy příčného řezu. Listy skleníkových rostlin měly také nápadnější žilnatinu.

2.3.2. Fotosyntéza a růst rostlinek v *in vitro* podmínkách

Konvenční kultivační podmínky mají značný vliv na fotosyntézu a růst *in vitro* pěstovaných rostlinek. Po dlouhou dobu se uvádělo, že rostlinky rostoucí v *in vitro* podmínkách mají jen nízkou schopnost fotosyntézy a vyžadují tedy exogenní přidání sacharidů jako zdroje uhlíku a energie. Například Grout a Millam (1985) zjistili, že listy rostlinek *Fragaria x ananassa* nejsou schopny fixovat dostatečné množství uhlíku a nedokáží vyvinout vyšší rychlost fotosyntézy ani po transferu do *ex vitro* podmínek. Listy vyvinuté v podmínkách *in vitro* tak mají spíše přechodnou, vyživující funkci a následný růst v *ex vitro* podmínkách je podporován pouze nově vyvinutými listy. Smith et al. (1986) popisují nízkou rychlost fotosyntézy u *in vitro* pěstovaných rostlinek *Betula platyphylla*, která dosahovala jen asi 1/3 hodnot naměřených u rostlin ze skleníku. Nízká byla i fotosyntetická kapacita těchto rostlinek. Také rostlinky *Fragaria ananassa* vykazovaly nízkou P_N a nízkou aktuální fotochemickou účinnost PSII (Zhou et al. 2005). Nízkou či dokonce zápornou P_N při konvenční kultivaci popisují i další autoři (např. Hdider a Desjardins 1994, Amancio et al. 1999, Zobayed et al. 1999, Kubota et al. 2001, Sha Valli Khan et al. 2002).

Lee et al. (1985) naopak zjistili vyšší P_N u *in vitro* pěstovaných prýtlů *Liquidambar styraciflua* ve srovnání se semenáčky rostoucími *ex vitro*, použili však při kultivaci stejné hladiny ozáření. Rychlost čisté fotosyntézy byla u semenáček jen asi poloviční než *in vitro* pěstovaných rostlinek. Příčinami tohoto rozporu s ostatními pracemi mohou být druhové rozdíly nebo skutečnost, že semenáčky byly pravděpodobně limitovány ve svém vývoji nízkou ozářeností.

Vztah mezi P_N a ozářeností (tzv. světelná křivka) je u rostlinek pěstovaných v *in vitro* podmínkách podobný jako u rostlin *ex vitro*, saturační ozáření je však u *in vitro* rostlinek výrazně nižší (Pospíšilová et al. 1992). U rostlinek *Cocos nucifera* byla fotosyntéza saturována světlem již při ozáření 14 – 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, zatímco u semenáček při

ozáření 133 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Světelný kompenzační bod fotosyntézy u rostlinek *Cocos nucifera* byl podobný jako u *ex vitro* rostlin stinného typu. Aktivita Rubisca byla podobná u semenáčků i *in vitro* pěstovaných rostlinek (Fuentes et al. 2005a).

Konvenčně *in vitro* pěstované rostlinky mají často i nižší obsah chlorofylů v listech (Navarro et al. 1994, Zobayed et al. 1999, Serret et al. 2001, Fuentes et al. 2005a), nižší poměr chlorofylů *a/b* (Fuentes et al. 2005a) a zpravidla hůře rostou, mají menší počet listů, menší listovou plochu a nižší čerstvou hmotnost i akumulaci sušiny (Navarro et al. 1994, Tichá 1996, Zobayed et al. 1999, Sha Valli Khan et al. 2003).

2.3.3. Vliv zvýšené hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO₂ během *in vitro* kultivace – fotoautotrofní versus fotomixotrofní kultivace

Odlišná anatomie a malá schopnost *in vitro* pěstovaných rostlinek fotosyntetizovat do značné míry snižují úspěšnost jejich převedení a aklimatizace do skleníku nebo polních podmínek (Preece a Sutter 1991, Serret et al. 1997). Proto se velká pozornost věnuje zlepšení kultivačních podmínek tak, aby byl co nejvíce podpořen jejich fotoautotrofní růst. S tím souvisí zejména zvýšení hladiny ozáření v průběhu kultivace, zvýšení koncentrace CO₂ jako substrátu pro fotosyntézu a snížení hladiny exogenně dodávaných sacharidů.

Srovnáváním rostlinek rostoucích fotoautotrofně (bez přidání sacharózy, za zvýšené koncentrace CO₂ a hladiny ozáření) a fotomixotrofně (za konvenčních podmínek nízké hladiny ozáření, koncentrace CO₂ a s přidáním sacharózy do média) se zabýval v posledních letech zejména výzkumný tým profesora Kozaie (např. Zobayed et al. 1999, Seon et al. 2000, Kubota et al. 2001, Sha Valli Khan et al. 2002, Sha Valli Khan et al. 2003). Zobayed et al. (1999) zjistili, že při fotoautotrofní kultivaci měly listy *Solanum tuberosum* funkční průduchy a jejich hustota byla dvojnásobná ve srovnání s fotomixotrofními rostlinkami. Rychlost transpirace byla nízká a řízená. Listy fotoautotrofních rostlinek byly tlustší, s lépe organizovanou vrstvou palisád a vyšším obsahem epikutikulárních vosků. Fotoautotrofně pěstované rostlinky *Eucalyptus tereticornis* a *Lycopersicon esculentum* měly vyšší P_N (Kubota et al. 2001, Sha Valli Khan et al. 2002), růst byl však lepší při fotomixotrofní kultivaci. Fotoautotrofně pěstované rostlinky *Rehmania glutinosa* se lépe vyrovnaly se změnami souvisejícími s transferem do *ex vitro* podmínek (Seon et al. 2000). Bohužel při všech výše uvedených pokusech došlo vždy ke změně všech důležitých

kultivačních podmínek najednou a lze je tedy jen obtížně srovnávat s pracemi ostatních autorů a vyvodit jednoznačný závěr.

2.3.3.1. Anatomie a morfologie listu při kultivaci *in vitro* za zvýšené hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO₂

Reakce rostlinek na zvýšení hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO₂ během *in vitro* kultivace bývají často rozdílné v závislosti na tom, zda rostlinky byly pěstovány fotoautotrofně nebo fotomixotrofně.

Při fotoautotrofní kultivaci za zvýšené hladiny ozáření (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) měly listy rostlinek *Actinidia deliciosa* větší buňky palisádového i houbového parenchymu (Dimassi-Theriou a Bosabalidis 1997). V buňkách palisádového i houbového parenchymu bylo při vyšší ozáření méně chloroplastů a v chloroplastech bylo méně škrobových zrn. Nižší počet chloroplastů v buňkách palisádového i houbového parenchymu při kultivaci rostlinek *Nicotiana tabacum* za zvýšené ozáření (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zaznamenali také Radochová et al. (2000). Rostlinky *Nicotiana tabacum* měly při vyšší ozáření naopak menší plochu mezofylové buňky na řezu listem, tloušťka listu ani mezofylu však nebyla ozáření ovlivněna.

Při fotomixotrofní kultivaci za zvýšené hladiny ozáření byly listy rostlinek *Nicotiana tabacum* tlustší (Radochová et al. 2000), u rostlinek *Gardenia jasminodes* (Serret a Trillas 2000) ozáření tloušťku listu neovlivnila. Průduchy byly na listech rostlinek *Liquidambar styraciflua* vyvýšené nad úroveň epidermis, a to bez ohledu na hladinu ozáření (Lee et al. 1988). Tlustší vrstva palisádového parenchymu a tenčí vrstva houbového parenchymu zvýšila poměr palisádového a houbového parenchymu (PP/HP) u rostlinek *Gardenia jasminoides* i *Nicotiana tabacum*. Listy rostlinek *Gardenia jasminoides* a *Liquidambar styraciflua* měly při vyšší ozáření menší podíl mezibuněčných prostor na řezu listem. Plocha mezofylových buněk na řezu listem nebyla ozáření ovlivněna u rostlinek *Nicotiana tabacum*, větší buňky mezofylu měly listy rostlinek *Liquidambar styraciflua* a *Gardenia jasminoides*. Počet chloroplastů v buňkách mezofylu u rostlinek *Nicotiana tabacum* a *Actinidia deliciosa* ozáření ovlivněn nebyl, méně chloroplastů měly při vyšší ozáření naopak mezofylové buňky rostlinek *Gardenia jasminoides*. Počet škrobových zrn byl v chloroplastech rostlinek *Actinidia deliciosa* rostoucích při vyšší ozáření menší. Při vyšší

ozáření měly chloroplasty rostlinek *Liquidambar styraciflua* dobře organizovaná grana a chloroplasty neobsahovaly žádný škrob (Lee et al. 1985). Naopak grana chloroplastů *Gardenia jasminoides* vypadala poněkud neuspořádaně z důvodu přítomnosti škrobových zrn (Serret et al. 1996).

Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na anatomii listu sledovali Zobayed et al. (2001) při fotomixotrofní kultivaci rostlinek *Brassica oleracea* a *Nicotiana tabacum*. Zvýšená koncentrace CO₂ během kultivace snížila hustotu průduchů a zlepšila jejich funkčnost, mezofylové buňky byly větší a lépe vyvinuté. Buňky také obsahovaly více chloroplastů. Listy měly více epikutikulárních vosků a menší hustotu epidermálních vlásků.

2.3.3.2. Fotosyntéza a růst při kultivaci *in vitro* za zvýšené hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO₂

Pro fotosyntézu a růst rostlinek v *in vitro* podmínkách za zvýšené hladiny ozáření a/nebo koncentrace CO₂ platí, stejně jako v případě anatomie, že vliv ozáření a CO₂ závisí na přítomnosti exogenní sacharózy v médiu.

Při fotoautotrofní kultivaci byl vliv ozáření na P_N u rostlinek *Coffea arabusta* nezřetelný (Nguyen et al. 1999). U rostlinek *Cocos nucifera* se P_N při zvýšení ozáření zvýšila (Fuentes et al. 2005b), u rostlinek *Nicotiana tabacum* se P_N při vyšší ozáření naopak snížila a u rostlinek se projevila fotoinhibice (Tichá et al. 1998). Zvýšení hladiny ozáření neovlivnilo akumulaci sušiny u rostlinek *Nicotiana tabacum*, zatímco u rostlinek *Cocos nucifera* se akumulace sušiny zvýšila.

Při fotomixotrofní kultivaci se P_N při saturační ozáření zvýšila při zvýšení kultivační ozáření u rostlinek *Nicotiana tabacum* (Tichá et al. 1998) i *Cocos nucifera* (Fuentes et al. 2005b). U rostlinek *Cocos nucifera* byla P_N při saturační ozáření nižší při vysoké koncentraci sacharózy v médiu (90 g l⁻¹), kdy se u rostlinek projevila fotoinhibice. Rostlinky *Nicotiana tabacum* i *Cocos nucifera* při vyšší ozáření akumulovaly více sušiny. Rostlinky *Musa* měly také větší listovou plochu, počet listů a obsah chlorofylů *a+b* (Navarro et al. 1994). Listy rostlinek *Liquidambar styraciflua* měly naopak při vyšší ozáření obsah chlorofylů snížený (Lee et al. 1985).

Zvýšená koncentrace CO₂ při fotoautotrofní i fotomixotrofní kultivaci zvýšila P_N a stimulovala růst listové plochy, akumulaci sušiny a zvýšila obsah chlorofylů *a+b* v listech

(Navarro et al. 1994, Tichá 1996, Zobayed et al. 1999, Nguyen et al. 2001). Vliv zvýšené koncentrace CO₂ byl při fotoautotrofní kultivaci rostlinek *Nicotiana tabacum* mnohem výraznější než při kultivaci fotomixotrofní (Tichá 1996). Po transferu rostlinek *Musa* do *ex vitro* podmínek byla však relativní růstová rychlost vyšší u rostlinek pěstovaných *in vitro* při atmosférické koncentraci CO₂ (Navarro et al. 1994).

2.3.3.3. Fotoinhibice v *in vitro* podmínkách

Podle Tiché et al. (1998) je schopnost *in vitro* rostlinek přizpůsobit se vyšší ozáření limitovaná a rostlinky jsou náchylné k fotoinhibici. Fotoinhibice se projevila u fotoautotrofně pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* již při ozáření 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a prohlubovala se s délkou kultivace (Tichá et al. 1998). Fotoinhibici popisují i Kadleček et al. (2003), kteří při fotoautotrofní kultivaci *Nicotiana tabacum* za zvýšené ozáření (380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zaznamenali pokles fotosyntetické účinnosti a obsahu chlorofylů *a+b*, pokles poměru chlorofylů *a/b*, nižší aktuální ($\phi_{\text{PS II}}$) i maximální (F_V/F_M) fotochemickou účinnost PS II a vyšší nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu *a* (NPQ). Tichá et al. (1998) i Kadleček et al. (2003) zjistili také zvýšený obsah pigmentů xanthofylového cyklu a jejich vyšší deepoxidovaný stav. Fotoinhibované rostlinek měly snížený poměr proteinů D2/LHC II a CP47/LHC II, což naznačuje preferenční ztrátu proteinů z reakčních center PS II (Tichá et al. 1998).

Fotoinhibice byla při kultivaci v *in vitro* podmínkách popsána i u fotomixotrofně pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* (Kadleček et al. 2003) a *Cocos nucifera* (Fuentes et al. 2005a,b), a to při vysoké koncentraci exogenně přidávané sacharózy (5% a 90 g l⁻¹). U fotomixotrofně pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* se fotoinhibice projevila snížením obsahu chlorofylů *a+b* a snížením P_N, fotoinhibované rostlinky *Cocos nucifera* měly navíc sníženou hodnotu F_V/F_M a nižší obsah i aktivitu Rubisca.

Fotoinhibici při kultivaci v *in vitro* podmínkách zjistili také Serret et al. (2001) u rostlinek *Gardenia jasminoides*. Nejvíce fotoinhibovány byly rostlinky rostoucí při vysoké ozáření a nízké koncentraci exogenně dodávané sacharózy. Fotoinhibice byla větší u rostlinek ve fázi množení prýtlů než ve fázi indukce kořenů. Snížení hodnoty F_V/F_M bylo ve fázi množení prýtlů způsobeno spíše zvýšením hodnoty F₀, která souvisí s inaktivací reakčních

center PS II fotopoškozením, a ve fázi indukce kořenů snížením hodnoty F_M , která souvisí s fotoprotektivními mechanismy (viz kapitola 2.2.1.1.).

2.3.4. Vliv snížené hladiny exogenně přidávané sacharózy během *in vitro* kultivace na fotosyntézu a růst rostlinek

Sacharóza přidávaná do média zpravidla podporuje růst *in vitro* rostlinek, její vliv na P_N však bývá, v závislosti na její koncentraci i na dalších kultivačních podmínkách, popisován rozdílně. Vysoká koncentrace sacharózy v médiu (5%) podle Capelladese et al. (1990) přispívá ke snížení fotosyntetické kapacity rostlinek sníženou regenerací karboxylačního substrátu RuBP. Sacharóza (20 g l^{-1}) v médiu potlačila P_N například u *in vitro* pěstovaných rostlinek *Fragaria x ananassa* (Kozai et al. 1991) a při koncentraci 90 g l^{-1} u rostlinek *Cocos nucifera* (Fuentes et al. 2005a). Maximální P_N byla výrazně nižší při kultivaci rostlinek *Fragaria x ananassa* na médiu s obsahem 3% nebo 5% sacharózy (Hdider a Desjardins 1994). Naopak zvýšení P_N díky vysoké koncentraci (5%) exogenně dodávané sacharózy popisují Furbank et al. (1997) u *Nicotiana tabacum* a *Flaveria bidentis*. Furbank et al. (1997) zjistili, že přidání 5% sacharózy do média zvýšilo fotosyntetickou kapacitu, která byla srovnatelná s fotosyntézou rostlin pěstovaných ve skleníku. Také aktivity mnoha fotosyntetických enzymů byly při kultivaci se sacharózou zvýšeny. Zvýšil se i obsah chlorofylů. Podle Furbanka et al. (1997) tedy 5% sacharóza působí jako pozitivní signál pro expresi fotosyntetických genů. Přítomnost 3% sacharózy v médiu zvýšila P_N u rostlinek *Nicotiana tabacum*, zatímco 5% sacharózy P_N snížilo a způsobilo fotoinhibici (Kadleček et al. 2003).

Vlivem exogenně přidávané sacharózy (3%) na růst, obsah chlorofylů a maximální P_N se zabývali i Le et al. (2001). Rostlinky *Lycopersicon esculentum* pěstovali za podmínek (1) nízké ozáření ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a koncentrace CO_2 ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$), tedy za podmínek limitace fotosyntézy zdroji a za (2) za podmínek vysoké ozáření ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a koncentrace CO_2 ($4000 \mu\text{mol mol}^{-1}$), tedy za podmínek limitace fotosyntézy sinkem. Z jejich výsledků vyplývá, že přidání exogenní sacharózy při limitovaných zdrojích zvýšilo čerstvou hmotnost, maximální P_N , obsah chlorofylů i F_v/F_M . Naopak při limitovaném sinku exogenně přidávaná sacharóza snížila čerstvou hmotnost a mírně i maximální P_N .

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že vliv exogenně dodávané sacharózy na P_N je závislý nejen na její koncentraci v médiu a na rostlinném druhu, ale patrně i na ostatních kultivačních podmínkách (Serret et al. 1996, Le et al. 2001, Kadleček et al. 2003).

3. Materiál a metody

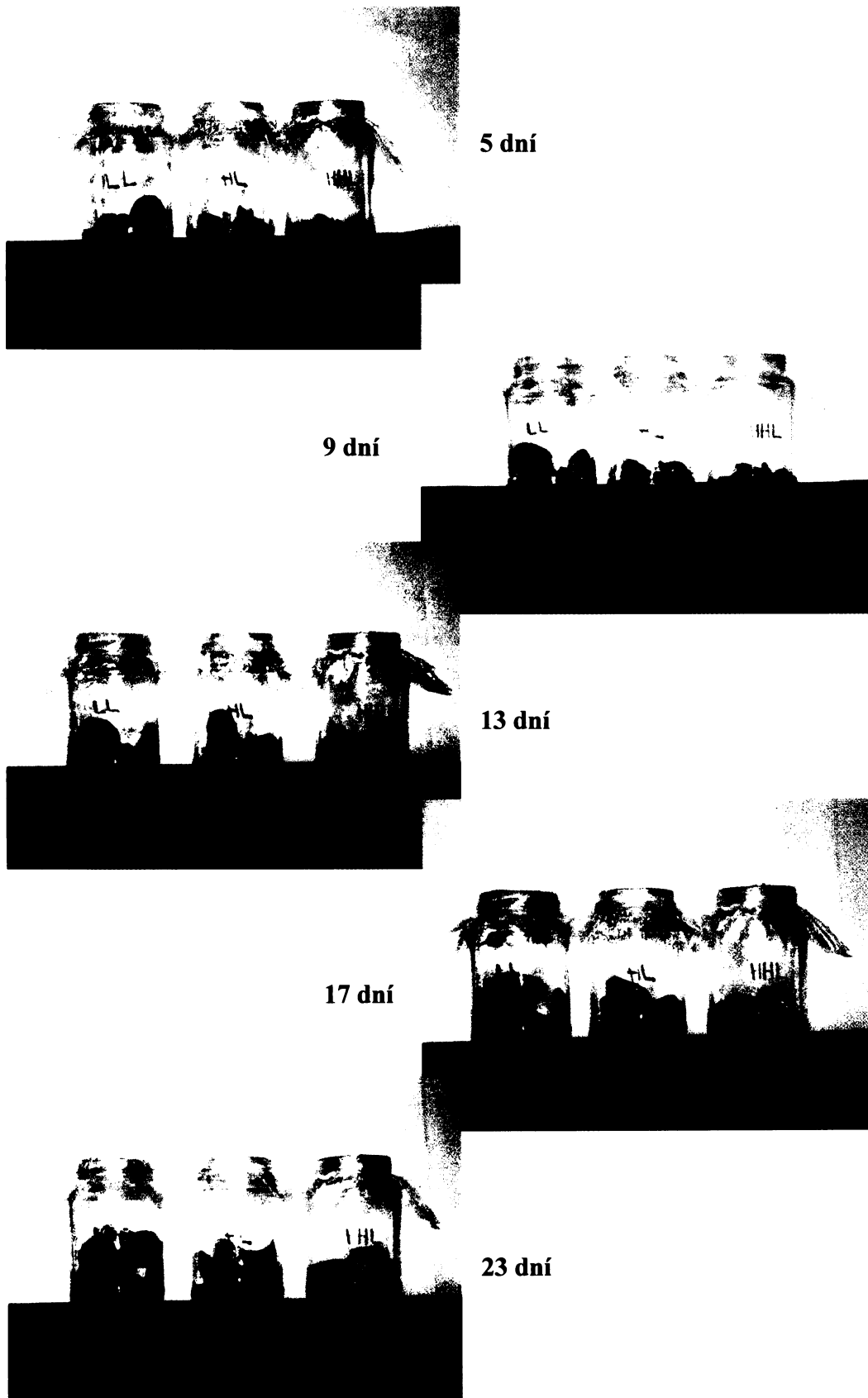
3.1. Pokusný materiál a jeho pěstování

Rostlinky tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) jsem pěstovala ze semen v podmínkách *in vitro* na pevném médiu Murashige a Skoog (MS) (Sigma-Aldrich, M5519) (Murashige a Skoog 1962). Na jeden litr média jsem přidávala 7 g agaru a po upravení hodnoty pH na 5,8 jsem médium sterilizovala 20 minut při teplotě 121°C za zvýšeného tlaku.

Každý pokus jsem začínala sterilním výsevem semen do Erlenmayerových baněk. Semena jsem sterilizovala 10 minut v 10% roztoku dezinfekčního prostředku SAVO a opakovaně promyla destilovanou vodou. Standardní MS médium bylo obohaceno o 3% sacharózy jako zdroje energie a organického uhlíku. Baňky se semeny jsem umístila do kultivačního boxu se zářivkami umístěnými po stranách, s homogenní ozářeností $130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Teplota v boxu byla 25°C ve dne a 18°C v noci, fotoperioda byla 16 hodin. Po 21 dnech jsem klíčící rostlinky sterilně rozsadila do skleněných kultivačních nádobek na totéž médium a do stejných podmínek. Při výsevu i přesazování jsem baňky uzavírala víčky z hliníkové fólie.

Ze semenáčků ve stáří 30 dnů jsem odebírala nodální segmenty s listem, které jsem sterilně vysazovala na standardní MS médium bez přidání sacharózy. Koncentraci CO_2 jsem v kultivačních boxech zvyšovala na $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ přidáním nádobek se směsí 2M karbonátového a 2M bikarbonátového pufru v poměru 1:3 a kultivační nádoby jsem uzavírala speciálními víčky s filtrem propouštějícím CO_2 – tzv. *suncaps* (Sigma-Aldrich, C6920) (Tichá 1996). Rostlinky jsem pěstovala ve dvou kultivačních boxech (Snijders Scientific, Tilburg, Holandsko) při třech hladinách ozářenosti (PAR 400-700 nm): nízké ($60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, LI), středně vysoké ($180 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, MI) a vysoké ($270 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, HI).

Všechna měření jsem prováděla na čtvrtém listu (počítáno od báze rostlinky) a v každém stáří jsem odebírala vždy tři až pět listů (rostlinek) z každé hladiny ozářenosti. Stáří listu jsem měřila jako počet dní poté, co se list objevil na apikálním vrcholu rostlinky. Čtvrtý list se objevil na apikálním vrcholu vždy 11 až 12 dní po zahájení experimentu a měření jsem prováděla ve stáří listu 5, 9, 13, 17 a 23 dní. (Obr. 3.1.). Pro stanovení některých růstových charakteristik jsem odebírala rostlinky celé.

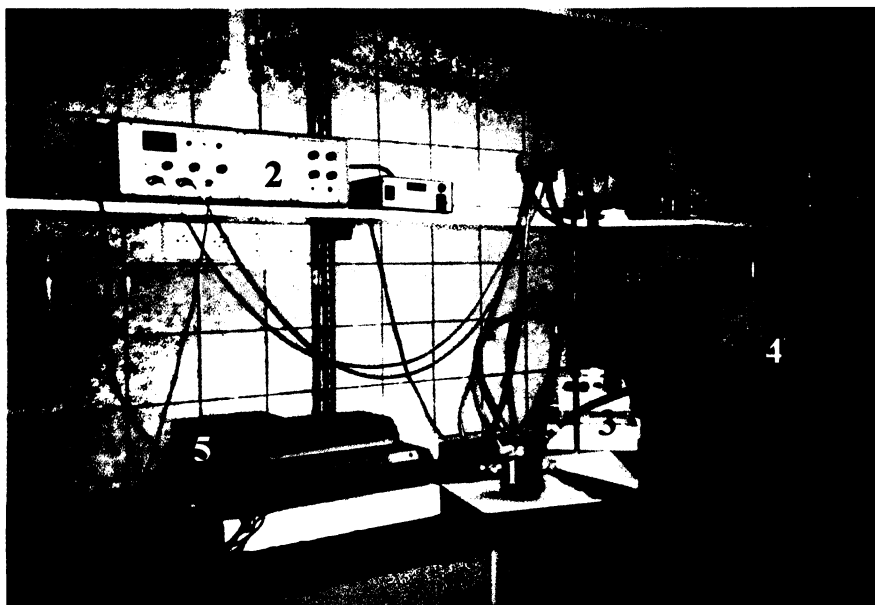


Obr. 3.1.: Fotoautotrofně *in vitro* pěstované rostlinky *Nicotiana tabacum* v průběhu vývoje 4. listu při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, vlevo), středně vysoké (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, uprostřed) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, vpravo) ozáření.

3.2. Měření rychlosti fotosyntézy a rychlosti temnotního dýchání kyslíkovou elektrodou

Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) jsem měřila jako množství kyslíku, které vydává list, je-li vystaven působení aktinického záření, a rychlost temnotního dýchání (R_D) jako množství kyslíku, které list přijímá, je-li umístěn ve tmě.

P_N a R_D jsem měřila kyslíkovou elektrodou Clarkova typu (LD2/2, Hansatech, King's Lynn, Anglie)(Obr. 3.2.). Elektroda je tvořena platinovou katodou a stříbrnou anodou, které jsou zality do disku z epoxidové pryskyřice tak, že katoda tvoří pomyslnou osu tohoto disku, zatímco anoda je umístěna v kruhové drážce na jeho bázi. Tato drážka slouží zároveň jako zásobárna elektrolytu, kterým je nasycený roztok KCl. Při potahování elektrody se na její povrch pokládá jemný cigaretový papírek napuštěný elektrolytem, který zajišťuje vodivé spojení obou elektrod. Stabilita celého systému je chráněna tenkou teflonovou membránou, která se pokládá na cigaretový papírek a propouští pouze molekuly plynů. Membrána i cigaretový papírek jsou ve správné poloze zafixovány gumovým kroužkem. Návod na



Obr. 3.2.: Aparatura pro současné měření fotosyntézy a fluorescence na listovém terčíku. 1 – měřicí komůrka s kyslíkovou elektrodou, 2 – PAM fluorometr, 3 – zdroj saturačních pulsů, 4 – termostat, 5 - zapisovač.

Správně potažená elektroda se po připojení na externí zdroj napětí polarizuje. Dosáhne-li elektrický potenciál na katodě 600-700 mV, začne se kyslík na jejím povrchu redukovat na peroxid vodíku. Na anodě současně probíhá oxidace stříbra a vznikající chlorid

stříbrný se zde usazuje. Proud, který v tomto okamžiku prochází obvodem, je stechiometricky přímo úměrný množství kyslíku spotřebovávanému na katodě. Elektrický proud, vznikající při výše popsaných procesech, se převádí na výstupní signál, který je zaznamenáván připojeným zapisovačem. Pro výpočet P_N a R_D je nutné elektrodu kalibrovat aplikací 0,5 ml vzduchu o teplotě 25°C. Podrobný postup kalibrace uvádí například Pacovská (1996).

Elektroda tvoří spodní část měřicí komůrky, která je temperovaná vodou na 25°C. Nad elektrodu se vkládá listový terčík a vložka ze savého materiálu napuštěná 200 μ l 2M roztoku $KHCO_3$ a 20 μ l roztoku enzymu karbonanhydrázy. Tento enzym zajišťuje saturační koncentraci oxidu uhličitého pro fotosyntézu v měřicí komůrce rozkladem $KHCO_3$ (Delieu a Walker 1981). Nad komůrku se upevňuje halogenová lampa (LS2H, Hansatech, King's Lynn, Anglie) jako zdroj aktinického záření pro fotosyntézu. Ozáření je regulována neutrálními šedými filtry.

Při vlastním měření jsem nejprve rostlinu umístila na 20 minut do tmy. Poté jsem z listu vykrojila terčík o ploše 10 cm^2 , který jsem vložila do listové komůrky. U mladších rostlin jsem pro měření použila celý list. Měřila jsem nejprve R_D a poté P_N při ozáření 60, 180 a 270 μ mol $m^{-2}s^{-1}$. Jako vztažnou jednotku jsem používala listovou plochu a obsah chlorofylů.

3.3. Měření fluorescenčních parametrů

K měření fluorescence jsem používala PAM fluorometr (Walz, Effeltrich, Německo) (Obr. 3.2.). Propojení fluorometru s výše zmíněnou elektrodou mi umožnilo měřit fotosyntézu a fluorescenci současně. Fluorometr se skládá ze dvou podjednotek, PAM 101 a PAM 103, a světlovodných vláken. Jednotka PAM 101 obsahuje emitör a detektor záření, jednotka PAM 103 řídí spuštění a dobu trvání saturačního pulsu světelného záření (zdroj KL 1500, Schott, Německo). Princip PAM fluorometru (Schreiber et al. 1986) spočívá v buzení fluorescence v listovém terčíku pomocí světelných pulzů o délce jedné mikrosekundy, které jsou emitovány LED diodami s frekvencí 1,6 nebo 100 kHz. Tyto pulzy světelného záření s maximem ve vlnové délce 650 nm procházejí cestou k povrchu listu přes optický filtr, který nepropouští záření delších vlnových délek než 680 nm. Fluorescenční signál emitovaný listem jako odpověď na každý budící pulz je monitorován fotodiodovým detektorem. Cestou k tomuto detektoru prochází přes ochranný filtr, který propouští pouze záření delší než 700

nm. Zachycený fluorescenční signál je dále zesilován a zaznamenáván připojeným zapisovačem.

Ze záznamu průběhu fluorescence (Obr. 3.3.) lze odečíst hodnoty základních fluorescenčních parametrů (Björkman a Demmig-Adams 1995):

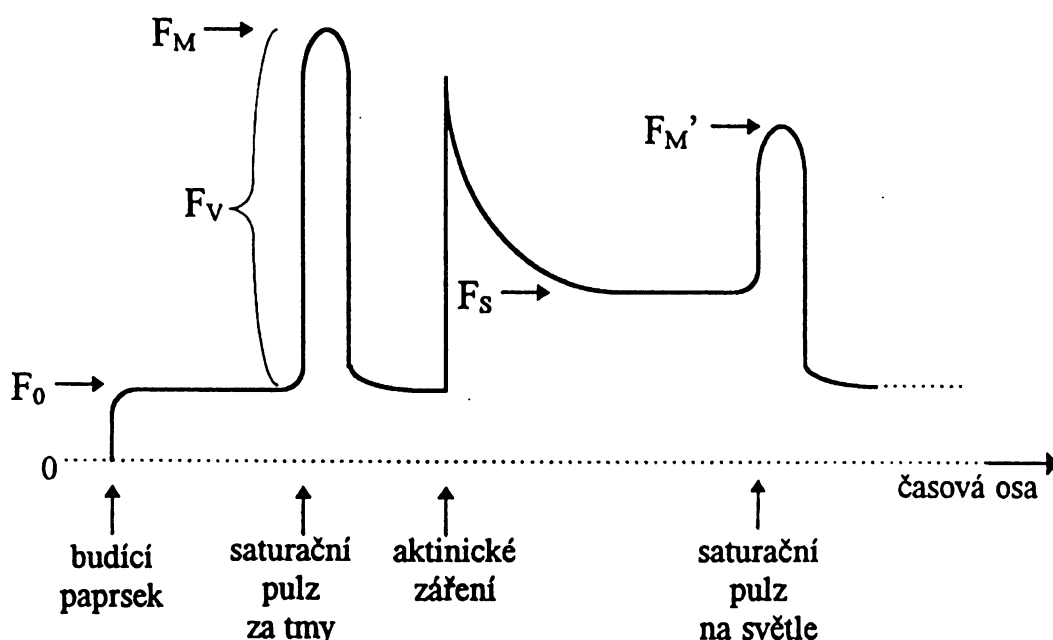
F_0 – fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem při aplikaci červeného budícího paprsku o intenzitě $0,01 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, který je příliš slabý, aby způsobil redukci reakčních center PS II.

F_M – maximální fluorescence emitovaná temnotně adaptovaným listem po aplikaci saturačního pulzu, který má dostatečnou intenzitu, aby zredukoval všechna reakční centra fotosystému II.

F_V – variabilní fluorescence, která je rovna rozdílu $F_M - F_0$.

F_M' – maximální fluorescence emitovaná fotosyntetizujícím listem po aplikaci saturačního pulzu, který způsobí redukci těch reakčních center, která nebyla dosud zredukována působením aktinického záření.

F_S – ustálená fluorescence emitovaná fotosyntetizujícím listem, u něhož po aplikaci aktinického záření došlo k tzv. fluorescenční indukci.



Obr. 3.3.: Záznam průběhu fluorescence s vyznačením základních parametrů (Čáp 1996).

Fluorescenční indukční křivka neboli Kautskyho efekt je typická emise fluorescenčního záření, k níž dochází u listu umístěného na několik minut do tmy, který je poté náhle vystaven působení silného aktinického záření (Walker 1990).

Při měření fluorescenčních parametrů jsem na temnotně adaptovaný listový terčik aplikovala nejprve budící paprsek (hodnota F_0) a poté saturační světelný puls (hodnota F_M). Pak jsem při ozářenostech 60, 180 a 270 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ postupně změřila hodnoty F_S a F_M' . Z výše uvedených základních parametrů jsem vypočítala další fluorescenční parametry podle následujících vzorců (Björkman a Demmig-Adams 1995, Roháček 2002):

$\phi_{P_0} = F_V/F_M$ – maximální fotochemická účinnost fotosystému II. Hodnota tohoto parametru se většinou pohybuje mezi 0,6 až 0,8 a k jejímu výraznému poklesu dochází pod vlivem stresových podmínek.

$\phi_{PSII} = 1 - (F_S/F_M')$ – aktuální fotochemická účinnost fotosystému II. Popisuje, s jakou účinností je při dané ozářenosti energie absorbovaná přeměňována na energii chemickou.

$NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$ – nefotochemické zhášení fluorescence.

3.4. Stanovení obsahu chlorofylů v listech

Obsah chlorofylů *a* a *b* jsem v listech tabáku stanovovala spektrofotometricky, pro extrakci jsem používala N,N'-dimetylformamid (DMF). DMF perforuje buněčné membrány a umožňuje tak proniknutí rozpouštědla až k pletivům obsahujícím fotosyntetické pigmenty. Tím lze dosáhnout úplné extrakce pigmentů, aniž by byla nutná homogenizace vzorků a další manipulace s nimi.

Z listů pokusných rostlinek jsem vykrajovala vždy tři terčíky o ploše 0,5 cm², protože rozložení chlorofylů v listech není zcela homogenní (Porra et al. 1989). Každý terčik jsem extrahovala zvlášť v 1,3 ml DMF ve tmě při teplotě -20°C po dobu 24 hodin. Tato doba extrakce i množství rozpouštědla se pro listy tabáku jeví jako dostačující.

Obsah chlorofylů jsem měřila na spektrofotometru HELIOS α (Unicam, Cambridge, Anglie) v absorpčním spektru od 450 do 800 nm. Z výsledné absorpční křivky jsem pomocí programu Vision 32 (Unicam, Cambridge, Anglie) odečítala hodnoty absorpce při vlnových délkách 647nm, 664nm a 750 nm. Pro výpočet obsahu chlorofylů jsem použila tyto rovnice (Wellburn 1994):

$$\begin{aligned} \text{chlorofyl a (chl a):} & \quad 11,65 (A^{664} - A^{750}) - 2,69 (A^{647} - A^{750}) \\ \text{chlorofyl b (chl b):} & \quad 20,81 (A^{647} - A^{750}) - 4,53 (A^{664} - A^{750}) \end{aligned}$$

kde A^λ jsou hodnoty naměřených absorbancí při dané vlnové délce, ostatní čísla jsou extinkční koeficienty.

3.5. Měření anatomických parametrů listů

Anatomické parametry jsem měřila na polotenkových příčných řezech listem. Kousky listové čepele (velikost 1 x 3 mm) ze střední části čepele mimo střední žilku jsem fixovala 2 hodiny v 5% (v/v) roztoku glutaraldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH = 7,3). Poté jsem segmenty třikrát propláchla v čistém pufru a postfixovala 2 hodiny ve 2% (m/v) roztoku kyseliny osmičelé v tomtéž pufru. Po vyprání pufrům a odvodnění ve vzestupné alkoholové řadě jsem vzorky zalila přes oxid propylénu jako intermédium do Spurrova nízkoviskozitního média (Spurr 1969). Při odvodňování jsem vzorky kontrastovala přes noc 1% (m/v) roztokem octanu uranylu v 70% etanolu. Přesný postup při převádění vzorků uvádí tabulka (Tab. 3.1.). Polymerace vzorků probíhala v termostatu při teplotě 65°C. Polotenkové řezy (tloušťka asi 1 μm) jsem řezala na ultramikrotomu (Reichert OmU2, Rakousko) a barvila 1% roztokem toluidinové modři v 1% tetraboritanu sodném. Z každého listu jsem odebrala čtyři vzorky, z nichž dva jsem zalila do Spurrova média. Jeden z nich jsem pak použila. Ze zhotovených mikroskopických preparátů příčných řezů (tři z každého listu) jsem snímala obrazy do počítače kamerou (jednočipová TV kamera COHU, San Diego, USA) napojenou na mikroskop (Olympus BX 40, Tokyo, Japan). Získané obrazy jsem zpracovávala v systému pro analýzu obrazu LUCIA G, verze 3.52 (Laboratory Imaging, Praha, ČR). Vzhledem k tomu, že tloušťka řezu listem se lišila v závislosti na stáří rostlinky, zvolila jsem vždy takové zvětšení, aby příčný řez listem zaujímal co největší část obrazovky a bylo dosaženo co největšího rozlišení. Při snímání jsem využila objektivy zvětšující 10x, 20x, 40x a 60x. Z každého příčného řezu jsem nasnímala ještě pět buněk palisádového a pět buněk houbového parenchymu. K vytvoření binárních obrazů jsem používala sérii jednoduchých příkazů (tzv. maker), které jsou uvedeny v příloze. Vytvořené binární obrazy jsem měřila pomocí volby „Don't load images, use commands“ v menu Image→Sequences, kam jsem vepsala sérii příkazů, která se má aplikovat na každý otevřený obraz (viz přílohy).

Tab. 3.1.: Přesný pracovní postup použitý při převádění vzorků do Spurrova média.

Pracovní postup pro fixaci vzorků rostlinných objektů, jejich odvodnění a zalití do Spurrova média
1. fixace glutaraldehydem nejméně 2 hodiny (za laboratorní teploty a tlaku, ve tmě) ve směsi 4 dílů 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,3) a 1 dílu 25% roztoku glutaraldehydu
2. promytí puftrem tříkrát po 15 minutách
3. postfixace kyselinou osmičelou 2 hodiny ve směsi 1 dílu fosfátového pufru a 1 dílu 4% vodného roztoku OsO ₄
4. promytí puftrem dvakrát po 15 minutách
5. odvodňovací řada (z čistého etanolu) 30%, 40% a 50% etanol, vždy po dobu 30 minut 70% etanol s 1% octanem uranylu přes noc, při laboratorní teplotě 70% etanol bez octanu uranylu 15 minut, potom vyměnit (v 70% etanolu lze vzorky ponechat v chladničce i po delší dobu)
6. vlastní zalití 80%, 96% a 100% etanol, vždy po dobu 30 minut 100% etanol s propylénoxidem v poměru 1:1 po dobu 30 minut dvakrát propylénoxid po dobu 30 minut propylénoxid se Spurrovým médiem (Spurr, 1969) v poměru 3:1, 1:1 a 1:3, vždy po dobu 60 minut Spurrovo médium 1 až 2 hodiny za laboratorní teploty, potom v chladničce (přes noc) objekty zalít do pryžové formy do čerstvě připraveného Spurrova média
7. polymerace v termostatu při 65°C, přes noc

Na příčných řezech listem jsem měřila plošné podíly jednotlivých typů pletiv (adaxiální epidermis, palisádového parenchymu, houbového parenchymu, abaxiální epidermis) a mezibuněčných prostor, na řezech buňkami palisádového a houbového parenchymu jsem měřila plochu buňky a podíl, který v ní zaujímají chloroplasty. Měřila jsem také tloušťku listu a tloušťku jednotlivých typů pletiv. Vydělením plošných podílů a tlouštěk palisádového a houbového parenchymu jsem vypočítala poměr palisádového a houbového parenchymu (poměr PP/HP).

3.6. Měření růstových parametrů

Jako doplněk k ostatním měřením jsem pro ověření růstu rostlinek stanovovala některé růstové parametry. Zjišťovala jsem výšku stonku, počet listů na rostlině, listovou plochu 4. listu, sušinu 4. listu, sušinu celého prýtu, kořene i celé rostlinky.

Vzorky pro stanovení sušiny jsem sušila po dobu 24 hodin v sušárně při 80°C, hmotnost vzorků jsem stanovovala na analytických vahách. Listovou plochu jsem měřila po obkreslení a nasnímání do počítače pomocí programu analýzy obrazu LUCIA G, verze 3.52 (viz výše).

3.7. Zpracování dat a jejich statistické vyhodnocení

Všechny parametry jsem měřila na 3 - 5 listech (rostlinkách) z každé hladiny ozáření a v každém uvedeném stádiu. Při měření růstových, fotosyntetických a fluorescenčních parametrů jsem pokus opakovala dvakrát. Měření anatomických parametrů listu jsem dělala jen jednou.

Naměřená data jsem statisticky vyhodnotila v programu BMDP Statistical Software (University of California, USA). Použila jsem metodu dvojné analýzy variance a mnohonásobná porovnání jsem provedla pomocí Student-Newman-Keulsova testu (Student-Newman-Keuls Multiple Range Test).

4. Experimentální část

Všechny parametry jsem měřila na 4. listu, počítáno od báze rostlinky, s výjimkou některých růstových parametrů, které se týkaly celé rostlinky (výška stonku, počet listů, sušina). Při měření jsem používala vždy stejné časové schéma.

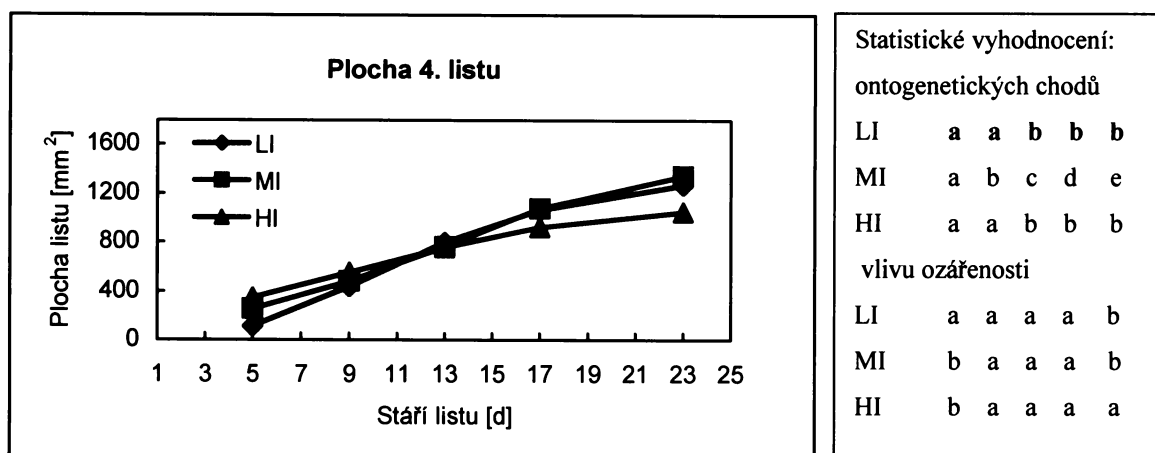
Listy nebo rostlinky jsem odbírala během 35-denní kultivace celkem pětkrát, a to 5, 9, 13, 17 a 23 dnů poté, co se 4. list objevil na apexu. Čtvrtý list se objevil na apexu u všech rostlin (LI, MI a HI) shodně 11. až 12. den kultivace.

Výsledky uvádím formou tabulek a spojnicových grafů, se shodnou úpravou pro snazší porovnání. Statistické vyhodnocení všech sledovaných parametrů uvádím vždy nejprve pro porovnání ontogenetických chodů u jednotlivých variant, a poté pro porovnání rostlinek v jednotlivých stářích. Výsledky statistického zpracování dat jsou vyjádřeny písmeny *a*, *b*, *c*, *d*, *e*. Písmeno *a* je přitom přiřazeno vždy nejnižší hodnotě. Pokud mezi rostlinkami nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl, jsou označeny stejnými písmeny, pokud mezi nimi byl rozdíl statisticky průkazný, jsou označeny písmeny různými, a to abecedně tím vzdálenějšími, čím větší je tento rozdíl. Jsou-li písmena tučná, jde o rozdíl statisticky vysoce významný (na hladině významnosti 1%), nejsou-li písmena tučná, jedná se o rozdíly významné (hladina významnosti 5%).

4.1. Růstové charakteristiky 4. listu během jeho vývoje

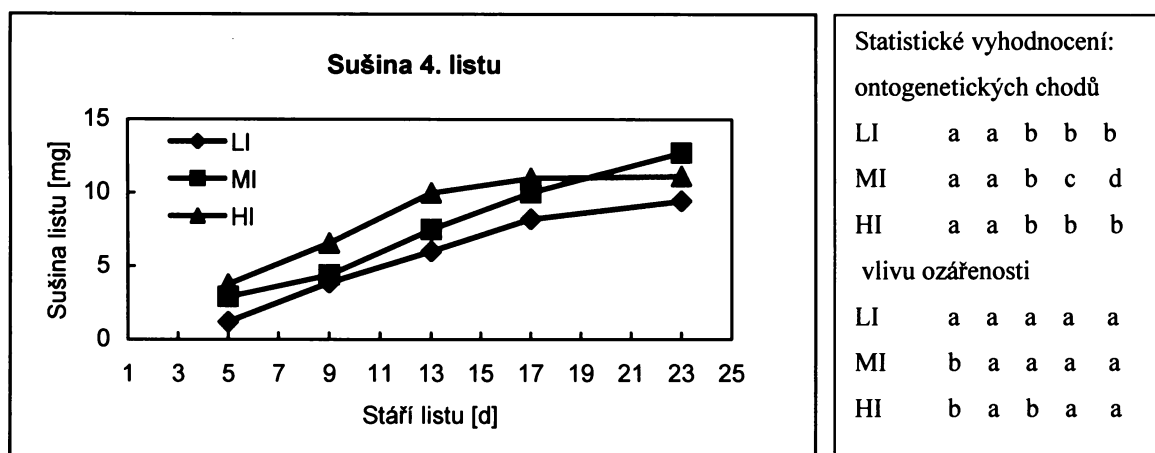
V průběhu vývoje 4. listu jsem sledovala jeho listovou plochu a akumulaci sušiny. Ostatní parametry se týkaly celé rostlinky (tj. výška stonku, počet listů, celková sušina, sušina kořene a prýtu).

Expanze listové plochy 4. listu (**Obr. 4.1.**) začala dříve u MI a HI rostlinek. Dvacet tři dní poté, co se list objevil na apexu, končila expanze listu pouze u HI rostlinek. Z důvodu pozdějšího nástupu rychlé expanze byla listová plocha 4. listu ve stáří 5 dnů u LI rostlinek významně menší. Naopak plocha 4. listu u HI rostlinek byla nejmenší ve stáří 23 dnů. Velikost listové plochy 4. listu byla u všech rostlinek téměř stejná ve stáří 13 dnů.



Obr. 4.1. Listová plocha během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

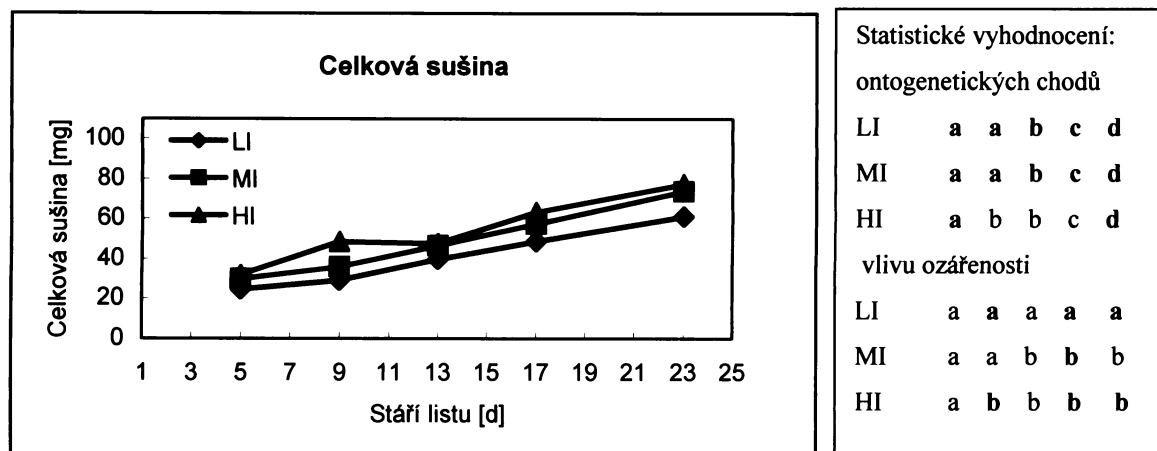
Akumulace sušiny u 4. listu (**Obr. 4.2.**) začala dříve a probíhala rychleji u MI a HI rostlinek. Během vývoje listu byl znatelný trend k nižší akumulaci sušiny 4. listu u LI rostlinek. V průběhu pokusu skončila akumulace sušiny 4. listu pouze u HI rostlinek.



Obr. 4.2. Sušina 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Akumulace sušiny celých rostlin (**Obr. 4.3.**) odráží v podstatě nárůst sušiny prýtu (**Tab. 4.1.**), protože nárůst sušiny kořene (**Tab. 4.1.**) byl v průběhu pokusu poměrně malý. Sušina prýtu se mezi 5. a 23. dnem u všech rostlin téměř ztrojnásobila, což v kombinaci s malým nárůstem sušiny kořenů způsobilo, že poměr sušiny prýtu ku sušině kořene narůstal (data neuvádím). Sušina prýtu byla celou dobu pokusu nejnižší u LI rostlinek (**Tab. 4.1.**). Dynamika akumulace sušiny prýtu byla u všech rostlin podobná. Sušina kořene narůstala

v průběhu pokusu statisticky významně pouze u LI rostlinek, což bylo dáno spíše menší variabilitou pokusných rostlin (Tab. 4.1.).

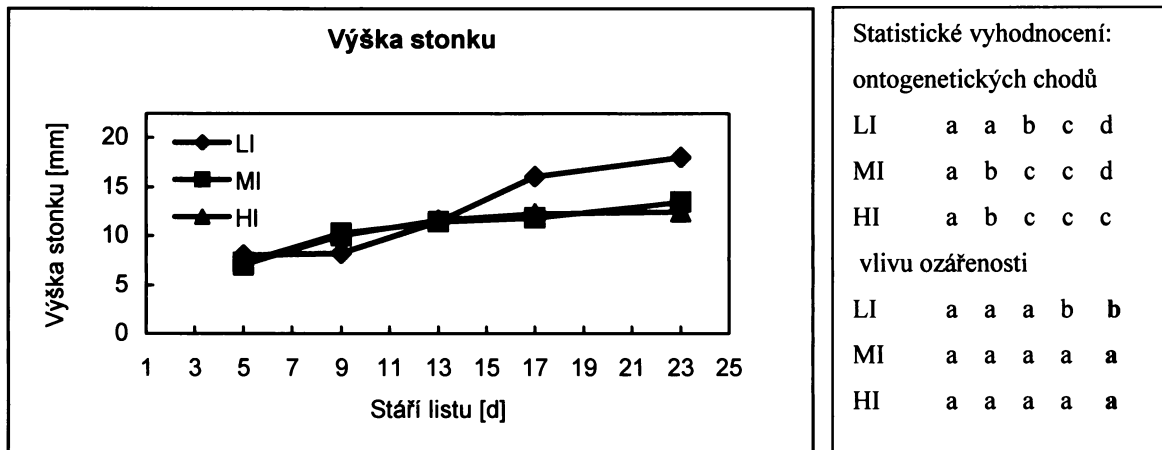


Obr. 4.3. Sušina celé rostlinky během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Tab. 4.1.: Sušina prýtu a kořene během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně). První písmenko za hodnotou udává vyhodnocení ontogenetických chodů, druhé písmenko za hodnotou udává vyhodnocení vlivu ozáření.

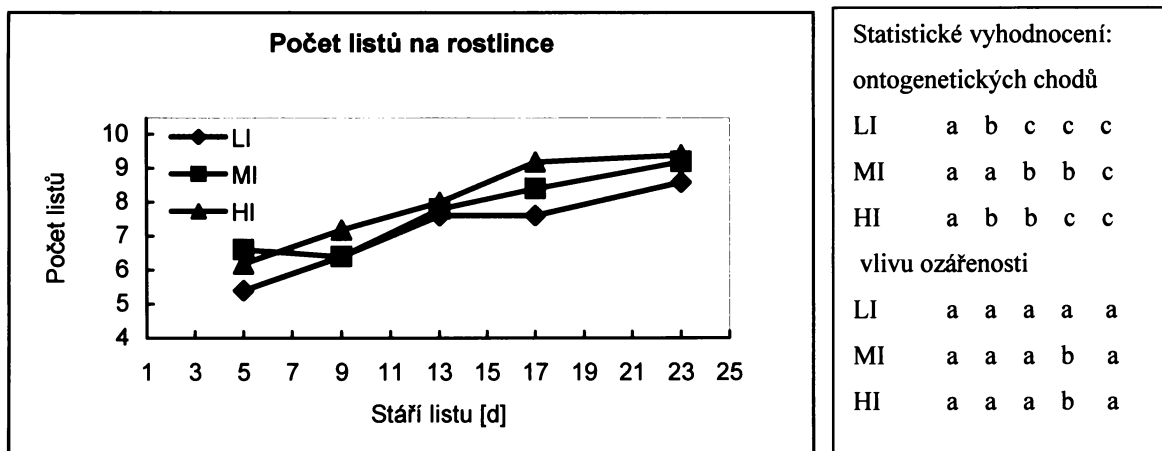
		Stáří listu [d]				
		5d	9d	13d	17d	23d
Sušina prýtu [mg]	LI	16.1 a,a	19.9 a,a	28.7 b,a	36.2 c,a	47.1 d,a
	MI	19.2 a,b	25.7 b,a	35.6 c,b	43.8 d,b	57.7 e,b
	HI	21.6 a,b	35.8 b,b	35.6 b,b	50.3 c,c	63.1 d,b
Sušina kořene [mg]	LI	8.6 a,a	9.0 a,a	11.0 b,a	12.5 b,a	13.9 c,a
	MI	10.5 a,a	10.1 a,a	11.0 a,a	13.2 a,a	15.8 a,a
	HI	10.2 a,a	12.7 a,b	12.1 a,a	13.0 a,a	14.2 a,a

Hladina ozáření měla poměrně značný vliv na výšku stonku (Obr. 4.4.), a to zejména u starších rostlinek (ve stáří 28 a 34 dnů, tj. 17 a 23 dnů poté, co se na apexu objevil 4. list). Nízká hladina ozáření (LI) způsobila výrazné prodloužení stonku, rostlinky MI a HI se ve výšce stonku navzájem nelišily.



Obr. 4.4. Výška stonku během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Počet listů na rostlince (**Obr. 4.5.**) růstovou ozáření naopak příliš ovlivněn nebyl. Na počátku sledování měly rostlinky v průměru 6 listů, na konci sledování v průměru 8-9 listů.



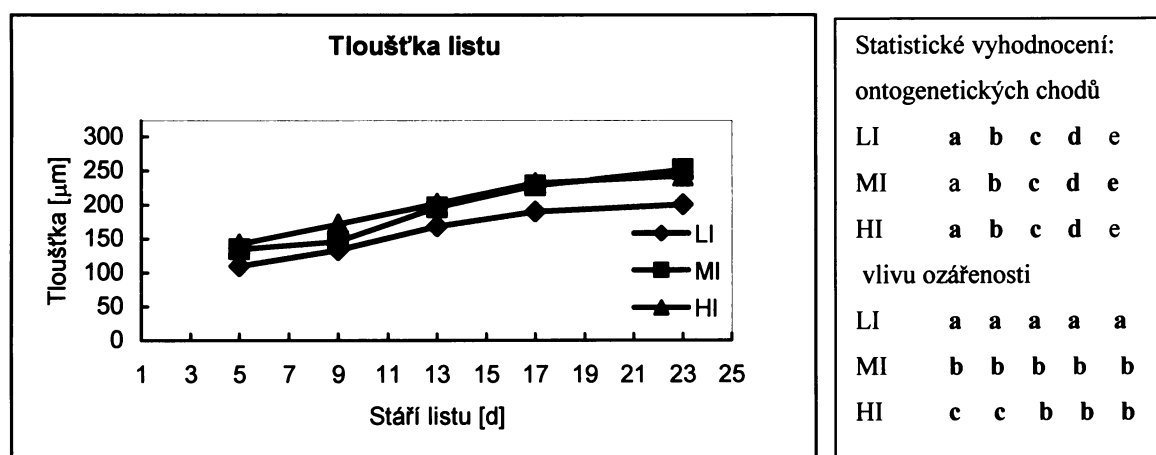
Obr. 4.5. Počet listů na rostlince během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

4.2. Anatomické charakteristiky 4. listu během jeho vývoje

Během vývoje 4. listu jsem sledovala tloušťku listu, tloušťky a plošné podíly jednotlivých typů pletiv na příčném řezu listem, plochu buněk palisádového a houbového parenchymu na příčném řezu listem a plošný podíl chloroplastů na řezu buňkou palisádového a houbového parenchymu.

Anatomické změny v průběhu vývoje 4. listu jsou dobře patrné i na příčných řezech listem (**Obr. 4.6. až 4.10.**). Ve stáří 5 dnů (**Obr. 4.6.**) lze rozpoznat více diferencovaná pletiva a větší zastoupení mezibuněčných prostor u HI rostlinek. Tento rozdíl odráží dřívější nástup expanze 4. listu. Čtvrtý list měl vždy jen jednu vrstvu palisádového parenchymu, který byl málo kompaktní, a to i u HI rostlinek. Na příčném řezu listem u rostlinek HI a MI lze v průběhu jeho vývoje také dobře vidět ústup chloroplastů palisádového parenchymu k antiklinálním buněčným stěnám (**Obr. 4.7. až 4.10.**).

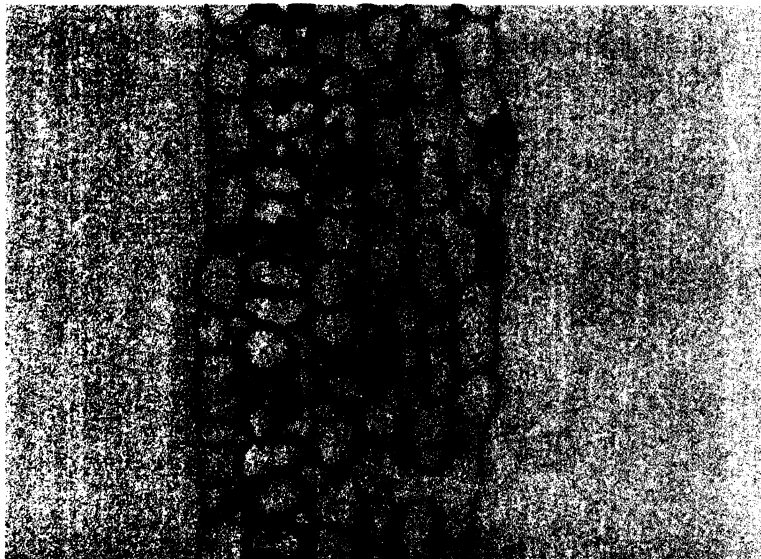
Pět dní poté, co se 4. list objevil na apexu, byla tloušťka listu (**Obr 4.11.**) největší u HI a nejmenší u LI rostlinek. V průběhu vývoje 4. listu jeho tloušťka narůstala a během 23 dnů pokusu se u všech rostlinek téměř zdvojnásobila. Rozdíly mezi tloušťkou 4. listu HI a MI rostlinek v průběhu vývoje listu vymizely.



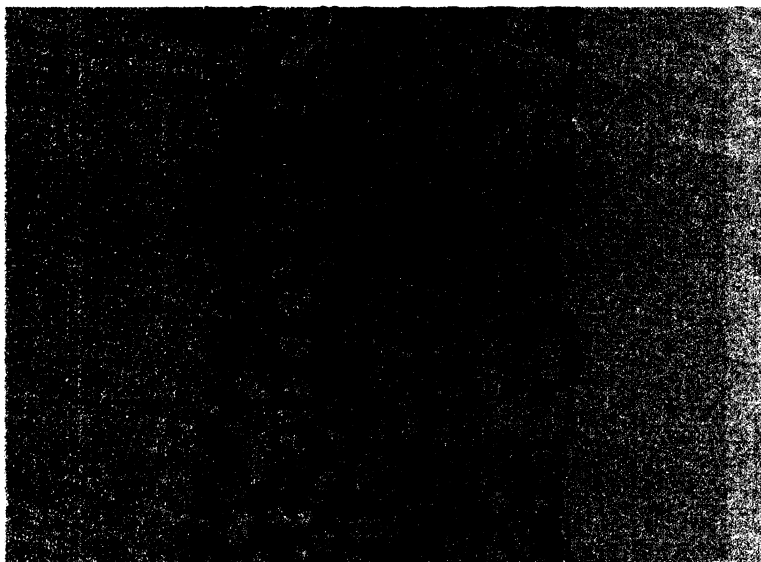
Obr. 4.11. Tloušťka 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Změny v tloušťkách jednotlivých typů pletiv v průběhu vývoje 4. listu jsou znázorněny v tabulce (**Tab. 4.2.**).

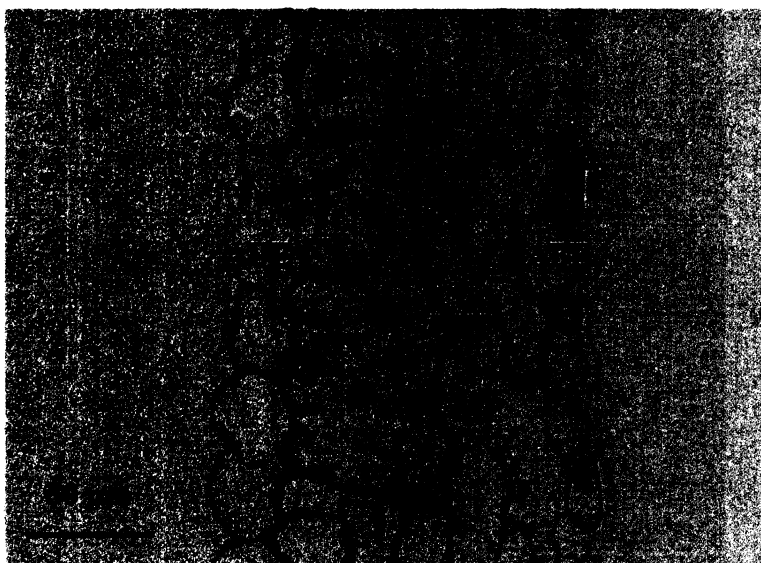
Popis struktur z **Obr. 4.6.:**
ADE - adaxiální epidermis
ABE - abaxiální epidermis
BHP – buňka houbového parenchymu
BPP – buňka palisádového parenchymu
MP – mezibuněčné prostory



5d LI



5d MI

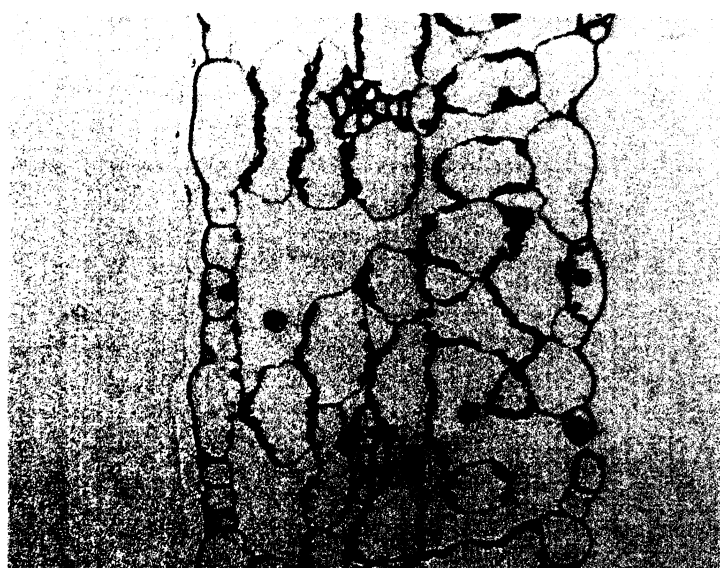


5d HI

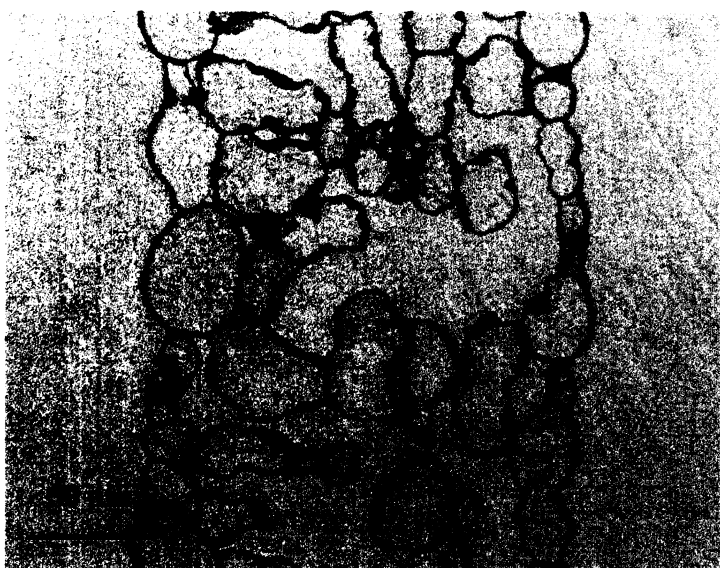
Obr. 4.6.: Příčné řezy 4. listem rostlinek *Nicotiana tabacum* pěstovaných při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Stáří listu 5 dní. Zvětšení pro všechny obrázky udává úsečka v dolním obrázku.



9d LI

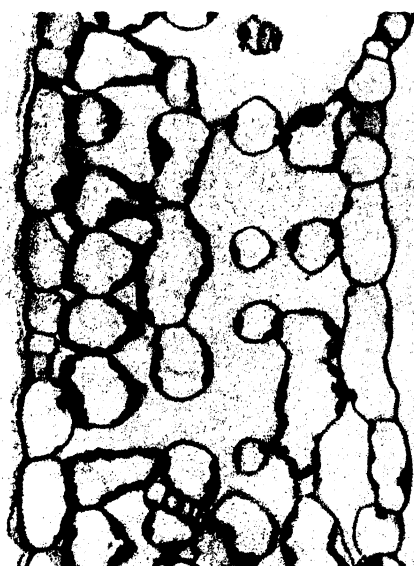


9d MI

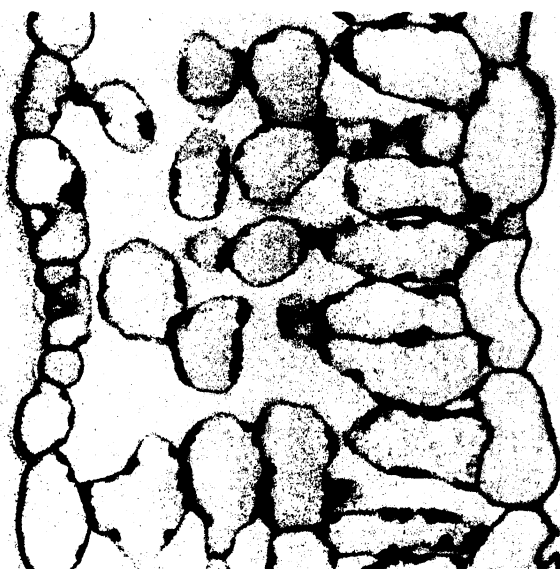


9d HI

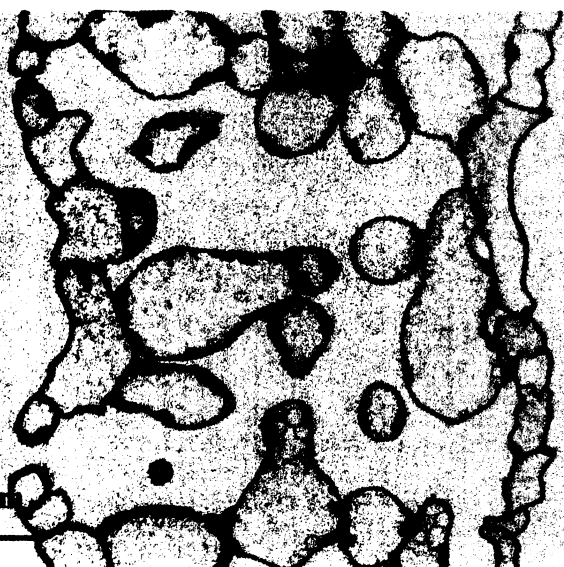
Obr. 4.7.: Příčné řezy 4. listem rostlinek *Nicotiana tabacum* pěstovaných při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Stáří listu 9 dní. Zvětšení pro všechny obrázky udává úsečka v dolním obrázku.



13d LI



13d MI

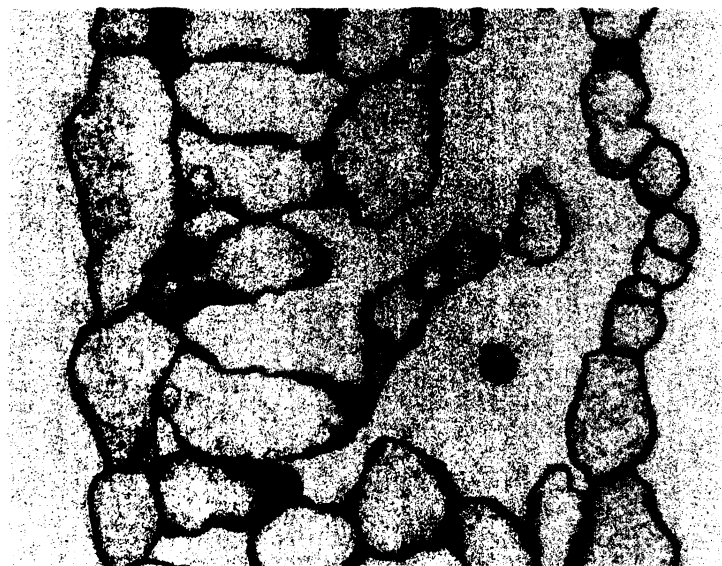


13d HI

Obr. 4.8.: Příčné řezy 4. listem rostlinek *Nicotiana tabacum* pěstovaných při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Stáří listu 13 dní. Zvětšení pro všechny obrázky udává úsečka v dolním obrázku.



17d LI

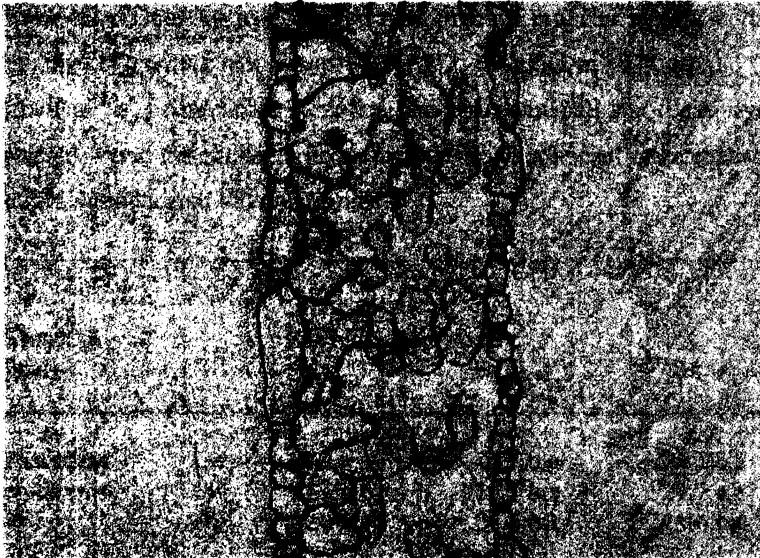


17d MI

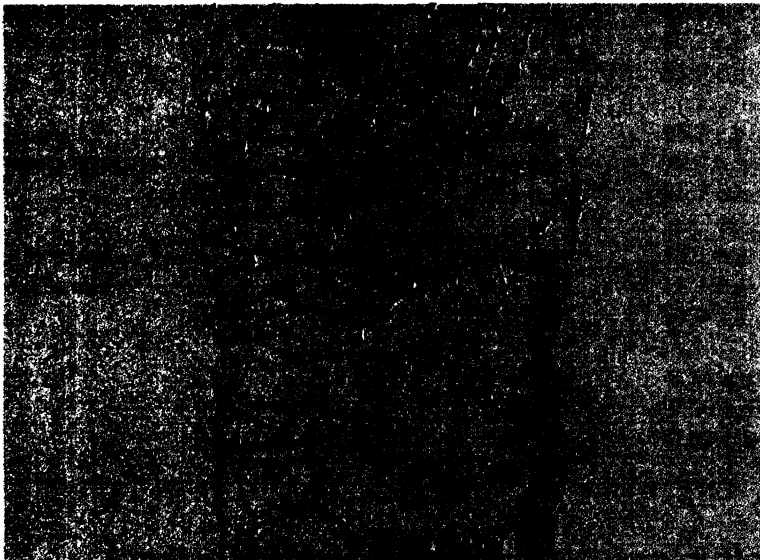


17d HI

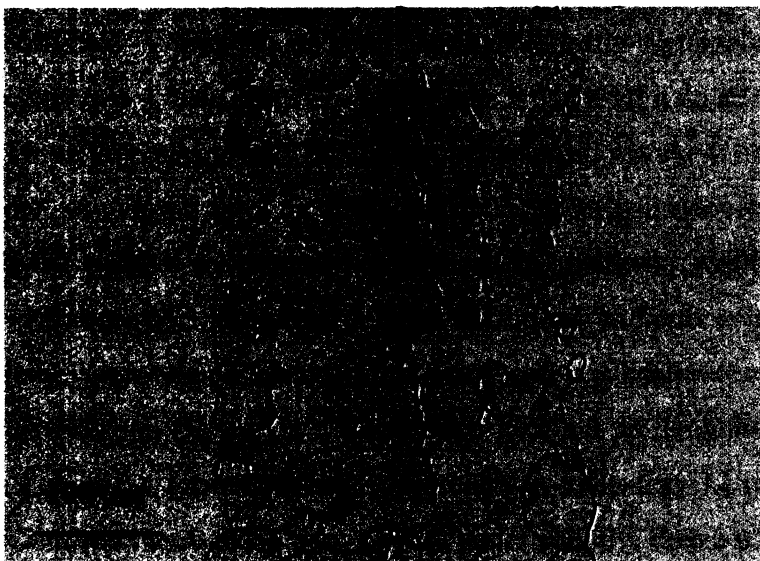
Obr. 4.9.: Příčné řezy 4. listem rostlinek *Nicotiana tabacum* pěstovaných při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Stáří listu 17 dní. Zvětšení pro všechny obrázky udává úsečka v dolním obrázku.



23d LI



23d MI



23d HI

Obr. 4.10.: Příčné řezy 4. listem rostlinek *Nicotiana tabacum* pěstovaných při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Stáří listu 23 dní. Zvětšení pro všechny obrázky udává úsečka v dolním obrázku.

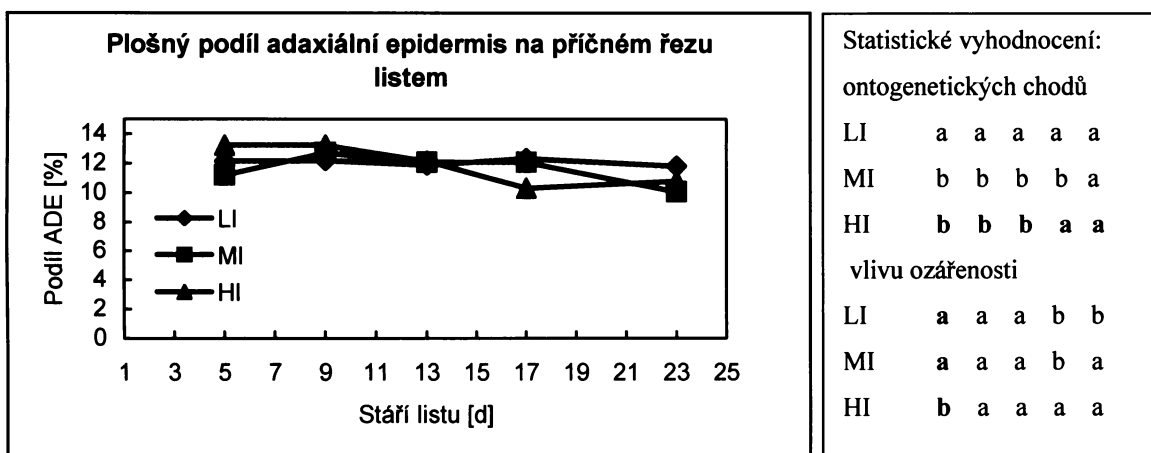
Tab. 4.2.: Tloušťky jednotlivých typů pletiv v průběhu vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně). První písmenko za hodnotou udává vyhodnocení ontogenetických chodů, druhé písmenko za hodnotou udává vyhodnocení vlivu ozáření.

Tloušťka [μm]	Stáří listu [d]	Stáří listu [d]				
		5d	9d	13d	17d	23d
Adaxiální epidermis	LI	13.7 a,a	16.5 b,a	20.2 c,a	23.6 d,a	22.9 d,a
	MI	15.5 a,b	19.1 b,a	22.7 c,a	24.7 c,a	24.3 c,a
	HI	19.0 a,c	23.6 b,b	23.6 b,a	24.8 b,a	25.8 b,a
Palisádový parenchym	LI	25.1 a,a	33.8 b,a	45.5 c,a	51.6 d,a	59.9 e,a
	MI	32.5 a,b	40.1 b,b	57.7 c,b	74.1 d,b	76.5 d,b
	HI	37.0 a,c	48.6 b,c	63.9 c,c	77.1 d,b	80.3 d,b
Houbový parenchyma	LI	57.7 a,a	69.2 b,a	85.2 c,a	94.3 d,a	100.6 e,a
	MI	72.0 a,b	70.6 a,a	97.9 b,b	107.3 c,b	127.5 d,c
	HI	72.4 a,b	83.1 b,b	95.7 c,b	110.2 d,b	115.7 d,b
Abaxiální epidermis	LI	14.1 a,a	14.4 a,a	18.1 b,a	21.5 c,a	17.5 b,a
	MI	15.0 a,a	16.5 a,b	18.1 b,a	22.6 c,a	23.5 c,b
	HI	15.6 a,a	18.0 a,b	19.9 b,a	21.3 b,a	21.9 b,b
PP/HP	LI	0.44 a,a	0.49 b,a	0.54 c,a	0.56 c,a	0.61 d,a
	MI	0.45 a,a	0.57 b,b	0.60 b,a	0.72 c,b	0.62 b,a
	HI	0.52 a,b	0.59 a,b	0.69 b,b	0.72 b,b	0.71 b,b

Adaxiální epidermis (ADE) byla u 5-denních listů nejtlustší u HI a nejtenčí u LI rostlinek. V průběhu vývoje listu tyto rozdíly vymizely (Tab. 4.2.). Tloušťka adaxiální epidermis 4. listu narůstala jen do stáří 9 dnů u HI a do stáří 17 dnů u LI rostlinek (Tab. 4.2.). Tloušťka palisádového parenchymu v průběhu vývoje 4. listu významně narůstala a během 23 dnů se zvětšila asi 2,5x (Tab. 4.2.). Tloušťka palisádového parenchymu (PP) byla po celou dobu pokusu významně nejmenší u LI rostlinek, rozdíl mezi MI a HI rostlinkami byl významný do 13 dnů stáří 4. listu. Také tloušťka houbového parenchymu v průběhu vývoje 4. listu významně narůstala, i když méně, než u palisádového parenchymu. Tloušťka houbového parenchymu (HP) byla u 23-denních listů ani ne dvojnásobná ve srovnání s 5-denními listy (Tab. 4.2.). Nejtenčí houbový parenchym měly listy LI rostlinek, listy MI a HI rostlinek se v tloušťce houbového parenchymu téměř nelišily. Pouze u 23-denních listů měly MI rostlinky tlustší houbový parenchym, což odráží pokračující expanzi 4. listu MI rostlinek v době, kdy expanze listu u HI rostlinek již končila. Tloušťka abaxiální epidermis (ABE) byla u 5-denních

listů přibližně stejná u všech rostlinek a v průběhu vývoje listu narůstala obdobným způsobem jako epidermis adaxiální (Tab. 4.2.). Poměr palisádového a houbového parenchymu (PP/HP) v průběhu vývoje listu mírně narůstal, což odráží větší nárůst tloušťky palisádového parenchymu ve srovnání s parenchymem houbovým. Nejvyšší PP/HP měly listy HI a nejnižší PP/HP měly listy LI rostlinek, i když rozdíly nebyly ve všech stářích statisticky významné (Tab. 4.2.).

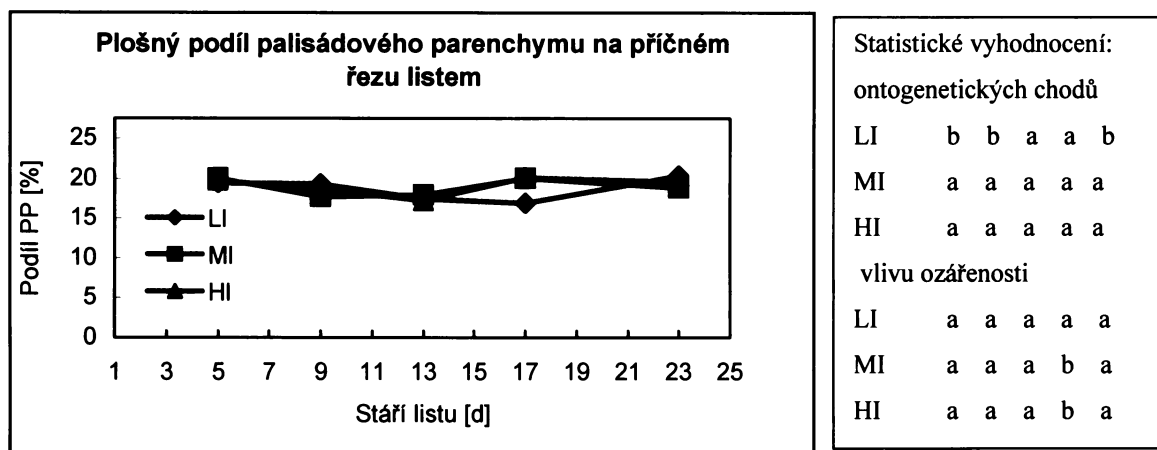
Plošné podíly jednotlivých typů pletiv na příčném řezu listem (Obr. 4.12. až 4.16.) se v průběhu vývoje 4. listu měnily, s výjimkou houbového parenchymu, jen málo. V průběhu vývoje 4. listu se plošný podíl adaxiální epidermis (Obr. 4.12.) pohyboval mezi 10 a 15%. Plošný podíl ADE se u LI rostlinek neměnil, u MI a HI rostlinek během vývoje listu mírně klesnul. Ve stáří 13 dnů, kdy měly listy stejnou listovou plochu, byl plošný podíl ADE téměř stejný u všech rostlinek.



Obr. 4.12. Plošný podíl adaxiální epidermis na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

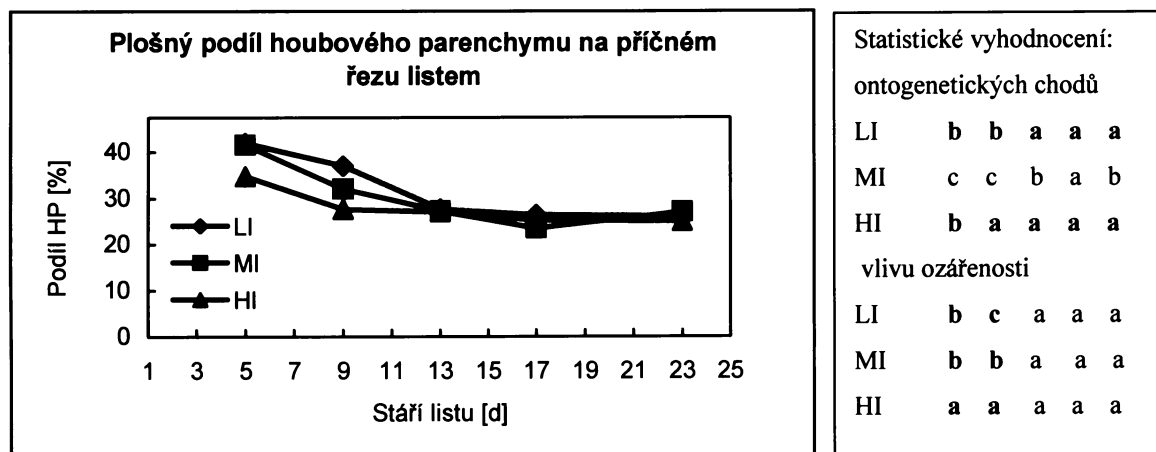
Plošný podíl palisádového parenchymu (Obr. 4.13.) se v průběhu vývoje 4. listu pohyboval mezi 17 a 20%, a to přesto, že tloušťka palisádového parenchymu výrazně narůstala a rozdíly mezi rostlinkami byly značné (Tab. 4.2.). Palisádový parenchym tedy narůstal proporcionálně s růstem listu. Ve stáří 13 dnů, kdy měly listy stejnou listovou plochu, byl plošný podíl PP, podobně jako v případě ADE, u všech rostlinek téměř stejný (Obr. 4.13.).





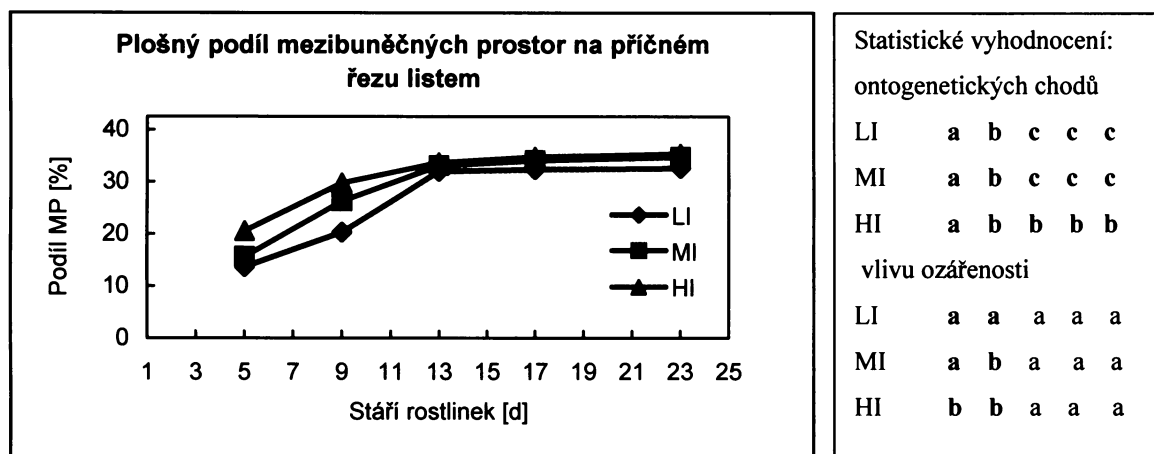
Obr. 4.13. Plošný podíl palisádového parenchymu na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Houbový parenchym (**Obr. 4.14.**) byl jediným pletivem, jehož plošný podíl v průběhu vývoje 4. listu výrazně klesl (z počátečních 35 - 42% na 25 - 27%). Tento pokles souvisel s nárůstem plošného podílu mezibuněčných prostor (MP) (**Obr. 4.15.**). Pokles plošného podílu HP byl významný mezi 5. a 9. dnem u HI rostlin a mezi 5. a 13. dnem u MI a LI rostlin. U 5-denních listů byl plošný podíl HP významně nižší u HI rostlin, které měly také významně vyšší plošný podíl MP. Rozdíly vymizely do 13. dne stáří listu, kdy měly listy také stejnou listovou plochu.



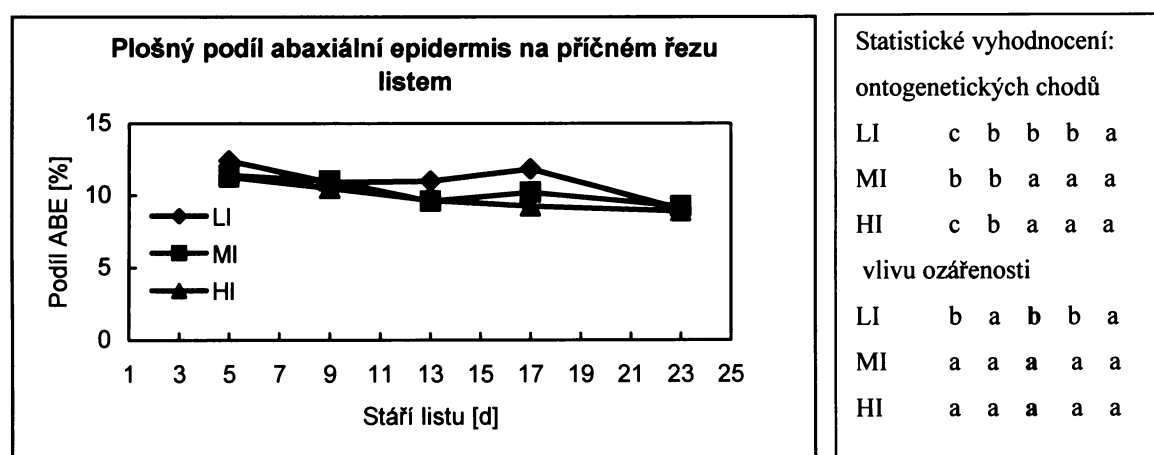
Obr. 4.14. Plošný podíl houbového parenchymu na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Plošný podíl mezibuněčných prostor (**Obr. 4.15.**) narůstal s poklesem plošného podílu HP. U 5-denních listů byl podíl MP na řezu listem 13 – 20%, u 13-denních se pohyboval okolo 33%. Od 13. dne se již podíl MP na řezu listem nezvyšoval a mezi rostlinkami již nebyly rozdíly.



Obr. 4.15. Plošný podíl mezibuněčných prostor na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

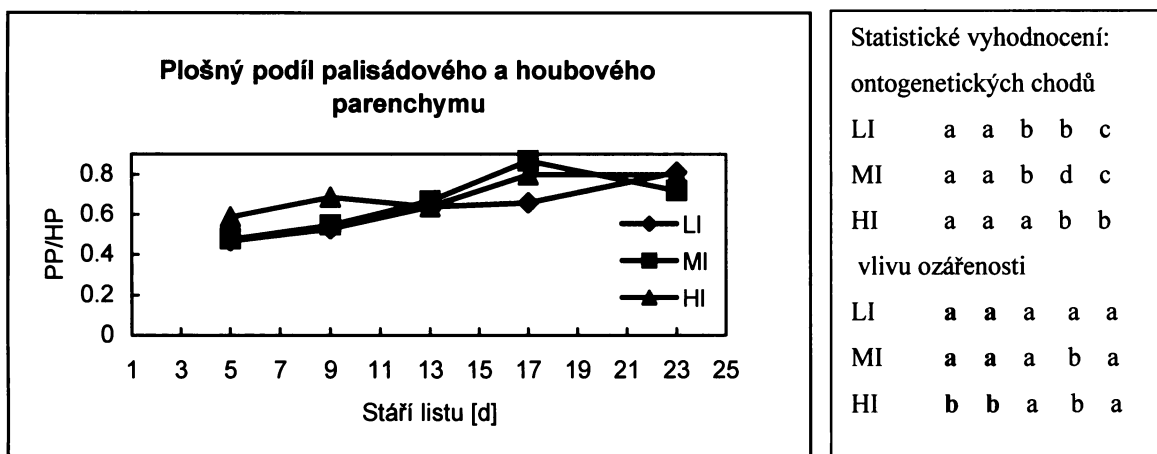
Plošný podíl abaxiální epidermis (**Obr. 4.16.**) v průběhu vývoje 4. listu u všech rostlinek mírně klesal, a to z 11 – 12% na 9%. Ve stáří 13 dnů měly listy LI rostlinek významně vyšší podíl ABE. Abaxiální epidermis byla tak jediným pletivem, jehož plošný podíl u 13-denních listů nebyl u všech rostlinek stejný.



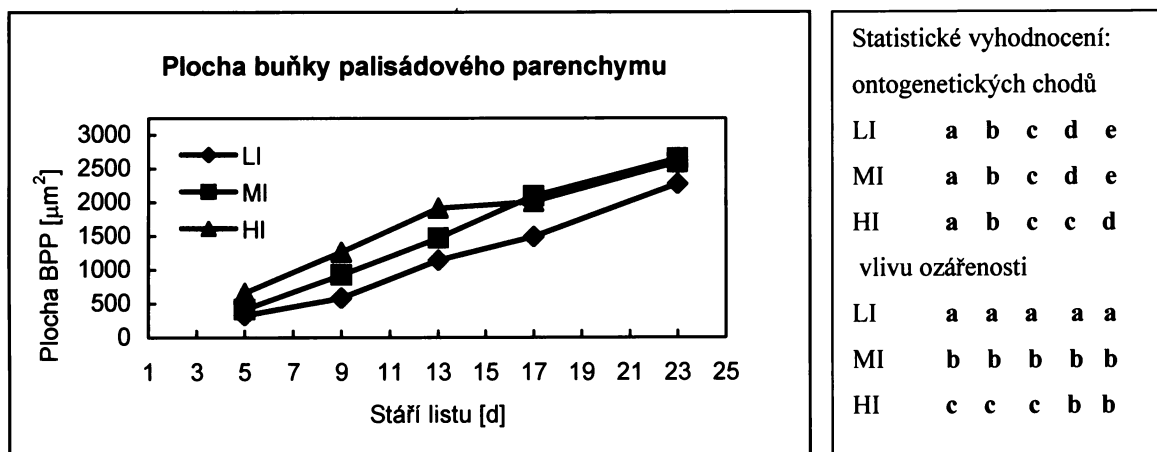
Obr. 4.16. Plošný podíl abaxiální epidermis na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Plošný podíl PP/HP (Obr. 4.17.) v průběhu vývoje 4. listu se u všech rostlinek zvětšoval. U 5-denních listů se plošný podíl pohyboval v rozmezí 0,45 – 0,60. U 23-denních pak dosáhl hodnot okolo 0,8.

Plocha buňky palisádového parenchymu (BPP) na příčném řezu listem (Obr. 4.18.) prudce narůstala v průběhu vývoje 4. listu a během pokusu se zvětšila asi 5x. PPB byla významně nejvyšší u HI a nejnižší u LI až do 17 dnů stáří listu, kdy již nebyl rozdíl mezi HI a MI rostlinkami.

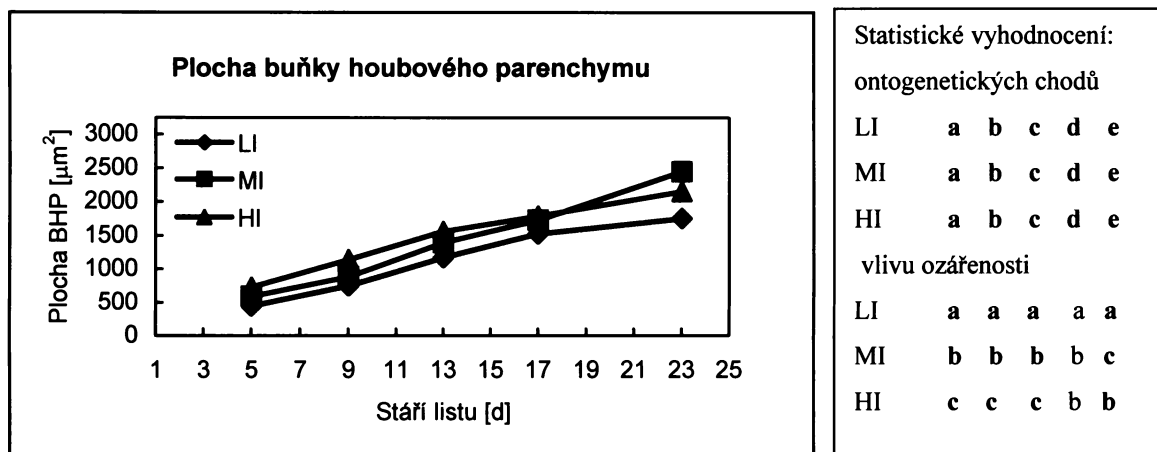


Obr. 4.17. Plošný podíl palisádového a houbového parenchymu na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).



Obr. 4.18. Plocha buňky palisádového parenchymu na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

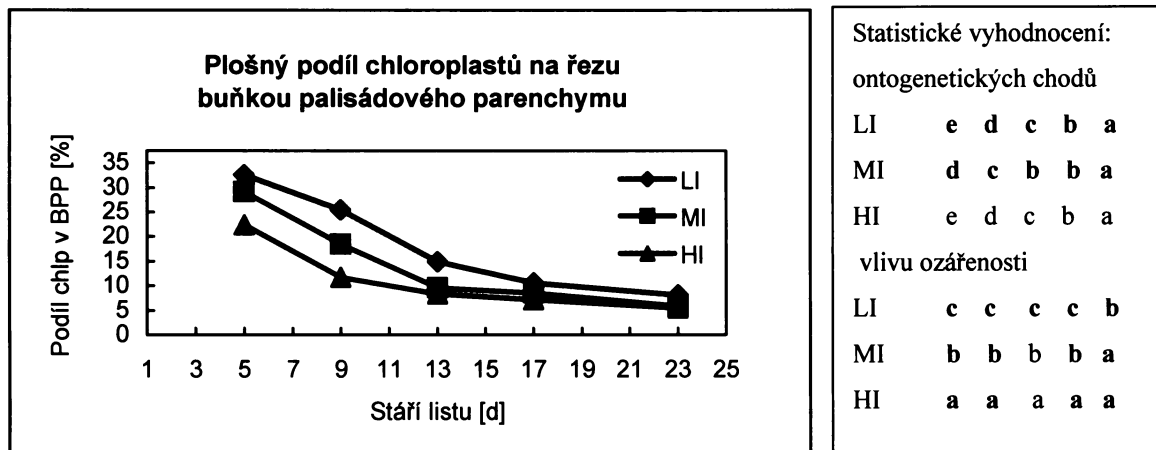
Plocha buňky houbového parenchymu (BHP) na příčném řezu listem (**Obr. 4.19.**) narůstala v průběhu vývoje 4. listu obdobně jako PPB. U 5-denních listů byla BHP o něco větší než BPP, u 23-denních listů tomu bylo přesně naopak. Dynamika nárůstu byla tedy u BHP o něco nižší.



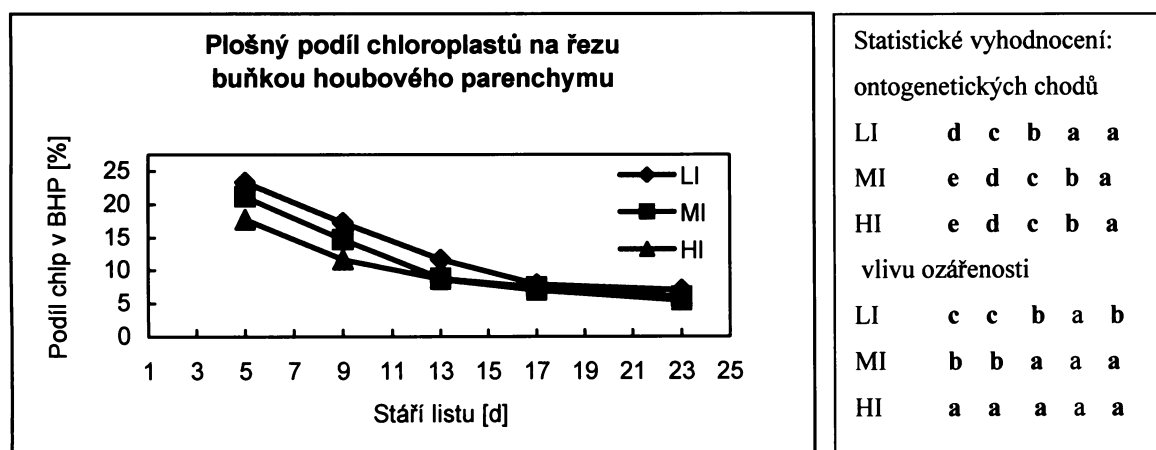
Obr. 4.19. Plocha buňky houbového parenchymu na příčném řezu 4. listem během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Spolu s narůstající plochou BPP na řezu listem klesal v průběhu vývoje listu podíl chloroplastů v buňce (**Obr. 4.20.**), měřený jako plošný podíl chloroplastů na řezu BPP, velmi výrazně do 13 dnů. Poté se pokles zpomalil, i když i u 23-denních listů byl statisticky významný. Největší podíl chloroplastů v buňce měly po celou dobu pokusu rostlinky LI. Rozdíly v podílu chloroplastů v BPP byly významné až do 23 dnů, kdy se ztrácí rozdíl mezi MI a HI rostlinkami.

Podíl chloroplastů na řezu BHP (**Obr. 4.21.**) klesal v průběhu vývoje 4. listu podobným způsobem jako v BPP. U 5-denních listů byl podíl chloroplastů v BHP nižší než v BPP, u 23-denních listů byl podíl chloroplastů shodně okolo 8% v obou typech buněk. Největší podíl chloroplastů v BHP měly listy LI rostlinek.



Obr. 4.20. Plošný podíl chloroplastů na řezu buňkou palisádového parenchymu u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

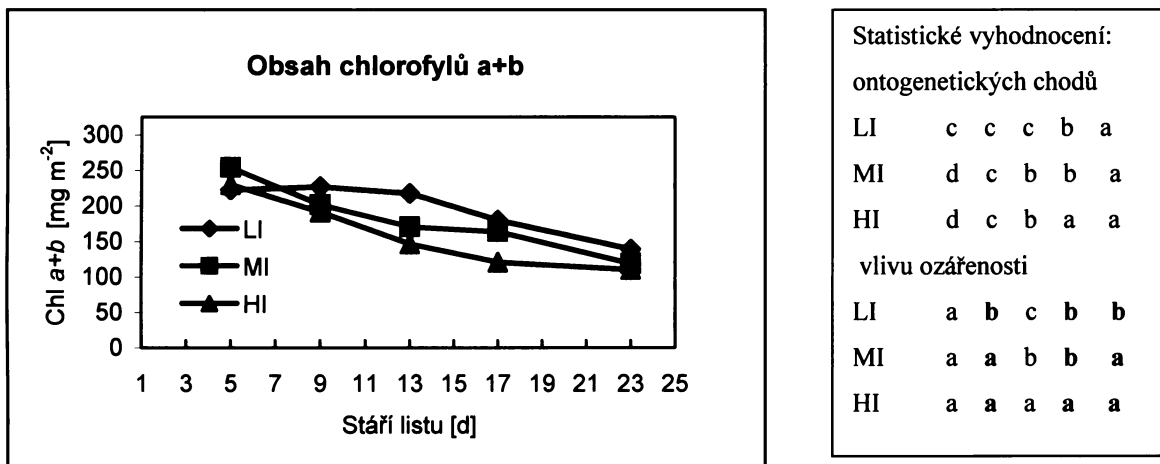


Obr. 4.21. Plošný podíl chloroplastů na řezu buňkou houbového parenchymu u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

4.3. Fotosyntetické charakteristiky 4. listu během jeho vývoje

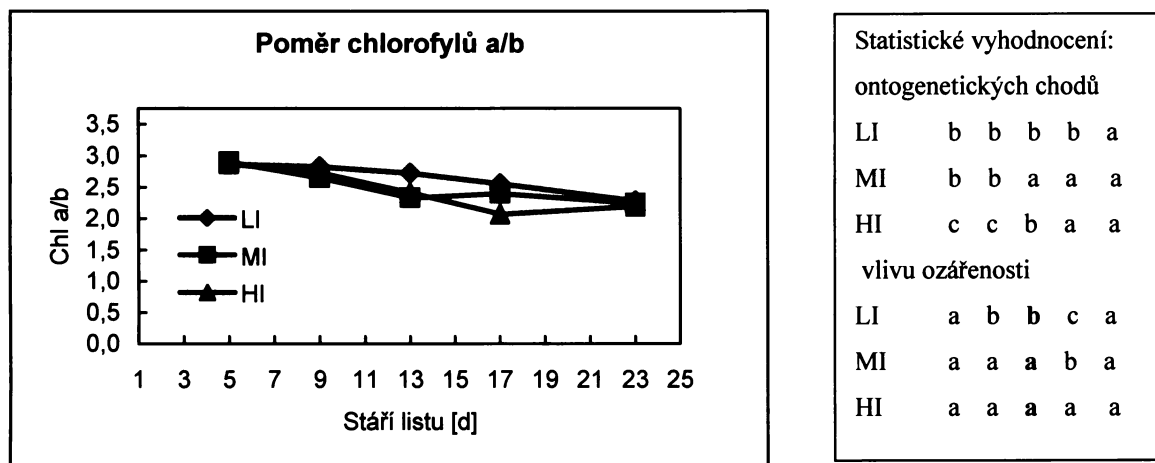
V průběhu vývoje 4. listu jsem měřila změny v obsahu chlorofylů, rychlost temnotního dýchání (R_D) a rychlost čisté fotosyntézy (P_N). Rychlost čisté fotosyntézy jsem u každého listu měřila při třech hladinách ozáření (60, 180 a 270 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$), které odpovídaly hladinám ozáření, při kterých jsem rostlinky pěstovala. Jako vztažné jednotky pro P_N jsem používala listovou plochu a obsah chlorofylu v listu.

Obsah chlorofylů $a+b$ ve 4. listu během jeho vývoje výrazně klesal (**Obr. 4.22.**). U 5-denních listů se pohyboval kolem hodnoty 250 mg m^{-2} a mezi rostlinkami nebyl patrný žádný významný rozdíl. Obsah chlorofylů klesal u MI a HI rostlinek již od počátku pokusu, u LI rostlinek začal klesat později (mezi 13. a 17. dnem stáří listu). U 23-denních listů obsah chlorofylu $a+b$ jen slabě překračoval hranici 100 mg m^{-2} .



Obr. 4.22. Obsah chlorofylů $a+b$ ve 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Poměr chlorofylů a/b (**Obr. 4.23.**) během vývoje 4. listu klesal podobně, jak obsah chlorofylů $a+b$, tedy dříve a výrazněji u MI a HI rostlinek. U 5-denních listů byl poměr chlorofylů a/b stejný u všech rostlinek a dosahoval hodnoty 2.9. U 23-denních listů dosahoval poměr chl a/b hodnoty jen 2.2-2.3.



Statistické vyhodnocení:

ontogenetických chodů

LI b b b b a

MI b b a a a

HI c c b a a

vlivu ozáření

LI a b b c a

MI a a a b a

HI a a a a a

Obr. 4.23. Poměr chlorofylů *a/b* ve 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

V průběhu vývoje 4. listu se měnil vztah mezi ozářeními a P_N , jak vyplývá z **Obr. 4.24**. Světelný kompenzační bod klesal u všech rostlin, u MI a HI rostlin se však od 13. dne stáří listu znovu zvyšoval. U 23-denních listů MI a HI rostlin byl světelný kompenzační bod stejný jako u 5-denních. U LI rostlin se světelný kompenzační bod nezvyšoval, takže u 23-denních listů byl výrazně nižší než u 5-denních. Fotosyntetická účinnost i kapacita se v průběhu vývoje listu zvyšovaly a poté mírně klesly u 23-denních listů. Fotosyntetická kapacita byla mírně vyšší u MI než u HI rostlin, a to v průběhu celého vývoje listu.

Rychlost temnotního dýchání (R_D) (**Obr. 4.25.**) se v průběhu vývoje listu významně neměnila, k statisticky významnému nárůstu došlo až mezi 17. a 23. dnem stáří listu. Listy LI rostlin vykazovaly trend k nižšímu R_D , než listy MI a HI rostlin.

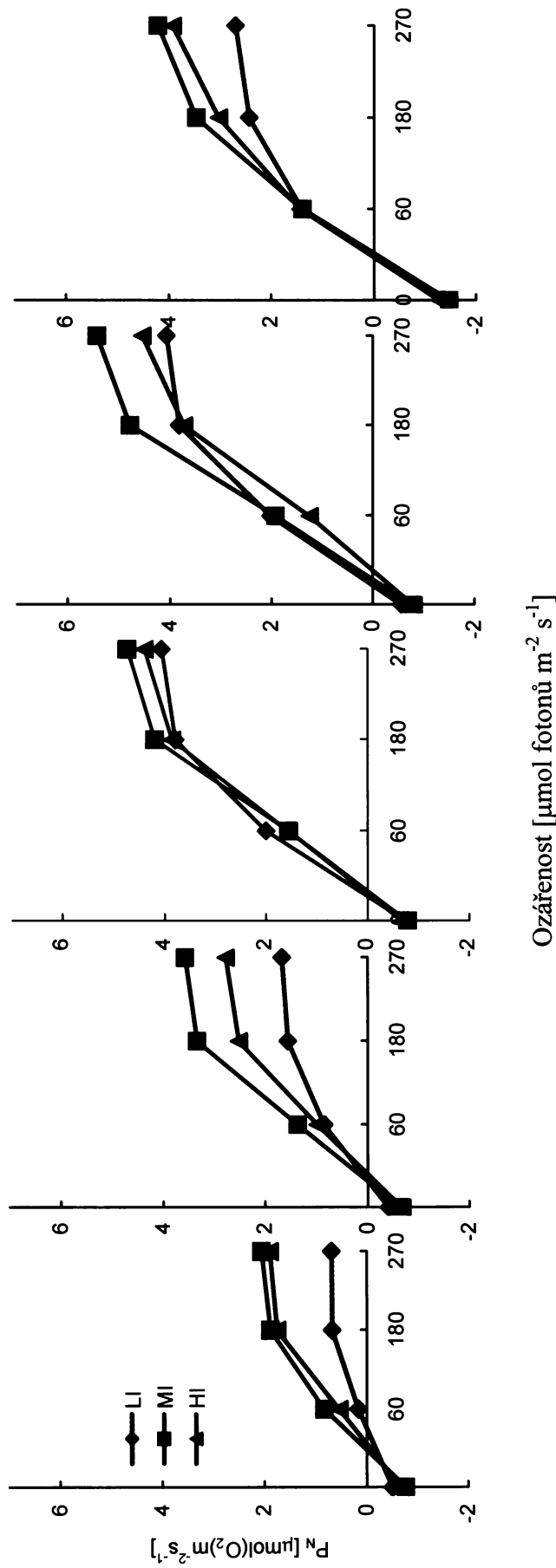
23-denní listy

17-denní listy

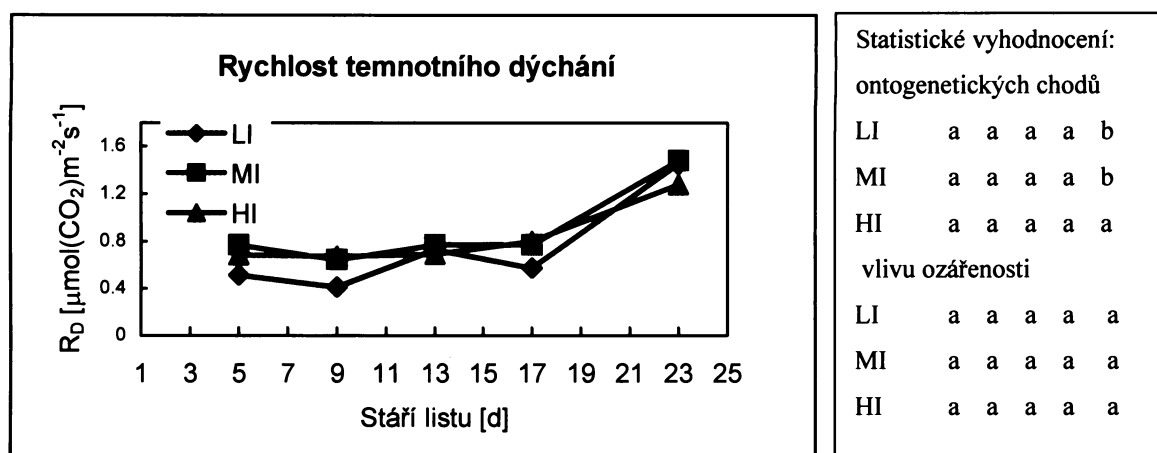
13-denní listy

9-denní listy

5-denní listy

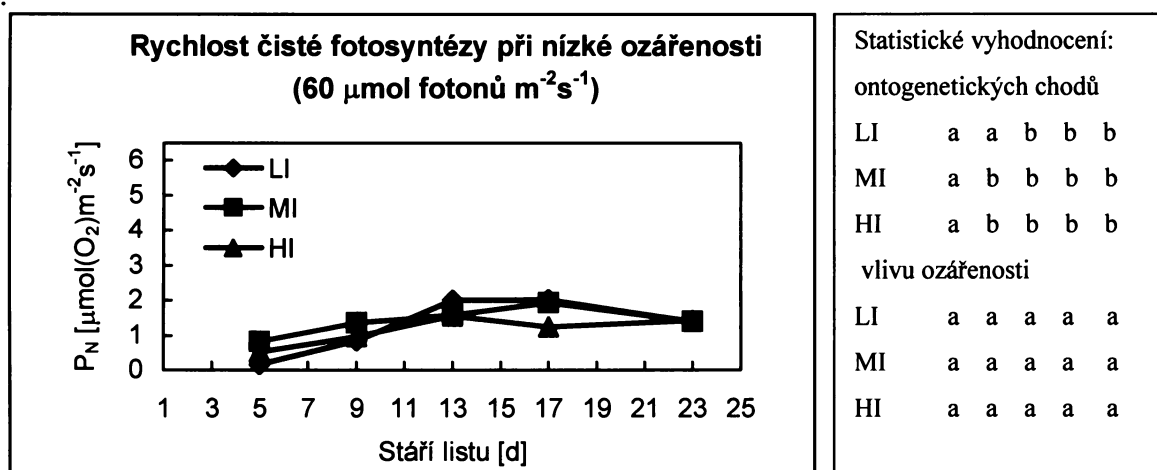


Obr. 4.24. Světelné křivky P_n 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozářenosti.

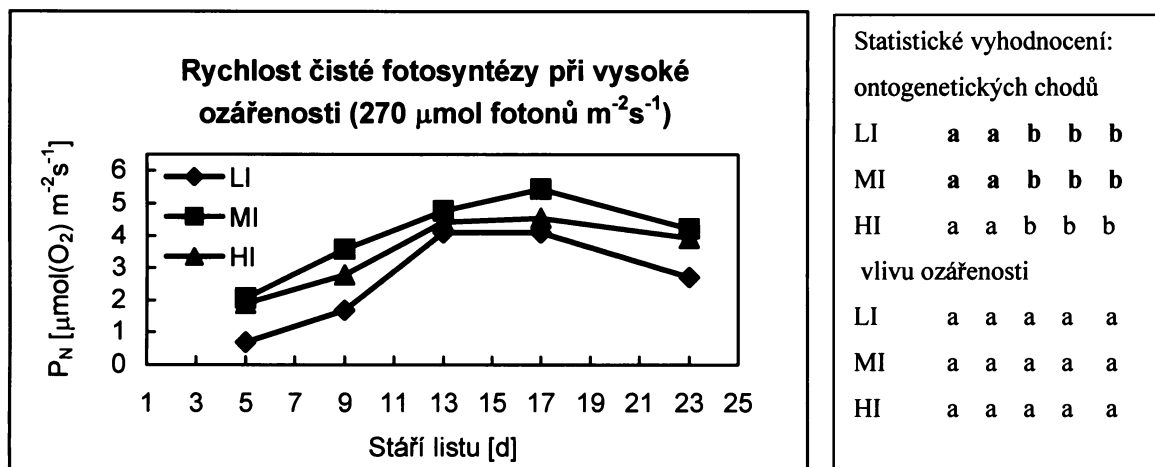


Obr. 4.25. Rychlost temnotního dýchání 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) při nízké ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (**Obr. 4.26.**) i vysoké hladině ozáření ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (**Obr. 4.27.**), vztažená na jednotku listové plochy, v průběhu vývoje 4. listu zpočátku významně narůstala a poté mírně klesla. Rozdíly mezi rostlinkami z různých kultivačních ozáření nebyly, kvůli vysoké variabilitě, statisticky významné.

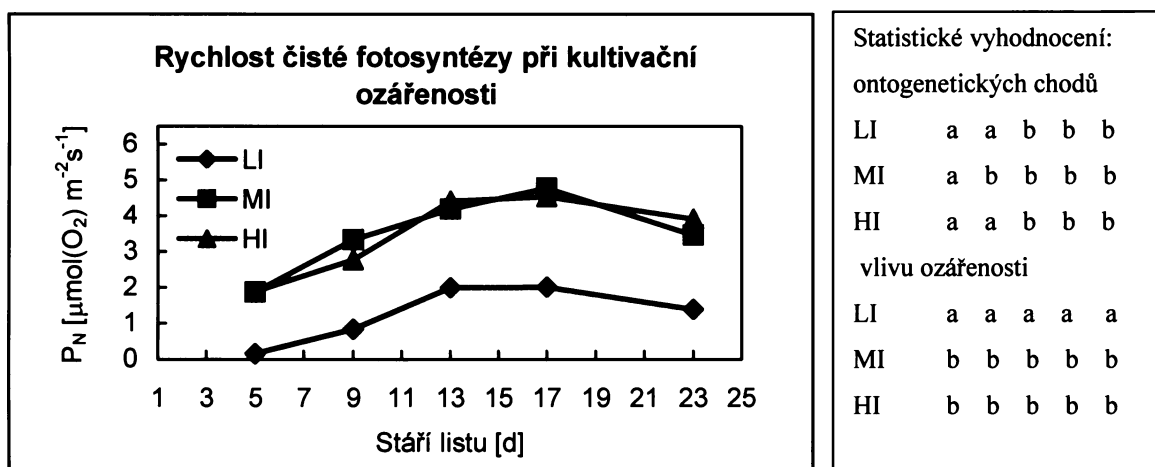


Obr. 4.26. Rychlost čisté fotosyntézy na jednotku listové plochy, měřená při nízké ozáření, u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).



Obr. 4.27. Rychlost čisté fotosyntézy na jednotku listové plochy, měřená při vysoké ozáření, u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

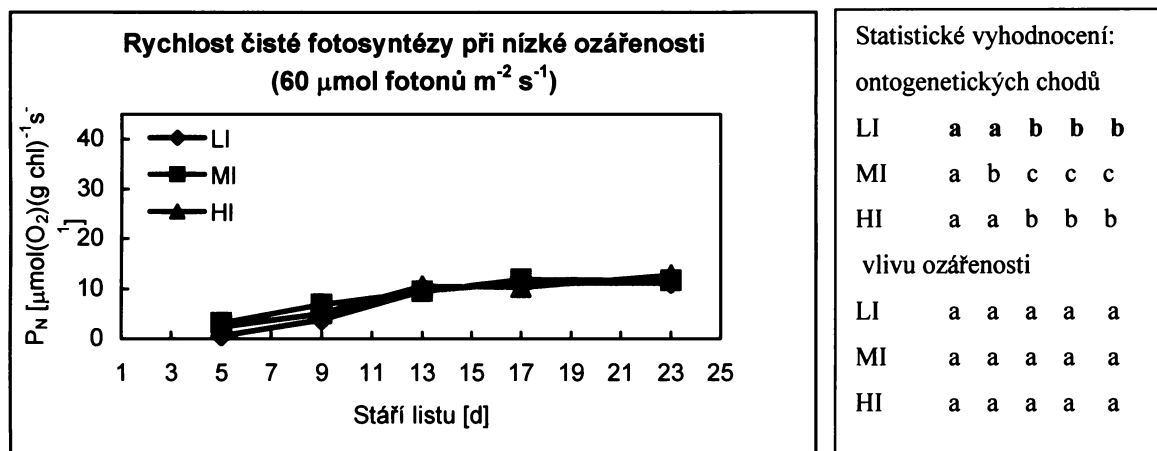
Rychlost čisté fotosyntézy na jednotku listové plochy, měřená při kultivační ozáření, byla v průběhu vývoje listu (**Obr. 4.28.**) významně nižší u LI rostlinek, MI a HI rostlinky se mezi sebou nelišily.



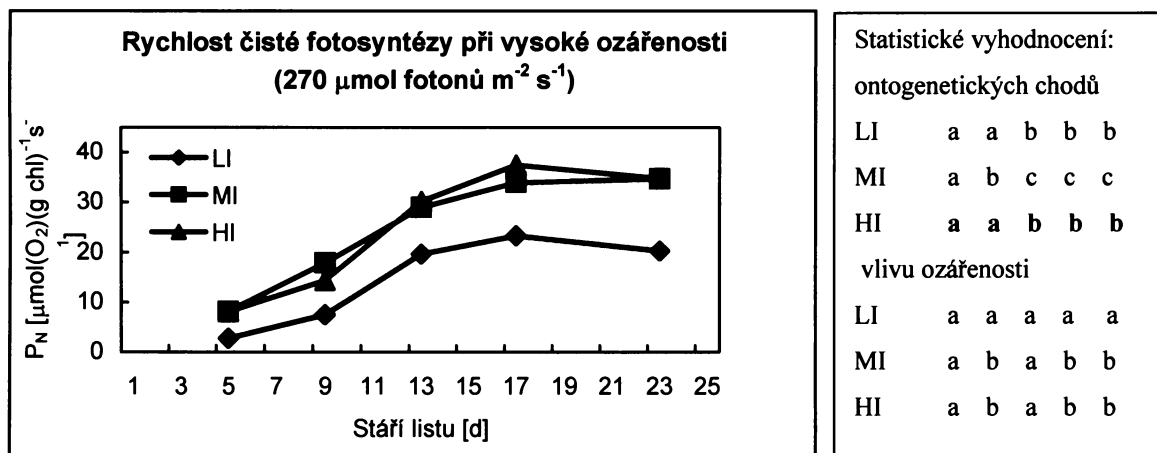
Obr. 4.28. Rychlost čisté fotosyntézy na jednotku listové plochy, měřená při kultivační ozáření, u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Rychlost čisté fotosyntézy, vztážená na jednotku chlorofylu, byla při nízké ozáření ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (**Obr. 4.29.**) podobná u všech rostlinek. Při vysoké ozáření ($270 \mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) byla P_N nižší u LI rostlinek. V průběhu vývoje listu P_N , vztážená na jednotku chlorofylu, narůstala. Trend mírného poklesu u 23-denních listů se projevil pouze u P_N měřené za vysoké ozáření ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Obr. 4.30.).



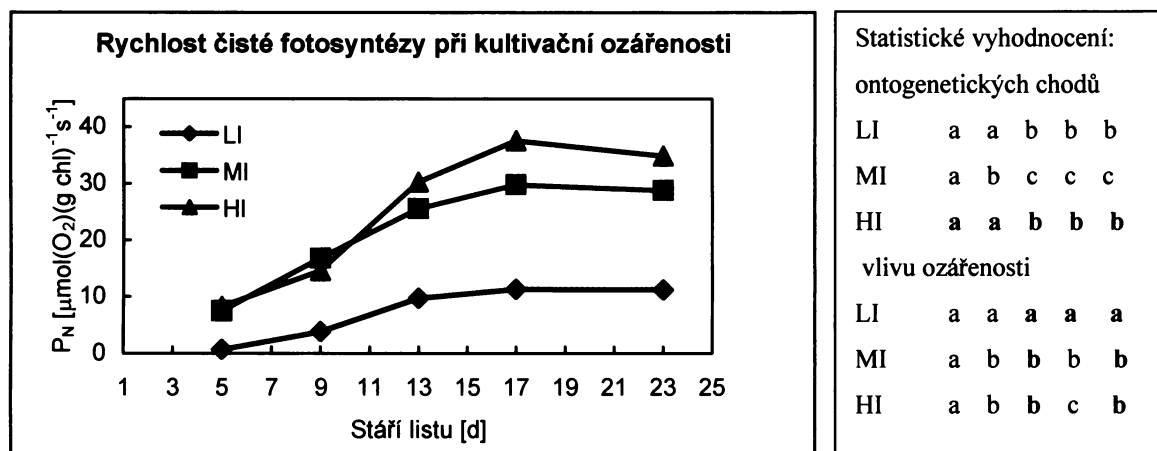
Obr. 4.29. Rychlost čisté fotosyntézy na jednotku chlorofylu, měřená při nízké ozáření, u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).



Obr. 4.30. Rychlost čisté fotosyntézy na jednotku chlorofylu, měřená při vysoké ozáření, u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Rychlost čisté fotosyntézy, měřená při kultivační ozáření a vztážená na jednotku chlorofylu, byla (Obr. 4.31.) během vývoje 4. listu nižší u LI rostlinek. Rychlost čisté fotosyntézy se nelišila mezi MI a HI rostlinkami, s výjimkou 17-denních listů, kdy byla P_N

významně vyšší u HI rostlinek. Trend mírného poklesu P_N se při měření za kultivační ozáření neprojevil pouze u LI rostlinek.

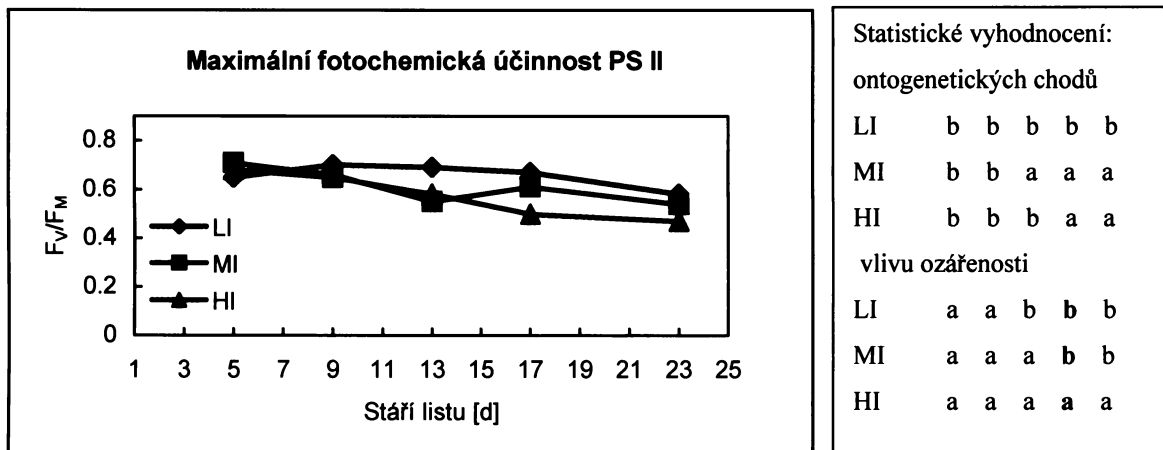


Obr. 4.31. Rychlost čisté fotosyntézy na jednotku chlorofylu, měřená při kultivační ozáření, u 4. listu během jeho vývoje u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

4.4. Fluorescenční charakteristiky 4. listu během jeho vývoje

Fluorescenční charakteristiky jsem měřila současně s charakteristikami fotosyntetickými, tj. i při stejných ozářeních (LI, MI, HI).

Maximální fotochemická účinnost PS II (F_V/F_M) (**Obr. 4.32.**) v průběhu vývoje listu významně klesla. Mírný trend poklesu jsem u rostlinek MI a HI zaznamenala již mezi 5. a 9. dnem stáří listu. U LI rostlinek došlo k mírnému poklesu až mezi 17. a 23. dnem stáří listu. Významně vyšší hodnoty F_V/F_M u LI rostlinek byly tedy způsobeny dřívějším a výraznějším poklesem tohoto parametru u rostlinek MI a HI. Hodnoty F_V/F_M se u 5-denních listů pohybovaly mezi 0.65-0.71, u 23-denních listů pak v rozmezí 0.47-0.58. Z hodnot uvedených v **Tab. 4.3.** lze usoudit, že pokles parametru F_V/F_M byl způsoben spíše nárůstem hodnoty základní fluorescence (F_0), než poklesem hodnoty maximální fluorescence (F_M).

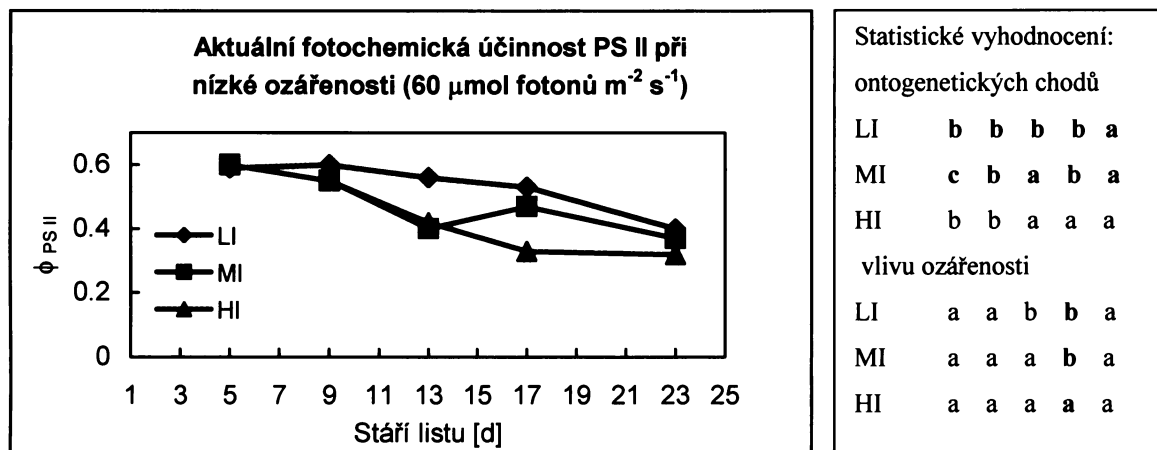


Obr. 4.32. Maximální fotochemická účinnost PS II během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

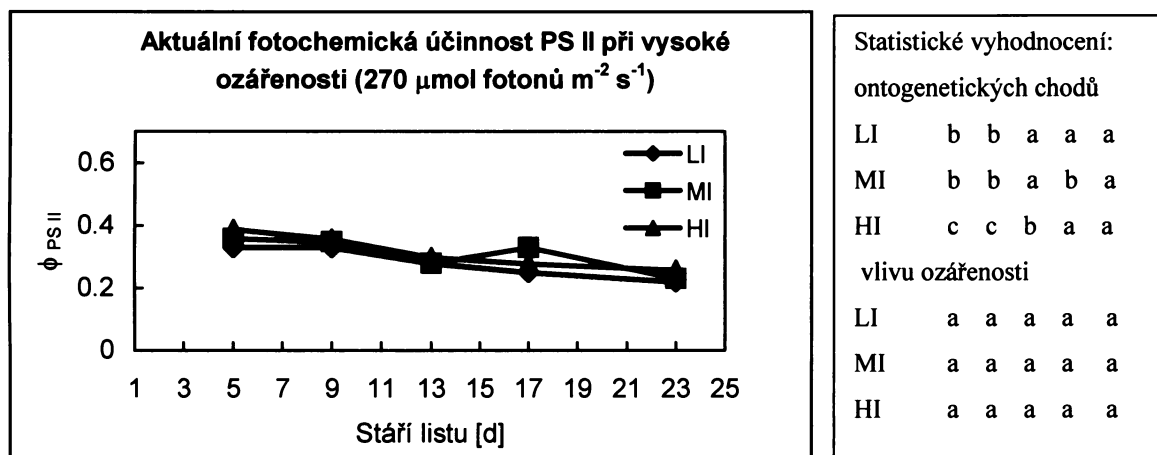
Tab. 4.3.: Maximální a základní fluorescence během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně). První písmenko za hodnotou udává vyhodnocení ontogenetických chodů, druhé písmenko za hodnotou udává vyhodnocení vlivu ozáření.

		Stáří listu [d]				
		5d	9d	13d	17d	23d
F _M	LI	30.5 a,a	36.4 b,a	40.0 b,b	45.9 c,b	53.7 d,c
	MI	42.9 b,a	36.3 b,a	34.7 a,a	40.5 b,b	48.3 b,b
	HI	39.0 a,a	34.5 a,a	34.5 a,a	34.1 a,a	41.8 a,a
F ₀	LI	10.7 a,a	10.9 a,a	12.5 a,a	14.9 b,a	22.6 c,a
	MI	11.8 a,a	12.4 a,a	15.6 a,a	15.5 a,a	22.7 b,a
	HI	12.1 a,a	11.9 a,a	14.4 a,a	17.0 a,a	22.2 b,a

Aktuální fotochemická účinnost PS II ($\phi_{\text{PS II}}$) byla vyšší při nízké ozáření ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Obr. 4.33.) ve srovnání s ozáření vysokou ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Obr. 4.34.), a to po celou dobu sledování. V průběhu vývoje listu $\phi_{\text{PS II}}$ při vysoké i nízké ozáření klesla u všech rostlin. Při vysoké ozáření nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi variantami, při nízké ozáření měly u 13- a 17-denních listů vyšší $\phi_{\text{PS II}}$ rostlinky LI. Aktuální fotochemická účinnost PS II klesala během vývoje listu podobně, jako F_v/F_M .

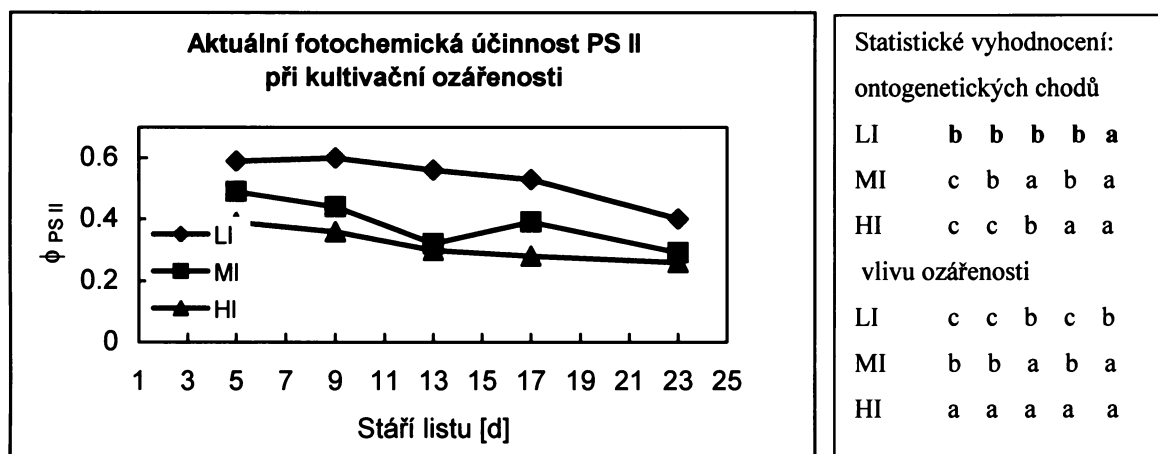


Obr. 4.33. Aktuální fotochemická účinnost PS II, měřená při nízké ozáření, během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).



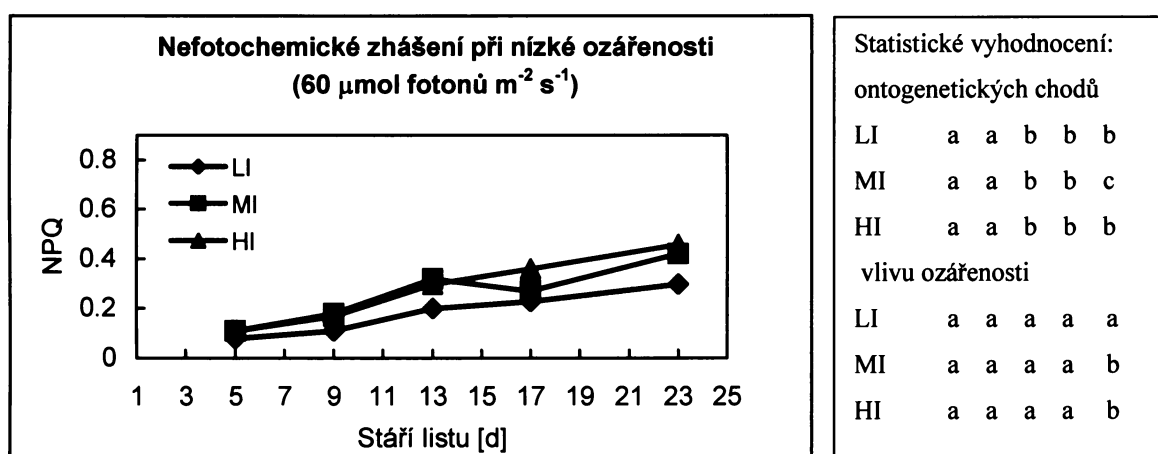
Obr. 4.34. Aktuální fotochemická účinnost PS II, měřená při vysoké ozáření, během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

Při porovnání $\phi_{PS II}$ při kultivační ozáření (**Graf 4.35.**), je zřejmé, že výrazně vyšších hodnot $\phi_{PS II}$ dosahovaly během vývoje 4. listu rostlinky LI. Naopak nejnižších hodnot dosahovaly rostlinky HI.

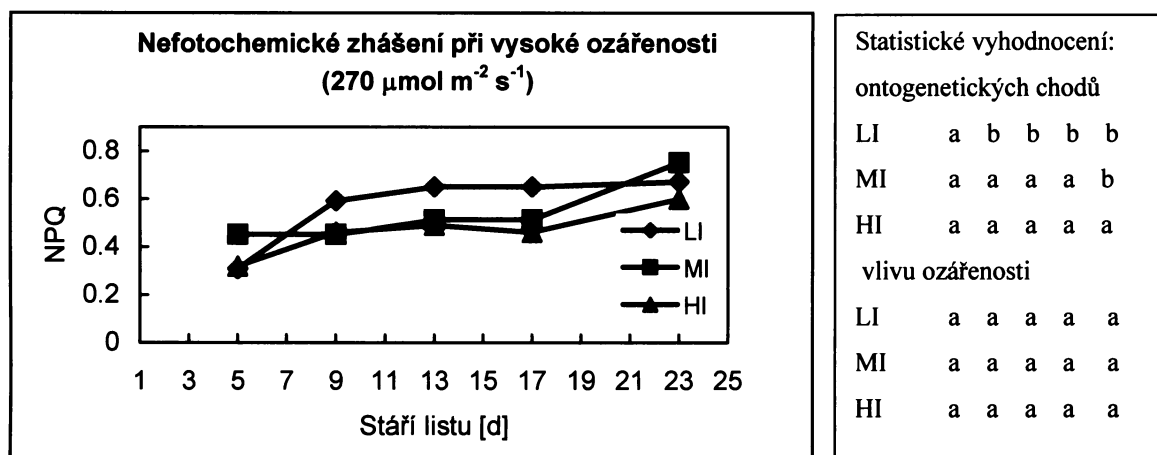


Obr. 4.35. Aktuální fotochemická účinnost PS II, měřená při kultivační ozáření, během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

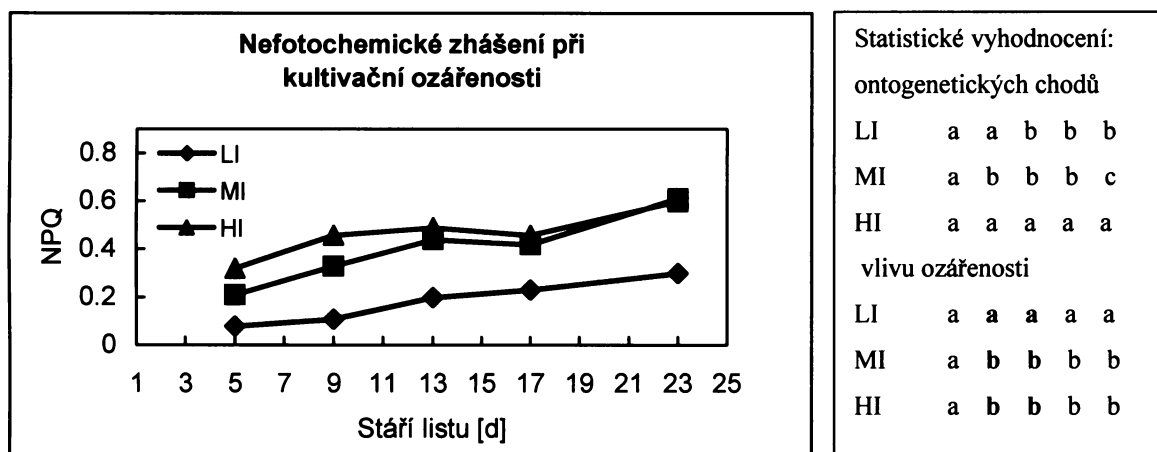
Nefotochemické zhášení (NPQ) v průběhu vývoje 4. listu vzrostlo, a to při nízké ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (**Obr. 4.36.**), vysoké ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (**Obr. 4.37.**) i kultivační ozáření (**Obr. 4.38.**). Při vysoké ozáření dosahovalo NPQ vyšších hodnot. Dynamika nárůstu NPQ byla při nízké ozáření vyšší u MI a HI rostlin. Při vysoké ozáření došlo k nárůstu NPQ u LI rostlin mezi 5. a 9. dnem stáří listu, u MI a HI rostlin pak mezi 17. a 23. dnem stáří listu. Nefotochemické zhášení měřené při kultivační ozáření bylo během vývoje listu významně nižší u LI rostlin.



Obr. 4.36. Nefotochemické zhášení, měřené při nízké ozáření, během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlin *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).



Obr. 4.37. Nefotochemické zhášení, měřené při vysoké ozáření, během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).



Obr. 4.38. Nefotochemické zhášení, měřené při kultivační ozáření, během vývoje 4. listu u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* při nízké (LI, 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), střední (MI, 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI, 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření. Rozdílná písmenka označují statisticky významné rozdíly při $P = 0.05$ a $P = 0.01$ (tučně).

5. Diskuse

Rostlinky *Nicotiana tabacum* jsem pěstovala *in vitro* fotoautotrofně po dobu 35 dnů při třech různých hladinách ozáření: konvenční (LI, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a dvou zvýšených (MI, $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; HI, $270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), s cílem sledovat vliv nadměrné ozáření na vývoj listu. Nadměrná ozáření způsobuje fotoinhibici, tj. poškození fotosyntetického aparátu rostlin projevující se například sníženou fotosyntetickou účinností a/nebo kapacitou, sníženým obsahem chlorofylů $a+b$ a sníženou maximální i aktuální fotochemickou účinností PS II. Chronická fotoinhibice byla u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* popsána již při ozáření $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tichá et al. 1998). Vysoká ozáření také urychluje vývoj listu, a je tedy možné, že změny, připisované fotoinhibičnímu působení nadměrné ozáření, jsou ovlivněny také časovým posunem ve vývoji listu, případně urychlenou senescencí. Dosavadní studie popisující fotoinhibici u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* se však týkaly jen plně rozvinutých listů (Tichá et al. 1998, Kadleček et al. 2003). Proto jsem se ve své práci zaměřila na změny probíhající během vývoje (čtvrtého) listu.

Čtvrtý list se u všech studovaných rostlinek objevil ve stejnou dobu – 11. až 12. den kultivace. Všechny parametry jsem měřila 5., 9., 13., 17. a 23. den stáří čtvrtého listu. Kromě parametrů čtvrtého listu jsem sledovala i některé růstové charakteristiky u celých rostlinek (zejména akumulaci sušiny, výšku stonku a počet listů), a to ve stejných dnech, jako měření charakteristik listových.

Během kultivace se u rostlinek *Nicotiana tabacum* objevily některé typické adaptace na hladinu ozáření (Björkman 1981), známé z *ex vitro* podmínek: HI a MI rostlinky byly menší (Obr. 4.4.), kompaktnější a akumulovaly více sušiny (Obr. 4.3.), počet listů však kultivační ozáření příliš ovlivněn nebyl (Obr. 4.5.). Rozdíly v akumulaci celkové sušiny byly způsobeny zejména rozdíly v sušině prýtu (Tab 4.1.), sušina kořene (Tab 4.1.) se prakticky nelišila. Protože sušina kořene narůstala v průběhu vývoje rostlinek pomaleji než sušina prýtu, zvyšoval se postupně poměr sušiny prýtu ku sušině kořene.

Listová plocha se často používá jako základní parametr vývoje listu (Šesták a Čatský 1985). V průběhu vývoje listu lze rozeznat tři základní fáze: (1) období expanze listové

plochy mladých listů, (2) období dospělosti po dosažení maximální plochy listu a (3) období senescence spojené s poklesem listové plochy. V průběhu 23 dnů od objevení se listu na apexu, měl nejbližší k ukončení své expanze čtvrtý list rostlinek HI (**Obr. 4.1.**), kdy byla ukončena akumulace jeho sušiny (**Obr. 4.2.**). Vysoká ozářenost tedy vývoj listu urychlila, jak bylo popsáno i pro mnoho dalších druhů rostlin v *ex vitro* podmínkách (např. Wild a Wolf 1980, Smith a Longstreth 1994, Behera a Choudhury 2001, Yano a Terashima 2004).

Přestože expanze listové plochy čtvrtého listu nebyla v průběhu 23 dnů zcela ukončena, lze říci, že čtvrtý list HI rostlinek měl menší maximální listovou plochu (**Obr 4.1.**) než MI a LI rostlinky a větší tloušťku (**Obr 4.11.**) než LI rostlinky. Takováto reakce na vysokou hladinu ozářenosti je typická u rostlin tolerujících zastínění (Dale 1988, Chaves 1994).

Urychlení vývoje čtvrtého listu při kultivaci za vysoké hladiny ozářenosti je patrný i na příčných řezech čtvrtého listu (**Obr. 4.6. až 4.10.**), a to zejména u nejmladších (5 denních) listů (**Obr. 4.6.**). Na příčných řezech jsou dobře patrné změny ve stavbě listu, k nimž v průběhu jeho vývoje dochází: tloušťka listu i jednotlivých pletiv narůstá, zpočátku hustě nahloučené buňky se rozestupují a vznikají velké mezibuněčné prostory.

Stavba listu byla u všech rostlinek typická pro *in vitro* rostlinky (viz např. Pospíšilová et al. 1999) a hladina ozářenosti neměla příliš velký vliv: průduchy byly vyvýšené nad úroveň epidermis, mezofyl se skládal jen z jedné vrstvy hruškovitých palisád a 3-4 vrstev houbového parenchymu. Mezofyl byl málo kompaktní, s velkým množstvím mezibuněčných prostor, a to i v palisádovém parenchymu.

Větší tloušťka čtvrtého listu MI a HI rostlinek byla způsobena hlavně rozdílnou tloušťkou mezofylu, protože tloušťka adaxiální i abaxiální epidermis se lišila jen velmi málo (**Tab. 4.2.**) nebo jen u mladších listů. Výraznější tloušťnutí jsem zaznamenala u palisádového než u houbového parenchymu, což naznačuje i zvyšující se poměr PP/HP. Vyšší poměr PP/HP u rostlinek rostoucích při vyšší ozářenosti odpovídá i našim dřívějším pozorováním (Radochová et al. 2000). Větší tloušťka palisádového parenchymu byla způsobena spíše prodloužením palisádových buněk, než vznikem další vrstvy palisád. Prodloužení jedné vrstvy palisád v reakci na zvýšení růstové ozářenosti popisují například Smith a Longstreth (1994) u rodu *Gossypium hirsutum*, vznik další vrstvy palisád udávají např. Yano a Terashima (2004) pro *Chenopodium album*.

Přestože nárůst tloušťky listových pletiv byl v průběhu vývoje listu značný, plošný podíl jednotlivých typů pletiv na řezu listem (**Obr. 4.12. až 4.16.**) byl mnohem stálější a s

s výjimkou houbového parenchymu se v průběhu vývoje listu měnil jen málo. Podíl jednotlivých typů pletiv na řezu listem nebyl příliš ovlivněn ani hladinou ozáření, což znamená, že růst listu je proporcionální a podíl, který v něm zaujímají jednotlivé typy pletiv je relativně stálý.

Podíl plochy houbového parenchymu na řezu listem (**Obr. 4.14.**) klesal v průběhu jeho vývoje úměrně s nárůstem podílu mezibuněčných prostor (**Obr. 4.15.**). Mezibuněčné prostory se u všech variant zvětšovaly do 13 dnů stáří listu, kdy zaujímaly asi 35% z celkové plochy řezu listem, dále se již nezvětšovaly. Ozáření neměla na podíl mezibuněčných prostor v listu žádný vliv a často popisovaný kompaktnější mezofyl při růstu rostlin za vysoké ozáření (např. Tichá 1985, Smith a Longstreth 1994, Serret a Trillas 2000) jsem nezaznamenala. Je tedy zřejmé, že na podíl mezibuněčných prostor v listu má, minimálně u listů rostlin *Nicotiana tabacum* pěstovaných v *in vitro* podmínkách, vliv jiný faktor než ozáření.

Díky stálému podílu palisádového parenchymu na řezu listem spolu s klesajícím podílem houbového parenchymu se zvýšil v průběhu vývoje listu plošný poměr PP/HP (**Obr. 4.17.**). Plošný poměr PP/HP narůstal obdobně jako poměr PP/HP vypočítaný z tloušťek pletiv (**Tab. 4.2.**).

V průběhu vývoje čtvrtého listu se výrazně zvětšovala plocha buněk mezofylu na řezu listem (**Obr. 4.18. a 4.19.**), a to při všech hladinách ozáření. Buňky palisádového i houbového parenchymu měly u nejmladších, 5-denních listů, stejně velkou plochu na řezu listem, v průběhu vývoje listu se více zvětšila plocha buňky palisádového parenchymu. Toto zjištění však nemusí nutně znamenat, že buňky palisádového parenchymu byly větší, protože buňky houbového parenchymu měly výrazně členitější tvar. Plocha mezofylové buňky na řezu listem byla při zvýšené ozáření větší. Větší plochu mezofylové buňky na řezu listem popisují při pěstování rostlin za vyšší hladiny ozáření například Wild a Wolf (1980) u *Sinapis alba*, Kubínová (1991) u *Hordeum vulgare* nebo Dimassi-Theriou a Bosabalidis (1997) u *Actinidia deliciosa*. Zcela opačný vliv vyšší hladiny ozáření na velikost mezofylové buňky pak zjistili Serret a Trillas (2000) u *Gardenia jasminoides* nebo Yano a Terashima (2004) u *Chenopodium album*.

Chloroplasty byly v mezofylových buňkách umístěny podél buněčných stěn (**Obr. 4.6. až 4.10.**). Jejich hustota byla u nejmladších, 5-denních listů, tak velká, že vytvářely souvislou vrstvu na povrchu buňky. Podíl chloroplastů v buňce, měřený jako plocha řezu chloroplastů na plochu řezu buňkou, byl vždy vyšší u palisádových buněk ve srovnání s buňkami

houbovými. U nejmladších, 5-denních listů, se podíl chloroplastů na řezu buňkou pohyboval okolo 20-30%.

S postupujícím vývojem čtvrtého listu byla patrná změna v podílu chloroplastů na řezu buňkou i v jejich umístění. Chloroplasty se více nacházely u buněčných stěn sousedících s mezibuněčnými prostory listu. Takové uspořádání chloroplastů je v buňkách mezofyly typické a patrně usnadňuje difúzi CO₂ z mezibuněčných prostor do chloroplastu (Psaras et al. 1996). U rostlinek rostoucích při HI a MI se chloroplasty prakticky nevyskytovaly u periklinálních buněčných stěn, kde byly naopak viditelné u LI rostlinek. Přesun chloroplastů k antiklinálním buněčným stěnám snižuje jeho absorpci a tedy i případné poškození fotosyntetického aparátu (Kasahara et al. 2002).

Podíl chloroplastů v mezofylové buňce se v průběhu vývoje listu snižoval, a to z počátečních 20 – 30% na konečných 5 – 8% (Obr. 4.20. a 4.21.). Toto zjištění je poněkud překvapivé, uvážíme-li, že v průběhu růstu buněk dochází zpravidla k rychlému dělení chloroplastů (Possingham a Lawrence 1983, Pyke 1997). Pyke (1999) uvádí, že bez ohledu na velikost buňky a velikost a počet plastidů, je celková plocha, kterou v buňce zaujímají chloroplasty, v úzkém vztahu k velikosti buňky. V průběhu růstu mezofylové buňky se vrstva chloroplastů udržuje po většině jejího povrchu a s pokračujícím růstem buňky se jednotlivé chloroplasty dělí a rostou tak, aby toto pokrytí buněčných stěn bylo zajištěno (Pyke 1999). V případě fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* byl tento úzký vztah mezi buňkou a chloroplasty narušen, a to i při kultivaci za nízké ozáření. Narušení tedy nemohlo být způsobeno nadměrnou ozáření.

K narušení vztahu mezi velikostí mezofylové buňky a zastoupením chloroplastů mohlo dojít buď snížením dělivé aktivity a růstu chloroplastů nebo urychlením jejich rozpadu. Úbytek chloroplastů v buňce byl popsán během pozdní senescence například u listů rostlin *Triticum aestivum* (Wardley et al. 1984) a *Glycine max* (Ford a Shibles 1988) poté, co se výrazně snížila jejich biochemická aktivita. Domnívám se však, že pokles podílu chloroplastů v buňce nebyl způsoben předčasnou senescencí listu, protože podíl chloroplastů v buňce klesal již u velmi mladých listů a navíc téměř současně u všech pokusných rostlin. Růst a dělení chloroplastů byly v průběhu vývoje listu spíše limitovány kultivačními podmínkami.

Důvodem snížení dělivé aktivity a růstu chloroplastů v průběhu vývoje listu mohla být nepřítomnost sacharózy v médiu. Serret a Trillas (2000) uvádějí, že zvýšením koncentrace exogenní sacharózy v médiu při kultivaci rostlinek *Gardenia jasminoides* se zvýšila hustota chloroplastů v mezofylových buňkách, i když pouze při nízké ozáření.

V průběhu vývoje listu byl podíl chloroplastů na řezu buňkou palisádového i houbového parenchymu zřetelně vyšší u LI rostlinek, než u MI a HI rostlinek. Podobně reagovaly na zvýšenou kultivační ozáření při fotoautotrofní kultivaci i rostlinky *Actinidia deliciosa* (Dimassi-Theriou a Bosabalidis 1997). V *ex vitro* podmínkách byl nižší podíl chloroplastů v mezofylových buňkách při vysoké růstové ozáření zaznamenán u rostlin *Guzmania monostachia* (Maxwell et al. 1999).

V průběhu vývoje čtvrtého listu jsem u všech rostlinek zjistila pokles obsahu chlorofylů *a+b* (Obr. 4.22.). U LI rostlinek začal obsah chlorofylů klesat později než u MI a HI, kde jsem pokles zaznamenala již mezi 5. a 9. dnem stáří listu. Typickým ontogenetickým chodem obsahu chlorofylů je přitom jejich rychlý nárůst na maximální hodnotu následovaný pozvolným poklesem (Šesták 1985). Rychlost syntézy chlorofylu na jednotku listové plochy je zpravidla vysoká v první polovině vývoje listu a poté se zpomaluje. Akumulace chlorofylu se zastavuje před nebo po dosažení maximální plochy listu. Teprve poté obsah chlorofylů klesá (Šesták 1985). Pokles obsahu chlorofylů je tedy typickým projevem senescence listu a v některých pracích (například Yoo et al. 2003) se používá jako její indikátor. Urychlení degradace chlorofylu v rostoucích listech MI a HI rostlinek bylo pravděpodobně způsobeno jejich fotooxidací (Powles 1984). Listy MI a HI rostlinek byly skutečně téměř chlorotické již 13 dnů poté, co se čtvrtý list objevil na apexu.

Obsah chlorofylů klesl v průběhu vývoje listu i u LI rostlinek, kde tento pokles nelze vysvětlit fotooxidací. Tento pokles je však v souladu se zjištěním Čápa (1996), který udává, že obsah chlorofylů *a+b* v průběhu vývoje fotoautotrofně pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* klesal. Pokles obsahu chlorofylů nebyl zaznamenán u rostlin rostoucích fotomixotrofně, tj. s přidáním exogenní sacharózy do kultivačního média. Sacharóza naopak akumulaci chlorofylů podpořila. Domnívám se tedy, že rozklad chlorofylů, k němuž docházelo před ukončením expanze listu, souvisí u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek, podobně jako v případě dělení a růstu chloroplastů, také s nedostatkem energie na jejich syntézu.

Rostlinky rostoucí při vyšší ozáření měly v průběhu vývoje listu nižší obsah chlorofylů než LI rostlinky. Nižší obsah chlorofylů zaznamenali při *in vitro* kultivaci za vysoké ozáření i Lee et al. (1985) u rostlinek *Liquidambar styraciflua* a Capellades et al. (1991) u *Rosa multiflora*. Capellades et al. (1991) navíc uvádějí, že rostlinky měly při fotoautotrofní kultivaci za vyšší ozáření chlorotické listy, což plně souhlasí i s mým pozorováním.

Obsah chlorofylů $a+b$ jsem vztahovala na jednotku listové plochy a zjistila během vývoje listu pouze jeho pokles. Avšak vzhledem k tomu, že podíl chloroplastů v mezofylové buňce klesal minimálně u LI rostlinek dříve než obsah chlorofylů $a+b$, soudím, že obsah chlorofylů v jenom chloroplastu během vývoje listu narůstal. Obsah chlorofylů $a+b$ v jednom chloroplastu se však nezvyšoval natolik, aby kompenzoval snižující se podíl chloroplastů v mezofylové buňce.

Poměr chlorofylů a/b během vývoje čtvrtého listu u všech rostlin mírně klesal (**Obr. 4.23.**). Šesták (1985) uvádí, že vyšší obsah chlorofylu a u mladších listů souvisí s upřednostněním jeho syntézy před syntézou chlorofylu b , a následný pokles tohoto poměru v průběhu ontogeneze listu je běžný. Pokles poměru chlorofylů a/b v průběhu vývoje listu uvádí například Behera a Choudhury (2001) u *Triticum aestivum*, u některých rostlinných druhů však zaznamenán nebyl (např. Adams et al. 1990, Lu and Zhang 1998).

Poměr chlorofylů a/b byl u 5-denních listů 2.9 u všech rostlin, v průběhu vývoje listu však začal klesat mnohem dříve u HI a MI rostlinek. Následkem toho byl poměr chlorofylů a/b u těchto rostlin významně nižší.

Poměr chlorofylů a/b je dán množstvím fotosystémů I (PS I) a II (PS II) ve vztahu k světlosběrným komplexům PS II (LHC II), protože veškerý chlorofyl b je obsažen právě v LHC II. Nízký poměr chlorofylů a/b je tedy typickou adaptací stinných rostlin, protože odráží vyšší množství LHC II důležitých pro účinné zachycování světelné energie (Schieffhale et al. 1999).

Fotoautotrofně *in vitro* pěstované rostlinky *Nicotiana tabacum* měly však při zvýšené ozáření obsah LHC II vyšší, což pravděpodobně zvýšilo absorpci světelné energie a prohloubilo tak fotoinhibici těchto rostlinek. Pokles poměru chlorofylů a/b popsali u fotoinhibovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* i Tichá et al. (1998) a Kadleček et al. (2003).

Domnívám se, že vyšší obsah LHC II u MI a HI rostlinek mohl být způsoben vyšší stabilitou LHC II ve srovnání s jádrem PS II, jak to při fotoinhibici u fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* a *Solanum tuberosum* popsali Šantrůček et al. (1991).

V souladu s klesajícím obsahem chlorofylů v průběhu vývoje čtvrtého listu klesala maximální i aktuální ($\phi_{PS II}$) fotochemická účinnost PS II.

Maximální fotochemická účinnost PS II (F_v/F_M) (**Obr. 4.32.**) se obvykle používá jako indikátor fotoinhibice (Krause a Weis 1991). Pro rostliny v *ex vitro* podmínkách beze stresu se hodnota tohoto parametru pohybuje v rozmezí 0.75 – 0.85 (Björkman a Demmig 1987). V případě fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* byly hodnoty

F_V/F_M obecně nižší, a to i u LI rostlinek (nejvyšší zjištěná hodnota byla 0.7). Nízké hodnoty F_V/F_M při *in vitro* kultivaci popsali i Serret et al. (2001) pro rostlinky *Gardenia jasminoides*. Nižší hodnoty F_V/F_M mohou být podle nich způsobeny nekompletním vývojem fotosyntetického aparátu v *in vitro* podmínkách.

Významný pokles F_V/F_M jsem v průběhu vývoje listu zjistila u MI a HI rostlinek, u LI rostlinek byl pokles statisticky nevýznamný a oproti MI a HI rostlinkám zpožděný. Pokles F_V/F_M v průběhu vývoje listu byl způsoben spíše fotoinhibicí než předčasnou senescencí, i když pokles F_V/F_M v průběhu vývoje listu byl u některých rostlinných druhů zaznamenán (Šesták a Šiffel 1997).

Pokles fluorescenčního parametru F_V/F_M může být způsoben vzestupem hodnoty základní fluorescence F_0 a/nebo poklesem hodnoty maximální fluorescence F_M . Vzestup F_0 bývá spojován s fotopoškozením, zatímco pokles F_M s fotoprotekcí (Araus a Hogan 1994). Vzestup F_0 je charakteristický při postupné destrukci reakčních center PS II, zatímco pokles F_M může naznačovat nárůst nefotochemického zhášení.

Během vývoje listu se F_0 postupně zvyšovalo u všech variant, takže u 23-denních listů bylo dvakrát vyšší než u 5-denních listů (Tab. 4.3). Mírný pokles F_M jsem během vývoje listu zjistila pouze u mladších listů (mezi 5. - 13. dnem stáří listu) MI a HI rostlinek. Pokles F_V/F_M u MI a HI rostlinek byl tedy způsoben výrazným nárůstem F_0 , což naznačuje, že v průběhu vývoje listu byla reakční centra PS II postupně inaktivována.

Vyšší hodnoty F_0 jsou typické u listů stinného typu a odrážejí tak větší velikost jejich antenálních systémů (Schiefthaler et al. 1999). U fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* byly hodnoty F_0 mírně vyšší u rostlinek MI a HI, což je v souladu s nižším poměrem chlorofylů *a/b* u těchto rostlinek (viz výše). Vyšší hodnoty F_M mohou být spojeny s nízkým nefotochemickým zhášením fluorescence chlorofylu *a*. V průběhu vývoje listu F_M narůstala nejvýrazněji u LI rostlinek, které také měly nejnižší hodnoty nefotochemického zhášení.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že během vývoje listu byly fotoinhibovány pouze rostlinky MI a HI, přestože vývoj fotosyntetického aparátu byl omezený i u LI rostlinek. Serret et al. (2001) přitom uvádějí, že nepřítomnost sacharózy v médiu, spíše než vysoká hladina ozáření, způsobila u rostlinek *Gardenia jasminoides* fotopoškození během kultivace v *in vitro* podmínkách.

Aktuální fotochemická účinnost PS II ($\phi_{PS II}$) vypovídá o množství zredukovaných neboli „uzavřených“ reakčních center PS II a bývá tedy vyšší při nízké ozáření. U fotoautotrofně *in vitro* pěstovaných rostlinek *Nicotiana tabacum* dosahovala $\phi_{PS II}$ při měření

za nízké ozáření u 5-denních listů hodnot okolo 0.6 a v průběhu vývoje listu klesla na hodnoty kolem 0.3 – 0.4 (**Obr. 4.33.**). Při měření za vysoké hladiny ozáření (**Obr. 4.34.**) byla $\phi_{PS II}$ u 5-denních listů okolo 0.3 a klesla v průběhu vývoje na hodnoty kolem 0.2. Významně vyšší hodnoty $\phi_{PS II}$ měly v průběhu vývoje listu rostlinky LI při nízké ozáření a také při porovnání $\phi_{PS II}$ při jejich kultivačních ozářeních (**Obr. 4.35.**).

Aktuální fotochemická účinnost PS II klesala během vývoje listu u všech rostlin. Klesající $\phi_{PS II}$ je také často pozorovaným indikátorem senescence listu a *in vitro* podmínkách ji popsali například Jiang et al. (1993) u *Glycine max*, Lu a Zhang (1998) u *Zea mays* a Lu et al. (2003) u *Triticum aestivum*. Pokles $\phi_{PS II}$ byl výraznější a začal dříve u MI a HI rostlinek, což vedlo v průběhu vývoje listu k nižším hodnotám $\phi_{PS II}$ u těchto variant. Nižší hodnoty při fotoautotrofní kultivaci za vysoké ozáření udávají u *Nicotiana tabacum* i Tichá et al. (1998) a Kadleček et al. (2003).

Spolu s klesající $\phi_{PS II}$ se v průběhu vývoje listu zvyšovalo netochemického zhášení fluorescence chlorofylu *a* (NPQ) (**Obr. 4.36. až 4.38.**). Změny v NPQ byly analogické ke změnám v $\phi_{PS II}$, tzn. při měření za nízké ozáření (**Obr. 4.36.**) bylo NPQ nižší než při měření za vysoké ozáření (**Obr. 4.37.**). Při kultivační ozáření (**Obr. 4.38.**) bylo NPQ výrazně vyšší pro MI a HI rostlinky, které měly nižší $\phi_{PS II}$.

Zvyšující se NPQ spolu s klesající $\phi_{PS II}$ bývá spojováno s xanthofylovým cyklem, který chrání PS II disipací nadbytku absorbované energie na teplo, a to přeměnou xantofylu violaxantinu na zeaxantin (Demmig-Adams 1990, Demmig-Adams a Adams 1992). Tichá et al. (1998) i Kadleček et al. (2003) při fotoautotrofní *in vitro* kultivaci rostlinek *Nicotiana tabacum* při vysoké ozáření (200, respektive 380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zjistili vyšší obsah pigmentů xantofylového cyklu i jejich vyšší deepoxidovaný stav, což naznačuje, že ochranné mechanismy proti nadměrné ozáření byly aktivovány. V průběhu senescence byly nárůst NPQ a aktivace xantofylového cyklu popsány například u listů *Triticum aestivum* (Lu et al. 2003) a *Trifolium repens* (Yoo et al. 2003).

Změny v rychlosti čisté fotosyntézy (P_N) v průběhu vývoje listu (**Obr. 4.26. až 4.31.**) poněkud překvapivě neodpovídaly změnám v obsahu chlorofylů ani změnám v aktuální a maximální fotochemické účinnosti PS II, jak bylo často pozorováno u *in vitro* rostlin (Šesták et al. 1985, Gratani a Ghia 2002, Lu et al. 2003, Yoo et al. 2003). V kontrastu s klesajícím obsahem chlorofylů a klesající fotochemickou účinností vykazala P_N svůj typický ontogenetický chod (např. Rawson a Craven 1975, Tichá et al. 1985): P_N narůstala u mladých listů a svého maxima dosáhla před plným rozvinutím listu. Tento ontogenetický chod P_N byl

stejný při vztažení P_N na jednotku listové plochy i na jednotku chlorofylu. Trend mírného poklesu P_N u 23-denních listů může souviset s již velmi nízkým obsahem chlorofylů, který se pohyboval mezi 110 mg m^{-2} u HI a 140 mg m^{-2} u LI rostlinek. Adams et al. (1990) uvádějí, že v průběhu senescence listů *Platanus occidentalis* P_N na jednotku chlorofylu klesla, když se obsah chlorofylů snížil na hodnoty okolo 100 mg m^{-2} .

Klesající P_N je jednou z dobře viditelných změn, ke kterým dochází v průběhu senescence listu a pokles P_N pod určitou prahovou hodnotu může fungovat jako její indukční signál (Bleecker a Patterson 1997). Z toho lze soudit, že změny, k nimž během vývoje listu docházelo, nebyly způsobeny předčasnou senescencí. Z výsledků také vyplývá, že P_N je do jisté míry nezávislá na obsahu chlorofylů v listech.

Spolu s mírným poklesem P_N u 23-denních listů došlo k nárůstu rychlosti temnotního dýchání (R_D) (Obr. 4.25.), které se jinak v průběhu vývoje listu neměnilo. Také zvýšení R_D je považováno za příznak senescence (Tichá et al 1985).

Z výsledků práce vyplývá, že změny fotosyntetických struktur a fotosyntetické aktivity, ke kterým v průběhu vývoje čtvrtého listu za zvýšené hladiny ozáření docházelo, byly způsobeny spíše fotoinhibicí, než předčasnou senescencí listu, ačkoliv změny mnoha měřených parametrů byly srovnatelné se změnami, ke kterým dochází v průběhu senescence. Z výsledků také usuzují, že nejen zvýšená ozáření, ale i samotná fotoautotrofní kultivace rostlinek je pro vývoj fotosyntetických struktur a fotosyntetické aktivity nepříznivá, neboť rostlinky, množené nodálními segmenty, patrně postrádají zdroj energie, který by, aspoň na začátku vývoje rostlinek, podpořil jejich růst a vývoj.

6. Závěr

- 1) Zvýšená ozáření (180 a 270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) v průběhu fotoautotrofní *in vitro* kultivace rostlin *Nicotiana tabacum* urychlila vývoj listu. Příznaky, které obvykle doprovázejí senescenci, se u těchto rostlin objevily dříve: klesal obsah chlorofylů *a+b* a poměr chlorofylů *a/b*, klesala maximální i aktuální fotochemická účinnost PS II, narůstalo nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu *a*. Klesal také podíl chloroplastů v buňkách palisádového i houbového parenchymu. Nelze však říci, že vyšší ozáření způsobila časný nástup senescence, protože typický ontogenetický chod P_N zůstal nezměněn. Narušení fotosyntetických struktur a snížení jejich funkce byly tedy urychleny fotoinhibicí, tj. poškozením fotosyntetického aparátu vysokou ozáření.
- 2) Příznaky, které jsou obvykle typické pro senescenci, se před dosažením maximální listové plochy a tedy předčasně, objevily i u rostlin rostoucích při nízké ozáření. To znamená, že vývoj fotosyntetického aparátu byl do jisté míry limitovaný kultivačními podmínkami, pravděpodobně nepřítomností sacharózy v médiu.
- 3) Příznaky fotoinhibice se u rostlin rostoucích při zvýšené ozáření projeví již u velmi mladých listů, na počátku jejich vývoje.
- 4) U rostlin pěstovaných při zvýšené ozáření jsem pozorovala některé typické adaptace rostlin tolerujících stín: rostlinky byly menší a kompaktnější a listová plocha čtvrtého listu byla menší než u rostlin pěstovaných při nízké ozáření. Rostlinky pěstované při zvýšené ozáření měly také vyšší P_N , jejich listy byly tlustší a chloroplasty se nacházely u antiklinálních buněčných stěn.
- 5) Z výsledků vyplývá, že hladinou ozáření ani kultivačními podmínkami nebyl změněn podíl jednotlivých pletiv v listu ani ontogenetický chod P_N . Tyto vlastnosti jsou, zřejmě pro svou významnost, patrně pevně geneticky fixovány.

7. Seznam citované literatury

- ADAMS III, W.W., WINTER, K., SCHREIBER, U., SCHRAMMEL, P.: Photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in relationship to changes in pigment and element composition of leaves of *Platanus occidentalis* L. during autumnal leaf senescence. - *Plant Physiol.* **93**: 1184- 1190, 1990.
- ADAMSON, H.Y., CHOW, W.S., ANDERSON, J.M., VESK, M., SUTHERLAND, M.W.: Photosynthetic acclimation of *Tradescantia albiflora* to growth irradiance: Morphological, ultrastructural and growth responses. - *Physiol. Plant* **82**: 353-359, 1991.
- ALI, K., KOEDA, K., NII, N.: Changes in anatomical features, pigment content and photosynthetic activity related to age of 'Irwin' mango leaves. - *J. Japan. Soc.Hort. Sci.* **68(6)**: 1090-1098, 1999.
- AMÂNCIO, S., REBORDÃO, J.P., CHAVES, M.M.: Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: photosynthetic competence and carbon allocation. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **58**: 31-37, 1999.
- APÓSTOLO, N.M., BRUTTI, C.B., LLORENTE, B.E.: Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. - *In Vitro Cell. Dev. Biol.* - *Plant* **41**: 307-313, 2005.
- ARAUS, J.L., HOGAN, K.P.: Leaf structure and patterns of photoinhibition in two neotropical palms in clearings and forest understory during the dry season. - *Amer. J. Bot.* **81**: 726-738, 1994.
- ARO, E.-M., VIRGIN, I., ANDERSSON, B.: Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. - *Biochim. Biophys. Acta* **1143**: 113-134, 1993.
- ASADA, K.: The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601-639, 1999.
- BARBER, J., ANDERSSON, B.: Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. - *Trends Biochem. Sci.* **17**: 61-66, 1992.
- BARBER, J., KÜHLBRANDT, W.: Photosystem II. - *Curr. Opinion Struct. Biol.* **9**: 469-475, 1999.
- BEHERA, R.K., CHOUDHURY, N.K.: Photosynthetic characteristics of chloroplasts of primary wheat leaves grown under different irradiance. - *Photosynthetica* **39(1)**: 11-15, 2001.
- BJÖRKMAN, O.: Responses to Different Quantum Flux Densities. In: LANGE, O.L., NOBEL, P.S., OSMOND, C.B., ZIEGLER, H. (eds.): Encyclopedia of Plant

Physiology (New Series), Vol. 12A: Physiological Plant Ecology I. Pp. 57-107. Springer-Verlag, Berlin 1981.

- BJÖRKMAN, O., DEMMIG, B.:** Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origin. – *Planta* **170**: 489-504, 1987.
- BJÖRKMAN, O., DEMMIG-ADAMS, B.:** Regulation of Photosynthetic Light Energy Capture, Conversion and Dissipation in Leaves of Higher Plants. – In: **SCHULZE, E.-D., CALDWELL, M.M.** (eds.): *Ecophysiology of Photosynthesis*. Pp. 17-47. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1995.
- BLANKE, M.M., BELCHER, A.R.:** Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. – *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **19**: 85-89, 1989.
- BLANKENSHIP, R.E.:** Photosynthesis: The Light Reactions. In: **TAIZ, L., ZEIGER, E.** (eds.): *Plant Physiology*. Third Edition. Pp. 111-143. Sinauer Associates Publishers, Sunderland 2002.
- BLEECKER, A.B., PATTERSON, S.E.:** Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. – *Plant Cell* **9**: 1169-1179, 1997.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.:** Shoot Morphology and Leaf Anatomy in Relation to Photosynthesis. In: **COOMBS, J., HALL, D.O., LONG, S.P., SCURLOCK, J.M.O.** (eds.): *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*, 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Frankfurt 1985.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., DRAXLER, G.:** Functional Leaf Anatomy. – In: **HALL, D.O., SCURLOCK, J.M.O., BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., LEEGOOD, R.C., LONG, S.P.:** *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Pp. 91-112. Chapman & Hall, London 1993.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., LONG, S.P., LECHNER, E.G.:** Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. – *Funct. Ecol.* **3**: 497-514, 1989.
- BUCHANAN, B.B.:** Photosynthesis: Carbon Reaction. – In: **TAIZ, L., ZEIGER, E.** (eds.): *Plant Physiology*. Third Edition. Pp. 171-192. Sinauer Associates Publishers, Sunderland 2002.
- CAPELLADES, M., FONTARNAU, R., CARULLA, C., DEBERGH, P.:** Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. – *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **115(1)**: 141-145, 1990.
- CAPELLADES, M., LEMEURE, R., DEBERGH, P.:** Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. – *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **25**: 21-26, 1991.

- ČÁP, F.: Optimalizace růstu rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) během jejich vývoje v podmínkách *in vitro*: vliv ozáření a exogenního zdroje uhlíku. Diplomová práce. Katedra fyziologie rostlin PšF UK, Praha 1996.
- DALE, J.E.: The control of leaf expansion. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 267-295, 1988.
- DELIEU, T.J., WALKER, D.A.: Polarographic measurement of photosynthetic oxygen evolution by leaf discs. - *New Phytol.* **89**: 165-178, 1981.
- DEMMIG-ADAMS, B.: Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophylls zeaxanthin. - *Biochim. Biophys. Acta* **1020**: 1-24, 1990.
- DEMMIG-ADAMS, B., ADAMS III, W.W.: Photoprotection and other responses of plants to high light stress. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 599-626, 1992.
- DEMMIG, B., BJÖRKMAN, O.: Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. - *Planta* **171**: 171-184, 1987.
- DIMASSI-THERIOU, K., BOSABALIDIS, A.M.: Effect of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **47**: 127-134, 1997.
- DONNELLY, P.M., BONETTA, D., TSUKAYA, H., DENGLER, R.E., DENGLER, N.G.: Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. - *Dev. Biol.* **215**: 407-419, 1999.
- DÜRING, H., HARST, M.: Stomatal behaviour, photosynthesis and photorespiration of *in vitro*-grown grapevines: Effects of light and CO₂. - *Vitis* **35**(4): 163-167, 1996.
- EICHELMANN, H., OJA, V., RASULOV, B., PADU, E., BICHELE, I., PETTAI, H., NIINEMETS, Ü., LAISK, A.: Development of leaf photosynthetic parameters in *Betula pendula* Roth leaves: correlations with photosystem I density. - *Plant Biol.* **6**: 307-318, 2004.
- EVANS, J.R.: Acclimation by thylakoid membranes to growth irradiance and the partitioning of nitrogen between soluble and thylakoid proteins. - *Aust. J. Plant Physiol.* **15**: 93-106, 1988.
- EVANS, L.S., TING, I.P.: Ozone sensitivity of leaves: Relationship to leaf water content, gas transfer resistance, and anatomical characteristics. - *Amer. J. Bot.* **61**: 592-597, 1974.
- EVANS, J.R., VON CAEMMERER, S., SETCHELL, B.A., HUDSON, G.S.: The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. - *Aust. J. Plant Physiol.* **21**(4): 475-495, 1994.

- FABBRI, A., SUTTER, E., DUNSTON, S.K.:** Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. – *Sci. Hort.* **28:** 331-337, 1986.
- FORD, D.M., SHIBLES, R.:** Photosynthesis and other traits in relation to chloroplast number during soybean leaf senescence. - *Plant Physiol.* **86:** 108-111, 1988.
- FUENTES, G., TALAVERA, C., OROPEZA, C., DESJARDINS, Y., SANTAMARIA, J.M.:** Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. – *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – *Plant* **41:** 69-76, 2005a.
- FUENTES, G., TALAVERA, C., DESJARDINS, Y., SANTAMARIA, J.M.:** High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. – *Biol. Plant.* **49(1):** 1-15, 2005b.
- FURBANK, R.T., PRITCHARD, J., JENKINS, C.L.D.:** Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C₃ plant tobacco and the C₄ plant *Flaveria bidentis*. - *Aust. J. Plant Physiol.* **24:** 291-299, 1997.
- GORTON, H.L., WILLIAMS, W.E., VOGELMANN, T.C.:** Chloroplast movement in *Alocasia macrorrhiza*. – *Physiol. Plant.* **106:** 421-428, 1999.
- GORTON, H.L., HERBERT, S.K., VOGELMANN, T.C.:** Photoacoustic analysis indicates that chloroplast movement does not alter liquid-phase CO₂ diffusion in leaves of *Alocasia brisbanensis*. - *Plant Physiol.* **132(3):** 1529- 1539, 2003.
- GRATANI, L., GHIA, E.:** Changes in morphological and physiological traits during leaf expansion of *Arbutus unedo*. – *Environ. Exp. Bot.* **48:** 51-60, 2002.
- GROUT, B.W.W., MILLAM, S.:** Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. – *Annals Bot.* **55:** 129-131, 1985.
- HDIDER, CH., DESJARDINS, Y.:** Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **36:** 27-33, 1994.
- CHAVES, M.M.:** Environmental constraints to photosynthesis in *ex vitro* plants. – In: LUMSDEN, P.J., NICHOLAS, J.R., DAVIES, W.J. (eds.): *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Pp. 1-18. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London 1994.
- JIANG, C.-Z., RODERMEL, S.R., SHIBLES, R.M.:** Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. - *Plant Physiol.* **101:** 105-112, 1993.
- JIANG, C.-D., GAO, H.-Y., ZOU, Q., JIANG, G.-M., LI, L.-H.:** Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. – *Environ. Exp. Bot.* **55:** 87-96, 2006.

- JOHANSSON, M., KRONESTEDT-ROBARDS, E.C., ROBARDS, A.W.: Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. - *Protoplasma* **166**: 165-176, 1992.
- KADLEČEK, P., RANK, B., TICHÁ, I.: Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*-grown plantlets. - *J. Plant Physiol.* **160**: 1017-1024, 2003.
- KASAHARA, M., KAGAWA, T., OIKAWA, K., SUETSUGU, N., MIYAO, M., WADA, M.: Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. - *Nature* **420(19/26)**: 829-832, 2002.
- KITAYA, Y., FUKUDA, O., KOZAI, T., KIRDMANEE, C.: Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. - *Sci. Hort.* **62**: 15-24, 1995.
- KODYM, A., ZAPTA-ARIAS, F.J.: Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **55**: 141-145, 1999.
- KOZAI, T., OKI, H., FUJIWARA, K.: Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **22**: 205-211, 1990.
- KOZAI, T., IWABUCHI, K., WATANABE, K., WATANABE, I.: Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **25**: 107-115, 1991.
- KRAUSE, G.H., WEIS, E.: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 313-349, 1991.
- KUBÍNOVÁ, L.: Stomata and mesophyll characteristics of barley leaf as affected by light: stereological analysis. - *J. Exp. Bot.* **42(241)**: 995-1001, 1991.
- KUBOTA, C., KAKIZAKI, N., KOZAI, T., KASAHARA, K., NEMOTO, J.: Growth and net photosynthetic rate of tomato plantlets during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. - *HortScience* **36(1)**: 49-52, 2001.
- KUTÍK, J.: Chloroplast Development. - In: ŠESTÁK, Z. (ed): Photosynthesis during Leaf Development. Pp. 51-75. Academia, Praha 1985.
- KUTÍK, J.: The development of chloroplast structure during leaf ontogeny. - *Photosynthetica* **35(4)**: 481-505, 1998.
- LE, V.Q., SAMSON, G., DESJARDINS, Y.: Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration. - *J. Plant Physiol.* **158**: 599-605, 2001.
- LEE, N., WETZSTEIN, H.Y., SOMMER, H.E.: Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings

- of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. - *Plant Physiol.* **78**: 637-641, 1985.
- LEE, N., WETZSTEIN, H.Y., SOMMER, H.E.:** Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of in vitro- and in vivo- developed sweetgum leaves. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **113**(1): 167-171, 1988.
- LEE, D.W., OBERBAUER, S.F., JOHNSON, P., KRISHNAPILAY, B., MANSOR, M., MOHAMAD, H., YAP, S.K.:** Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two southeast asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. - *Amer. J. Bot.* **87**(4): 447-455, 2000.
- LU, C. a ZHANG, J.:** Modification in photosystem II chemistry in senescent leaves of maize plants. - *J. Exp. Bot.* **49**: 1671-1679, 1998.
- LU, Q., WEN, X., LU, C., ZHANG, Q., KUANG, T.:** Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. - *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 749-754, 2003.
- MAKSYMOWYCH, R., DOLLAHON, N., WILLIAMS, R.J., ORKWISZEWSKI, J.A.J.:** Chloroplast division during leaf development of *Xanthium pensylvanicum* Wallr. (Compositae). - *Acta Soc. Bot. Poloniae* **68**(1): 5-7, 1999.
- MANSFIELD, T.A.:** Some aspects of stomatal physiology relevant to plants cultured in vitro. In: **LUMSDEN, P.J., NICHOLAS, J.R., DAVIES, W.J.** (eds.): *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Pp. 120-131. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- MARÍN, J.A., GELLA, R., HERRERO, M.:** Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. - *Ann. Bot.* **62**: 663-670, 1988.
- MAUSETH, J.D.:** *Plant Anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park – Reading – Don Mills, Wokingham – Amsterdam – Sydney – Singapore – Tokyo – Madrid – Bogota – Santiago – San Juan 1988.
- MAXWELL, K., MARRISON, J.L., LEECH, R.M., GRIFFITHS, H., HORTON, P.:** Chloroplast acclimation in leaves of *Guzmania monostachia* in response to high light. - *Plant Physiol.* **121**: 89-95, 1999.
- MOTT, K.A., MICHAELSON, O.:** Amphistomy as an adaptation to high light intensity in *Ambrosia cordifolia* (Compositae). - *Amer. J. Bot.* **78**(1): 76-79, 1991.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.:** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant.* **15**: 473-497, 1962.
- MUSTÁRDY, L., GARAB, G.:** Granum revisited. A three-dimensional model – where things fall into place. - *Trends Plant Sci.* **8**(3): 117-122, 2003.

- MYERS, D.A., JORDAN, D.N., VOGELMANN, T.C.:** Inclination of sun and shade leaves influences chloroplast light harvesting and utilization. – *Physiol. Plant.* **99**: 395-404, 1997.
- NAVARRO, C., TEISSON, C., CÔTE, F., GANRY, J.:** Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plantlets (*Musa* AAA, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. – *Sci. Hort.* **60**: 41-54, 1994.
- NGUYEN, Q.T., KOZAI, T., NIU, G., NGUYEN, U.V.:** Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO₂ concentrations and light intensities. – *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* **55**: 133-139, 1999.
- NGUYEN, Q.T., KOZAI, T., HEO, J., THAI, D.X.:** Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. – *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **66**: 217-225, 2001.
- NIYOGI, K.K.:** Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 333-359, 1999.
- PACOVSKÁ, D.:** Vliv světla na fotosyntézu u rostlin tabáku v podmínkách *in vitro*. – Diplomová práce. Katedra fyziologie rostlin PŘF UK, Praha 1996.
- PANDEY, S. KUSHWAHA, R.:** Leaf anatomy and photosynthetic acclimation in *Valeriana jatamansi* L. grown under high and low irradiances. – *Photosynthetica* **43(1)**: 85-90, 2005.
- PORRA, R.J., THOMPSON, W.A., KRIEDEMANN, P.E.:** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. – *Biochim. Biophys. Acta* **975**: 384-394, 1989.
- POSPÍŠILOVÁ, J., SOLÁROVÁ, J., ČATSKÝ, J.:** Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation. – *Photosynthetica* **26(1)**: 3-18, 1992.
- POSPÍŠILOVÁ, J., TICHÁ, I., KADLEČEK, P., HASEL, D., PLZÁKOVÁ, Š.:** Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. – *Biol. Plant.* **45(4)**: 481-497, 1999.
- POSSINGHAM, J.V., LAWRENCE, M.E.:** Controls to plastid division. – *Int. Rev. Cytol.* **84**: 1-56, 1983.
- POSSINGHAM, J.V., SAURER, W.:** Changes in chloroplast number per cell during leaf development in spinach. – *Planta (Berl.)* **86**: 186-194, 1969.
- POWLES, S.B.:** Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. – *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 15-44, 1984.

- PREECE, J.E., SUTTER, E.G.:** Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: **DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H.** (eds): Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht-Boston-London 1991.
- PSARAS, G.K., DIAMANTOPOULOS, G.S., MAKRYPOULIAS, C.P.:** Chloroplast arrangement along intercellular air spaces. - *Israel J. Plant Sci.* **44**: 1-9, 1996.
- PYKE, K.A.:** The genetic control of plastid division in higher plants. - *Amer. J. Bot.* **84(9)**: 1017-1027, 1997.
- PYKE, K.A.:** Plastid division and development. - *The Plant Cell* **11**: 549-556, 1999.
- PYKE, K.A., LEECH, R.M.:** Rapid image analysis screening procedure for identifying chloroplast number mutants in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*(L.) Heynh. - *Plant Physiol.* **96**: 1193-1195, 1991.
- RADOCHOVÁ, B., VIČÁNKOVÁ, A., KUTÍK, J., TICHÁ, I.:** Leaf structure of tobacco *in vitro* grown plantlets as affected by saccharose and irradiance. - *Biol. Plant.* **43(4)**: 633-636, 2000.
- RAWSON, H.M., HACKETT, C.:** An exploration of the carbon economy of the tobacco plant. III. The gas exchange of leaves in relation to position on the stem, ontogeny, and nitrogen content. - *Aust. J. Plant Physiol.* **1**: 551-560, 1974.
- RAWSON, H.M., CRAVEN, C.L.:** Stomatal development during leaf expansion in tobacco and sunflower. - *Aust. J. Bot.* **23**: 253-261, 1975.
- ROHÁČEK, K.:** Chlorophyll fluorescence parameters: the definition, photosynthetic meaning, and mutual relationships. - *Photosynthetica* **40(1)**: 13-29, 2002.
- RUSSELL, A.W., CRITCHLEY, C., ROBINSON, S.A., FRANKLIN, L.A., SEATON, G.G.R., CHOW, W.S., ANDERSON, J.M., OSMOND, C.B.:** Photosystem II regulation and dynamics of the chloroplast D1 protein in *Arabidopsis* leaves during photosynthesis and photoinhibition. - *Plant Physiol.* **107**: 943-952, 1995.
- SEON, J.-H., CUI, Y.-Y., KOZAI, T., PAEK, K.-Y.:** Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmania glutinosa* plantlets during acclimatization. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **61**: 135-142, 2000.
- SERRET, M.D., TRILLAS, M.I., MATAS, J., ARAUS, J.:** Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **45**: 1-16, 1996.
- SERRET, M.D., TRILLAS, M.I., MATAS, J., ARAUS, J.L.:** The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **47**: 217-230, 1997.

- SERRET, M.D., TRILLAS, M.I.: Effects of light and sucrose levels on anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro*. - *Int. J. Plant Sci.* **161(2)**: 281-289, 2000.
- SERRET, M.D., TRILLAS, M.I., MATAS, J., ARAUS, J.L.: The effect of photoautotrophy on photosynthesis and photoinhibition of gardenia plantlets during micropropagation. - *Photosynthetica* **39(2)**: 245-255, 2001.
- SHA VALLI KHAN, P.S., KOZAI, T., NGUYEN, Q.T., KUBOTA, C., DHAWAN, V.: Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **71**: 141-146, 2002.
- SHA VALLI KHAN, P.S., KOZAI, T., NGUYEN, Q.T., KUBOTA, C., DHAWAN, V.: Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. - *Biol. Plant.* **46(2)**: 161-166, 2003.
- SCHIEFTHALER, U., RUSSELL, A.W., BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., CRITCHLEY, C.: Photoregulation and photodamage in *Schefflera arboricola* leaves adapted to different light environments. - *Aust. J. Plant Physiol.* **26**: 485-494, 1999.
- SCHREIBER, U., SCHLIWA, U., BILGER, W.: Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. - *Photosynth. Res.* **10**: 51-62, 1986.
- SMITH, J.E., LONGSTRETH, D.J.: Leaf expansion and carbon assimilation in cotton leaves grown at two photosynthetic photon flux densities. - *Amer. J. Bot.* **81(6)**: 711-717, 1994.
- SMITH, M.A.L., PALTA, J.P., McCOWN, B.H.: Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown asian white birch. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **111(3)**: 437-442, 1986.
- SMITH, W.K., VOGELMANN, T.C., DELUCIA, E.H., BELL, D.T., SHEPHERD, K.A.: Leaf form and photosynthesis. - *BioScience* **47(11)**: 785-793, 1997.
- SPURR, A.R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. - *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-43, 1969.
- STAEHELIN, L.A., VAN DER STAAY, G.W.M.: Structure, Composition, Functional Organization and Dynamic Properties of Thylakoid Membranes. In: ORT, D.R. and YOCUM, C.F. (eds.): Oxygenic Photosynthesis. The Light Reactions, pp. 11-30, Kluwer Academic Publishers, 1996.
- SUTTER, E.: Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **113(2)**: 234-238, 1988.
- SUTTER, E., LANGHANS, R.W.: Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot Tipp culture. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **104(4)**: 493-496, 1979.

- SZABÓ, I., BERGANTINO, E., GIACOMETTI, G.M.:** Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. - *EMBO Reports* **6(7)**: 629-634, 2005.
- ŠANTRŮČEK, J., ŠIFFEL, P., POLIŠENSKÁ, M., PEŠKOVÁ, H.:** Species-specific response of the photosynthetic apparatus of tobacco and potato to low CO₂ concentrations. - *Photosynthetica* **25(2)**: 203-209, 1991.
- ŠESTÁK, Z.:** Chlorophylls and Carotenoids during Leaf Ontogeny. - In: ŠESTÁK, Z. (ed): Photosynthesis during Leaf Development. Pp. 76-106. Academia, Praha 1985.
- ŠESTÁK, Z., ČATSKÝ, J.:** Leaf development – terms and photosynthetic aspects. In: ŠESTÁK, Z. (ed): Photosynthesis during Leaf Development. Pp. 11-15. Academia, Praha 1985.
- ŠESTÁK, Z., ŠIFFEL, P.:** Leaf-age related differences in chlorophyll fluorescence. - *Photosynthetica* **33**: 347-369, 1997.
- ŠESTÁK, Z., TICHÁ, I., ČATSKÝ, J., SOLÁROVÁ, J., POSPÍŠILOVÁ, J., HODÁŇOVÁ, D.:** Integration of Photosynthetic Characteristics during Leaf Development. - In: ŠESTÁK, Z. (ed): Photosynthesis during Leaf Development. Pp. 263-286. Academia, Praha 1985.
- TICHÁ, I.:** Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. 7. Stomata density and sizes. - *Photosynthetica* **16**: 375-471, 1982.
- TICHÁ, I.:** Ontogeny of Leaf Morphology and Anatomy. - In: ŠESTÁK, Z. (ed): Photosynthesis during Leaf Development. Pp. 16-50. Academia, Praha 1985.
- TICHÁ, I., ČATSKÝ, J., HODÁŇOVÁ, D., POSPÍŠILOVÁ, J., KAŠE, M., ŠESTÁK, Z.:** Gas Exchange and Dry Matter Accumulation during Leaf Development. - In: ŠESTÁK, Z. (ed): Photosynthesis during Leaf Development. Pp. 157-216. Academia, Praha 1985.
- TICHÁ, I.:** Optimization of photoautotrophic tobacco *in vitro* culture: effect of suncaps closures on plantlet growth. - *Photosynthetica* **32(3)**: 475-479, 1996.
- TICHÁ, I., ČÁP, F., PACOVSKÁ, D., HOFMAN, P., HASEL, D., ČAPKOVÁ, V., SCHÄFER, C.:** Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. - *Physiol. Plant.* **102**: 155-162, 1998.
- TRISSEL, H.W., WILHELM, C.:** Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? - *Trends Biochem Sci.* **18**: 415-419, 1993.
- VALLADARES, F., PEARCY, R.W.:** The geometry of light interception by shoots of *Heteromeles arbutifolia*: morphological and physiological consequences for individual leaves. - *Oecologia* **121**: 171-182, 1999.
- VOGELMANN, T.C.:** Plant tissue optics. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 231-251, 1993.

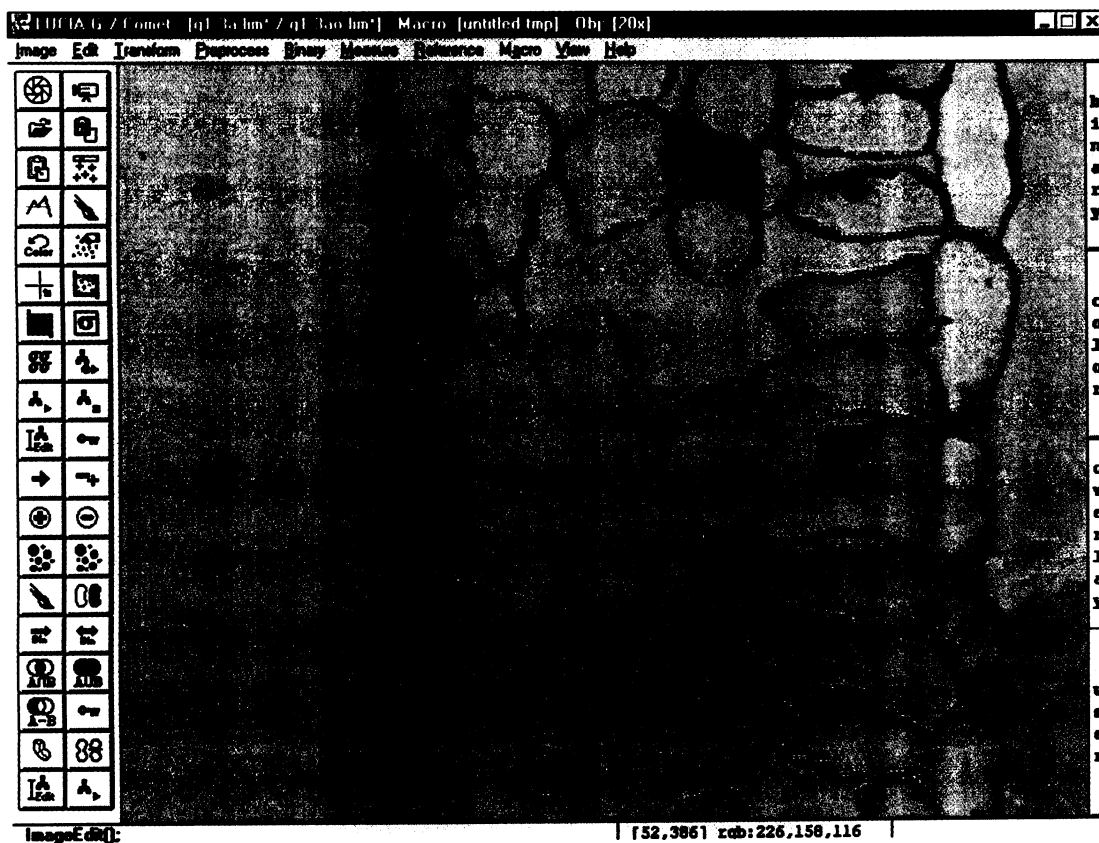
- VOGELMANN, T.C., NISHIO, J.N., SMITH, W.K.:** Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. - *Trends Plant Sci.* **1(2):** 65-70, 1996.
- VOGELMANN, T.C.:** Photosynthesis: Physiological and Ecological Considerations. In: **TAIZ, L., ZEIGER, E. (eds.):** Plant Physiology. Third Edition. Pp. 171-192. Sinauer Associates Publishers, Sunderland 2002.
- WALKER, D.A.:** The use of oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis (2nd impression). Oxygraphics, Sheffield 1990.
- WARDLEY, T.M., BHALLA, P.L., DALLING, M.J.:** Changes in the number and composition of chloroplasts during senescence of mesophyll cells of attached and detached primary leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). - *Plant Physiol.* **75:** 421-424, 1984.
- WELLBURN, A.R.:** The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. - *J. Plant. Physiol.* **144:** 307-313, 1994.
- WETZSTEIN, H.Y., SOMMER, H.E.:** Scanning electron microscopy of *in vitro*-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **108(3):** 475-480, 1983.
- WILD, A., WOLF, G.:** The effect of different light intensities on the frequency and size of stomata, the size of cells, the number, size and chlorophyll content of chloroplasts in the mesophyll and the guard cells during the ontogeny of primary leaves of *Sinapis alba*. - *Z. Pflanzenphysiol.* **97:** 325-342, 1980.
- YANO, S., TERASHIMA, I.:** Developmental process of sun and shade leaves in *Chenopodium album* L. - *Plant Cell Environ.* **27:** 781-793, 2004.
- YOO, S.D., GREER, D.H., LAING, W.A., McMANUS, M.T.:** Changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition in leaves of white clover at different developmental stages. - *Plant Physiol. Biochem.* **41:** 887-893, 2003.
- ZHOU, Y.-H., GUO, D.-P., ZHU, Z.-J., QIAN, Q.Q.:** Effects of *in vitro* rooting environments and irradiance on growth and photosynthesis of strawberry plantlets during acclimatization. - *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **81:** 105-108, 2005.
- ZOBAYED, S.M.A., AFREEN-ZOBAYED, F., KUBOTA, C., KOZAI, T.:** Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. - *In Vitro Cell. Dev. Biol.* - *Plant* **35:** 183-188, 1999a.
- ZOBAYED, S.M.A., ARMSTRONG, J., ARMSTRONG, W.:** Cauliflower shoot-culture: effects of different types of ventilation on growth and physiology. - *Plant Sci.* **141:** 209-217, 1999b.

ZOBAYED, S.M.A., ARMSTRONG, J., ARMSTRONG, W.: Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. - *Plant Sci.* **161**: 537-548, 2001.

8. Přílohy

Makro 1 – pro vytvoření binárního obrazu obrysu řezu (viz. obr. 8.1.)

```
ClearBinary();  
Sharpen();  
Contrast(70,82,247);  
DefineThreshold(0,0,0,140,210,134,0);  
Threshold();  
CleanBinary(1,3);  
ImageEdit();  
CleanBinary(3,3);  
ImageEdit();  
_ImageSaveAs();
```



Obr. 8.1.: Binární obraz obrysu řezu vytvořený pomocí makra číslo 1.

Makro 2 – pro vytvoření binárního obrazu jednotlivých typů pletiv (epidermis, palisádový a houbový parenchym) (viz. obr. 8.2.)

```
BinaryToReference();
_ImageOpen();
ImageEdit();
InvertBinary();
BinaryOperations(1);
ImageEdit();
InvertBinary();
CleanBinary(2,4);
FillHoles();
ImageEdit();
_ImageSaveAs();
```



Obr. 8.2.: Binární obraz palisádového parenchymu vytvořený pomocí makra číslo 2.

Makro 3 – pro skládání binárních obrazů jednotlivých typů pletiv a vytvoření binárního obrazu intercelulár (viz. obr. 8.3.)

```

_ImageOpen();
BinaryToReference();
_ImageOpen();
BinaryOperations(1);
BinaryToReference();
_ImageOpen();
BinaryOperations(1);
BinaryToReference();
_ImageOpen();
BinaryOperations(1);
BinaryToReference();
InvertBinary();
ImageEdit();
_ImageSaveAs();
BinaryOperations(1);
_ImageSaveAs();

```



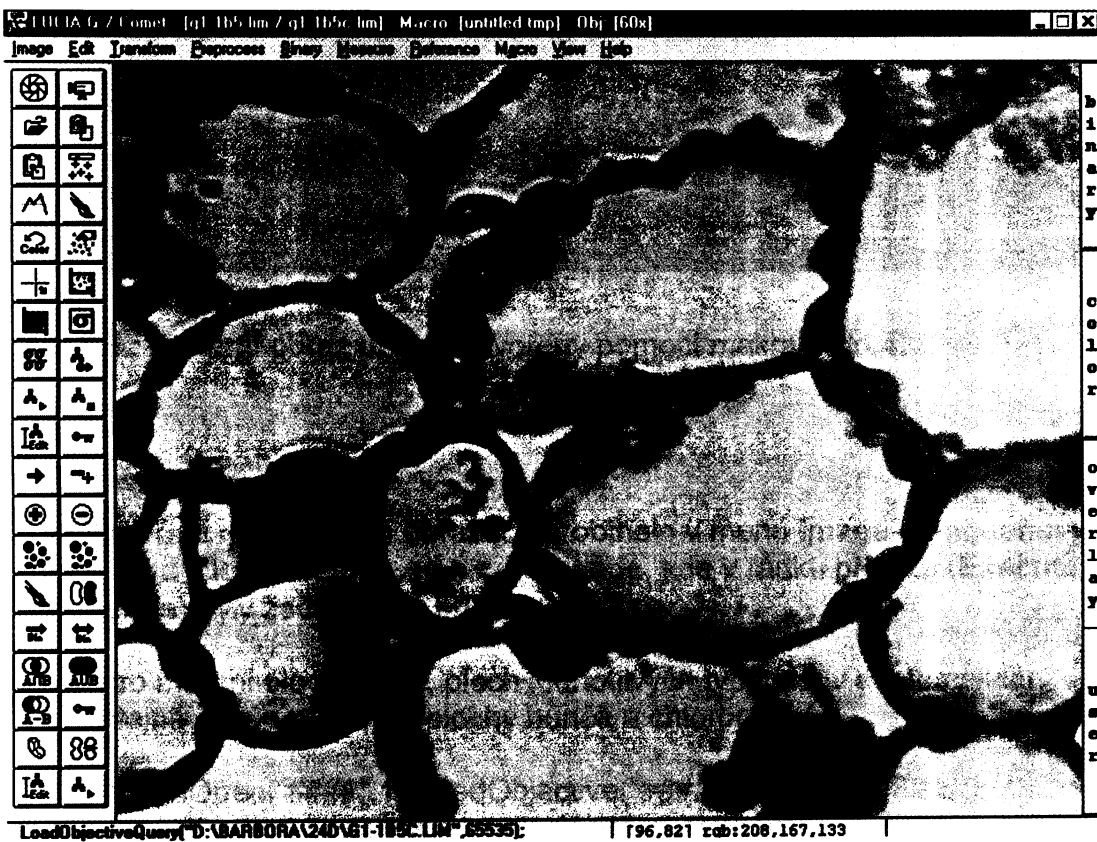
Obr. 8.3.: Binární obraz intercelulár vytvořený pomocí makra číslo 3.

Makro 4 – pro vytváření binárních obrazů chloroplastů a mezofylových buněk (viz. obr. 8.4. a 8.5.)

```

ClearBinary();
Sharpen();
Contrast(70,82,247);
ImageEdit();
FillHoles();
_ImageSaveAs();
ImageEdit();
FillHoles();
_ImageSaveAs();

```



Obr. 8.4.: Binární obraz chloroplastů vytvořený pomocí makra číslo 4.



Obr. 8.5.: Binární obraz buňky vytvořený pomocí makra číslo 4.

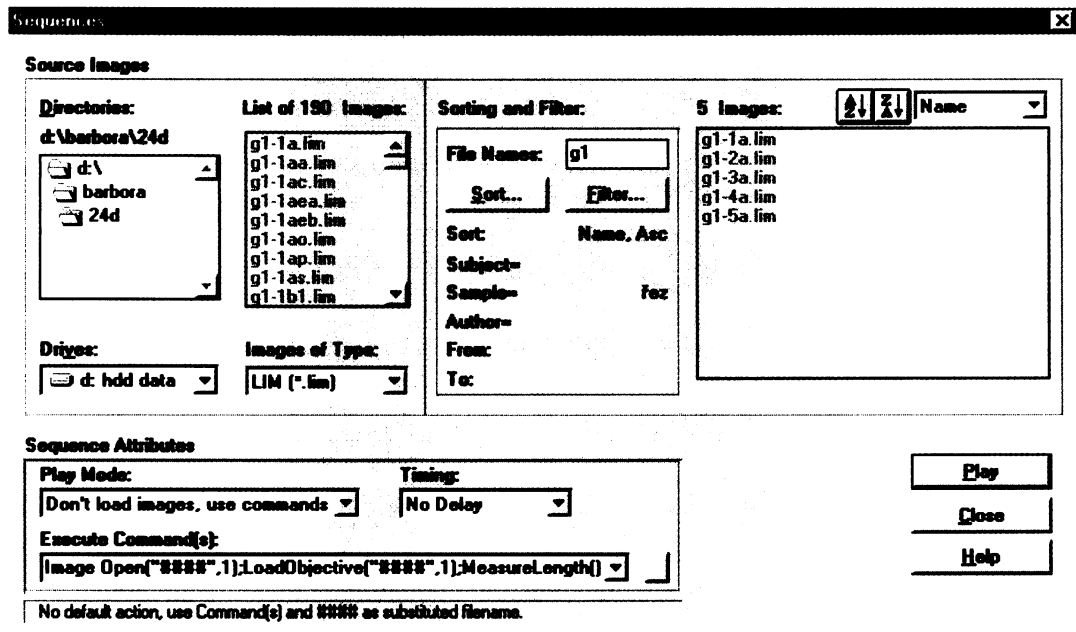
Vlastní měření na binárních obrazech probíhalo v menu **Image**→**Sequences**, v módu **Don't load images, use commands**, kde v řádku příkazů (**Execute Commands**) byly zadány tyto příkazy:

- a) pro měření plochy řezu, ploch jednotlivých typů pletiv a intercelulár, stejně jako pro měření plochy buněk a chloroplastů:

```
ImageOpen("####",1);LoadObjective("####",1);MeasureField();
```

- b) pro měření tloušťky řezu listem a tloušťky jednotlivých typů pletiv na řezu listem) (viz. obr. 8.6.)

```
ImageOpen("####",1);LoadObjective("####",1);MeasureLength();
```



Obr. 8.6.: Dialogové okno menu Sequences pro vlastní měření sérií binárních obrazů.